

# Antioksidacijska svojstva i stabilnost boje autohtonih međimurskih vina i craft piva

---

Žerjav, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:634514>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Marko Žerjav

**ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I  
STABILNOST BOJE AUTOHTONIH  
MEĐIMURSKIH VINA I CRAFT PIVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakultet pod mentorstvom prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

*Od srca zahvaljujem prof. dr. sc. Sunčici Beluhan na pruženoj prilici, uloženom vremenu, strpljenju i neizmjernoj pomoći prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala svim tehničarkama u laboratoriju na trudu i pomoći.*

*Najviše hvala mojoj obitelji čija mi je podrška bila najveći oslonac tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I STABILNOST BOJE AUTOHTONIH MEĐIMURSKIH VINA I CRAFT PIVA

Marko Žerjav, univ. bacc. ing. biotechn. 0058215110

**Sažetak:** U ovom radu ispitivana su antioksidacijska svojstva i stabilnost boje autohtonih međimurskih vina i craft piva. Istraživanja su provedena na tri vrste craft piva (svijetlo, crveno i tamno) te tri autohtona međimurska vina (bijelo, rose i crveno). Cilj je bio utvrditi utjecaj ukupnih polifenola na antioksidacijski kapacitet uzoraka, uz praćenje promjena u udjelu polifenolnih spojeva tijekom vremena. Promatrana je i promjena boje uzoraka tijekom 120 dana skladištenja na temperaturama od 4 °C i 37 °C. Također, praćena je redukcijska snaga uzoraka tijekom normalnog i ubrzanog starenja. Rezultati istraživanja doprinose boljem razumijevanju kvalitativnih promjena u međimurskim vinima i pivu, s naglaskom na stabilnost boje i antioksidacijski potencijal tijekom različitih uvjeta skladištenja i starenja.

**Ključne riječi:** vino, craft pivo, polifenoli, antioksidacijski kapacitet, stabilnost boje

**Rad sadrži:** 53 stranice, 16 slika, 6 tablica, 74 literaturnih navoda, 6 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan (mentor)
3. prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan (član)
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 25. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing  
Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### ANTIOXIDANT PROPERTIES AND COLOR STABILITY OF INDIGENOUS MEĐIMURJE WINES AND CRAFT BEERS

Marko Žerjav, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058215110

**Abstract:** This study investigates the antioxidant properties and color stability of indigenous Međimurje wines and craft beers. The research was conducted on three types of craft beer (light, red, and dark) and three indigenous Međimurje wines (white, rosé, and red). The aim was to determine the impact of total polyphenol content on the antioxidant capacity of the samples, while monitoring changes in polyphenol content over time. The color change of beer samples was also observed during 120 days of storage at temperatures of 4 °C and 37 °C. Additionally, the reduction power of the samples was monitored during normal and accelerated aging. The results contribute to a better understanding of the qualitative changes in Međimurje wines and beers, with an emphasis on color stability and antioxidant potential under different storage and aging conditions.

**Keywords:** wine, craft beer, polyphenols, antioxidant capacity, color stability

**Thesis contains:** 53 pages, 16 figures, 6 tables, 74 references, 6 supplements

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Sunčica, Beluhan, PhD, Full professor

#### Reviewers:

1. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (president)
2. Sunčica, Beluhan, PhD, Full professor (mentor)
3. Vesna, Zechner-Krpan, PhD, Full professor (member)
4. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 25<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. VINARSTVO I PIVARSTVO U MEĐIMURJU.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. BIOAKTIVNI SASTOJCI VINA I PIVA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI..</b>	<b>6</b>
<b>2.4. NEFLAVONOIDNI POLIFENOLI U VINU I PIVU .....</b>	<b>6</b>
2.4.1. Hidroksicinaminske kiseline.....	7
2.4.2. Hidroksibenzojeve kiseline .....	7
2.4.3. Stilbeni .....	8
2.4.4. Hidrolizabilni tanini .....	8
<b>2.5. FLAVONOIDNI SPOJEVI .....</b>	<b>9</b>
2.5.1. Flavan-3-oli i kondenzirani tanini .....	9
2.5.2. Flavoni, flavonoli i flavanoni.....	10
2.5.3. Antocijanini.....	10
<b>2.6. UTJECAJ TEHNOLOGIJE NA POVEĆANJE FENOLNIH SPOJEVA.....</b>	<b>11</b>
2.6.1. Sirovine .....	12
<b>2.7. PROMJENE TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE .....</b>	<b>15</b>
<b>2.8. DOZRIJEVANJE, STARENJE I SKLADIŠTENJE .....</b>	<b>15</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>20</b>
3.1.1. Uzorci piva i vina uporabljeni u radu.....	20
3.1.2. Kemikalije i aparatura uporabljeni u radu.....	20
<b>3.2. METODE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Kemijska određivanja kakvoće piva.....	20
3.2.2. Kemijska određivanja kakvoće vina.....	22
3.2.3. Analitičke metode .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. KEMIJSKI SASTAV PIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. KEMIJSKI SASTAV VINA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA SVIJETLOG, CRVENOG I TAMNOG PIVA ....</b>	<b>31</b>
4.3.1. Istraživanje udjela polifenola u pivu .....	31
4.3.2. Istraživanja udjela polifenola u uzorcima vina.....	40
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>45</b>



## 1. UVOD

Vino i pivo pojavljuju se sa samim počecima ljudske djelatnosti u poljoprivredi te je vino svoju primjenu nalazilo u raznim terapijama i liječničkim tretmanima, dok je pivo bilo neizostavan dio prehrane. Oba su pića iznimno složena po pitanju sastojaka, a na konačnu kakvoću konačnog proizvoda utječe čitav niz čimbenika, od kakvoće sirovina, kvasca, fermentativnih uvjeta, mikrobiološkog statusa, uvjeta starenja, te načina čuvanja. Osim po svom specifičnom okusu, vino i pivo ističu se i po tome što sadrže brojne bioaktivne sastojke, poput antioksidanta, te je zbog toga i naglasak raznih istraživanja stavljen upravo na njihov nutritivni profil. Većina istraživačkih studija podržava tezu da se umjerenom konzumacijom crvenog vina i crvenih i tamnih piva pozitivno utječe na smanjenje bolesti povezanih s kardiovaskularnim sustavom. Svojim antioksidacijskim djelovanjem u pivu i vinu posebno se ističu fenolni spojevi te mnogi od njih imaju utjecaj na kardiovaskularne i kronične degenerativne bolesti (Mozaffarian i sur., 2018). Crveno vino i pivo prilično su različitog fenolnog profila i udjela, ponajviše zbog primjene različitih sirovina u proizvodnji tih pića. Velik je značaj prisutnih fenolnih spojeva u vinu i pivu, s obzirom da njihova prisutnost utječe i na konačnu kakvoću gotovog proizvoda te utječu na dužinu i trajanje transporta i skladištenja, kao i na stabilnost okusa i boju piva.

U oba pića sastav fenolnih spojeva varira i ovisi o brojnim uvjetima, ponajprije o genetskim čimbenicima sirovina i okolišnim uvjetima tijekom uzgoja, ali i o tehnološkim uvjetima. Što se tiče piva, udjel antioksidacijskih sastojaka najviše ovisi o sladu i hmelju jer otprilike 70 % tih spojeva potječe iz slada, a ostatak iz hmelja. Osnovna podjela piva temelji se na procesu fermentacije te se stoga piva mogu podijeliti na lager, ale i lambic piva (Capece i sur., 2018). Lager piva najviše se konzumiraju, a proizvode se pri nižim temperaturama fermentacije (6 – 15 °C), za razliku od ale piva koja se proizvode fermentacijom pri 16 – 24 °C. Lambic piva rezultat su spontane fermentacije združene kulture bakterija i kvasaca.

Kao sirovina za proizvodnju vina koristi se grožđe, a s obzirom na boju uporabljenog grožđa, vina se dijele na bijela, rose i crvena. Osnovna i najbitnija razlika u njihovoj proizvodnji jest činjenica da se za proizvodnju crvenih vina provodi i postupak maceracije, odnosno ekstrakcija boje i ostalih spojeva iz kožice grožđa, dok se kod proizvodnje bijelih vina za fermentaciju koristi groždani sok koji nije prošao postupak maceracije. Kod proizvodnje rose vina, provodi se tek ograničeni kontakt s kožicom grožđa s ciljem ekstrakcije boje i ostalih fermentabilnih tvari. Upravo postupak maceracije prilikom proizvodnje crvenih vina u konačnici najviše utječe na ukupni udjel fenolnih spojeva u vinu, s obzirom da se maceracijom ekstrahiraju fenolni spojevi iz grožđa. Zbog toga crvena vina sadrže veći udio antioksidacijskih tvari u odnosu na bijela vina. Još jedan značajan korak u proizvodnji vina predstavlja i odležavanje vina u drvenim

bačvama, čime se također povećava udjel polifenolnih spojeva.

Sve veća kompetitivnost na tržištu piva i vina, ali i činjenica da su potrošači sve više orijentirani pićima koja im pružaju određene zdravstvene benefite, samo su neki od katalizatora sve većeg razvoja novih tehnologija s ciljem povećanja udjela antioksidacijskih spojeva u vinu i pivu.

Cilj ovog rada bio je usporediti naizgled neusporedivo; a to su antioksidacijska svojstva, te promjene boje tijekom skladištenja autohtonih međimurskih craft piva i vina. Vino je oduvijek poznato kao izvrstan izvor antioksidanata, posebice crveno i piće Bogova koje se ispija uz delicije, a pivo samo kao „piće za običan puk“, te su napravljena sljedeća određivanja:

- kemijskog sastava svijetlog, crvenog i tamnog piva,
- kemijskog sastava bijelog, rose i crvenog vina,
- stabilnosti i intenziteta boje piva tijekom skladištenja,
- promjene boje bijelog vina tijekom skladištenja, te ubrzani test posmeđivanja bijelog vina,
- udjela ukupnih polifenola u pivu i vinu,
- antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom,
- redukcijske snage istraživanih piva i vina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. VINARSTVO I PIVARSTVO U MEĐIMURJU

Međimurje, smješteno na krajnjem sjeveru Hrvatske između rijeka Drave i Mure, odlikuje se bogatstvom prirodnih resursa, plodnim zemljištem te povoljnom klimom. Ove značajke ovu regiju čine pogodnom za poljoprivredu, a naročito za vinogradarstvo. Poznato i kao "cvjetnjak Hrvatske", Međimurje se ističe svojim blagim brežuljcima i bogatom vegetacijom, što daje dodatan doprinos razvoju poljoprivrednih djelatnosti, uključujući vinogradarstvo i pivarstvo (Varga, 2016).

Vinogradarstvo u Međimurju ima dugogodišnju tradiciju koja datira još iz srednjeg vijeka te prvi pisani zapisi o uzgoju vinove loze potječu iz tog razdoblja, kada su na padinama međimurskih brežuljaka počeli nicati prvi vinogradi. Međimursko vinarstvo razvijalo se pod utjecajem raznih kultura i naroda koji su prolazili kroz ovaj kraj, a proizvodnja vina ubrzo je postala i značajan dio lokalne ekonomije.

Među sortama koje se uzgajaju u Međimurju, posebno se ističu graševina, pušipel (autohtona sorta koja se smatra jednim od simbola međimorskog vinogradarstva), sauvignon, pinot sivi i žuti muškat. Kakvoća međimurskih vina rezultat je primjene suvremenih tehnika vinifikacije u kombinaciji s tradicionalnim znanjem. Ova vina prepoznata su i nagrađivana na nacionalnim i međunarodnim razinama te su međimurska vina na nedavno održanom uglednom natjecanju *Decanter World Wine Awards* u Londonu osvojila čak 29 medalja, od kojih je 15 njih pripalo vinima autohtone sorte pušipel. Značajno mjesto u turističkoj ponudi Međimurja zauzima „Međimurska vinska cesta,” koja povezuje brojne vinarije i omogućava posjetiteljima upoznavanje s bogatom vinarskom kulturom regije (slika 1).

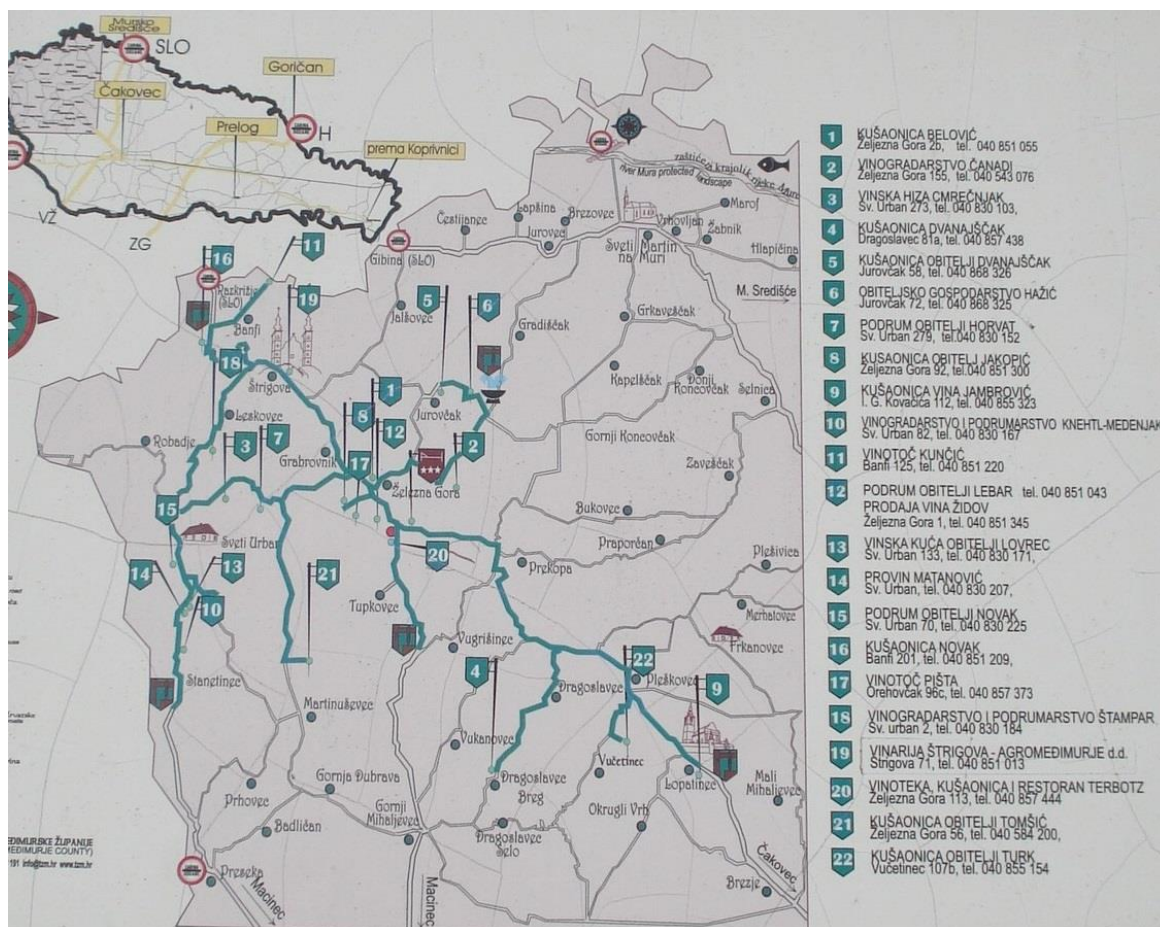
Pivarstvo u Međimurju datira još iz vremena Zrinskih, a sam Nikola VII. Zrinski imao je knjigu koja opisuje metode kuhanja piva s eksperimentalnim sastojcima (Varga, 2016). Craft pivarstvo u Međimurju relativno je novija pojava, ali je brzo steklo značajan interes. U posljednjih desetak godina, Hrvatska je svjedočila porastu popularnosti zanatskih piva, a Međimurje je postalo jedno od središta ovog trenda. Craft pivarstvo u Međimurju karakterizira primjena specifičnih sastojaka i inovativnih proizvodnih metoda, što rezultira unikatnim pivskim proizvodima.

Najistaknutija craft pivovara u regiji je *Međimurski Lepi Dečki* iz Čakovca, a osnovana je 2016. godine. Njihova piva, kao što su „Međimursko Pale Ale” i „Čakovečko” odlikuju se jedinstvenim aromama i okusima, čime se ističu na hrvatskom tržištu piva. Spomenuta pivovara također aktivno sudjeluje u radu lokalne zajednice, organizirajući događanja i edukativne radionice, čime doprinosi promociji i razvoju kulture craft pivarstva u regiji.

Vinarstvo i craft pivarstvo u Međimurju djeluju sinergistički, oba sektora značajno pridonose jačanju prepoznatljivosti i promociji regije kao važne eno-gastronomske destinacije.

Zajedničkim manifestacijama i međusobnom suradnjom vinarije i pivovare obogaćuju kulturni i turistički život Međimurja, te se regija ističe kao područje koje uspješno spaja tradiciju i inovaciju u proizvodnji alkoholnih pića.

Međimurje, zahvaljujući svom povijesnom naslijeđu, povoljnim geografskim uvjetima i inovativnim pristupima u proizvodnji vina i piva, predstavlja regiju značajnu za hrvatsku eno-gastronomsku ponudu. Tradicija vinarstva ovdje se uspješno nadograđuje modernim tehnikama, dok craft pivarstvo unosi novinu i osvježanje u lokalnu industriju pića.



Slika 1. Međimurska vinska cesta (Varga, 2016)

## 2.2. BIOAKTIVNI SASTOJCI VINA I PIVA

Najveću skupinu prirodnih antioksidacijskih tvari vina i piva čine polifenoli, a riječ je o velikoj skupini spojeva koji se mogu podijeliti u dvije grupe: flavonoide i neflavonoide. Skupinu neflavonoida čine polifenolni spojevi koji mogu biti u obliku fenolnih kiselina, stilbena, lignana, halkona i tanina (Callemien i Collin, 2010). Razlika u prisutnosti i udjelu određenih fenolnih spojeva kod vina i piva očekivana je s obzirom na primjenu različitih sirovina i tehnoloških

procesa.

Oba su pića iznimno popularna i znatno se konzumiraju, a benefite njihove umjerene konzumacije podupiru i podaci iz znanstvenih literatura. Polifenoli crvenog vina i piva, osim što djeluju kao antioksidanti, djeluju i protuupalno te daju doprinos obrani od aterosklerotskih bolesti (Snopek i sur., 2018). Antioksidanti prisutni u pivu pozitivno utječu na određene bolesti te na kardiovaskularni i imunološki sustav te je potvrđeno da konzumacija bezalkoholnog piva pozitivno utječe na smanjenje sistoličkog krvnog tlaka i upalnih biomarkera, poput homocisteina (Redondo i sur., 2018). Torres i suradnici (2015) objavili su da je umjerenom konzumacijom vina, u odnosu na ostala alkoholna pića, došlo do povećanja antioksidacijskog kapaciteta kod mladih i zdravih ispitanika koji su pritom konzumirali ishranu bogatu mastima. To je u korelaciji s fenomenom „francuski paradoks“, koji ukazuje da svakodnevna, umjerena konzumacija crvenog vina pridonosi nižoj učestalosti koronarnih bolesti srca, unatoč prehrani bogatoj zasićenim masnim kiselinama. Međutim, pretjerana konzumacija alkoholnih pića povezana je s razvojem kroničnih bolesti i drugim ozbiljnim problemima koji predstavljaju rizik od smrtnosti (Lim i sur., 2012).

Pozitivni učinak pojedinačnih polifenolnih spojeva na ljudsko zdravlje javlja se pri koncentracijama višim od onih u pivu i vinu, što sugerira sinergističko djelovanje više različitih polifenola. Na osnovu literaturnih podataka, pivo sadrži veći udio *p*-kumarinske kiseline i svih hidroksibenzojevih kiselina, no svi ostali polifenolni spojevi u većem su broju prisutni u crvenom vinu nego u pivu. Flavonoli su, kao važne bioaktivne komponente, u epidemiološkim istraživanjima pokazali pozitivan učinak protiv raka i kardiovaskularnih bolesti (Giovinazzo i Grieco, 2015). Koncentracije sva tri prisutna flavonola (kvercetin, miricetin i kempferol) dosta su veće u crvenom vinu nego u pivu. S korisnim svojstvima vina u vezu se najčešće dovode stilbeni, a posebice resveratrol koji djeluje antioksidacijsko, protuupalno, kardioprotektivno, a djeluje i protiv raka. Udio stilbena u vinu i pivu nije usporediv te ih, prema literaturnim podacima, u pivu gotovo i nema. Flavoni također pokazuju biološku aktivnost, a primjenu nalaze i u tretmanu neurodegenerativnih poremećaja i koronarnih bolesti srca. Grupi antioksidacijskih agensa pripadaju i flavanoni, no njihova je koncentracija u pivu i vinu prilično niska. Tanini su također pokazali sposobnost hvatanja radikala te protuupalnu i antioksidativnu aktivnost, a udio kondenziranih tanina poprilično je visok u crvenom vinu. Osim dosad nabrojanih polifenolnih spojeva u pivu je moguće pronaći i određene koji nisu prisutni u vinu, ali i obratno. Od spojeva prisutnih u pivu posebno se ističu ksantohumul i melanoidin te oba spoja pokazuju antimikrobna svojstva. Od fenolnih spojeva s biološkom aktivnošću u vinu se ističu i antocijanini. Najčešće prisutni antocijanini u crvenom vinu su malvadin-3-glukozid i malvadin-3-galaktozid, a oba spoja djeluju sinergistički i pokazuju protuupalnu aktivnost (Huang i sur., 2014).

### **2.3. ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI**

Antioksidacijska aktivnost piva uglavnom je određivana primjenom elektronske paramagnetske rezonancije, a metoda se temelji na spinskom hvatanju radikala formiranih pri 60 °C (Kunz i sur., 2014). Spektroskopske metode najčešće su primjenjivane metode u vinarstvu za određivanje antioksidacijske aktivnosti i udjela ukupnih polifenola. Spektrofotometrija se koristi za praćenje smanjenja apsorbancije do koje dolazi jer prisutni antioksidanti hvataju radikale dodane u uzorak. U svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta koriste se različiti radikali, a najčešće se primjenjuju DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) i ABTS (2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina). Spektrofotometrija omogućava praćenje redukcijske aktivnosti fenolnih spojeva u vinu; primjenom FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode koja se temelji na fenolno posredovanoj regeneraciji željeznog(III) iona u željezni(II) ion te CUPRAC metode koja se temelji na regeneraciji bakrovog(II) iona u bakrov(I) ion (Ozyurek i sur., 2011). Iako su te metode osnova za evaluaciju antioksidacijske aktivnosti i udjela fenolnih spojeva, također su prisutne i elektrokemijske tehnike za određivanje antioksidacijske aktivnosti vina, poput diferencijalne pulsne voltametrije i cikličke voltametrije (Šeruga i sur., 2011). Ricci i suradnici (2019) proučavali su analitičke pristupe primjenom protočno-injekcijskih sustava sa sekvencijskim detektorom s nizom dioda i elektrokemijskim amperometrijskim detektorom te su došli do zaključka da je takav protočno-injekcijski sustav koristan i uspješno primjenjiv za određivanje antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola u vinu. Primjenom amperometrijskog biosenzora na bazi tirozinaze određen je polifenolni indeks u vinu i uzorcima piva te je postignuta dobra analitička učinkovitost ovog biosenzora, a kao referenca za polifenole korištena je kafeinska kiselina (Garcia-Guzman i sur., 2018). Elektroanalitičke tehnike pokazale su se kao dobra alternativa, s obzirom na brze rezultate, visoku osjetljivost, nepotrebnost obrade uzoraka i nisku cijenu. Osim toga, kombiniranom primjenom elektroanalitičkih tehnika i enzima moguće je postići dobru selektivnost prilikom određivanja polifenolnog indeksa (Garcia-Guzman i sur., 2018).

Usporedbom prikupljenih podataka kod primjene istih metoda zaključuje se da vino ima veći udio ukupnih polifenola i veću antioksidativnu aktivnost.

### **2.4. NEFLAVONOIDNI POLIFENOLI U VINU I PIVU**

Neflavonoidne fenolne spojeve vina čine tri osnovne grupe spojeva, a to su dvije vrste fenolnih kiselina (cinaminska i benzoinska) i stilbeni (Niculsecu i sur., 2017). Pivo također sadrži neflavonoidne polifenole, a to su monofenoli, halkoni (ksantohumol) i resveratrol (Wannenmacher i sur., 2018). U oba pića fenolne kiseline prisutne su u obliku (hidroksi-)

benzojevih i (hidroksi-) cinaminskih kiselinskih derivata, a dodatno se mogu podijeliti ovisno o vrsti supstituenta na prstenu. Najveći dio detektiranih fenolnih kiselina u pivu nalazi se u vezanom obliku kao esteri, glikozidi i ostali vezni kompleksi. U vinu se te fenolne kiseline često nalaze u obliku estera vinskih kiselina, ali i u slobodnom obliku ili esterificirane etanolom i antocijaninima. Također, u vinu hidroksibenzojeve i hidroksicinaminske kiseline djeluju kao kopigmenti.

#### 2.4.1. Hidroksicinaminske kiseline

Hidroksicinaminske kiseline u oba pića ne utječe na miris i okus, no njihova je važnost u tome što djeluju kao prekursori za hlapive fenolne spojeve (Habschied i sur., 2020). Prema literaturnim podacima, ferulinska i p-kumarinska kiselina najzastupljenije su kiseline u pivu (Piazzon i sur., 2010). Hidroksicinaminske kiseline potječu od upotrijebljenih sirovina za proizvodnju piva, slada i hmelja. Uostalom, ferulinska i p-kumarinska kiselina prevladavaju u ječmenom sladu te njihova koncentracija ovisi o uvjetima okoline i fermentacije, ali i o obradi ječma nakon žetve. Habschied i suradnici (2020) odredili su udio kafeinske i p-kumarinske kiseline u različitim tipovima piva te zaključili da je udio kafeinske kiseline najniži od svih ostalih fenolnih spojeva. Također su objavili da svijetla i tamna piva imaju najniži udio p-kumarinske kiseline, za razliku od crnih piva kod kojih je taj udio veći. Vrijedi spomenuti i da se hidroksicinamati u pivu mogu pronaći i u konjugiranom obliku s poliamidima, hidroksicinaminskim kiselinskim amidima ili fenolamidima, a ti se spojevi mogu pojaviti u glikoziliranom obliku ili kao derivati hidroksiliranog agmatina.

Hidroksicinaminske kiseline mogu biti prisutne u slobodnom obliku ili vezanom obliku kao esteri vinske kiseline. Te kiseline čine većinu neflavonoidnih spojeva u crvenom vinu te većinu fenolnih spojeva u bijelom vinu. Esteri vinske kiseline podložni su djelomičnoj hidrolizi tijekom procesa alkoholne fermentacije, što rezultira nastankom njihovog slobodnog oblika. Udio kafeinske, kumarinske i ferulinske kiseline u grožđu, grožđanom soku i vinu ovisi o samom grožđu, odnosno sorti, te o okolišnim uvjetima uzgoja, ali i uvjetima berbe grožđa.

#### 2.4.2. Hidroksibenzojeve kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline imaju klasičnu C6-C1 strukturu te pripadaju grupi fenolnih spojeva. Najčešće prisutne hidroksibenzojeve kiseline u pivu su salicilna, p-hidroksibenzojeva, vanilinska i galna kiselina, dok su u vinu pretežito zastupljene p-hidroksibenzojeva, siringinska, vanilinska i galna kiselina. Poseban je naglasak stavljen na određivanje udjela galne kiseline u pivu, jer, s obzirom na izrazitu podložnost te kiseline degradaciji i oksidaciji, dokazano je da ta

kiselina može imati ulogu indikatora oksidacije tijekom proizvodnje piva (Socha i sur., 2017). Utvrđeno je da je galna kiselina zastupljenija u lager pivima u odnosu na ostale tipove piva (Moura i sur., 2016). Galna kiselina, baš kao i u pivu, smatra se i najvažnijom kiselinom u vinu, s obzirom da je upravo ta kiselina prekursor hidrolizabilnih tanina. Nadalje, zbog prisustva tri hidroksilne grupe ta je kiselina snažni antioksidant, a duži postupak maceracije u proizvodnji crnih vina rezultira višim koncentracijama te kiseline. Ukupni udio hidroksibenzojevih kiselina u vinima iznosi do 218 mg/L (Castaldo i sur., 2019).

#### 2.4.3. Stilbeni

Resveratrol je jedan od najznačajnijih predstavnika iz grupe neflavonoidnih spojeva, a ističe se svojim pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje. Što se tiče njegove strukture, resveratrol posjeduje dva fenolna prstena, međusobno povezana stirenskom dvostrukom vezom te može postojati u *cis*- i *trans*- konformaciji. Također se može naći i u obliku 3-beta-glukozida i *trans*- i *cis*-piceida. Objavljene vrijednosti koncentracije ovog spoja znatno su niže u pivu u odnosu na vino, a posebno u odnosu na crveno vino. Koncentracije oba izomera prisutna u vinu, *cis*- (0,1-7 mg/L) i *trans*- (0,7-6,5 mg/L), ovise o sorti grožđa, podneblju, proizvodnim tehnikama i vrsti vina (Nour i sur., 2012). Koncentracija resveratrola detektirana je u manjem udjelu i kod bezalkoholnih piva, lager piva te *ale* piva, a kao razlog toga navodi se činjenica da je određena količina resveratrola prisutna u hmelju koji se dodaje u procesu hmeljenja (Cheiran i sur., 2019).

#### 2.4.4. Hidrolizabilni tanini

Tanini čine važnu skupinu fenolnih spojeva, posebice u crvenom vinu, s obzirom da utječu na senzorne karakteristike vina, a uključeni su i u reakcije povezane s posmeđivanjem bijelog vina. S obzirom na kemijsku strukturu dijele se u dvije skupine, a to su kondenzirani tanini (proantocijanidini) i hidrolizabilni tanini. Kondenzirani tanini prisutni su i u grožđu i u vinu. Hidrolizabilni tanini sastavni su dio hrastovih bačvi te su stoga prisutni u vinu koje dozrijeva u takvim bačvama. Koncentracije tanina u crvenom vinu kreću se od 1,1 do 3,4 g/L (Castaldo i sur., 2019).

Prekursor i osnovna jedinica hidrolizabilnih tanina jest galna kiselina i njezini derivati poput elaginske kiseline. Te kiseline često su esterificirane šećerima poput glukoze ili, rjeđe, kvininskom ili šikiminskom kiselinom. Zbog esterifikacije molekulska masa tih spojeva iznosi i do 2800 Da. Hidrolizabilni tanini obično se ekstrahiraju iz hrastovih bačvi tijekom dozrijevanja vina u istima, a uglavnom je riječ o ekstrakciji elagitanina. Koncentracije tih tanina variraju,



ovisno o tipu drva, no obično se kreću u rasponu 0,4 – 50 mg/L (Basalekou i sur., 2019). Kod piva su također prisutni hidrolizabilni tanini te oni potiču od hmelja i slada.

## 2.5. FLAVONOIDNI SPOJEVI

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu fenolnih spojeva te čak 85 % ukupnih fenola u vinu pripada flavonoidima (Markoski i sur., 2016). Osnovna struktura flavonoida temelji se na tri prstena: dva aromatska i jednom centralnom prstenu s kisikom. S obzirom na supstituciju piranskog prstena i stupanj oksidacije, flavonoidi se mogu podijeliti u više skupina, poput flavonola, flavona, flavanola, flavana, flavanonola, flavanona, antocijanina, antocijanidina te halkona i dihidrohalkona (Escobar-Cevoli i sur., 2017). I pivo i vino sadrže većinu tih spojeva, no postoji spoj koji je prisutan u pivu, ali ne i u vinu, a riječ je o ksantohumolu i produktu njegove ciklizacije, izoksanthumolu. Oba ta spoja pokazuju antikancerogeno djelovanje. Ksantohumol pripada skupini preniliranih halkona, a koncentracija u pivu ovisi o proizvodnoj tehnici te načinu hmeljenja te ona u komercijalnim pivima iznosi oko 0,2 mg/L. Prenilflavonoidi utječu na aromu i okus piva, posebice tamnih piva, a u pivu njihova koncentracija varira od 0,002 do 0,628 mg/L (Andres-Iglesias i sur., 2014).

### 2.5.1. Flavan-3-oli i kondenzirani tanini

Flavanoli su spojevi prisutni u obliku jednostavnih monomera, ali i polimera. Najpoznatije i najznačajnije molekule iz te grupe spojeva su katehin i njegov enantiomer, epikatehin. Oni su prekursori za sintezu proantocijanidina koji pak utječe na trpkost vina i piva (Markoski i sur., 2016). Koncentracije tih spojeva u pivu kreću se od 1 do 20 mg/L, dok su u vinu te koncentracije dosta više i kreću se od 50 do 120 mg/L. U nekim specijalnim i jako starim crnim vinima udio katehina može iznositi i do 1000 mg/L (Cabrera-Banegil i sur., 2016). Katehin i epikatehin nalaze se u peteljci, sjemenki i kožici grožđa te posljedično i u vinu, a slična je situacija i s pivom kod kojeg katehini dospijevaju putem upotrijebljenih sirovina, točnije slada i hmelja. Osim monomernih oblika, u pivu se također nalaze i njihovi esteri s galnim kiselinama (katehin galati), dok su derivati katehina (epigalokatehin, galokatehin, epigalokatehin galat i epikatehin galat) detektirani u vinu.

Proantocijanidini su fenolni spojevi te strukturno predstavljaju oligomere flavan-3-ola, a poznati su i kao kondenzirani tanini, iako se u pivarskoj industriji često upotrebljava naziv „antocijanogeni“ (Wannenmacher i sur., 2018). Ti fenolni spojevi prisutni su u svim dijelovima bobice grožđa, a u vino dospijevaju tijekom obrade grožđa, maceracije i alkoholne fermentacije. Proantocijanidini posebno su zanimljivi u pivarskoj industriji, s obzirom da se dovode u vezu s

nastankom mutnoće te je utvrđeno da se s povećanjem molekulske mase proantocijanidina povećava i mutnoća piva. Također se ističe i njihov snažan antioksidativni kapacitet te potencijalni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje, osobito na kardiovaskularne bolesti i rak (McCullough i sur., 2012). Prodelfinidini i procijanidini nalaze se i u pivu i u vinu te predstavljaju najzastupljenije kondenzirane tanine u grožđu i vinu. Proantocijanidini iznimno su važni za senzorska svojstva vina s obzirom da utječu na trpkost i gorčinu vina, a imaju ulogu i u dozrijevanju i starenju vina.

### 2.5.2. Flavoni, flavonoli i flavanoni

Zajednička karakteristika ove grupe fenolnih spojeva jest prisutnost 4-keto skupine. Flavoni imaju tri funkcionalne grupe, karbonilnu i dvije hidroksilne, a unutar flavonoidne strukture postoji i dvostruka veza. Prisutni su u kožici grožđa te u vinu i to u obliku aglikona ili u obliku glikozida. Prisutni su u prilično niskim koncentracijama, osim luteolina čija se koncentracija u grožđu kreće od 0,2 do 1 mg/L (Cabrera-Banegil i sur., 2016). Poznato je da flavoni imaju značajne biološke karakteristike pogodne za ljudsko zdravlje, uključujući antitumorno, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (Singh i sur., 2014). Većina tih spojeva u pivu najvjerojatnije potječe od ječma. Uz flavone, pivo također sadrži i njihove izomere, odnosno izoflavone, a u tu skupinu pripadaju daidzein, genistein, formononetin i biohanin A.

Karakteristična funkcionalna skupina flavonola jest hidroksilna grupa na trećem ugljikovom atomu te se upravo zbog toga često nazivaju 3-hidroksiflavoni. U crvenom vinu nalaze se u obliku aglikona, poput kempferola, kvercetina, rutina i miricetina, te glikozida, poput galaktozida, glukoronida, glukozida i diglikozida. Njihova koncentracija u vinu varira u rasponu od 12,7 do 130 mg/L (Cabrera-Banegil i sur., 2016). Biološka aktivnost tih spojeva pozitivno utječe na kardiovaskularni sustav. Usporedbom dostupnih literaturnih podataka zaključuje se da je vino bogatije ovim fenolnim spojevima u odnosu na pivo.

Što se tiče flavanona, pivo sadrži četiri prenilflavanona, a to su: izoksantohumol (najzastupljeniji, u koncentraciji 0,04 – 3,44 mg/L), 6-prenilnaringenin, 8-prenilnaringenin i 6-geranilnaringenin (Andres-Iglesias i sur., 2014). Izoksantohumol nastaje izomerizacijom ksantohumola tijekom procesa vrenja.

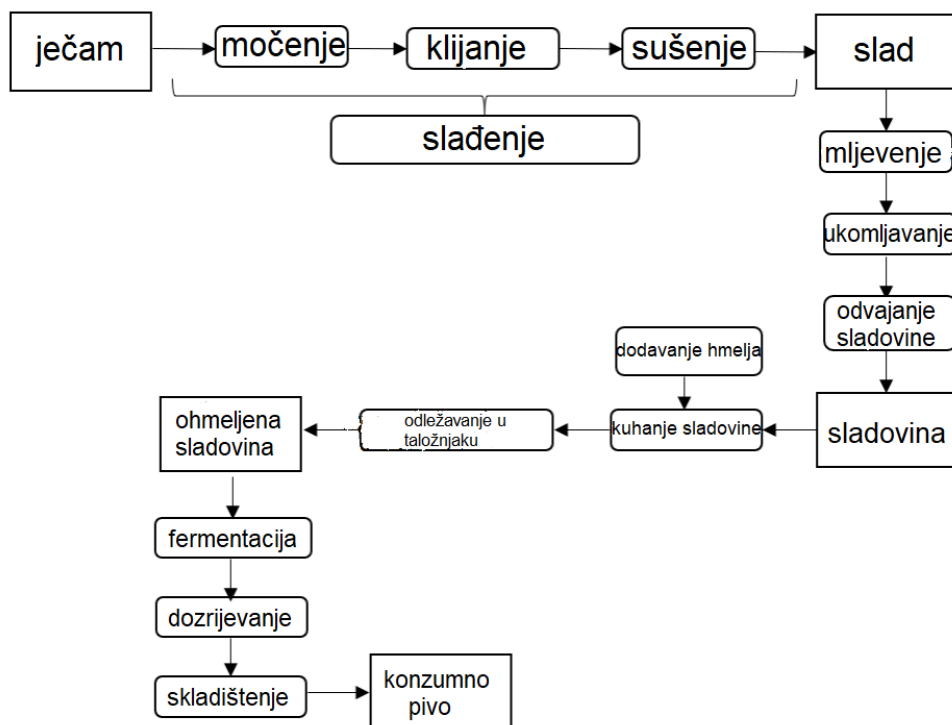
### 2.5.3. Antocijanini

Prema dostupnim literaturnim podacima, ova skupina fenolnih spojeva zastupljena je u vinu, dok za njezino prisustvo u pivu još uvijek nema objavljenih podataka. Antocijanini ističu se svojom aktivnošću protiv određenih bolesti, posebice protiv koronarnih bolesti srca (Cassidy i

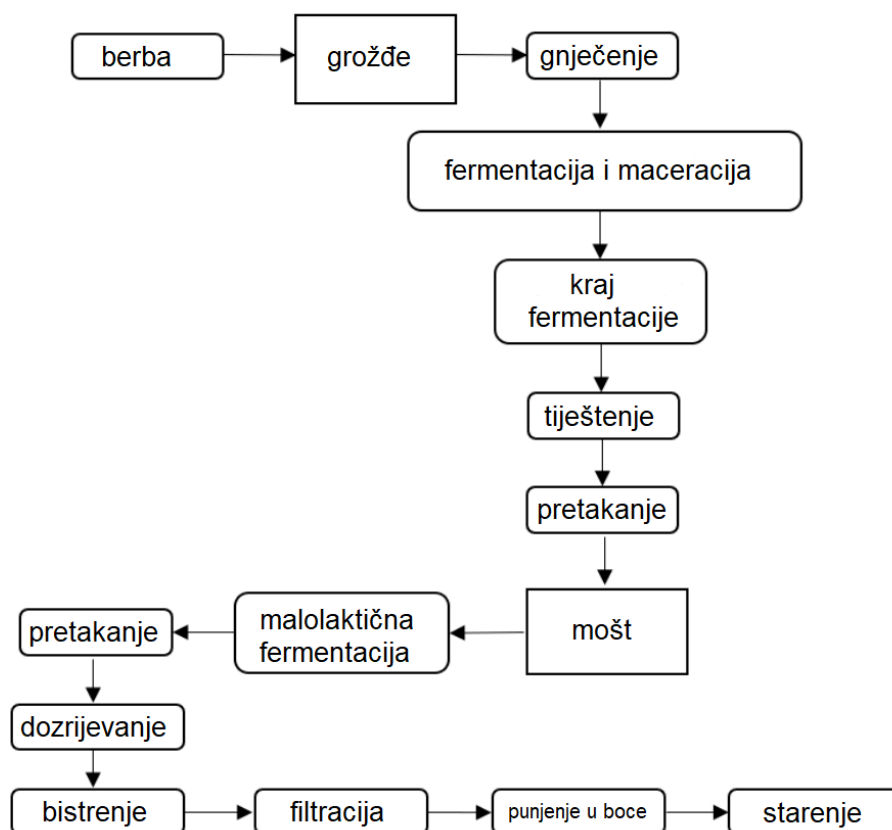
sur., 2016). S obzirom na kemijsku strukturu, antocijanini predstavljaju glikozilirani oblik antocijanidina te sadrže flavilijev kation s vezanim metoksilnim i hidroksilnim grupama. Antocijanini su zaslužni za boju grožđa i vina, a u crvenom je vinu detektirano slijedećih šest skupina antocijanina: cinadin, malvidin, peonidin, petunidin, delphinidin i pelargonidin te njihovi 3-O-monoglukozidi. Antocijanini se uglavnom nalaze u kožici grožđa, a malvadini su iznimno zastupljeni u vrsti *Vitis vinifera*. Na udio antocijanina utječu sorta grožđa, okolišni uvjeti, klimatski uvjeti, podneblje, ali i tehnika proizvodnje vina, prvenstveno postupak maceracije. Antocijanini igraju ulogu u brojnim važnim reakcijama, poput polimerizacije, oksidacije te formiranja novih pigmenata tijekom proizvodnje i starenja vina. Ukupni udio antocijanina najčešće varira od 32,5 do 1011 mg/L, ovisno o sorti grožđa (Šućur i sur., 2016).

## 2.6. UTJECAJ TEHNOLOGIJE NA POVEĆANJE FENOLNIH SPOJEVA

Grožđe je jedina sirovina koja se koristi za proizvodnju vina, dok se za proizvodnju piva upotrebljavaju slad (često uz dodatak neslađenih sirovina poput riže, šećera, kukuruza i pšenice), voda i hmelj. Za proizvodnju oba pića ključna je alkoholna fermentacija te se za njenu provedbu obično koriste komercijalni suhi kvasci. Redoslijed osnovnih postupaka i tehnologija korištenih u proizvodnji piva i vina prikazan je na slikama 2 i 3.



**Slika 2.** Redoslijed tehnoloških postupaka u proizvodnji piva



**Slika 3.** Redoslijed tehnoloških postupaka u proizvodnji vina

### 2.6.1. Sirovine

Kao što je već ranije spomenuto, udio fenolnih spojeva u grožđu ovisi o sorti grožđa, podneblju (klima, lokacija vinograda, vrsta tla), primijenjenim tehnikama proizvodnje, berbi i dozrijevanju vina. Kao posljedica klimatskih promjena danas je iznimno zahtjevno i izazovno proizvesti zdravo grožđe, koje nije prezrelo i koje je postiglo optimalnu zrelost. Klimatske promjene značajno utječu na dozrijevanje grožđa, te je stoga u podnebljima sa suhim i vrućim uvjetima proces dozrijevanja grožđa puno brži te takvo grožđe sadrži veći udio šećera, a manji udio fenolnih spojeva, što posljedično rezultira vinima koje sadrže adstringentne i „zelene“ tanine (Hannah i sur., 2013). Kako bi se taj problem reducirao, razvijene su neke nove agrikulturalne tehnike, poput prorjeđivanja grozdova i defolijacije, a pokazalo se da se primjenom tih metoda može povećati sinteza antocijanina i flavonida. Osim tih metoda, ponekad se primjenjuju i elicitori za koje je dokazano da ima utjecaj na povećanje udjela resveratrola (Giacosa i sur., 2019).

Osnovni sastojci piva od kojih potječu fenolni spojevi su žitarice (uglavnom ječam) i hmelj.

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) pripada porodici trava te se za slađenje i proizvodnju piva najčešće primjenjuje dvoredni ječam. Oko 70 – 80 % fenolnih spojeva u pivu potječe od ječma, unatoč činjenici da ječmeni slad sadrži manje fenolnih spojeva od hmelja (Almaguer i sur., 2014). Od fenolnih spojeva prisutnih u ječmu, najzastupljenije su fenolne kiseline (u slobodnom i vezanom obliku). No, isto kao i kod grožđa, na sastav i udio fenolnih spojeva u ječmu utječu sorta ječma i podrijetlo. Tako su i rezultati određenih istraživanja pokazali da je ukupni udio fenolnih spojeva značajno veći u oljuštenim sortama ječma. Slad ima veći utjecaj na antioksidativnu aktivnost piva od hmelja (Leitao i sur., 2012). Također, ječmeni je slad najznačajniji izvor škroba u procesu proizvodnje piva. Postupak proizvodnje slada uključuje slijedeće korake: močenje, klijanje i sušenje (pečenje). U fazi močenja, kao posljedica ispiranja fenolnih spojeva, smanjuje se udio tih spojeva, no njihov se udio povećava tijekom klijanja i sušenja. Varijacijom parametara tijekom slađenja, poput stupnja vlaženja i trajanja i temperature klijanja, moguće je utjecati i prilagoditi kvalitetu slada. Munoz-Insa i suradnici (2016) zaključili su da postoji pozitivna korelacija između temperature klijanja i udjela ukupnih fenola, ali i negativna korelacija između povećanja stupnja vlaženja i udjela ukupnih fenolnih spojeva. Wannemacher i suradnici (2018) su zaključili da slad s većim udjelom proteina daje pivo s izraženijom antioksidacijskom aktivnošću.

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je biljka koja pripada porodici *Cannabaceae*, a u pivo se dodaje u maloj količini s ciljem postizanja željene arome i gorčine. Također, posjeduje i antibiotička i antifungalna svojstva. Sadrži brojne antioksidacijske spojeve koji mogu biti smolasti, poput preniliranih halkona i alfa-kiselina, ali i nesmolasti, poput flavonoida i fenolnih kiselina (Wannenmacher i sur., 2018). Ksantohumul predstavlja najznačajniji spoj zastupljen unutar tvrde hmeljne smole, a uz njega je, u puno nižim koncentracijama, prisutno i još 13 ostalih spojeva koji pripadaju skupini preniliranih halkona (Stevens i Page, 2004). Također je potvrđeno da se ksantohumul nalazi isključivo u hmelju, dok se ostali prenilflavonoidi mogu pronaći i u drugim biljnim porodicama. Od polifenolnih spojeva prisutnih u hmelju ističu se flavanoli, proantocijanidini, flavanol glikozidi i fenolne kiseline. Jerkovic i Collin (2007) proučavali su ukupni udio trans-resveratrola i trans-piceida te je u 40 hmeljnih uzoraka detektirana koncentracija koja je varirala od 0,5 do 11,7 mg/kg. Također su zaključili da značajan utjecaj na udio stilbenoida u hmelju ima godina berbe, ali i to da sorte hmelja s nižim udjelom alfa-kiselina obično sadrže veći udio stilbenoida. Osim sorte i uvjeta uzgoja, na udio polifenolnih spojeva u hmelju utječe i vrsta hmeljnog proizvoda. Hmelj se uglavnom prerađuje u hmeljne ekstrakte, hmeljne pelete i izomerizirane proizvode. Tijekom proizvodnje hmeljnih peleta, sirovi se hmelj podvrgava postupku sušenja i mljevenja, čime se zapravo malo smanjuje udio polifenolnih spojeva, dok sam proces peletizacije nema utjecaja na promjenu u udjelu polifenola (Krofta i sur., 2008). Također je utvrđeno da trajanje skladištenja ima utjecaj na koncentraciju polifenola

u hmelju, a Mikyška i Krofta (2012) su proveli istraživanje i objavili da se udio polifenola u hmelju poprilično smanjio tijekom skladištenja hmelja koje je trajalo dvanaest mjeseci. Što se tiče hmeljnog ekstrakta, sastav i koncentracija polifenolnih spojeva ovise o otapalu za ekstrakciju. Tako je hmeljni ekstrakt dobiven primjenom superkričnog CO<sub>2</sub> bogatiji u udjelu ksantohumola, s obzirom da su flavanoni i ostali prenilirani halkoni netopivi u tom otapalu (Steenackers i sur., 2015).

Postupak koji se provodi prije alkoholne fermentacije jest ukomljavanje i kuhanje sladovine s dodanim hmeljem. Tijekom tog procesa dolazi do promjene u udjelu ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva te se stoga u obzir moraju uzeti svi čimbenici koji utječu na te promjene. Slad se najprije podvrgava postupku mljevenja, a postoje dva osnovna tipa mljevenja: suho i vlažno. Vlažnim postupkom mljevenja dolazi do smanjenja u udjelu ukupnih fenola i ferulinske kiseline (Szwajgier, 2012). Dobivena sladna prekrupa miješa se s vodom te se taj postupak zove ukomljavanje, a cilj je prevesti što više netopljivih sastojaka sladne prekrupe u topljivi oblik. Ukomljavanje se može provesti na dva načina; prvi uključuje postepeno zagrijavanje komine u skladu s optimalnom aktivnošću enzima koji provode oštećenje, a drugi način uključuje odvajanje dijela komine i njezino zagrijavanje u drugom kotlu i potom vraćanje u komovnjak gdje se nalazi ostatak komine koja se posljedično zagrijava. Na oslobađanje fenolnih kiselina utječu temperatura i trajanje ukomljavanja te gustoća komine. Vanbeneden i suradnici (2008) utvrdili su da optimalna temperatura cinamoil esteraze iznosi 30 °C, dok optimalna temperatura za oslobađanje ferulinske kiseline iznosi 40 °C. Također su zaključili da sitnije mljevena krupica i duže vrijeme ukomljavanja rezultiraju većim udjelom ferulinske kiseline u sladovini. Nakon ukomljavanja slijedi postupak odvajanja sladovine od tropa, a to se postiže primjenom kominskih filtera ili cjednjaka (bistrenika). Primjenom cjednjaka uočeno je veće smanjenje udjela fenolnih spojeva u odnosu na kominski filter. Odvojena se sladovina potom kuha i dodaje se hmelj. S ciljem postizanja željene gorčine, hmelj se može dodati na samom početku kuhanja sladovine ili na kraju, pa čak i tijekom odležavanja u taložnjaku (virpulu). Odležavanje u taložnjaku (virpulu) provodi se nakon kuhanja i hmeljenja, s ciljem izdvajanja toplog taloga i dobivanja bistre sladovine. Tijekom tog procesa smanjuje se udio fenolnih spojeva zbog njihove adsorpcije na topli talog. Ispostavilo se da kasniji dodatak hmelja pozitivno utječe na oksidativnu stabilnost piva (Kunz i sur., 2014). Raniji dodatak hmelja i duže kuhanje sladovine rezultirali su smanjenjem u udjelu fenolnih spojeva (Wannenmacher i sur., 2018). Kasnijim dodatkom hmelja postignut je veći udio ukupnih polifenola, neizomeriziranih alfa-kiselina i antocijanogena, poput flavan-3,4-diola (Kunz i sur., 2014). Wannemacher i suradnici (2018) proučavali su utjecaj različitih hmeljnih proizvoda i režima hmeljenja na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidativni potencijal piva te su zaključili da pivo kod kojeg je hmelj dodan naknadno tijekom odležavanja u taložnjaku (virpulu) sadrži veći udio ukupnih fenola, kao i veći udio individualnih fenolnih

spojeva. Također, piva kod kojih je hmelj dodan tijekom odležavanja u taložnjaku dobila su bolje senzorske ocjene. Tijekom kuhanja sladovine potrebno je 15 do 30 minuta za oslobađanja flavonoida iz hmelja u sladovinu.

## **2.7. PROMJENE TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE**

Tijekom alkoholne fermentacije grožđa, osobito crnog, ekstrahiraju fenolni spojevi iz grožđa. Osim odabrane sorte grožđa, na taj proces utječe čitav niz mikrobioloških i tehnoloških čimbenika, poput kvasca, enzima i temperature. Tijekom alkoholne fermentacije u vinu dolazi do povećanja u udjelu polifenolnih spojeva, za razliku od piva gdje se taj udio tijekom fermentacije smanjuje (Fumi i sur., 2011).

Utvrđeno je da soj kvasca koji se koristi za fermentaciju, osim što ima veliki utjecaj na senzorske karakteristike vina, utječe i na sadržaj polifenola. Grieco i suradnici (2019) proučavali su utjecaj autohtonih kvasaca s grožđa sorte Primitivo i Negroamaro iz regije Apulia te su detektirali značajno veću koncentraciju stilbena u vinima obje sorte kod kojih jer fermentacija bila provedena autohtonim kvascima u odnosu na ista vina, ali kod kojih je fermentacija bila provedena komercijalnim kvascem. Udio fenolnih kiselina u vinima dobivenim fermentacijom s komercijalnim kvascem također je manji u odnosu na vina dobivena fermentacijom s autohtonim kvascima, a slična je situacija i s udjelom flavonola. Osim kvascem, na udio polifenolnih spojeva u vinu može se utjecati i još nekim čimbenicima. Uočeno je da je veći udio fenolnih spojeva prisutan nakon alkoholne fermentacije provedene u fermentoru u odnosu na tradicionalnu vinifikaciju u PVC bačvama, a dodatak tanina grožđa, enzima i hrastovih strugotina rezultirao je u povećanju udjela ukupnih polifenola, antocijanina i flavan-3-ola (Raičević i sur., 2017). Također, trajanje postupka maceracije također utječe na udio antocijanina te na boju vina, pa su tako u vinima s kraćim trajanjem maceracije zapaženi slabija boja vina i niži udio antocijanina (Bautista-Ortin i sur., 2007).

## **2.8. DOZRIJEVANJE, STARENJE I SKLADIŠTENJE**

Dozrijevanje i starenje predstavljaju važne korake u proizvodnji piva i vina, a promjene do kojih dolazi tijekom tih procesa prvenstveno se odražavaju na boju i senzorska svojstva. Promjena boje povezana je sa smanjenjem udjela antocijanina. Tijekom starenja vina, antocijanini se kovalentno vežu s ostalim spojevima vina pri čemu se formiraju piroantocijanini te dolazi do reakcija polimerizacije, a novonastali spojevi pozitivno utječu na stabilnost vina. Odabir posude za odležavanje i starenje, osim što utječe na udio i sastav fenola u vinu, utječe i na senzorne karakteristike vina. Za dozrijevanje vina koristi se širok spektar posuda, raznih oblika i

materijala, poput nehrđajućeg čelika i drva. Nehrđajući čelik ističe se dobrom propusnošću kisika i lakom kontrolom temperature, a najčešće se primjenjuje za čuvanje jeftinijih vina, prije samog punjenja u boce. S druge strane, visokokvalitetna vina najčešće dozrijevaju u drvenima bačvama, a tijekom dozrijevanja u takvim bačvama vino postupno, blago oksidira, a određeni spojevi drveta se ekstrahiraju u vino. Na dozrijevanju utječu veličina bačve i temperatura, pa je tako u manjim bačvama dozrijevanje brže, dok niža temperatura usporava dozrijevanje (Grainger i Tattersall, 2016). Od spojeva koji se nalaze u hrastovom drvetu bačve ističu se hemiceluloza, celuloza, lignin i elagitanini, a prisutni su i fenoli manje molekulske mase te hlapivi spojevi. Ti se spojevi tijekom dozrijevanja ekstrahiraju u vino te je upravo to glavni razlog za odabir drvenih bačvi za dozrijevanje vina. Elagitanini, koji se ekstrahiraju u vino tijekom dozrijevanja u hrastovim bačvama, utječu na trpkost i gorčinu vina, a imaju i antioksidacijsko djelovanje (Garcia-Estevéz i sur., 2017). Elagitanini također reagiraju s antocijaninima te s njima stvaraju stabilne komplekse, a mogu interferirati i s flavonoidima te takvi kompleksi pokazuju antioksidativnu aktivnost. Najtradicionalnije i najčešće korišteno drvo za izradu bačvi je hrastovo drvo. Koncentracije spojeva u hrastu variraju ovisno o vrsti hrasta, podrijetlu, uvjetima sušenja i „toastinga“ (izlaganje drveta vatri). Jeremic i suradnici (2020) ispitivali su antioksidativnu aktivnost enoloških tanina (procijanidini iz sjemenke i kožice grožđa), elagitanina iz hrastovog drveta te galotanina u komercijalnom Chianti crvenom vinu. Zaključili su da je potrošnja kisika bila najveća nakon što su dodani elagitanini, što predstavlja učinkovito sredstvo u proizvodnji vina u trenucima kada je potrebna trenutna zaštita od oksidacije, međutim učinak elagitanina na potrošnju kisika brzo opada s vremenom te to predstavlja najveću prepreku za njihovu uporabu.

Uočeno je da se u pivskoj proizvodnji, nakon fermentacije i dozrijevanja, udio fenolnih spojeva smanjio za čak 17 %, kao posljedica adsorpcije tih spojeva na hladni talog i kvasac. Pivo je u biološkom smislu stabilan proizvod, no njegov rok trajanja nije neograničen, ponajviše zbog promjene okusa i koloidne stabilnosti. Uvjeti skladištenja, ponajviše svjetlost i temperatura, imaju veliki utjecaj u starenju piva tijekom kojeg dolazi do smanjenja u udjelu  $\alpha$ -kiselina. Osim promjena u udjelu  $\alpha$ -kiselina, udio fenolnih spojeva također se mijenja tijekom starenja piva, točnije, smanjuje se. Tijekom skladištenja smanjuju se i koncentracije flavanola (katehin i epikatehin), prodelfinidina i proantocijanidina B3. Tijekom jednogodišnjeg skladištenja piva pri 20 °C uočeno je značajno smanjenje udjela malih flavonoidnih spojeva (Callemien i Collin, 2007). Prenilirani flavonoidi odlikuju se velikom stabilnošću u pivu tijekom skladištenja, pa je tako njihova koncentracija u pivu i nakon desetogodišnjeg skladištenja približno jednaka kao i u svježem pivu. Uočeno je i smanjenje koncentracije ksantohumola u pivu tijekom skladištenja, za razliku od izoksantohumola čija se koncentracija povećala (Heuberger i sur., 2012).

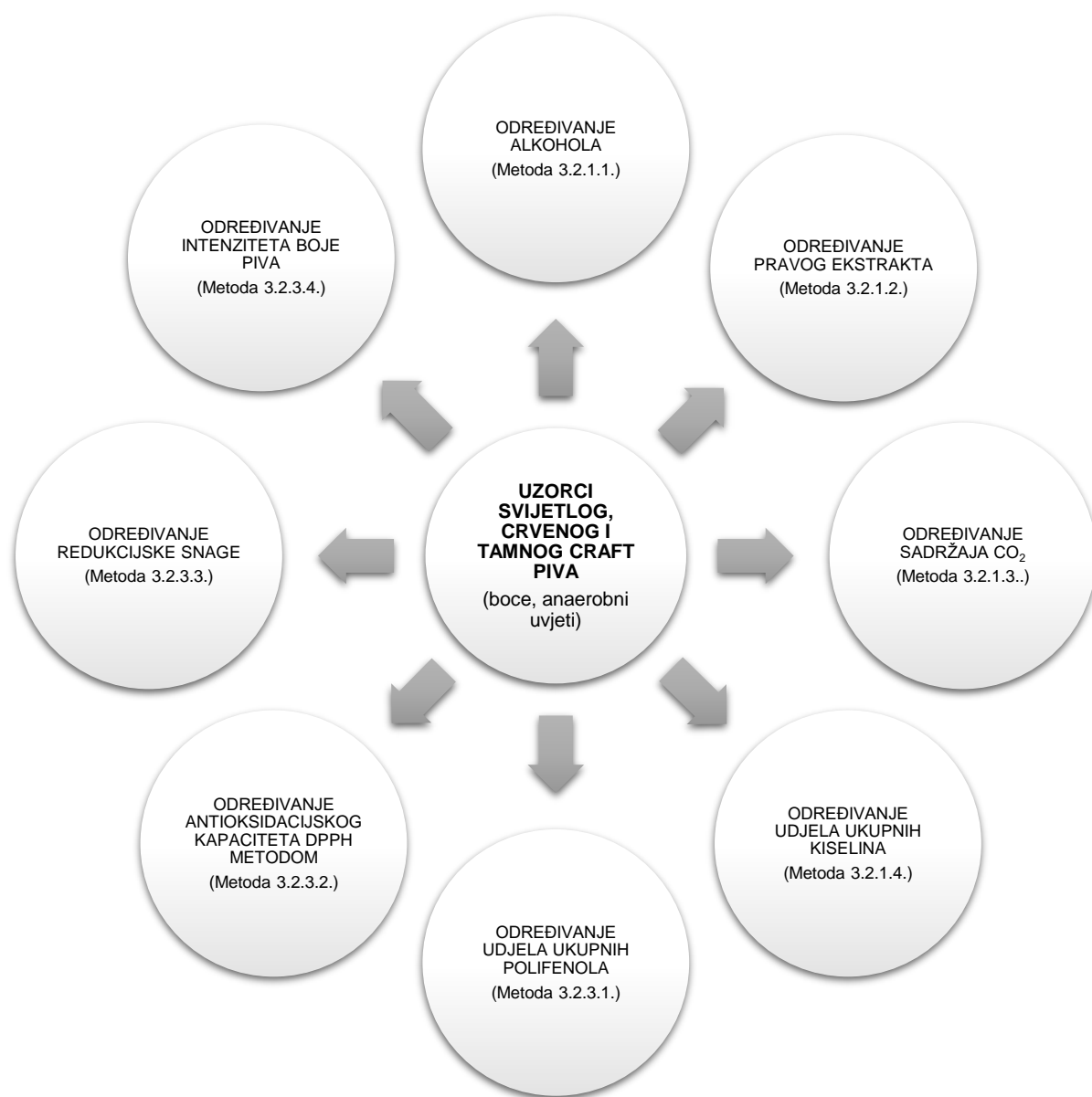
Industrija craft piva globalno brzo raste te je postigla izniman uspjeh i u zemljama koje nisu



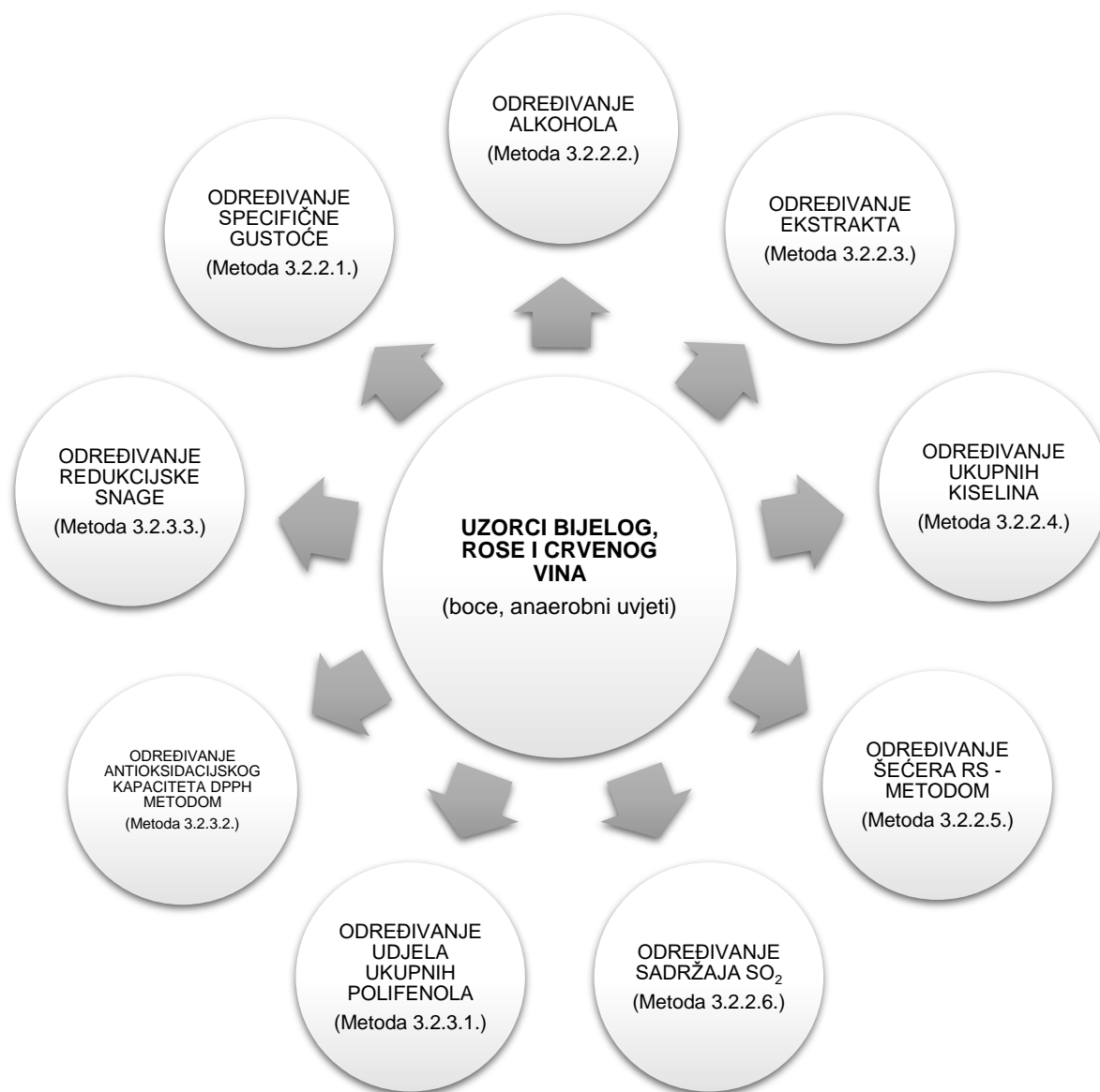
tradicionalni proizvođači piva. Posebnost i jedinstvena vrijednost craft piva krije se u dodatku nekih novih sastojaka tradicionalnim sirovinama; sladu, hmelju, vodi i kvascu. Veljović i suradnici (2012) su utvrdili da je primjenom fermentativne smjese groždanog mošta i sladovine moguće proizvesti specijalni tip piva s većim udjelom ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na komercijalna svijetla piva. U drugom je istraživanju analiziran utjecaj dodatka različitih vrsta voća (trešnja, breskva, marelica, malina, šljiva, grožđe, jabuka i naranča) na udio polifenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost piva (Nardini i Garaguso, 2020). Većina voćnih piva posjeduje veću antioksidativnu aktivnost i viši udio polifenolnih spojeva te sva voćna piva sadrže veći udio katehina i kvercetina. Udio polifenolnih spojeva u pivu s dodanim mangom čak je 44 % veći u usporedbi s pivom bez manga (Gasinski i sur., 2020). Sve te studije ukazuju da dodatak raznih voća povećava udio polifenolnih spojeva i antioksidativnu aktivnost piva, ali i pozitivno utječe na organoleptička svojstva piva.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu provedena su istraživanja uzoraka svijetlog, crvenog i tamnog craft piva te bijelog, rose i crvenog vina prema shemama prikazanim na slikama 4 i 5.



**Slika 4.** Shematski prikaz istraživanja uzoraka svijetlog, crvenog i tamnog craft piva



**Slika 5.** Shematski prikaz istraživanja uzoraka svijetlog, rose i crvenog vina

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci piva i vina uporabljeni u radu

Istraživani uzorci međimurskih craft svijetlog, crvenog i tamnog piva, te bijelog, rose i crvenog vina nabavljani su izravno od proizvođača te čuvani i na sobnoj temperaturi i na 4 °C u hladnjaku do provođenja pokusa, a za pokuse ubrzanog starenja piva termostatirani su na 37 °C u termostatu.

##### Pivo:

- svijetlo – Međimursko, Međimurski Lepi Dečki, Čakovec
- crveno – Rička – Mrletovo pivo, Međimurski Lepi Dečki, Čakovec
- tamno – The Dark Side, Međimurski Lepi Dečki, Čakovec

##### Vino:

- bijelo – Rajnski rizling, Židov, Željezna Gora 1, 40 312 Štrigova, berba 2016.
- rose – Crni pinot, Dvanajščak-Kozol, Dragoslavec 81, 40 311 Lopatinec, berba 2022.
- crveno – Cabernet sauvignon, Kerman, Sveti Urban 88, 40 312 Štrigova, berba 2022.

#### 3.1.2. Kemikalije i aparatura uporabljeni u radu

U radu su uporabljene sljedeće kemikalije (proizvođači): Folin-Ciocalteu reagens (Fluka, Njemačka), 7,5 %-tna otopina natrijeva karbonata, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika, Hrvatska), galna kiselina (Sigma, Njemačka), (+)-katehin (Sigma, Njemačka), metanol (Fluka, Njemačka), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma, Njemačka), Trolox (Sigma, Njemačka), kalijev feracijanid (Sigma, Njemačka), trikloroctena kiselina (Kemika, Hrvatska), FeCl<sub>3</sub> (Sigma, Njemačka).

U radu su korišteni slijedeći uređaji (proizvođači): pH-metar (Methrom, model 744, Švicarska), analitička vaga (Mettler, Švicarska), digitalna analitička vaga (Shimadzu, Japan), tehnička vaga (Tehtnica ET 1211, Slovenija), vibrirajući mikser Tehtnica model EV-102 (Železniki, Slovenija), termostat Memmert IF40 (Memmert, (SAD)), spektrofotometar Unicam Helios (SAD).

### 3.2. METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.2.1. Kemijska određivanja kakvoće piva

##### 3.2.1.1. Odrađivanje alkohola kemijskom metodom

Udjel alkohola u uzorcima piva je određivan kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) u kiselom okolišu.

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka koji je razrijeđen s demineraliziranom

vodom do 50 mL (odnos uzorka i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0,1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 ml, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 ml koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI i ostavljeno začepljeno 5 minuta. Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1 %-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje.

Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2 \quad [1]$$

a = utrošak 0,1 M otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (mL)

### 3.2.1.2. *Određivanje pravog ekstrakta*

Ostatak u tikvici nakon određivanja alkohola je ohlađen i na vagi dopunjen destiliranom vodom do prvobitne težine od 100 g. Sadržaj tikvice je dobro izmiješan i određena je gustoća tekućine piknometrom termostatiranjem pri 20 °C. Pravi ekstrakt (*n*) je očitao iz tablice i izražen kao % mase.

### 3.2.1.3. *Određivanje sadržaja CO<sub>2</sub>*

U menzuru od 25 ml dodano je 15 mL 0,1 M NaOH i 10 mL ohlađenog piva (0 – 5 °C), nakon čega je sadržaj prelišen u čašu od 50 mL, ispran deioniziranom vodom i titriran s 0,1 M HCl do pH 8,3 (provjera pH vrijednosti pH metrom).

$$\text{Utrošak HCl za 10 ml piva} = a = \text{ml HCl} \cdot f_{\text{HCl}} \quad [2]$$

Pivu zagrijanom na 15 – 20 °C uklonjen je CO<sub>2</sub> stresanjem, nakon čega je otpipetirano 50 ml piva, koje je titrira s 0,1 M NaOH do pH 8,3.

Utrošak NaOH za 10 mL piva:

$$b = \frac{ml\ NaOH \times f_{NaOH}}{5} \quad [3]$$

Koncentracija CO<sub>2</sub> (g/l) je izračunata prema jednadžbi:

$$CO_2 = 0,44 \cdot [15 - (a - b)] \quad [4]$$

#### 3.2.1.4. Određivanje udjela ukupnih kiselina

Udjel ukupnih kiselina određen je titracijom s 0,1 M NaOH, uz fenolftalein kao indikator. 50 ml piva je oslobođeno CO<sub>2</sub> povremenim mućkanjem u vodenoj kupelji pri 40 °C tijekom pola sata. Svijetlo piva je razrijeđeno istim volumenom vode, a tamno dvostrukim volumenom. Svijetlo je titrirano izravno uz dodatak 5-6 kapi fenolftaleina, dok je tamno titrirano bez indikatora, a kraj titracije je određen fenolftaleinskim papirom do ružičaste boje. Udjel kiselina je izražen u ml 0,1 M NaOH na 10 mL piva. Utrošeni mL 0,1 M NaOH za titraciju piva je pomnožen s faktorom 0,1 M NaOH i podijeljen s 5.

#### 3.2.2. Kemijska određivanja kakvoće vina

##### 3.2.2.1. Određivanje specifične gustoće vina

Prije određivanja udjela alkohola i ekstrakta, u uzorcima vina je određivana specifična gustoća, koja je prvi pokazatelj kakvoće vina.

Piknometar je 2 – 3 puta ispran s malo vina koje je analizirano, a zatim je napunjen vinom do iznad oznake, te stavljen na termostatiranje pri 20 °C oko 20 minuta. Nakon termostatiranja, filter papir je pažljivo uklonjen višak uzorka (do oznake), te je piknometar izvagan na analitičkoj vagi (pet decimala).

Specifična gustoća vina je izračunata prema jednadžbi i očitana iz tablica (Prilog 1):

$$\rho_{20/20}^* = (m_{pv} - m_{pp}) / m_{pv} \quad [5]$$

$\rho_{20/20}^*$  – specifična gustoća vina

$m_{pv}$  – masa piknometra s vinom (g)

$m_{pp}$  – masa praznog piknometra (g)

$m_{pv}$  – masa piknometra s vodom (g)

Za posebnu točnost, specifična gustoća je korigirana zbog prisutnog  $SO_2$  prema jednadžbi (OIV, 2016):

$$\rho_{20/20} = \rho^*_{20/20} - 0.0006 \cdot S \quad [6]$$

$\rho_{20/20}$  – korigirana specifična gustoća

$\rho^*_{20/20}$  – izmjerena specifična gustoća

S = ukupni  $SO_2$  (g/L)

### 3.2.2.2. *Određivanje udjela alkohola u vinu*

Udjel alkohola u ispitivanim uzorcima vina je određivan istom metodom kao i kod uzoraka piva (Metoda 3.2.1.1.).

### 3.2.2.3. *Određivanje udjela ekstrakta u vinu*

Nakon provedene destilacije, u destilacijskoj tikvici je ostala tekućina koja se naziva ekstrakt, a predstavljaju ga nehlapljivi sastojci, pa je taj ostatak vina korišten za određivanje udjela ekstrakta u vinu izražen u g/l.

Ekstrakt iz tikvice za destilaciju je kvantitativno prenesen u piknometar koji je nadopunjen do ispod oznake s deioniziranom vodom kojom je tikvica 2 – 3 puta isprana. Piknometar s ekstraktom je termostatiran pri 20 °C tijekom 30 minuta, nakon čega je nadopunjen deioniziranom vodom do oznake i izvagan.

Specifična gustoća ekstrakta je izračunata na isti način kao kod određivanja udjela alkohola u vinu (OIV, 2016):

$$\rho_{\text{ekstrakta}} = (m_{pe} - m_{pp}) / m_{pv} \quad [7]$$

$\rho_{\text{ekstrakta}}$  – specifična gustoća ekstrakta ( $\rho_{20/20}$ )

$m_{pe}$  – masa piknometra s ekstraktom (g)

$m_{pp}$  – masa praznog piknometra (g)

$m_{pv}$  – masa piknometra s vodom (g)

Iz izračunate specifične gustoće ekstrakta je iz tablica po Windischu (Prilog 2) očitana udjel

ekstrakta (g/L) u vinu.

#### 3.2.2.4. Određivanje ukupnih kiselina

Sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove kisele soli, kao i druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg se utroška izračuna udjel ukupnih kiselina. Ukupna kiselost se u vinima izražava kao udjel vinske kiseline (g/L).

25 ml vina je preneseno u čašu od 200 ml i zagrijano do vrenja da se ukloni CO<sub>2</sub>, nakon čega je uzorak ohlađen i titriran s 0,1 M NaOH uz pH-metar do pH 7,0.

Masena koncentracija ukupnih kiselina je izračunata preko jednadžbe:

$$\gamma = V \cdot 0,3 \cdot f \quad [8]$$

$\gamma$  – masena koncentracija ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina (g/L)

$V$  – utrošeni volumen 0,1 M NaOH (mL)

$f$  – faktor 0,1 M NaOH ( $f = 1,0000$ )

#### 3.2.2.5. Određivanje koncentracije šećera RS- metodom

##### Postupak:

- 1) 5 mL uzorka je dodano 20 mL destilirane vode.
- 2) Uzorku (25 mL) je zatim dodano 10 mL otopine A (Fehling I) i 10 mL otopine B (Fehling II).
- 3) Kuhano je točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 mL uz povratno hladilo, ohlađeno pod mlazom vode i dodano 10 mL otopine C (30 %-tni KJ) i 10 mL otopine D (26 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- 4) Sve je dobro izmiješano i uzorku je dodano 2 mL škroba (1 %-tna otopina), te je titriran s 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do prijelaza plave boje u boju puti (treba se zadržati jednu minutu).

Glukoza test (kontrola): 5 mL otopine glukoze (10 g/L) + 20 ml destilirane vode (ukupan volumen 25 mL) i ponovljen prethodno opisan postupak.

Slijepa proba: 25 mL destilirane vode i ponovljen prethodno opisan postupak.

Masena koncentracija šećera je izračunata preko jednadžbe:



$$\gamma = [50 (a - b) / [(a - c) \cdot d]$$

[9]

$\gamma$  – masena koncentracija reducirajućih šećera, RS (g/L)

a – volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za slijepu probu (mL)

b – volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za uzorak (mL)

c – volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za kontrolu (glukoza test) (mL)

d – volumen uzorka uzet za analizu (5 mL)

### 3.2.2.6. Određivanje udjela SO<sub>2</sub>

#### *Slobodni SO<sub>2</sub>:*

U tikvicu za kuhanje je otpipetirano, preko lijevka, 10 mL uzorka vina i 5 mL fosforne kiseline (25 %). U manju, apsorpcijsku tikvicu dodan je već pripremljeni indikator (2 – 3 ml, metilno crvenilo + metilno modrilo 1:0.15), te 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon destilacije, uzorak je titriran s 0,01 M NaOH. Utrošeni mL 0,01 M NaOH su pomnoženi s 32 da bi se dobili mg slobodnog SO<sub>2</sub>/L vina.

#### *Vežani SO<sub>2</sub>:*

Nakon određivanja slobodnog SO<sub>2</sub> u tikvici je ostao određeni volumen vina. U čistu apsorpcijsku tikvicu je ponovno stavljen pripremljeni indikator (2 – 3 ml, metilno crvenilo + metilno modrilo 1:0.15), te 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te je pod tikvicu stavljen plamenik sa što manjim plamenom i uzorak je grijan, uz lagano vrenje točno 10 minuta. Nakon titracije uzorka s 0,01 M NaOH, utrošeni mililitri su pomnoženi s 32 i da bi se dobili mg vezanog SO<sub>2</sub>/ L vina.

#### *Ukupni SO<sub>2</sub>:*

Izračunat je kao zbroj vrijednosti slobodnog i vezanog SO<sub>2</sub>/l vina.

### 3.2.3. Analitičke metode

#### 3.2.3.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih polifenola je određivana spektrofotometrijski s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965).

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2 mL uzorka, 9 mL destilirane vode i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcijska smjesa je promiješana na vibromikseru i ostavljena da stoji 3 minute, nakon čega je uzorku dodano 8 mL 7,5 %-tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tako pripremljeni uzorak ostavljen je stajati 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je mjerena apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba pripremana je na isti način kao i uzorci, samo je umjesto 2 ml uzorka, reakcijska smjesa sadržavala isti volumen destilirane vode. Svaki uzorak pripreman je u dvije usporedne probe (n=2), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Koncentracija ukupnih fenola je izračunata preko baždarnog dijagrama za određivanje ukupnih fenola i izražena kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/L). Udjeli fenolnih spojeva (galna kiselina i (+)-katehin) su izračunati prema baždarnim krivuljama (Prilozi 3 i 4).

#### 3.2.3.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet je određivan s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalom prema metodi koju je opisao Molyneux (2004).

##### Postupak za uzorke piva:

Pripremljena je 250 μM metanolna otopina DPPH. U epruvetu je otpipetirano 0,1 mL uzorka piva i dodano mu je 2,9 ml metanolne otopine DPPH. Odmah po dodatku otopine DPPH mjerena je apsorbancija pri 515 nm u razmaku od 1 minute, sve do uspostavljanja konstantne vrijednosti apsorbancije (ravnotežno stanje). U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka je dodano 2 mL metanola te 2 mL otopine DPPH.

##### Postupak za uzorke vina:

Antioksidacijski kapacitet istraživanih uzoraka vina je određivan metodom koju su predložili Makris i sur. (2006). 0,1 mL razrijeđenih uzoraka vina (1:10 u 12 %-tnoj otopini etanola i 0,2 M KCl-HCl pufera, pH 2,0, je dodan u 0,975 mL metanolne otopine DPPH (0,06 mM u metanolu) i promiješano na vibromikseru. Nakon 60 minuta reakcije proveden je isti postupak kao i kod uzoraka piva.

Antioksidacijski kapacitet vina ( $A_{kv}$ ) je izračunat prema jednadžbi (Makris i sur., 2006):

$$A_{kv} = 0,699 \cdot \ln (\% \Delta A_{515}) - 7,023 \quad [10]$$

pri čemu je:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515(t=0)} - A_{515(t=60)}) / A_{515(t=0)}] \cdot 100 \quad [11]$$

Postotak preostalog DPPH (% DPPH<sub>pr</sub>) je izračunat prema jednadžbi:

$$\% \text{DPPH}_{pr} = [\text{DPPH}]_{t=60} / [\text{DPPH}]_{t=0} \quad [12]$$

Antioksidacijski kapacitet je izražen kao ekvivalent koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) (Prilog 5).

### 3.2.3.3. *Određivanje redukcijske snage*

Redukcijska snaga određivana je metodom po Lugasiju i Hovariju (2003).

1 ml uzorka je pomiješan (vibracijska mješalica) s 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 1 %-tnim kalijevim fericijanidom,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (2,5 ml). Reakcijska smjesa je inkubirana na 50 °C tijekom 20 min i nakon toga je dodano 2,5 mL trikloroctene kiseline (10 %-tne). Iz ove smjese je izuzeto 2,5 mL kojima je dodano 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine  $\text{FeCl}_3$  i očitana je apsorbancija na 700 nm. Redukcijska snaga je izražena kao ekvivalent askorbinske kiseline/mL (Prilog 6). Ovako izražen rezultat znači da 1 mL uzorka ima jednaku reducirajuću snagu kao određena količina katehina, izražena u  $\mu\text{mol}$ .

### 3.2.3.4. *Određivanje intenziteta boje crvenog i tamnog piva*

Boja piva mjerena je standardnom referentnom metodom (SRM), kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbancija na 430 nm. Očitana apsorbancija je množena s faktorom 12,7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama (tablica 1):




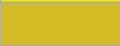
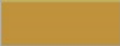

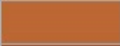
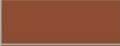






$$\text{SRM} = 12,7 \cdot D \cdot A_{430}, \quad [13]$$

gdje je D faktor razrijeđenja.

Ako se intenzitet boje želi izraziti u EBC jedinicama, tada se koristi jednadžba:

$$\text{EBC} = \text{SRM} \cdot 1,97 \quad [14]$$

**Tablica 1.** Tablica za izračunavanje boje piva tijekom istraživanja (DeLange, 2008)

SRM/Lovibond	Primjer	Boja	EBC
2	svijetli lager		4
3	Pilsner		6
4	Pilsner Uguell		8
6			12
8	pšenično		16
10	svijetli ale		20
13			26
17	tamni lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	vrhunski Stout		138

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Općenito je mišljenje potrošača alkoholnih pića da je vino zdravije konzumirati od piva, unatoč činjenici da, u usporedbi ova dva pića, pivo sadrži puno više hranjivih supstancija nego vino (Bamforth, 2008).

Pivo je osvježavajuće piće s malim udjelom alkohola, proizvedeno od ječmenog slada i hmelja kao izvora značajnih količina bioaktivnih sastojaka, većinom antioksidanata, koji povoljno utječu na zdravlje potrošača. Polifenoli i melanoidini su glavni prirodni antioksidanti u pivu. Njihov udjel u najvećoj mjeri ovisi o genetičkim i agronomskim čimbenicima koji utječu na sirovine, te o tehnološkim postupcima tijekom proizvodnje piva. Pivo također sadrži produkte Maillardove reakcije, koji uglavnom nastaju tijekom procesa proizvodnje slada i piva (Saura-Calixto i sur., 2009). Polifenolni sastojci su važni antioksidanti, čiji mehanizam djelovanja uključuje i vezanje slobodnih radikala i keliranje metala. Polifenoli imaju nezamjenjiv učinak na oksidativnu stabilnost piva (Andersen i sur., 2000).

Vino, posebice crveno, bogato je polifenolima, posebice flavan-3-olima ((+)-katehin, (-)-epikatehin i dr.), flavonolima (kvercetin, rutin, miricetin i dr.), antocijanima (malvidin-3-O-glukozid), oligomernim i polimernim proantocijanidinima, fenolnim kiselinama (galna kiselina, kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina), stilbenima (trans-resveratrol) i mnogim drugim polifenolima. Za mnoge od ovih spojeva (primjerice, resveratrol, kvercetin, rutin, katehin i njihovi oligomerni i polimerni proantocijanidini) dokazano je da posjeduju višestruke biološke aktivnosti, među kojima su i kardioprotektivna, protuupalna, antikancerogena, antiviralna i antibakterijska svojstva (Santos-Buelga i Scalbert, 2000).

### 4.1. KEMIJSKI SASTAV PIVA

Održavanje kakvoće piva tijekom faza odležavanja, distribucije i, posebice, trajanja gotovog proizvoda, predstavlja za svakog proizvođača piva izazov. Nekoliko parametara određuje kakvoću piva (udjel ječma i neslađenih žitarica, konačni ekstrakt, volumni % alkohola, udjel CO<sub>2</sub>, prevrelost i gorčina), no dva su svojstva izrazito važna, a to su koloidna i biološka stabilnost piva (Aron i Shellhammer, 2010).

U radu su istraživana kemijska i antioksidacijska svojstva svijetlog, crvenog i tamnog craft piva donjeg vrenja (lager). Kemijski sastav piva koja su uporabljena u istraživanjima prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Kemijski sastav uzoraka istraživanih piva

<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Alkohol (vol %)</b>	<b>Ekstrakt (g/L)</b>	<b>CO<sub>2</sub> (g/L)</b>	<b>Ukupne kiseline (g/L)</b>	<b>pH</b>
svijetlo	5,22	11,9	11,5	3,2	4,63
crveno	4,98	12,8	8,2	2,8	4,58
tamno	5,34	14,6	7,9	2,8	4,61

#### **4.2. KEMIJSKI SASTAV VINA**

Rezultati analiza kemijskog sastava istraživanih vina prikazani su u tablici 3.

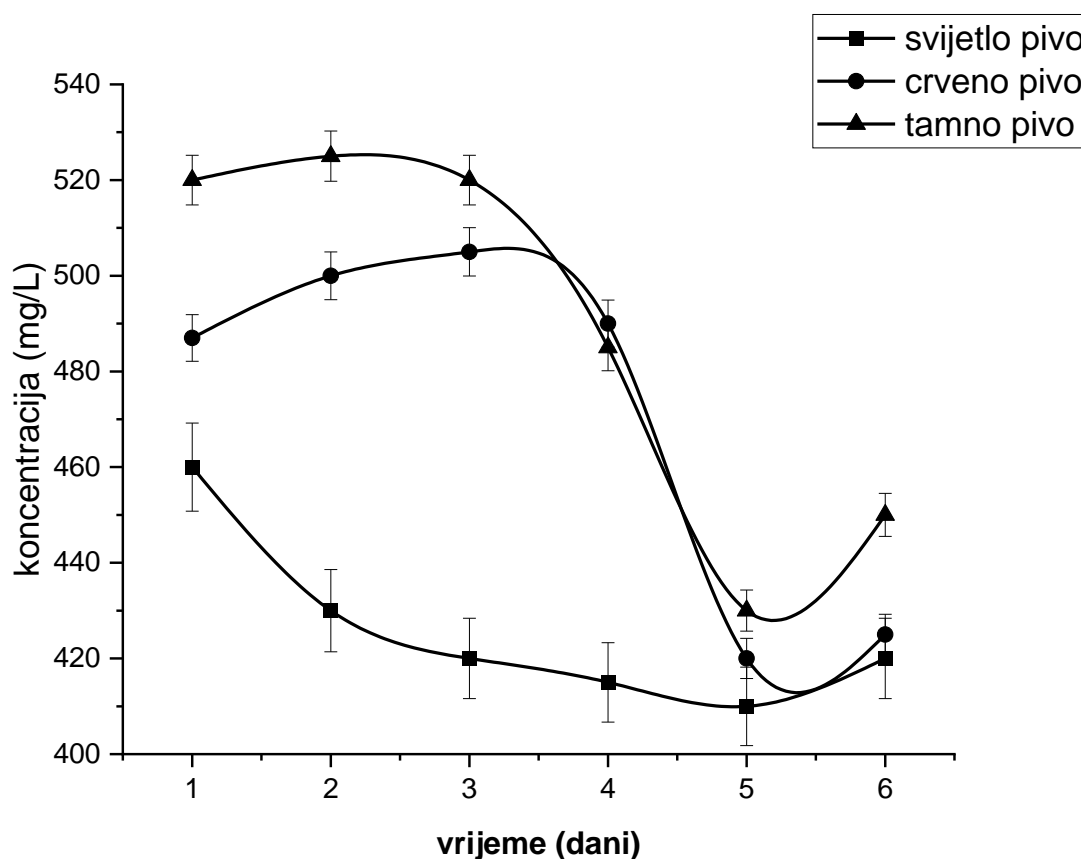
**Tablica 3.** Kemijski sastav istraživanih vina

<b>Analiza</b>	<b>Bijelo vino</b>	<b>Rose vino</b>	<b>Crveno vino</b>
Specifična gustoća	1,7	0,7	0,3
Korigirana sp. gustoća	1,64	0,66	0,24
Alkohol (vol %)	10,61	10,52	11,2
Ekstrakt (g/L)	27,9	27,9	56,5
Ukupne kiseline (g/L)	3,2	2,82	2,8
Reducirajući šećeri (g/L)	8,61	5,11	5,38
SO <sub>2</sub> (mg/L)			
slobodni	32	9,6	41,6
vezani	73,6	48	51,2
ukupni	105,6	57,6	92,8
pH	3,58	3,62	3,61

### 4.3. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA SVIJETLOG, CRVENOG I TAMNOG PIVA

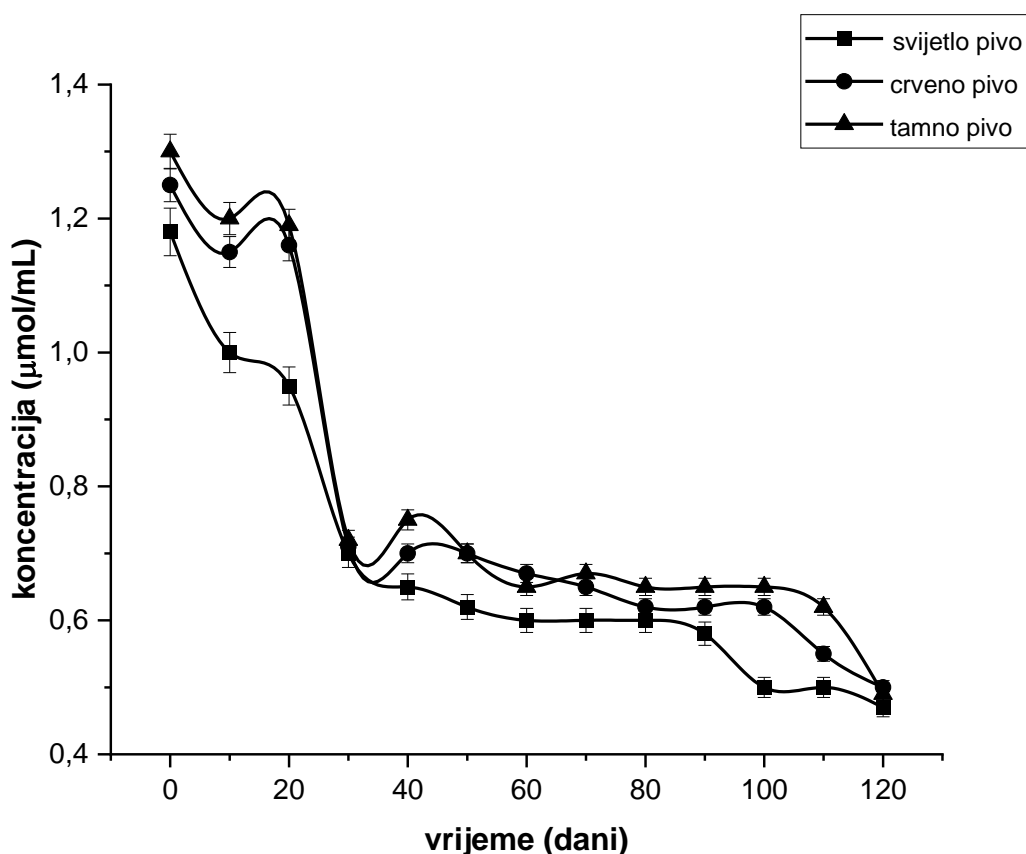
#### 4.3.1. Istraživanje udjela polifenola u pivu

Pivo je drugo najkonzumiranije alkoholno piće u Europi, s udjelom od 37 % ukupne konzumiranih alkoholnih pića u EU-u, prema Europskoj organizaciji za alkoholna pića. Sadrži ugljikohidrate, minerale (kalij, magnezij), vitamine (niacin, riboflavin, folnu kiselinu, kobalamin, piridoksin) i aminokiseline. Osim toga, pivo sadrži polifenole, oko 70 – 80 % potječe iz slada, a preostalih 30 – 20 % iz hmelja (Habschied i sur., 2021). Tijekom skladištenja piva, fenolni spojevi reagiraju s proteinima i tvore visokomolekulske spojeve koji izazivaju zamućenje proizvoda. U ovom su radu provedeni testovi ubrzanog starenja craft piva s ciljem otkrivanja mogućeg zamućenja, tijekom kojih su mjerene promjene udjela polifenola u svijetlom, crvenom i tamnom pivu (slika 6).



**Slika 6.** Promjena udjela ukupnih polifenola tijekom testiranja ubrzanog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

Promjena udjela ukupnih polifenola u svijetlom, crvenom i tamnom craft pivu praćena je skladištenjem uzoraka na sobnoj temperaturi tijekom 4 mjeseca (slika 7). Može se uočiti da je najveće smanjenje udjela fenolnih spojeva izmjereno u prvih 20 dana skladištenja, nakon čega je uslijedilo povećanje udjela fenola u uzorcima crvenog i tamnog piva, dok su se vrijednosti u svijetlom pivu, uz male oscilacije između 40. i 90. dana, ustalile. Jedno od objašnjenja za ove rezultate može biti i razlika u sirovinama koje su uporabljene za proizvodnju svijetlog, crvenog i tamnog piva (udjel fenolnih sastojaka u ječmu i hmelju).

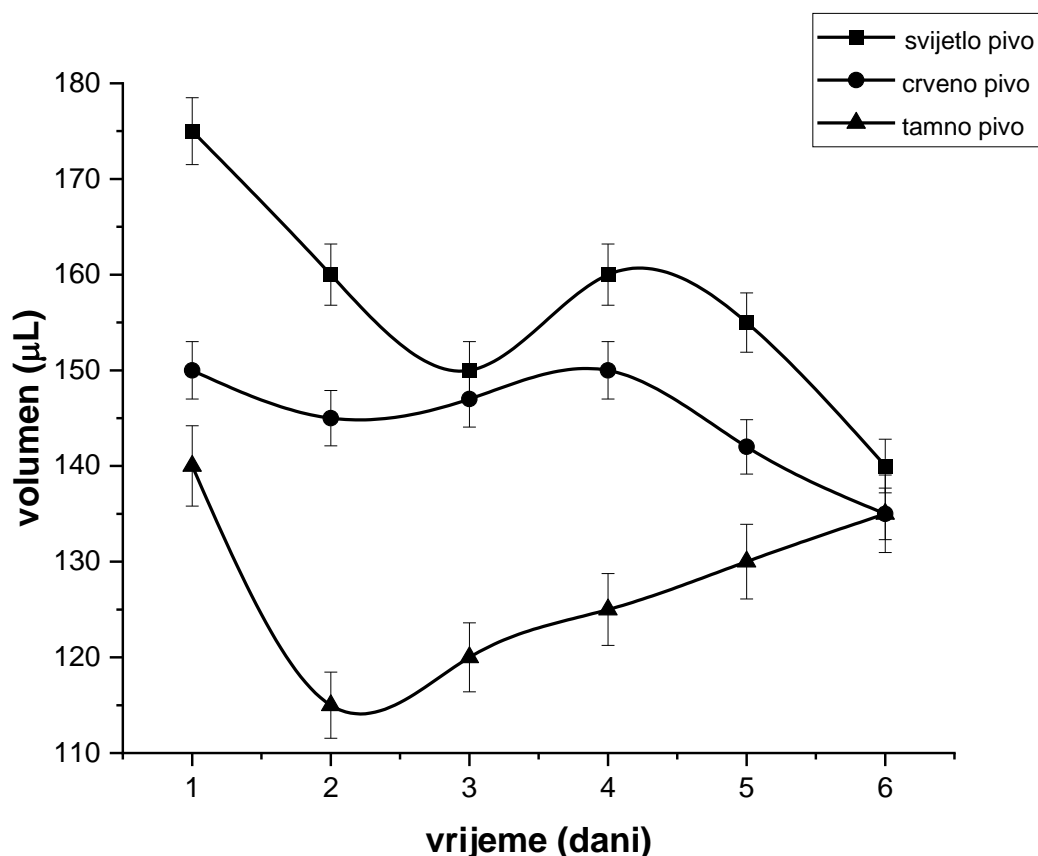


**Slika 7.** Promjena udjela ukupnih polifenola tijekom testiranja normalnog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

Sposobnost vezanja slobodnih radikala mjerena je redukcijom slobodnog radikala DPPH\*. Rezultati su prikazani kao  $EC_{50}$ , odnosno volumen uzorka ( $\mu$ l) potreban da se postigne 50 %-tno obezbojenje DPPH. Na slici 8 vidljivo je da najveći antioksidacijski kapacitet imalo tamno pivo, no i da su rezultati oscilirali tijekom mjerenja uzoraka tamnog piva, što se nije dogodilo u uzorcima svijetlog i crvenog piva. No, tijekom istraživanja, uočeno je da su tijekom vremena antioksidacijski kapaciteti svijetlog i crvenog piva rasli, a tamnog piva se smanjivao. Na kraju istraživanja (6. dan), antioksidacijski kapaciteti crvenog i tamnog piva bili su potpuno isti, dok je

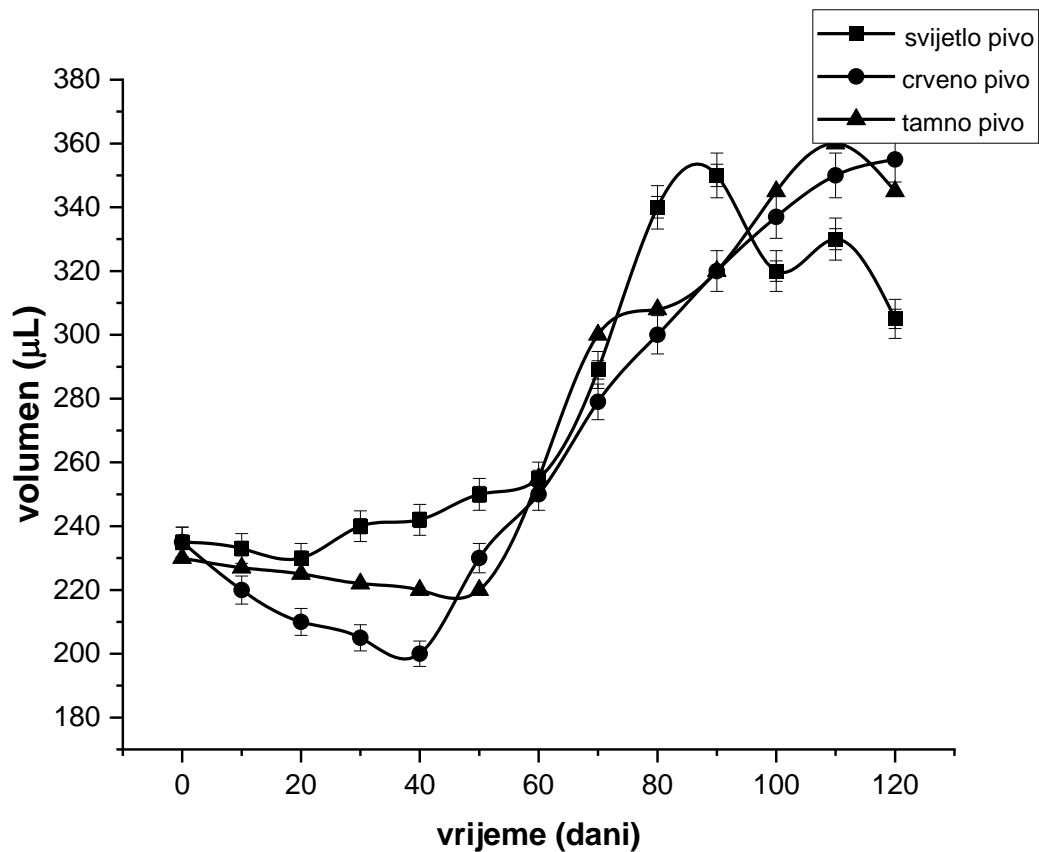


svijetlo pivo pokazalo neznatno niže vrijednosti.



**Slika 8.** EC<sub>50</sub> vrijednosti tijekom testiranja ubrzanog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

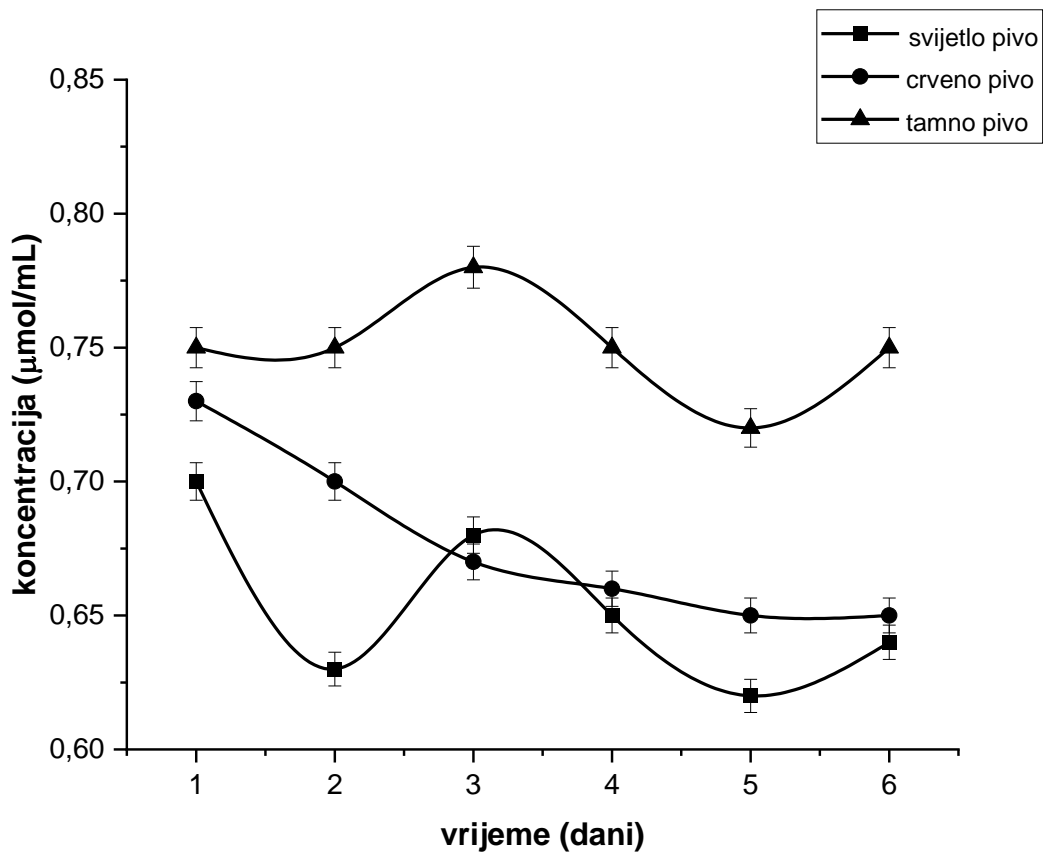
Rezultati dobiveni mjerenjima provedenim tijekom 4 mjeseca skladištenja značajno su se mijenjali od uzorka do uzorka, pri čemu su svijetlo i tamno pivo pokazali značajne oscilacije u izmjerenim vrijednostima (slika 9). U svim je istraživanim pivima EC<sub>50</sub> vrijednost rasla s vremenom skladištenja, što je ukazalo na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta. Zanimljivo je primijetiti da su tijekom skladištenja svi uzorci, bez obzira na vrstu piva, od 60. do 80. dana imale ujednačene vrijednosti, nakon čega su određena odstupanja i oscilacije u rezultatima. Nakon 120 dana skladištenja, rezultati su pokazali da je svijetlo pivo pokazalo najbolji antioksidacijski kapacitet, a crveno i tamno su imali više, ali podjednake vrijednosti. Antioksidacijska vrijednost uvelike ovisi o sirovinama uporabljenim u postupku varenja piva, no, kako su u ovom radu istraživana craft piva, nije poznato podrijetlo sirovina, samo njih udjel u usipku. Zbog toga ovi rezultati ne mogu biti usporedivi s u literaturi navedenim rezultatima. Također, izbor sirovina ovisi i o geografskom podrijetlu i klimatskim uvjetima u kojima su uzgajane, požnjevene i skladištene, te o načinu slađenja ječma.



**Slika 9.** EC<sub>50</sub> vrijednosti tijekom testiranja normalnog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

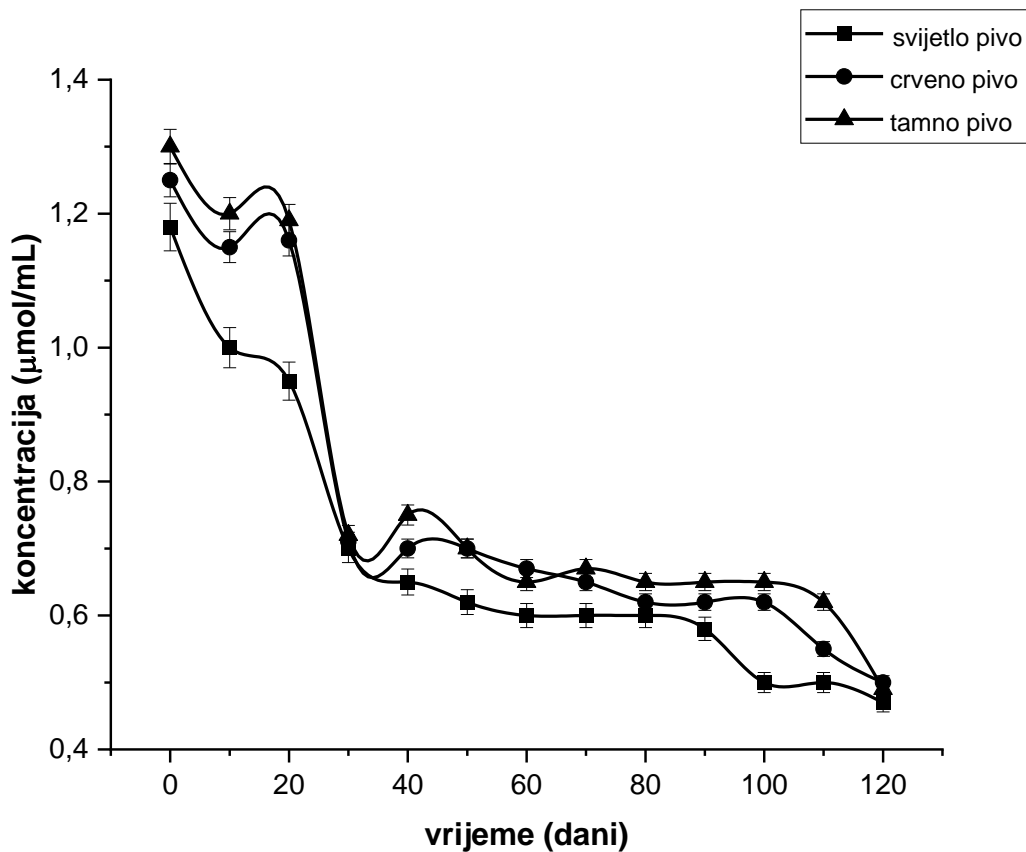
Promjena okusa piva povezana je s oksidativnom razgradnjom sastojaka piva reaktivnim spojevima kisika kao što su radikali kisika ili dušika sa sposobnošću oksidacije ili pretvaranja molekule u oksidirajuće radikale. Međutim, pivo je bogato tvarima koje mogu pomoći u zaštiti od oksidacija, od kojih su najvažniji sumporni spojevi, smole hmelja, vitamini, i proizvodi Maillardove reakcije (Bertuzzi i sur., 2020).

Redukcijska snaga smatra se sekundarnom ili preventivnom antioksidacijskom aktivnošću (Lugasi, 2003). Kao i u mjerenjima udjela ukupnih polifenola (slika 6) i sposobnosti vezanja slobodnih radikala (slika 8), tijekom testa ubrzanog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva, dobivene vrijednosti su pokazale značajna odstupanja ovisno o vrsti piva (slika 10). Prema očekivanjima, najveću redukcijsku snagu su pokazali uzorci tamnog piva, iako je primijećena oscilacija u 3. danu istraživanja, jednako, kao i kod svijetlog piva, koje je pokazalo najmanju izmjerenu redukcijsku snagu. Kod crvenog craft piva je uočen blagi linearni pad, no nije bilo oscilacija u rezultatima, što može ukazati na postojanost proizvoda tijekom ubrzanog testiranja starenja piva.



**Slika 10.** Redukcijska snaga tijekom testiranja ubrzanog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

Za razliku od testa ubrzanog starenja, piva koja su normalno starila izgubila su 50 % svoje redukcijske snage već nakon 30 dana skladištenja. Nakon tog perioda, linearni pad vrijednosti se ustalio i održale su se podjednakima sve do 100. dana kraj skladištenja, kada je opet uočena tendenciju pada kod sve tri vrste piva (slika 11).



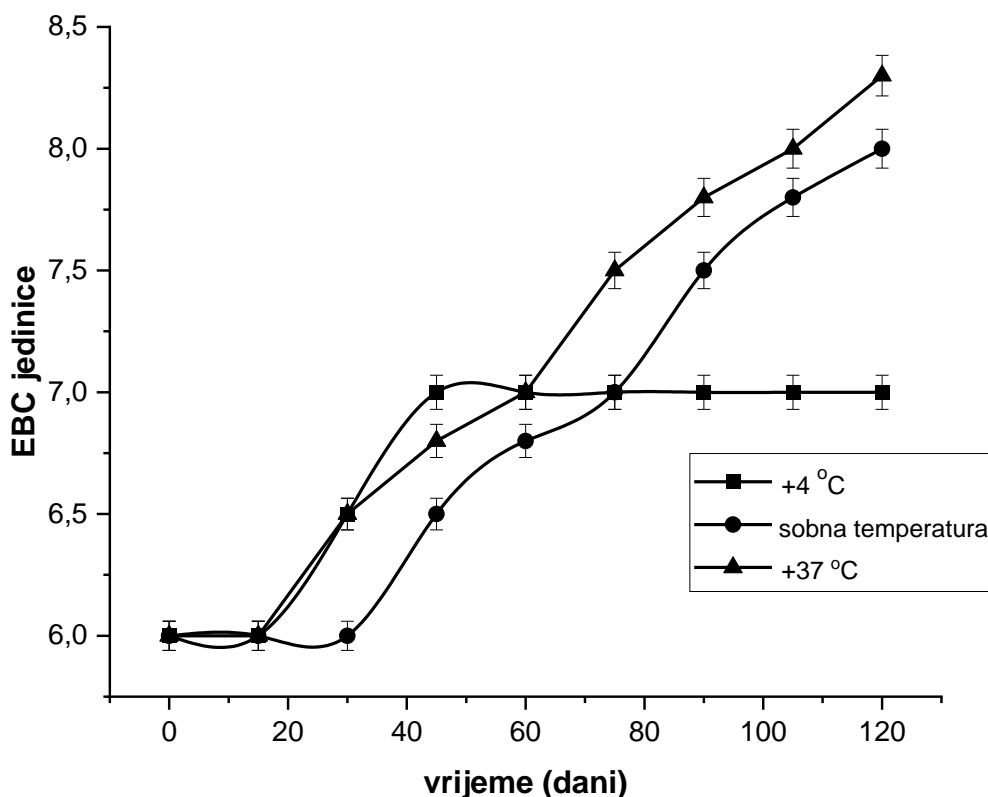
**Slika 11.** Redukcijska snaga tijekom testiranja normalnog starenja svijetlog, crvenog i tamnog craft piva

Boja piva važan je senzorski atribut, ali mora biti vjerna vrsti piva, a to je prvo svojstvo koje potrošač opaža. Izgled proizvoda, uključujući pjenu i boju, ključan je čimbenik kakvoće gotovog proizvoda.

Najveći problemi u metodama mjerenja boje na temelju apsorbancije razvijenim prije nekoliko desetljeća za tradicionalna piva, počeli su u zadnje vrijeme s revolucijom craft pivarstva i uz širenje palete voćnih piva i piva međunarodnih pivarskih kompanija miješanih pića na bazi piva, koji postaju sve popularniji. Postoje samo ograničene informacije o njima i o njihovoj usporedbi s tradicionalnim proizvodima. Zastupljeni su u mnogim različitim bojama i tradicionalne metode mjerenja boja kao što su SRM ili EBC mogu dati lažne rezultate u njihovom slučaju jer oni osim karamelizacije imaju i druge komponente bojanja, produkata pirolize i Maillardovih reakcija (Shellhammer i Bamforth 2008).

U literaturi postoji vrlo malo podataka koji se odnose na promjenu boje tijekom skladištenja craft piva. Rezultati dobiveni u ovim istraživanjima pokazali su da se boja gotovo linearno mijenjala s vremenom kod svijetlog piva skladištenog na sobnoj temperaturi i čuvanjem pri + 37 °C, dok je ta promjena bila slabije izražena u pivu skladištenom pri + 4 °C u hladnjaku (slika 12). Iz

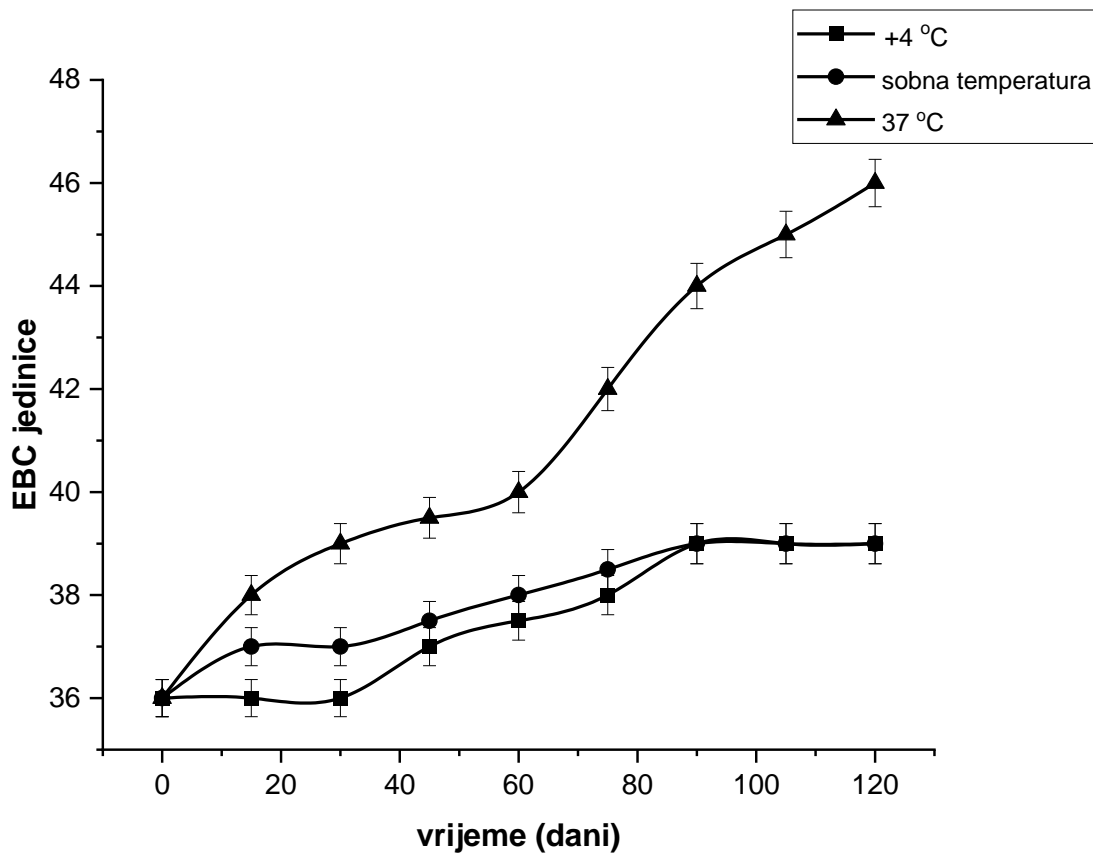
rezultata je vidljivo da skladištenje pri sobnoj ili povišenoj temperaturi dovodi do promjene boje svijetlog piva, što narušava vizualnu kakvoću proizvoda.



**Slika 12.** Promjena boje svijetlog craft piva tijekom 120 dana skladištenja pri +4 °C, sobnoj temperaturi i pri 37 °C

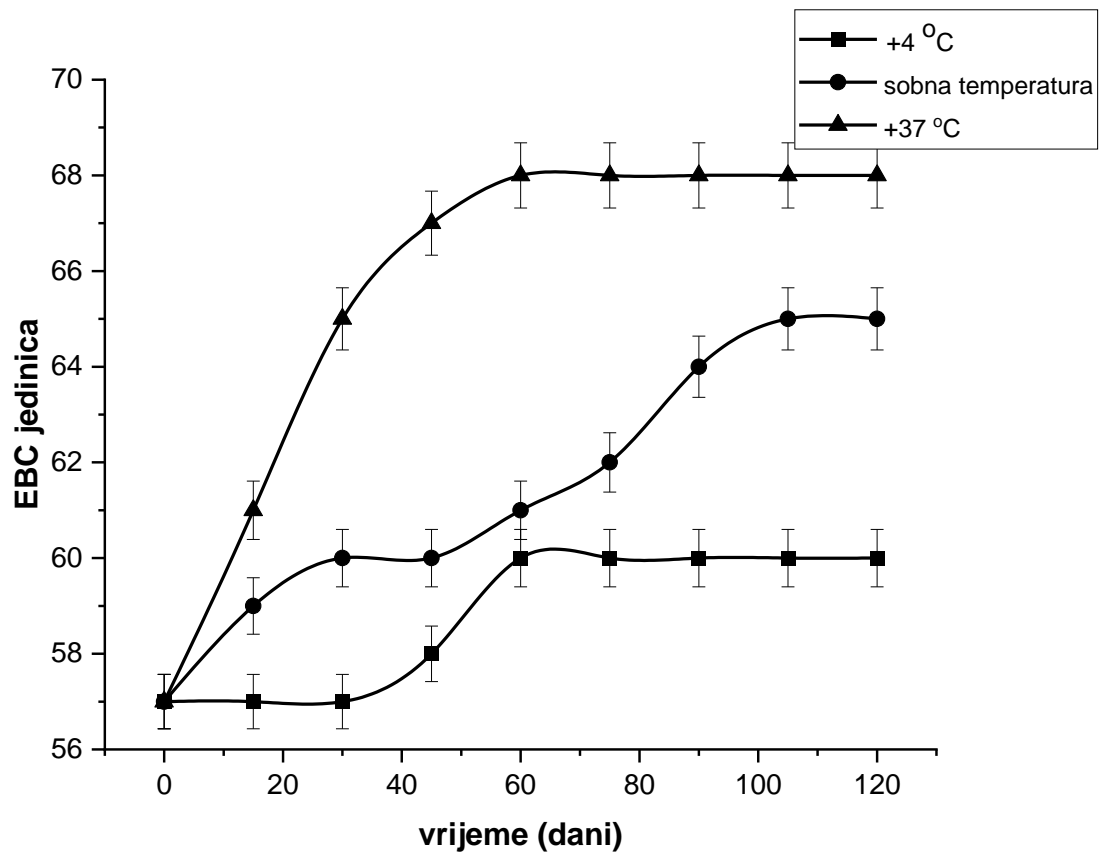
Boja konačnog proizvoda uglavnom je posljedica izvora različitih sirovina koje se primjenjuju tijekom procesa proizvodnje piva. Posebice se to odnosi na ječam koji je podvrgnut sušenju ili prženju (Davies, 2016). Za crvena piva koristi se karamelni slad koji je pirjan na temperaturama do 85 °C, pri čemu je, zbog Maillardovih reakcija, poprimio karamelnu boju. Sekundarni doprinos je oksidacija polifenola, podrijetlom iz slada i hmelja, tijekom skladištenja i odležavanja. Glavne fenolne komponente koje doprinose promjenama boje piva zbog oksidacije su monomeri flavan-3-ola i oligomeri proantocijanidina (Aron i Shellhammer 2010). Očekivano, rezultati (slika 13) su pokazali da je najveća promjena boje izmjerena u uzorcima skladištenim pri + 37 °C u termostatu. S obzirom da su boce u kojima je bilo pakirano pivo bile smeđe boje, moglo bi se zaključiti da nije došlo do oksidacije i time povećanja intenziteta boje piva, nego je to rezultat skladištenja na povišenoj temperaturi, koja nije prilagođena skladištenju crvenog piva. Na slici 13 također se može uočiti da su promjene u boji crvenog piva skladištenih

na + 4 °C i sobnoj temperaturi bile podjednake, što bi moglo ukazati da nije nužno skladištenje craft crvenog piva na niskim temperaturama da bi se održala boja izvornog proizvoda.



**Slika 13.** Promjena boje crvenog craft piva tijekom 120 dana skladištenja pri +4 °C, sobnoj temperaturi i pri 37 °C

Tamno pivo je pokazalo najintenzivniju promjenu boje tijekom normalnog starenja na sobnoj temperaturi (slika 14). Ta se boja linearno mijenjala u uzorcima piva od 40. do 120. dana skladištenja na sobnoj temperaturi za 8 EBC jedinica boje, dok je ukupna promjena boje tijekom skladištenja na 37 °C bila čak 11 EBC jedinica. Skladištenjem pri +4 °C došlo je do promjene za 3 EBC jedinice do 60. dana, no nakon toga se boja nije mijenjala. Nadalje, pivo skladišteno na sobnoj temperaturi bilo je izloženo svjetlu, za razliku od piva iz hladnjaka, te se i time može objasniti ovo povećanje intenziteta boje.



**Slika 14.** Promjena boje tamnog craft piva tijekom 120 dana skladištenja pri +4 °C, sobnoj temperaturi i pri 37 °C

#### 4.3.2. Istraživanja udjela polifenola u uzorcima vina

Odležavanje vina definirano je kao vrijeme od punjenja do konzumacije i čimbenik je koji je presudan za okus i kakvoću vina jer tijekom vremena skladištenja fenolni spojevi prolaze kroz nekoliko kemijskih transformacija. Promjene ili razgradnja/fragmentacija fenolnih spojeva uzrokuju intenzivniju boju i različite senzorne karakteristike u odnosu na izvorne. Rezultati istraživanja utjecaja vremena čuvanja bijelog vina tijekom 6 mjeseci, kao i testiranje ubrzanog posmeđivanja na promjenu udjela ukupnih polifenola i flavon-3-ola prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Utjecaj vremena čuvanja u tamnom prostoru i ubrzanog posmeđivanja bijelog vina na udjel fenolnih spojeva

Vrijeme čuvanja dani/mjeseci	Ukupni polifenoli (mg/L)	Ukupni katehini (mg/L)	Galna kiselina (mg/L)
Početno	290,16 ± 0,15	1,99 ± 0,34	1,79 ± 0,22
6 mjeseci*	267,53 ± 1,09	1,51 ± 0,99	1,38 ± 0,86
Ubrzano posmeđivanje	277,65 ± 0,45	1,21 ± 0,66	9,31 ± 0,78

\*čuvanje boca u tamnom i suhom prostoru

Prema rezultatima prikazanim u tablici 4, vidljivo je da se tijekom skladištenja bijelog vina (6 mjeseci) koncentracija ukupnih polifenola smanjila za 9,2 %, dok je smanjenje ukupnih katehina bilo znatnije (13,18 %). Blago manje promjene određene su promjenom koncentracije galne kiseline (12,97 %). Testom ubrzanog starenja bijelog vina uočeno je 10,45 % smanjenja ukupnih polifenola, no izrazito smanjenje ukupnih katehina (16,44 %) i povećanje koncentracije galne kiseline (80 %). Dobiveni rezultati su potvrdili da je došlo do promjena u sastavu ukupnih polifenola i flavan-3-ola tijekom produženog skladištenja, a to je posebice potvrdio test ubrzanog posmeđivanja bijelog vina.

Zdravstveni učinci fenolnih spojeva često se pripisuju njihovom antioksidacijskom djelovanju, koja je rezultat niza mehanizama, uključujući smanjenje ili uklanjanje reaktivnih vrsta kisika, keliranje iona prijelaznih metala i inhibiciju enzima uključeni u oksidativni stres (Visioli i sur., 2020). Međutim, njihov utjecaj na ljudsko zdravlje ovisi o prisutnoj količini bioraspoloživosti. U nastavku istraživanja promjene udjela polifenolnih spojeva tijekom čuvanja vina, određivan je antioksidacijski kapacitet i redukcijska snaga bijelog vina (izraženi kao ekvivalenti Troloxa i askorbinske kiseline), kao i promjene apsorbancije izmjerene pri 420 nm (tablica 5).



**Tablica 5.** Utjecaj vremena čuvanja u tamnom prostoru i ubrzanog posmeđivanja bijelog vina na antioksidacijske parametre i  $A_{420}$

Vrijeme čuvanja dani/mjeseci	DPPH*	Redukcijska snaga**	$A_{420}$ ***
Početno	0,674 ± 0,01	0,662 ± 0,23	0,0987 ± 0,31
6 mjeseci	0,694 ± 0,34	0,691 ± 0,21	0,1023 ± 0,45
Ubrzano posmeđivanje	0,519 ± 0,67	0,488 ± 0,43	0,2985

\*vrijednosti su izražene kao mM Trolox ekvivalenta

\*\*vrijednosti su izražene kao mM askorbinske kiseline

\*\*\* vrijednosti su izražene kao apsorbancija na 420 nm

Rezultati (tablica 5) su pokazali da je antioksidacijski kapacitet vezanjem DPPH\* radikala i na početku istraživanja i nakon 6 mjeseci skladištenja bio nezamjetno različit, dok je nakon testiranja ubrzanog posmeđivanja bio 13 % manji. Isto su pokazali i rezultati mjerenja redukcijske snage, gdje je tek u testu ubrzanog posmeđivanja uočeno smanjenje 13,57 %. Ovime se može zaključiti da su rezultati istraživanja antioksidacijskih parametara i udjela fenolnih spojeva u potpunoj korelaciji.

Antioksidacijska svojstva rose i crvenog vina prikazana su u tablici 6.

**Tablica 6.** Udjel polifenola i antioksidacijska svojstva rose i crvenog vina

Određivanje	Rose vino	Crveno vino
Ukupni polifenoli (mg/L)	622,8 ± 0,11	1873,16 ± 0,26
Ukupni katehini (mg/L)	2,52 ± 0,45	5,78 ± 0,22
Galna kiselina (mg/L)	2,18 ± 0,33	8,02 ± 0,11
DPPH*	0,768 ± 0,21	0,287 ± 0,09
Redukcijska snaga	0,659 ± 0,11	0,679 ± 0,21
$A_{420}$	0,3586 ± 0,09	0,5111 ± 0,15

\*vrijednosti su izražene kao mM Trolox ekvivalenta

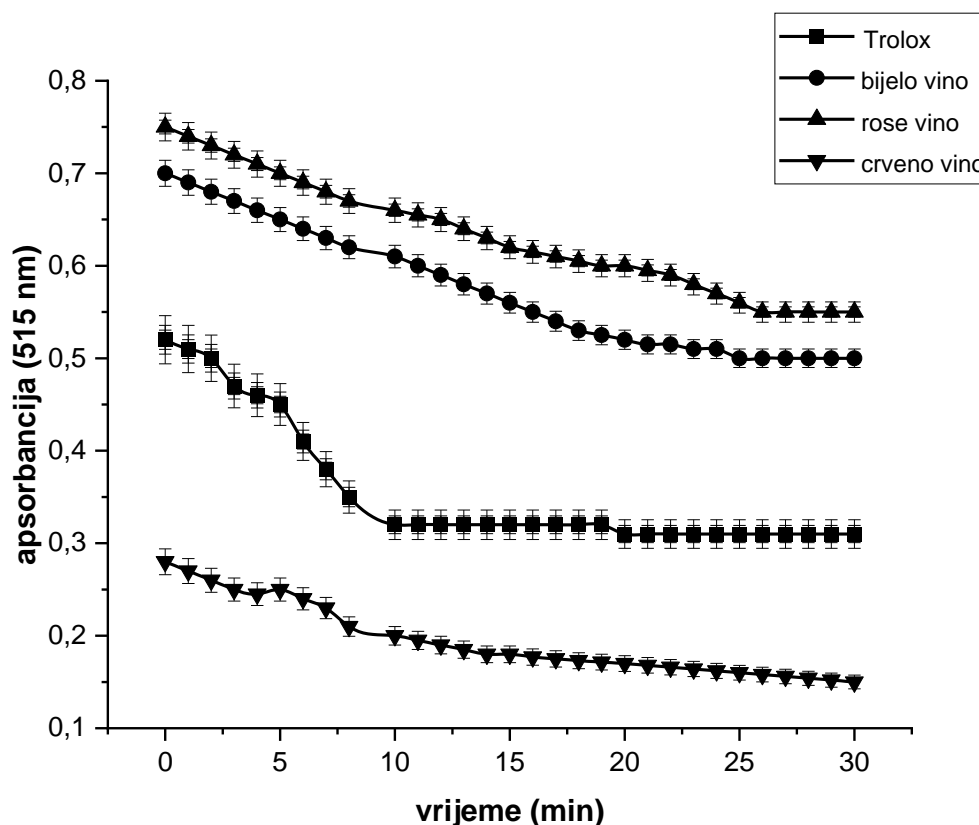
\*\*vrijednosti su izražene kao mM askorbinske kiseline

\*\*\* vrijednosti su izražene kao apsorbancija na 420 nm

Odležavanje vina definirano je kao vrijeme od punjenja do konzumacije te je to čimbenik koji je presudan za okus i kvalitetu vina jer tijekom vremena skladištenja fenolni spojevi prolaze kroz

nekoliko kemijskih transformacija (Visioli i sur., 2020). Promjene ili izomer transformacija ili razgradnja/fragmentacija fenolnih spojeva uzrokuju intenzivan boju i različite senzorne karakteristike u odnosu na izvorne.

Kinetika vezanja DPPH\* radikala dodatkom otopine 0,025 mM Troloxa kao standarda i uzoraka ispitivanih vina (bijelog, rose i crvenog) prikazana je na slici 15. Iz slike je vidljivo da je najbolji antioksidacijski kapacitet pokazalo crveno vino, a u pola slabije bijelo i rose vino.

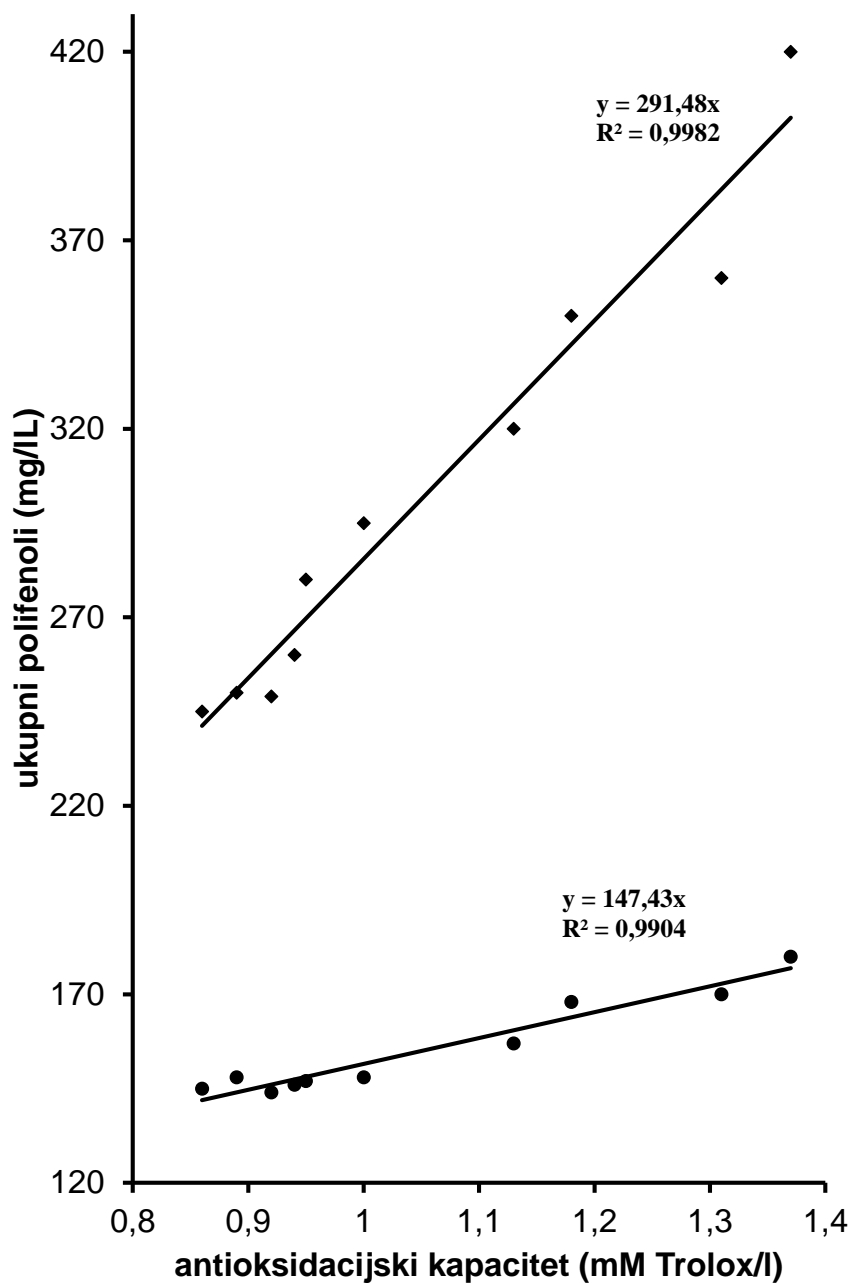


**Slika 15.** Kinetika vezanja DPPH\* radikala u uzorcima Troloxa, bijelog, rose i crvenog vina

U ovim je istraživanjima bilo važno odrediti na koji način udjel ukupnih polifenola utječe na ukupni antioksidacijski kapacitet istraživanih uzoraka. Na slici 16 prikazan je usporedni korelacijski odnos između dva ispitivana parametra u crvenom vinu i tamnom pivu, s obzirom da je dokazan najveći udjel ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima.

Općenito je mišljenje potrošača alkoholnih pića da je vino zdravije konzumirati od piva, unatoč činjenici da, u usporedbi ova dva pića, pivo sadrži puno više hranjivih supstancija nego vino. Jedan od argumenata je da crno vino sadrži resveratrol koji smanjuje rizik od ateroskleroze. Istraživanja su potvrdila da se umjerenom konzumacijom crnog vina smanjuje rizik od srčanih oboljenja, ali da je za to zaslužan udjel alkohola. Zapravo, sva alkoholna pića, uključujući i bijelo

i ružičasto vino, te pivo, kada se konzumiraju u alkoholnim ekvivalentima, mogu postići jednaki učinak na smanjenje srčanih oboljenja. Usporedbom udjela polifenola u tamnom pivu i crnom vinu, dokazano je da crno vino ima značajno veći antioksidacijski kapacitet od tamnog piva (slika 16).



**Slika 16.** Korelacijski prikaz ukupnog antioksidacijskog kapaciteta prema udjelu ukupnih polifenola u crvenom vinu (■) i tamnom pivu (●)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju provedenih istraživanja, utvrđeno je da se tijekom skladištenja craft piva smanjuje udio ukupnih polifenola, pri čemu se najveći pad očituje u prvih 20 dana skladištenja. Ovaj pad je najizraženiji kod svijetlog piva.
2. Rezultati istraživanja pokazuju da su polifenolni sastojci ključni za antioksidacijska svojstva piva i vina. Tamno pivo je imalo najveći antioksidacijski kapacitet, dok su rezultati pokazali oscilacije tijekom skladištenja. Crveno vino pokazalo je najviši udio ukupnih polifenola i bolji antioksidacijski kapacitet u odnosu na tamno pivo.
3. Skladištenje piva na višim temperaturama (+37 °C) dovelo je do značajnijih promjena u boji, što ukazuje na važnost kontroliranja uvjeta skladištenja za očuvanje vizualne kvalitete piva. Promjene boje su bile manje izražene u pivu skladištenom na nižim temperaturama (+4 °C). Crveno pivo pokazalo je slične promjene boje na različitim temperaturama, dok je tamno pivo imalo najintenzivnije promjene boje tijekom normalnog starenja.
4. U svim ispitivanim uzorcima antioksidacijski kapacitet smanjivao se s vremenom skladištenja, a što je indicirano povećanjem  $EC_{50}$  vrijednosti. To ukazuje na smanjenje učinkovitosti vezanja slobodnih radikala tijekom vremena.
5. Dokazano je da postoji značajna korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja ukupnih polifenola u crvenom vinu ( $R^2 = 0,9982$ ) i tamnom pivu ( $R^2 = 0,9904$ ). Usporedbom koncentracija polifenola, utvrđeno je da crveno vino ima veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na tamno pivo.

## 6. LITERATURA

Almaguer C, Schonberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T (2014) Humulus lupulus—A story that begs to be told. A review. *J Inst Brew* **120**, 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>

Andersen ML, Outtrup H, Skibsted LH (2000) Potential antioxidants in beer assessed by EPR spin trapping. *J Agric Food Chem* **48**, 3106-3111. [10.1021/jf000354+](https://doi.org/10.1021/jf000354+)

Andrés-Iglesias C, Blanco C.A, Blanco J, Montero O (2014) Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. *Food Chem* **157**, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.123>

Aron PM, Shellhammer TH (2010) A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *J Inst Brew* **116**(4):369–380. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>

Bamforth CW (2008) Beer and health. U: Bamforth CW (ured.) Beer: A Quality Perspective, Elsevier, Burlington, MA, str. 229-253.

Basalekou M, Kyraleou M, Pappas C, Tarantilis P, Kotseridis Y, Kallithraka S (2019) Proanthocyanidin content as an astringency estimation tool and maturation index in red and white winemaking technology. *Food Chem* **299**, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125135>

Bautista-Ortín A, Fernandez-Fernandez, J.I., Lopez-Roca J.M., Gomez-Plaza E (2007) The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *J Food Comp Anal* **20**, 546–552. [10.1016/j.jfca.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.008)

Bertuzzi T, Mulazzi A, Rastelli S, Donadini G, Rossi F, Spigno G (2020) Targeted healthy compounds in small and large-scale brewed beers. *Food Chem* **310**, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125935>

Cabrera-Banegil M, Hurtado-sánchez MC, Galeano-Díaz T, Durán-Merás I (2016) Front-face fluorescence spectroscopy combined with second-order multivariate algorithms for the quantification of polyphenols in red wine samples. *Food Chem* **220**, 168–176.

10.1016/j.foodchem.2016.09.152

Callemien D, Collin S (2007) Involvement of flavanoids in beer color instability during storage. *J Agric Food Chem* **55**, 9066–9073. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_78](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_78)

Callemien D, Collin S (2010) Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer—a review. *Food Rev Int* **26**, 1–84. 10.1080/87559120903157954

Capece A., Romaniello R, Pietrafesa A, Siesto G, Pietrafesa R, Zambuto M, Romano P (2018) Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *Int J Food Microbiol* **284**, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>

Cassidy A, Bertoia M, Chiuve S, Flint A, Forman J, Rimm EB (2016) Habitual intake of anthocyanins and flavanones and risk of cardiovascular disease in men. *Am J Clin Nutr* **104**, 587–594. 10.3945/ajcn.116.133132

Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Di Minno G, Ritieni A (2019) Red wine consumption and cardiovascular health. *Molecules* **24**, 3626. 10.3390/molecules24193626

Cheiran KP, Raimundo VP, Manfroi V, Cheiran KP, Rodrigues E, Anzanello MJ, Raimundo VP, Frazzon J, Kahmann A (2019) Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chem* **286**, 113–122. 10.1016/j.foodchem.2019.01.198

DeLange AJ (2008) The Standard Reference Method of Beer Color Specification as the Basis for a New Method of Beer Color Reporting. *J Am Soc Brew Chem* **66**(3), 143-150. 10.1094/ASBCJ-2008-0707-01

Davies N (2016) *Malts*. U: Bamforth CW (ur.) *Brewing materials and processes*. Elsevier, Amsterdam, str. 1–25.

Escobar-Cévoli R, Castro-Espín C, Béraud V, Buckland G, Zamora-Ros R, Béraud GBV (2017) An overview of global flavonoid intake and its food sources. U: Justino GC (ured.) *Flavonoids—From Biosynthesis to Human Health*, Intech Open, London.

Fumi MD, Galli R, Lambri M, Donadini G, De Faveri DM (2011) Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *J Food Compos Anal* **24**, 568–573. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03851-1>

García-Estévez I, Alcalde-Eon C, Martínez-Gil AM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT, Nevares I, Del Alamo-Sanza M (2017) An approach to the study of the interactions between ellagitannins and oxygen during oak wood aging. *J Agric Food Chem* **65**, 6369–6378. [10.1021/acs.jafc.7b02080](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02080)

García-Guzmán JJ, López-Iglesias D, Cubillana-Aguilera L, Lete C, Lupu S, Palacios-Santander JM, Bellido-Milla D (2018) Assessment of the polyphenol indices and antioxidant capacity for beers and wines using a tyrosinase-based biosensor prepared by sinusoidal current method. *Sensors* **19**, 66. [10.3390/s19010066](https://doi.org/10.3390/s19010066)

Gasinski A, Kawa-Rygielska J, Szumny A, Czubaszek A, Gasior J, Pietrzak W (2020) Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). *Molecules* **25**, 3033. <https://doi.org/10.3390/molecules25133033>

Giacosa S, Ossola C, Botto R, Río Segade S, Paissoni MA, Pollon M, Gerbi V, Rolle L (2019) Impact of specific inactive dry yeast application on grape skin mechanical properties, phenolic compounds extractability, and wine composition. *Food Res Int* **116**, 1084–1093. [10.1016/j.foodres.2018.09.051](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.051)

Giovinazzo G, Grieco F (2015) Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods Hum Nutr* **70**, 454–462. [10.1007/s11130-015-0518-1](https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1)

Grainger K, Tattersall H (2016) *Wine Production: Vine to Bottle*, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK, str. 138–143.

Grieco F, Carluccio MA, Giovinazzo G (2019) Autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures enhance polyphenols content, antioxidant activity, and anti-inflammatory response of Apulian red wines. *Foods* **8**, 453. <https://doi.org/10.3390/foods8100453>

Habschied K, Lončarić A, Mastanjević K (2020) Screening of polyphenols and antioxidative

activity in industrial beers. *Foods* **9**, 238. <https://doi.org/10.3390/foods9020238>

Habschied K, Košir IJ; Krstanović V; Kumrić G, Mastanjević K (2021) Beer Polyphenols—Bitterness, Astringency, and Off-Flavors. *Beverages* **7**, 38. <https://doi.org/10.3390/beverages7020038>

Hannah L, Roehrdanz PR, Ikegami M, Shepard AV, Shaw MR, Tabor G, Zhi L, Marquet PA, Hijmans RJ (2013) Climate change, wine, and conservation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 6907–6912. [10.1073/pnas.1210127110](https://doi.org/10.1073/pnas.1210127110)

Heuberger AL, Broeckling CD, Lewis MR, Salazar L, Bouckaert P, Prenni JE (2012) Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. *Food Chem* **135**, 1284–1289. [10.1016/j.foodchem.2012.05.048](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.048)

Huang WY, Liu YM, Wang J, Wang XN, Li CY (2014) Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. *Molecules* **19**, 12827–12841. <https://doi.org/10.3390/molecules190812827>

Jeremic J, Vongluangam I, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2020) The oxygen consumption kinetics of commercial oenological tannins in model wine solution and chianti red wine. *Molecules* **25**, 1215. <https://doi.org/10.3390/molecules25051215>

Jerkovic V, Collin S (2007) Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones. *J Agric Food Chem* **55**, 8754–8758. [10.1021/jf071792k](https://doi.org/10.1021/jf071792k)

Krofta K, Mikyška A, Haškova D (2008) Antioxidant characteristics of hops and hop products. *J Inst Brew* **114**, 160–166. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00321.x>

Kunz T, Frenzel J, Wietstock PC, Methner FJ (2014) Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. *J Inst Brew* **120**, 415–425. [https://doi.org/10.1002/jib.162\\_](https://doi.org/10.1002/jib.162_)

Leitao C, Marchioni E, Bergaentzlé M, Zhao M, Didierjean L, Miesch L, Holder E, Miesch M, Ennahar S (2012) Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *J Cereal Sci* **55**, 318–322. [10.1016/j.jcs.2012.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.01.002)



Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* **380**, 2224–2260. 10.1016/S0140-6736(12)61766-8.

Lugasi A, Hóvári J (2003) Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung* **47**(2), 79–86. <https://doi.org/10.1002/food.200390031>

Lugasi A (2003) Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Aliment* **32**(2), 181–192. 10.1556/AAlim.32.2003.2.7

Makris DP, Kallithraka S, Kefalas P (2006) Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J Food Composite Analysis* **19**, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.10.003>

Markoski MM, Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A (2016) Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. *Nutr Metab Insights* **9**, 51–57. 10.4137/NMI.S32909

McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT (2012) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr* **95**, 454–464. 10.3945/ajcn.111.016634

Mikyška A, Krofta K (2012) Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. *J Inst Brew* **118**, 269–279. <https://doi.org/10.1002/jib.40>

Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* **26**(2), 211–219.

Moura, N, Cazaroti T, Dias N, Fernandes P, Monteiro M, Perrone D, Guedes A (2016) Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chem* **199**, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>

Mozaffarian D, Rosenberg I, Uauy R (2018) History of modern nutrition science—Implications

for current research, dietary guidelines, and food policy. *BMJ* **361**, 2392. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2392>

Muñoz-Insa A, Gastl M, Becker T (2016) Variation of sunstruck flavor-related substances in malted barley, triticale and spelt. *Eur Food Res Technol* **242**, 11–23. [10.1007/s00217-015-2513-z](https://doi.org/10.1007/s00217-015-2513-z)

Nardini M, Garaguso I (2020) Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chem* **305**. 125437 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>

Niculescu VC, Paun N, Ionete RE (2017) The evolution of polyphenols from grapes to wines. U: Jordão AM, Cosme F (ured.) *Grapes and Wines—Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*, Intech Open, London, UK.

Nour V, Trandafir I, Muntean C (2012) Ultraviolet irradiation of trans-resveratrol and HPLC determination of trans-resveratrol and cis-resveratrol in Romanian red wines. *J Chromatogr Sci* **50**, 920–927. [10.1093/chromsci/bms091](https://doi.org/10.1093/chromsci/bms091)

OIV (2016) Density and Specific Gravity at 20°C. Compendium of international analysis of methods. Physical Analysis. Method OIV-MA-AS2-01B.

Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Sözgen-Baskan K, Erçag E, Çelik SE, Baki S, Yıldız L, Karaman S, Apak R (2011) A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal Methods* **3**, 2439–2453. [10.1039/C1AY05320E](https://doi.org/10.1039/C1AY05320E)

Piazzon A, Forte M, Nardini M (2010) Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J Agric Food Chem* **58**, 10677–10683. [10.1021/jf101975q](https://doi.org/10.1021/jf101975q)

Raičević D, Božinović Z, Petkov M, Ivanova-Petropulos V, Kodžulović V, Mugoša M, Šučur S, Maraš V (2017) Polyphenolic content and sensory profile of Montenegrin Vranac wines produced with different oenological products and maceration. *Maced J Chem Chem Eng* **36**, 229–238. [10.20450/mjcce.2017.1145](https://doi.org/10.20450/mjcce.2017.1145)

Redondo N, Nova E, Díaz-Prieto LE, Marcos A (2018) Effects of moderate beer consumption on health. *Nutr Hosp* **35**, 41–44. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.2286>.

Ricci A, Teslic N, Petropoulos V, Parpinello GP, Versari A (2019) Fast analysis of total polyphenol content and antioxidant activity in wines and oenological tannins using a flow injection system with tandem diode array and electrochemical detections. *Food Anal Methods* **12**, 347–354. 10.1007/s12161-018-1366-z

Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* **80**, 1094–1117. 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1

Saura-Calixto F, Serrano J, Perez-Jimenez J (2009) What contribution is beer to the intake of antioxidants in the diet? U: Preedy VR (ured.) Beer in health and disease prevention, Elsevier Inc., str. 441-448.

Singh M, Kaur M, Silakari O (2014) Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* **84**, 206–239. 10.1016/j.ejmech.2014.07.013

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158. 10.5344/ajev.1965.16.3.144

Snopek L, Mlcek J, Sochorova L, Baron M, Hlavacova I, Jurikova T, Kizek R, Sedlackova E, Sochor J (2018) Contribution of red wine consumption to human health protection. *Molecules* **23**, 1684. 10.3390/molecules23071684

Socha R, Pajak P, Fortuna T, Buksa K (2017) Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. *Int J Food Prop* **20**, 1–15. 10.1080/10942912.2017.1306550

Steenackers B, De Cooman L, De Vos D (2015) Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chem* **172**, 742–756. 10.1016/j.foodchem.2014.09.139

Stevens JF, Page JE (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry* **65**, 1317–1330. 10.1016/j.phytochem.2004.04.025

Shellhammer TH, Bamforth CW (2008) Assessing color quality of beer. U: Culver C, Wolstad R (ured.) Color quality of processed foods, American Chemical Society Symposium Series, vol

983. American Chemical Society, Washington, DC, str. 192–202

Szwajgier D (2012) Dry and wet milling of malt. A preliminary study comparing fermentable sugar, total protein, total phenolics and the ferulic acid content in non-hopped worts. *J Inst Brew* **117**, 569–577. 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00505.x

Šeruga M, Novak I, Jakobek L (2011) Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem* **124**, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>

Šučur S, Maraš V, Kodžulović V, Raičević J, Mugoša M, Jug T, Košmerl T (2016) The impact of different commercial yeasts on quality parameters of Montenegrin red wine—Vranac and Kratošija. *Biol Eng Med* **1**, 1-4. 10.15761/BEM.1000105

Torres A, Cachafeiro V, Millán J, Lahera V, Nieto M, Martín R, Bello E, Alvarez-Sala L, Nieto M (2015) Red wine intake but not other alcoholic beverages increases total antioxidant capacity and improves pro-inflammatory profile after an oral fat diet in healthy volunteers. *Rev Clin Esp* **215**, 486–494. 10.1016/j.rce.2015.07.002

Vanbeneden N, Van Roey T, Willems F, Delvaux F, Delvaux FR (2008) Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chem* **111**, 83–91. 10.1016/j.foodchem.2008.03.029

Varga D (2016) Hrana, kuhinja i blagovanje u doba Zrinskih, 1.izd., Meridijani, Samobor

Veljović M, Despotović S, Pecić S, Davidović S, Djordjević R, Vukosavljević P, Leskosek-Cukalović I (2012) The influence of raw materials and fermentation conditions on the polyphenol content of grape beer. U: Lević J, Nedović V, Ilić N, Tumbas V, Kalušević A (ured.) Proceedings of the 6th Central European Congress on Food, CEFood 2012, University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Srbija, str. 1137–1141.

Visioli F, Panaite SA, Tomé-Carneiro J (2020) Wine's phenolic compounds and health: A Pythagorean view. *Molecules* **25**, 4105. <https://doi.org/10.3390/molecules25184105>

Wannenmacher J, Gastl M, Becker T (2018) Phenolic substances in beer: Structural diversity,

reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Compr Rev Food Sci* **17**, 953–988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>

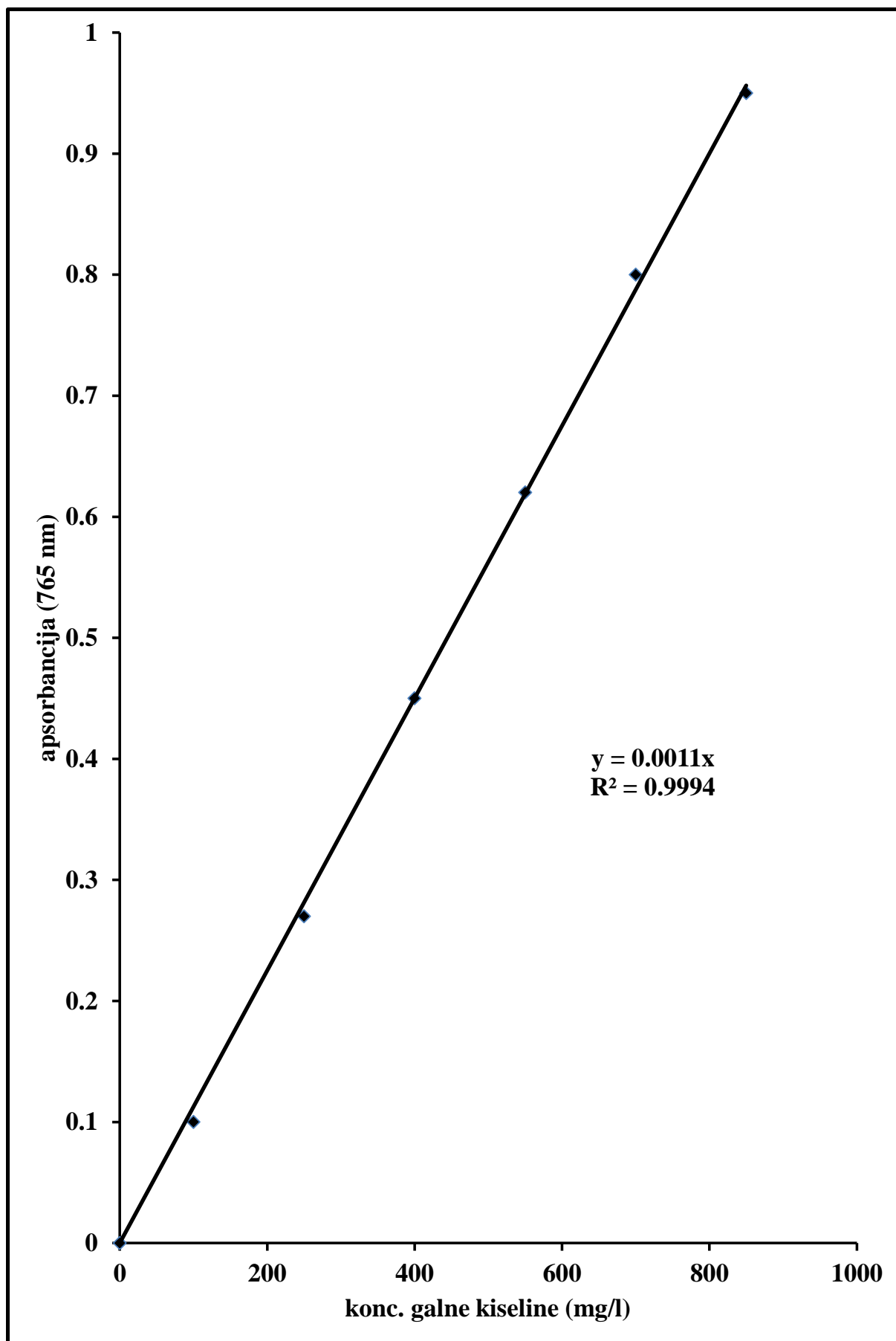
## 7. PRILOZI

### Prilog 1. Specifična gustoća ekstrakta u vinu

Relativna gustoća do 2. decimale	Treće decimalno mjesto u brojčanom izrazu za relativnu gustoću									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g ekstrakta/l vina									
0,99										
1,00	4,6	7,1	9,7	12,3	14,9	17,5	20,1	22,7	25,3	27,9
1,01	30,5	33,1	35,7	38,3	40,9	43,5	46,1	48,7	51,3	53,9
1,02	56,5	59,1	61,7	64,3	66,9	69,5	72,1	74,7	77,3	79,9
1,03	82,6	85,2	87,8	90,4	93,0	95,6	98,2	100,8	103,4	106,1
1,04	108,7	111,3	113,9	116,5	119,1	121,8	124,4	127,0	129,6	132,2
1,05	134,9	137,5	140,1	142,7	145,3	147,9	150,6	153,2	155,8	158,4
1,06	161,1	163,7	166,3	168,9	171,6	174,2	176,8	179,4	182,1	184,7
1,07	187,3	190,0	192,6	195,2	197,9	200,5	203,1	205,8	208,4	211,0
1,08	213,7	216,3	218,9	221,6	224,2	226,9	229,5	232,1	234,8	237,4
1,09	240,0	242,7	245,3	248,0	250,6	253,3	255,9	258,5	261,2	263,8
1,10	266,5	269,1	271,8	274,4	277,1	279,7	282,4	285,0	287,7	290,3
1,11	293,0	295,6	298,3	300,9	303,6	306,2	308,9	311,5	314,2	316,9
1,12	319,5	322,2	324,8	327,5	330,2	332,8	335,5	338,1	340,8	343,5
1,13	346,1	348,8	351,5	354,1	356,8	359,4	362,1	364,8	367,5	370,1
1,14	372,8	375,5	378,1	380,8	383,5	386,2	388,8	391,5	394,2	396,9
1,15	399,5	402,2	404,9	407,6	410,3	412,9	415,6	418,3	421,0	423,7

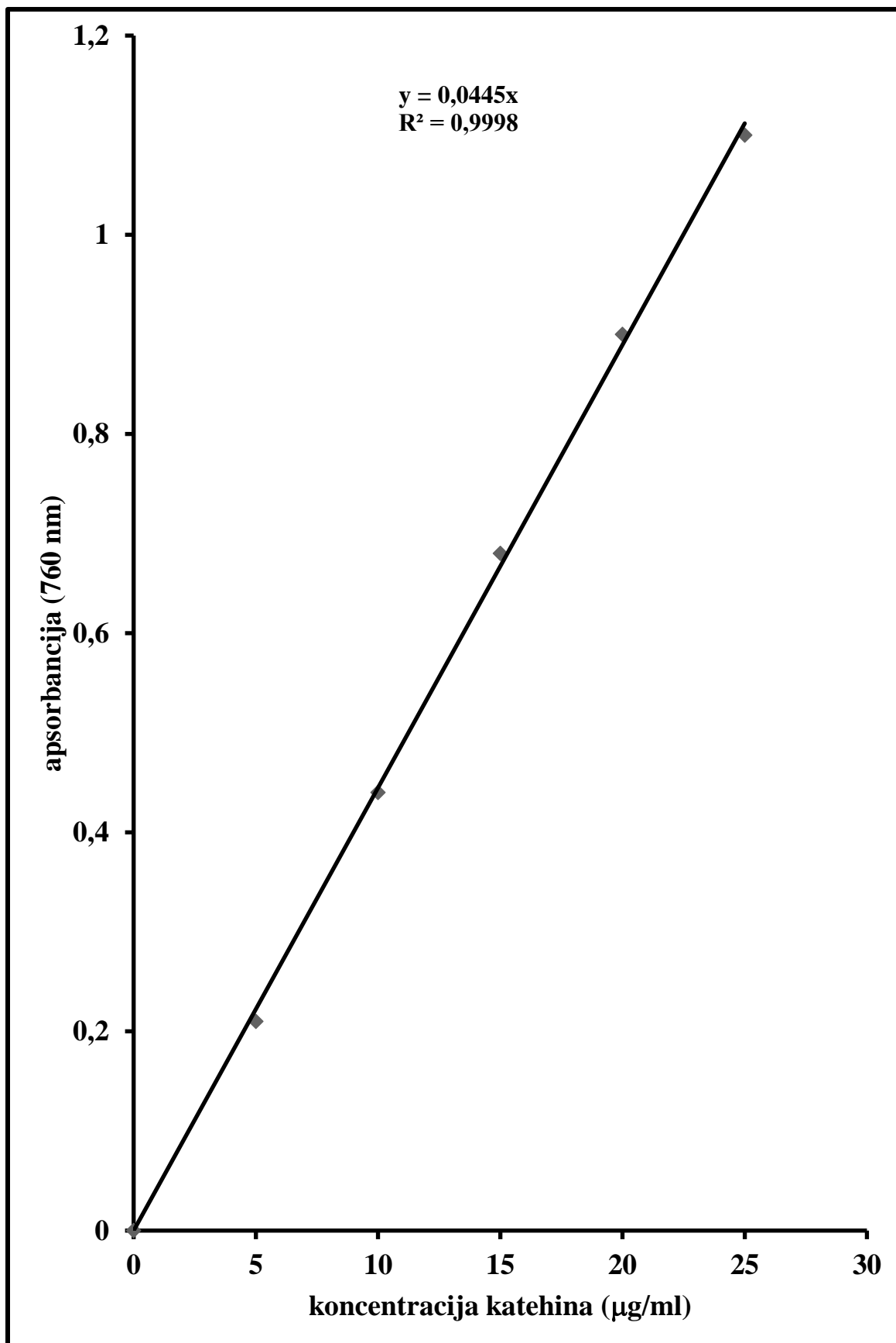
**Prilog 2.** Tablica prema Windisch-u za preračunavanje koncentracije alkohola

Relativna gustoća (20/20)	Četvrto decimalno mjesto relativne gustoće destilata									
	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
	g alkohola/l destilata									
0,999	0,5	1,1	1,6	2,1	2,7	3,2	3,7	4,3	4,8	5,3
0,998	5,8	6,4	6,9	7,4	8	8,5	9,0	9,6	10,1	10,6
0,997	11,2	11,7	12,3	12,8	13,4	13,9	14,5	15,0	15,5	16,1
0,996	16,6	17,2	17,7	18,3	18,8	19,4	19,9	20,5	21,0	21,6
0,995	22,1	22,7	23,3	23,8	24,4	24,9	25,5	26,1	26,6	27,2
0,994	27,8	28,3	28,9	29,4	30,0	30,6	34,2	31,8	32,4	32,9
0,993	33,4	34,1	34,7	35,3	35,9	36,5	37,1	37,6	38,2	38,8
0,992	39,4	39,9	40,5	41,1	41,7	42,3	42,9	43,5	44,1	44,7
0,991	45,3	45,9	46,5	47,1	47,7	48,3	48,9	49,5	50,1	57,0
0,990	51,3	52,0	52,6	53,2	53,8	54,4	55,0	55,6	56,2	56,9
0,989	57,5	58,1	58,7	59,3	59,9	60,6	61,2	61,8	62,5	63,1
0,988	63,7	64,4	65,0	65,6	66,3	66,9	67,5	68,2	68,8	69,4
0,987	70,1	70,7	71,4	72,0	72,7	73,3	74,0	74,6	75,3	75,9
0,986	76,6	77,2	77,9	78,5	79,1	79,8	80,4	81,1	81,8	82,5
0,985	83,1	83,8	84,5	85,1	85,8	86,5	87,2	87,8	88,5	89,2
0,984	89,9	90,6	91,2	91,9	92,6	93,3	94,0	94,7	95,4	96,0
0,983	96,7	97,4	98,1	98,8	99,5	102,2	100,9	101,6	102,3	103,0
0,982	103,6	104,3	105,0	105,7	106,4	107,1	107,8	108,5	109,2	109,9
0,981	110,7	111,4	112,1	112,8	113,5	114,2	114,9	115,7	116,4	117,1
0,980	117,8	118,5	119,3	120,8	120,7	121,5	122,2	122,9	123,6	124,4
0,979	125,1	125,8	126,6	127,3	128,0	128,8	129,5	130,2	130,9	131,6
0,978	132,4	133,1	133,8	134,5	135,3	136,0	136,7	137,4	138,2	138,9
0,977	139,7	140,4	141,2	141,9	142,7	143,4	144,2	144,9	145,7	146,4
0,976	147,1	147,9	148,6	149,3	150,1	150,8	151,5	152,2	153,0	153,7
0,975	154,5	155,2	155,9	156,6	157,4	158,1	158,8	159,6	160,3	161,0
0,974	161,7	162,5	163,2	163,9	164,7	165,4	166,1	166,9	167,6	168,3
0,973	169,1	169,8	170,5	171,2	172,0	172,7	173,4	174,2	174,9	175,6
0,972	176,3	177,0	177,8	178,5	179,2	179,9	180,6	181,3	182,1	182,8
0,971	183,5	184,2	184,9	185,6	186,3	187,0	187,7	188,4	189,1	189,8
0,970	190,5	191,2	191,9	192,6	193,3	194,0	194,7	195,4	196,1	196,8
0,969	197,5	198,2	198,8	199,5	202,2	200,9	201,6	202,3	203,0	203,7
0,968	204,3	205,0	205,7	206,4	207,0	207,7	208,4	209,0	209,7	210,4
0,967	211,1	211,7	212,4	213,1	213,7	214,4	215,1	215,7	216,4	217,1
0,966	217,7	218,4	219,0	219,7	220,4	221,0	221,7	222,3	223,0	223,6
0,965	224,3	224,9	225,6	226,2	226,9	227,5	228,2	228,8	229,5	230,1

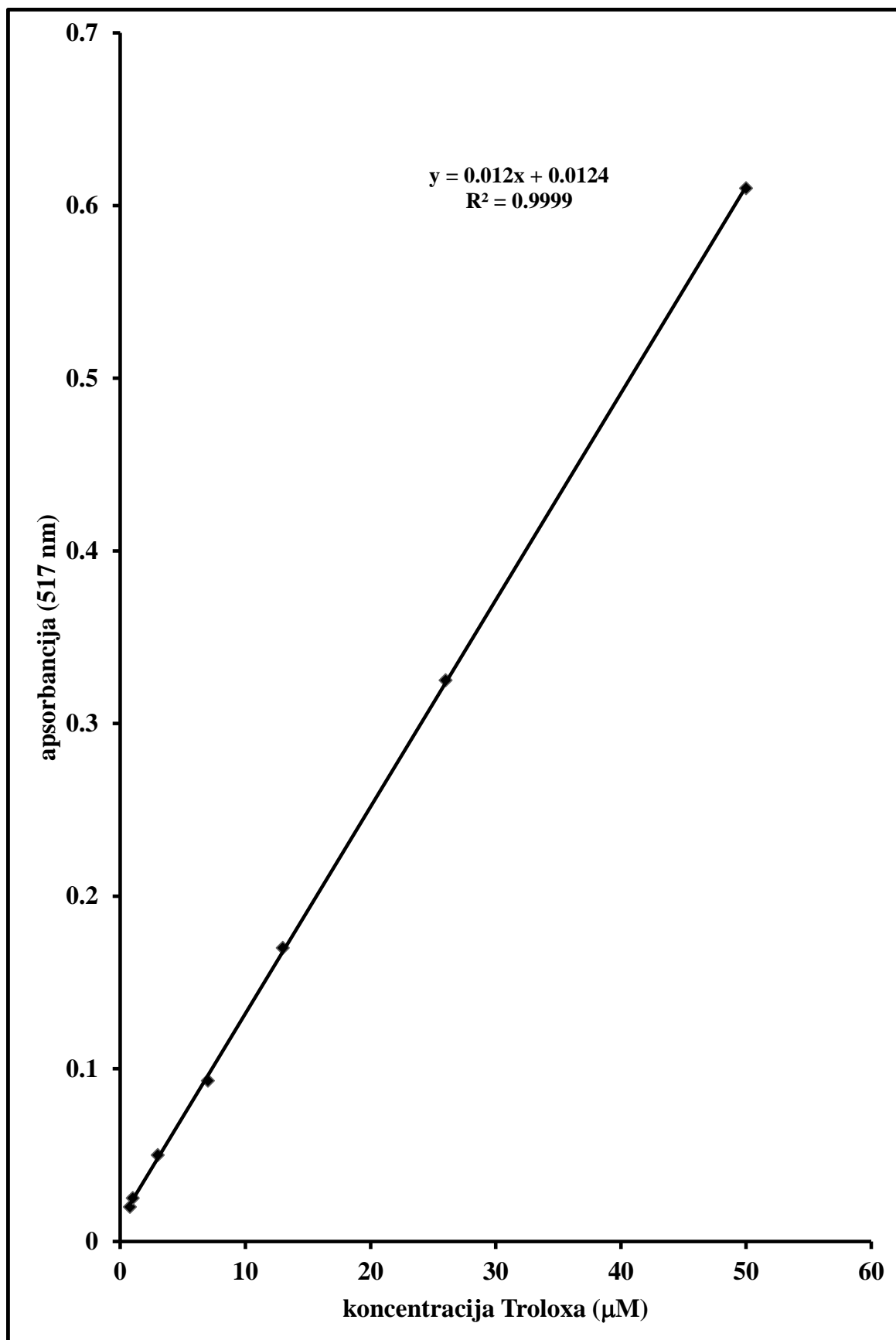


Prilog 3. Baždarni pravac koncentracije galne kiseline (mg/L)

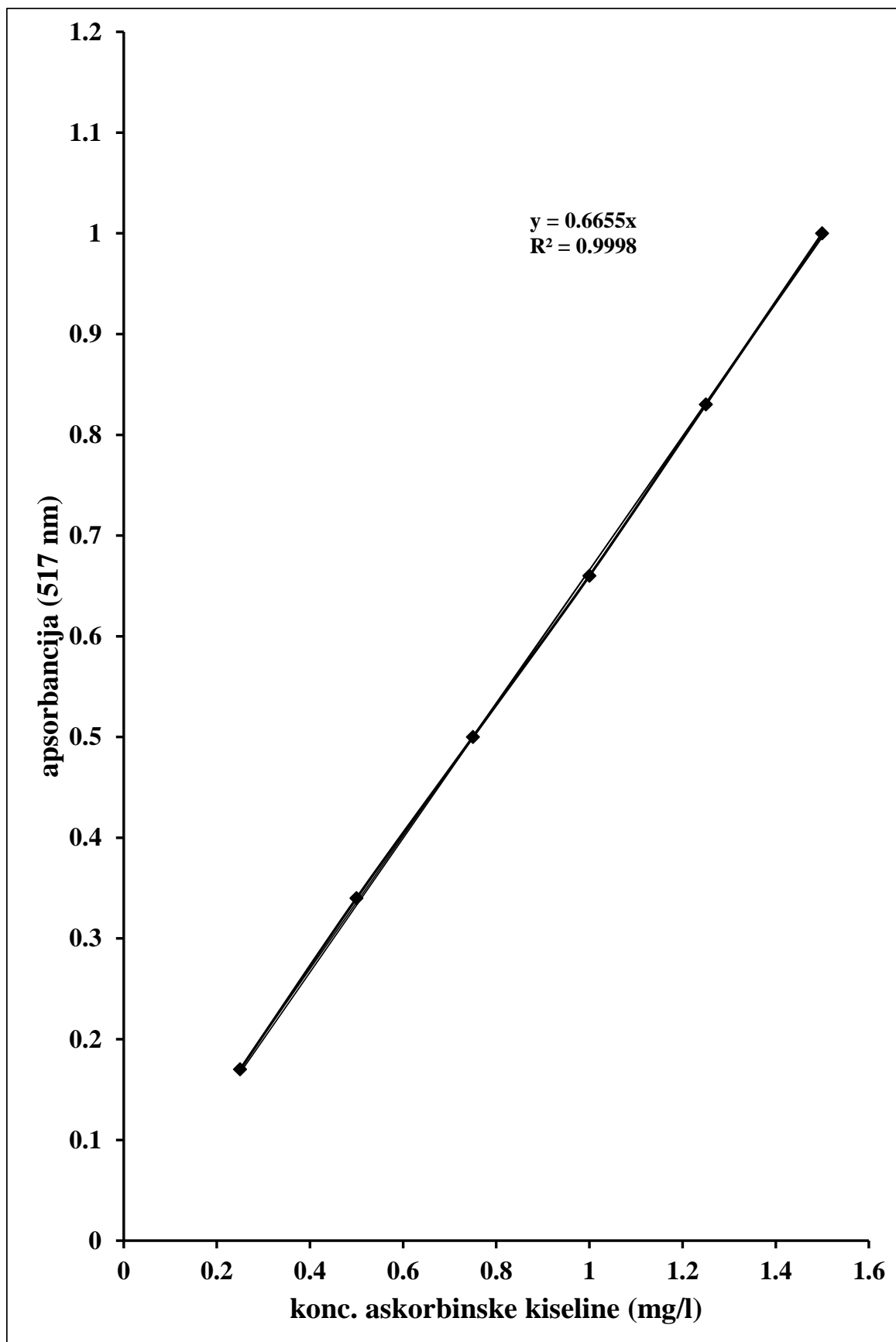




Prilog 4. Baždarni pravac koncentracije katehina ( $\mu\text{g/mL}$ )



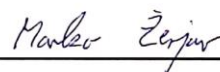
Prilog 5. Baždarni pravac koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ )



**Prilog 6.** Baždarni pravac koncentracije askorbinske kiseline (mg/L)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marko Žerjav izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Marko Žerjav in cursive script, positioned above a horizontal line.

Vlastoručni potpis