

# Antioksidacijska svojstva i stabilnost boje tijekom ubrzanog i prirodnog starenja piva tamnih piva

---

Herceg, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

*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:159:570136>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

FILIP HERCEG  
6489/BT

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I STABILNOST BOJE  
TIJEKOM UBRZANOG I NORMALNOG STARENJA TAMNIH  
PIVA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2015.

Završni rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

### ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I STABILNOST BOJE TIJEKOM UBRZANOG I PRIRODNOG STARENJA PIVA TAMNIH PIVA

FILIP HERCEG, 6489/BT

**Sažetak:** Pivo je piće dobiveno alkoholnom fermentacijom sladovine, većinom pripravljene samo od ječmenog slada, no mogu se dodati i neslađene žitarice, kao što su kukuruz, pšenica ili riža. Smatra se dobrim izborom polifenola kojima je izvor u ječmenom sladu i hmelju. U ovom je radu određivan oksidacijski profil dva različita tipa hrvatskih tamnih piva podvrgnutih ubrzanom postupku starenja (6 dana pri 42 °C) i prirodnom starenju (4 mjeseca pri sobnoj temperaturi). U uzorcima su određivani udjel ukupnih polifenola, sposobnost vezanja slobodnih radikala (DPPH), redukcijska snaga i stabilnosti boje piva tijekom istraživanja. Rezultati ubrzanog starenja piva su pokazali da se nije dogodila promjena u udjelu ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta. Piva koja su prirodno starila imala su smanjeni udjel polifenola, smanjenu reducirajuću snagu i antioksidacijski kapacitet. Za smanjenje moguće nestabilnosti boje piva preporučeno je skladištenje piva bez prisustva kisika pri niskim temperaturama.

**Ključne riječi:** tamno pivo, polifenoli, antioksidacijski kapacitet, starenje, skladištenje

**Rad sadrži:** 36 stranica, 14 slika, 3 tablice, 47 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf) formatu pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Završni rad predan:** rujan 2015.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

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

### **ANTIOXIDATIVE PROPERTIES AND COLOR STABILITY IN FORCED AND NATURALLY AGED BEERS**

**FILIP HERCEG, 6489 /BT**

**Abstract:** Beer is a beverage obtained through alcoholic fermentation of malt wort, usually made of barley, which could be added of other cereals, such as corn, wheat or rice. It can be considered a good source of polyphenols derived from barley malt and hops. This study evaluated the oxidative profile of two different types of Croatian dark beer submitted to a forced aging process (6 days at 42 °C) and natural aging (4 months at room temperature). The applied tests were: total polyphenol content, free radical scavenging ability (DPPH), reducing power and beer color stability. Results showed no changes in total polyphenol content or antioxidant capacity during forced aging. Beers aged naturally showed a decrease in their polyphenol content, reducing power and antioxidant capacity. Beer storage in the absence of oxygen and at low temperature is recommended so as to minimize beer color instability.

**Keywords:** Dark beer, polyphenols, antioxidant capacity, aging, storage

**Thesis contains:** 36 pages, 14 figures, 3 tables, 47 references

Original in: Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

**Mentor:** *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

**Final work delivered:** September, 2015

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2. 1. Polifenoli u pivu... ..	3
2. 2. Polifenoli i koloidna nestabilnost piva .....	4
2. 3. Mehanizam nastajanja koloidne nestabilnosti .....	4
2. 4. Antioksidacijski kapacitet piva.....	6
2. 5. Flavonoidi i nestabilnost boje piva tijekom skladištenja.....	7
2.6. Stabilnost okusa piva .....	8
2.7. Metode za procjenu starenja piva .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Uzorci piva.....	13
3.1.2. Reagensi za određivanje ukupnih polifenola .....	13
3.1.3. Reagensi za određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala.....	13
1. otapalo: metanol (Fluka).....	13
2. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma) .....	13
3. Trolox (Sigma) .....	13
3.1.4. Reagensi za određivanje reducirajuće snage.....	13
3.2. Aparati .....	14
3.3. Metode istraživanja.....	15
3.3.1. Određivanje kakvoće piva.....	15
3.3.2. Analitičke metode .....	17
<b>4. REZULTATI</b> .....	21
4.1. Kemijska analiza piva.....	21
4.2. Antioksidacijska svojstva tamnih piva .....	22
<b>5. RASPRAVA</b> .....	28
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	31
<b>7. LITERATURNI NAVODI</b> .....	32

## **1. UVOD**

Pivo je osvježavajuće piće s malim udjelom alkohola, proizvedeno od ječmenog slada i hmelja, no za većinu konzumenata je nepoznato da je pivo kompleksna otopina sastojaka, od kojih je oko 450 niskomolekulskih sastojaka određeno i karakterizirano, no sadrži i makromolekule kao što su proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi i lipidi. Svi ovi sastojci zajedno tvore svojstvo ili „karakter“ određenog piva (Bamforth, 1999). Proizvodnja piva je dugotrajan i složen proces sastavljen od niza tehnoloških operacija podijeljenih u pet faza: priprema sladovine, vrenje, odležavanje, filtracija i punjenje.

U ljetnim je mjesecima povećana potrošnja piva, kada dolazi do izražaja vrlo važan problem za sve proizvođače piva, a to je kako održati proizvod stabilnim tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Starenje piva je vrlo kompleksan fenomen i razumijevanje reakcijskih mehanizama odgovornih za te promjene je od najveće važnosti. Biokemijski procesi koji se zbivaju tijekom skladištenja piva, događaju se spontano, ali ne i istovremeno. Intenzitet ovih reakcija ovisi o uvjetima u kojima je proizvod skladišten i interakcijama metaboličkih putova.

Rok trajanja pakiranog piva je određen pojavom zamućenja ili kvarenjem okusa. Do danas nije u potpunosti poznato koji mehanizmi utječu na stabilnost piva. Smatra se da su sirovine uzrok pojave zamućenja, iako i sam proces fermentacije može biti uzrok. Postojanost okusa ovisi o količini kisika u pakiranom pivu, budući da veća količina kisika u pivu uzrokuje pojavu aerobnih mikroorganizama u pivu.

Osim okusnih i nutritivnih svojstava, pivo sadrži sastojke koji su prepoznati u epidemiološkim istraživanjima kao zaštitni agensi, a radi se o prirodnim antioksidansima (Nicoli *et al.*, 1997). Pivo sadrži sastojke s antioksidacijskim svojstvima, kao što su reducirajući šećeri, produkti Maillardove reakcije, vitamini i fenolni sastojci čiji se udjel smanjuje s vremenom skladištenja, odnosno starenjem (Oñate-Jaen i sur., 2006). Polifenolni sastojci su važni antioksidansi, čiji mehanizam djelovanja uključuje i vezanje slobodnih radikala i keliranje metala. Neka istraživanja su pokazala da konzumiranje piva značajno podiže udjel antioksidanasa u plazmi, budući da se konzumiranjem piva mogu unijeti fenolne komponente u organizam (Montanari i sur., 1999).

Dobro je poznato da se mnogi antioksidansi gube prilikom skladištenja, što utječe na starenje piva. Ti spojevi reagiraju i s drugim sastojcima piva, zbog čega je starenje piva kompliciran proces koji uključuje mnoge mehanizme koji do danas nisu dobro istraženi. Tijekom skladištenja piva, fenolni sastojci reagiraju s proteinima i tvore visokomolekulske spojeve, koji dovode do zamućenja piva (Vanderhaegen i sur., 2006). No, polifenoli imaju nezamjenjiv učinak na oksidativnu stabilnost piva (Andersen i sur., 2000).



Cilj ovog rada bio je istražiti kako se mijenjaju kemijski sastav i antioksidacijska svojstva tamnih piva tijekom ubrzanog i normalnog starenja tijekom skladištenja, pa su stoga napravljena sljedeća određivanja:

- usporedba kemijskog sastava dva tamna piva različitih proizvođača,
- udjela ukupnih polifenola u pivima tijekom skladištenja,
- antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom,
- redukcijske snage istraživanih piva
- stabilnosti i intenziteta boje tamnih piva tijekom skladištenja.

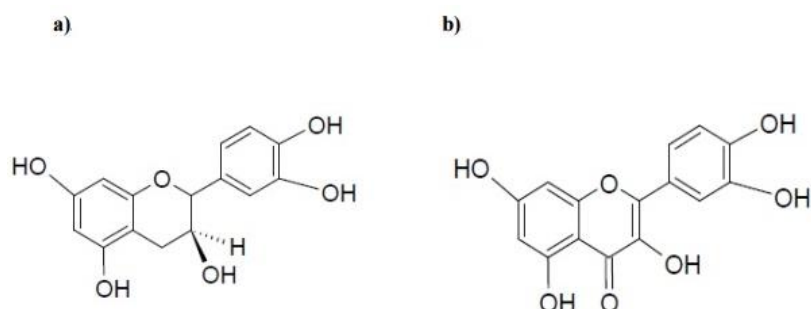
## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2. 1. Polifenoli u pivu

Izvorište polifenola u pivu su ječam i hmelj. Polifenole u većim koncentracijama nalazimo u višim biljkama gdje imaju svoju signalnu i obrambenu ulogu (Doner i sur., 1993).

Blagotvorni utjecaji napitaka koji sadrže polifenole, kao što su čajevi, kava, voćni sokovi, vino i pivo, dobro su poznati i istraženi (Gorinstein i sur., 2000; Kaur i Kapoor, 2002). Fenolni sastojci predstavljaju skupinu kemijskih supstancija koje u svojoj strukturi imaju barem jednu fenolnu jedinicu, a izraz polifenoli se odnosi na sve molekule s dva ili više fenolna prstena (Bamforth, 1999).

U pivu je važan postotak fenolnih spojeva prisutan u monomernom obliku kao što su hidroksicimetne kiseline (npr. *p*-kumarinska, ferulinska, i kafeinska) i fenolne kiseline (npr. galna). Najvažnija hidroksicimetna kiselina u pivu je ferulinska kiselina (0,52-2,36 mg/l), koja dolazi iz stanične stijenke endosperma ječmenog zrna (Baxter i sur., 1997). Koncentracije polifenola u pivima donjeg vrenja su između 50 i 150 mg/l (Callemien i Collin, 2007). Ovisno o tipu piva, čak do 80 % polifenola potječe iz slada, dok je ostatak iz hmelja (Goupy i sur., 1999). U pivu možemo odrediti nekoliko grupa fenolnih spojeva, od jednostavnih fenola, derivata benzojeve kiseline, cimetne kiseline, kumarina, flavanona, flavona, flavan-3-ola, proantocijanidina,  $\alpha$ -kiselina i drugih spojeva (Aron i Shellhammer, 2010). Konačna koncentracija polifenola u pivu u najvećoj mjeri ovisi o načinu varenja piva i uporabljenim sirovinama. Dva su tipa polifenola koja u posljednje vrijeme izazivaju veliku pažnju, a to su flavan-3-ol i flavonol (Slika 1).



**Slika 1.** Strukture flavonoidnih polifenola: a) flavan-3-ol, b) flavonol (Aron i Shellhammer, 2010)

Flavonoli čine približno 10 % ukupnih polifenola u pivu, a u tu skupinu pripadaju i spojevi koji izazivaju koloidnu nestabilnost piva. Flavan-3-ol ima važnu ulogu u postizanju zadovoljavajuće kakvoće piva: utječe na stabilnost pjene, okus, boju i koloidnu stabilnost (Dvorakova i sur., 2008).

## **2. 2. Polifenoli i koloidna nestabilnost piva**

Koloidna nestabilnost piva uglavnom je izazvana interakcijama između polipeptida i polifenola, koje rezultiraju vidljivim zamućenjem s posljedicom smanjenja trajnosti gotovog proizvoda (Siebert i Lynn, 1997).

Polipeptidi odgovorni za nastajanje zamućenja imaju svoje izvorište u ječmu, veličine su od 10 do 30 kDa i bogati su prolinom i glutaminskom kiselinom (Asano i sur., 1982). Čine tek 3-7 % ukupnih proteina piva (Leiper i sur., 2003). Ovi polipeptidi, poznati kao „osjetljivi proteini“, talože se s taninskom kiselinom, i na taj način se može odrediti njihov udjel u pivu.

Polifenoli koji izazivaju mutnoću nazvani su „tanoidima“ i vrlo su slični polimernim proantocijanidinima (Chapon, 1993). Tanoidi se pretvaraju u tanine koji mogu izazvati zamućenje i najčešće uključuju i flavonoidne oligomere (McMorrough, 1995). Flavonoidi iz piva su najčešće katehin, epikatehin, galokatehin i epigalokatehin (Siebert i sur., 1996).

Kako pivo stari, kao prva faza u stvaranju zamućenja je pojava hladnog zamućenja. Događa se kad je pivo ohlađeno ispod 0 °C i nestaje ako se pivo zagrije. Hladno zamućenje se pojavljuje kada se proteini i polifenoli vežu nekovalentnim vezama (Siebert i sur., 1996). Trajno zamućenje nastaje na isti način u početku, no ubrzo se stvaraju kovalentne veze i pomoću njih netopljivi kompleksi koji se ne otapaju pri zagrijavanju.

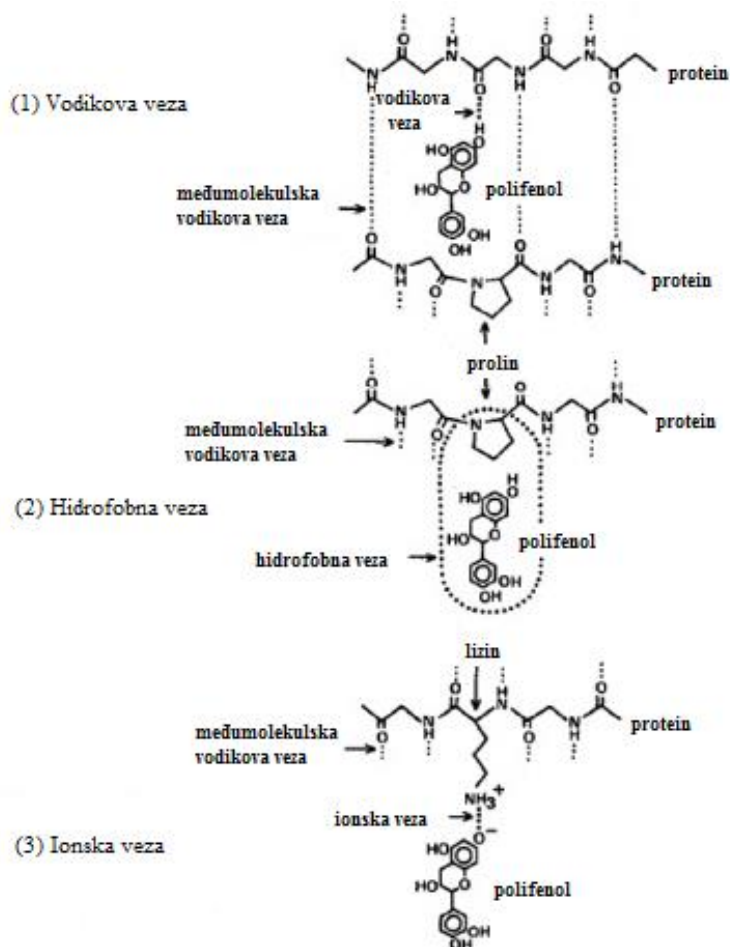
Za osiguravanje koloidne stabilnosti piva nije nužno ukloniti sve proteine i tanoide. Identifikacija dopuštenog udjela ovih spojeva može se koristiti za definiranje sastava piva pri punjenju u boce kojom se postiže zadovoljavajuća dugotrajna stabilnost proizvoda (Moll i sur., 1987).

## **2. 3. Mehanizam nastajanja koloidne nestabilnosti**

Kada se govori o nestabilnosti piva, važno je razlikovati koloidno zamućenje od mikrobiološkog. Mikrobiološka nestabilnost piva je vrlo rijetka pojava zahvaljujući značajnim poboljšanjima u dizajnu i tehnološkim operacijama tijekom proizvodnje piva. Koloidno ili ne

biološko zamućenje podrazumijeva reakcije između različitih molekula proteina, polifenola i ugljikohidrata (Bamforth, 1999; McMurrugh i sur., 1999). Istraživački tim Karla Sieberta s Cornell University, USA (Siebert i sur., 1996) proveo je opsežna istraživanja na ovom području i objavio da dvije glavne molekule – proteini koji izazivaju zamućenje i polifenoli – imaju specifične strukture koje im omogućavaju međusobno djelovanje i time tvorbu čestica koloida (Siebert i sur., 1996; Siebert i Lynn, 1998).

Zanimljivo je da je prolin jedina aminokiselina u sladovini koja ne treba kvascu tijekom vrenja zbog toga što kvasac nema permeaze koje bi omogućile transport prolina u stanicu. U posljednjih su trideset godina predloženi brojni mehanizmi nastanka koloidnog zamućenja piva, a na Slici 2 su prikazani mehanizmi koje su, među prvima, predložili Asano i suradnici još davne 1982. godine.



**Slika 2.** Mehanizmi reakcije proteina s polifenolima (Asano i sur., 1982)

## 2. 4. Antioksidacijski kapacitet piva

Antioksidacijski kapacitet namirnice rezultat je sinergijskih učinaka između bioaktivnih supstancija, elemenata u tragovima, metala i dugih sastojaka namirnice, te ne predstavlja zbroj antioksidacijskih kapaciteta pojedinih bioaktivnih supstancija (Liu, 2004). Antioksidansi mogu djelovati putem vrlo različitih mehanizama kao što je keliranje metala, supresija prvih slobodnih radikala koji iniciraju oksidativno oštećenje, vezanje slobodnih radikala i stvaranje kompleksa ili induciranje aktivnosti antioksidacijskih bioloških sustava (Prior i sur., 2005).

Saura- Calixto i suradnici (2009) su mjerili antioksidacijski kapacitet piva na dva načina: FRAP i ABTS ili TEAC (*eng.* Trolox equivalent antioxidant capacity) metodama koje se temelje na sposobnosti uzorka da veže organske slobodne radikale. Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol Troloxa}/100 \text{ ml}$  (Tablica 1). Iz tablice je vidljivo da najveći antioksidacijski kapacitet imaju crni čaj, pivo, jabukovača i crveno vino, za razliku od bijelog vina, jabučnog soka i soka od naranče (Bamforth, 2004).

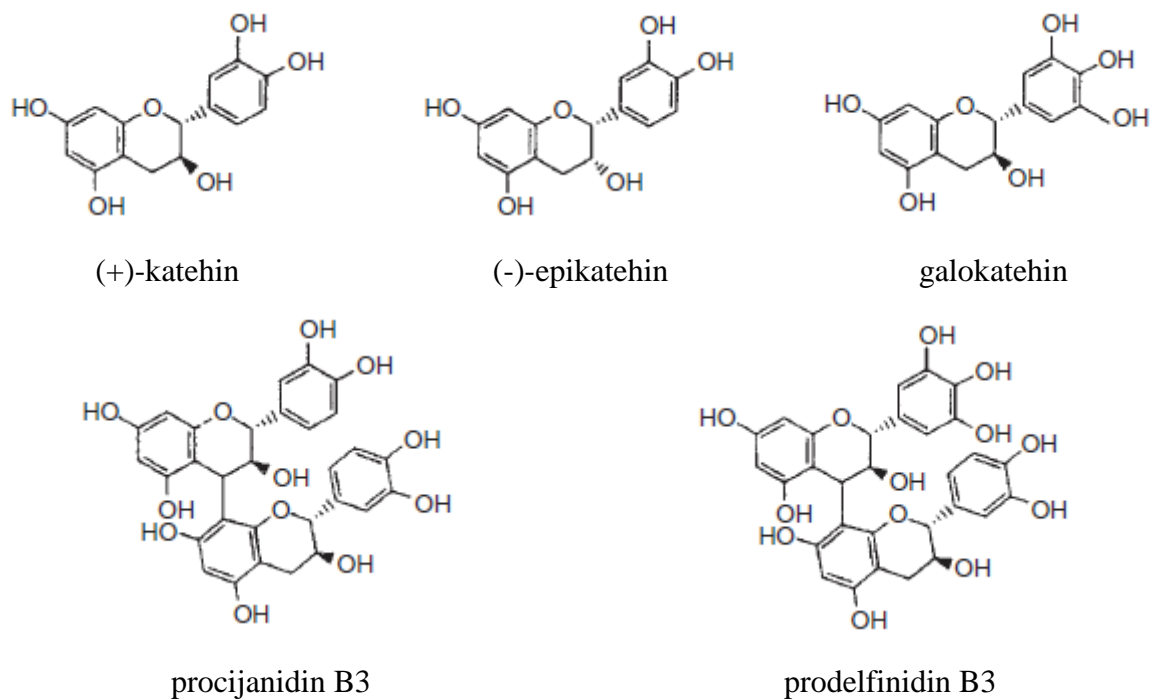
**Tablica 1.** Antioksidacijski kapacitet najčešće konzumiranih namirnica i pića  
(Bamforth, 2004)

Namirnica	Količina	Ukupni antioksidacijski kapacitet ( $\mu\text{mol Trolox ekvivalenata}$ )
jabuka (oguljena)	100 g	640
rajčica	100 g	160
bijelo vino	150 mL	220
crni čaj	150 mL	1400
jabučni sok	150 mL	140
sok od naranče	150 mL	400
pivo	500 mL	910-1340
jabukovača	500 mL	200-5190
crveno vino	150 mL	1340-3400

## 2. 5. Flavonoidi i nestabilnost boje piva tijekom skladištenja

Flavonoidi, obojeni antocijani i tanini, polifenoli su koji doprinose nestabilnosti piva. Proantocijanidini su odgovorni za koloidnu nestabilnost, dok se za flavonoide smatra da sudjeluju u nestabilnosti boje piva (Callemien i Collin, 2007). Promjene boje piva tijekom skladištenja uglavnom su posljedica enzimskih i ne enzimskih oksidacija polifenola i/ili nastajanja melanoidinskih spojeva (Šavel, 2010). Nadalje, tijekom proizvodnje piva, u fazi ukomljavanja i kuhanja sladovine s hmeljom, nastaju obojeni karamelni spojevi, koji utječu na intenzitet boje.

U prisutnosti kisika, dolazi do brzog pojačavanja intenziteta boje u prvim danima skladištenja zbog oksidacije i dodatne razgradnje polifenola, što rezultira smanjenjem udjela ukupnih flavonoida. McMurrugh i sur. (1996) su uočili smanjenje koncentracije (+)-katehina, (-)-epikatehina, prodelfinidina B3 i procijanidina B3 pri 37 °C, posebice tijekom prvih 4-5 tjedana skladištenja (Slika 3). Suprotno tome, nakon lag perioda od oko 5 tjedana, udjel „tanoida“ se povećao (McMurrugh i sur., 1997). Nadalje, prema istraživanjima koja su proveli Gardner i McGuinness (1977), oksidativni mehanizmi mogu izazvati polimerizaciju flavonoida, što dodatno utječe na intenzitet boje.

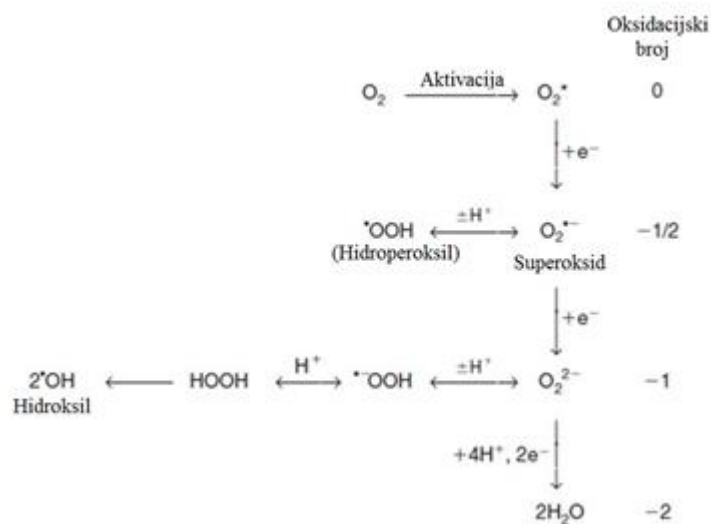


**Slika 3.** Flavonoidi iz piva (Siebert i Lynn, 1998)

## 2.6. Stabilnost okusa piva

Kada se pivo skladišti duže vrijeme, stvara se trajno zamućenje. Iako sam proces fermentacije utječe na koloidnu stabilnost piva, sastojci korištenih sirovina se smatraju glavnim uzročnicima zamućenja. Koloidna nestabilnost piva je uzorkovana formiranjem netopljivih kompleksa između proteina i oksidiranih polifenola. Stoga, ravnoteža između te dvije grupe spojeva uvelike određuje koloidnu stabilnost piva (Andersen i sur., 2000). Frekvencija pojave zamućenja se povećava najviše zbog temperature skladištenja i prisutnosti kisika (usko vezano uz kvarenje okusa). Prisutnost željeza u tragovima indirektno uzrokuje pojavu zamućenja budući da katalizira reakcije oksidacije. Kretanje koloida u pivu ubrzava proces formiranja zamućenja (zbog brzine kojom reagiraju koloidi), a svjetlost potiče oksidaciju i pojavu zamućenja (Stewart, 2004).

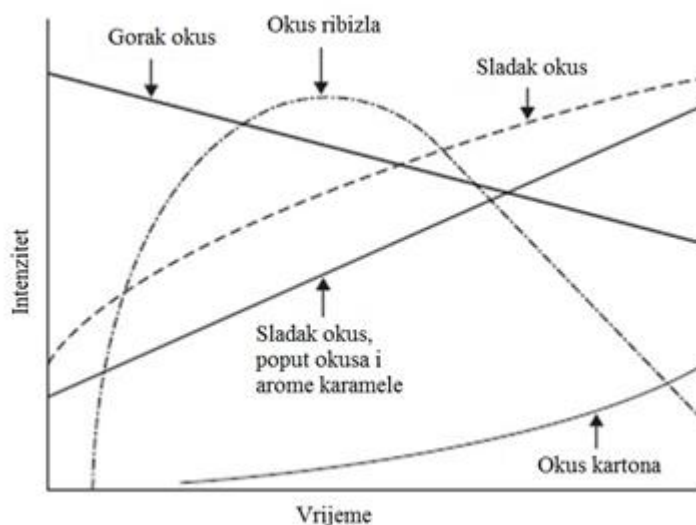
Stabilnost okusa ovisi o koncentraciji otopljenog kisika u pivu. Vrlo je važno da koncentracija otopljenog kisika u pivu bude što manja prije pakiranja u ambalažu (manje od 100 mg/L) te da akumulacija kisika pri punjenju bude minimalna. Ustanovljeno je da je oksidacija piva glavni uzrok kvarenja okusa. Kisik u obliku molekule,  $O_2$ , nije pretjerano reaktivan (Bamforth i Parsons, 1985). Međutim, aktivirani oblici kisika ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $O_2^{2-}$ ,  $H_2O$ ,  $OH^{\cdot}$ ) sudjeluju u procesu starenja piva (Uchida i Ono, 1996) (Slika 4).



**Slika 4.** Mehanizam nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva (Preedy, 2009)



Reakcije oksidacije uključuju i Fentonove reakcije, koje ovise o ionima kisika i željeza ili bakra te minimiziranje prisutnosti tih sadržaja pozitivno utječe na stabilnost okusa piva (Andersen i sur., 2000). Međutim, sada se zna da stabilnost okusa piva ovisi o svim stupnjevima proizvodnje piva. U mnogim namirnicama, kvarenje uzorkuje pojava raznih neželjenih nezasićenih karbonilnih spojeva. To vrijedi i za kvarenje piva (Bamforth, 2000). Spojevi odgovorni za loš okus piva mijenjaju se tijekom produženog skladištenja, a te promjene su prikazane na Slici 5.



**Slika 5.** Dalglieshov dijagram promjene u okusima piva tijekom skladištenja (Preedy, 2009)

Poznato je da pojava određenih karbonilnih spojeva (produkti oksidacije) igra važnu ulogu stabilnosti okusa piva (Varmuza i sur., 2002). Spojevi koji uzrokuju sladak okus vrlo starih piva još nisu identificirani. Ipak, smatra se da "papierast" okus piva starih 2-4 mjeseca uzrokuju nezasićeni aldehidi. Aldehyd s najvećim utjecajem na okus je *trans*-2-nonenal. Ostali aldehidi, poput nonadienala, dekadienala i undekadienala, mogu uzrokovati promjenu okusa (Stewart, 2004). Drugi spojevi čija se koncentracija povećava tijekom starenja piva su:  $\beta$ -damascenon, metional-dimetiltrisulfid (Chevance i sur., 2002; Guido i sur., 2004) i furfural-etil-eter (Vanderhaegen, 2004). Poznato je da je stabilnost okusa piva određena endogenom antioksidativnom aktivnošću samog piva, na koju utječe svaki stupanj proizvodnje piva (Uchida i Ono, 1996). Pivo sadrži sastojke s antioksidativnim svojstvima kao što su: reducirajući šećeri, sumporov dioksid, fenolni spojevi, vitamini i MRP-i. Znatno broj fenolnih

spojeva mogu djelovati kao antioksidanti, s mehanizmima koji uključuju prikupljanje slobodnih radikala i heliranje metala (Fantozzi i sur., 1998). Sadržaj fenolnih spojeva u pivu, koji je opisan u bibliografiji, oscilira između 50 i 350 mg/L. S druge strane, uloga fenola kao antioksidanta je sporna. Pri istraživanju efektivnosti fenolnih spojeva kao antioksidanta dobiveni su kontradiktorni rezultati, pri čemu je sulfid prepoznat kao bitan antioksidant u pivu (Kaneda i Takashio, 1996; Uchida i Ono, 1996; Foster i sur., 1999).

## **2.7. Metode za procjenu starenja piva**

Iako se loš okus piva lako identificira senzorskom analizom za okus piva, svakako postoji potreba za analitičkim metodama kojima je moguće odrediti spojeve odgovorne za taj okus kako bi se omogućilo kvantitativno određivanje kvarenja piva. U literaturi se mogu naći razne metode za procjenu starenja piva. Te metode se najviše odnose na nestabilnost okusa piva, što je najvažniji čimbenik u određivanju roka trajanja piva u ambalaži (Uchida i Ono, 1996).

Dijele se na:

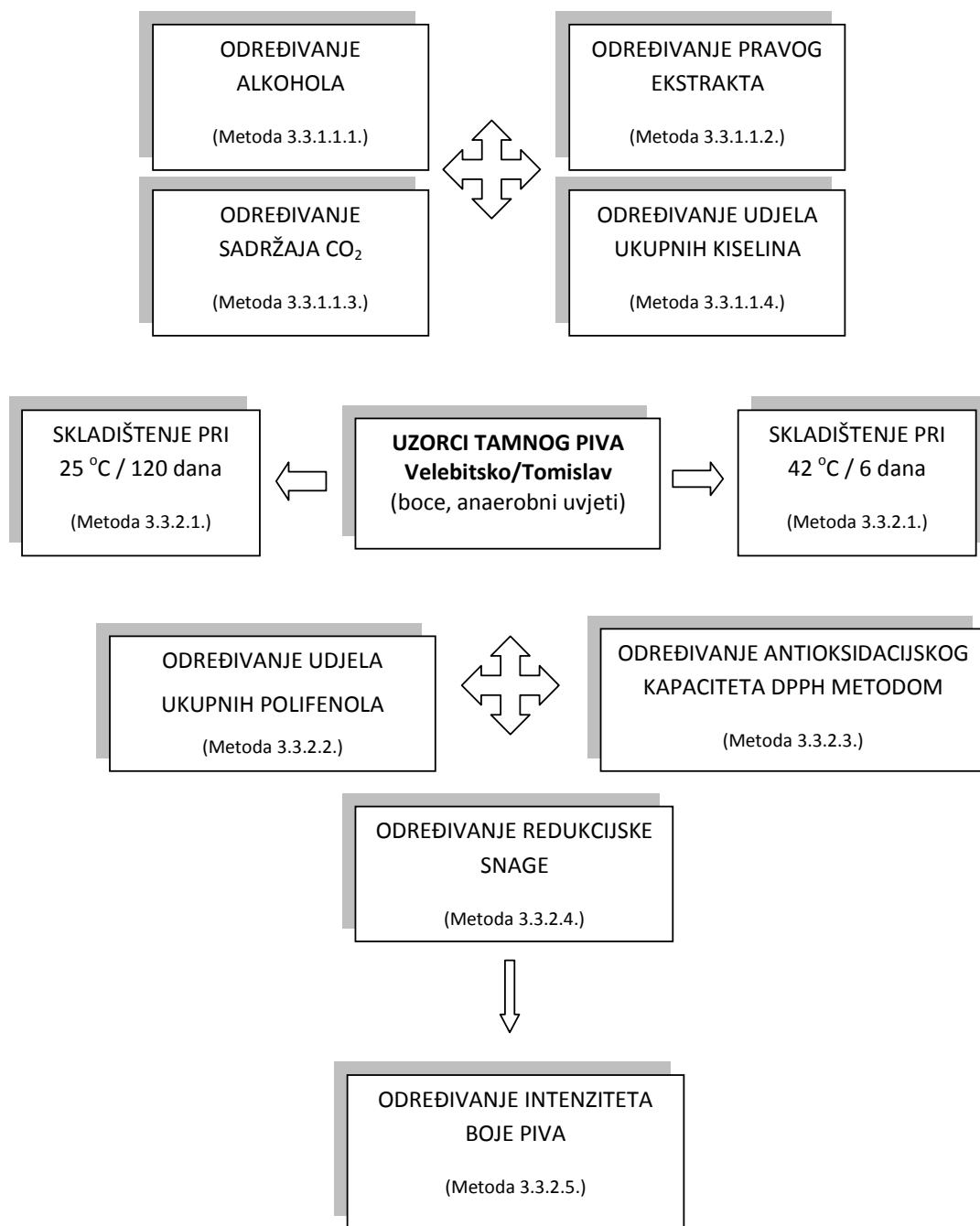
- (a) metode za mjerenje jednog spoja ili grupe istovrsnih spojeva
- (b) metode za detekciju vremena potrebnog za stvaranje slobodnih radikala
- (c) simulacije dodavanjem egzogenih slobodnih radikala u pivo
- (d) ostale metode vezane uz razne vrste osnovnih svojstava
- (e) senzorsku analiza i senzore (elektronski nos (EN) i elektronski jezik)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

U ovom su radu istraživana kemijska i antioksidacijska svojstva tamnog piva tijekom produženog i ubrzanog skladištenja

Istraživanja su obuhvatila određivanja (Slika 6):

- kemijskog sastava piva: udjela alkohola (vol. %), pravog ekstrakta (g/l), udjela ukupnih kiselina (g/l) i sadržaja CO<sub>2</sub> (g/l)
- stabilnosti i intenziteta boje piva tijekom skladištenja
- udjela ukupnih polifenola u pivu
- antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom
- redukcijske snage istraživanog piva



**Slika 6.** Shematski prikaz istraživanja na uzorcima tamnog piva.

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Uzorci piva**

Svi su istraživani uzorci piva nabavljani iz trgovina u Zagrebu i čuvani i na sobnoj temperaturi i na 4 °C u hladnjaku do provođenja pokusa.

Uzorci tamnog piva:

- tamno – Tomislav (kraljevsko tamno pivo), Zagrebačka pivovara, Zagreb
- 

#### **3.1.2. Reagensi za određivanje ukupnih polifenola**

1. otapalo: destilirana voda, H<sub>2</sub>O
2. Folin-Ciocalteu reagens (Fluka)
3. 7,5 %-tna otopina natrijeva karbonata, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika)
4. galna kiselina (Sigma)
5. (+)-katehin (Sigma)

#### **3.1.3. Reagensi za određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala**

1. otapalo: metanol (Fluka)
2. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma)
3. Trolox (Sigma)

#### **3.1.4. Reagensi za određivanje reducirajuće snage**

1. 0,2 M fosfatni pufer
2. kalijev fericijanid (1 %)
3. trikloroocetna kiselina (10 %)
4. otopina FeCl<sub>3</sub> (0,1 %)
5. askorbinska kiselina

## 3.2. Aparati

### - pH-metar

Pri radu je korišten pH-metar "Methrom", model 744, Švicarska.

### - Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

### - Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica" model EV-102, Železniki, Slovenija.

### - Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije pri 420 i 520 nm korišten je spektrofotometar Unicam Helios E, USA.

Za mjerenje kinetike vezanja DPPH\* radikala u bijelom, ružičastom i crnom vinu korišten je spektrofotometar Cary 3, Varian, Australia.

### - Termostat

Uzorci piva za test „ubrzanog“ starenja termostatorirani su tijekom 6 dana pri 42 °C, u termostatu Sutjeska, BiH.

### 3.3. Metode istraživanja

#### 3.3.1. Određivanje kakvoće piva

##### **3.3.1.1. Kemijska određivanja kakvoće piva (Analytica-EBC, 1998)**

###### 3.3.1.1.1. Određivanje alkohola (Metoda 9.2.1.)

U tikvicu za destilaciju od 500 ml odvagano je točno 100 g piva bez CO<sub>2</sub>, s točnošću od 0,01 g. Tikvica je priključena na Liebig-ovo hladilo produženo na donjem kraju izvučenom cijevi koja se uvodi u piknometar od 50 ml. Tijekom destilacije (30 – 40 minuta), destilat je povremeno promiješan zbog kontrakcije volumena. Destilacija je prekinuta kada je piknometar bio pun skoro do oznake. Nakon toga je piknometar ostavljen 30 minuta u vodenoj kupelji pri 20 °C i dopunjen do oznake destiliranom vodom iste temperature. Nakon vaganja termostatiranog piknometra, gustoća destilata je izračunata prema formuli:

$$d = \frac{a}{b}$$

d = gustoća destilata (d<sub>30/20</sub>)

a = masa destilata (g)

b = vodena vrijednost piknometra (g)

Koncentracija alkohola očitana je iz tablica po Windischu. Budući da je destilirano 100 g piva, postotak alkohola u pivu je:

$$A = \frac{a \cdot c}{100}$$

a = masa destilata (g)

c = koncentracija alkohola u destilatu (maseni %)

A = koncentracija alkohola u pivu (maseni %)



### 3.3.1.1.2. Određivanje pravog ekstrakta (Metoda 9.43.1.)

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 očitana iz tablice i izražen kao % mase.

$n = \text{pravi ekstrakt (\%)}$

### 3.3.1.1.3. Određivanje sadržaja CO<sub>2</sub> (Metoda 9.28.1.)

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).

Utrošak HCl za 10 ml piva =  $a = \text{ml HCl} \cdot f_{\text{HCl}}$

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:

$$b = \frac{\text{ml NaOH} \cdot f_{\text{NaOH}}}{5}$$

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

$$\text{CO}_2 = 0,44 \cdot [15 - (a - b)]$$

#### 3.3.1.1.4. Određivanje udjela ukupnih kiselina (Metoda 9.2.5.)

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 pivo je razrijeđeno istim volumenom vode, a tamno dvostrukim volumenom. Svijetlo titrirano se izravno uz dodatak 5-6 kapi fenolftaleina, dok je tamno titrirano bez indikatora, a kraj titracije je određuje 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.

### 3.3.2. Analitičke metode

#### 3.3.2.1. Testovi ubrzanog („forcing test“) i normalnog starenja piva

Za test ubrzanog starenja piva, boce piva su termostatirane pri 42 °C tijekom 6 dana, a svaki dan su izuzimani uzorci za određivanje udjela ukupnih polifenola i njihovog antioksidacijskog kapaciteta.

Za test normalnog starenja, piva su ostavljena na sobnoj temperaturi 4 mjeseca i tijekom tog perioda izuzeto je 12 uzoraka piva za provođenje istih testova kao i kod piva koja su podvrgnuta ubrzanom starenju.

Kontrolne uzorke su predstavljala piva čuvana pri + 4 °C u hladnjaku.

#### 3.3.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola

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

##### Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, pri čemu se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframova i molibdenova oksida. Nakon dva sata reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom,

spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm . Očitane vrijednosti apsorbancije razmjerne su intenzitetu nastale plave boje i koncentracijama antioksidansa. Kao standard je korištena galna kiselina.

#### Postupak:

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. Apsorbancija slijepa probe je oduzeta od apsorbancije uzorka i tako dobivena vrijednost je korištena za izračunavanje konačnog rezultata. 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.

#### **3.3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom**

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

#### Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora – AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene plave boje otopine u žutu, što je popraćeno opadanjem vrijednosti apsorbancije.

#### Postupak:

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. Rezultati su prikazani kao EC<sub>50</sub>, odnosno količina uzorka potrebna da se postigne 50 %-tno obezbojenje DPPH. Niže vrijednosti EC<sub>50</sub> ukazuje na veći antioksidacijski kapacitet.

.

Antioksidacijski kapacitet piva ( $A_{kv}$ ) je izračunat prema jednadžbi (Makris i sur., 2003):

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

pri čemu je

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

Postotak preostalog DPPH ( $\% DPPH_{pr}$ ) je izračunat prema jednadžbi:

$$\% DPPH_{pr} = [DPPH]_{t=60} / [DPPH]_{t=0}$$

#### **3.3.2.4. Određivanje reduksijske snage**

Reduksijska snaga određivana je metodom po Lugasiju (2003).

##### Postupak:

1 ml uzorka je pomiješan (vibracijska miješalica) s 2,5 ml fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 1 %-tnim kalijevim fericijanidom, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (2,5 ml). Reakcijska smjesa je inkubirana na 50 °C tijekom 20 min i nakon toga joj 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 FeCl<sub>3</sub> i očitana je apsorbancija na 700 nm. Reduksijska snaga je izražena kao ekvivalent kvercetina/ml. Ovako izražen rezultat znači da 1 ml uzorka ima jednaku reducirajuću snagu kao određena količina katehina, izražena u μmol.

### 3.3.2.5. Određivanje intenziteta boje piva

Boja piva mjerena je standardnom referentnom metodom (SRM), kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbancija na 430 nm (deLange, 2008). Očitana apsorbancija je množena s faktorom 12,7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama (Tablica 2):



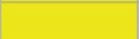
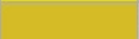
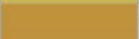





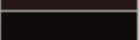

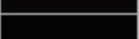
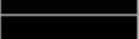
$$\text{SRM} = 12,7 \cdot D \cdot A_{430},$$

gdje je D faktor razrijeđenja.

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

$$\text{EBC} = \text{SRM} \cdot 1,97$$

**Tablica 2.** 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**

#### 4.1. Kemijska analiza piva

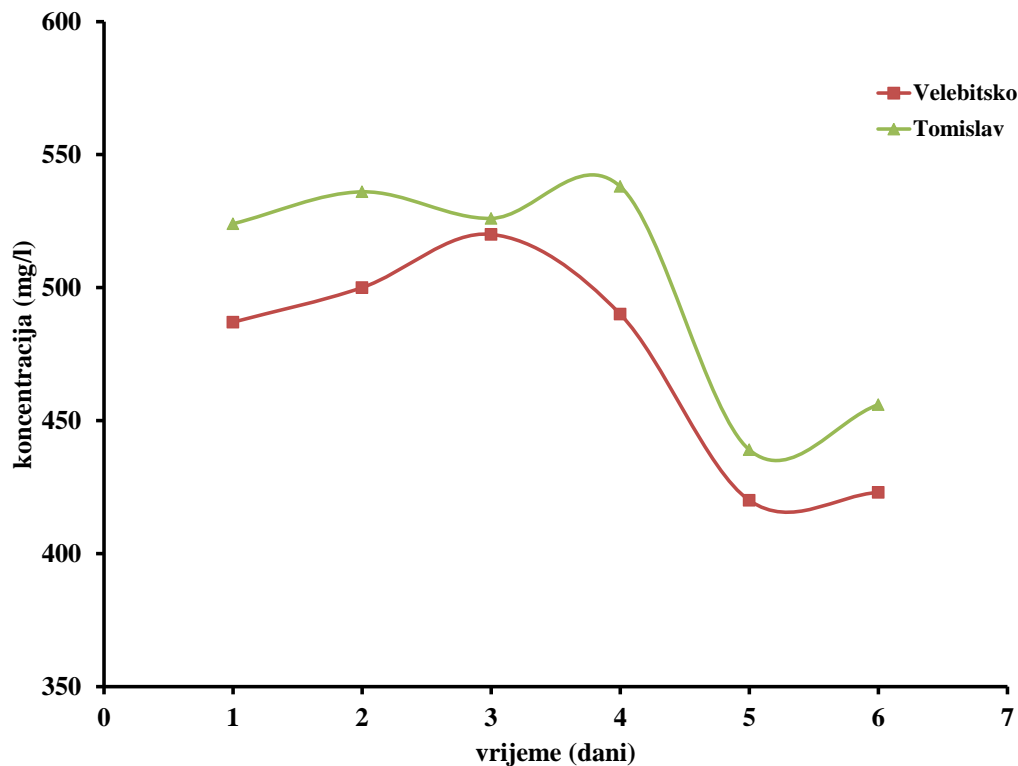
U radu su istraživana kemijska i antioksidacijska svojstva dva tamna piva: Velebitskog (Gospić) i Tomislava (Zagrebačka pivovara, Zagreb). Istraživana tamna piva predstavljaju lager piva, odnosno piva donjeg vrenja. Kemijski sastav uzoraka piva koji su uporabljeni za istraživanja prikazan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Kemijski sastav istraživanih uzoraka tamnog piva

Analiza	Velebitsko	Tomislav
Gustoća (g/mL)	0.9893	0.9874
Alkohol (vol. %)	6.12	7.33
Ekstrakt (g/L)	13.8	14.6
Ukupne kiseline (g/L)	3.06	3.84
Suha tvar (g/100 mL)	6.362	6.781
CO <sub>2</sub> (g/L)	4.136	4.532
pH	4.18	4.62
Boja (EBC jedinica)	63.05	69.02

## 4.2. Antioksidacijska svojstva tamnih piva

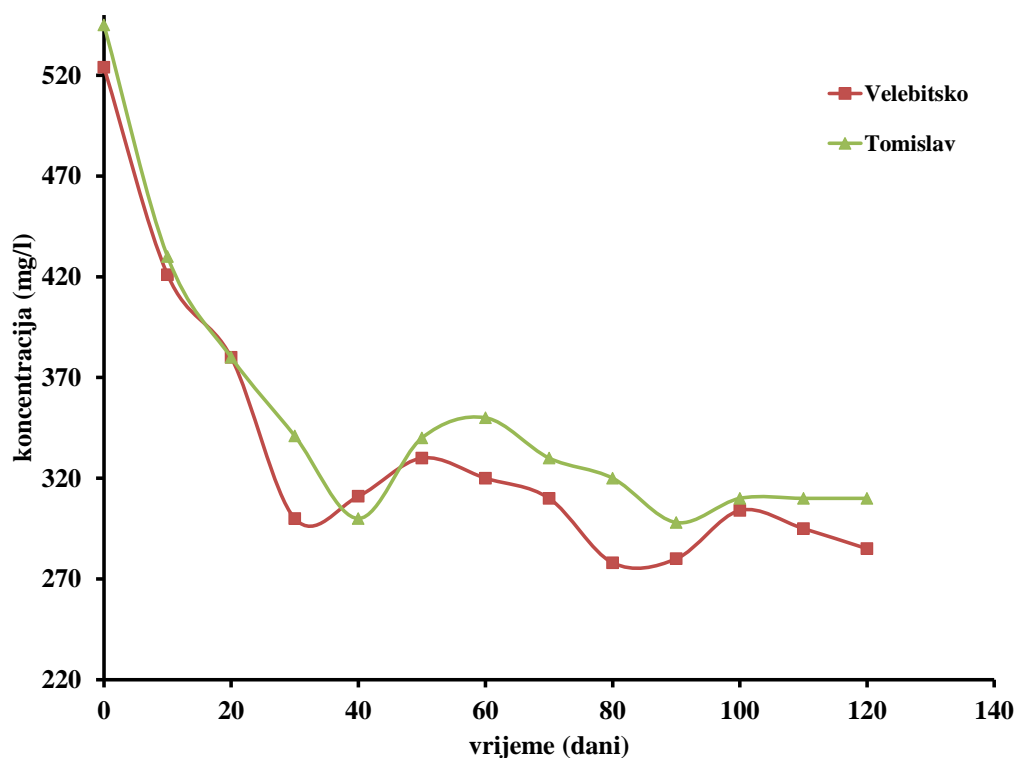
Polifenolni sastojci su važni antioksidansi, koji mogu na sebe vezati slobodne radikale. Tijekom skladištenja piva, fenolni spojevi reagiraju s proteinima i tvore visokomolekulske spojeve koji izazivaju zamućenje proizvoda. Iako rezultati koji se provode u „ekstremnim“ uvjetima ne mogu u potpunosti prikladno prikazati reakcije koje se odvijaju u „normalnim“ uvjetima skladištenja, test ubrzanog starenja (*eng.* forcing aging) pri 42 °C tijekom 6 dana je uobičajena metoda procjene koloidne stabilnosti piva i omogućava istraživanje starenja piva pri višim temperaturama u kratkom vremenskom periodu. U ovom su radu provedeni testovi ubrzanog starenja piva s ciljem otkrivanja mogućeg zamućenja, tijekom kojih su mjerene promjene udjela polifenola u dva tamna piva (Slika 7).



**Slika 7.** Promjena udjela ukupnih polifenola tijekom testiranja ubrzanog starenja tamnih piva



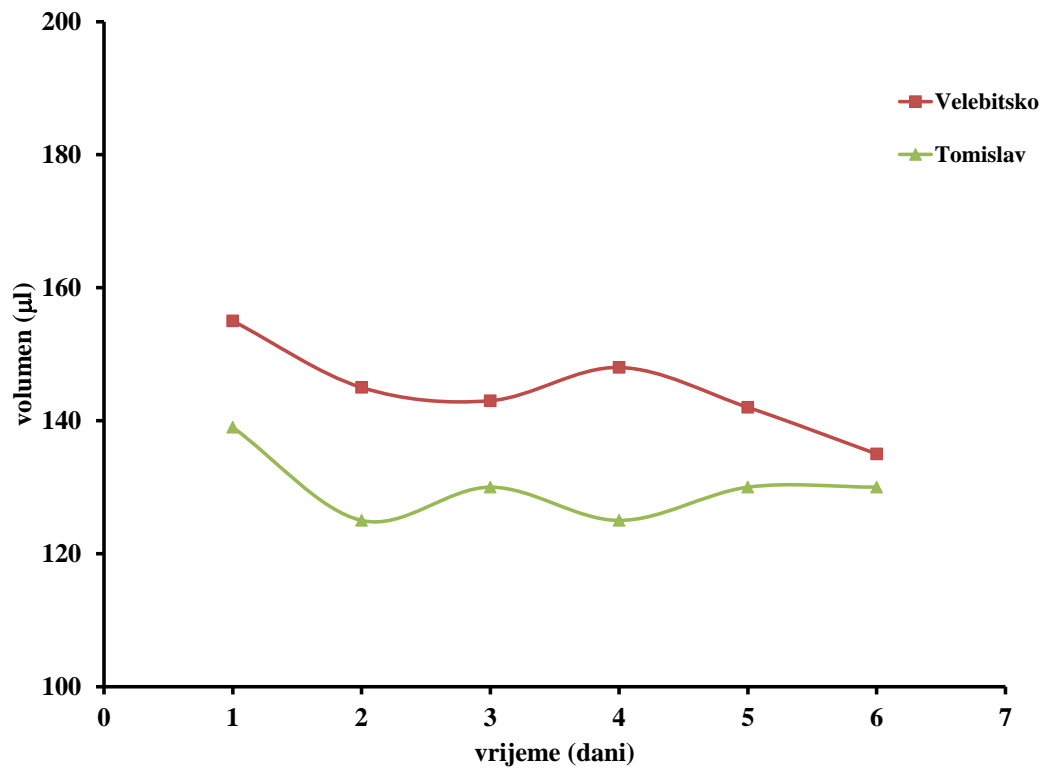
Promjena udjela ukupnih polifenola u uzorcima tamnih piva praćena je skladištenjem uzoraka na sobnoj temperaturi tijekom 4 mjeseca (Slika 8). Vidljivo je da je najveće smanjenje udjela fenolnih spojeva izmjereno u prvih 20 dana skladištenja, nakon čega su se vrijednosti, uz male oscilacije između 40-tog i 90-tog dana, uz manje oscilacije, ustalile.



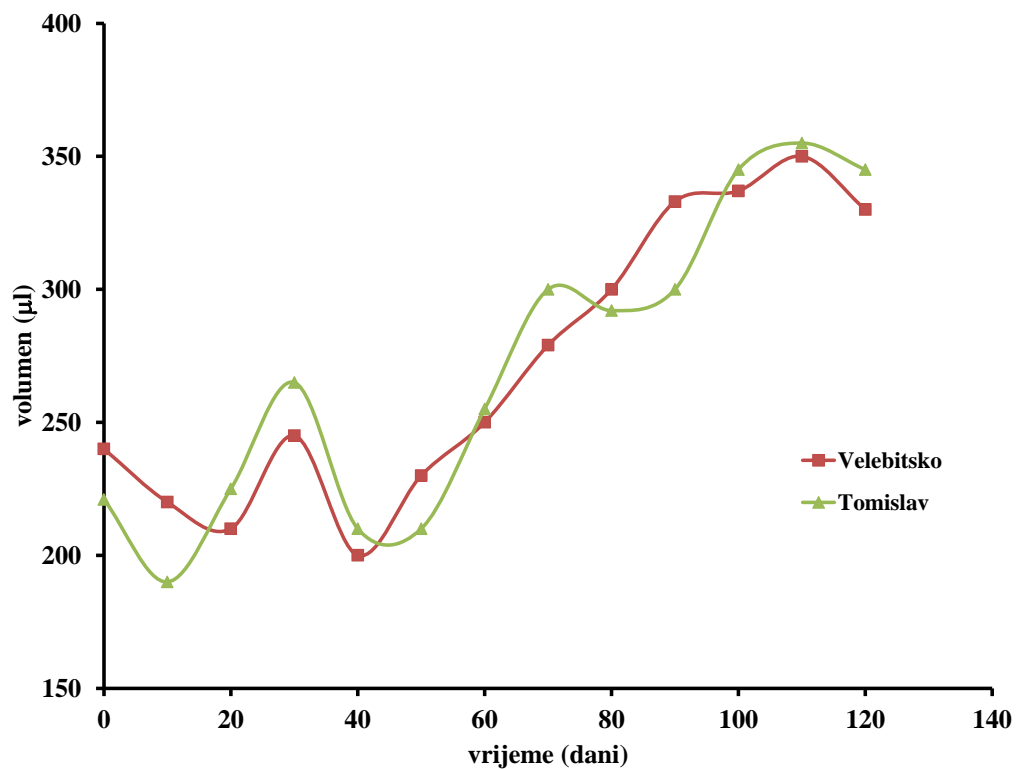
**Slika 8.** Promjena udjela ukupnih polifenola tijekom testiranja prirodnog starenja tamnih piva

Sposobnost vezanja slobodnih radikala mjerena je redukcijom slobodnog radikala DPPH. Rezultati su prikazani kao  $EC_{50}$ , odnosno volumen uzorka ( $\mu\text{l}$ ) potreban da se postigne 50 %-tno obezbojenje DPPH. Na Slici 9 je vidljivo je da veći antioksidacijski kapacitet imalo Tomislav pivo.

Rezultati dobiveni mjerenjima provedenim tijekom 4 mjeseca skladištenja mijenjali su se od uzorka do uzorka, pri čemu su i jedno i drugo tamno pivo pokazali oscilacije u izmjerenim vrijednostima (Slika 10). U svim je istraživanim pivima  $EC_{50}$  vrijednost rasla s vremenom skladištenja, što ukazuje na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta.



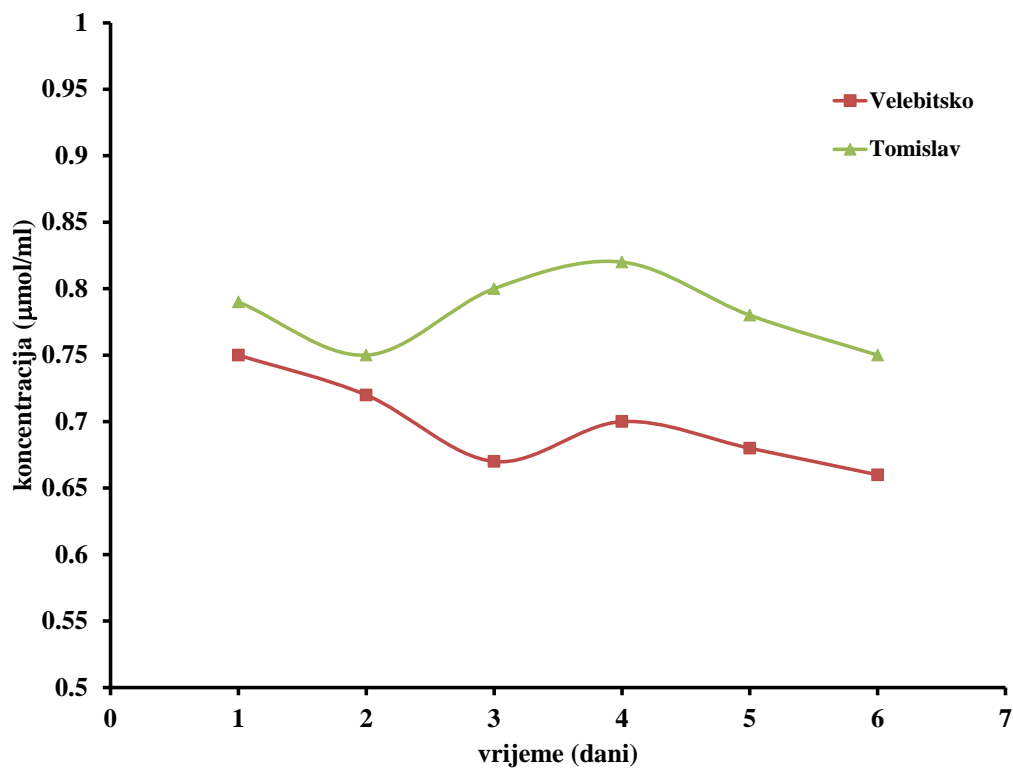
Slika 9. EC<sub>50</sub> vrijednosti tijekom testiranja ubrzanog starenja tamnih piva



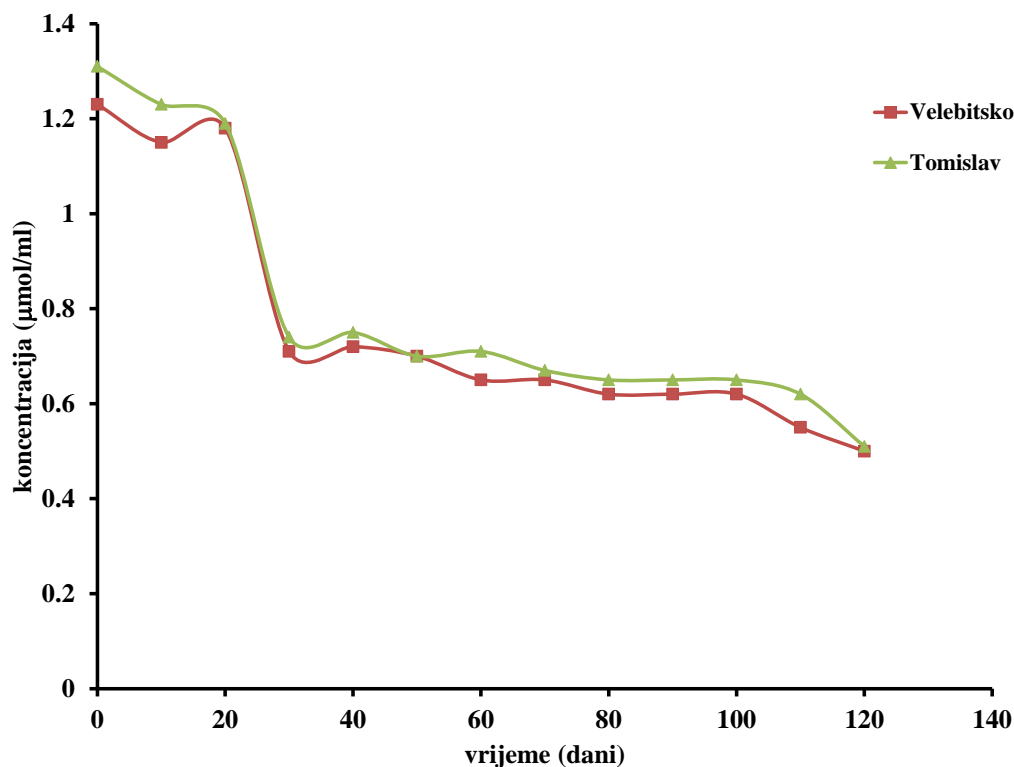
Slika 10. EC<sub>50</sub> vrijednosti tijekom testiranja prirodnog starenja tamnih piva

Reducirajuća snaga smatra se sekundarnom ili preventivnom antioksidacijskom aktivnošću (Lugasi, 2003). Kao i u mjerenjima udjela ukupnih polifenola (Slika 7) i sposobnosti vezanja slobodnih radikala (Slika 9), tijekom testa ubrzanog starenja dva tipa tamnog piva, dobivene vrijednosti se nisu značajnije mijenjale (Slika 11).

Za razliku od testa ubrzanog starenja, piva koja su prirodno starila izgubila su 50 % svoje reducirajuće snage već nakon 30 dana skladištenja. Nakon tog perioda, vrijednosti su se ustalile i održale jednakima sve do pred kraj skladištenja, kada su opet pokazale tendenciju pada kod obje vrste tamnog piva (Slika 12).



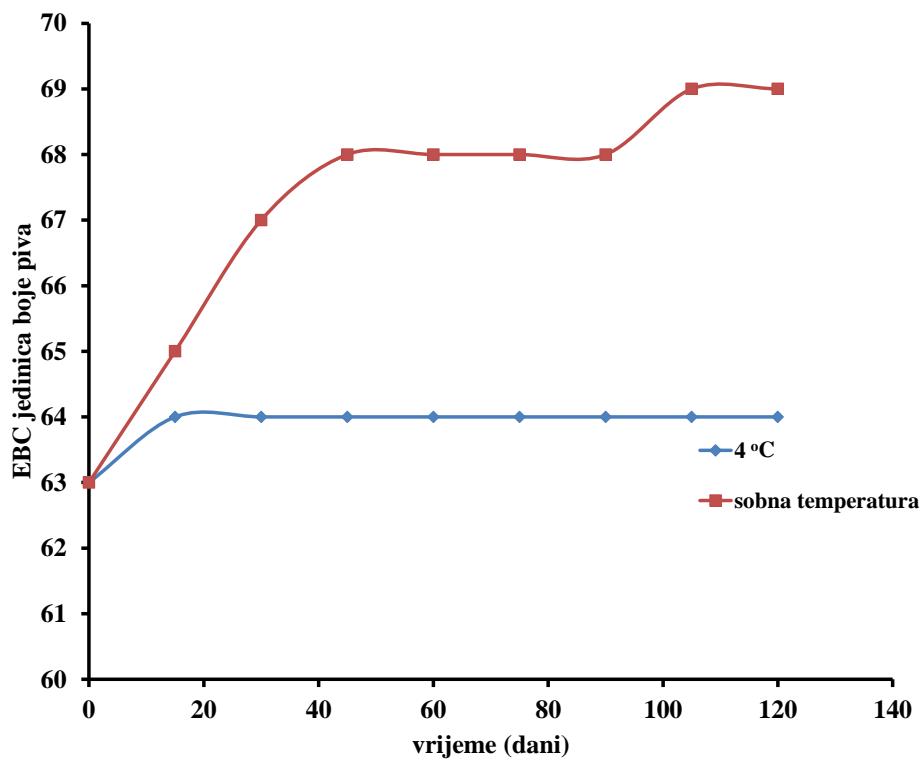
**Slika 11.** Reducirajuća snaga tijekom testiranja ubrzanog starenja tamnih piva



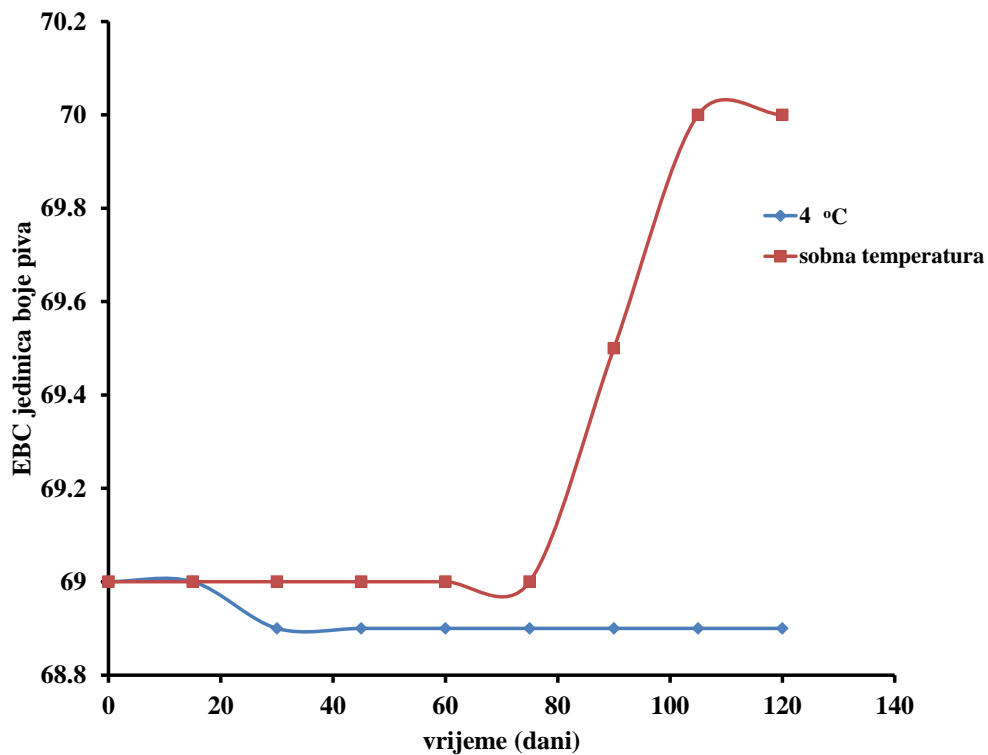
**Slika 12.** Reducirajuća snaga tijekom testiranja prirodnog starenja tamnih piva

U literaturi postoji vrlo malo podataka koji se odnose na promjenu boje tijekom skladištenja piva. Rezultati dobiveni u ovim istraživanjima pokazali su da se kod Velebitskog piva boja gotovo linearno mijenjala s vremenom skladištenja na sobnoj temperaturi, te je na kraju iznosila 6 EBC jedinica više od početne vrijednosti. Skladištenom pri +4 °C u hladnjaku tijekom prvih 20 dana se intenzitet boje povećao za 1 EBC jedinicu i ta se vrijednost nije mijenjala do kraja istraživanja (Slika 13).

Tomislav pivo je pokazalo znatnu promjenu boje tijekom prirodnog starenja na sobnoj temperaturi (Slika 14). Na slici je vidljivo da se boja od 80-tog do 100-tog dana linearno promijenila za samo 1 EBC jedinicu, a do tada je zadržala početnu vrijednost. Pivu, skladištenom pri +4 °C, nakon 20 dana je vrijednost intenziteta boje pao za samo 0.1 EBC jedinicu, nakon čega se vrijednost više nije mijenjala.



**Slika 13.** Promjena boje Velebitskog piva tijekom 120 dana skladištenja pri +4 °C i na sobnoj temperaturi



**Slika 14.** Promjena boje Tomislav piva tijekom 120 dana skladištenja pri +4 °C i na sobnoj temperaturi

## **5. RASPRAVA**

Održavanje kakvoće piva tijekom različitih faza odležavanja, distribucije i trajanja gotovog proizvoda predstavlja za svakog proizvođača piva izazov. Nekoliko parametara određuje općenitu kakvoću piva (udjel ječma i neslađenih žitarica, ekstrakt u osnovnoj sladovini, vol % alkohola, udjel CO<sub>2</sub>, prevrelost), no dva svojstva gotovog proizvoda izazivaju posebnu pažnju, a to su koloidna i okusna stabilnost (Aron i Shellhammer, 2010).

U ovom radu su istraživana antioksidacijska svojstva dva tamna hrvatska piva, Velebitskog i Tomislava. Oba piva su imala sličan kemijski sastav (Tablica 3), osim što je Tomislav pivo imalo veći volumni postotak alkohola i ekstrakta (7.33 %; 3.84 g/L) od Velebitskog (6.12 %; 3.06 g/L).

Polifenoli su u pivu zastupljeni u obliku fenolnih kiselina, jednostavnih flavonoida i tanina (Jerumanis, 1985). Prema McMurrugh i sur. (1996) približno 30 % ukupnih polifenola u pivu potječe od hmelja, a 70 % od ječmenog slada i to u obliku ferulinske kiseline, (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B3 i prodelfinidina (B3-9 i dva A tipa) (Slika 3). U području pivarstva, proantocijanidini su odgovorni za koloidnu nestabilnost tijekom skladištenja, a flavonoidi za nestabilnost boje piva tijekom skladištenja (McMurrugh i sur., 1992). Istraživanja koja su proveli Lermusieau i sur. (2001) na različitim sortama hmelja s obzirom na udjel ukupnih polifenola su pokazala da ovisno o sorti hmelja i načinu obrade, udjel polifenola može biti različit čak do 250 %. Prema tome, uporaba različitih sorti hmelja i ječma u proizvodnji piva može dovesti do razlike u krajnjoj koncentraciji polifenolnih sastojaka.

Antioksidacijska svojstva tamnih vrsta piva ispitivana su testom ubrzanog starenja (6 dana na 42 °C) i pri prirodnom starenju piva (120 dana na 25 °C). U ovom radu su u Velebitskom pivu prije i nakon testa ubrzanog starenja izmjerene vrijednosti ukupnih polifenola bile između 480 i 410 mg/L. Vrijednosti u Tomislav pivu bile su veće, od 525 na početku do 450 mg/L na kraju ubrzanog testa (Slika 7). Tijekom prirodnog starenja, udjel ukupnih polifenola i u Velebitskom i u Tomislav pivu smanjio se nakon 30-og dana skladištenja, te nakon toga ostao relativno stabilan sve do kraja testiranja (Slika 8). U tom „stabilnom“ periodu, udjel ukupnih polifenola u ispitivanim pivima kretao se od 320 do 300 mg/L. Uočeno je da se udjel ukupnih polifenola u prva tri tjedna skladištenja smanjio za oko 40 %, što može biti posljedica oksidacije polifenola na početku testiranja, jer se smatra da jednostavni polifenoli polimeriziraju do viših molekularne mase (tanina). Ove reakcije mogu ukazati na prisutnost acetaldehida, koji nastaje kao posljedica oksidacije etanola (Vanderhaegen i sur., 2006).

Ukupni udjel polifenola je kvantificiran metodom po Folin-Ciocalteu, pri čemu polimerizacija nije utjecala na njihovo određivanje. Ova činjenica objašnjava profil promjene ukupnih polifenola istražen u ovom radu, koji ostaje skoro konstantan nakon dva tjedna skladištenja. Iako je antioksidacijski kapacitet smanjen tijekom testiranja zbog polimerizacije fenolnih sastojaka, udjel ukupnih polifenola ostao je jednak.

Sposobnost vezanja slobodnih radikala, mjerena redukcijom slobodnog radikala DPPH nije se značajnije promijenila tijekom testiranja ubrzanog starenja uzoraka tamnih piva, te je kod Velebitskog piva pala za 15 %, a kod Tomislav piva za samo 4 % (Slika 9). No, tijekom prirodnog starenja piva,  $EC_{50}$  vrijednost je značajno linearno rasla tijekom posljednjih dana skladištenja u oba tipa piva (Slika 10), što je pokazalo da su za 50 %-tno smanjenje slobodnih radikala potrebni veći volumeni uzoraka. Isti fenomen su zapazili i Vanderhaegen i sur. (2006), koji su određivali udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet u pivima skladištenim 180 dana pri 20 i 40 °C.

Reducirajuća snaga smatra se sekundarnom ili preventivnom antioksidacijskom aktivnošću. Sekundarni ili preventivni antioksidansi mogu reducirati brzinu nastajanja lanca u peroksidaciji lipida ili reagirati s produktima peroksidacije što dovodi do nastajanja neradikalnih stabilnih produkata. Rezultati dobiveni testiranjem ubrzanog i prirodnog starenja piva prikazani su na Slikama 11 i 12. Uzorci podvrgnuti ubrzanom starenju nisu pokazali značajnije promjene tijekom 6 dana istraživanja, no Velebitsko pivo je pokazalo manju reducirajuću snagu od Tomislav piva (Slika 11). Za razliku od ubrzanog testa starenja, tijekom prirodnog starenja i kod jednog i kod drugog piva došlo je do smanjenja vrijednosti reducirajuće snage nakon 30 dana skladištenja i nove tendencije smanjenja vrijednosti nakon 100 dana (Slika 12).

Vrlo malo podataka u literaturi postoji o promjeni boje piva tijekom skladištenja. Prema McMurroughu i sur. (1996), postoji linearno povećanje intenziteta boje tijekom skladištenja piva pri 40 °C u odsustvu kisika, a kao uzrok toj promjeni navode se produkti Maillardove reakcije (Bravo i sur., 2002).

Izloženost piva dnevnom (vidljivom) svjetlu dovodi do promjene intenziteta boje piva. Ove su promjene izraženije kod svijetlih nego kod tamnih piva. Vrlo je važan čimbenik i ambalaža u koju je pivo pakirano. Smeđe staklene boce skoro u potpunosti štite pivo od sunčevih zraka (350-500 nm), dok prozirne ili zelene staklene boce omogućuju vrlo slabu ili nikakvu zaštitu (Bamforth, 2011).

U ovom istraživanju su i Velebitsko i Tomislav pivo bili punjeni u smeđe staklene boce, te skladišteni 4 mjeseca pri + 4 °C i na sobnoj temperaturi, kako bi se usporedile



promjene boje piva tijekom skladištenja u različitim temperaturnim uvjetima. Dobiveni rezultati su pokazali da je Velebitsko pivo skladištenjem na sobnoj temperaturi tijekom 120 dana promijenilo boju za čak 6 EBC jedinica, dok je pri +4 °C ta promjena bila samo za 1 EBC jedinicu (Slika 13). Tomislav pivo je vrlo malo promijenilo intenzitet boje; tek nakon 100-tog dana skladištenja je izmjerena 1 EBC jedinica više nego na početku pokusa. Skladištenjem na +4 °C, Tomislav pivo je zadržalo intenzitet boje kao i na početku istraživanja (Slika 14). Može se uočiti da su promjene intenziteta boje istraživanih piva skladištenih na sobnoj temperaturi bile izraženije, što se objašnjava izloženošću svjetlu, za razliku od piva iz hladnjaka.

## **6. ZAKLJUČCI**

**Prema rezultatima postignutim u ovom radu, može se zaključiti:**

- 1) Antioksidacijska svojstva tamnih piva (Velebitsko i Tomislav) ispitivana su testom ubrzanog starenja (6 dana pri 42 °C) i tijekom normalnog starenja piva (120 dana pri 25 °C).
- 2) Tijekom ubrzanog starenja piva nisu uočene značajnije promjene udjela ukupnih polifenola. Nakon 30 dana skladištenja uzoraka piva na sobnoj temperaturi uočeno je značajno smanjenje udjela ukupnih polifenola (58 %), nakon čega je vrijednost do kraja normalnog starenja ostala ujednačena.
- 3) Sposobnost vezanja slobodnih radikala u uzorcima tamnih piva nije se značajnije mijenjala tijekom ubrzanog testa starenja, dok se normalnim starenjem nakon 90 dana smanjila na 64 %, a na kraju skladištenja na 70 % što ukazuje na smanjenje antioksidacijskog kapaciteta.
- 4) Tijekom prirodnog starenja tamnog piva došlo je do smanjenja reducirajuće snage nakon 30 dana skladištenja za 43 %, a nakon 120 dana skladištenja za 59 %. U uzorcima podvrgnutim ubrzanom starenju nije uočeno značajnije smanjenje reducirajuće snage.
- 5) Velebitskom pivu se tijekom normalnog starenja na sobnoj temperaturi promijenio intenzitet boje za 6 EBC jedinica, a pri + 4 °C za samo 1 EBC jedinicu nakon 80 dana skladištenja. Tomislav pivu se tijekom normalnog starenja na sobnoj temperaturi promijenio intenzitet boje za 1 EBC jedinica, a pri + 4 °C za nije primijećena promjena boje.

## **7. LITERATURNI NAVODI**

Analytica-EBC; European Brewery Convention (1998) Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.

Andersen, M. L., Outtrup, H., Skibsted, L. H. (2000) Potential antioxidants in beer assessed by EPR spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3106-3111.

Aron, P. M., Shellhammer, T. H. (2010) A discussion of polyphenols in beer physical and flavor stability. *J. Inst. Brew.* **116**, 369-380.

Asano, K., Shinagawa, K., Hasimoto, N. (1982) Characterization of haze-forming proteins of beer and their role in chill haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **40**, 147-154.

Bamforth, C.W., Parsons, R. (1985). New procedures to improve the flavor stability of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**, 197 – 202.

Bamforth, C. W. (1999) Beer haze. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 81-90.

Bamforth, C.W. (2004). Beer Health and Nutrition. Blackwell Publishing, Oxford. str. 71–90.

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

Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., Williamson, M. P. (1997) Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline rich protein repeat result in complexation and interaction. *Biochemistry-US*, **36**, 5566-5577.

Bravo, A., Sanchez, B., Scherer, E., Herrera, J., Range-Aldao, R. (2002) Alpha-dicarbonyl compounds as indicators and precursors of flavor deterioration during beer aging. *Tech. Q.-Master Brew. Assoc. Am.* **39**, 13-23.

Callemien, D., Collin, S. (2007) Involvement of flavanoids in beer color instability during storage. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9066-9073.

Chapon, L. (1993) Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. *J. Inst. Brew.* **99**, 49-56.

Chevance, F., Guyot-Declerck, C., Dupont, J., Collin, S. (2002). Investigation of the beta-damascenone level in fresh and aged commercial beers. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3818 – 3821.

deLange, A. J. (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**, 143-150.

Dvorakova, M., Moreira, M. M., Dostalek, P., Skulikova, Z., Guido, L. F., Barros, A. A. (2008) Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A*, **1189**, 398-405.

Fantozzi, P., Montanari, L., Manzini, F., Gasbarrini, A., Addolorato, G. and Simmoncini, M. (1998). *Lebensm. Wiss. Technol. – Food Sci. Technol.* **31**, 221 – 227.

Foster, C., Schwieger, J., Narzib, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., Yanagi, K. (1999). Multivariate modelling of sensory and chemical data to understand staling in light beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **5/6**, 86 – 93.

Gardner, R. J., McGuinness, J. D. (1977) Complex phenols in brewing – a critical survey. *Tech. Q.-Master Brew. Assoc. Am.* **14**, 250-261.

Gijs, L., Perpete, Ph., Timmermans, A., Collin, S. (2000). 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6196 – 6199.

Gorinstein, S., Caspi, A., Zemeser, M., Trakhtenberg, S. (2000) Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. *Nutr. Res.* **20**, 131-139.

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M. J. (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1625-1634.

Guido, L. F., Fortunato, N. A., Rodrigues, J. A., Barros, A. A. (2003). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3911 – 3915.

Guido, L. F., Carneiro, J. R., Santos, J. R., Almeida, P. J., Rodrigues, J. A., Barros, A. A. (2004). *J. Chromagr.* **1032**, 17 – 22.

Jerumanis, J. (1985) Quantitative analysis of flavanoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Inst. Brew.* **91**, 250-252.

Kaneda, H., Takashio, M., Osawa, M., Kawahishi, S., Tamaki, T. (1996). Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 115 – 120.

Kaur, C., Kapoor, H. C. (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**, 153-161.

Leiper, K. A., Stewart, G. G., McKeown, I. P. (2003) Beer polypeptides and silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation. *J. Inst. Brew.* **109**, 73-79.

Lermusieau, G., Liegeois, C., Collin, S. (2001). Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chem.* **71**, 413-418.

Lugasi, A. (2003). Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Aliment.* **32**, 181-192.

McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J., Smyth, M. R. (1996) The role of flavanoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 141-148.

McMurrough, I., Kelly, R. J., Byrne, J., O'Brien, M. (1992) Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 67-76.

McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J. (1999) Haze formation and shelf life prediction for lager beer. *Food Technol.* **53**(1), 85-92.

McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J. (1997) Evaluation of rapid colloidal stabilization with polyvinylpyrrolidone (PVPP). *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 38-43.

Moll, M. (1987) Colloidal stability of beer. U: Brewing Science, Academic Press, London, str. 1-327.

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

Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzi, P. (1999). *Lebensm-Wiss.Technol.* **32**, 535 – 539.

Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. T., Franceschi, S., Lerici, C. R. (1997). *Cancer Lett.* **114**, 71 - 74 .

Onate-Jaen, A., Bellido-Milla, D., Hernandez-Artiga, M. P. (2006) Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food* **97**, 361-369.

Prior, R. L., Gu, L. W. (2005) Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in American diet. *Phytochemistry* **66**, 2264-2280.

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

Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P. (1996) Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1997-2005.

Siebert, K. J., Lynn, P. Y., (1997) Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55**, 73-78.

Šavel, J., Košin, P., Brož, A. (2010) Anaerobic and aerobic beer aging. *Czech J. Food Sci.* **28**, 18-26.



Uchida, M., Ono, M. (1996). Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 198 – 204.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2003). Bioflavoring and beer refermentations. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6782 – 6790.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Daenen, L., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2004). Furfuryl ethyl ether: Important aging flavor and new marker for storage conditions of beer. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1661 – 1668.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* **95**, 357-381.

Varmuza, K., Steiner, I., Glinsner, T., Klein, H. (2002). Chemometric evaluation of concentration profiles from compounds relevant for beer aging. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 235 – 239.