

Promjena sastojaka okusa i arome piva donjeg vrenja tijekom čuvanja u različitoj ambalaži

Car, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:086374>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 20. srpnja 2018. godine

Ana Car
854/BPI

Promjena sastojaka okusa i arome piva donjeg vrenja tijekom čuvanja u različitoj ambalaži

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Antonije Trontel, više asistentice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Promjena sastojaka okusa i arome piva donjeg vrenja tijekom čuvanja u različitoj ambalaži

Ana Car, 854/BPI

Sažetak: U ovom radu praćena je promjena koncentracije hlapivih sastojaka arome i okusa piva donjeg vrenja tijekom čuvanja od šest mjeseci. Tijekom čuvanja piva dolazi do promjene kemijskog sastava piva i tvorbe nepoželjnih sastojaka arome. Analiza je provedena u uzorcima piva pakiranim u četiri različite vrste ambalaže: povratna staklena boca, PET ambalaži (Amasorb, 2%, 33g, Poliprotect, 36g i Amasorb, 4%, 36g). Koncentracija hlapivih spojeva u uzorcima piva određivana je kromatografskom metodom HS-GC-FID i HS-GC-MS sustavom. Na osnovi rezultata ovog rada može se zaključiti da koncentracije hlapivih sastojaka arome i okusa piva odgovaraju standardima kvalitete pretpostavljene za pivo donjeg vrenja i nakon šest mjeseci skladištenja, neovisno o vrsti ambalaže.

Ključne riječi: pivo donjeg vrenja, skladištenje, hlapive komponente piva, kromatografija (HS-GC-FID i HS-GC-MS), različita ambalaža

Rad sadrži: 45 stranica, 15 slika, 5 tablica, 30 literaturnih referenci, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Tonči Rezić
2. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
4. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc

Datum obrane: 20. srpnja 2018. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Changes of flavour and aroma compounds of laer beer during storage in different packaging

Ana Car, 854/BPI

Abstract: In this study the concentration of volatile aroma and flavour compounds in lager beer was monitored during the six month storage period. A change in the chemical composition of the beer and the formation of undesirable aromas occurs during storage of the beer. The analysis was carried out for beer samples packed in four different types of packaging: returnable glass bottle 0,5 L, PET packaging (Amasorb, 2%, 33g, Poliprotect, 36g and Amasorb, 4%, 36g). Concentration of volatile compounds in beer samples was determined by chromatographic method, HS-GC-FID and HS-GC-MS system. Based on the results of this paper it can be concluded that the concentrations of volatile compounds of the flavor and the taste of beer correspond to the quality standards assumed for the lower beer and after six months of storage, irrespective of the type of packaging.

Keywords: lager beer, storage, volatile organic compounds, chromatography (HS-GC-FID and HS-GC-MS), different packaging

Thesis contains: 45 pages, 15 figures, 5 tables, 30 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: PhD Antonija Trontel

Reviewers:

1. PhD Tonči Rezić, Associate professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Blaženka Kos, Full professor
4. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor

Paper defended: July 20th 2018

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Proizvodnja piva donjeg vrenja.....	2
2.2 Kvasci u proizvodnji piva.....	3
2.3 Hlapive komponente piva.....	6
2.3.1 Esteri	7
2.3.2 Viši alkoholi	10
2.3.3 Vicinalni diketoni (VDK)	12
2.3.4 Karbonilni spojevi	13
2.3.5 Sumporni spojevi	14
2.4 Ambalaža	14
2.4.1 Staklena ambalaža	15
2.4.2 Plastična ambalaža	15
2.4.3 Aluminijske limenke i metalne i metalne bačve.....	16
2.4.4 „Aktivno“ i „inteligentno“ pakiranje	16
2.5 Metode identifikacije komponenti arome piva	18
2.5.1 „Headspace“ metode uzorkovanja	19
2.5.2 Plameno-ionizacijski detektor	19
2.5.3 Detektor apsorpcije elektrona	20
2.5.4 Sprengute metode	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1 Materijali	21
3.1.1 Uzorci piva donjeg vrenja.....	21
3.1.2 Korištene kemikalije	21
3.1.3 Aparatura	22
3.1.3.1. Sustav za plinsku kromatografiju sa „headspace“ tehnikom uzorkovanja	22
3.1.3.2. Informatički programi i obrada rezultata	22
3.2 Metode rada	23
3.2.1 Analitičke metode	23
3.2.1.1 Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg vrenja plinskom „headspace“ kromatografijom (HS-GC-FID i HS-GC-MS).....	23
3.2.1.2 Priprema standardnih otopina za izradu baždarnih dijagrama	24

4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) piva u povratnoj staklenoj boci.....	26
4.2 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Amasorb, 2%,33g)	30
4.3 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci odležavanja u PET ambalaži (Poliprotect, 36g)	33
4.4 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g).	36
5. ZAKLJUČAK:.....	39
6. LITERATURA	40
7. PRILOZI	43
7.1 BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HLAPIVIH KOMPONENATA PLINSKOM „HEAD SPACE“ KROMATOGRAFIJOM	43

1.UVOD

Pivo se proizvodi više od 5000 godina te predstavlja najstariju ljudsku biotehnološku aktivnost. Prvi pisani tragovi o pripremi pive pronađeni su u Babilonu 3000 p.n.e.. Prvo pivo nastalo je spontanom fermentacijom iz kruha, inokulacijom divljim sojevima kvasca iz okoliša (zapisi na glinenim pločicama potvrđuju da su Sumerani preko 40% svojih žitarica pretvarali prvo u kruh, a zatim iz njega proizvodili pivo). Ondašnja piva uvelike su se razlikovala od današnjih, bila su mutna i podložna kvarenju. Tek početkom 19.-og stoljeća započinje industrijska proizvodnja piva te se počinju primjenjivati komercijalni sojevi kvasca, što je uvelike posljedica općeg napretka znanosti i tehnologije (Marić, 2009).

U svijetu, ali i Hrvatskoj bilježi se trend sve veće pojave „craft“ pivovara koje svojim potrošačima nude široku paletu piva unikatne arome i okusa te potražnja za njima raste. Uz kvasac i početne sirovine na aromu piva mogu utjecati i način te vrijeme skladištenja (shelf life).

Kontakt piva s kisikom uzrokuje brzu promjenu arome piva odnosno degradaciju okusa, no i bez prisutnosti kisika u pivu dolazi do tvorbe nepoželjnih aroma. Tijekom skladištenja dolazi do degradacije „pozitivnih“-cvjetnih i voćnih aroma u pivu kao i tvorbe spojeva koji pivu daju ustajali okus: karbonilni spojevi, spojevi sa sumporom (Vanderhagen i sur., 2006).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih vrsta pakiranja na kvalitetu piva donjeg vrenja

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Proizvodnja piva donjeg vrenja

Pivo podliježe raznim vrstama podjela te ga tako možemo podijeliti prema: glavnoj sirovini korištenoj za samu proizvodnju, prema boji (svijetla, crvena, tamna i crna), prema prehrambenoj vrijednosti, volumnom udjelu alkohola te prema vrsti kvasca i načinu provođenja glavnog vrenja. Pivo se proizvodi alkoholnim vrenjem pivske sladovine pri čemu se najviše koristi ječmeni slad. U puno manjoj mjeri koriste se i tzv. specijalni sladovi, odnosno sladovi drugih žitarica, prvenstveno pšenice, a zatim i riže, tritikala, zob i prosa. Osim slađenih sirovina koriste se i neslađene sirovine npr. ječam, pšenica, raž ili kukuruz. Pri proizvodnji piva često se koriste mješavine različitih vrsta slada kako bi se dobile željene karakteristike piva (boja, miris i okus); (Marić, 2009). U procesu sušenja (prženja) slada upotrebljavaju se temperature do 85°C kako bi se dobio blago prženi slad namijenjen proizvodnji piva donjeg vrenja (Hughes i Baxter, 2001). Danas se za proizvodnju piva donjeg vrenja koristi tzv. „High gravity brewing“ (HGB) proces. Ovakav postupak zasniva se na dobivanju sladovine s povećanim udjelom ekstrakta iz koje zatim nastaje jako pivo, koje se na kraju razrjeđuje kako bi se došlo do optimalnih koncentracija sastojaka za konzumaciju. Pri proizvodnji visokokoncentriranih sladovina za HGB proces, često se koristi postupak dodavanja šećera tijekom kuhanja sladovine (šećer iz repe, trske, glukoza ili škrobni sirup); (Marić, 2009). Korištenjem HGB postupka može se postići povećanje kapaciteta pivovare od 20 do 30% bez dodatnih investicija (Pires i sur., 2014). Unatoč navedenim prednostima, veliki osmotski pritisak može inhibirati rast i aktivnost kvasca pa se gustoća u fermentoru ograničava na 16-18 °P (1°P = 1,004 SG-specifična gustoća); (Olaniran i sur., 2017). Također, preveliko povećanje gustoće sladovine u fermentoru dovodi do povećane proizvodnje acetatnih estera, što dovodi do neuravnotežene arome piva (Pires i sur., 2014). Temperatura glavnog vrenja za proizvodnju piva donjeg vrenja iznosi od 7 do 13°C. Danas se glavno vrenje piva provodi u cilindrično konusnim fermentorima nakon čega se fermentor hladi na 0°C kako bi se kvasac istaložio na dnu. Pri kraju kuhanja često se dodaje 20% porcije hmelja kao bi se dobila cvjetna i pikantna aroma piva donjeg vrenja (Hughes i Baxter, 2001).

2.2 Kvasci u proizvodnji piva

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi koji pripadaju carstvu gljiva. Svi organizmi koji pripadaju carstvu gljiva svrstani su u četiri razreda: *Phycomycetes* (*Zygomycetes*), *Ascomycetes* i *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*). Industrijski najzanimljiviji kvasci pripadaju razredu *Ascomycetes*, koji se dijeli u tri razreda: *Arciascomycetes*, *Euascomycetes* i *Hemiascomycete* te će u ovom poglavlju biti opisani neki od njih. Kvasci iz roda *Saccharomyces* (porodica *Saccharomycetaceae*; razred *Hemiascomycete*), komercijalno su najiskorištavaniji kvasci te se koriste u industriji alkoholnih pića (vino i pivo), pekarskoj industriji i služe kao izvor tvari okusa, enzima i faktora rasta u stočarstvu i ljudskoj prehrani. Rod *Saccharomyces* dijeli se na osam vrsta, no tri od njih povezane su s fermentacijskim procesima. To su *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *S. pastorianus* (*sin. S. carlsbergensis*); (Grba, 2010). U pivarskoj industriji uvriježena je podjela kvasaca na kvasce gornjeg vrenja (*S. cerevisiae*) koji se koriste u proizvodnji piva gornjeg vrenja i kvasce donjeg vrenja (*S. pastorianus*; *sin. S. carlsbergensis*) koji se koriste u proizvodnji piva donjeg vrenja. Glavna razlika u procesu proizvodnje ovih piva je temperatura glavnog vrenja te za piva donjeg vrenja ona iznosi 8-15°C, a ale piva 16–25°C (Pires i sur., 2014). Također, kvasci donjeg vrenja imaju izraženo svojstvo koagulacije i taloženja (Stewart i sur., 1975) te pri kraju glavnog vrenja padaju na dno fermentora za razliku od kvasaca gornjeg vrenja koji se skupljaju na površini prevrele komine. Hibridi kvasca donjeg vrenja nisu pronađeni u prirodi već su izolirani iz piva, a nastali su pod utjecajem ljudskog djelovanja, odnosno selekcijom određenih uvjeta pri provođenju glavnog vrenja (niska temperatura). *S. pastorianus* (*sin. S. carlsbergensis*) hibrid je *S. cerevisiae* i druge „ne-*Saccharomyces*“ vrste zbog koje kvasci donjeg vrenja imaju kriotolerantna svojstva. Prema novijim istraživanjima koja uključuju sekvencioniranje DNK, radi se o vrsti *Saccharomyces eubayanus*. Postoji više teorija o podrijetlu *Saccharomyces eubayanus*, ali najvjerojatnijom se čini ona o podrijetlu iz Istočne Azije točnije Tibetanske visoravni (pretpostavlja se da je u Europu stigao tzv. Putem svile), gdje je izolirano nekoliko sojeva *Saccharomyces eubayanus*. Udio podudarnosti genoma novo izoliranih sojeva sa „ne-*Saccharomyces*“ genomom kvasaca donjeg vrenja iznosi čak 99,82 % (Wendland, 2014). Unutar vrste *S. pastorianus* prisutna su dva varijeteta: Saaz (tzv. Grupa 1) i Froberg (tzv. grupa 2). Oba posjeduju karakteristike tipične za kvasce donjeg vrenja kao što su dobra flokulacija i odvijanje glavnog vrenja pri nižim temperaturama, no među njima također postoje značajne razlike kada je u pitanju fiziologija kvasca. Gibson i sur. (2013) napravili su studiju u kojoj su usporedili neke karakteristike sojeva kvasaca donjeg vrenja *S.*

pastorianus s roditeljskom vrstom *S. eubayanus* te im odredili pripadnost s obzirom na navedene grupe. Oba varijeteta imaju sličan kapacitet iskorištenja glukoze i maltoze, no razlikuju se u metabolizmu maltotrioze. Frohberg sojevi pokazuju visoko iskorištenje maltotrioze, dok je kod Saaz sojeva i *S. eubayanus* iskorištenje maltotrioze vrlo nisko. Sojevi kvasaca gornjeg vrenja uglavnom pokazuju malo iskorištenje maltotrioze, tako da je u pivarstvu uvriježeno mišljenje da su kvasci donjeg vrenja superijorniji u njezinom korištenju. Saaz sojevi i *S. bayanus* pokazali su bolju toleranciju na niže temperature od Frohberg sojeva, kao i sličnu koncentraciju estera u mladom pivu na kraju glavnog vrenja. Koncentracija viših alkohola viša je pri višoj temperaturi, varira između sojeva, bez jasne razlike u ovisnosti o grupi kojoj pripadaju (Gibson i sur., 2013), što je vidljivo iz Tablice 1.

Tablica 1: Komponente arome mladog piva nastale metabolizmom kvasca (Gibson i sur., 2013).

	Kvasci donjeg vrenja			<i>S. pastorianus</i> (Frohberg)		<i>S. eubayanus</i>		<i>S. pastorianus</i> (Saaz)			
Sastojak (mg L ⁻¹)	A56	A60	A03		A15		C902	A11		A12	
	22°C	22°C	10°C	22°C	10°C	22°C	10°C	10°C	22°C	10°C	22°C
Etanol	6.1	6.4	6.4	6.5	6.5	6.5	5.1	5.3	5.6	4.4	4.8
Acetaldehid	14.0	99.9	32.2	15.5	32.0	12.6	52.0	58.3	22.3	8.6	49.4
1-propanol	13.5	17.4	6.3	13.1	6.8	15.2	7.4	6.1	16.2	6.1	11.4
2-metil propanol	14.4	16.17	11.12	14.5	11.4	16.0	13.9	5.8	46.2	10.7	13.7
3-metilbutanol	24.0	13.6	15.9	22.6	19.6	29.4	18.7	12.2	30.7	10.4	16.2
2-metilbutanol	26.4	18.3	25.6	28.7	22.8	34.3	29.5	11.4	53.1	11.5	21.2
2-feniletil alkohol	7.8	2.6	1.0	1.4	1.0	1.2	1,2	1.1	1.6	1.6	2.0
Etil-acetat	25.2	20.8	17.6	26.6	22.8	24.0	23.4	9.5	16.2	4.3	13.2
3-metilbutil acetat	1.8	0.7	1.0	2.2	2.2	2.1	1.7	0.3	0.4	0.3	0.3
Etil kaproat	0.1	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2	0.5	0.5	0.1	0.2	0.4
Etil kaprilat	0.4	0.2	0.6	0.4	0.4	0.4	07	0.1	0.1	0.2	0.1
2-Feniletil acetat	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
Etil-dekanoat	3.4	0.8	1.0	0.6	0.9	0.8	0.9	0.4	0.5	0.4	0.8

2.3 Hlapive komponente piva

Velik utjecaj na krajnju aromu piva imaju početne sirovine, odnosno korištene žitarice i hmelj, čiji kemijski sastav ima bitnu ulogu za buduću biokemijsku aktivnost kvasca tijekom vrenja (Olaniran i sur., 2017). Uz odabrane sirovine i parametre vođenja procesa (temperatura, konc. O₂, pH sladovine, tlak itd.) za dobivanje kvalitetnog piva najvažniji je izbor kvasca (Marić, 2009). Danas se u pivarstvu najčešće koriste kvasci donjeg vrenja te piva donjeg vrenja čine preko 90% ukupno proizvedenog piva u svijetu (Olaniran i sur., 2017).

Uz dominantne produkte vrenja (EtOH i CO₂) te derivate koji potječu iz sirovina (hmelja i slada), na okus i aromu piva najviše utječu nusproizvodi alkoholnog vrenja (Marić, 2009), odnosno produkti sekundarnog metabolizma kvasca.

Unatoč velikom broju spojeva u pivu koji sačinjavaju hlapivu frakciju (preko 800), samo neki od njih uključeni su u proizvodnju okusne senzacije pri konzumaciji (Olaniran i sur., 2017).

Prema Olaniran i sur, (2017) hlapivu frakciju piva koja ima utjecaj na aromu i okus možemo podijeliti na:

- (i) estere
- (ii) više alkohole
- (iii) vicinalne diketone
- (iv) karbonilne spojeve
- (v) masne kiseline
- (vi) sumporne spojeve
- (vii) furanske spojeve
- (viii) monoterpenole
- (ix) hlapive fenole
- (x) C₁₃–norisoprenoide

Svi navedeni sastojci nalaze se u pivu u vrlo malim koncentracijama (Olaniran i sur., 2017). Međutim, njihova ravnoteža u gotovom proizvodu je nužna kako kvaliteta piva ne bi bila narušena. Najveći utjecaj na aromu i okus piva od navedenih komponenti imaju esteri, viši alkoholi i vicinalni diketoni (Pires i sur, 2014), pri čemu su potonji za razliku od estera i viših alkohola jedni od najnepoželjnijih sastojaka piva (Marić, 2009). Dugotrajnim

skladištenjem dolazi do promjena u kemijskom sastavu, što mijenja senzorne karakteristike piva (Vanderhagen i sur., 2006).

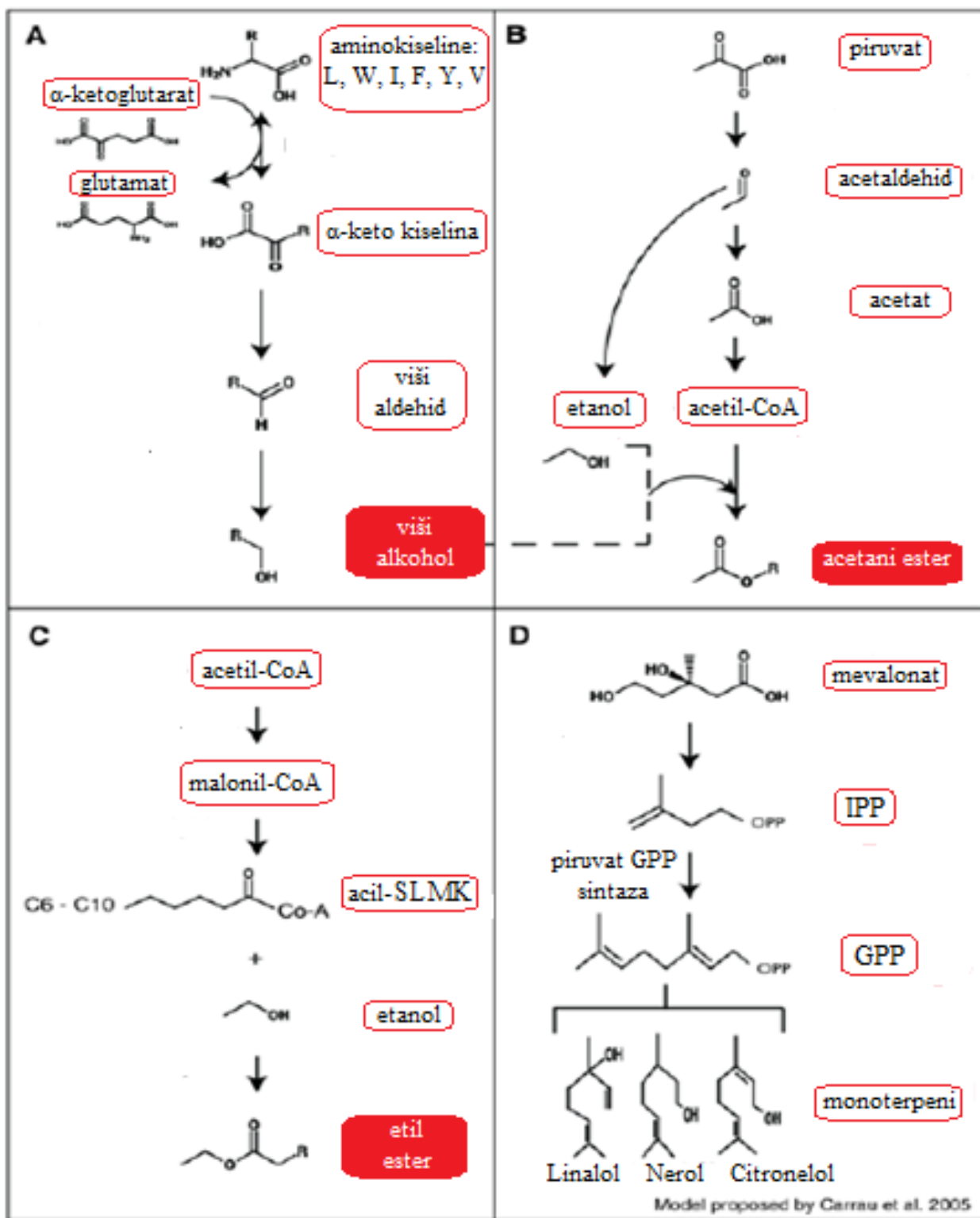
2.3.1 Esteri

Esteri su organske tvari u kojima organska grupa zamjenjuje jedan ili više atoma vodika u hidroksilnoj skupini. Kod estera hidroksilna skupina reagira s karboksilnom skupinom i nastaje esterska veza -COO- .

Esteri nastaju tijekom vrenja. Djeluju sinergistički, zbog čega su, ukoliko se pojedini nalaze ispod svog koncentracijskog praga, i dalje dominantni te se smatraju najvažnijim komponentama arome piva. Pivu daju karakterističnu cvjetno-voćnu aromu (Tablica 2); (Verstrepen i sur., 2003). Hlapivi esteri u pivu dijele se u dvije skupine: acetatni i etilni esteri. Acetatni esteri nastaju reakcijom acetata s etanolom ili nekim drugim alkoholom dobivenim u metabolizmu aminokiselina. Ova grupa estera uključuje izobutil-acetat, izoamil-acetat, feniletal-acetat, i etil-acetat koji čini 1/3 svih estera u pivu. Razlog tomu je visoka koncentracija etanola. Acetatni esteri su kratkolančani i time lipofilniji te lako difundiraju kroz plazmatsku membranu kvasca. Drugu skupinu čine etilni esteri, pri čemu etanol čini alkoholnu komponentu, a kao kiselinska komponenta vežu se srednje lančane masne kiseline. U grupi etil estera najznačajniji su etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat. Difuzivnost ovih estera smanjuje se povećanjem duljine kiselinske komponente estera (Saerens i sur., 2010, Olaniran i sur., 2017). Na Slici 1 (b,c) shematski su prikazani metabolički putevi sinteze acetatnih i etilnih estera. Na efikasnost sinteze estera utječu mnogi faktori tijekom industrijske proizvodnje piva. Neki od njih su koncentracija kisika i dušika koji nepovoljno djeluju na sintezu estera, koncentracija CO_2 , tlak i temperatura (Pires, 2014). Povišenjem temperature dolazi do povećanja brzine reakcije. To se uglavnom odnosi i na brzinu sinteze estera, a ona uvelike ovisi o vrsti i soju kvasca. Također, različiti esteri pokazuju i različite temperaturne ovisnosti kada je u pitanju njihov udio u pivu (Olaniran i sur., 2011).

Tablica 2: Prikaz koncentracija, okusnih pragova i impresije arome određenih estera u pivu

<u>Ester</u>	<u>Okusni prag</u> (mg L ⁻¹)	<u>Koncentracija</u> (mg L ⁻¹)	<u>Impresija</u> <u>arome</u>	<u>Referenca</u>
Etil-acetat	25-30	8-32	voće, otapalo	Pires i sur., 2014
Izoamil-acetat	1.2-2	0.3-3.8	banana	Pires i sur., 2014
Feniletal-acetat	0.2-3-8	0.1-0.73	ruže, med	Pires i sur., 2014
Etil-heksanoat	0.2-0.23	0.05-0.21	jabuka, voće	Pires i sur., 2014
Etil-oktanoat	0.9-1.0	0.04-0.53	jabuka, anis	Pires i sur., 2014
Etil-dekanoat	1.5	0.190	cvijeće, sapun	Briggs i sur., 2004 Saerens i sur., 2010



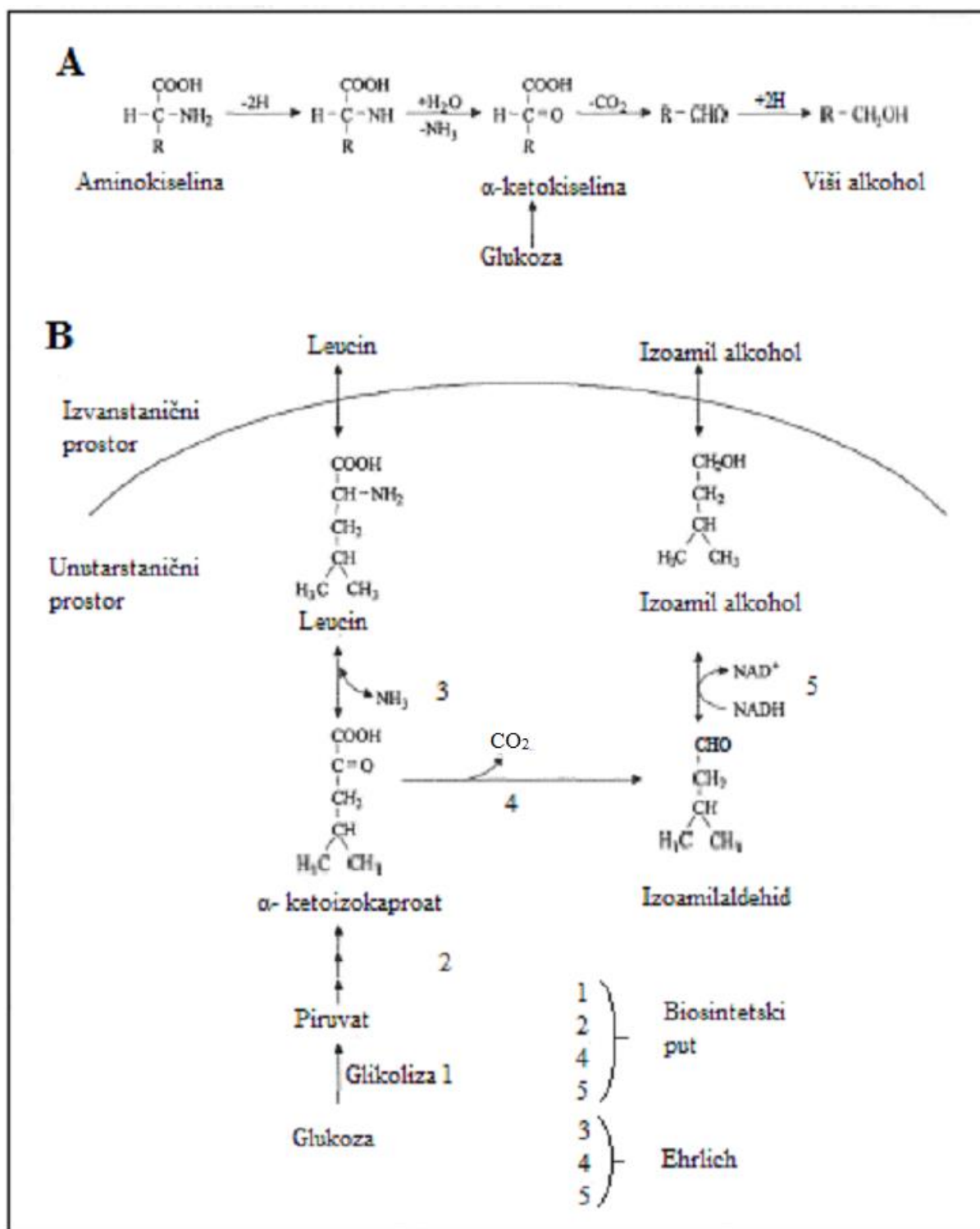
Slika 1: Metabolički putevi tvorbe aromatskih komponenti tijekom vrenja sladovine sa *S. cerevisiae* (Hirst i Richter., 2016).

2.3.2 Viši alkoholi

Viši alkoholi ili patočna ulja nastaju tijekom glavnog vrenja (80%); (Marić, 2009), a udjelom su najveća skupina sastojaka arome alkoholnih pića. Viši alkoholi u alkoholnim pićima uključuju: propanol, izobutanol, amil alkohol, izoamil alkohol, aktivni amil alkohol, 2-feniletanol i tirozol, (Hirst i Richter, 2016) pri čemu udio izoamil alkohola iznosi od 40-70% ukupne frakcije viših alkohola, ovisno o kojem se alkoholnom piću radi (Lambrechts i Pretorius, 2000). Njihova sinteza usko je povezana s metabolizmom aminokiselina. Mogu nastati putem katabolizma aminokiselina, odnosno tzv. Ehrlichovim putem ili pri njihovoj sintezi, iz ugljikohidrata (glukoze) kako je shematski prikazano na Slici 2 (Olaniran i sur., 2017). Aminokiseline koje sudjeluju u Ehrlichovom putu su leucin, valin izoleucin, fenilalanin, tirozin i triptofan (Hirst i Richter, 2016). Prva reakcija Ehrlichovog puta je transaminacija aminokiseline pri čemu nastaju alfa-ketokiseline koristeći glutamat/alfa-ketoglutarat kao donor/akceptor. Nakon transaminacije slijedi nepovratna reakcija dekarboksilacije alfa ketokiseline u aldehid koji se zatim reducira u odgovarajući viši alkohol (Pires i sur., 2014). U Tablici 2 prikazane su koncentracije i okusni pragovi nekih viših alkohola u pivu.

Tablica 3: Prikaz koncentracija, okusnih pragova i impresije arome nekih viših alkohola u pivu

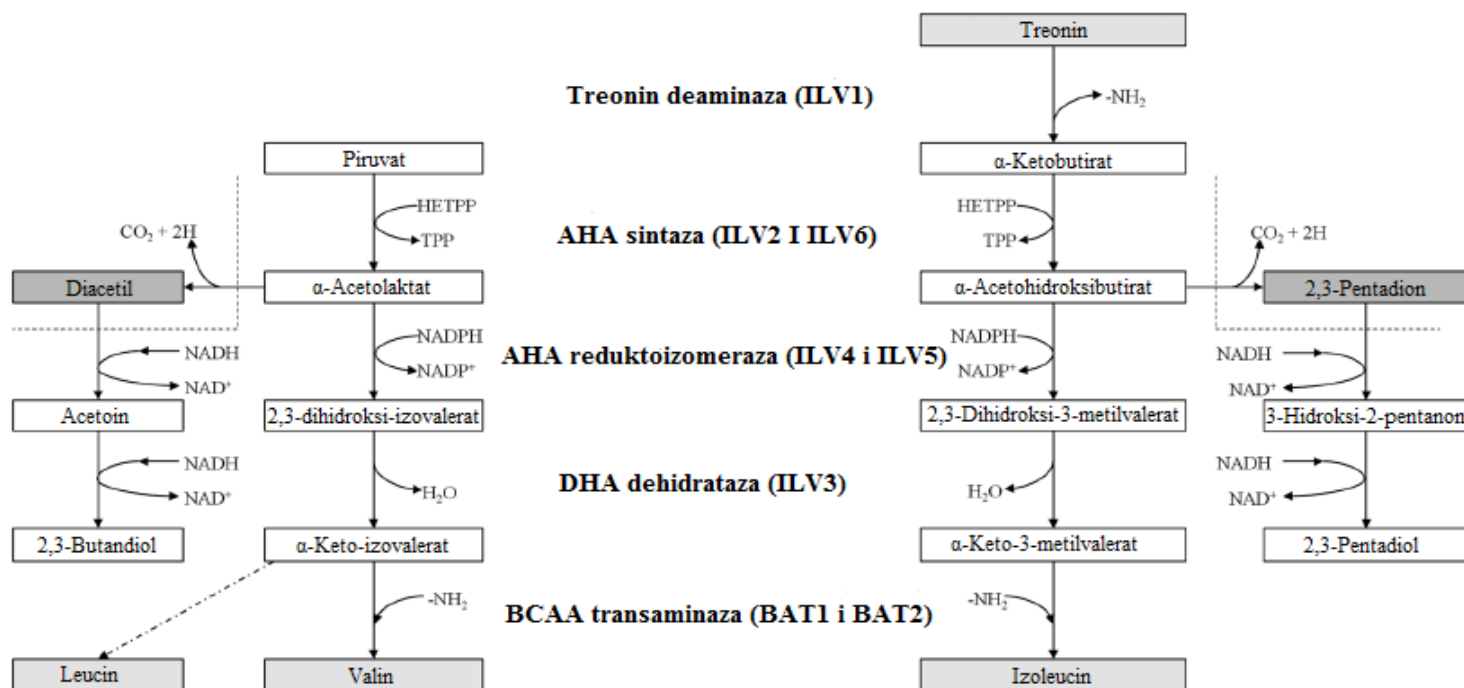
<u>Viši alkohol</u>	<u>Okusni prag (mg L⁻¹)</u>	<u>Koncentracija (mg L⁻¹)</u>	<u>Impresija arome</u>	<u>Referenca</u>
n-Propanol	600	4-17	alkohol, slatka aroma	Pires i sur., 2014
Izobutanol	100	4-57	otapalo	Pires i sur., 2014
Amil alkohol	50-70	7-34	alkohol, otapalo	Pires i sur., 2014
Izoamil alkohol	50-65	5-137	alkohol, banana	Pires i sur., 2014
Aktivni amil alkohol	65	8-30	alkohol, banana, otapalo	Hughes i Baxter, 2001
Tirozol	200	3-40	gorka, kemikalije	Hughes i Baxter, 2001
2-feniletanol	40	5-102	ruže	Pires i sur., 2014



Slika 2: (A) Generalni put tvorbe viših alkohola (patočnih ulja) iz aminokiselina i prekursora, α -ketokiselina. **(B)** Tvorba izoamil alkohola anaboličkim i kataboličkim putevima (Lambrechts i Pretorius, 2000).

3.3 Vicinalni diketoni (VDK)

Glavne komponente koje pridonose lošoj aromi piva su diacetil (2,3-butandion) i acetoin (2,3-pentandion) te se zajedno određuju kao vicinalni diketoni (Marić, 2009). Diacetil i acetoin nastaju kao nusprodukti anabolizma aminokiselina valina i izoleucina, odnosno kao rezultat spontane ne-enzimske oksidativne dekarboksilacije α -acetohidroksi kiselina (mliječne kiseline i α -ketobutirata) koje su intermedijeri u sintezi navedenih aminokiselina (Krogerus i Gibson, 2013). Diacetil je tijekom glavnog vrenja prisutan u puno većoj koncentraciji od acetoina međutim oba imaju isti učinak na okus te pri koncentracijama iznad ljudskog okusnog praga, oko 20 mg L^{-1} , pivu daju slatkast i odbojan okus te miris po užeglom maslacu (Marić, 2009). Metabolizam vicinalnih diketona odvija se u stanici i izvan stanice kvasca tijekom glavnog vrenja, što je vidljivo na Slici 3 (Krogerus i Gibson, 2013). Prekursore za njihovu izgradnju, navedene α -hidroksi kiseline, kvasac tijekom razgradnje šećera izlučuje u okoliš (mlado pivo). Nastale kiseline se zatim oksidativnom dekarboksilacijom prevode u diketone, prvenstveno diacetil (Marić, 2009) ili u manjoj količini, neoksidativno, u acetoin (Krogerus i Gibson, 2013), što se odvija izvan stanice. Nastali vicinalni diketoni zatim ulaze u kvašćeve stanice te se reduciraju u diole i izlučuju izvan nje. Prag osjetljivosti nastalih diola puno je viši u odnosu na VDK; 4500 mg L^{-1} za butandiol pa ne utječu na krajnju aromu piva (Krogerus i Gibson, 2013). Pošto je sposobnost kvašćevih stanica za redukciju diacetila puno veća nego sposobnost proizvodnje α -hidroksi kiselina kao prekursora, tako je koncentracija vicinalnih diketona u zreлом pivu donjeg vrenja obično manja od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Marić, 2009).



Slika 3: Metabolički put sinteze i redukcije diacetila i acetoina te sinteze valina i izoleucina kod roda *Saccharomyces spp.* (Krogerus i Gibson, 2013).

2.3.4 Karbonilni spojevi

Osim tijekom vrenja (gdje nastaju kao produkt metabolizma viših alkohola te pri razgradnji glukoze do etanola), značajne količine aldehida nastaju i pri samoj pripremi komine putem oksidacije lipida i Maillardovih reakcija (Olaniran i sur., 2017).

Trans-2-nonenal najvažniji je aldehyd odgovoran za lošu aromu piva koja dolazi do izražaja tijekom skladištenja. Razlog tomu je vrlo nizak okusni prag koji iznosi oko 100 ng L⁻¹. (Hughes i Baxter, 2001). Pivu daje „okus kartona“ te je odgovoran za ustajalu aromu piva (Vanderhagen i sur., 2006). Prekursori trans-2-nenenala nastaju oksidacijom masnih kiselina prisutnih u sladu (uglavnom linolenske i linoleniske kiseline). Navedene masne kiseline oslobađaju se tijekom pripreme sladovine. Dva pretpostavljena mehanizma oksidacije masnih kiselina su autooksidacija i djelovanje lipogenaza. Trans-2-nonenal stvara adukte s proteinima i sulfitima iz kojih se zatim tijekom skladištenja otpušta zbog čega njegova koncentracija u pivu raste. Zbog opisanog mehanizma, nakupljanje određene količine

sulfita tijekom vrenja je poželjno kako bi se očuvala stabilnost arome piva (Briggs i sur., 2004). Uz trans-2-nonenal, vrlo važan aldehid koji pridonosi aromi piva je acetaldehid koji čini oko 90% aldehida prisutnih u alkoholnim pićima (Nykanen i Soumalainen, 1983). Acetaldehid je uzročnik loše arome piva jer mu daje podrumsku ili pljesnivu aromu, a njegova koncentracija doseže maksimum tijekom prva tri dana vrenja i iznosi od 20-40 g L⁻¹. Tijekom dozrijevanja ta koncentracija pada na 8–10 g L⁻¹ (Marić, 2009).

Hashimoto (1972) navodi kako hlapivi aldehidi u pivu tijekom skladištenja nastaju oksidacijom viših alkohola melanoidinima. Navodi kako molekularni kisik ne oksidira alkohole u odsutstvu melanoidina, ali ako je prisutan djeluje kao katalizator reakcije. Tijekom skladištenja nastaju i tzv. Štrekerovi aldehidi kao što su 2-metil propanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, benzaldehid, fenil-acetaldehid i metional koji utječu na aromu ustajalog piva (Vanderhagen i sur, 2006).

2.3.5 Sumporni spojevi

Sumporne spojeve u pivu čine H₂S, SO₂, merkaptani i dimetil sulfid (DMS) te svi imaju negativan utjecaj na krajnju aromu piva (Marić, 2009). Prekursor dimetil sulfida (S-metilmetionin) nastaje tijekom proizvodnje slada. S-metilmetionin je termolabilan te lako prelazi u DMS tijekom prženja slada (Hughes i Baxter, 2001). Zbog velike se hlapivosti dimetil sulfid nastao tijekom prženja i kuhanja gubi, dok onaj nastao tijekom procesa hlađenja zaostaje u pivu (Briggs i sur., 2004). Tipične koncentracije dimetil sulfida u pivu kreću se od 10-100 µg L⁻¹ dok njegov okusni prag iznosi 30 µg L⁻¹ pri čemu daje aromu po slatkom kukuruzu (Hughes i Baxter, 2001).

2.4 Ambalaža

Odabir ambalaže za pakiranje gotovog piva ima vrlo važnu ulogu u očuvanju zdravstvene ispravnosti, kvalitete proizvoda od trenutka proizvodnje do njegovog konzumiranja te u produljenju njegova trajanja. Postupak punjenja piva u ambalažu i ambalaža korištena tijekom skladištenja mogu utjecati na: okus, boju, pjenjenje, bistrinu i

nutritivnu vrijednost piva. Do degradacije navedenih čimbenika te posljedično skraćenog roka trajanja piva može doći zbog interakcije piva sa zrakom (O_2), apsorpcije komponenata piva u ambalažni materijal ili migracije komponenata ambalaže u pivo. Kao prvi način pakiranja piva koristili su se drveni ili keramički spremnici, namijenjeni tek kratkotrajnom skladištenju piva za vrijeme transporta i do trenutka konzumacije. Pivska ambalaža danas se može podijeliti na tri vrste: staklene boce, plastične boce, aluminijske limenke (Bamfort i Krochta, 2010) i metalne bačve.

2.4.1 Staklena ambalaža

Staklene boce se tradicionalno najviše koriste kao pivska ambalaža. Prednosti staklene ambalaže su: inertnost i rigidnost stakla, mogućnost toplinske sterilizacije te nepropusnost stakla za plinove, pare i male molekule što omogućava dugotrajno očuvanje arome i kvalitete piva. Također, staklo je transparentno što omogućava potrošaču direktan uvid u ono što konzumira. Varijacije u boji stakla omogućuju očuvanje fotoosjetljivih sastojaka piva. Među potrošačima vlada veća naklonost zelenim bocama nego onima jantarne boje, međutim, zelene boce su manje učinkovite pri zaštiti piva od valnih duljina vidljivog i UV-spektra koje kataliziraju oksidacijske reakcije u pivu. Najveće mane staklene ambalaže su lomljivost i težina. Porast tlaka u boci ili termalni šok mogu uzrokovati njeno prsnuće. Također, zbog njene lomljive prirode potrebno je pri transportu takve ambalaže osigurati povoljne uvjete što dodatno povećava troškove (Ramos i sur., 2015).

2.4.2 Plastična ambalaža

Uporaba plastičnih boca je u porastu pri čemu prednjače boce od polietilentereftalata tzv; PET-boce. Jedan od razloga je jeftin materijal. Prednosti PET boca u odnosu na staklene boce su njihovo lako oblikovanje, mala težina i fleksibilnost, pri čemu izgledaju kao staklene transparentne boce. Plastične boce mogu biti monoslojne ili višeslojne, zbog čega pokazuju različitu permeabilnost za svjetlost, plinove, pare te niskomolekularne spojeve. Zbog navedenog se polietilentereftalat kombinira s više različitih materijala koji smanjuju

permeabilnost ambalaže, što otežava njihovu kasniju reciklaciju, odnosno onemogućava reciklaciju zajedno s monoslojnim PET bocama. Plastične boce su manje inertne od staklenih pa postoji bojazan od otpuštanja komponenata ambalaže u pivo (monomera, plastifikatora i antioksidansa), kao i od apsorpcije sastojaka piva u ambalažu (Bamfort i Krochta, 2010).

2.4.3 Aluminijske limenke i metalne i metalne bačve

Aluminij je nepropustan materijal za plinove, pare i svjetlost zbog čega se koristi za izradu limenki piva. Unutrašnjost limenke obložena je emajlom kako ne bi došlo do interakcije aluminija i piva, što bi uzrokovalo zamućenje i metalni okus piva (Bamfort i Krochta, 2010). Neke od prednosti metalne ambalaže su njen dekorativni potencijal i mogućnost reciklacije. Mana aluminijske ambalaže je nemogućnost zavarivanja, što ga čini korisnim samo za izradu bešavnih posuda. Također, cijena aluminija je visoka u odnosu na druge metale (npr. čelik); (Ramos i sur., 2015). Za izradu metalnih bačvi koristi se aluminij ili nehrđajući čelik te njihova zapremnina obično iznosi 25, 30, 50, ili 100 L. Pivo namijenjeno pakiranju u metalne bačve sadrži od 1.5 do 2.5 vol/vol CO₂ (Briggs i sur., 2004).

2.4.4 „Aktivno“ i „inteligentno“ pakiranje

Kod većine prehrambenih proizvoda prisutnost kisika tijekom vremena provedenog u skladištu/na polici uzrokuje nepoželjne promjene koje odbijaju potrošače od njihove konzumacije. Promjena boje i okusa piva posljedice su oksidacijskih reakcija koje su ubrzane prisustvom metalnih iona, visoke temperature ili svjetla, zbog čega je pivo nužno čuvati u zatamnjenoj ambalaži na niskoj temperaturi i osigurati što manji kontakt s kisikom (Bamfort i Krochta, 2010). Koncentracija kisika tijekom samog procesa proizvodnje te kasnije u pivskoj ambalaži uzrokuje tvorbu reaktivnih kisikovih komponenti O₂⁻, HOO⁻, H₂O₂ i HO koje su puno reaktivnije od molekularnog kisika. Nastanak navedenih spojeva inicira reakcija kisika s metalnim ionima (Fe³⁺ i Cu⁺) te je koncentracija slobodnih radikala koj nastaju tijekom starenja piva veća, što je veća koncentracija metalnih iona (Vanderhagen i sur, 2006). Zbog navedenog problema, ali i mnogih drugih, danas se u prehrambenoj industriji primjenjuje praksa tzv. "aktivnog pakiranja". „Aktivno pakiranje“ definira se kao sustav u kojem se u pakirnu ambalažu namjerno ugrađuju komponente koje oslobađaju tvari u okoliš koji okružuje pakiranu hranu/piće ili apsorbiraju komponente iz pakirane hrane/pića. Takvim pakiranjem

osigurava se dulji rok trajanja te održavanje ili poboljšanje stanja pakirane hrane (Ramos i sur., 2015). Sustav aktivnog pakiranja podrazumijeva materijale koji „hvataju“ kisik i etilen, tvari koje „hvataju“ ili otpuštaju ugljikov dioksid, kontrolore vlage, adsorbere ili emitere okusa i filmove koji sadrže antimikrobne ili antioksidativne agense. Tvari koje „hvataju“, odnosno smanjuju koncentraciju kisika u hrani, mogu se nalaziti u posebni paketićima, naljepnicama koje su u kontaktu s ambalažom ili mogu biti inkorporirane u ambalažni materijal (Cruz i sur., 2012). Ramos i sur. (2015) saželi su glavne primjene tzv. „aktivnog pakiranja“ za pića, među kojima i tri za pivo. Navedene tri primjene mogu se podijeliti na antioksidativnu, funkcionalnu i sustav samohlađenja. Najvažnija i najraširenija je primjena tvari koje služe za smanjenje kisika u pivu, dok otpuštanje CO₂ kao oblik funkcionalnog pakiranja, i samohlađuća pivska ambalaža još nemaju komercijalnu primjenu, ali su u razvoju (Ramos i sur., 2015). Kisik u pivu može potjecati iz četiri izvora: kisik zaostao iz vrenja piva, kisik zaostao nakon procesa punjenja u ambalažu, kisik koji tijekom skladištenja uđe kroz ambalažni zatvarač te kisik koji difundira kroz sam ambalažni materijal (Bamforth i Krotcha, 2010). Nakon vrenja i odležavanja pivo sadrži oko 50 µg L⁻¹ O₂, dok se nakon procesa punjenja u ambalažu ta koncentracija može povećati za još 400 µg L⁻¹ pa se proces punjenja vrši tako da dođe do što manjeg povećanja njegove koncentracije. Kao bi se smanjio negativan učinak kisika na pivo, proces punjenja u ambalažu provodi se u modificiranoj atmosferi. Prije samog punjenja piva iz boca se potiskuje zrak, a tlači se CO₂ (ispiranje s CO₂), nakon čega udio kisika iznosi oko 2%. Ako se izvrši drugo istiskivanje, nakon ispiranja boce s CO₂, te se ponovno uspostavi pretlak s CO₂, udio kisika smanjuje se na oko 0,2% (Bamforth i Krotcha, 2010). Nakon prvog, odnosno drugog istiskivanja, pivo se toči u gotovo čistu atmosferu ugljičnog dioksida. PET boce i limenke samo se ispiru s CO₂ prije punjenja piva, jer bi istiskivanjem zraka došlo do njihove implozije. Primjenom aktivnog pakiranja odnosno tvari koje smanjuju koncentraciju O₂, njegov udio može se svesti ispod 0,01% (Ramos i sur., 2015).

Primjena aktivnog pakiranja kod piva, s ciljem antioksidativnog djelovanja vrši se na nekoliko načina :

- i. Paketić s komponentom koja „hvata“ kisik nalazi se unutar zatvarača koji je od sadržaja boce odvojen membranom (Ramos i sur., 2015).
- ii. Komponenta koja „hvata“ kisik je inkorporirana u polimerni materijal unutar zatvarača (Ramos i sur., 2015).

- iii. Komponenta koja „hvata“ kisik je inkorporirana u sam ambalažni materijal (PET boce) ; Cruz i sur., 2012).

Komponente koje se mogu koristiti za uklanjanje kisika u pivu mogu biti soli askorbinske kiseline, komponente sa željezom (Ramos i sur., 2015) i enzimi (kombinacija glukoza oksidaze i katalaze); (Cruz i sur., 2012). Također se koriste i nezasićeni ugljikovodici. Jedan od njih je Nylon-MXD6 (generičko ime za široku lepezu poliamida proizvedenih od m-ksilendiamida (MDA) proizvedenu od strane Mitsubishi Gas Chemical Co.). Komercijalno ime navedenog polimera je „Oxbar“, te se koristi u proizvodnji PET pивske ambalaže kao dodatan sloj. U formi peleta, nezasićeni ugljikovodici koriste se u plastičnim/metalnim čepovima i čeličnim krunama te je navedeno da mogu produljiti rok trajanja piva za 25%. Pri oksidaciji nezasićenih ugljikovodika koristi se kobalt kao katalizator oksidacije (Cruz i sur., 2012). Kako je navedeno ranije, aluminijske limenke su nepropusne za kisik, a za zatvaranje limenke koristi se dvostruki lem (spoj) te je jedini kisik u pivu onaj zaostao iz vrenja i procesa punjenja. Staklo je također nepropustan materijal te osim izvora kisika navedenih za limenke piva, dodatan izvor kisika u staklenim bocama može biti njegov ulazak kroz zatvarač (krunu), odnosno kroz plastičnu oblogu krune. PET ambalaža je, kako je ranije rečeno, generalno propusnija, za pare, plinove i niskomolekulske spojeve od stakla i aluminijskih limenki te kao i za staklene boce, dodatan rizik za propuštanje kisika čini plastični zatvarač.

2.5 Metode identifikacije komponenti arome piva

U pivu je do sada okarakterizirano oko 450 komponenata ne ubrajajući makromolekule kao što su nukleinske kiseline, polisaharidi, lipidi i proteini (Briggs i sur., 2004). Osim na organske i anorganske spojeve u pivu (pri čemu, uz udio vode, bitnu ulogu ima i koncentracija metala potrebnih za rast kvasca); (Briggs i sur., 2004), komponente piva možemo podijeliti na hlapive i nehlapive. Nehlapive komponente piva koje imaju utjecaj na krajnju aromu su glicerol, monosaharidi, polisaharidi, organske i fenolne kiseline (Hirst i Richter, 2016) te se za njihovu analizu najčešće koristi visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC); (Briggs i sur., 2004).

Za separaciju hlapivih komponenenata koriste se plinska kromatografija (GC) dok se za njihovu detekciju najčešće koristi FID detektor. Za preciznije kvalitativno određivanje

hlapivih komponenti općenito, koriste se spregnute metode tj. GC s MS, NMR ili IR (Barišić, 2014).

Prije „ulaska“ hlapivih komponenata na samu kolonu za razdvajanje koristi se tzv. „headspace“ sustav, koji podrazumijeva prikupljanje parne faze iznad tekućeg uzorka u viali za kromatografiju od kuda dalje odlazi na kolonu.

U sljedećim poglavljima bit će opisane neke metode koje se koriste u analizi hlapivih komponenata piva.

2.5.1 „Headspace“ metode uzorkovanja

„Headspace“ tehnika podrazumijeva zagrijavanje tekućeg uzorka u viali na unaprijed određenu temperaturu. Zagrijavanjem uzorka dolazi do isparavanja hlapivih sastojaka dok se ne postigne ravnoteža između parne i tekuće faze (Sithersingh i Snow, 2012). Najčešće korištene tehnike uzorkovanja su: „static headspace extraction“ (SHE) i „dynamic headspace extraction“ (Purge and trap); (Sohrabvandi i Mortazavian, 2011).

Kod SHE, nakon zagrijavanja viala s uzorkom i uspostavljanja ravnoteže, uskom iglom probija se zatvarač viala ispod kojeg se nalazi parna faza te se pomoću nje određeni alikvot uzorka direktno prenosi na kolonu (Sithersingh i Snow, 2012).

„Purge and trap“ tehnika zasniva se na kontinuiranom prolasku inertnog plina kroz tekući uzorak. Plin svojim prolaskom kroz tekući uzorak evaporira hlapive sastojke (purge) te ih odvodi do sorbenta koji ih sakuplja (trap); (Sithersingh i Snow, 2012). Adsorbensi na koje se adsorbiraju hlapive komponente nalaze se u kratkoj koloni. Kolona je ispunjena adsorbentima koji različitim afinitetom adsorbiraju teže i lakše hlapive komponente. Prolaskom inertnog plina kroz kolonu za adsorpciju komponente se različitom brzinom (volumenom plina) eluiraju u kromatografsku kolonu (SRI Instruments Europe GmbH, 2018).

2.5.2 Plameno-ionizacijski detektor

Engl. Flame Ionization Detector, (FID) ima najrašireniju uporabu među detektorima te se za detekciju hlapivih komponenata u pivu često koristi HS-GC-FID metoda. FID radi na principu pirolize ugljikovodika. Hlapive se komponente nakon izlaska iz kolone miješaju sa

smjesom zraka i vodika pri čemu se uzorak zapali i dolazi do pirolize prisutnih komponenata. Pirolizirani ugljikovodici, izuzev onih sa karboksilnom i karbonilnom skupinom, stvaraju radikale $\text{CH}\cdot$ iz kojih nastaju CHO^+ ioni i elektroni. Elektroni se zatim skupljaju na sabirnoj elektrodi, a njihova se struja, proporcionala broju ugljikovih atoma, mjeri ampermetrom (Barišić, 2014).

2.5.3 Detektor apsorpcije elektrona

Engl. Electrone Capture Detector (ECD) detektor ima veliku osjetljivost i selektivnost prema organskim molekulama s elektronegativnim funkcijskim skupinama te se može koristiti za detekciju vicinalnih diketona (Tian, 2010). Ne može se primjenjivati za detekciju alkohola i ugljikovodika (Barišić, 2014). Sastoji se od cilindričnog spremnika (nehrđajući čelik) koji sadrži radioaktivan izvor (^{63}Ni); (Tian, 2010). Plin nositelj (N_2); (Tian, 2010) prelazi preko radioaktivnog izvora koji emitira elektrone. Elektroni se zatim sudaraju s česticama plina i ioniziraju ga te plin nositelj oslobađa elektrone. Nastali elektronski snop zatim privlači anoda pa se između elektroda pojavljuje stalna struja kao posljedica ionizacije. Ukoliko su u plinu nositelju prisutni elektronegativni organski spojevi, dolazi do redukcije struje između elektroda (uslijed „hvatanja“ elektrona nastalih ionizacijom) te je koncentracija analita proporcionalna smanjenju struje (Barišić, 2014)

2.5.4 Spregnute metode

Za detekciju hlapivih komponenata piva koristi se i HS-GC-MS metoda (Sohrabvandi i sur., 2011). Masena spektrometrija je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase (i naboja). Može se koristiti za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava uzorka. Informacije sadržane u masenom spektru na kraju analize pomoću kojih možemo utvrditi o kojem spoju se radi su molekulska masa i molekulska formula. Najvažnija karakteristika MS-a je mogućnost detekcije komponenata u tragovima (Barišić, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci piva donjeg vrenja

U ovom istraživanju korišteno je pivo donjeg vrenja koje je čuvano u PET ambalži različitih osobina (Amasorb, 2%, 33g, Poliprotect, 36g i Amasorb, 4%, 36g) i staklenoj boci kao kontroli. Pivo je čuvano u hladnoj i tamnoj prostoriji kroz period od šest mjeseci tj. period označen na ambalaži kao „najbolje upotrijebiti“ od momenta punjenja u ambalažu. Pivo donjeg vrenja korišteno u ovom istraživanju dobiveno je standardnim postupkom proizvodnje koji uključuje: dekokciju, glavno i naknadno vrenje u cilindrično konusnom fermentoru, naplavnu filtraciju, pasterizaciju u protočnom pasterizatoru i punjenje u ambalažu.

3.1.2 Korištene kemikalije

Tablica 4. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripravu standarda i uzoraka.

	Kemikalija	Čistoća (v/v)	Proizvođač
1	Etanol	5%, p.a	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
2	Acetaldehid	99,5%, p.a	Fluka, Švicarska
3	1-propanol	99,9%, p.a	Fluka, Švicarska
4	2-butanol	99%, p.a	Fluka, Švicarska
5	Etil-acetat	99,8%, p.a	Fluka, Švicarska
6	2-metil-1-propanol (Izobutanol)	99,8%, p.a	Fluka, Švicarska
7	N-butanol (IS)	99%, p.a	Fluka, Švicarska

8	3-metil-1-butanol (Izoamil alkohol)	98,5%, p.a	Fluka, Švicarska
9	2-metil-1-butanol (Amil alkohol)	99%, p.a	Fluka, Švicarska
10	Etil-butirat	99%, p.a,	Fluka, Švicarska
11	Izoamil-acetat	97%., p.a	Fluka, Švicarska
12	Etil-heksanoat	99%, p.a	Fluka, Švicarska
13	2-feniletanol	99%, p.a	Fluka, Švicarska
14	Etil-oktanoat	99%, p.a	Fluka, Švicarska

3.1.3 Aparatura

3.1.3.1. Sustav za plinsku kromatografiju sa „headspace“ tehnikom uzorkovanja

Plinski kromatograf Perkin Elmer Autosystems XL GC (Perkin-Elmer, SAD) sastoji se od „headspace“ sustava za uzorkovanje Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD), uređaja za grijanje kolone (ZB-5MS, Zebron, Phenomenex 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50 µm df), FID detektora i računalnog programa TotalChrom.

3.1.3.2. Informatički programi i obrada rezultata

Za obradu podataka i određivanje koncentracije analiziranih spojeva: 1-butanola, acetaldehida, 1-propanola, 2-butanola, etil-acetata, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola, 2-metil-1-butanola, etil-butirata, izoamil-acetata, etil-heksanoata, 2-feniletanola, etil-oktanoata, 2,3-pentanediona, 2,3-butandiona, trans-2-nonenala i dimetil sulfida koristio se računalni program „Microsoft Excel 2010“.

3.2 Metode rada

3.2.1 Analitičke metode

3.2.1.1 Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg vrenja plinskom „headspace“ kromatografijom (HS-GC-FID i HS-GC-MS)

Za izradu baždarnih dijagrama te kvalitativno određivanje hlapivih komponenata, odnosno njihovih koncentracija u uzorcima piva, korištena je plinska kromatografija s metodom unutrašnjeg standarda (IS).

Analiza je provedena na plinskom kromatografu Perkin Elmer Autosystems XL GC, opremljenom FID (Perkin-Elmer, SAD) detektorom i sustavom za uzimanje uzoraka Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD). Za održavanje plamena na FID-u upotrijebljeni su vodik i zrak.

Uzorak piva za analizu pripremljen je na sljedeći način: u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano je 5 µL internog standarda (1-butanol), a tikvica je do oznake nadopunjena pivom. Sadržaj tikvice je dobro izmiješan te je 10 mL tako pripremljenog uzorka preneseno u vialu volumena 22 mL.

Uvjeti pri kojima je provedeno termostatiranje uzorka kako bi se uspostavila ravnoteža između tekuće i plinske faze, injektiranje uzorka sustavom za uzorkovanje, kromatografsko razdvajanje te detekcija spojeva u uzorcima piva navedeno je ispod.

Viala je termostatirana 20 min. na temperaturi od 80°C . Vrijeme injektiranja iznosilo je 0,05 min, a temperatura injektora 110 °C. Kao mobilna faza korišten je helij pod tlakom od 25 Pa. Analitička kolona termostatirana je prema sljedećem programu: 5 min na 35°C, 2 min na 60°C te 7 min na 180°C. Brzina zagrijavanja između navedenih temperatura iznosila je 10°C/min. Vrijeme trajanja programa iznosilo je 28,5 min. Za detekciju je korišten FID (Flame Ionization Detector) detektor čija je temperatura iznosila 250°C.

Koncentracije vicinalnih diketona, dimetil sulfida i trans-2-nonenala određene su kromatografskom metodom na HS-GC-MS sustavu u ustanovi BIOINSTITUT d.o.o. za usluge u zdravstvu i veterinarstvu, Čakovec. Analiza je provedena na Perkin Elmer GC Clarus 680 sustavu spregnutim sa spektrometrijom mase MS 600T. Na GC sustavu koristila se Zebron ZB-624 (30 m x 0,25 mm x 1,4 µm). U ovoj analizi korišten je „headspace-trap“ sustav, pri čemu je viala termostatirana 20 min. na 80°C, temperatura injektora iznosila je

120°C, a kao mobilna faza korišten je helij pod tlakom od 31 Pa. Analitička kolona termostatorirana je prema sljedećem programu: 5 min. na 35°C te je brzina zagrijavanja do 245°C iznosila 6°C/min.. Kao mobilna faza korišten je helij koji je strujao brzinom od 2,0 mL/min.

3.2.1.2 Priprema standardnih otopina za izradu baždarnih dijagrama

Standardne otopine za izradu baždarnih pravaca pripremljene su razrjeđivanjem temeljne standardne otopine. Temeljna standardna otopina pripremljena je u odmjernoj tikvici od 250 ml, a koncentracije pojedinih hlapivih komponenata za analizu iznosile su 100 mg L⁻¹. U odmjernu tikvicu dodani su odgovarajući volumeni otopina hlapivih komponenti nakon čega je tikvica do oznake nadopunjena 5% etanolom.

Standardne otopine za izradu baždarnih pravaca u kojima je koncentracija pojedinih hlapivih komponenti iznosila; 80, 60, 40, 30, 20, 10, 5, 3, 1, 0.5 i 0.1 mg L⁻¹, pripremljene su u viali za kromatografiju, razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena temeljne standardne otopine. Uzorci standardnih otopina za izradu baždarnih pravaca pripremljeni su u tri paralele. U vialu za kromatografiju dodan je odgovarajući volumen temeljne standardne otopine, 5 µl internog standarda (N-butanol) te je viala do volumena 10 mL nadopunjena 5% etanolom. Baždarni dijagrami prikazani su u poglavlju Prilozi (poglavlje 7.1). Retencijska vremena analiziranih spojeva prikazana su u Tablici 5.

Tablica 5: Retencijska vremena hlapivih komponenti piva

	Spoj	tR/min
1	Acetaldehid	4,14
2	2-metil-1-propanol	8,23
3	3-metil-1-butanol	12,26
4	N-propanol	6,37
5	Etil-oktanoat	24,25
6	2-butanol	7,46
7	2-metil-1-butanol	12,43
8	1-butanol (IS)	9,51
9	Etil-butirat	14,49
10	Etil-acetat	7,71
11	Izoamil-acetat	16,80
12	Etil-heksanoat	19,95
13	2-feniletanol	22,98

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati provedenih kromatografskih analiza (HS-GC-FID i HS-GC-MS) kojima su kvalitativno i kvantitativno određene hlapive komponente piva. Identične hlapive komponente: acetaldehid, 1-propanol, 2-butanol, etil-acetat, 2-metil-1-propanol (i-propanol), N-butanol (IS), 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, etil-butarat, izoamil-acetat, etil-heksanoat, 2-feniletanol, etil-oktanoat, 2,3-pentandion, 2,3-butandion, trans-2-nonenal i dimetil sulfid određene su za uzorke piva koji su bili zapakirani u četiri različite vrste ambalaže. Koncentracija navedenih hlapivih komponenata u pivu analizirana je za uzorke piva koji su u ambalaži proveli različit vremenski period (od 0 dana do 6 mjeseci).

Analizirani uzorci piva bili su zapakirani u: povratnoj staklenoj boci 0,5 L, PET ambalaži (Amasorb, 2%, 33g), PET ambalaži (Poliprotect 36g) i PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g). Rezultati su podijeljeni u 4 poglavlja prema vrsti ambalaže u kojoj se nalazilo pivo.

Koncentracija spojeva koji se u pivu nalaze u mg L^{-1} koncentracijama kao što su: aldehidi, viših alkoholi i esteri određena je HS-GC-FID metodom (poglavlja: 2.5.1. i 2.5.2.), dok je koncentracija 2,3-butadiona, 2,3-pentadiona i trans-2-nonenala određena je HS-GC-MS metodom (poglavlje 2.5.4.).

4.1 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) piva u povratnoj staklenoj boci.

Aldehidi pripadaju grupi nepoželjnih sastojaka u dozrelom pivu. Koncentracija acetaldehida u pivu pakiranom u povratnoj staklenoj boci porasla je sa $3,99 \text{ mg L}^{-1}$ (0-ti dan) na $5,49 \text{ mg L}^{-1}$ (180. dan), odnosno za 37,59% (Slika 5). Dobiveni rezultat je u skladu s literaturom (Vanderhagen i sur., 2003), gdje je koncentracija acetaldehida tijekom šest mjeseci skladištenja u boci na sobnoj temperaturi porasla sa $1,052$ na $1,377 \text{ mg L}^{-1}$. Uzrok porasta acetaldehida tijekom skladištenja može se pripisati oksidaciji etanola zbog prisustva kisika u pivu (Vanderhagen i sur., 2003). Koncentracije acetaldehida u pivu nalaze se unutar intervala navedenog u literaturi ($2\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001).

Koncentracija drugog analiziranog aldehida, trans-2-nonenala, ima izrazito pozitivan trend (Slika 6). Njegova koncentracija narasla je s početnih $27,80 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (0-ti dan) na $54,65 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (183. dan) te je navedena koncentracija veća od koncentracija unutar koncentracijskog intervala navedenog u literaturi ($0,1\text{--}2,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001). Porast

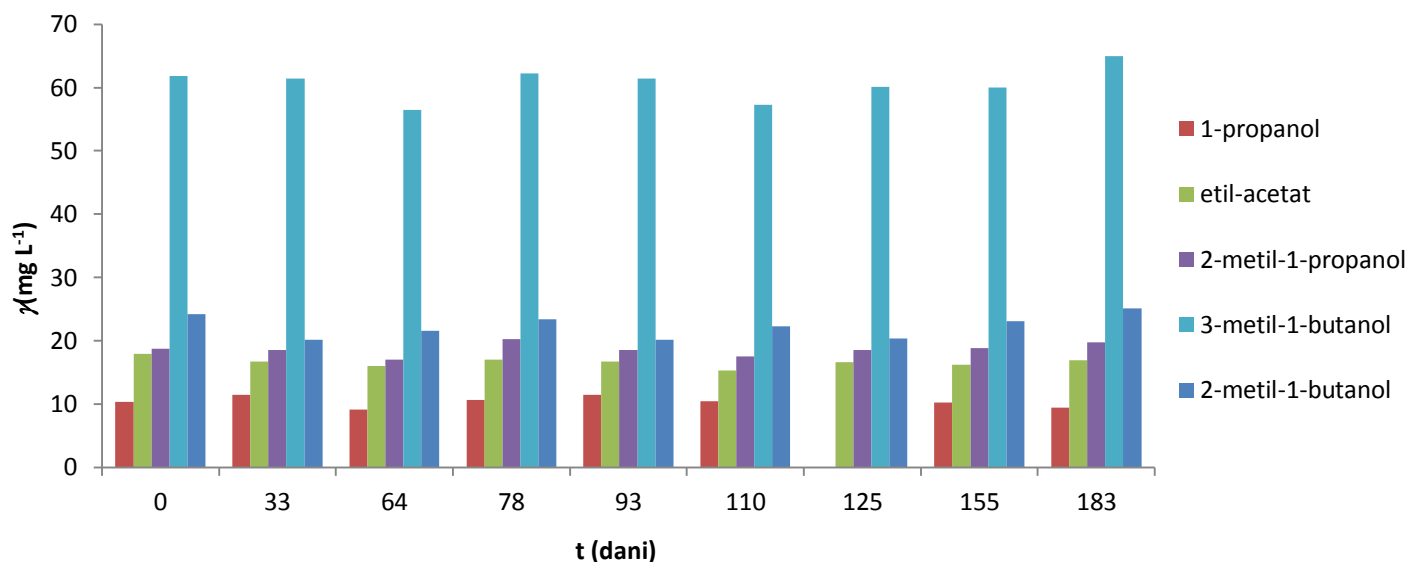
koncentracije trans-2-nonenala u skladu je s literaturom gdje se navodi porast njegove koncentracije ili koncentracija tijekom skladištenja ostaje gotovo nepromijenjena (Vanderhagen i sur., 2003).

Koncentracija 2,3-butandiona tijekom skladištenja narasla je sa 23,02 na 88,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Slika 6), što se podudara s rezultatima navedenim u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003), gdje je koncentracija 2,3-butandiona porasla s početnih 2 na 24,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Koncentracija 2,3-pentandiona porasla je s početnih 108,57 $\mu\text{g L}^{-1}$ na konačnih 111,88 $\mu\text{g L}^{-1}$ sa značajnim padom koncentracije nakon 93. dana skladištenja (52,41 $\mu\text{g L}^{-1}$); (Slika 6). Izmjerene koncentracije 2,3-butandiona i 2,3 pentandiona nalaze se unutar intervala navedenih u literaturi koji za 2,3-butandion iznosi: 10-400 $\mu\text{g L}^{-1}$, a 2,3-pentandion 10-150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Hughes i Baxter, 2001).

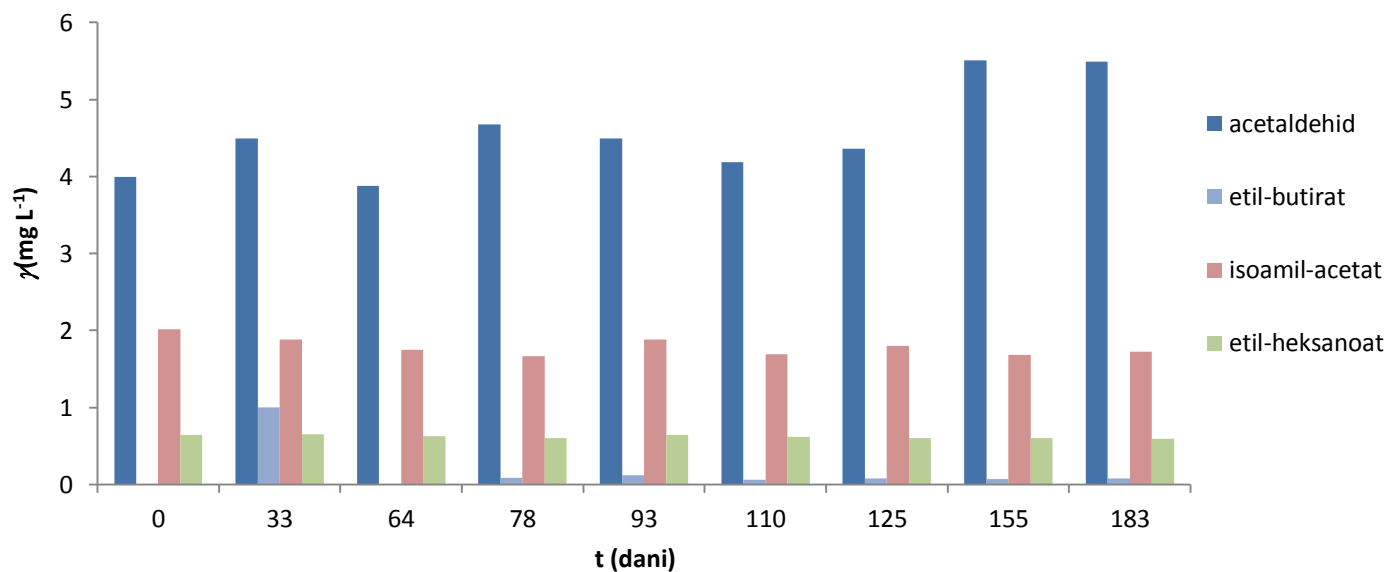
Koncentracija dimetil sulfida porasla je sa 1,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ na 3,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Slika 6). Njegova koncentracija u analiziranom pivu je manja od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ što je donja granica osjetljivosti za dimetil sulfid navedena u literaturi (Hughes i Baxter, 2001). Dimetil sulfid s udjelom od 0,0024% čini najmanji udio u ukupnoj količini analiziranih hlapivih komponenata.

Koncentracija etil-oktanoata nalazi se ispod donje granice detekcije. Koncentracije etil-butirata tijekom čuvanja u staklenoj boci variraju oko donje granice detekcije (Slika 5) te na kraju analize ujedno čini najmanji udio među esterima (0,42%). Sličan rezultat dobiven je u literaturi (Evans i sur., 1999) gdje su pikovi etil-butirata nakon provedbe GC-FID jedva vidljivi. Koncentracija etil-acetata u pivu smanjila se za 6,07%. U prvom i posljednjem uzorku iznosila je 17,95 mg L^{-1} , odnosno 16,86 mg L^{-1} te je tako etil-acetat najzastupljeniji ester u pivu, s udjelom od 87,58% u frakciji estera (Slika 4). Dobiveni rezultat u skladu je s literaturom (Vanderhagen i sur., 2003), gdje je koncentracija tijekom skladištenja u periodu od šest mjeseci pala sa 28,1 mg L^{-1} na 27,75 mg L^{-1} te je etil-acetat također najzastupljeniji ester. Drugi po redu najzastupljeniji esteri su izoamil-acetat i etil-heksanoat čije su se koncentracije tijekom skladištenja smanjile za mali iznos (Slika 5). Koncentracije izoamil-acetata u prvom i zadnjem uzorku iznosile su 2,02 i 1,72 mg L^{-1} , a etil heksanoata 0,65 i 0,59 mg L^{-1} . Pad koncentracije estera u skladu je s rezultatima u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003), gdje se koncentracija izoamil-acetata tijekom skladištenja smanjila sa 1,97 mg L^{-1} na 1,71 mg L^{-1} , a etil-heksanoata sa 0,26 mg L^{-1} na 0,24 mg L^{-1} . Pad koncentracije estera posljedica je kemijske hidrolize i djelovanja esteraza oslobođenih iz stanica kvasca (Vanderhagen i sur., 2003). Koncentracije estera nalaze se unutar koncentracijskih intervala navedenih u literaturi, izuzev etil-heksanoata koji je prisutan u većoj koncentraciji (Tablica 2).

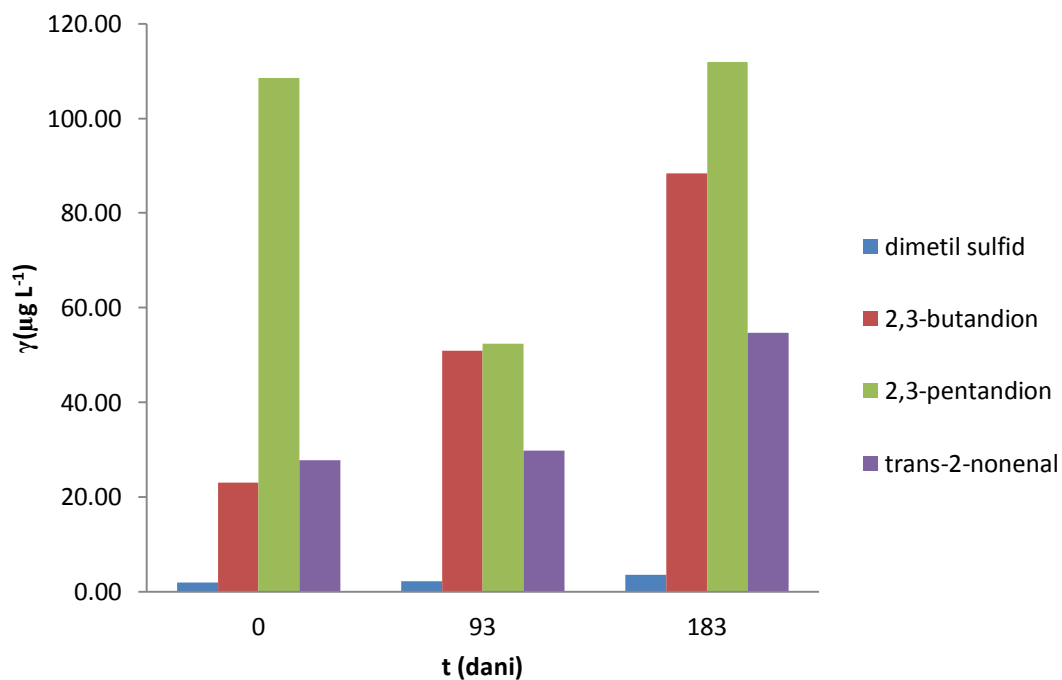
Prisutnost alkohola 2-butanola i 2-feniletanola nije detektirana tijekom skladištenja piva u staklenoj boci. Odsutstvo alkohola 2-butanola u pivu je poželjno, jer njegova prisutnost može ukazivati na kontaminaciju bakterijama vrste *Lactobacillus brevis* (Nykanen i Soumalainen, 1983). Koncentracija 3-metil-1-butanola porasla je sa 61,81 na 64,94 mg L⁻¹ (Slika 4) te je najzastupljenija komponenta u udjelu analiziranih komponenata što je u skladu s podacima u literaturi (Marić, 2009). Njegov udio u ukupnoj količini analiziranih hlapivih komponenata iznosi 45,05%. Najzastupljeniji je viši alkohol (54,49%) te se dobiveni rezultat podudara s podatkom u literaturi gdje je navedeno da udio izoamil alkohola u frakciji viših alkohola iznosi od 40 do 70% (Lambrechts i Pretorius, 2000). Sljedeći najzastupljeniji alkoholi po redu su 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol i 1-propanol te se poredak viših alkohola po koncentraciji poklapa s redoslijedom koncentracija viših alkohola u literaturi (Ivušić i sur., 2006). Koncentracije navedenih alkohola gotovo su stalne tijekom perioda od šest mjeseci (Slika 4). Početna i krajnja koncentracija 2-metil-1-butanola iznosile su 24,23, odnosno 25,08 mg L⁻¹ te se nalazi unutar koncentracijskog intervala navedenog u literaturi (Tablica 3). Početne i krajnje koncentracije 2-metil-1-propanola i 1-propanola iznosile su 18,70 i 19,72 mg L⁻¹, odnosno 10,35 i 9,44 mg L⁻¹. Koncentracije 2-metil-1-propanola i 1-propanola nalaze se unutar koncentracijskih intervala za pivo donjeg vrenja navedenih u literaturi (Tablica 3).



Slika 4: Promjene koncentracije viših alkohola i etil-acetata tijekom čuvanja (skladištenja) piva u povratnoj staklenoj boci.



Slika 5: Promjene koncentracije estera i acetaldehida tijekom čuvanja (skladištenja) piva u povratnoj staklenoj boci.



Slika 6: Promjene koncentracije vicinalnih diketona, dimetil-sulfida i trans-2-nonenala tijekom čuvanja (skladištenja) piva u povratnoj staklenoj boci.

4.2 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Amasorb, 2%,33g)

Početna koncentracija acetaldehida iznosila je $4,28 \text{ mg L}^{-1}$, a konačna $8,62 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 8). Koncentracije acetaldehida kreću se unutar intervala navedenog u literaturi ($2\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$) te je porast koncentracije u skladu s rezultatima dobivenim u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003). Koncentracija drugog analiziranog aldehida, trans-2-nonenala, porasla je sa $24,36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (90.-ti dan) na $172,66 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (180.-ti dan); (Slika 9) te se navedene koncentracije nalaze izvan intervala navedenog u literaturi ($0.1\text{--}2.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001). Porast koncentracije trans-2-nonenala u skladu je s literaturom gdje se navodi porast njegove koncentracije ili koncentracija tijekom skladištenja ostaje gotovo nepromijenjena (Vanderhagen i sur., 2003).

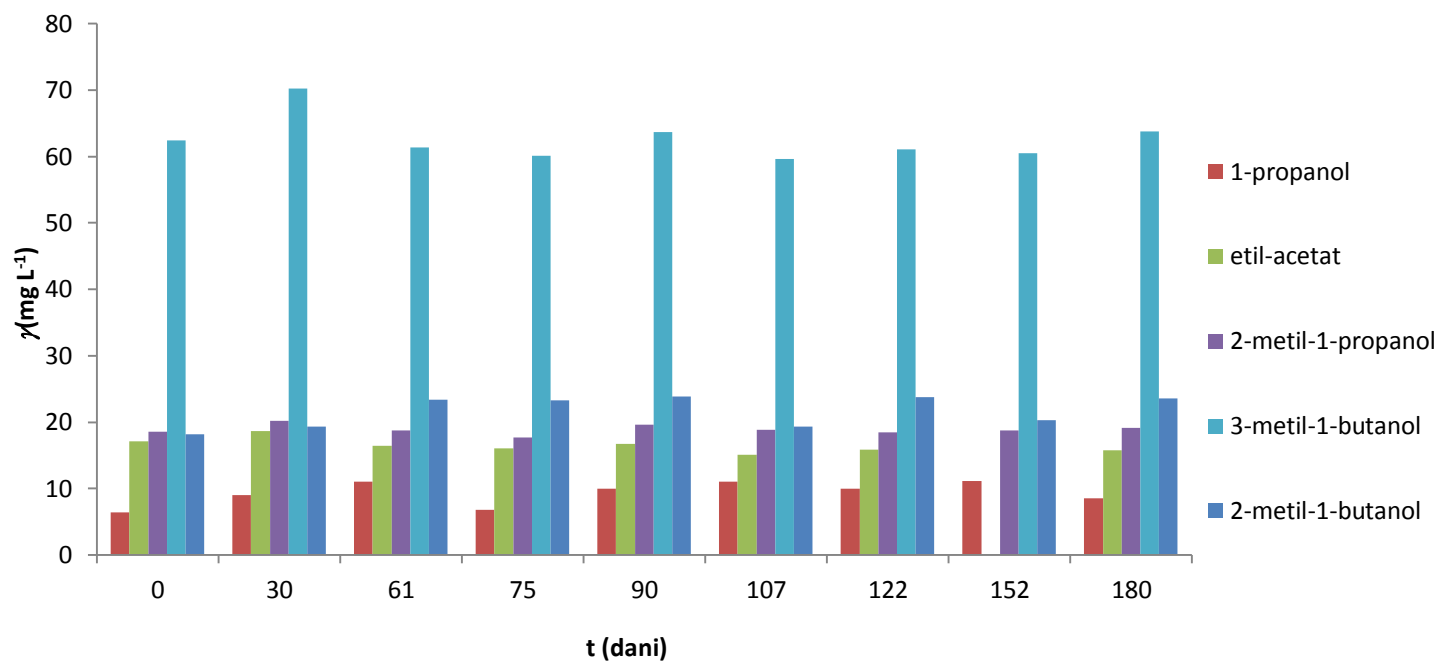
Koncentracija oba analizirana vicinalna diketona narasla je od 90.-og do 180.-og dana boravka piva u PET ambalaži (Slika 9). Koncentracija 2,3-butandiona narasla je sa $0,00$ na $61,87 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, a 2,3-pentandiona sa $30,90$ na $52,52 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ te je porast njihove koncentracije tijekom skladištenja u skladu s porastom koncentracije vicinalnih diketona navedenog u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003). Izmjerene koncentracije 2,3-butandiona i 2,3-pentandiona nalaze se unutar intervala navedenih u literaturi koji za 2,3-butandion iznosi: $10\text{--}400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, a 2,3-pentandion $10\text{--}150 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Hughes i Baxter, 2001).

Dimetil sulfid čini najmanji udio od svih analiziranih komponenata na kraju istraživanja ($0,0013\%$). Njegova je koncentracija tijekom vremena porasla sa $1,41$ (90.-ti dan) na $1,90 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (180.-ti dan); (Slika 9). Koncentracija dimetil sulfida u analiziranom pivu je manja od $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ što je donja granica osjetljivosti dimetil sulfida u pivu navedena u literaturi (Hughes i Baxter, 2001).

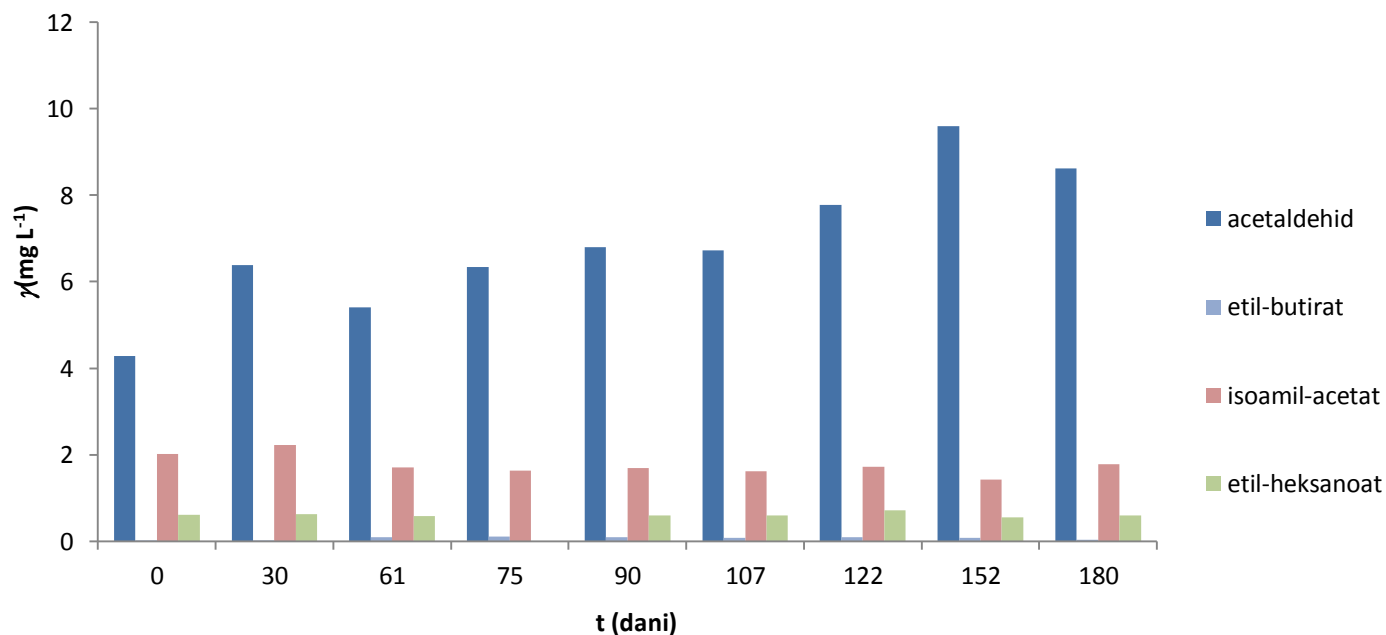
Najzastupljeniji ester u analiziranom pivu je etil-acetat što je u skladu s literaturom (Vanderhagen i sur., 2003). Njegov je udio u frakciji estera iznosio $86,8\%$. Početna i krajnja koncentracija etil-acetata iznosile su $17,07 \text{ mg L}^{-1}$, odnosno $15,78 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 7). Slijede ga izoamil-acetat i etil-heksanoat. Koncentracija izoamil-acetata gotovo je stalna tijekom perioda od šest mjeseci (početna: $2,01$, krajnja: $1,77 \text{ mg L}^{-1}$); (Slika 8). Početna i krajnja koncentracija etil-heksanoata gotovo su iste ($0,61$ i $0,60 \text{ mg L}^{-1}$); (Slika 8). Koncentracije etil-acetata i izoamil-acetata nalaze se unutar intervala navedenog u literaturi dok je koncentracija etil-heksanoata povišena (Tablica 2). Koncentracije etil-butarata kreću se oko donje granice detekcije (Slika 8); (što je u skladu s literaturom Evans i sur., 1999) te tako čini najmanji udio ($0,17\%$) u ukupnom udjelu analiziranih estera, dok se koncentracije etil-oktanoata u pivu

nalaze se ispod granice detekcije tijekom svih šest mjeseci skladištenja piva. Pad koncentracije estera svojstven je pivu skladištenom određeni vremski period, što je u skladu s podacima navedenim u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003) gdje se također navodi pad koncentracije analiziranih estera.

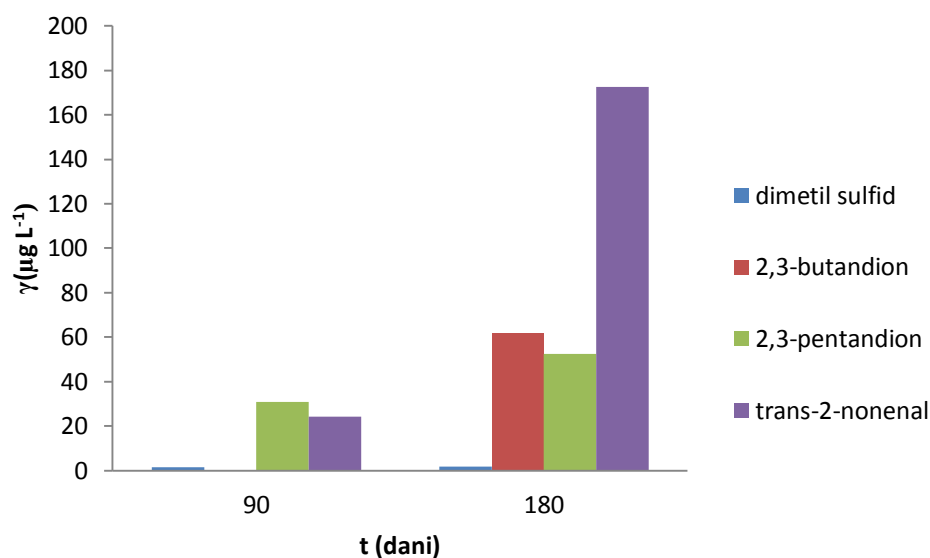
Prisustvo 2-butanola u pivu koje bi ukazivalo na kontaminaciju bakterijama mliječne kiseline (Nykanen i Soumalainen, 1983) nije detektirano. Prisustvo 2-feniletanola također nije detektirano tijekom boravka piva u ambalaži. 3-metil-1-butanol najzastupljenija je od analiziranih komponenata u pivu (u skladu s literaturom Marić, 2009). Njegove su koncentracije uglavnom nepromijenjene te su početna i krajnja koncentracija iznosile 62,48 odnosno 63,74 mg L⁻¹ (Slika 7). Udio 3-metil-1-butanola u ukupnoj količini hlapivih komponenata iznosio je 44,92%, dok je udio u frakciji viših alkohola iznosio 55,44%, što je u skladu s literaturom (Lambrechts i Pretorius, 2000). Navedene koncentracije nalaze se unutar literaturnog intervala kako je prikazano u Tablici 3. Sljedeći najzastupljeniji alkoholi po redu su: 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol te 1-propanol. Najveći porast koncentracije alkohola zabilježen je kod 2-metil-1-butanola, kojem je koncentracija porasla sa 18,17 na 23,53 mg L⁻¹ (Slika 7), dok za posljednja dva alkohola početne i krajnje koncentracije iznose 18,70 i 19,72 mg L⁻¹, odnosno 6,37 i 8,56 mg L⁻¹ (Slika 7). Navedene koncentracije nalaze se unutar intervala navedenog u literaturi (Tablica 3) te se poredak viših alkohola poklapa s redoslijedom koncentracija viših alkohola u literaturi Ivušić i sur. (2006).



Slika 7: Promjene koncentracije viših alkohola i estera tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalži (Amasorb, 2%, 33g).



Slika 8: Promjene koncentracije estera i acetaldehida tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalži (Amasorb, 2%, 33g).



Slika 9: Promjene koncentracije vicinalnih diketona, dimetil-sulfida i trans-2-nonenala od 90.-og do 180.-og dana skladištenja piva u PET ambalaži (Amasorb, 2%, 33g).

4.3 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci odležavanja u PET ambalaži (Poliprotect, 36g)

Koncentracija acetaldehida u pivu prvi dan skladištenja iznosila je $4,28 \text{ mg L}^{-1}$, a 180. $5,63 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 8) te je porast koncentracije u skladu s literaturom (Vanderhagen i sur., 2003). Koncentracija trans-2-nonenala značajno je porasla tijekom skladištenja, s početne koncentracije od $6,57$ na $46,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ u krajnjem uzorku (Slika 12). Navedene se koncentracije nalaze izvan koncentracijskog intervalu navedenog u literaturi ($0.1\text{-}2.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001). Porast koncentracije trans-2-nonenala u skladu je s literaturom gdje se navodi porast njegove koncentracije ili koncentracija tijekom skladištenja ostaje gotovo nepromijenjena (Vanderhagen i sur., 2003)

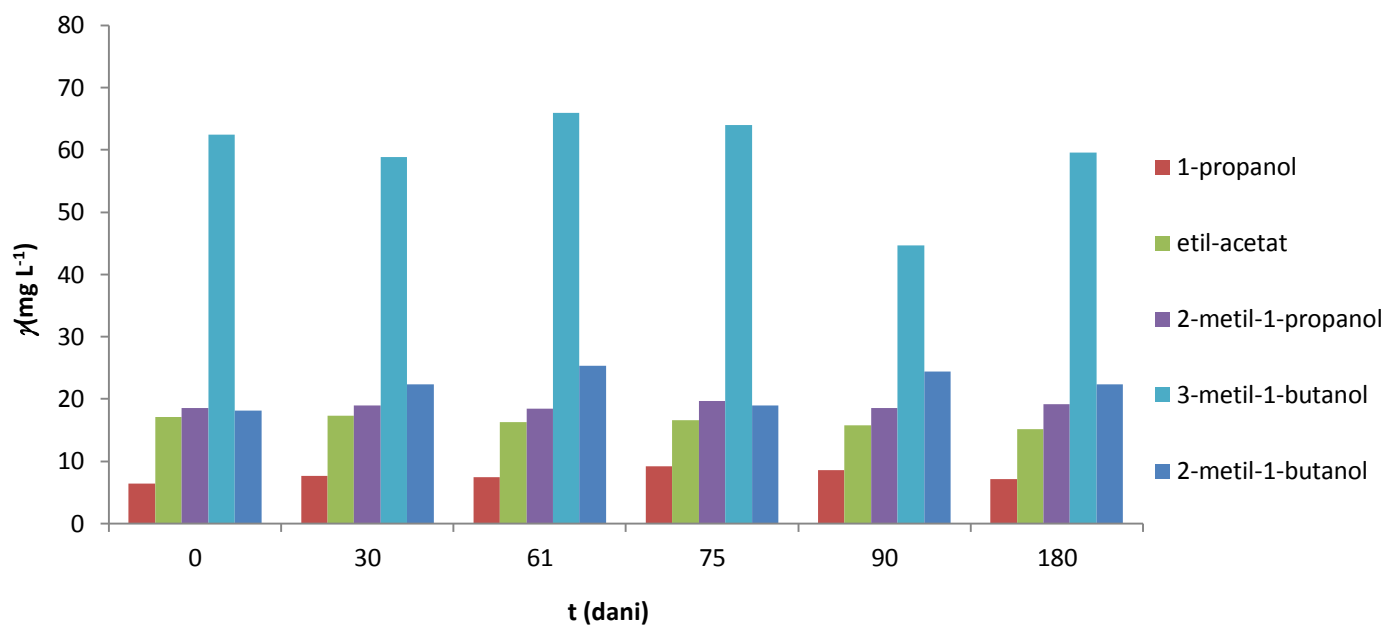
Koncentracija 2,3-butandiona porasla je s početne koncentracije od $16,73 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ na $38,57 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ u posljednjem uzorku (Slika 12). Porast koncentracije tijekom skladištenja naveden je i u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003) te se koncentracije 2,3-butandiona nalaze unutar predviđenog koncentracijskog intervala ($10\text{-}400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001). Početna koncentracija 2,3-pentandiona iznosila je $165,79 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ nakon čega slijedi značajan

pad koncentracije na $31,24 \mu\text{g L}^{-1}$, da bi u posljednjem uzorku ponovno porasla na $78,24 \mu\text{g L}^{-1}$ (Slika 12). Koncentracije 2,3-pentandiona nalaze se unutar koncentracijskog interval navedenog u literaturi ($10\text{--}150 \mu\text{g L}^{-1}$); (Hughes i Baxter, 2001).

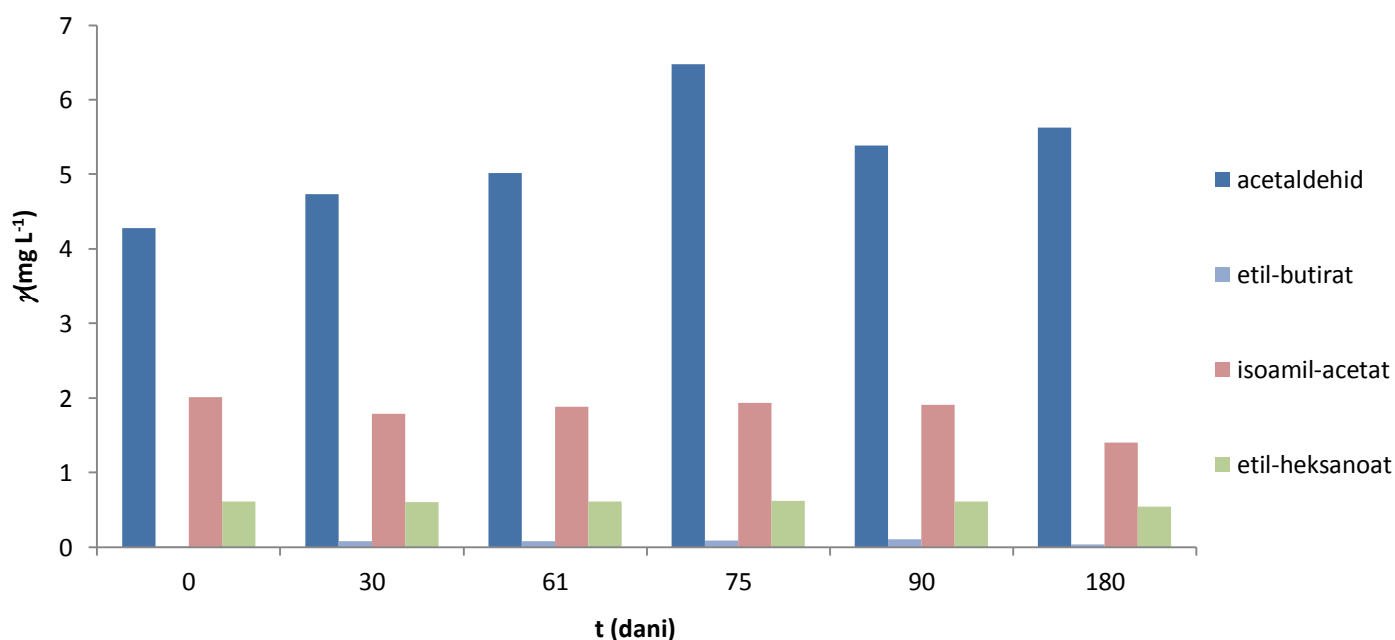
Koncentracija dimetil sulfida smanjila se sa $3,18 \mu\text{g L}^{-1}$ na $1,62 \mu\text{g L}^{-1}$ te dimetil sulfid čini najmanji udio ($0,0012\%$) u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata (Slika 12). Njegova koncentracija u analiziranom pivu je manja od $10 \mu\text{g L}^{-1}$ što je donja granica osjetljivosti dimetil sulfida u pivu navedena u literaturi (Hughes i Baxter, 2001).

Koncentracija etil-oktanoata nalazi se ispod granice detekcije dok koncentracija etil-butirata tijekom boravka u boci varira oko donje granice detekcije (Slika 11) kao i u radu Evans i sur. (1999) te na kraju analize ujedno čini najmanji udio među esterima ($0,18\%$). Etil-acetat najzastupljeniji je među esterima ($88,5\%$); (u skladu s literaturom Vanderhagen i sur., 2003). Njegova početna koncentracija u pivu od $17,07 \text{ mg L}^{-1}$ blago je povišena u odnosu na krajnju koncentraciju ($15,16 \text{ mg L}^{-1}$); (Slika 10). Slijede ga esteri izoamil-acetat i etil-heksanoat čije su se koncentracije s vremenom nenatno smanjile. Početne koncentracije navedenih estera redom iznose $2,01$ i $0,61 \text{ mg L}^{-1}$, a koncentracije u uzorcima koji su u ambalaži proveli šest mjeseci $1,40$ i $0,54 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 11). Koncentracije etil-acetata i izoamil-acetata nalaze se unutar intervala navedenog u literaturi dok je koncentracija etil-heksanoata povišena (Tablica 2). Pad koncentracije estera svojstven je pivu skladištenom određeni vremenski period, što je u skladu s podacima navedenim u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003).

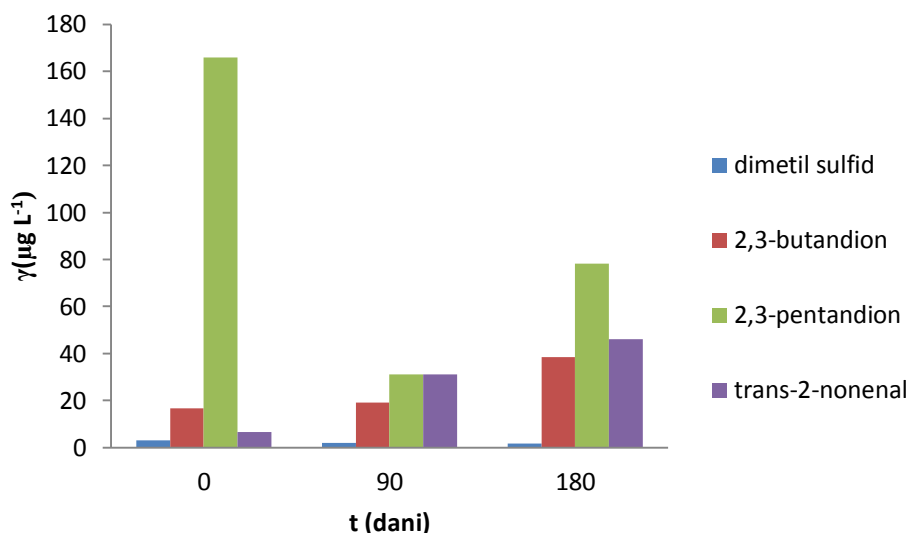
3-metil-1-butanol najzastupljenija je komponenta s udjelom od $45,44\%$ u ukupnoj količini analiziranih komponenata (u skladu s literaturom Marić, 2009) te udjelom u frakciji viših alkohola u iznosu od $55,05\%$ što se podudara s literaturom (Lambrechts i Pretorius, 2000). Njegove su početna i krajnja koncentracija iznosile $62,48$ odnosno $59,57 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 10). Slijede ga 2-metil-1-butanol i 2-metil-1-propanol čije su početne koncentracije od $18,17$ i $18,52 \text{ mg L}^{-1}$ nešto niže od konačnih: $22,33$ i $19,14 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 10). Početna koncentracija 1-propanola iznosila je $6,37 \text{ mg L}^{-1}$, a konačna $7,18 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 10). Navedene koncentracije analiziranih alkohola nalaze se u koncentracijskim intervalima danim u literaturi (Tablica 3). Koncentracija 2-feniletanola kao ni koncentracija 2-butanola nije zabilježena u pivu što je u skladu s očekivanjima, jer bi prisutnost 2-butanola ukazivala na kontaminaciju bakterijama mliječne kiseline



Slika 10: Promjene koncentracije viših alkohola i estera tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Poliprotect 36g).



Slika 11: Promjene koncentracije estera i acetaldehida tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Poliprotect 36g).



Slika 12: Promjene koncentracije vicinalnih diketona, dimetil-sulfida i trans-2-nonenala tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Poliprotect 36g).

4.4 Određivanje hlapivih komponenti piva tijekom 6 mjeseci čuvanja (skladištenja) u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g).

Koncentracija acetaldehida u pivu porasla je s početne koncentracije od 3,88 mg L⁻¹ na 9,48 mg L⁻¹ u pivu koje je čuvano 180 dana (Slika 14) te je porast koncentracije acetaldehida u skladu s povećanjem koncentracije u literaturi (Vanderhagen i sur., 2003). Koncentracije acetaldehida kreću se unutar intervala navedenog u literaturi (2-20 mg L⁻¹). Koncentracija trans-2-nonenala narasla je tijekom perioda provedenog na polici, s početne koncentracije od 9,55 na 57,58 μg L⁻¹ (Slika 15). Koncentracije trans-2-nonenala nalaze se izvan koncentracijskog intervala danog u literaturi (0.1-2.0 μg L⁻¹); (Hughes i Baxter, 2001). Porast koncentracije trans-2-nonenala u skladu je s literaturom gdje se navodi porast njegove koncentracije ili koncentracija tijekom skladištenja ostaje gotovo nepromijenjena (Vanderhagen i sur., 2003).

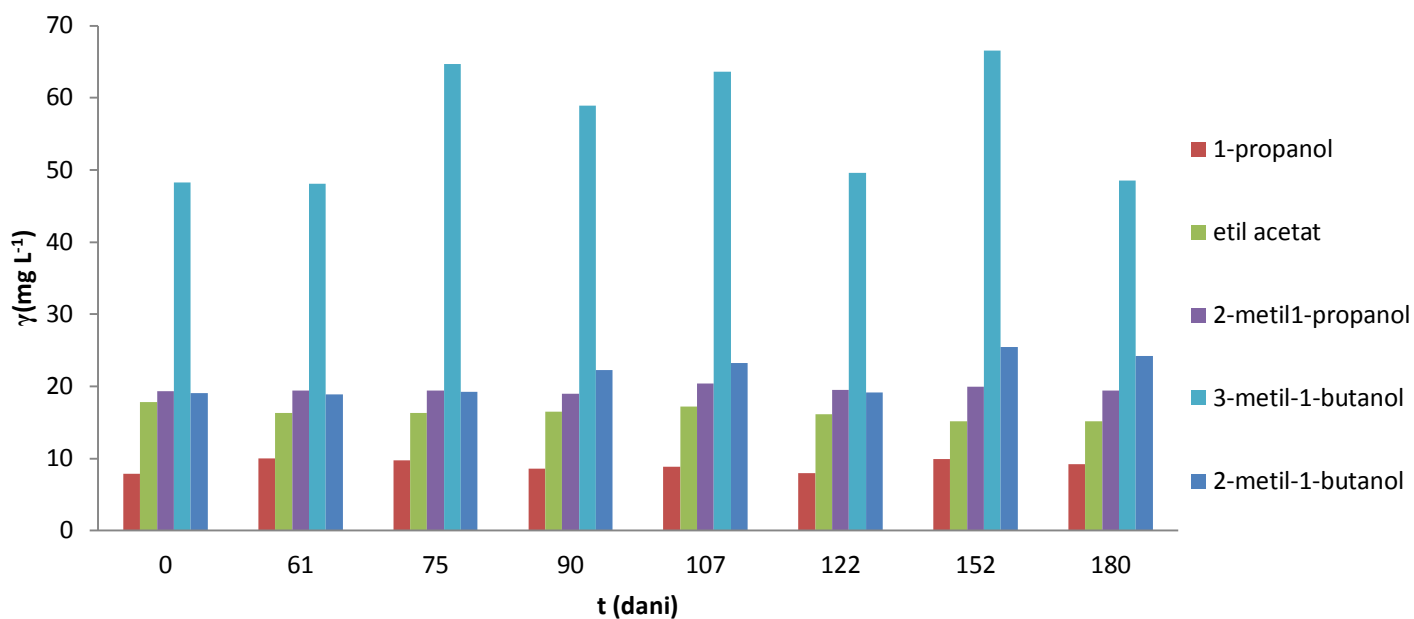
Koncentracija 2,3-butandiona je u istom vremenskom periodu značajno narasla, sa 15,54 na 122,07 μg L⁻¹ (Slika 15). Koncentracija 2,3-pentandiona također je porasla sa 44,20 na 88,19 μg L⁻¹ (Slika 15). Izmjerene koncentracije 2,3-butandiona i 2,3-pentandiona nalaze se unutar intervala navedenih u literaturi koji za 2,3-butandion iznosi: 10-400 μg L⁻¹, a 2,3-

pentandion 10-150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Hughes i Baxter, 2001).

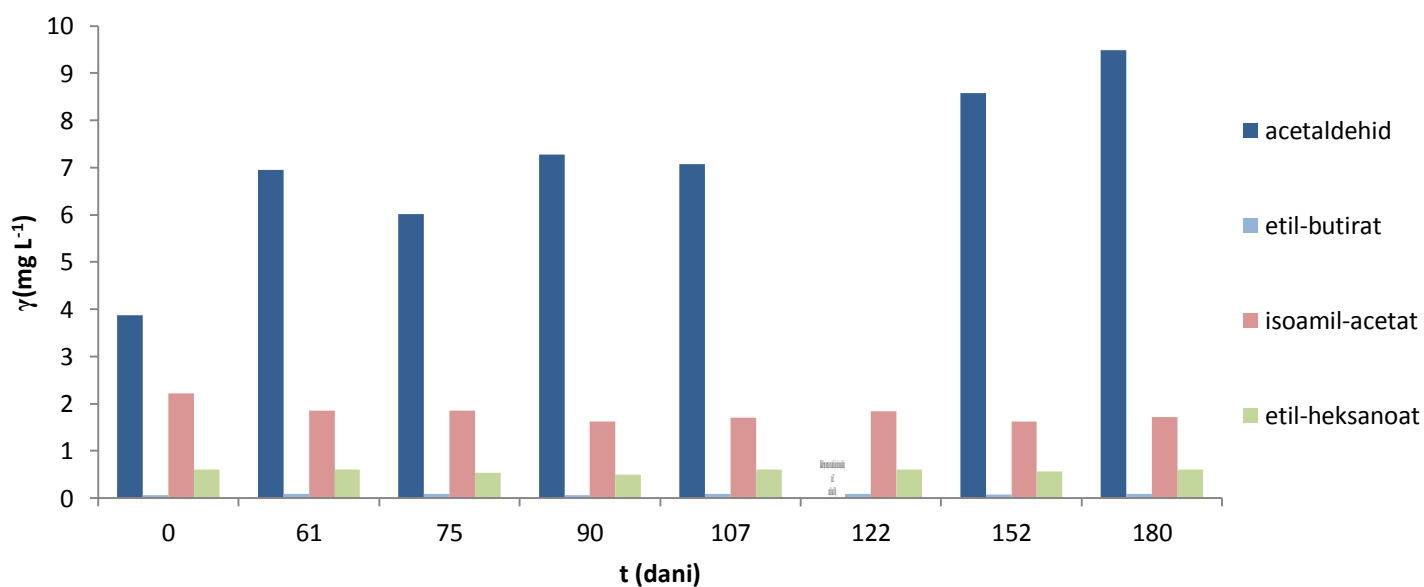
Koncentracija dimetil-sulfida porasla je s početne koncentracije od 1,81 na krajnju koncentraciju od 2,22 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Slika 15) te dimetil sulfid ujedno čini najmanji udio u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata (0,0017%). Njegova koncentracija u analiziranom pivu manja je od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ što je donja granica osjetljivosti dimetil sulfida u pivu navedena u literaturi (Hughes i Baxter, 2001).

Koncentracija etil-oktanoata nalazi se ispod granice detekcije dok koncentracija etil-butirata tijekom boravka u ambalaži varira oko donje granice detekcije (Slika 14); (u skladu s podacima navedenim u literaturi Evans i sur., 1999) te na kraju analize ujedno čini najmanji udio među esterima (0,51%). Etil-acetat najzastupljeniji je među esterima s udjelom od 86,27% u frakciji estera, a njegova je početna koncentracija od 17,84 mg L^{-1} blago povišena u odnosu na krajnju koncentraciju od 15,14 mg L^{-1} (Slika 13). Slijede ga esteri izoamil-acetat, čija se koncentracija blago smanjila te etil-heksanoat, čija koncentracija ostaje gotovo nepromijenjena tijekom perioda od šest mjeseci i većinom iznosi 0,61 mg L^{-1} (Slika 14). Početna je koncentracija izoamil-acetata iznosila 2,22 mg L^{-1} , a krajnja 1,71 mg L^{-1} (Slika 14). Koncentracije etil-acetata i izoamil-acetata nalaze se unutar intervala navedenog u literaturi dok je koncentracija etil-heksanoata povišena (Tablica 2).

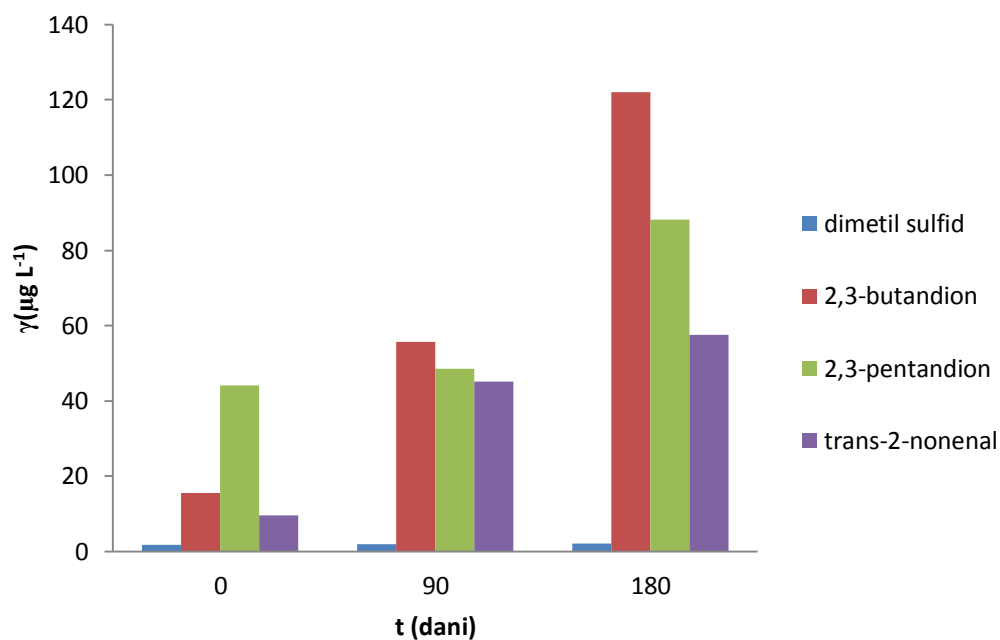
3-metil-1-butanol najzastupljeniji je alkohol, ali i komponenta od ukupno analiziranih komponenata u pivu, s udjelom od 37.77% (Marić, 2009). Udio 3-metil-1-butanola u frakciji viših alkohola iznosi 47,93 što je u skladu s literaturom (Lambrechts i Pretorius, 2000). Njegova koncentracija značajno varira u periodu od šest mjeseci. Početna i konačna koncentracija 3-metil-1-butanola iznosile su 48,25 i 48,55 mg L^{-1} , međutim, do značajnog porasta koncentracije došlo je 75.-og, 107.-og i 152.-og dana čuvanja, kada su njegove koncentracije u pivu redom iznosile 64,68, 63,6 te 66,54 mg L^{-1} (Slika 13). Slijede ga 2-metil-1-butanol i 2-metil-1-propanol. Koncentracija 2-metil-1-butanola porasla je sa 19,06 na 24,19 mg L^{-1} (Slika 13). Koncentracija 2-metil-1-propanola gotovo je ista tijekom perioda od šest mjeseci te u prvom uzorku iznosi 19,30 mg L^{-1} , a u zadnjem uzorku 19,38 mg L^{-1} (Slika 13). Slijedi 1-propanol čija se koncentracija značajno ne mijenja pa početna koncentracija iznosi 7,89 mg L^{-1} , a krajnja 9,17 mg L^{-1} (Slika 13). Prisustvo 2-butanola i 2-feniletanola nije detektirano u uzorcima piva. Koncentracije svih navedenih alkohola nalaze se unutar koncentracijskog intervala navedenog u literaturi (Tablica 3).



Slika 13: Promjene koncentracije viših alkohola i estera tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g).



Slika 14: Promjene koncentracije estera i acetaldehida tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g).



Slika 14: Promjene koncentracije vicinalnih diketona, dimetil-sulfida i trans-2-nonenala tijekom čuvanja (skladištenja) piva u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da:

1. Pivo čuvano u staklenoj boci ima 3-metil-1-butanol kao najzastupljeniju komponentu u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata u pivu, s udjelom od 45,05% te je 3-metil-1-butanol ujedno najzastupljeniji alkohol u frakciji alkohola, s udjelom od 54,49%. Koncentracija dimetil sulfida porasla je za 85,19% u odnosu na početnu koncentraciju te ima najmanji udio u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata s udjelom od 0,0024%. Etil acetat najzastupljeniji je ester u pivu s udjelom od 87,85% u frakciji estera. Koncentracija acetaldehida u pivu pakiranom u staklenoj boci porasla je za 37,59%, dok je koncentracija trans-2-nonenala porasla za 96,58%. Koncentracija 2,3-butandiona narasla je za 284,06%, dok je konačna koncentracija 2,3-pentandiona porasla za 3,05% u odnosu na početnu koncentraciju (značajan pad koncentracije u odnosu na početnu koncentraciju zabilježen je 93. dan skladištenja).

2. Pivo čuvano u PET ambalaži (Amasorb, 2%,33g) sadrži alkohol 3-metil-1-butanol kao najzastupljeniju komponentu u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata udjelom od 44,92% te je ujedno najzastupljeniji alkohol u frakciji alkohola, s udjelom od 55,44%. Koncentracija dimetil sulfida porasla je za 34,75% u odnosu na koncentraciju izmjerenu 90.-og dana skladištenja te ima najmanji udio u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata s udjelom od 0,0013%. Etil-acetat najzastupljeniji je ester u pivu s udjelom od 86,8% u frakciji estera. Koncentracija acetaldehida u pivu porasla je za 101,4% dok je koncentracija trans-2-nonenala porasla za 608,78%. Koncentracija 2,3-butandiona narasla je za 61,87% dok je konačna koncentracija 2,3-pentandiona porasla za 69,97% u odnosu na koncentraciju izmjerenu 90.-og dana skladištenja.
3. Pivo čuvano u PET ambalaži (Poliprotect 36g) sadrži alkohol 3-metil-1-butanol kao najzastupljeniju komponentu u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata, s udjelom od 45,44% te je ujedno najzastupljeniji alkohol u frakciji alkohola, s udjelom od 55,05%. Koncentracija dimetil sulfida smanjila se za 49,06% u odnosu na početnu koncentraciju. Dimetil sulfid ima najmanji udio u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata s udjelom od 0,0012%. Etil-acetat najzastupljeniji je ester u pivu s udjelom od 88,5% u frakciji estera. Koncentracija acetaldehida u pivu porasla je za 31,54%, dok je koncentracija trans-2-nonenala porasla za 600,91%. Koncentracija 2,3-butandiona porasla je za 130,54%, dok je konačna koncentracija 2,3-pentandiona pala za 52,81% u odnosu na početnu koncentraciju (značajan pad koncentracije 2,3-pentandiona u odnosu na početnu koncentraciju zabilježen je 90.-ti dan skladištenja da bi zatim došlo do porasta do konačne koncentracije).
4. Pivo čuvano u PET ambalaži (Amasorb, 4%, 36g) sadrži alkohol 3-metil-1-butanol kao najzastupljeniju komponentu u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata s udjelom od 37,77% te je ujedno najzastupljeniji alkohol u frakciji alkohola, s udjelom od 47,93%. Koncentracija dimetil sulfida porasla je za 22,65% u odnosu na početnu koncentraciju te ima najmanji udio u ukupnoj koncentraciji analiziranih komponenata s udjelom od 0,0017%. Etil acetat najzastupljeniji je ester u pivu s udjelom od 86,27% u frakciji estera. Koncentracije svih detektiranih estera smanjile su se tijekom perioda od šest mjeseci. Koncentracija acetaldehida u pivu porasla je za 144,33%, dok je

koncentracija trans-2-pentandiona porasla za 502,93%. Koncentracija 2,3-butandiona porasla je za 685,52%, a koncentracija 2,3-pentandiona za 99,52% u odnosu na početnu koncentraciju.

5. Koncentracije hlapivih komponenata piva skladištenog u sve četiri vrste ambalaže zadovoljavaju standard kvalitete pretpostavljene za pivo donjeg vrenja i nakon šest mjeseci boravka u ambalaži.

6. LITERATURA

Bamforth, C. W., Krochta, J. M. (2010) Packaging and the Shelf Life of Beer. U: Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide (Robertson, Gordon L.), Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, str: 215-229.

Barišić, L. (2014). Kromatografija [Powerpoint prezentacija s predavanja Instrumentalne analize održanog u ak. god. 2013/2014 na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu]. Zagreb

Briggs, D. E., Boulton C. A., Brookes P. A., Stevens, R. (2004) Brewing Science and practice, Woodhead Publishing Limited, Abington Cambridge CB1 6AH, str. 662-679.

Evans, D. J., Schmedding, D. J. M., Bruijnje, A., Heideman, T., King , B. M., Groesbeek, N. M. (1999) Flavour Impact of Aged Beers. *J. Inst. Brew.* **105**, 301-307. doi: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00524.x

Gibson, B. R., Storgårds, E., Krogerus, K., Vidgren, V. (2013) Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*. **30**, 255-266. doi: 10.1002/yea.2960

Grba, S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb, str.18-25.

Hashimoto, N., (1972) Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer. The Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd., Miyahara-cho, Takasaki, Gamma Pref., Japan. **78**, 43-51.

Hirst, M. B., Richter, C. L. (2016) Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *Am. J. Enol. Viticult.* **67**, 361-370. doi: 0.5344/ajev.2016.15098

Hughes, P. S., Baxter, E. D. (2001) Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 4-84.

Ivušić, F., Soldo Gjeldum, M., Nemet , Z., Gracin, L., Marić, V. (2006) Aluminium and Aroma Compound Concentration in Beer During Storage at Different Temperatures. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 499–505.

Krogerus, K., Gibson, B. R. (2013) 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *J. Inst. Brew.* **119**, 86–97. doi: 10.1002/jib.84

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000) Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97-129.

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

Marotta L., Tipler, A., (2011) Monitoring Volatile Organic Compounds in Beer Using the Clarus SQ 8 GC/MS and Turbomatrix Headspace Trap System [Application note], PerkinElmer, Inc, Shelton, CT 06484 USA.

Nykänen, L., Soumalainen, H. (1983) Aroma of Beer Wine and Distilled Alcoholic Beverages [online] Akademie-Verlag,
<https://books.google.hr/books?id=allg4XxlOM4C&pg=PR3&hl=hr&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false>. Pristupljeno 23. Srpnja 2017.

Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P. Pillay, B. (2017) Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J. Inst. Brew.* **123**, 13–23. doi: 10.1002/jib.389

Olaniran, A. O., Maharaj, Y. R., Pillay, B. (2011) Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. *Electron. J. Biotechn.* **4**, 1-10. doi: 10.2225/vol14-issue2-fulltext-5

Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., Vicente, A. A. (2014) Yeast: the soul of beer`s aroma- a review of flavour- active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1937-1949.

R. S. Cruz, G. P. Camilloto, A. C. dos Santos Pires (2012) Oxygen scavengers: An approach on food preservation. U: Structure and Function of Food Engineering (Amer Eissa, A. ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str: 21-42. <https://doi.org/10.5772/48453>

Ramos, M., Valdés, A., Mellinas, A. C., Garrigós, M. C. (2015) New Trends in Beverage Packaging Systems: A Review. *Beverages* **1**, 248-272. doi: 10.3390/beverages1040248

Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M. (2010) Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* **3**, 165-177. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x

Sithersingh M. J., Snow N. H., (2012) Headspace-Gas Chromatography. U: Gas Chromatography (Poole C. F. ured.), Elsevier, Oxford, str. 221-233.

Sohrabvandi S., Mortazavian A. M. (2011) Advanced Analytical Methods For The Analysis of Chemical And Microbiological Properties of Beer. *J. Food Drug Anal.* **19**, 1-21.

SRI Instruments Europe GmbH (2018) < <https://www.sri-instruments-europe.com/en/products/index.php> > .Pristupljeno : 23.lipnja 2018.

Stewart, G. G., Russel, J., Garrison, I. F. (1975) Some considerations of the flocculation characteristics of ale and lager strains. *J. Inst .Brew.* **81**, 248-257. doi: 10.1002/j.2050-0416.1975.tb03686.x

Tian, J. (2010) Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. *Food Chem.* **123**, 1318–1321.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2006) The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* **95**, 357-381. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.006

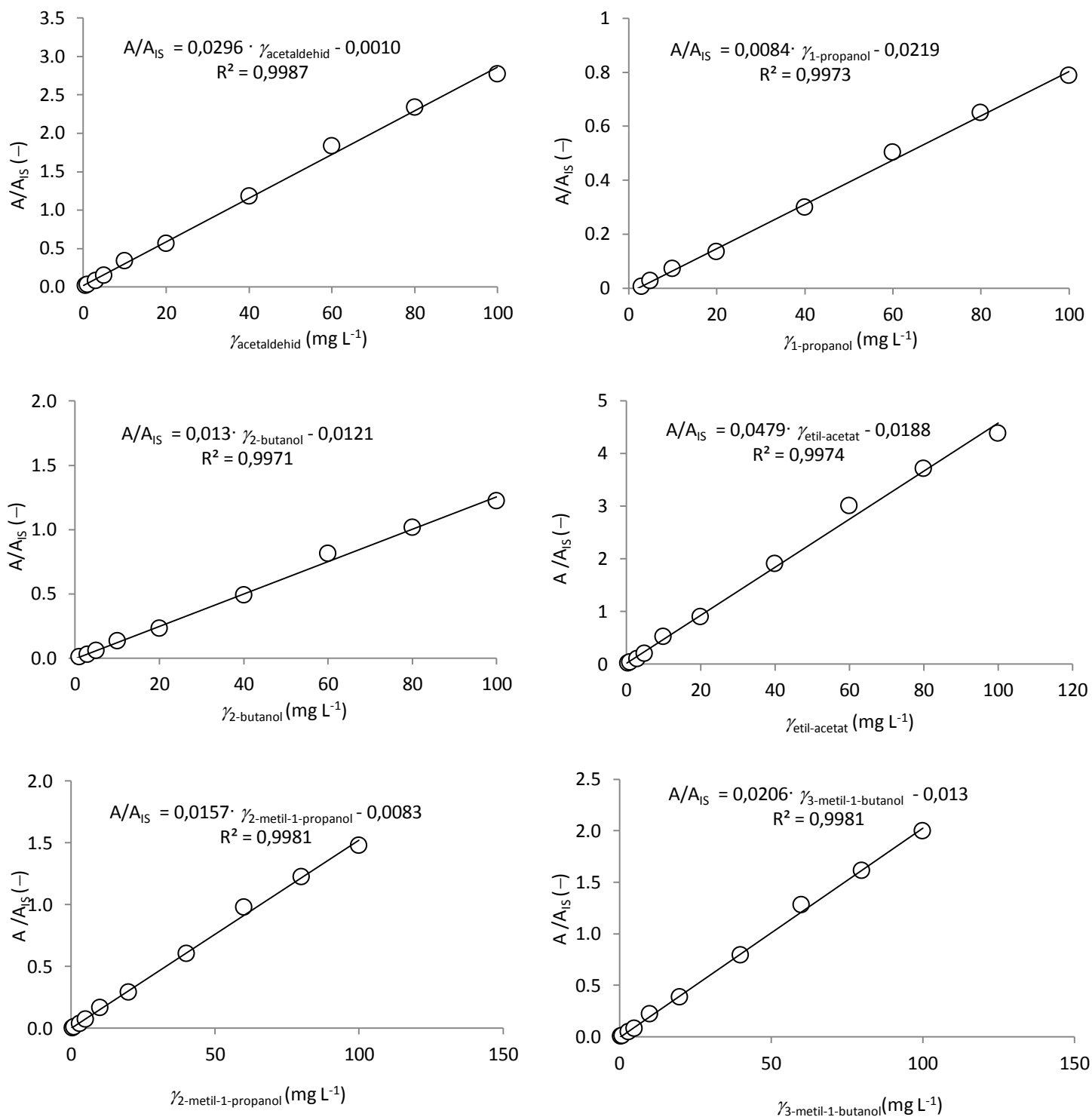
Vanderhagen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2003) Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6782-6790. doi: 10.1021/jf034631z

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelin, J. M., Pretorius, I. S., Delvaux, F. R. (2003) Flavour-Active Esters: Adding Fruitines to Beer. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 110-118.

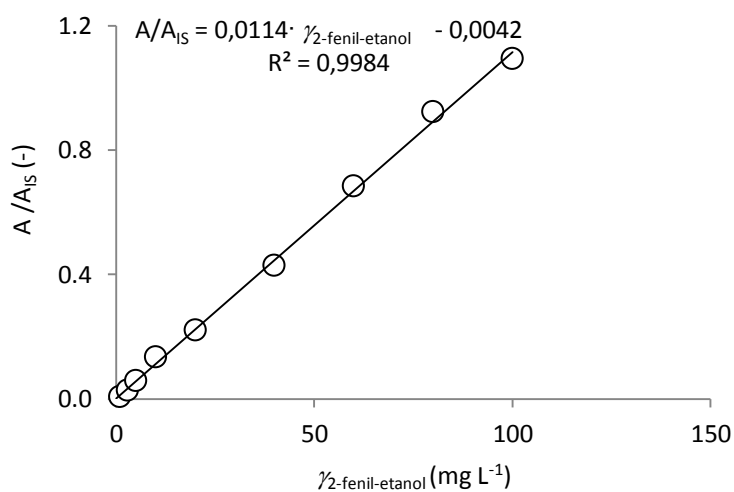
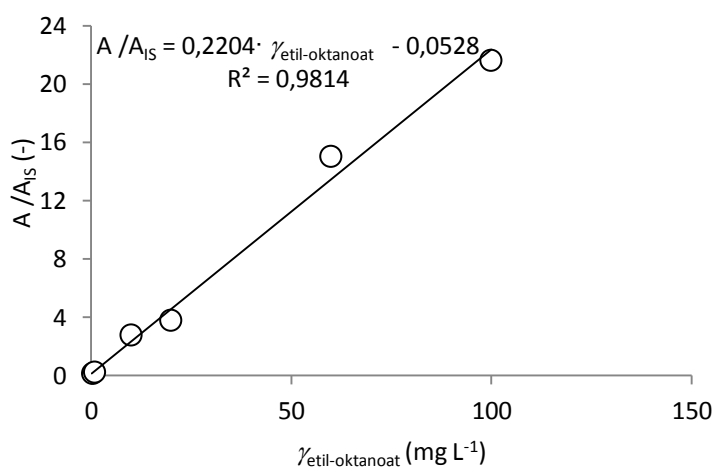
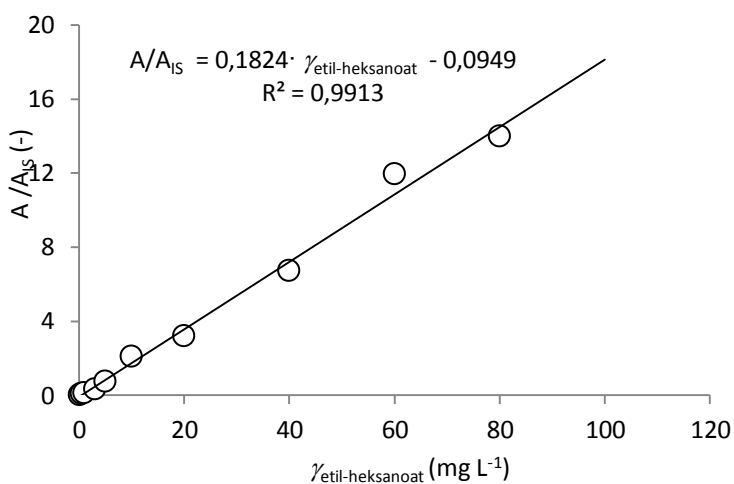
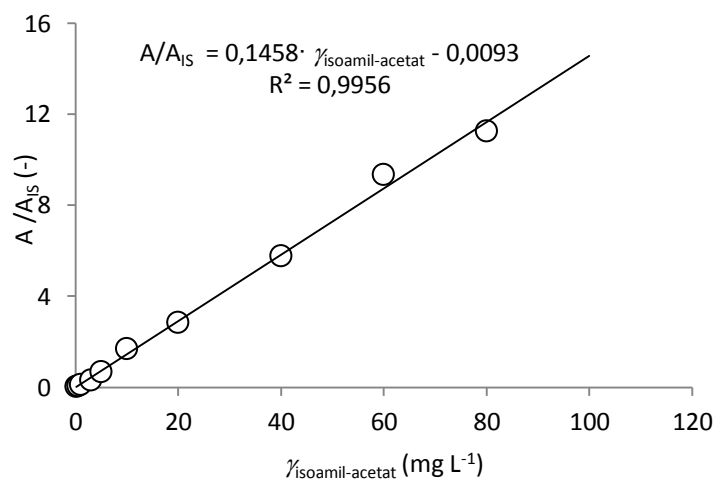
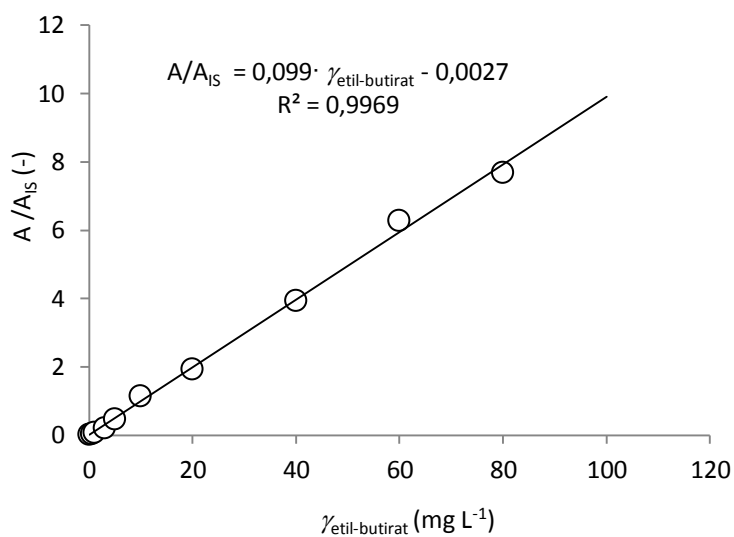
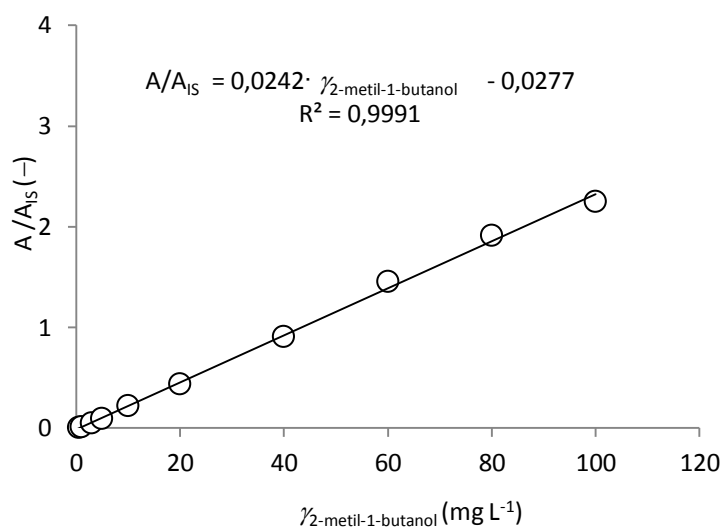
Wendland, J. (2014) Lager Yeast Comes of Age. *Eukaryo. Cell.* **13**, 256-1265. doi: 10.1128/EC.00134-14

7. PRILOZI

7.1 BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HLAPIVIH KOMPONENATA PLINSKOM „HEAD SPACE“ KROMATOGRAFIJOM



Slika 14.a Baždarni pravci za određivanje hlapivih komponenti piva HS-GC-FID metodom



Slika 14.b Baždarni pravci za određivanje hlapivih komponenti piva HS-GC-FID metodom

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Čar

Ime i prezime studenta