

Utjecaj mikotoksina na senzorski profil craft piva korištenjem kvantitativne deskriptivne analize

Dodlek Šarkanj, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:244345>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Prazna stranica



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Dodlek Šarkanj

**UTJECAJ MIKOTOKSINA NA SENZORSKI
PROFIL CRAFT PIVA KORIŠTENJEM
KVANTITATIVNE DESKRIPTIVNE ANALIZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ivana Dodlek Šarkanj

**THE INFLUENCE OF MYCOTOXINS ON
THE SENSORY PROFILE OF CRAFT BEER
USING QUANTITATIVE DESCRIPTIVE
ANALYSIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Dodlek Šarkanj

**UTJECAJ MIKOTOKSINA NA SENZORSKI
PROFIL CRAFT PIVA KORIŠTENJEM
KVANTITATIVNE DESKRIPTIVNE ANALIZE**

DOKTORSKI RAD

Mentor(i):

Prof.dr.sc. Nada Vahčić
Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ivana Dodlek Šarkanj

**THE INFLUENCE OF MYCOTOXINS ON
THE SENSORY PROFILE OF CRAFT BEER
USING QUANTITATIVE DESCRIPTIVE
ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor(s):

Nada Vahčić, PhD, Full Professor
Ksenija Markov, PhD, Full Professor

Zagreb, 2024.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Sveučilištu Sjever, Odjelu za prehrambenu tehnologiju, Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, Zavodu za biokemijsko inženjerstvo u laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada i u laboratorijima Instituta bioanalitike i agrometabolomike, Odjela za Agrobiotehnologiju (IFA Tulln), Sveučilišta prirodnih resursa i životnih znanosti (BOKU), Beč, Austrija, pod mentorstvom prof.dr.sc. Nade Vahčić i prof.dr.sc. Ksenije Markov.

Informacije o mentorima

Nada Vahčić

Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

Telefon: + 385 1 4605 277

Email: nvahcic@pbf.hr

Lokacija: Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji, 4. kat

Vahčić Nada rođena je 1959. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu 1985. godine te ostala raditi kao pripravnik postdiplomi. Magistrirala je 1988. godine, a doktorirala 1996. godine. Slijede izbori u docenta, izvanrednog profesora, redovitog profesora, a od 2009. godine je redoviti profesor u trajnom izboru.

Nositelj je predmeta "Kontrola kvalitete u prehrambenoj industriji" koji je uvođenjem bolonjskog procesa promijenio naziv u „Analitika hrane“ i „Analitika prehrambenih proizvoda“ zatim predmeta "Senzorske analize hrane", „Suvremene metode u kontroli kvalitete hrane“ i „Suvremene metode u analitici hrane“. Počevši od 2000. godine bila je Pročelnik je Laboratorija za kontrolu kvalitete prehrambenih proizvoda, a periodički i predstojnica Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda. Tijekom proteklog perioda rada bila je član nekoliko Odbora na fakultetu od kojih najčešće u Odboru za znanost i Odboru za poslijediplomske studije.

Izvan matične ustanove član je brojnih drugih stručnih i znanstvenih društava. Također je i područni recenzent u časopisu Food Technology i Biotechnology. Periodički sudjeluje u radu brojnih komisija za senzorsko ocjenjivanje meda, mliječnih proizvoda, pršuta i suhomesnatih proizvoda te voća. Nastavna djelatnost vezana joj je za kontrolu kvalitete hrane i senzorske analize te osiguranje kvalitete i sustave upravljanja kvalitetom. Nositelj je 2 predmeta na prijediplomskom i 2 predmeta na diplomskom studiju na PBF-u te suradnik na još nekoliko predmeta, a sve iz područja kvalitete hrane. Na poslijediplomskom studiju na matičnom fakultetu nositelj je 4 predmeta. Bila je voditelj specijalističkog studija "Analitika i mikrobiologija namirnica", a danas poslijediplomskog specijalističkog studija „Kvaliteta i sigurnost hrane“ na PBF-u.

Dosada je kao istraživač ili voditelj aktivno bila uključena u rad 18 znanstvenoistraživačka projekta, a trenutno je istraživač na jednom znanstvenom projektu HAZU-a. U proteklom periodu rada pod njenim vodstvom realizirano je i nekoliko stručnih projekata uglavnom vezanih za područje senzorske procjene hrane od kojih se neki provode periodički na godišnjoj razini i danas. Do ožujka 2024. godine objavila je 88 znanstvenih radova (prema WoS-u; h-indeks 24; br. citata 1571), 45 znanstvenih radova iz kategorije a2, 23 rada iz kategorije a3 te brojne stručne radove. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim skupovima (domaći/inozemni) kao autor, koautor ili pozvani predavač s posterima, usmenim priopćenjima ili plenarnim predavanjima. Također je bila voditelj stotinjak diplomskih i/ili završnih radova, više od 30 znanstvenih magistarskih i/ili specijalističkih radova te 10 doktorskih radova. Sudjelovala je kao organizator i izvođač 71 izobrazbe za senzorskog

analitičara namijenjene prehrambenoj industriji kroz koje je prošlo oko 950 polaznika iz 39 domaćih prehrambenih industrija. Usavršavala se u zemlji i inozemstvu kroz brojne seminare i studijske boravke vezano uz područje kvalitete hrane, sigurnosti hrane te senzorske procjene hrane.

Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Telefon: + 385 1 4605 284

Telefaks: + 385 1 4836 424

Email: kmarkov2@pbf.hr

Lokacija: Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, 4. kat

Prof.dr.sc. Ksenija Markov, rođena je u Zagrebu, gdje je 1982. godine upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1987. godine i iste godine zaposlila se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, PBF-a kao pripravnik-postdiplomi, gdje radi i danas. Akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, stekla je 1991., a akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, 2005. godine. Zvanje izvanredne profesorice stječe 2012. godine, redovite profesorice 2017., a redovite profesorice u trajnom izboru 2022. godine.

Od 2013. godine do danas je pročelnica Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica PBF-a, a u razdoblju 2019.-2021. obnašala je dužnost predstojnice Zavoda za biokemijsko inženjerstvo PBF-a. Kao nastavnik sudjeluje u izvođenju nastave na prijediplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima. Od 2019. godine voditeljica je poslijediplomskog specijalističkog studija „Upravljanje hranom“ na PBF-u. Znanstveno se usavršavala iz područja mikrobiologije i mikotoksikologije, a završila je i programe usavršavanja visokoškolske nastave. Koautorica je pet sveučilišna udžbenika, jedne znanstvene knjige, pet poglavlja u znanstvenim knjigama te tri stručne knjige. Pod njenim mentorstvom izrađeno je oko 60-tak diplomskih i završnih radova te obranjena četiri doktorska rada i 9 specijalističkih radova.

Prof. dr. sc. Ksenija Markov je od 2007. godine članica brojnih odbora i povjerenstava na PBF-u, članica je Povjerenstva u Ministarstvu zdravlja (2014.-2023.) i Ministarstvu poljoprivrede (2019.-2023.), Stručne radne skupine za Codex alimentarius (2018.-), Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja VBT područja (2019.-2021.), članica Stručnog tijela za biološke opasnosti u hrani i hrani za životinje, HAPIH (2023. -). Sudjelovala je kao suradnica ili kao voditeljica u provedbi 19 domaćih i stranih znanstvenih projekata te kao konzultantica na jednom znanstvenom projektu. Rezultati znanstvenih istraživanja zaštićeni su u 3 nacionalna patenta, a objavila je preko stotinjak znanstvenih radova. Članica je Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu, Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista i Hrvatskog mikrobiološkog društva.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 6. izvanredovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2022./2023. održanoj dana 17. svibnja 2023. godine u Zagrebu, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je Odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 19. prosinca 2023. godine na 3. redovitoj sjednici u 355. akademskoj godini (ak. god. 2023./2024.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ MIKOTOKSINA NA SENZORSKI PROFIL CRAFT PIVA KORIŠTENJEM KVANTITATIVNE DESKRIPTIVNE ANALIZE

Ivana Dodlek Šarkanj, dipl.ing.preh.teh i proc.ing

Rad je izrađen u laboratoriju Sveučilištu Sjever, Koprivnica Odjelu za prehrambenu tehnologiju, Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, Zavodu za biokemijsko inženjerstvo u laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada i u laboratorijima Instituta bioanalitike i agrometabolomike, Odjela za Agrobiotehnologiju (IFA Tulln), Sveučilišta prirodnih resursa i životnih znanosti (BOKU), Beč, Austrija.

Mentori: prof. dr.sc. Nada Vahčić i prof.dr.sc. Ksenija Markov

Sažetak:

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni te jedni od najraširenijih prirodnih kontaminanata sirovina za proizvodnju piva. Termostabilni su spojevi koji iz sirovina mogu završiti u konačnom proizvodu i mogu utjecati na senzorski profil piva. Stoga su ciljevi ove disertacije bili utvrditi pojavnost plijesni u sirovinama za proizvodnju piva te validiranom multitoksinskom metodom odrediti koncentraciju mikotoksina u sirovinama naročito hmelju, kao i njihov transfer u konačne proizvode. Primjenom kvantitativne deskriptivne analize (QDA) od strane stručnog panela utvrditi senzorski profil intenziteta pojedinih deskriptora piva te njihov utjecaj staviti u korelaciju sa udjelom pojedinih mikotoksina. Na temelju dobivenih podataka o udjelu mikotoksina u craft pivu moći će se napraviti procjena rizika na zdravlje potrošača kao i postavljanje zakonske legislative za mikotoksine u pivu. Mikološkom analizom utvrđena je pojavnost plijesni u sirovinama, a multitoksinskom metodom koncentracija mikotoksina, naročito u hmelju. QDA metodom utvrđen je senzorski profil piva i korelacija s udjelom mikotoksina. Rezultati pokazuju širok spektar mikotoksina u sirovinama i njihov mogući transfer u pivo. Negativne i pozitivne korelacije zabilježene su između mikotoksina i senzorskih ocjena. Prvi puta je potvrđena pojavnost mikotoksina u hmelju, a važan su faktor za procjenu rizika za potrošače. Slad je identificiran kao glavni izvor kontaminacije.

Broj stranica:

Broj slika:

Broj tablica:

Broj literaturnih navoda:

Broj priloga:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: craft pivo, hmelj, slad, mikotoksini, fizikalno-kemijska svojstva piva, kvantitativna deskriptivna analiza

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. izv.prof.dr. sc. Kristina Mastanjević
3. izv.prof. dr. sc. Mario Novak

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK:

Scientific Area: Biotechnical sciences

Scientific Field: Food Technology

THE INFLUENCE OF MYCOTOXINS ON THE SENSORY PROFILE OF CRAFT BEER USING QUANTITATIVE DESCRIPTIVE ANALYSIS

Ivana Dodlek Šarkanj, MSc

Thesis performed in the laboratory of Northern University, Department of Food Technology, Faculty of Food and Biotechnology in Zagreb, Department of Biochemical Engineering in the Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Technology of Beer and Malt, and in the Institute of Bioanalytics and Agro-Metabolomics, Department of Agrobiotechnology (IFA Tulln) University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria.

Supervisors: PhD Nada Vahčić, Full Professor i PhD Ksenija Markov, Full Professor

Abstract: Mycotoxins are secondary metabolites of mold and one of the most widespread natural contaminants of raw materials for beer production. They are thermostable compounds that can end up in the final product from raw materials and can affect the sensory profile of beer. Therefore, the goals of this dissertation were to determine the occurrence of mold in raw materials for beer production and to determine the concentration of mycotoxins in raw materials, especially hops, as well as their transfer to final products, using a validated multitoxin method. Using quantitative descriptive analysis (QDA) by an expert panel, determine the sensory profile of the intensity of individual beer descriptors and correlate their influence with the proportion of individual mycotoxins. Based on the obtained data on the share of mycotoxins in craft beer, it will be possible to assess the risk to the health of consumers, as well as to establish legal limits for mycotoxins in beer. Mycological analysis determined the presence of mold in raw materials, and the multitoxin method determined the concentration of mycotoxins, especially in hops. The QDA method established the sensory profile of beer and its correlation with mycotoxin content. Results show a wide spectrum of mycotoxins in raw materials and their transfer into beer. Both negative and positive correlations were found between mycotoxin concentration and sensory scores. The presence of mycotoxins in hops was confirmed for the first time, as important factor for consumer risk assessment. Malt was identified as the main source of contamination.

Number of pages:

Number of figures:

Number of tables:

Number of references:

Number of supplements:

Original in: Croatian

Key words: craft beer, hops, malt, mycotoxins, physical-chemical properties of beer, quantitative sensory analysis

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Božidar Šantek, PhD, Full Professor
2. Kristina Mastanjević, PhD, Associate Professor
3. Mario Novak, PhD, Associate Professor

Thesis deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

SAŽETAK

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni te jedni od najraširenijih prirodnih kontaminanata sirovina za proizvodnju piva. Ovi termostabilni spojevi mogu iz sirovina završiti u konačnom proizvodu i utjecati na senzorski profil piva, što može predstavljati značajan problem za pivarsku industriju. Pivarska industrija koristi razne sirovine, uključujući ječam, hmelj, kvasac i vodu od kojih svaki može biti kontaminiran mikotoksinima. Budući da je pivo često konzumirani napitak diljem svijeta, razumijevanje prisutnosti mikotoksina u pivarskim sirovinama i njihov transfer u pivo ključan je faktor zbog procjene rizika sigurnosti zdravlju potrošača.

Stoga je cilj ove disertacije bio multitoksinom metodom dokazati prisutnost mikotoksina u sirovinama i njihov transfer u craft pivo te staviti u korelaciju pojavnost mikotoksina i njihovih metabolita u craft pivu sa senzorskim profilom piva.

Prema tome validiranom multitoksinom metodom određena je po prvi puta koncentracija mikotoksina i u hmelju jer dosad nema nikakvih podataka o tome. Osim hmelja, istraženi su i drugi sastojci poput slada i kvasca. Osim utvrđivanja transfera mikotoksina iz sirovina u konačne proizvode utvrđeni su i osnovni fizikalno - kemijski parametri.

Primjenom kvantitativne deskriptivne analize (QDA) od strane stručnog panela utvrđen senzorski profil intenziteta pojedinih deskriptora piva te je njihov utjecaj stavljen u korelaciju s udjelom pojedinih mikotoksina.

Ovo istraživanje pruža sveobuhvatni pregled prisutnosti mikotoksina u pivarskim sirovinama i njihov utjecaj na senzorski profil piva. Rezultati ukazuju na potrebu za nadzorom i regulacijom mikotoksina kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta piva. Također, rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao osnova za buduća istraživanja i razvoj zakonskih okvira za kontrolu mikotoksina u pivarskoj industriji.

Ključne riječi: *craft pivo, hmelj, slad, mikotoksini, fizikalno-kemijska svojstva piva, kvantitativna deskriptivna analiza*

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of molds and one of the most widespread natural contaminants of raw materials for beer production. These thermostable compounds can end up in the final product from the raw materials and affect the sensory profile of the beer, which can be a significant problem for the brewing industry. The brewing industry uses a variety of raw materials, including barley, hops, yeast, and water, all of which can be contaminated with mycotoxins. Since beer is a widely consumed beverage around the world, understanding the occurrence of mycotoxins in raw materials for the brewing industry and their transfer to beer is a key factor for the risk assessment of the safety for consumer health.

Therefore, the goal of this dissertation was to prove the presence of mycotoxins in raw materials and their transfer to craft beer using the multitoxin method, and to correlate the occurrence of mycotoxins and their metabolites in craft beer with the sensory profile of the beer.

Accordingly, the concentration of mycotoxins in hops was determined for the first time using the validated multitoxin method, as there is no data on this so far. In addition to hops, other ingredients such as malt and yeast were also investigated. In addition to determining the transfer of mycotoxins from raw materials to final products, the basic physicochemical parameters were also determined.

The application of quantitative descriptive analysis (QDA) by an expert panel determined the sensory profile of the intensity of individual beer descriptors and their influence was correlated with the proportion of individual mycotoxins.

This research provides a comprehensive overview of the presence of mycotoxins in brewing raw materials and their impact on the sensory profile of beer. The results indicate the need for monitoring and regulation of mycotoxins in order to ensure the safety and quality of beer. Also, the results of this research can serve as a basis for future research and the development of legal frameworks for the control of mycotoxins in the brewing industry.

Key words: *craft beer, hops, malt, mycotoxins, physical-chemical properties of beer, quantitative descriptive analysis*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Sirovine za proizvodnju piva	4
2.2. Podjela piva	9
2.2.1. <i>Industrijsko i craft pivo</i>	11
2.3. <i>Mikotoksini</i>	14
2.3.1. <i>Mikotoksini u pivu</i>	18
2.3.2. <i>„Maskirani“ mikotoksini</i>	21
2.3.3. <i>Metode detekcije mikotoksina</i>	22
2.3.3.1. <i>Masena spektometrija</i>	24
2.4. <i>Senzorska analiza</i>	26
2.4.1. <i>Metode u senzorskoj analizi</i>	27
2.4.2. <i>Senzorska procjena piva</i>	33
2.4.3. <i>Kotač okusa piva</i>	36
3. MATERIJALI I METODE	38
3.1. MATERIJALI.....	39
3.1.1. <i>Sirovine (hmelj, slad, kvasac, voda) i craft piva</i>	39
3.1.2. <i>Hranjive podloge</i>	41
3.1.3. <i>Kemikalije</i>	41
3.1.4. <i>Laboratorijski probor</i>	41
3.1.5. <i>Uređaji i ostala oprema</i>	42
3.1.6. <i>Trenirani panelisti iz Carlsberg Croatia pivovare, Koprivnica</i>	43

3.2. METODE.....	43
3.2.1. Uzorkovanje sirovina i uzoraka craft piva.....	43
3.2.2. Mikološka analiza hmelja i slada.....	43
3.2.3. Fizikalno- kemijske analize uzoraka craft piva.....	44
3.2.3.1. Određivanje pH.....	44
3.2.3.2. Određivanje ukupnog ekstrakta.....	44
3.2.3.3. Određivanje boje craft piva.....	44
3.2.3.4. Određivanje šećera, masnih kiselina i etanola u uzorcima craft piva tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC).....	45
3.2.4. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu, craft pivu, kvascu i vodi.....	46
3.2.5. Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA)....	46
3.2.6. Statistička analiza.....	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. Uzorkovanje sirovina i uzoraka craft piva.....	50
4.2. Mikološka analiza hmelja i slada.....	51
4.3. Fizikalno - kemijske analize uzoraka craft piva.....	52
4.4. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu, craft pivu, kvascu i vodi UHPLC/MS/MS uređajem.....	58
4.5. Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA)	69
4.6. Statistička analiza dobivenih rezultata podataka.....	75
5. RASPRAVA.....	87
5.1. Mikološka analiza hmelja i slada.....	88
5.2. Fizikalno- kemijska analiza piva.....	89
5.3. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu i kvascu.....	92

5.4.	Određivanje mikotoksina u craft pivu	103
5.6.	Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA).....	110
5.7.	Rezultati statističke analize	112
6.	ZAKLJUČCI.....	116
7.	LITERATURA.....	120

1. UVOD

Pivo je stoljećima dio naše kulture još od antičkog vremena pa do danas, ujedno i jedno od najkonzumiranijih i najpopularnijih alkoholnih pića na svijetu (Fangel *i sur.*, 2018). Posljednjih godina u Hrvatskoj primijećen je znatan porast potrošnje craft piva. Potrošači su sve više zainteresirani za nove tipove piva zbog različitih senzorskih karakteristika u odnosu na industrijske proizvode (Aquilani *i sur.*, 2015). Tijekom uzgoja, slađenja i/ili skladištenja slađene ili neslađne sirovine koje se koriste u proizvodnji piva mogu biti kontaminirane plijesnima iz rodova, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Alternaria*. Upravo su kvaliteta i senzorska svojstva piva ključni čimbenici za zadovoljstvo potrošača stoga je važno jamčiti kvalitetu piva i dosljednost između serija. Međutim, kontaminacija piva mikotoksina, koji su nusproizvodi plijesni, značajno mogu utjecati na njegovu senzorsku percepciju i konačnu kvalitetu (Anderson *i sur.*, 2019).

Regulatorna ograničenja uvedena su samo za žitarice ili specifične prerađevine, ne razmatrajući njihovu upotrebu za proizvodnju piva, te trenutno na razini Europske unije ne postoji legislativa o maksimalno dopuštenim koncentracijama mikotoksina u pivu (Kovač *i sur.*, 2018). Ujedno prisutnost mikotoksina u hmelju, a koji je jedan od ključnih sastojaka koji utječe na aromu piva nije dovoljno istražena (Pascari *i sur.*, 2022). U pivu je pronađeno više od 1000 spojeva; alkohola, estera, ketona, aldehida, organskih kiselina, sumpornih spojeva, fenola itd. Glavni alat za procjenu kvalitete i prihvatljivosti piva među potrošačima je provođenje senzorske analize piva od strane educiranih stručnjaka (Parker, 2012). Od senzorskih metoda najčešće se provode deskriptivni testovi i hedonističke ljestvice za procjenu kvalitete, odnosno prihvatljivosti proizvoda (Gonzalez Viejo *i sur.*, 2019).

Deskriptivni senzorski testovi zahtjevni su jer uključuju opis kvalitativnih i kvantitativnih senzorskih svojstava proizvoda od strane educiranih panelista. Educirani panelisti imaju bitnu ulogu u homogenizaciji „osjetilne“ komunikacije i opisivanja proizvoda kroz razvoj osjetilnog leksikona (da Costa Jardim *i sur.*, 2018).

Prema svemu navedenom doktorski rad je multitioksinom metodom dokazao prisutnost mikotoksina u sirovinama i njihov transfer u craft pivo. Na različitim uzorcima craft piva iz Republike Hrvatske utvrđen je senzorski profil QDA (kvantitativna deskriptivna analiza), kako bi se moglo staviti u korelaciju pojavnost mikotoksina i njihovih metabolita u craft pivu sa senzorskim profilom piva. Te ujedno i istražiti udio pojavnosti mikotoksina u craft pivu nužnih za izradu procjene rizika za potrošače.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sirovine za proizvodnju piva

Slad se dobiva iz zrna ječma (*Hordeum vulgare*). Za proizvodnju pivarskog slada najčešće se koriste ozime i ozimo-jare sorte dvorednog ječma zbog dobrog prinosa i kvalitete zrna. Postoji nekoliko načina postupka proizvodnje slada, a na slici 1 prikazana je shema tipičnog postupaka sladovanja (Stewart, 2016).



Slika 1. Tipičan proces proizvodnje slada (Stewart, 2016)

Za proizvodnju piva postupak slađenja zrna ječma sastoji se od tri koraka; namakanja, klijanja i sušenja. Močenjem dolazi do stvaranja korjenja te se u ječmu aktiviraju određene količine proteolitičkih i amilolitičkih enzima. Enzimi su važni za hidrolizu ugljikohidrata stanične stijenke endosperma i proteinskog matriksa (Šarić, 2020). Enzimatskom razgradnjom škroba oslobađaju se aminokiseline, šećeri, lipidi, i ostali spojevi okusa u pivu (Habschied *i sur.*, 2020). Prema dužini korjenčića određuje se kraj procesa klijanja. Proklijalo zrno naziva se još i “zeleni slad” (Šarić, 2020).

Najvažnija kritična kontrolna točka u proizvodnji je faza sušenja jer omogućuje proizvodnju različitih vrsta slada ovisno o vremenu potrebnom za sušenje, postignutoj konačnoj temperaturi, vlažnosti, protoku zraka i pH (Howe, 2020). Svrha sušenja je da se smanji sadržaj vlage u sladu ispod 5%, da se na taj način osigura stabilnost sirovine za skladištenje, transport i da se spriječi denaturacija enzima (Oser, 2015). Sušenjem se potiče stvaranje melanoidina putem neenzimske Maillardove reakcije između aminokiselina i šećera

(Howe, 2020). Postupnim podizanjem temperature sa 50 do 85 °C oko 21 sat razvija se intenzivnija boja slada (Poutanen, 2020; Rani i Bhardwaj, 2021). Može se postići veliki raspon boja slada od 3 jedinice Europske konvencije o pivarstvu (EBC) za lager slad i do 1000 EBC jedinica za čokoladni slad. U tablici 1, nalaze se neke vrste slada zajedno s ključnim opisima okusa i raspona boja (Parker, 2012).

Tablica 1. Tipične vrste slada s opisima okusa i rasponom boja (Parker, 2012)

<i>Slad</i>	<i>Okus</i>	<i>Boja SRM</i>
<i>Zeleni slad</i>	zeleni, travanti, zeleni grašak	
<i>Lager</i>	zeleno, sladno, orašasto, slatko	2 do 4
<i>Ale</i>	sladno, orašasto, slatko, prepečeno	4 do 7
<i>Karamelizirani</i>		
<i>Karamalt</i>	slatko, karamala	10 do 30
<i>Kristal</i>	slatko, karamela, pirjano voće, toffee, crna melasa, spaljena	75 do 750
<i>Pečeno (suho)</i>		
<i>Amber</i>	biskvitno, pečeno, sladno, gorko	40 do 60
<i>Čokoladni slad</i>	tamna čokolada, spaljena, oštra	800 do 1200
<i>Crni slad</i>	zagorjela crna kava, oštra, pomalo trpka	1200 do 400
<i>Pečeni ječam</i>	zagorjela, oštra, suha, crna kava	1200 do 1500

Slad se može podijeliti na lager i ale sladove. Bijeli ili enzimski slad daje pivo zlatne boje sa slatkim i orašastim okusima. Specijalni slad, proizveden na niskim temperaturama sušenja ima slatku, aromu karamele te narančasto-smeđu boju. Sladovi koji su podvrgnuti intenzivnijim temperaturama pečenja vrlo su tame boje te imaju zagoreni, dimljeni okus, na čokoladu i crni slad (Parker, 2012). Maillardovom reakcijom dolazi do ugradnje dušika što omogućuje stvaranja spojeva ključnih nota okusa tamnih piva poput pirola (slatki, orašasti), piridina (riba, kokice) i pirazina (prženi orasi, maslac od kikirikija, karamela, kava). Ugradnja sumpora (metionin, cistein) stvara produkte poput tiofena i tiazola (orašasti, zeleni, klice graha). Tijekom proizvodnje specijalnog slada, zrno se kuha na temperaturama iznad 129 °C što dovodi do karamelizacije odnosno stvaranja spojeva poput furana, furanona i piranona koji imaju slatkasti, voćni i karamelni okus. Procesom pirolize iznad 250 °C dolazi do stvaranja vrlo zagorjelih, pepeljastih i oporih okusa koji su povezani s tamnim prženim slalom poput čokolade (Parker, 2017). Također se mogu proizvesti fenoli, koji imaju okus na

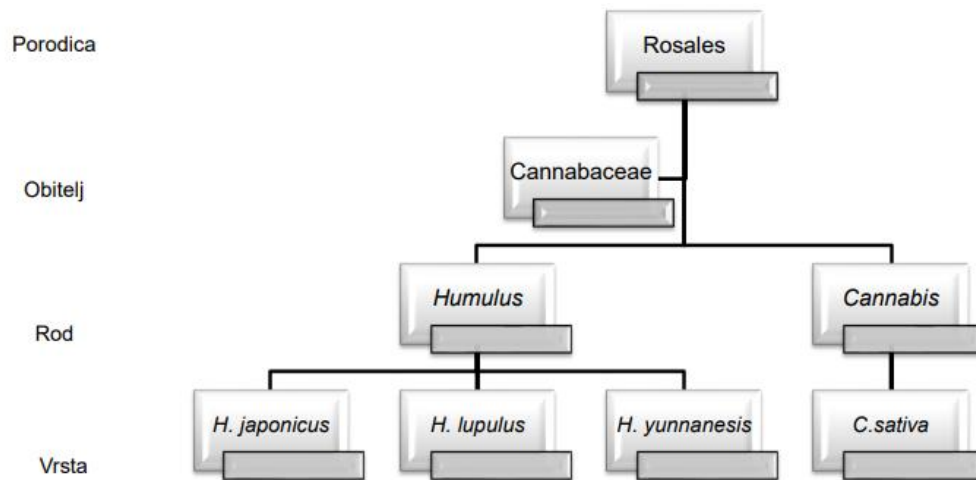
ljekove i dim. Tamni slad ima višu koncentraciju aldehida koji su nastali Streckerovom razgradnjom aminokiselina tijekom sušenja i povezani su s ustajalim okusima piva (Parker, 2012).

U pivarskoj industriji tijekom procesa proizvodnje piva koristi se velika količina vode. Voda služi za čišćenja, hlađenja i stvaranje pare za grijanje ali isto tako velika količina vode se koristi za proces kuhanja piva. Industrije recikliraju otpadne vode, kako bi se smanjili ekonomski troškovi proizvodnje (Bamforth, 2003). Njenoj kvaliteti doprinose čimbenici poput pH, sadržaj iona i mikroba, kao i potencijalna prisutnost nusproizvoda dezinfekcije. Određena piva za svoj karakterističan okus ovise o vodi iz određenih regija. Primjerice Guinness® se izvorno kuha s tvrdom vodom iz Dublina, Irska i Pilsner Urquell potječu iz regije mekih voda u Plsenu, Češka (Parker, 2012).

Tvrde vode koje imaju visoku razinu kalcija i magnezijevih sulfata, dobra su za proizvodnju bitter pale-ale piva. Nepoželjan miris i okus piva može prouzrokovati klor pa se mora ukloniti filtracijom preko aktivnog ugljena. Kalcij ima utjecaj na pH sladovine, utječe na taloženje i nakupljanje pivskog kamenca. Prije proizvodnje piva određuje se omjer klorida i sulfata jer utječu na okus piva, sulfati pojačavaju suhoću piva, a kloridi pridonose volumenu i punoći okusa (Parker, 2012).

Većinom pivovare za proizvodnju piva koriste vodovodnu, mikrobiološki ispravnu vodu jedino moraju prilagoditi ionski sastav vode. U većini slučajeva dodaje se kiselina u malim količinama ili pak se provodi ionska izmjena demineralizacija i reverzna osmoza vode. Ako pak se za proizvodnju piva koristi voda iz rijeke, jezera, bunara ili podzemnog izvora takva voda se mora mikrobiološki testirati i po potrebi obraditi klorom, klor-dioksidom, ozonom, UV zrakama, sterilnom filtracijom (Parker, 2012).

Hmelj (*Humulus lupulus L.*) je dvodomna biljka, trajna penjačica iz porodice Cannabaceae, rod *Humulus*, vrsta *Lupulus L.* (slika 2) (Šrédl *i sur.*, 2020). Postoje muške i ženske biljke, dvospolna, višegodišnja biljka podrijetlom iz Azije, Sjeverne Amerike i Europe. Šišarka hmelja koja se koristi u pivarstvu je produktivni ženski cvijet (Almaguer *i sur.*, 2014).



Slika 2 . Klasifikacija biljke hmelja (Almaguer *i sur.*, 2014)

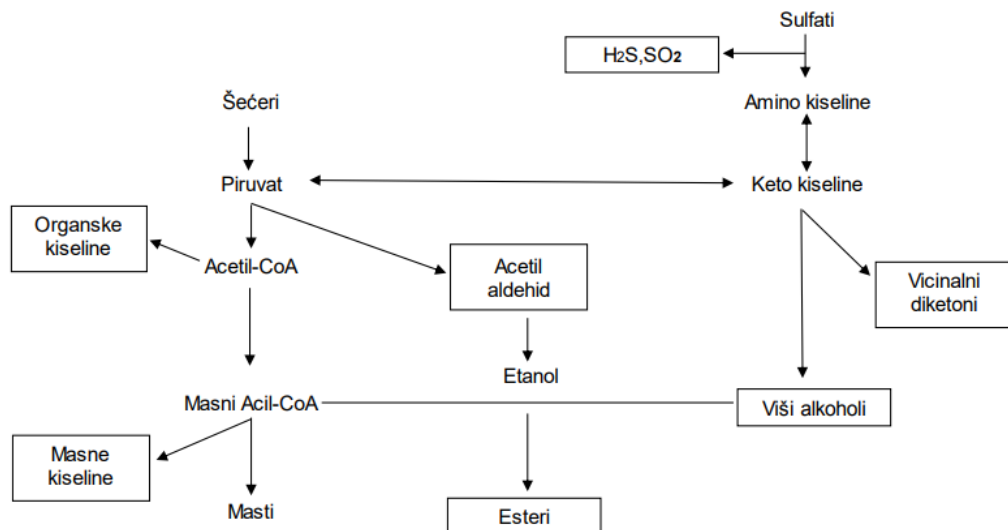
Već 1888. godine utvrđeno je da hmelj doprinosi mikrobnj stabilnosti piva te da ima blaga antifungalna svojstva na odabrane vrste gljiva, pa samim time štiti pivo od infekcija. U pivo se dodaje radi postizanja određene gorčine te za dobivanje karakteristične arome i okusa (npr. voćna, cvjetna i sl.) Spojevi odgovorni za gorak okus su smole i esencijalna ulja. Frakcija smole sastoji se od nekoliko komponenti od kojih su najznačajnije α -kislone ili humuloni. Tijekom vrenja sladovine kiseline se izomeriziraju do gorkih i topljivih spojeva zvanih izo- α -kislone što utječe na promjenu organoleptičkog profila okusa piva (Šrédl *i sur.*, 2020).

Na temelju kemijskog sastava sorte hmelja mogu se podjeliti na: "goraki hmelj" i "aroma hmelj". Uljni ekstrakti hmelja mogu biti pročišćene frakcije arome hmelja, npr. cvjetni, začinski, voćni, biljni ili ekstrakti jedne sorte hmelja, npr. Golding, Saaz i Cascade. Najčešće se u sladovinu dodaju nakon fermentacije jer ti spojevi mogu ishlapiti ventilacijom ili apsorpcijom (Bamforth, 2002). Gorke sorte hmelja se u sladovinu dodaju na početku kuhanja, a aromatične na kraju da se spriječi isparavanje lako hlapivih eteričnih ulja. Hmeljne kiseline doprinose gorčini piva, ali i postizanju stvaranja i stabilnosti pivske pjene tako da se hidrofobni spojevi koncentriraju u pjenu, čime se povećava stabilnost pjene. Pjena je važan faktor kvalitete u procesu proizvodnje piva (Almaguer *i sur.*, 2014).

Prirodna ili umjetno proizvedena svjetlost uzrokuje razgradnju izo- α -kiselih gorkih tvari u 3-metil-2-buten-1-tiol (MBT) što dovodi do stvaranja nepoželjne arome okusa piva na lagani ili „skunky“ okus. Pivo u ambalaži od smeđeg stakla ima određenu zaštitu od svjetlosti koja uzrokuje navedenu štetu, ali zeleno i prozirno staklo nema svjetlosnu zaštitu (Parker,

2012). Spojevi koji utječu na gorčinu su polifenoli npr. galna kiselina, vanilijeva kiselina, kumarin, flavonoidi i tanin. Koncentracija se izražava kao Međunarodna jedinica za gorčinu (eng. *International bittering unit* IBU) (Oladokun *i sur.*, 2016). Mješanjem dviju ili više sorti hmelja može se stvoriti jedna sinergija s ciljem stvaranja arome ili gorčine u svakom stilu piva (González-Salitre *i sur.*, 2023).

Kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) ima važnu ulogu u proizvodnji svih alkoholnih pića. Okus i aroma piva ovisi o sastavu, sladovini, te u konačnici upotrebljenom soju kvasca. Više od 800 spojeva prisutnih u pivu u različitim koncentracijama utječu na spektar okusa a potječu od metabolizma kvasca. Za dobivanje piva željenog okusa koriste se različiti sojevi pivskog kvasca. Aktivni proizvodi iz metabolizma kvasca koji utječu na aromu su etanol i viši alkoholi, glicerol, CO₂, estere, acetaldehid, masne kiseline, organske kiseline, fenole i niz sumpornih spojeva (slika 3) (Didak Ljubas *i sur.*, 2022; Peces-Pérez *i sur.*, 2022).



Slika 3. Shema dijagrama okusa koje proizvodi kvasac tijekom fermentacije (Gagula, 2017)

Ovisno o temperaturi fermentacije kvasac se može podijeliti u dvije skupine oni koji fermentiraju na višim temperaturama i na nižim temperaturama (Parker, 2012). Kvasce koji nisu *Saccharomyces* karakterizira pomak u metabolizmu prema proizvodnji sekundarnih metabolita, za razliku od klasičnih *Saccharomyces* spp. koji proizvode biomasu i etanol (Lodolo *i sur.*, 2008). Kao produkti metabolizma kvasca nastaju esteri koji pivu daju voćne note na bananu (izo-amil acetat), ananas, crvena jabuka-sjemenke anisa (etil heksanoat) i esteri otapala (etil acetat). Najvažniji nusprodukt metabolizma aminokiselina je diacetil koji ima intenzivan okus maslaca (Meilgaard, M. C. *i sur.*, 1979). Tijekom vrenja kvasac proizvodi

i spojeve sa sumporom, poput sumporovodika (jaje), sumpornog dioksida (SO₂), dimetil sulfat (DMS-a) (kukuruz šećerac) i dimetil disulfida (kuhano povrće, kupus) sa vrlo niskim pragom okusa ($\mu\text{g L}^{-1}$) u pivu. Također, još jedan bitan spoj koji nastaje tijekom sušenja slada, gnječnja i kuhanja sladovine je 3-metiltiopropionaldehid (metional) (Parker, 2012).

2.2. Podjela piva

Mnogo je različitih vrsta i tipova piva koji sadrže više od 1000 okusa i mirisa. Podjela piva na tipove i vrste je definirana pravilnicima o kvaliteti piva. Različiti su načini proizvodnje piva i to od same upotrebe različitih vrsta žitarica, načina sušenja nakon slađenja, svojstva vode koja se koristi za kuhanje i sojeva kvasaca što u konačnici pridonosi tradicionalnim razlikama između piva. Najčešća podjela piva je prema procesu fermentacije pa tako se dijele piva „gornjeg“ i „donjeg“ vrenja.

Podjela piva prema vrsti kvasca

Lager piva ili piva donjeg vrenja najviše su konzumirana i dobivaju se vrenjem pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces uvarum*. Vrenje pivske sladovine započinje pri temperaturi od 6-8 °C i zato se naziva hladnim vrenjem, a završava na temperaturi od 9-18 °C. Mlado pivo se ohladi, a kvasac se istaloži na dnu posude te se odvoji i odležava pri 0-1 °C jedan do tri ili više tjedana. *Lager pivo* tako ima izraženu gorčinu i aromu po hmelju, bogatu i trajnu pjenu, punog je okusa zbog relativno velikog udjela neprevrelog ekstrakta. Tamno lager pivo naziva se *Dunkel ili Dunkles*, dok neka iznimno tamna piva tog tipa nose predikat Schwartz (crn). U mnogim se zemljama jako lager pivo naziva *Bock*, a posebno jako *Doppel Bock*. Varijacijom u preradi, formulacijama i sastavu sastojaka dobivaju se različiti tipovi piva kao što su pilsen (sti ardni američki lager), bock, weizen, pale i brown ales, rauchbier i mnogi drugi (Marić, 2009).

Vrste lager piva se u osnovi razlikuju prema tvrdoći vode te razgrađenosti i boji slada za pripremu sladovine. Tako se plzensko lager pivo (*Pils*) proizvodi od vrlo mekane vode (ukupna tvrdoća do 4 nj°) i vrlo svijetlog slada, a dortmundsko od tamnog slada i vrlo tvrde vode (preko 40 nj°). Upravo zbog tvrdoće vode i boje slada, vrste lager piva se međusobno razlikuju po nijansi boje (od svjetložute do crvenosmeđe), punoći okusa i aromi.

Drugi tip piva je pivo „gornjeg“ vrenja ili ale, za alkoholno vrenje koristi se čista kultura pivskog kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*, vrenje započinje pri višoj temperaturi sladovine od 10 °C i završava na 25 °C, kada kvasac ispliva na površinu mladog piva. Nakon

izdvajanja kvasca, mlado pivo odležava i dozrijeva pri temperaturi od 20 °C. Praznijeg je okusa u usporedbi s lager pivom više je sličnije vinu nego pivu.

Druga skupina ovih piva su crna britanska piva Porter i Stout, a imaju izuzetnu punoću, slatnu aromu te gustu i stabilnu pjenu. Manje poznato je Afričko pivo koje se proizvodi s posebnom vrstom kvasaca *Shizosaccharomyces pombe* u ekstremnim klimatskim uvjetima na 30-40 °C od prosenog, a ne ječmenog slada.

Nedavno se pojavio i četvrti tip piva koji nastaje spontano uz pomoću divljih, neselekcioniranih sojeva kvasaca. Kvasci u sladovinu dopijevaju iz zraka ili sa zidova posuda i prostorija za vrenje. Neki industrijski proizvođači piva u Belgiji (dolina rijeke Zenne) koriste ovaj postupak za proizvodnju čuvenih *Lambic piva*, koja sadrže više neprevrelog ekstrakta i hlapljivih sastojaka što im daje poseban bouquet okus (vinski, voćni, ponekad fenolni) (Marić, 2009).

Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini

Obzirom na maseni udio suhe tvari (ekstrakta) u sladovini prije početka vrenja, tipovi piva se dijele na:

Slaba ili laka piva imaju malen udio alkohola i neprevrelog ekstrakta.

Sti ardna se proizvode od sladovine s 10,1-12 % ekstrakta, pa je udio alkohola u njima od 3,5-5,5 vol.%.

Specijalna se piva proizvode iz sladovine s više od 12 % ekstrakta, sadrže više neprevrela ekstrakta, pa se nazivaju puna piva.

Dvostruko slatna piva se proizvode od sladovine s 18-22 % ekstrakta i nazivaju se jakim pivima, jer sadrže povećani udio alkohola i neprevrelog ekstrakta.

Ječmena piva sadrže volumni udio alkohola kao i vina od 7,5 do 10 vol.%. Zbog velikog udjela neprevrelog ekstrakta izrazito su punog okusa, pa se konzumiraju u malim količinama (Marić, 2009).

Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine

Ječmeni slad je osnovna sirovina za većinu lager i ale piva, ali u mnogim zemljama može se djelomično zamijeniti "neslađenim" sirovinama. Zamjenom najmanje 50 % ječmenog slada s pšeničnim dobiva se pšenično, *Bijelo pivo* (Weizenbier). U Europi se može naći i raženo pivo proizvedeno od raženog slada koji pivu daje vrlo svojstven okus zbog voćnih, pomalo gorkih, pikantnih, uljastih, ponekad gotovo ljutih obilježja paprene metvice. Slatni sirak, proso i kukuruz se u velikom dijelu Afrike koriste za proizvodnju lokalnih piva

kao što su *bouza*, *burukutu*, *pito* i *tshwala*. Tarahumara iz Meksika uključuje ispijanje kukuruznog piva, *tesquina* za vrijeme važnih društvenih rituala (Young, 2021).

Podjela piva prema boji

U osnovi, piva mogu biti: svijetla, crvena, tamna i crna, ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene, crvenosmeđe i crne boje. Češko ili plzensko pivo je svjetložute do svjetlozlatne boje. Bečko je zlatnožuto, dortmundsko crvenkasto, a bavarsko smeđe. Tipične vrste vrlo tamnog piva su Porter i Stout. Nekada se Porter pivo dugo čuvalo u drvenim bačvama gdje se razvijala specifična mikroflora (*Brettanomyces* spp. npr.), što mu je davalo karakterističnu aromu na miris deke za pokrivanje konja. Najpoznatije Stout pivo proizvodi tvrtka Guinness. Crna su piva su praktično neprozirna s okusom gorke čokolade ili "suhog" karamela (Marić, 2009).

Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola

Ova podjela uglavnom služi za određivanje posebnog poreza na pivo koji u svim zemljama značajno doprinosi državnom proračunu. Porez je viši što je viši volumni udio alkohola u pivu koji može biti od 0,5-10 % (vol.%). Bezalkoholna piva svugdje u svijetu mogu sadržavati do 0,5 vol.% alkohola, iznimka su islamske zemlje gdje bezalkoholno pivo ne smije sadržavati nimalo alkohola. Piva s malim udjelom alkohola sadrže ispod 3,5 vol.% alkohola. Sti ardna lager piva i piva gornjeg vrenja (ale) sadrže preko 3,5 vol.%. Jaka piva imaju više od 5,5 vol.% alkohola. Ječmena piva pak imaju udjel alkohola kao vina (7,5-10 vol%). U svim europskim zemljama na etiketi piva mora biti naznačen udio alkohola u volumnim % (Marić, 2009).

2.2.1. *Industrijsko i craft pivo*

Prema Pravilniku pivo se definira kao „proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura.“ Može se razvrstavati u sljedeće kategorije: „specijalno pivo“; „jako pivo“; „bezalkoholno pivo“; „pšenično pivo“; „pivo proizvedeno s mješovitom mikrobnom kulturom“; „mutno pivo“; „nefiltrirano pivo“; „svijetlo pivo“; „crveno pivo“ ili „tamno pivo“; i „crno pivo“.

Ovisno o vrsti glavnog vrenja, pivo se može označiti i kao:

„ale“ ili „alt bier“ za pivo gornjeg vrenja;

„lager“ za pivo donjeg vrenja;

„spontano prevrelo“ za spontano prevrelo pivo (NN 142/2011, 2011).

Najveći porast prodaje piva posljednjih godina dolazi iz kategorije craft piva, koja je znatno porasla za 10 % od 2015. do 2016. godine u odnosu na ukupnu kategoriju piva koja je porasla samo za 1,3 %-3,5 %. Craft pivovare imaju manji obim i neovisnost, a njihova glavna karakteristika je stavljanje naglaska na poseban okus i na tehnike kod kuhanja (Sánchez, 2017).

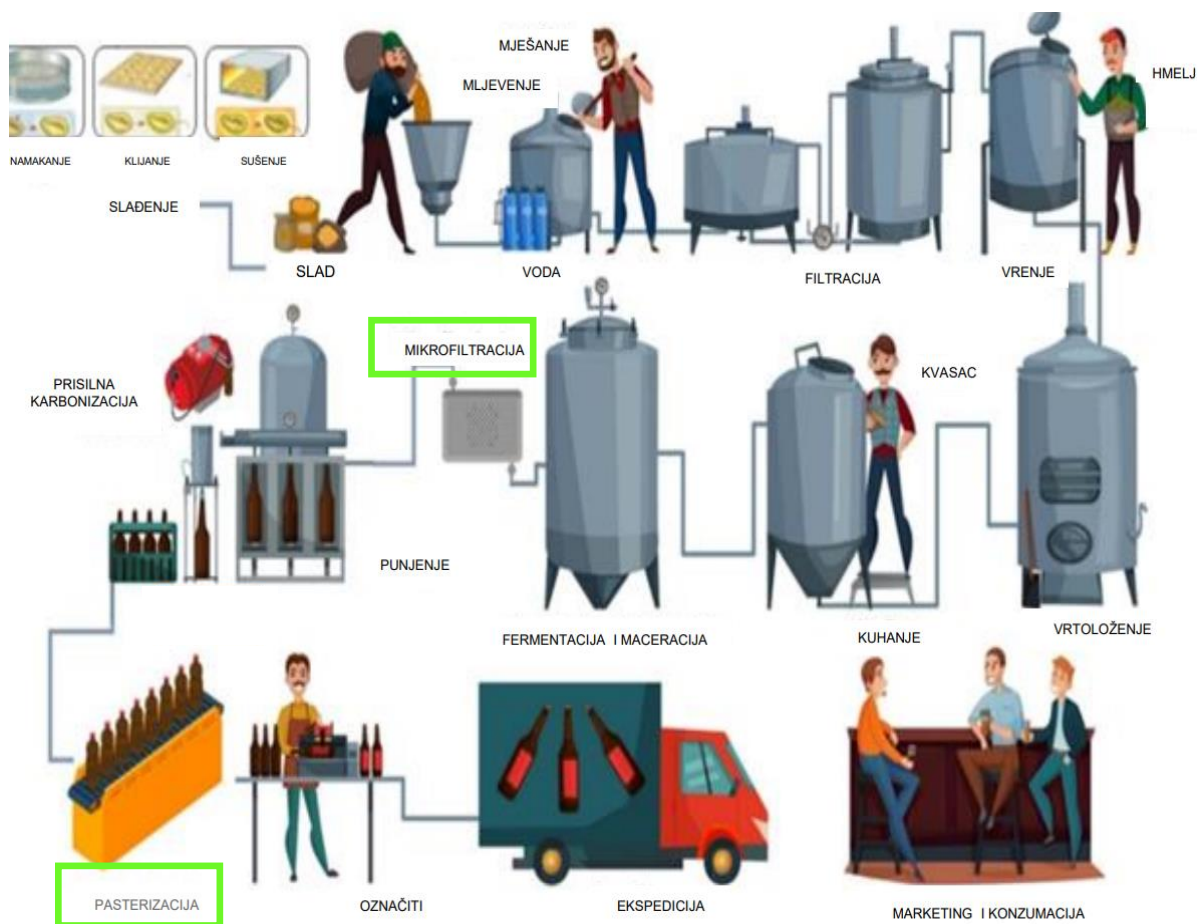
U Hrvatskoj je donesen Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o trošarinama 100/15, čl. 66.a, u kojem su craft pivovare definirane kao „pivovara s godišnjom proizvodnjom piva do 125.000 hL, koja je pravno i ekonomski nezavisna od bilo koje druge pivovare, koristi proizvodne i skladišne prostore fizički odvojene od bilo koje druge pivovare i koja ne proizvodi pivo prema licenci“ (NN 144/2021, 2021).

Osnovne sirovine koje se koriste u proizvodnji industrijskog tako i craft piva su: voda, ječam, kvasac, hmelj i ostali dodaci. Slad je ujedno i glavni sastojak u samome procesu, a mogu se koristiti ili se koriste neslađene žitarice ili njihovi proizvodi kao dodaci u proizvodnji piva (Jaeger *i sur.*, 2020). Kvaliteta sirovine igra važnu ulogu u senzorskim karakteristikama piva i stoga se mora uzeti u obzir tijekom procesa kuhanja piva (Mastanjević *i sur.*, 2018). Većina craft pivovara proizvodnju piva započinje sa već kupljenim sladom, a ne s ječmom. Jer sam proces vlastite proizvodnje slada dovodi do većih kapitalnih ulaganja, a i veća je nesigurnost oko kvalitete konačnog proizvoda. Kvantitativno najvažnija sirovina je voda jer ona također utječe na svojstva i kvalitetu piva u različitim fazama prerade (Pascari, *i sur.*, 2018).

Hmelj daje pivu gorak okus i utječe na aromu piva. U craft pivovarama pivari dodaju aromatične pelete sorte hmelja u već gotovo pivo da se maceriraju određeno vrijeme. U modernoj pivarskoj praksi uopće se ne koriste neprerađene šišarice već se zbog više razloga koriste različiti hmeljni peleti i ekstrakti hmelja (Sánchez, 2017). Kvasci su odgovorni za fermentaciju, a craft piva se dobivaju pomoću kvasca gornjeg vrenja (ale), i donjeg vrenja (lager) ili spontanom fermentacijom (Pascari *i sur.*, 2018).

Izgled i okus glavne su razlike između craft i industrijskih piva na koje snažno utječe proces proizvodnje piva. Uz različite sirovine koje se koriste u proizvodnji, zrelo glavno pivo prolazi mikrofiltraciju, a pivo se zatim pasteurizira u bocama kako bi se uklonili mikroorganizmi prije pakiranja u boce (Pascari *i sur.*, 2018). Craft pivo je obično nefiltrirano i

nepasteriziran proizvod, a kvasac tada posljedično zaostaje u craft pivu. Ova dva koraka čine glavne razlike između industrijskih i obrtničkih procesa kuhanja piva. Odsutnost ovih procesa može craft pivo učiniti podložnijim mikrobnj kontaminaciji u usporedbi s industrijskim pivom (slika 4). U konačnici to može rezultirati kvarenjem piva poput zamućenja, zakiseljavanja i stvaranja nepoželjnih aromatskih spojeva. Mnogi spojevi poput šećera, organskih kiselina, gorkih kiselina hmelja, polifenola i karbonilnih spojeva utječu na senzorska svojstva craft piva. Potrošači craft piva upravo biraju zbog njihovih različitih okusa, što povećava vjerojatnost percipiranja da su craft piva više kvalitete (Giovenzana, Beghi i Guidetti, 2014).



Slika 4. Razlika u koracima; komercijalno pivo sa mikrofiltracijom i pasterizacijom (zeleno) od obrtničkog procesa kuhanja koje je bez tih koraka (Schabo *i sur.*, 2021)

Tipovi piva također se mogu razlikovati u proizvodnji među regijama ovisno o kulturnim aspektima i dostupnosti sastojaka (Bamforth, 2003). Ovaj rastući sektor pivarstva pruža raznolikost i održivost, dok podržava lokalne zajednice i proizvođače (Aquilani *i sur.*,

2015). Većina craft pivovara proizvodi male serije različitih tipova (npr. lager, ale, india pale ale, porter, stout, pšenična i kisela piva), u različitim intenzitetima (visoki sadržaj hmelja ili slada) i često s višim udjelom alkohola (Jaeger *i sur.*, 2021).

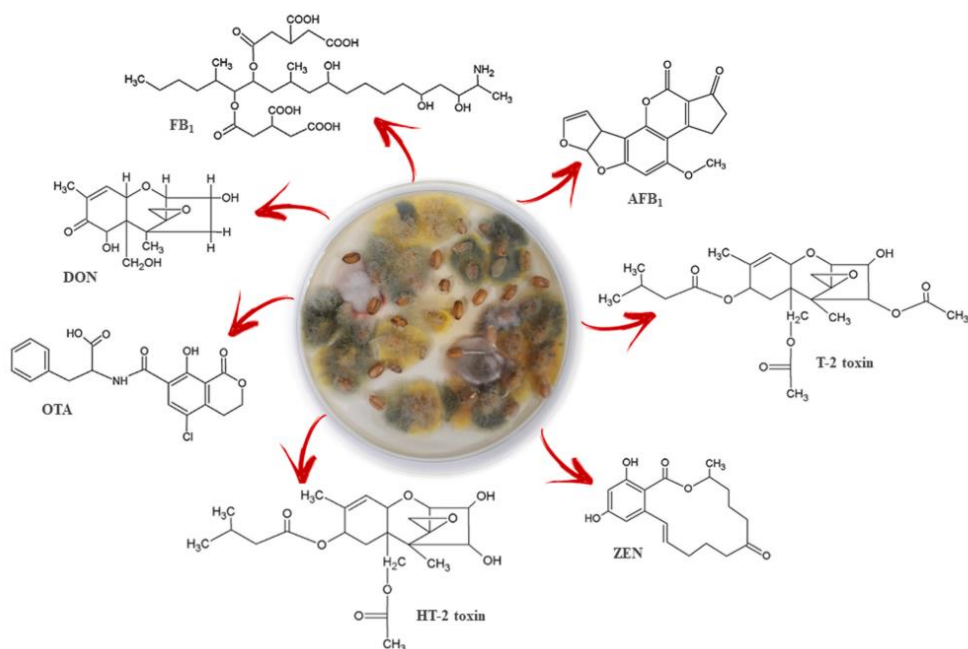
2.3. Mikotoksini

Unutar carstva gljiva velika skupina mikroorganizama su mikroskopske micelijske gljive odnosno plijesni (Markov, 2022). Plijesni proizvode sekundarne metabolite koji djeluju kao metabolički odgovor na stres iz okoliša i mogu pružiti kemijsku obranu protiv svojih antagonista. Ujedno dovode do mikrobiološkog kvarenja što narušava estetski izgled i prehrambenu vrijednost hrane. Poznato je više od 100 000 vrsta plijesni. Više od 400 vrsta se smatra toksičnima, a za 5 % je poznato da proizvode mikotoksine koje imaju neželjen učinak kako na životinje tako i na čovjeka (Habschid, 2011).

Mikotoksini naziv dolazi od grčke riječi *myces* – gljiva, *toxicum* – otrov, toksični su sekundarni metaboliti plijesni i od velike su važnosti za sigurnost hrane kao i hrane za životinje. Stabilni su kemijski spojevi koji se ne uništavaju tijekom procesiranja i toplinske obrade. Nalaze se na poljoprivrednim proizvodima uglavnom su povezani sa žitaricama, posebice kukuruzom, pšenicom, ječmom, raži, rižom i zobi (Goyarts *i sur.*, 2007). Na taj način mogu kontaminirati hranu i stočnu hranu uzrokujući širok spektar štetnih učinaka kako na ljude tako i na životinje (Arroyo-Manzanares *i sur.*, 2021).

Osim što su toksični za ljude i životinje, mogu imati i fitotoksične ili antimikrobne učinke na zdravlje ljudi. Primjerice penicilin ili statini kao metaboliti plijesni koriste se u proizvodnji lijekova, a toksični metaboliti plijesni su aflatoksini, trihoteceni i ostali, primjerice ergot alkaloidi su toksični ali i farmaceutski korisni (Kochman *i sur.* 2021). Plijesni žive kao parazitetni organizmi na različitim tvarima organskog podrijetla čija boja može biti od crne, zelene, žute, sive ili crvene a potječe od njihovih spora.

Plijesni koje se najčešće mogu pronaći na ječmu i pšenici na polju uključuju vrste rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium*, pri čemu najveće probleme u sladarstvu i pivarstvu predstavljaju plijesni roda *Fusarium* (slika 5) (Papadopoulou-Bouraoui *i sur.*, 2007).



Slika 5. Zrna kontaminirana plijesnima i potencijalnim mikotoksинима koje mogu proizvesti toksigene vrste (Schabo *i sur.*, 2021)

Šarža zrna ječma ili pšenice koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana je plijesnima roda *Fusarium* smatra se nepogodnom za slađenje (Schwarz, Casper i Beattie, 2018). Primjerice, jedna vrsta plijesni može proizvoditi više strukturno različitih mikotoksina i obrnuto jedan mikotoksin može proizvoditi više različitih vrsta i rodova plijesni, kao što je prikazano u tablici 2 (Frisvad, 2018).

Tablica 2. Najznačajniji mikotoksini i plijesni koje ih proizvode (Frisvad, 2018)

Mikotoksini	PLIJESNI
Aflatoksini	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Citrinin	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>M. purpureus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. odoratum</i> , <i>P. radicicola</i> , <i>P. verrucosum</i>
Deoksinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>
Fumonizini	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i>

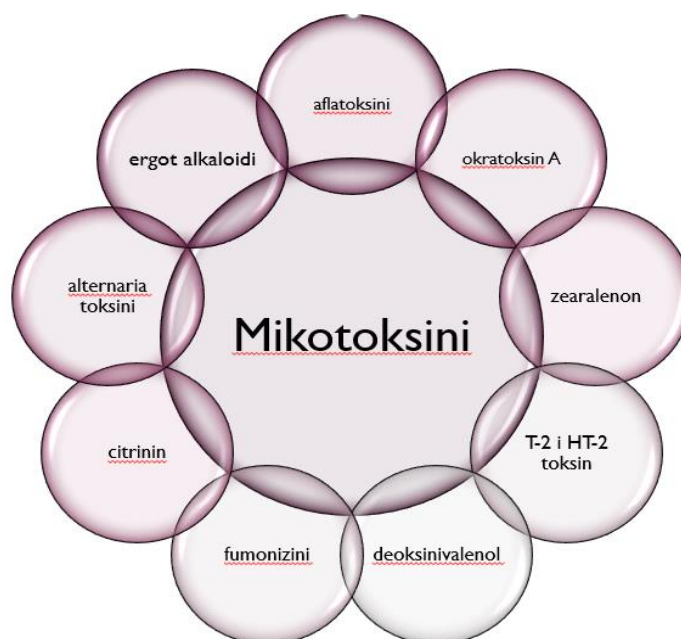
Mikotoksini**PLIJESNI**

Okratoksin A	<i>Aspergillus affinis</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. welwitschiae</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. cretensis</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. lacticoffeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A. roseoglobulosus</i> , <i>A. sclerotium</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>Neopetromyces muricatus</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>Paecilomyces fulvus</i> , <i>P. niveus</i> , <i>P. saturatus</i> , <i>Penicillium antarcticum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. clavigerum</i> , <i>P. compactum</i> , <i>P. concentricum</i> , <i>P. coprobium</i> , <i>P. dipodomyicola</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. gli icola</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. marinum</i> , <i>P. novae-zeelii</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. psychrosexualis</i> , <i>P. samsonianum</i> , <i>P. sclerotigenum</i> , <i>P. vulpinum</i> , <i>Xylaria longiana</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. crookwellense</i>
Ergot alkaloidi	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i>
T-2 i HT-2 toksin	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i>

Primjena kontaminiranog slada u proizvodnji piva može uzrokovati različite probleme, kao što su promjena u boji i sastavu sladovine, prisutnost mikotoksina i pojavu prekomjernog pjenjenja piva. Što naravno može predstavljati ozbiljan zdravstveni rizik za potrošače (Azam *i sur.*, 2021). Nakon žetve, faktori koji utječu na infekciju plijesnima i naknadnu sintezu mikotoksina su; sadržaj vlage u zrnu, pravovremena žetva, duljina mokrog čuvanja zrna prije sušenja, količina zrna i stranih materijala, količina prašine, vrsta i kvaliteta skladišnih struktura, temperatura zrna, relativna vlažnost zraka u međuprostoru, kondenzacija u prostoru, kretanje vlage u rasutom zrnu i zaraza kukcima (Channaiah i Maier, 2014).

Negativni zdravstveni učinci na ljude mogu biti od akutne toksičnosti do kroničnih simptoma kao što su oštećenje bubrega, oštećenje jetre i pojava karcinoma (WHO, 2017). Kontaminacija mikotoksinima svjetski je problem, ozbiljniji u vlažnim i toplim uvjetima okoliša koji pogoduju rastu plijesni i proizvodnji mikotoksina. U nedavnom istraživanju utvrđeno je da 60% do 80% poljoprivrednih proizvoda je kontaminirano mikotoksinima (Eskola *i sur.*, 2020).

Najčešći regulirani mikotoksini koji se mogu naći u žitaricama, a posljedično i u pivu su aflatoksin (AFB₁, B₂, G₁ i G₂), okratoksin A (OTA), trihoteceni (deoksinivalenol (DON), T-2 i HT-2 toksin), fumonizini (FB), zearalenon (ZEN), ergot alkaloidi i alternaria toksini (slika 6) (Schabo *i sur.*, 2021).



Slika 6. Najčešći regulirani mikotoksini u raznim prehrambenim proizvodima a posljedično se mogu naći u pivu (autor)

Prisutnost mikotoksina u hmelju ključnom sastojku piva još nije dovoljno istražena iako je potvrđena prisutnost mikotoksikogenih plijesni kao kontaminanata hmelja (Pascari *i sur.*, 2022). Regulatorna ograničenja uvedena su samo za žitarice ili specifične prerađevine, ne razmatrajući njihovu upotrebu za proizvodnju piva. Trenutno na razini Europske unije ne postoji legislativa o maksimalno dopuštenim koncentracijama mikotoksina u pivu (Ostry, 2017).

Cilj i potreba svake zemlje je unaprijediti strategiju kontrole kvalitete i sigurnosti hrane (Channaiah i Maier, 2014). Primjenom dobre tehnike, strategije obrade i same kontrole mikotoksina koja počinje već tokom žetve pri niskim razinama vlažnosti zrna kako bi se spriječio rast plijesni ili pak sušenjem nakon žetve (Bullerman i Bianchini, 2014). U konačnici sustavni pristup dobroj proizvođačkoj praksi i primjena HACCP-a (eng. *Hazard Analysis and Critical Control Point*) važni su za smanjenje mikotoksina u žitaricama (Neme i Mohammed, 2017).

2.3.1. Mikotoksini u pivu

Za proizvodnja piva mogu se koristiti zrna ječma odnosno slada koja su možda bila kontaminirana mikotoksinima. Među najčešćim *Fusarium* mikotoksinima pronađenim u pivu su: *trihoteceni tipa A*; diacetoksiscirpenol, T-2 i HT-2 toksini, od *trihotecena tipa B*: nivalenol (NIV), deoksinivalenol (DON), 3- i 15-acetil-deoksinivalenol (3-Ac-DON i 15-Ac-DON) te maskirani mikotoksin deoksinivalenol-3-glukozid (DON-3-Glc), zearalenon (ZEN), aflatoksini (AF), okratoksin A (OTA) i fumonizini (Benešová *i sur.*, 2012). Kontaminacija s *Fusarium* ili drugim toksigenim ili ne-toksigenim plijesnima utječe na sigurnost konačnog proizvoda ali može ometati i metabolizam biljaka te promijeniti sastav žitarica i enzima vezanih uz proizvodnju piva (Bertuzzi *i sur.*, 2018; Pascari, Ramos, *i sur.*, 2018). Mikotoksini koje proizvode vrste *Aspergillus* i *Penicillium*, poput okratoksin A i aflatoksina također su tijekom istraživanja pronađeni kod proizvodnje slada, u pšenici i u pivu (Schabo *i sur.*, 2021).

Aflatoksini su prirodni toksini koje proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, glavne vrste aflatoksina su: B1, B2, G1, G2 te M1 i M2. Zbog svoje termostabilnosti, ne mogu se eliminirati tijekom obrade hrane (Marin *i sur.*, 2013). Aflatoksin B1 (AFB1) najznačajniji i najsnažniji prirodni hepatokarcinogen, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC; eng. *International Agency for Research on Cancer*) svrstala ga je u karcinogene 1. skupine (IARC, 2002). Spoj koji je izrazito teratogen, visokotoksičan i karcinogen te u ljudskom i životinjskom organizmu djeluje imunosupresijski, izaziva akutne i kronične toksične učinke (Eskola *i sur.*, 2020). Često su otkriveni u kukuruznim pivima (Marin *i sur.*, 2013). Akutni simptomi koji se javljaju kod ljudi uključuju bolove u trbuhu, povraćanje, plućne bolesti, ikterus, cerebralni edem, konvulzije, krvarenje, pa čak i smrt. Kod kronične aflatoksikoze dolazi do potiskivanja imunološkog sustava samim time izaziva tumore ili druga nepovoljna patološka stanja. Kontinuirana izloženost aflatoksinima je značajno povezana s kognitivnim oštećenjem i inhibicijom rasta u djece (Wan, 2020).

Zearalenon (ZEN), poznat još kao F-2 toksin, je fitoestrogenski mikotoksin kojeg proizvode vrste *Fusarium graminearum* i *F. culmorum*. Često ga se pronalazi u kukuruzu i proizvodima od kukuruza, pšeničnim mekinjama i biljnim uljima, riži, ali i u pivu (Šarkanj *i sur.*, 2013), te u pivarskim proizvodima (Pascari, Ortiz-Solá, *i sur.*, 2018). Pokazalo se da je hepatotoksičan, hematotoksičan, imunitoksičan i genotoksičan. Najznačajniji među derivatima ZEN-a je α -zearalenol koji je šezdeset puta toksičniji od zearalenona, te β izomer koji je duplo toksičniji od ZEN-a (EFSA, 2017). Veže se na receptore estrogena u citoplazmi

stanica spolnih organa. Inhibira stvaranje folikularno stimulirajućeg hormona pa ne dolazi do ovulacije. Afinitet pokazuje prema žutom tijelu (luteotropin) što je posljedica porasta koncentracije progesterona u krvi i pojave “lažne” trudnoće. Kod muških osoba smanjuje koncentraciju testosterona u plazmi te uzrokuje ginekomastiju (Zinedine *i sur.*, 2007). Žene koje su tijekom trudnoće konzumirale hranu kontaminiranu ZEN-om kod njihove djece se očituju simptomi preuranjenog puberteta. Također prema istraživanjima u Portoriku i Mađarskoj kod djevojčica sa preuranjenim spolnim sazrijevanjem u krvi je pronađen zearalenon (Szuets *i sur.*, 1997). Uzrokuje hiperestrogenizam utječući na reprodukciju, a neka istraživanja povezuju ZEN sa stimulacijom rasta stanica raka dojke kod ljudi (Tola i Kebede, 2016). Zbog dobre topljivosti u vodi i visoke toplinske stabilnosti može se prenijeti iz slada u pivo (Habschied *i sur.*, 2011).

Fumonizini su kancerogeni sekundarni metaboliti koje sintetiziraju plijesni *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. moniliforme*. Spadaju među najvažnije toksine u hrani i stočnoj hrani, ovisno o broju i smještaju hidroksilnih skupina razlikujemo fumozin B1, B2, B3, B4 i B6. Fumonizin B1 je najzastupljeniji toksin koji čini približno 75% infekcija. Stabilni su na povišenim temperaturama tijekom procesiranja hrane i nisu fotosenzibilni.

Citotoksični su i kancerogeni za ljude i životinje. U različitim zemljama FB1 je povezan s karcinomom jednjaka. Djelovanje fumonizina dovodi do poremećaja u rastu, diferencijaciji i funkciji te u konačnici i smrti. Zbog drastičnih promjena na živčanom sustavu dolazi do razvoja progresivne neurotoksikoze koja se manifestira kroz depresiju, nemir, ekscitaciju, sljepoću, ataksiju, besciljno lutanje, facijalnu paralizu, prisilne kretnje, komu i smrt. Zbog premalo epidemioloških istraživanja na ljudima a velikog broja dokaza kancerogenosti na životinjama IARC je FB1 uvrstio u 2B skupinu kao moguće kancerogene tvari za ljude (IARC, 1993).

Trihoteceni (TC) uglavnom proizvode plijesni roda *Fusarium* (Udovicki *i sur.*, 2018). Postoji samo nekoliko istraživanja koja sadrže podatke o prisutnosti HT-2 i T-2 toksina u pivu, a njihova je prisutnost povezana s kontaminiranom konzumacijom ječma, zobi i pšenice (Pascari, Ramos, *i sur.*, 2018). T-2 toksin se resorbira kroz kožu, lokalno uzrokuje upalu i koagulacijsku nekrozu kod životinja. Svojim djelovanjem inhibira i sintezu nukleinskih kiselina DNA i RNA. Citotoksičan je, te dolazi do nastanka dermatitisa i ulceracije sluznice dok imunosupresijsko djelovanje rezultira atrofijom limfnog tkiva. Uzročnik je akutne intoksikacije i kroničnih bolesti kod ljudi i životinja (Creppy, 2002).

Tijekom Drugog svjetskog rata među stanovništvom pojavila se bolest nazvana alimentarna toksična aleukija (ATA). Glavni klinički simptomi su smetnje u hemopoeznom sustavu s progresivnom leukopenijom, granulopenijom i limfocitozom. Istraživanja na mačkama i majmunima kao pokusnim životinjama pokazala su da davanje T-2 toksina izoliranog iz *F. sporotrichioides* uzrokuje nastanak ATA (Pleadin *i sur.*, 2015).

Deoksinivalenol (DON) pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina. Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i toplinske obrade hrane. U buragu preživača metabolizira se u deepoksideoksinivalenol koji je znatno manje toksičan od izvornog oblika, a kod ljudi se izlučuje urinom u obliku deoksinivalenol -3 i 15- glukuronida. DON u kombinaciji s drugim mikotoksinima naprimjer u kombinaciji s AFB1 ima izraženo mutageno djelovanje. Akutni gastrointestinalni simptomi koji nastaju zbog konzumacije hrane kontaminirane DON-om a uključuju glavobolju, mučninu, vrtoglavicu, povraćanje, bolove u trbuhu, hemoragični proljev i groznicu (Sobrova *i sur.*, 2010). Predstavlja zabrinutost za javno zdravlje vezano i kod konzumacije piva kao i kod procjene rizika za hrvatske potrošače kojima je pivo drugi najznačajniji izvor DON-a (Piacentini, 2017).

Važan problem kod prisutnosti DON-a u pivu je što uzrokuje pretjerano pjenjenje odnosno „šikljanje“ i prelijevanje pri otvaranju boce, posljednjih godina se često javlja i može ozbiljno narušiti kvalitetu piva i ugled pivovare (Piacentini, 2017).

Glavni *Alternaria* mikotoksini su tenuazonska kiselina (TeA), alternariol (AOH) i alternariol monometil eter (AME). *Alternaria* spp., uglavnom *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. arborescens*. Mikotoksini alternarije su toksični, mutageni i karcinogeni te su odgovorni za deformaciju spirale DNA, poremećaj metabolizma sfingolipida, inhibiciju sinteze proteina i fotofosforilaciju (Ostry, 2008). *Alternaria* vrste su sveprisutne u okolišu mnogi su saprotrofi ili biljni patogeni koji utječu na usjeve u polju pri tome uzrokujući bolest pjegavosti stabljike i listova, odnosno kvarenje plodova biljke ili zrna u fazi nakon berbe. U stanju su akumulirati toksične metabolite u jestive dijelove biljaka. *Alternaria* je izolirana iz široke palete proizvoda hrane kao što su žitarice, orašasti plodovi, plodovi rajčice, masline, paprike, jabuke, bobičasto voće, agrumi kao i njezini derivati (Patriarca, 2016).

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin koji proizvode uglavnom vrste *Aspergillus* i *Penicillium*, osobito *A. ochraceus* i *P. verrucosum*. Pronađen je u različitim koncentracijama kao kontaminant žitarica: raž, ječam, pšenica, sirak, riža i kukuruz, a također je kontaminant u kavi, zrnu kakaovca, začinima, grožđu i suhom voću (Wang *i sur.*, 2018). Ovaj mikotoksin je nefrotoksičan, imunosupresivni, teratogeni i kancerogeni za životinje i klasificiran kao

moćući karcinogen za ljude, a IARC ga je svrstao u skupinu 2B. Otkriven je u alkoholnim pićima poput vina (Haque *i sur.*, 2020) i piva (Visconti *i sur.*, 2008).

2.3.2. „Maskirani“ mikotoksini

Prilikom određivanja mikotoksina u sladovini i pivu moguće je dobiti prividno manje početne koncentracije mikotoksina. Razlog tome je reakcija mikotoksina s drugim spojevima poput šećera, aminokiselina ili sulfatne grupe koji se mogu naći u žitaricama, pri čemu nastaju „maskirani“ mikotoksini - DON-3-glukozid i ZEA-4-glukozid. Dio mikotoksina se također može vezati i za staničnu stijenku kvasaca koja se koristi u procesima detoksifikacije mikotoksina (Sarkanj *i sur.* 2020).

Pojam "maskirani mikotoksin" pojavio se sredinom 1980-ih, kao posljedica pojave nekih slučajeva mikotoksikoze koji nisu bili u korelaciji s nekim mikotoksinima otkrivenim u analiziranim uzorcima. Stoga se visoka toksičnost prepisuje pojavi neotkrivenim oblicima.

Maskirani mikotoksini prolaze kroz promjene u svojoj strukturi, polarnosti, topljivosti i molekularnoj masi. Većina ih je manje toksična od svojih roditeljskih oblika, no enzimi u probavnom sustavu mogli bi transformirati modificirane oblike u roditeljske oblike i imati teško predvidljive posljedice na ljudsko zdravlje (Berthiller *i sur.*, 2013). Naziv koji se koristi za toksine iz roda *Fusarium* kao što su beauvericin, enniatins, fusaproliferin i moniliformin kontaminanti su žitarica. Relevantnost i dopuštene granice ovih mikotoksina još nisu definirane, njegova prisutnost u žitaricama i dokaz *in vitro* toksičnosti mogu promijeniti ovaj scenarij u budućnosti (Gruber-Dorninger *i sur.*, 2017).

Pojavnost ovih mikotoksina varira ovisno o regiji, klimatskim uvjetima, vrsti sirovine i žetvi (Stanciu *i sur.*, 2017). Osim mogućih aditivnih i/ili sinergističkih učinaka, neki od ovih derivata mogu se pretvoriti u slobodni mikotoksin tijekom obrade i metabolizma kod životinja i ljudi, čineći ih ponovno bioraspoloživima. A neki pak se mogu dalje transformirati u druge spojeve (Freire *i sur.*, 2020).

Nedostatak podataka o toksičnosti i njihovoj izloženosti u kombinaciji sa slobodnim mikotoksinima ne daje zaključak o toksičnim učincima. Dosadašnji dobiveni rezultati pokazuju da izloženost maskiranim mikotoksinima može predstavljati dodatni rizik za zdravlje ljudi i životinja. Preporuka je da 3-acetil-deoksinivalenol, 15-acetil-deoksinivalenol i deoksinivalenol-3-glukozid induciraju toksične učinke slične DON-u zbog mogućnosti deacetilacije 3 i 5-acetil-deoksinivalenola, te hidrolize deoksinivalenol-3-glukozida tijekom

metabolizma životinja i ljudi. Međutim, za druge maskirane mikotoksine preporučena su daljnja istraživanja kako bi se izvršila procjena rizika za životinje (Freire i Sant'Ana, 2018).

Konačnu koncentraciju mikotoksina u craft pivu teško je predvidjeti jer ovisi o početnoj koncentraciji sadržanoj u sirovini i samim uvjetima prerade. Trenutačni nedostatak ograničenja mikotoksina u pivu iz obrtničke proizvodnje podcjenjuje moguće rizike za ljudsko zdravlje (Neme i Mohammed, 2017). Da bi došlo do proizvodnje mikotoksina, toksigene vrste moraju naići na povoljne uvjete u okolišu, tijekom skladištenja i obrade hrane (Schabo *i sur.*, 2021). Temperature obrtničkog kuhanja piva dosežu najviše 100 °C, što nije dovoljno za uništavanje nekih mikotoksina (Pascari, Ramos, *i sur.*, 2018).

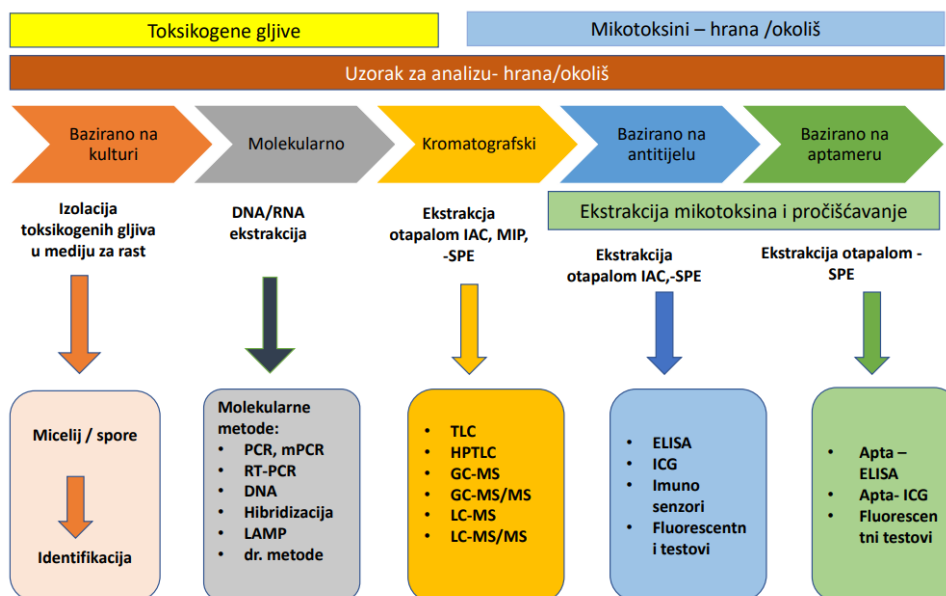
Međutim, kontaminacija mikotoksinima u craft pivu još nije obrađena kao pitanje sigurnosti hrane (Pascari, Ramos, *i sur.*, 2018). Dio mikotoksina prisutnih u žitaricama može se transformirati u modificirane mikotoksine tijekom kuhanja piva, što se također može okarakterizirati kao potencijalna opasnost po zdravlje (Freire *i sur.*, 2018).

2.3.3. Metode detekcije mikotoksina

Od njihova otkrića do danas validirano je nekoliko metoda za određivanje mikotoksina. Parametri za provedbu validacije definirani su i u odluci Komisije o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (2002/657/EZ), a najznačajniji parametri su: linearnost, granica detekcije (LOD), granica kvantifikacije (LOQ), preciznost, točnost, selektivnost i mjerno područje. U analizi mikotoksina potrebno je zadovoljiti i uvjete koji su propisani u Uredbi komisije br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani, te u Uredbi Komisije (EU) 2023/915 utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (EC, 2023). Svaki od navedenih pravilnika donosi svoje upute o validacijskim parametrima koje je potrebno poštivati kako bi se mogle validirati metode za službeno određivanje mikotoksina u uzorcima hrane (Gilbert and Anklam, 2002).

Za određivanje mikotoksina u hrani koriste se različite analitičke metode koje se grupiraju na orijentacijske (*screening*) i potvrdne metode (slika 7). Od orijentacijskih metoda za određivanje mikotoksina najčešće se koristi imunoenzimska ELISA metoda. Prednosti takve metode primarno se odnosi na brzinu izvedbe, mogućnost analize velikog broja uzoraka u kratkom razdoblju, jednostavnost provedbe, nisku cijenu i upotrebu ne štetnih reagensa. Kao potvrdne metode koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućuju selektivno

određivanje mikotoksina u hrani je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) (Pleadin i sur. 2018).



Slika 7. Metode koje se koriste u analitici mikotoksina i plijesni kao njihovih producenata (Pleadin i sur. 2018.)

U novijim istraživanjima za analizu mikotoksina koristi se tekućinska kromatografija u kombinaciji s time masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) (Kadota *i sur.*, 2011). Postoji nekoliko metoda u kojima se pomoću LC-MS/MS-a kvantitativno određuje više od 500 mikotoksina, antibiotika i toksina biljaka (Sulyok *i sur.*, 2020).

Prednosti upotrebe metode ultravisokotlačne tekućinske kromatografije (U-HPLC) spojene na (time) masenu spektrometriju je u tome što daje veću selektivnost, također omogućuje određivanje više analita bez namjernog pripremanja uzorka (Krska *i sur.* 2010). Ujedno omogućuje brže kromatografsko odvajanje, skraćujući vrijeme rada uz povećanu osjetljivost i poboljšanu razlučivost. U-HPLC spojen s trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom smatra se jednom od najselektivnijih i najosjetljivijih tehnika za analizu mikotoksina (Malachová *i sur.*, 2014).

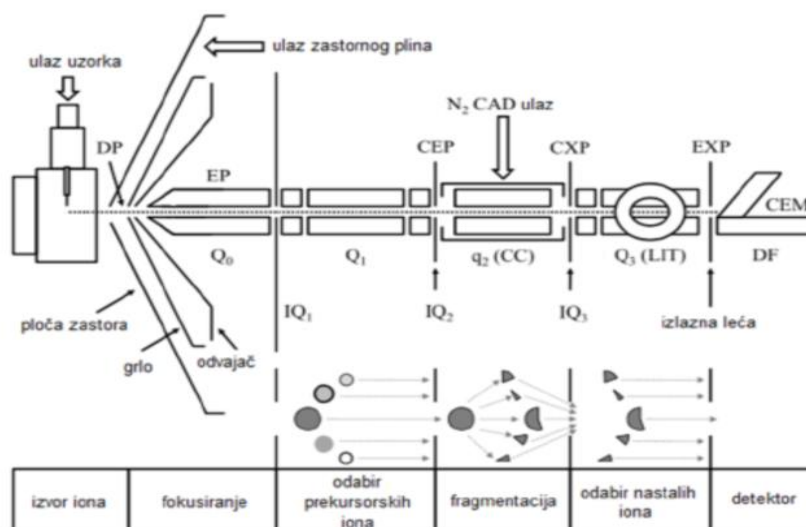
Nedostatak pristupa "razrijedi i mjeri" je taj da je potreban visokoprecizan uređaj koji će moći detektirati mikotoksine i nakon što se ekstrakti razrijede. Kad nema pročišćavanja matrice ekstrakta, veća je mogućnost da će doći do supresije ili pojačanja signala te time do odstupanja od stvarnog rezultata uzrokovanog matricom. Zbog toga je kod računanja uvijek potrebno razlikovati prividno iskorištenje od efikasnosti ekstrakcije korištenjem certificiranih

odnosno referentnih materijala. Mora se provesti obogaćivanje uzorka bez mikotoksina, te odvojeno obogaćivanje samo ekstrakta da se pripremi kalibracija u matrici ekstrakta kako bi se moglo razlikovati efikasnost ekstrakcije i utjecaj matrice na supresiju ili pojačanje signala pogotovo kod korištenja ESI ionizatora (Frisvad J. C. *i sur.*, 2004).

Kod maskiranih mikotoksina zbog promjena u njihovoj strukturi, ti spojevi obično ostaju neotkriveni tijekom ispitivanja matičnog mikotoksina, upravo LC-MS/MS pomaže u istraživanju istih (Freire and Sant'Ana, 2018). Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) također omogućuje razjašnjenje strukture maskiranih mikotoksina (Beltrán *i sur.*, 2009; Gholobova *i sur.*, 2018).

2.3.3.1. Masena spektrometrija

Ti em masena spektrometrija je analitička metoda koja podrazumijeva spajanje dva ili više kvadrupola sa svrhom povećanja sposobnosti analiziranja određenih molekula. Najčešće se u ti em masenoj spektrometriji koristi trostruki kvadrupol (eng.triple quadrupol, QQQ) (slika 8), to su tri serijski povezana kvadrupola. U prvom kvadrupolu (Q_1) dolazi do probiranja prekursorskih iona koji imaju točno definiranu masu i naboj. Nakon toga ioni iz prvog kvadrupola (Q_1) odlaze prema drugom kvadrupolu (Q_2) odnosno prema kolizijskoj ćeliji u kojoj dolazi do fragmentacije iona u produktne ione. U trećem kvadrupolu (Q_3) se provodi selekcija određenih iona obzirom na njihov omjer mase i naboja. Na samom kraju analize ioni dolaze do detektora gdje se kvantificiraju i identificiraju te se ispisiuje maseni spektar (de Hoffmann, 2007).



Slika 8: Shematski prikaz trostrukog kvadrupola (Faktor J *i sur.*, 2012)

U LC–MS/MS sustavu ionizacija elektrosprejom (ESI) predstavlja najzastupljeniji način ionizacije u kojem se analit ionizira u obliku otopine, a kao otapalo koriste se tvari koje su hlapljivije od analita kako bi se one mogle odstraniti. Otopina analita se propušta kroz kapilaru u vakuumu i kada otopina uđe u komoru ona se raspršuje u obliku sitnih kapljica gdje otopina isparava, a ioni analita ostaju u komori. Koncentracija toksina i vidljiva infekcija ne moraju nužno biti u korelaciji i mikotoksini mogu biti prisutni u namirnicama bez mogućnosti da se otkriju plijesni koje su povezane s toksinima i obrnuto. Primjer je upotreba pljesnive rajčice za proizvodnju kečapa (Andersen, Smedsgaard and Frisvad, 2004). Upotrebom masenih spektrometara najnovije generacije omogućuje se kvantitativno određivanje mikotoksina u sirovim ekstraktima hrane, pod uvjetom da ekstrakcija učinkovitosti kao i učinci matrice dovoljno su karakterizirani za sve ispitivane kombinacije analita (Sulyok i sur. 2007).

Sulyok i suradnici razvili su metodu koja je temeljena na HPLC-MS/MS za kvantitativno određivanje 39 mikotoksina u pšenici i kukuruzu. Priprema uzorka svedena je na jedan korak ekstrakcije nakon čega je slijedila analiza razrjeđivanja sirovih ekstrakata i to zbog kemijske raznolikosti analita. Svi gubici koji su bili uzrokovani nepotpunom ekstrakcijom i potiskivanjem signala izazvanim matriksom bili su ponovljivi na svim razinama koncentracije za dati uzorak, pokazujući da je takav pristup "razrijedi i mjeri" primjenjiv u analizi više mikotoksina pomoću LC-MS/MS. Metoda je proširena za još 48 analita, uključujući većinu mikotoksina s ciljem da se dokaže izvedivost takve metode na temelju uzorka modela s više toksina koji je obogaćen na više razina kako bi se odredili parametri izvedbe metode i istražili učinci matrice i povrati koraka ekstrakcije. Metoda je primijenjena na mali skup prirodno pljesnivih uzoraka kako bi se pokazala njezina pogodnost za buduća istraživanja o pojavi toksičnih gljivičnih metabolita koji do sada nisu dovoljno obrađeni kvantitativnom analizom (Sulyok i sur. 2007).

Nakon toga metoda je nadograđena na 295 analita (uglavnom mikotoksina) (Malachová *i sur.*, 2014), te na >500 analita (Sulyok *i sur.*, 2020), trenutna metoda je sa više od 1000 analita (miktotoksina, pesticida preko ostataka veterinarskih lijekova, toksina bilja i sličnih kontaminanata hrane) (Steiner *i sur.*, 2021).

2.4. Senzorska analiza

Pivarima je u interesu da oduševi kupce svojim "tajnim sastavom" pozitivnih okusa u pivu. Osim kvalitetnih sirovina, provjerenih receptura, dobro projektirane opreme, dobre pivarske prakse i instinkta, jedna od ključnih vještina je upravo kušanje piva. Glavni alat za procjenu kvalitete i prihvatljivosti piva među potrošačima je provođenje senzorske analize piva od strane educiranih stručnjaka (O' Sullivan, 2011).

Senzorska analiza definirana je kao znanstvena disciplina koja se koristi za mjerenje, analizu, interpretaciju i tumačenje odgovora na prehrambene proizvode koji su dobiveni pomoću ljudskih osjetila (Sidel i Stone, 1993). Ovu su definiciju prihvatili odbori za senzorsku procjenu Instituta prehrambenih tehnologa i Američkog društva za ispitivanje i materijale. Senzorske analize provodi voditelj panela koji odabire metodu, skale, kontrolira rad panelista, provodi statističku obradu i prezentiranje rezultata.

Objekti u kojima se provodi senzorska analiza definirani su prema (ISO 8589:2007). Idealna prostorija trebala bi imati odjeljenja za degustaciju za svakog panelista, sa dobrom prirodnom ili umjetnom rasvjetom. Prostorija mora biti bez jakih mirisa, buke, čista i svijetlije boje. Potrebno je imati kuhinju sa dobrom ventilacijom u kojoj se pripremaju uzorci.

Dodatni zahtjevi koji moraju biti ispunjeni za prostor su: stabilna temperatura zraka 21 °C i vlažnost zraka oko 80 %. Prikupljeni uzorci za senzorsku analizu moraju biti pravilno skladišteni. Idealno je da se uzorci piva čuvaju na temperaturi oko 4 °C, ali se poslužuju panelistima pri sobnoj temperaturi. Uzorci su anonimni odnosno označavaju se troznamenkastim brojevima da se izbjegne subjektivna reakcija panelista prilikom posluživanja. Identifikacija uzorka se može izvršiti nakon testiranja. Prije svakog kušanja svakog sljedećeg uzorka panelist mora neutralizirati nepce sa vodom ili kruhom (Parker, 2012).

Mjerni instrument je senzorski panel koji čini skup ljudi odabrani i trenirani za provođenje senzorske analize na prehrambenim proizvodima prema (ISO 8586:2023). Odabrani su na temelju njihove oštine prepoznavanja okusa, prepoznavanju osnovnih okusa i drugih specifičnih svojstava ovisno o ciljanoj kategoriji proizvoda. Ovisno o senzorskim svojstvima proizvoda, trening može varirati između 10 i 120 sati (Pineau *i sur.*, 2022).

Važno da se treningom minimalizira mogućnost subjektivnog utjecaja pojedinog panelista na rezultate same analize. Ovisno o metodi i vrsti uzorka broj panelista varira od 5 do 10. Ocjenjivač je osoba koja prisustvuje u senzorskoj analizi uzoraka nekog proizvoda, a može

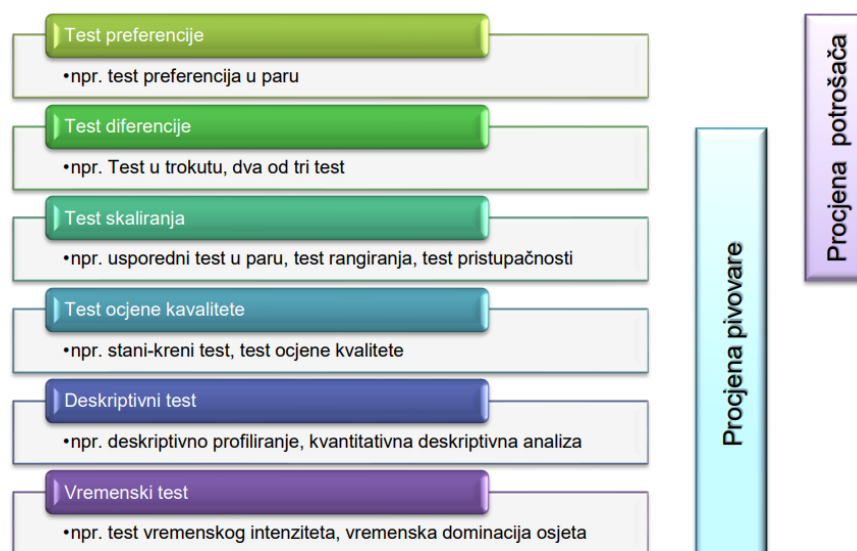
biti trenirani ocjenjivač sa prethodnim iskustvom ili osoba koja se po prvi puta susreće sa senzorskom analizom. Trening mora biti kratak ali učinkovit, kako ne bi izazvao otpor panelista. Cilj svake obuke je prepoznati mogućnosti svakog pivskog senzorskog panelista i pomoći mu da postigne svoj maksimum u razlikovanju što je moguće više okusa i mirisa (Parker, 2012).

2.4.1. Metode u senzorskoj analizi

Senzorske metode su se počele intenzivnije razvijati 1940-ih i 1950-ih, nakon što je za vrijeme Drugog svjetskog rata otkrivena važnost prehrane i razvoj novih proizvoda (Su *i sur.*, 2022). Mogu se podijeliti na analitičke ili metode sklonosti. U analitičke metode spadaju analize diskriminacije odnosno razlike i deskriptivni testovi, dok metode sklonosti uključuju hedonističke i preferencijske testove. Izbor metode ovisi o cilju ispitivanja (Stone, 2018).

Za provođenje senzorske analize pića najčešće se koristi QDA (kvantitativna deskriptivna analiza) čiji je pristup prepoznat i proučavan od Stonea i Sidela 2008. godine (Stone *i sur.*, 2008; Puri *i sur.*, 2016; Marques *i sur.*, 2022). Metoda uključuje obuku sudionika senzorskog panela za kvantificiranje specifičnih senzorskih svojstava proizvoda, te se kvantitativni deskriptori proizvoda dalje mogu statistički analizirati i prikazati grafički paukovom mrežom.

Metode ispitivanja preferencija pripadaju domeni potrošačkog testiranja i one bi se trebale provoditi izvan pivovara. Sve ostale metode mogu se koristiti u pivovari za rješavanje specifičnih problema testiranja (slika 9).



Slika 9. Senzorski testovi koji se koriste u industriji pića (Simpson, 2016)

Testovi razlika mogu se podijeliti na: *opće testove razlika* i *testove razlike obzirom na neko obilježje*. Cilj je da se prepoznaju razlike između uzoraka i da se prepoznaju razlike u intenzitetu ili pak jačini nekog obilježja. Testovi iz skupine *općih testova* razlika su: *test uspoređenja u paru*, *duo-trio test*, *test trokuta (Triangle test)*, *test dva od pet*, *jednostavni test razlika* i *test „A“-„nije A“*.

U industriji pića najčešće korišten senzorni test razlike je *Triangle test*, odnosno test trokuta koji je 1943. godine prvi puta proveden u Danskoj „Carlsberg“ pivovari (Stone i sur., 2008). Poželjan je što veći broj ispitanika od 20 do 40, no može biti i 12 ukoliko su razlike lako uočljive i velike među uzorcima. Na kraju se broji broj ispitanika koji su točno odabrali uzorak (Sinkinson, 2017).

Tetrad test je relativno novi test koji je uveden s ciljem da se minimiziraju problemi trokutastog testa. Pokušava se utvrditi postoji li uočljiva razlika između dva proizvoda, ali s 4 uzorka, dva piva A i dva piva B. Broji se broj ispitanika koji su ispravno grupirali uzorke a donosi se zaključak ovisno o broju kušača i razini pouzdanosti za proveden test (Lawless and Heymann, 2010). Glavni nedostatak je što zahtijeva 4 uzorka umjesto 3, što komplicira postupak i može izazvati zabunu za ispitanike naročito kod početnika (Habschied i sur.2022).

Testovi razlika u obilježjima koriste se za određivanje ima li ili nema razlike u intenzitetu karakteristike po kojem se dva ili više uzoraka međusobno razlikuju. Vrste testova koji se koriste iz skupine testova razlike s obzirom na obilježje su: *test nizanja parova*, *jednostavni test nizanja*, *test uspoređenja u paru*, *test višestrukog uspoređenja u paru* i *testovi razlika na više uzoraka* (Stone i Sidel, 2004).

Testovi sklonosti (afektivni testovi) za cilj imaju prikupiti mišljenja potrošača u svrhu razvoja novih proizvoda, ispitivanja tržišta, poboljšanja arome, teksture, okusa i optimizacije proizvoda. Lokacija na kojoj se provode testovi sklonosti može biti različita kao što je laboratorij, sajmovi, robna kuća, iznajmljeni prostori. Testovi sklonosti dijele se na kvalitativne i kvantitativne.

Kvalitativni testovi mjere subjektivan odgovor potrošača na senzorska obilježja uzorka putem intervjua ili u manjim skupinama. Tipovi kvalitativnih testova su:

Fokus grupe u kojoj je 10 do 12 potrošača koji su odabrani po nekom kriteriju, te imaju tri (3) puta jedan do dva sata zasjedanje.

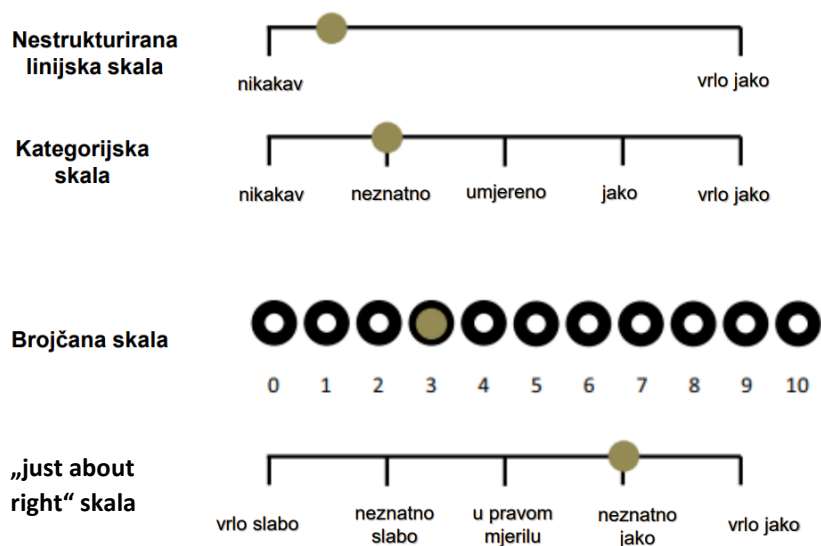
Fokus paneli, slična varijanta kako kod fokus grupe samo se ima puno više vremena.

Intervju gdje se radi razgovor sa potrošačima jedan na jedan.

Kvantitativni testovi prikupljaju pojedinačne odgovore velike grupe potrošača (50-400) na pitanja preferencije, dopadanja, senzorskih obilježja itd. Koriste se zbog određivanja sveukupne preferencije ili dopadanja proizvoda potrošaču, određivanja potrošačke preferencije ili dopadanja pojedinog senzorskog obilježja ili skupine obilježja, te mjerenju odgovora potrošača za određeno senzorsko obilježje. Tipovi kvantitativnih testova sklonosti su: *testovi preferencije* koji se koriste u situacijama kada se jedan proizvod suprotstavlja drugom kao poboljšani proizvod ili kao konkurencija. Potrošač odabire uzorak koji više preferira ili koji mu se više sviđa. Neki od testova koji se koriste su: preferencija u paru, nizanje preferencije, višestruka preferencija u paru (3 ili više uzoraka) ili višestruka preferencija uparu sa odabranim uzorcima.

Testovi prihvaćanja su slični testovima razlika u obilježjima, a ovdje je obilježje dopadanje ili prihvaćanje. Za testove prihvaćanja se koriste razne *hedonističke ljestvice* jer se njima najbolje izražava ne prihvatljivost do prihvatljivosti, tj. ne sviđanje do sviđanja (Lawless and Heymann, 2010).

Osim hedonističkih ljestvica koriste se i *linijske ljestvice* za procjenu jačine (veličine) sviđanja i kategorijske (slika 10) (Vilela i sur., 2019).



Slika 10. Različiti tipovi skala koji se koriste u senzorskim istraživanjima (Simpson, 2016)

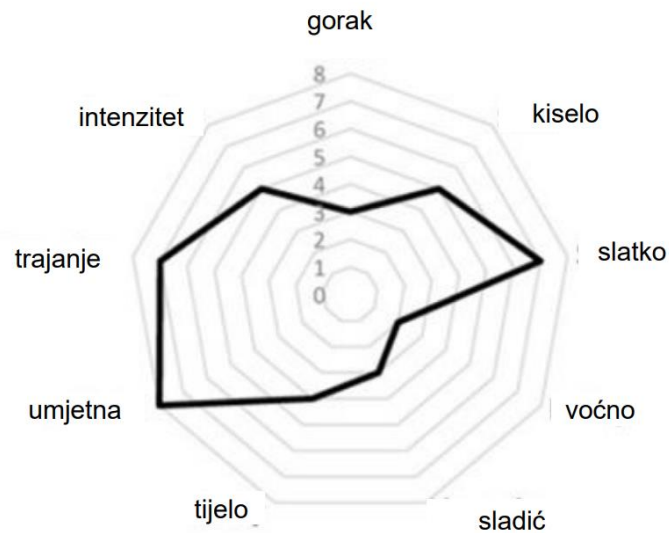
Opisne senzorske analize uključuju prepoznavanje i opis svih kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika hrane od strane treniranih panelista. Deskriptivne metode omogućuju karakterizaciju različitih osjetilnih podražaja opaženih tijekom doživljaja hrane putem vida, mirisa (ortonazalna percepcija arome), percepcije arome u ustima (retronazalna percepcija arome), okusa, teksture i percepcije zvuka (Pineau *i sur.*, 2022). Kvalitativni elementi deskriptivne analize opisuju vanjski izgled proizvoda, karakteristiku arome i okusa, teksturu u ustima dok kvantitativni elementi mjere intenzitet kvalitativnih elemenata raznim ljestvicama. Ljestvice mogu biti kategorijske (0-9), linijske (cm) i ljestvice procjene jačine odnosno volumena (Lawless and Heymann, 2010; da Costa Jardim *i sur.*, 2018).

QDA se koristi se za usporedbu prototipova proizvoda da se dobije informacija potrošača u odnosu na senzorska svojstva proizvoda, te za senzorsko mapiranje i usklađivanje proizvoda (Murray *i sur.* 2001). Također se koristi i za praćenje promjena na proizvodu tijekom vremena s obzirom na rok trajanja i učinak pakiranja, za istraživanje učinaka parametara proizvodnje za konačnu senzorsku kvalitetu proizvoda te za istraživanje percepcije potrošača o proizvodima. Za procjenu kvalitete odnosno prihvatljivosti proizvoda provode se deskriptivni testovi i hedonističke ljestvice (Gonzalez Viejo *i sur.*, 2019).

Postoji nekoliko različitih metoda deskriptivne analize: metoda profila okusa, metoda profila teksture, kvantitativna deskriptivna analizaTM, SpectrumTM metoda, kvantitativno profiliranje okusa, profiliranje slobodnog izbora i generička deskriptivna analiza. Deskriptivni testovi oslanjaju se na: profiliranje slobodnog izbora (FCR eng. *Free-choice profiling*) i kvantitativnu deskriptivnu analizu, QDA[®] (eng. *Quality descriptive analysis*) (da Costa Jardim *i sur.*, 2018).

Kvantitativna deskriptivna analiza (QDA) najčešće koristi kvantitativni deskriptivni test. Cilj analize nije samo identificirati prisutne okuse u pivu, nego i kvantificirati njihov intenzitet. QDA[®] se oslanja na identifikaciju okusa prisutnih u pivu, ali i na kvantificiranje njihovog intenziteta. Prilikom ocjenjivanja nije lako dati broj osjetilnoj percepciji, zato neki voditelji panela koriste riječi (gotovo neprimjetno, jasno uočljivo, preintenzivno) ali najčešće se koriste *numeričke ljestvice* (npr. ljestvica 1 do 5, ljestvica 0 do 9, 1 do 10 mjerilo). Iako se QDA uvelike koristio za opisivanje piva, ali izvorno je bio dizajniran za upotrebu uzorka s jednostavnim senzorskim profilima i smanjenim skupom deskriptora. Ova metoda zahtijeva intenzivnu i kontinuiranu obuku najmanje 8-10 panelista koja bi mogla identificirati 20-50 deskriptora piva. A za sve to je potrebno uložiti puno vremena, truda i novaca. Dobiveni podaci se prikazuju pomoću paukovog dijagrama (slika 11). Za određivanje statistike koriste

se grafikoni Pareto ili Waterfall koji omogućuju usporediti uzorke, dok je najkorisniji grafikon za analizu glavnih komponenti (PCA eng. *principal component analysis*) (Habschied i sur. 2022).



Slika 11. Grafički prikaz deskriptora piva „paukovom mrežom“(Habschied i sur. 2022)

Profiliranje po slobodnom izboru (FCP) može se provesti bez prethodne obuke panelista. Prilikom kušanja piva potrošače se zamoli da daju vlastiti opis dojma. Te se može dobiti vrlo detaljan profil okusa piva koji ponekad može biti primjenjiv samo za vlastitu pivovaru (Habschied i sur. 2022).

Test pitkosti sastoji se od prezentiranja nekoliko vrsta piva sa različitim omjerom slada i dodataka samim potrošačima. Pivo s najvećim popijenim volumenom označava se kao vrlo pitko, mogu se pratiti i drugi faktori, poput punoće želuca ili okusa. Cilj senzorske procjene je dobiti pojedinosti o organoleptičkim svojstvima piva putem treniranih panelista, dok se pitkost može provesti s posvećenim potrošačima (Habschied i sur. 2022). U senzorskoj analizi piva primjenjuju se i druge dinamičke metode mjerene tijekom vremena.

Jedna od dinamičkih metoda koja se još koristi u sensorici pića je **TDS (eng. Temporal Dominance of Sensations)** usmjerena je na deskriptore okusa i odnosi se na interakcije atributa. Omogućuje dopunske vremenske informacije, percipirane tijekom

procesa pijenja i povezuje ih s kvalitativnim promjenama koje nisu mjerljive uobičajenim metodama analize senzorskog profila (Habschied i sur. 2022).

Projektivno mapiranje (PM) je metoda procjene i opisivanja razlika među uzorcima. Slični uzorci se stave bliže jedan drugome, a oni različiti se smjeste dalje. PM često se koristi s ultra-flash profiliranjem (UFP) koje traži od sudionika da identificiraju vlastiti skup deskriptora (Hayward i sur., 2020). Pokazala se kao učinkovita metoda za istraživanje uparivanja hrane i pića. Afektivni pristup potkrepljuje kategorizaciju proizvoda na temelju izbora ili preferencija potrošača (Marques i sur., 2022).

Metodologija provjeri ih sve (check-all-that-apply) (CATA) i ocijeni ih sve (Rate-all-that-apply) (RATA) temelji se na principima već unaprijed odabranih pojmova, a mogu sudjelovati ispitivači bez prethodne obuke. Brza i jednostavna metoda koju je lako spojiti s afektivnim mjerenjima, kao što su primjerice hedonistički testovi (Alexi i sur., 2018). CATA pitanja su primijenjena na senzorsku karakterizaciju širokog spektra proizvoda različite složenosti. Što se tiče pića, njegova upotreba je za sok od jabuke, ledeni čaj, vino, pivo i mliječnu čokoladu (Sara R. Jaeger i sur., 2020). RATA je još jedna alternativa CATA metodi gdje potrošači ne samo da provjeravaju, već i ocjenjuju intenzitet svih svojstava proizvoda koje pronađu u ocjenjivanom proizvodu (Jaeger i sur., 2018).

Metoda preferiranih atributa (PAE) ispitivači određuju nekoliko opisnih pojmova za proizvode, nakon dogovora o tim svojstvima proizvoda oni rangiraju svoj intenzitet svidanja istih. Ova nova senzorska metoda može se koristiti s neobučanim panelom u samo jednoj sesiji. Definiranje najrelevantnijih deskriptora proizvoda za potrošače omogućuje industrijama da dizajniraju nove prehrambene proizvode koji zadovoljavaju preferencije potrošača (Himmler i sur., 2021).

Metoda diskretnog izbora (DCE) i najbolje-najgore skaliranje (BWS) u DCE-ovima bira se između dvije ili više mogućnosti. BWS se može provoditi putem tri različita pristupa: predmetni slučajevi, profilni slučajevi i više profilni slučajevi. U slučajevima profila, ispitanici biraju najbolje i najgore alternative s popisa razina dimenzija ili stavki (Silva i sur., 2020).

Polarizirano senzorsko pozicioniranje (PSP) je brza senzorska metoda koja se temelji na procjeni globalnih razlika između uzoraka i fiksnog skupa referentnih proizvoda, nazvanih polovi. Dvije su vrste PSP s različitim vrstama evaluacije: polarizirano senzorsko pozicioniranje na temelju stupnja različitih ljestvica i trijadno polarizirano senzorno pozicioniranje. U prvom, ljestvica se kreće od "potpuno isto" do "potpuno drugačije". U

posljednjem se od ocjenjivača traži da uzmu u obzir polove i pokažu koji je uzorak sličniji, a koji različitiji (Ares i sur. 2018).

2.4.2. *Senzorska procjena piva*

Najčešća svojstva piva koja zahtijevaju stalnu procjenu su svježina, kvaliteta, uravnoteženost, usklađenost sa tipom ili markom i pitkost. Okus i miris piva procjenjuje se radi dobivanja informacija o tome kako različiti ljudi reagiraju na različite proizvode, te da bi se utvrdilo koja skupina ljudi voli određenu vrstu piva. Unatoč postignutoj stabilnosti piva, sva su piva podložna promjenama senzorskih svojstava tijekom nekog vremena. Nepravilno skladištenje, transport i posluživanje piva utječe ili pak može narušiti njegova karakteristična senzorska svojstva. Da bi se osigurala kvaliteta piva na tržištu u pivovari se uobičajno provodi kontrola kvalitete prije i poslije pakiranja proizvoda, kod provjere piva prije puštanja na tržište i kod ocjenjivanja uzoraka s tržišta.

Senzorska procjena koristi pet osnovnih osjetila: olfaktometrijski (miris); okus (okus); haptic (dodir); optički (vid); akustik (sluh). Osnovna svojstva okusa su: slatko, kiselo, slano, gorko, umami. Pojam "osjećaj u ustima" podrazumijeva percepciju prehrambenog proizvoda na površini usne šupljine, primjerice učinak zagrijavanja alkohola, pjenušavost ugljičnog dioksida, masnoću i trpkost. Okus se može detektirati kada se uzorak stavi u usta te kad je pokrivena cijela unutrašnjost usne šupljine jer se okusni pupoljci za različite okuse nalaze se na različitim dijelovima jezika. Gorčina se može osjetiti prema stražnjoj strani jezika i tek nakon gutanja. Naknadni okus se može prepoznati nakon gutanja (Habschied i sur. 2022).

Početni proces identificiranja mirisa počinje u stražnjem dijelu nosa, kada hlapljive molekule uđu u nosnu šupljinu povezujući se izravno ili preko proteina koji vežu mirise, na receptore na vanjskoj površini resica i aktiviraju receptore na mirisni epitel (Mori and Sakano, 2011). Aroma je organoleptička karakteristika koja se percipira organom njuha preko hipofarinksa. Dinamika i mehanizam otpuštanja arome iz modelnih otopina pokazuju da je otpuštanje arome u alkoholnim pićima mnogo složenije nego u drugim pićima (Schmelzle, 2009).

Olfaktorni, okusni i taktilni osjeti su međusobno povezani i percipirani "okus" je rezultat vrlo složenih interakcija između osjetila. Povećana koncentracija ugljičnog dioksida u pivu povećava kiselost i smanjuju trpkost, dok viša koncentracija etanola i viši pH piva povećavaju percepciju gorčine. Prisutnost jedne tvari može pojačati ili umanjiti intenzitet

percepcije druge tvari. Na taj način, intenzitet mješavine komponenata može biti veći ili niži od zbroja pojedinačnih intenziteta, koji se nazivaju "sinergija" (Meilgaard *i sur.*, 2012).

Dodatak okusnim i mirisnim osjetima na kemijske doživljaje u nosu i ustima posredovan je trigeminalnim živcima. Velik raspon svakodnevnih okusa proizlazi iz trigeminalnih podražaja kao što su „štibanje“ mjehurića ugljikovog dioksida u gaziranim napitcima, „pečenje“ ljutih papričica, jetkost papra. Trigeminalni osjeti izazivaju oštrinu i suhoću u ustima, uzrokuju doživljaj stezanja obraza ili mišića na licu. Mehanizimi kojima nastaju ti podražaji nisu u potpunosti razjašnjeni, ali postoji teorija da se tanini vežu na proteine sline i mukopolisaharide koji su sastojci sline. Zbog toga se govori o jednom „paradoksu“ jer dolazi do nakupljanja i taloženja sline a ujedno se smanjuje sposobnost sline da obavija i vlaži oralna tkiva. To u konačnici rezultira doživljajima oštrine i suhoće u ustima čak i onda kada se u ustima nalazi tekućina (Lawless and Heymann, 2010).

Važne komponente koje utječu na ocjenu kvalitete piva su vizualna svojstva proizvoda boja, bistrina, volumen pjene i postojanost pjene. U korelaciji su sa prvim dojmom potrošača što ujedno dovodi do reakcije sviđanja ili nesviđanja proizvoda. Sadržaj alkohola u korelaciji je sa slatkoćom, sadržaj ugljičnog dioksida povezan je sa vizualnim svojstvima proizvoda, osjećajem u ustima, otpuštanjem aroma. Ujedno odsutnost neugodnih okusa uvelike utječe na prihvaćanje proizvoda među potrošačima. Obilježja kvalitete piva ovise o tipu piva, ali neka osnovna svojstva proizvoda uključuju: ugodan, karakterističan miris; visok osjećaj u ustima; dobru punoću (tijela); gorčina dobre kvalitete (nije opora) i bez neugodnih okusa. Kod procjene izgleda treba procijeniti dubinu pivske pjene, veličinu i boju mjehurića pjene, koja se lijepi za čašu tijekom konzumiranja, boju i bistrinu piva.

Neke metode senzorske procjene ne uzimaju u obzir izgled jer se on može odrediti upotrebom fizikalno-kemijskih metoda u laboratoriju. Danas postoje dvije glavne metode za mjerenje boje piva, SRM i EBC. EBC (European Brewery Convention) je jedna od najraširenijih u Europi, a SRM (Standard Reference Method) se češće koristi u Sjedinjenim Američkim Državama. Numeričke vrijednosti za boju piva ne podudaraju se uvijek s vizualnom percepcijom boje za svjetle i tamne nijanse piva. U tablici 3 su prikazane različite nijase boje piva od najsvjetlijeg deskriptora prema najtamnijem deskriptoru prema vrijednosti za SRM.

Tablica 3. Prikaz deskriptora piva od najsvjetlijeg prema najtamnijem (Parker, 2012)

BOJA DESKRIPTORA	SRM
<i>Jako svjetlo</i>	1-1,5
<i>Slama</i>	2-3
<i>Pale</i>	4
<i>Zlatno</i>	5-6
<i>Amber lagano</i>	7
<i>Amber</i>	8
<i>Srednje amber</i>	9
<i>Bakar/</i>	10-12
<i>Svjetlo smeđe</i>	13-15
<i>Smeđe/crveno smeđe/kesten smeđa</i>	16-17
<i>Tamno smeđe</i>	18-24
<i>Jako crno</i>	25-39
<i>Crno</i>	40+

Kvaliteta okusa i stabilnost piva vrlo je važna za potrošača jer to utječe na naviku kupnje istog proizvoda i samim time se preferira pojedina marka piva. Kada mikotoksini kontaminiraju sirovine koje se koriste u pivarstvu, u konačnici mogu utjecati na proces fermentacije i konačne karakteristike piva. Neki od glavnih učinaka mikotoksina na senzorska svojstva piva mogu imati gorak ili metalni okus koji narušava uobičajeni okus piva. Također, mogu utjecati na aromu piva, dajući mu nepoželjne mirise koji nisu karakteristični za određeni stil piva. Određeni mikotoksini mogu izazvati promjene u boji piva, kao i smanjenje bistrine, što može negativno utjecati na njegovu vizualnu privlačnost. Mikotoksini mogu utjecati na stabilnost pjene piva, što je važan faktor u njegovoj senzorskoj ocjeni.

Jedan od parametara koji također utječe na proizvodnju hlapljivih spojeva poput estera je kontaminacija mikotoksinima, koja se može pojaviti u različitim fazama proizvodnje piva. Polarni mikotoksini se zbog svoje bolje topljivosti u vodi i termostabilnosti mogu se prenijeti iz zrna žitarica u slad, a zatim u pivo (Humia *i sur.*, 2019). Istraživanja o učinku kontaminacije sladovine mikotoksinima na hlapljive spojeve alkoholne fermentacije otkrile su da neki mikotoksini (uglavnom AFB1 i DON) mogu inhibirati alkohol dehidrogenazu. Rezultat je povećanje koncentracije acetaldehida i drugih nepoželjnih hlapljivih spojeva sintetiziranih tijekom alkoholne fermentacije ali to nema utjecaja na ukupni sadržaj estera (Gómez-López, 2020). Na temelju svih dosadašnjih relevantna istraživanja, uzimajući u obzir sve navedene čimbenike o mikotoksinima u sirovinama koje se koriste za proizvodnju craft piva, pružaju informacije o nastanku i sudbini spojeva tijekom procesa kuhanja piva koji utječu na senzorska svojstva piva (Mastanjević *i sur.*, 2018)

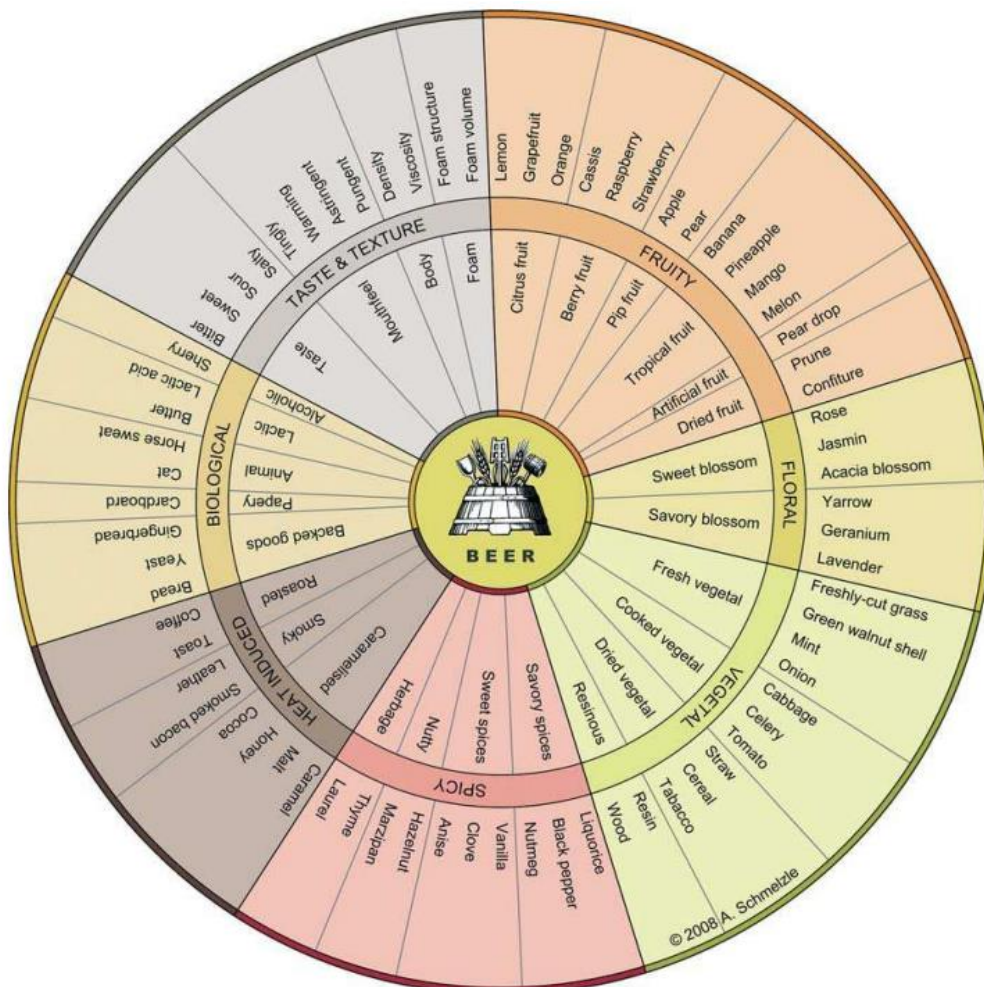
Mnogi prehrambeni proizvodi, uključujući i pivo, mogu se ocjenjivati putem elektronskog nosa ili jezika. Senzorsko ocjenjivanje gdje je mjerni instrument čovjek bolji je izbor jer panelisti mogu uzeti u obzir i pružiti holistički doživljaj kušanog piva. Određivanje kvalitete u prehrambenoj industriji, posebice u pivarstvu, vrlo je teško jer potrošači imaju različito stajalište o tome što za njih znači kvalitetan proizvod. Za neke je kvaliteta povezana s ekskluzivnošću i visokom cijenom. Drugi pak vide kvalitetu kao pristupačnu, a ne skupu ili proizvode koje tradicionalno kupuju godinama. Da bi se imao zadovoljni potrošač, važno je isporučiti proizvod bez grešaka, konzistentan sa svim prethodnim serijama s odgovarajućim senzorskim profilom (Schabo *i sur.*, 2021).

2.4.3. Kotač okusa piva

Za provođenje senzorske analize i dobivanje pouzdanih podataka potrebno je formirati i dobro educirati panel. Najvažniji dio obuke za senzorsko ocjenjivanje piva je korištenje sti ardizirane, međunarodno priznate terminologije. Zajedničkim naporima Europske konvencije o pivarstvu, Američke udruge kemičara pivara i Master Brewers of America rezultirali su sti ardiziranom terminologijom grafički izraženom kotačem okusa piva (slika 12) (Simpson, 2016). Kotač okusa može se vidjeti u različitoj literaturi uz dopuštenje Američkog društva kemičara piva, St. Paul, MN, SAD (Langstaff *i sur.* 2018). Kotač okusa sastoji se od 14 različitih osnovnih pojmova okusa koji su uobičajeni u tehnologiji proizvodnje piva kao aromatični, žitarice, osjećaj u ustima itd.. Kako bi se usko opisao okus, pojmovi su podijeljeni na izraze 1. razine (alkoholno, slično otapalu, itd.) i pojmove 2. razine (ljuto, drvenasto, orah, itd.). Postoje 44 objektivna pojma prve razine i 78 uvjeta druge razine. (Habschied *i sur.* 2022).

Aroma kotači daju terminologiju za lakši senzorski opis proizvoda. Razvijeni su kako bi pomogli ljudima koji su odgovorni za kontrolu kvalitete i razvoj proizvoda, te za lakšu međusobnu komunikaciju upravo korištenjem nedvosmislene terminologije iz kotača okusa. Meilgaard je prije 30 godina razvio kotač okusa piva. Njegov razvoj bio je važna prekretnica u uspostavljanju prihvaćene terminologije za senzorsku znanost o pivu. Ona i dalje služi kao osnova za izbor opisnih pojmova testova profiliranja. Kako bi se zajamčila dosljedna uporaba jezika, potrebno je revidirati postojeću terminologiju piva. U Meilgaardovom kotaču okusa,

mirisna, okusna i haptička osjetilna percepcija se preklapaju i nekoliko pojmova nije jasno usklađeno s osjetilnim opažajima. Za komunikaciju s panelistima važno je da i oni razumiju terminologiju. Kotač arome piva predstavlja kotač koji je strukturiran prema senzorskim standardima. Čak i ljudi koji nemaju poznavanje na koji se način razvijaju okusi u pivu mogu ga koristiti za opisivanje osjetilnih percepcija. Kotač pomaže ocjenjivačima u opisu pozitivnih i poželjnih karakteristika piva (Schmelzle, 2009).



Slika 12. Kotač arome piva za komunikaciju s potrošačima (Schmelzle, 2009)

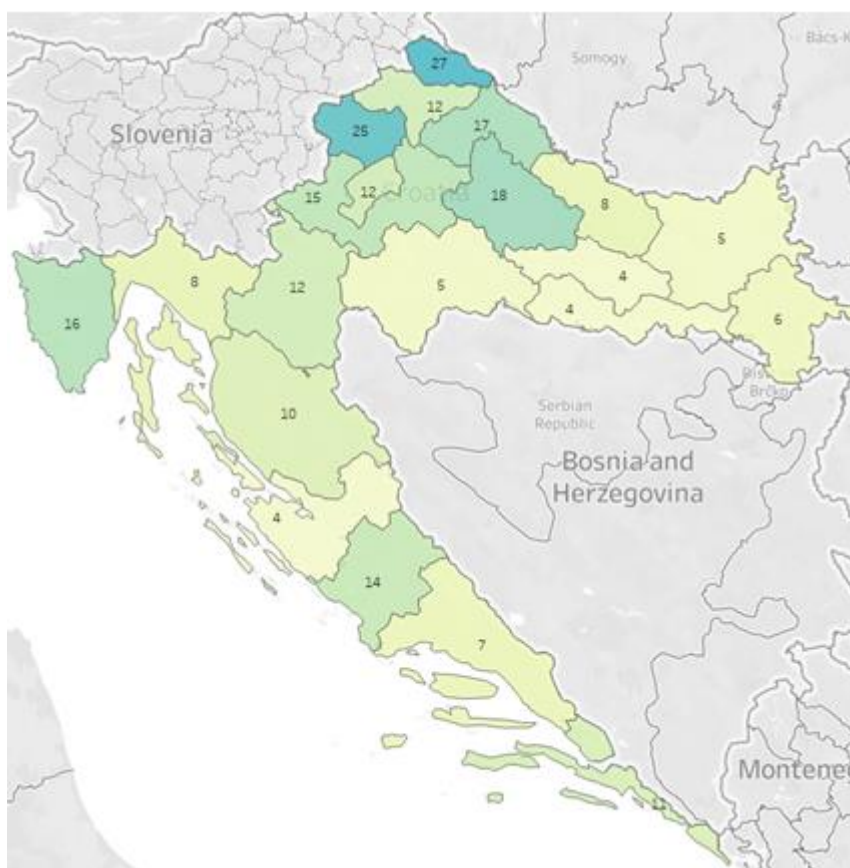
3. MATERIJALI I METODE

3.1. **MATERIJALI**

3.1.1. **Sirovine (hmelj, slad, kvasac, voda) i craft piva**

U istraživanju je obuhvaćeno 20 županija Republike Hrvatske zajedno sa Gradom Zagrebom. Iz svake županije sudjelovalo je od jedne do tri craft pivovare održavajući reprezentativnost unutar županije.

Prikupljeno je 60 uzoraka craft piva kao i sirovine koje se koriste za proizvodnju piva od toga: 86 uzoraka slada, 62 uzorka hmelja, 31 uzorak kvasca i 30 uzoraka vode, te šest komercijalnih piva koja su poslužila kao referentni uzorak za usporedbu sa craft pivama (slika 13).



Slika 13. Ukupna distribucija prikupljenih sirovina i craft piva po županijama (autor)

Tipovi craft piva koji su uzorkovani: lager, pilsner, pale ale, ale, amber ale, indijski pale ale (IPA), američki blond ale (ABA), blond ale i porter, stout. Odabrani tipovi piva za svako specifično pivo pokazuju različite razine boje, ekstrakta i sadržaja etanola. Uzorci piva prikupljeni su direktno od craft proizvođača i kuhani na istim ili pak različitim mjestima.

Tablica 4. Popis tipova i broj uzoraka craft i industrijskih piva (autor)

<i>Tipovi piva</i>	<i>Broj uzoraka</i>	<i>Oznake uzoraka</i>
Lager	19	B01, B13, B14, B16, B17, B32-B38, B40, B42, B43, B45, B46, B48, B54
Pilsner	3	B41, B44, B47
Pale ale	9	B39, B50 – B53, B56 - B59
Ale	8	B03, B15, B19, B20 - B23, B55
IPA	7	B07 - B12, B24
Amber ale	2	B49, B60
American blonde ale	3	B02, B29, B30
Blonde ale	5	B25 - B28, B31
Porter	2	B04, B05
Stout	2	B06, B18
Industrijska piva	6	BI05-BI10

3.1.2. Hranjive podloge

Selektivne hranjive podloge za mikrobiološku analizu hmelja i slada:

- PDA (Potato Dextrose Agar), Liofilchem i DG 18 agar, Liofilchem

3.1.3. Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Stupanj čistoće</i>	<i>Proizvođač</i>
acetonitril	≥ 99%	<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>
bakrov sulfat pentahidrat	99%	<i>Honeywell, SAD</i>
cinkov sulfat heptahidrat	99%	<i>Merck KgaA, Njemačka</i>
octena kiselina	99,50%	<i>Avantor, SAD</i>
sumporna kiselina	96%	<i>Merck KgaA, Njemačka</i>
HiPerSolv Chromanorm HPLC	≥ 99%	<i>VWR Chemicals (Beč, Austrija)</i>
gradijent acetonitrila		
Metanol LC-MS Chromasolv	≥ 99%	<i>Honeywella (Seelze, Njemačka)</i>
amonijev acetat	≥ 97 %	<i>Sigma-Aldricha (Beč, Austrija)</i>
glacijalna octena kiselina (p.a.)	99,80%	<i>Sigma-Aldricha (Beč, Austrija)</i>
Referentni sti ardi mikotoksina i gljivičnih metabolita	/	<i>(Sulyok i sur.2020)</i>
Kloramfenikol		<i>Carl Roth (Njemačka)</i>

3.1.4. Laboratorijski probor

- Automatske pipete
- Nastavci za automatske pipete (0,1-1000 µL)
- Staklena čaša (50 mL, 250 mL, 1000 mL)
- Štapić po Drigalskom
- Sterilne staklene boce s navojem od 250 mL
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice
- Plastične epruvete, sterilne (50 mL, Falcon)
- Plastične tubice (2 mL, Eppendorf)
- Stalak za plastične tubice
- Kivete za spektrofotometar

3.1.5. Uređaji i ostala oprema

- a. Uređaj za određivanje mikotoksina; *Agilent 1290 UHPLC-u* s binarnom pumpom, 1290 infinity
 - autosampler spojeni sa Sciex® QTRAP 5500 MS/MS detektorom s elektrosprejnim izvorom ionizacije
 - kolona Gemini C18, 150 × 4,6 mm Phenomenex, Torrance, CA, SAD

- b. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UHPLC): *Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD*; i pripadajućim djelovima:
 - crpka (G7104A 1290 Flexible Pump);
 - injektor (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnica,
 - analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama,
 - detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID) i
 - računalni program za kromatografiju (OpenLAB CDS)

- c. Ostala oprema

<i>Uređaj za četvrtanje žitarica</i>	RETSCH Riffelteiler 12.5
<i>Laboratorisjski mlin</i>	<i>Perten 3610</i>
<i>spektrofotometar</i>	<i>ONDA TOUCH UV-21, Prag</i>
<i>Vortex, Witeg VM -10,</i>	<i>Witeg, Wertheim, Njemačka</i>
<i>Centifuga, Witeg CF-10</i>	<i>Witeg, Wertheim, Njemačka</i>
<i>Refraktometar</i>	<i>ORA 3AA, KERN</i>
<i>pH metar</i>	<i>EC-30-pH, Phoenix</i>
<i>Tresilica GFL 3017</i>	<i>Gemini, NL</i>
<i>Tehnička vaga, Kern T572</i>	<i>Kern and Sohn Gmbh, Belingen</i>
<i>Analitička vaga, SOLIS ADAM SAAB 225i</i>	<i>Adam Equipment , UK</i>
<i>Oprema za filtraciju otopina</i>	<i>(0,20 μm, 0,47 μm); Magna, GE</i>
<i>Najlonski filteri</i>	<i>Water i Process Technologies, Michigan, SAD</i>
<i>Autoklav</i>	<i>BIOBASE, Kina</i>
<i>Hadnjak, 1A60404B1VN</i>	<i>Končar</i>
<i>Zamrzivač, RFNE312E43WN</i>	<i>Beko</i>
<i>Ultazvučna kupelj, DU-100</i>	<i>Agro Lab</i>
<i>Laboratorijski mikroskop, TENSION B1-252</i>	<i>Labena</i>
<i>Kabinet s laminarnim strujanjem zraka, BSC-2000II A2-X</i>	<i>Kina</i>
<i>Inkubator, POL-EKO-SP.J. ST 2B SMART</i>	<i>POL-EKO, Poljska</i>

3.1.6. *Trenirani panelisti iz Carlsberg Croatia pivovare, Koprivnica*

Za kvalitetno i pouzdano provođenje kvantitativne deskriptivne analize (QDA) na uzorcima craft piva, potrebno je imati pouzane i dobro trenirane paneliste. Da bi se dobili što pouzdaniji i relevantniji rezultati za ovaj doktorski rad senzorsko ocjenjivanje craft piva QDA metodom proveli su trenirani panelisti iz Carlsberg Croatia, Koprivnica. Cilj je bio imati panel koji je u mogućnosti identificirati uobičajene okuse piva od neugodnih okusa i kontaminanata niske koncentracije i samim time osigurati dosljedno ocjenjivanje intenziteta u širokom rasponu okusa prema dobivenim uputama.

3.2. *METODE*

3.2.1. *Uzorkovanje sirovina i uzoraka craft piva*

Uzorci slada, hmelja, kvasaca, vode i piva uzorkovani su sukladno uputama Europske komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (EC, 2006). Kod uzoraka hmelja i slada odvojio se poduzorak za mikološku analizu. Uzorci slada i hmelja reducirali su se do laboratorijskog poduzorka četvrtanjem pomoću uređaja *RETSCH Riffelteiler 12.5*, a ostatak slada se usitnito pomoću mlina *Perten 3610*. Tako samljeveni uzorci slada i hmelja čuvali su se na -22 °C, a pivo na 4 °C do provođenja analize mikotoksina i fizikalno-kemijske analize.

3.2.2. *Mikološka analiza hmelja i slada*

Mikološka analiza hmelja i slada provodila se u mikrobiološkom laboratoriju uzgojem plijesni na selektivnim hranjivim podlogama kroz 7 dana na 25 °C, a makroskopskim i mikroskopskim pretraživanjem odredile su se plijesni do razine roda. Rezultati su poslužili u koreliranju između pojavnosti rodova plijesni i mikotoksina u navedenim uzorcima te radi usporedbe s rezultatima ostalih istraživanja.

3.2.3. Fizikalno- kemijske analize uzoraka craft piva

Za određivanje parametara fizikalno-kemijske analize svi uzorci craft piva prethodno su bili dekarbonizirani u ultrazvučnoj kupelji 30 min do nestanka pjene, što je pokazatelj da pivo ne sadrži CO₂. Iz dekarboniziranih uzoraka craft piva izravno se analiziralo:

3.2.3.1. Određivanje pH

pH vrijednosti uzoraka izmjerena je na prethodno dekarboniziranim uzorcima pomoću pH-metra (da Costa Jardim *i sur.*, 2018).

3.2.3.2. Određivanje ukupnog ekstrakta

Ukupni ekstrakt čija je vrijednost izražena kao °Brix, izmjeren je uz pomoć digitalnog ručnog uređaja (*ORA 3AA, KERN*) uz prethodno kalibriranje destilaranom vodom (*Humia i sur.*, 2020).




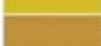









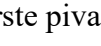
3.2.3.3. Određivanje boje craft piva

Boja piva određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije craft piva u kvarcnim kivetama na 430 nm pomoću spektrofotometra ONDA TOUCH UV-21 kako bi se dobila EBC boja. Uzorci piva su prethodno bili dekarbonizirani na ultrazvučnoj kupelji zatim se očitavala vrijednost apsorbance. Ukoliko vrijednost apsorbancije nije bila u linearnom području spektrofotometra, uzorak je bilo potrebno razrijediti (deLange, 2008; da Costa Jardim *i sur.*, 2018). Ovom metodom očitana apsorbancija je množena s faktorom 12,7 za SRM ili 25 (1) za određivanje boje u EBC jedinicama (2), pri čemu D predstavlja razrjeđenje uzorka:

$$A_{430 \text{ nm}} \cdot D \cdot 12,7 = \text{SRM} \quad [1]$$

$$A_{430 \text{ nm}} \cdot D \cdot 25 = \text{EBC} \quad [2]$$

Na slici 14 je prikazan raspon EBC vrijednosti za određene vrste piva

SRM/Lovibond	Primjer	Boja piva	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

Slika 14. Prikazuje pripadajuće boje za različite vrste piva odnosno vrijednost boje u EBC jedinicama (prilagođeno iz deLange, 2008)

3.2.3.4. *Određivanje šećera, masnih kiselina i etanola u uzorcima craft piva tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)*

Prije same analize, dekarbonizirani uzorci craft piva su centrifugirani kako bi se izdvojio supernatant. Nakon toga, supernatant dobro je pomiješan u omjeru 1:1 (vol/vol) s 10% vodenom otopinom $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ kako bi se istaložili proteini. Taloženje proteina se provodilo 20 min, zatim su se istaloženi proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem 10 minuta na $4000 \text{ okr min}^{-1}$. Nakon centrifugiranja u obilježene epice otpipetira se 1 mL razrijeđenog uzorka te se doda 1 mL demineralizirane vode. Naposljetku, uzorak se profiltrira u vijale kroz najlonski filter za šprice promjera pora $0,2 \mu\text{m}$. Pripremljeni uzorci su se zatim analizirali tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UHPLC).

Za kvantificiranje koncentracije šećera (glukoze, fruktoze, maltoze, maltotroze), masnih kiselina, glicerola i etanola korištena je analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (15 cm x 7,2 mm, Phenomenex, SAD), a kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi 0,0025 M, temperatura pećnice iznosila je 60 °C,

temperatura RID detektora 40 °C, a volumen injektiranog uzorka je 10 µL uz brzinu protoka mobilne faze od 0,6 mL min⁻¹ s vremenom rada od 15 minuta . Rezultati su izraženi kao g L⁻¹. Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Marđetko, 2022).

3.2.4. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu, craft pivu, kvascu i vodi

Određivanje mikotoksina i njihovih metabolita u uzorcima slada, hmelja, kvasca, vode i piva provodilo se prema validiranoj metodi koju su objavili Sulyok i sur. (2020) na QTrap 5500 MS / MS sustav (Sciex, Foster City, CA, SAD) koji je opremljen s TurboV izvorom ionizacije elektrospreja (ESI) te je spojen na UHPLC sustav serije 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Kromatografsko odvajanje provedeno je na 25 °C na Gemini kolonama C18, 150 × 4,6 mm i.d., veličine čestica od 5 µm, opremljenog zaštitnim uloškom C18, 4 × 3 mm i.d. (oba Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Elucija je provedena u binarnom gradijentnom načinu rada s protokom od 1000 µLmin⁻¹. Obje mobilne faze sadržavale su amonijev acetat od 5 mM i sastojale su se od metanola/vode/octene kiseline 10:89:1 (v/v/v; eluent A) odnosno 97:2:1 (v/v/v; eluent B). Nakon početnog vremena od 2 min na 100 % A, udio B je linearno povećan na 50 % u roku od 3 minute. Nakon daljnjeg linearnog povećanja od B do 100 % unutar 9 min slijedilo je vrijeme zadržavanja od 4 min pri 100 % B i ponovna ravnoteža stupca od 2,5 min na 100 % A. Volumen ubrizgavanja bio je 5 µL. ESI-MS/MS je izveden u planiranom načinu višestrukog praćenja reakcija (sMRM) u pozitivnom i negativnom polaritetu u dva odvojena kromatografska ciklusa. Vrijeme ciljanog ciklusa bilo je 1000 ms, vrijeme pauze MS-a 3 ms, a širina prozora za otkrivanje bila je 40, odnosno 52 s u pozitivnom i negativnom ESI načinu rada (Sulyok *i sur.*, 2020).

3.2.5. Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA)

Kvantitativnom deskriptivnom analizom (QDA) odredio se senzorski profil na 60 uzoraka craft piva od toga je šest komercijalnih piva koja su dostupna u trgovinama kroz cijelu godinu na području Republike Hrvatske. QDA analiza na uzorcima craft piva provedena na Sveučilištu Sjever od strane stručnog panela iz pivovare „Carlsberg Croatia“ u Koprivnici. Skupinu ocjenjivača je činilo sedam educiranih panelista, tri muškaraca i četiri

žene između 25 i 50 godina starosti, u zdravom stanju. Panelisti unutar svoje kompanije provode redovite treninge upotrebom testova za prepoznavanje i skaliranje intenziteta pojedinačnih nota okusa piva uz pomoć Aroxa certificiranih standarda okusa. Raspon certificiranih standarda okusa sadrži preciznu količinu praškastog senzorski čistog materijala okusa i nano-inkapsuliranog za stabilnost proizvedenog u njihovom laboratoriju Pharma-GMP (Aroxa, 2024).

Prije same provedbe deksriptivnog testa panelisti su dobili sve upute ocjenjivanja, upoznati su sa kotačem okusa (Schmelzle, 2009) i pripadajućim deskriptorima „flavore“ i „offlavore“ piva koji se mogu pronaći u pivu a nalaze se na obrascu A (Prilog 8). Panelisti su morali označiti intenzitet prepoznatog deskriptora piva na skali od 0 do 9. Te intenzitet dojma senzorskog profil okusa na skali od 0 do 100 obzirom na prepoznati deskriptor (tablica 5).

Tablica 5. Prikaz raspona skale intenziteta okusa općeg dojma piva (autor)

<i>Senzorski profil okusa</i>	<i>Opis osobine piva</i>	<i>Skala intenziteta</i>
<i>loše</i>	Nepitko piće /i sa nekoliko intenzivnijih neugodnih okusa i mirisa	0-25
<i>Ni loše ni dobro</i>	Piće s neugodnim mirisom/okusom na niskoj razini i/ili nejednakim osobinama okusa	25-50
<i>dobro</i>	Svježije piće koje ima karakterističnu osobinu okusa/mirisa na blago povišenoj razini	50-75
<i>vrlo dobro</i>	Savršen primjer pića	75-100

Ocjenjivanje uzorka je obavljeno u odgovarajućoj osvijetljenoj prostoriji bez neugodnih mirisa i buke, temperatura prostorije je bila 22 °C. Uzorci piva su prije provođenja testa čuvani u hladnjaku na 4 °C, te su prije degustiranja držani na sobnoj temperaturi 10 minuta. Svakom ki idatu se poslužilo oko 30 mL svakog piva u plastičnim čašama koje su bile kodirane troznamenkstnim brojem bez prethodnog znanja ocjenjivača o proizvođaču piva koje se ocjenjuje. Tijekom provedbe senzorske procjene panelisti su između svakog uzoraka dobili vodu i suhe neslane grisine za neutraliziranje nepca.

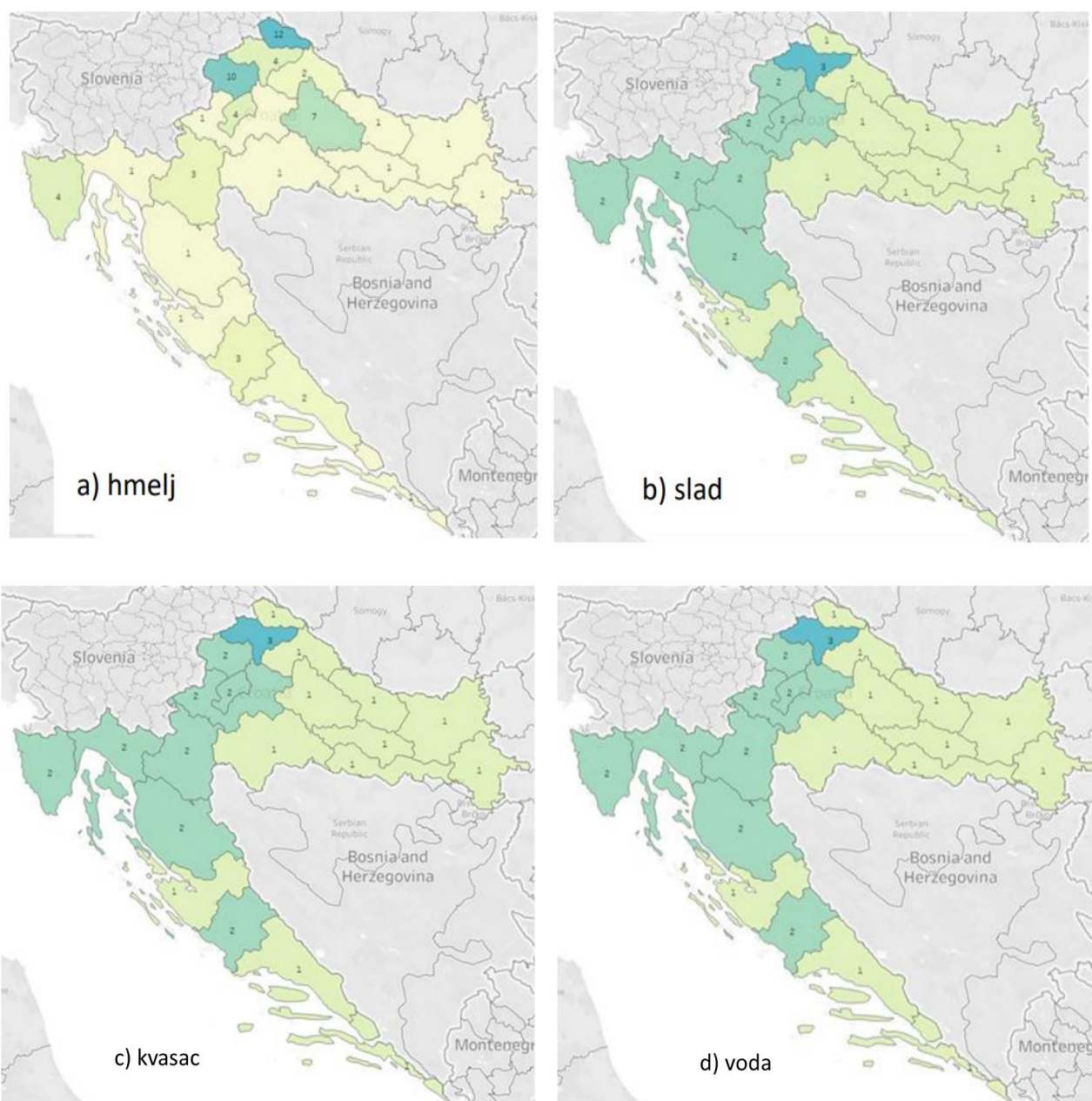
3.2.6. Statistička analiza

Statistička analiza podataka provedena je upotrebom Microsoft Excel 2016, Statistica 13.3, Tableau 2023.1.1. te Minitab 20.4. softverskog paketa. Rezultati dobiveni QDA metodom grafički su prikazani „paukovim mrežama“. Osnovna deskriptivna statistika pripremljena je korištenjem Statistica 13.3. paketa. Ispitana je normalnost distribucije podataka pomoću Shapiro-Wilksovog W testa, te homogenost varijance pomoću Levenovog testa. Temeljem tih rezultata odabrani su daljnji testovi koji se smiju koristiti za usporedbu između pojedinih skupina podataka (ANOVA ili Kruskal-Wallis ANOVA), odnosno kod usporedbe između dvije varijable (T-test ili Mann Whitney U test). Provjerena je korelacija korištenjem Pearsonovog i/ili Spearmanovog koeficijenta. U Tableau 2023.1.1. napravljene su toplinske mape prosjeka pojavnosti mikotoksina u pivima s obzirom na županije iz koje dolaze. Za provjeru povezanosti varijabli korišten je Minitab 20.4. softver gdje su sve varijable uspoređene pomoću PCA testa, te su prema potrebi grupirane u pojedine skupine kako bi se lakše utvrdila povezanost. Razlika u distribuciji podataka smatrat će se statistički značajnom ukoliko je $p < 0,05$.

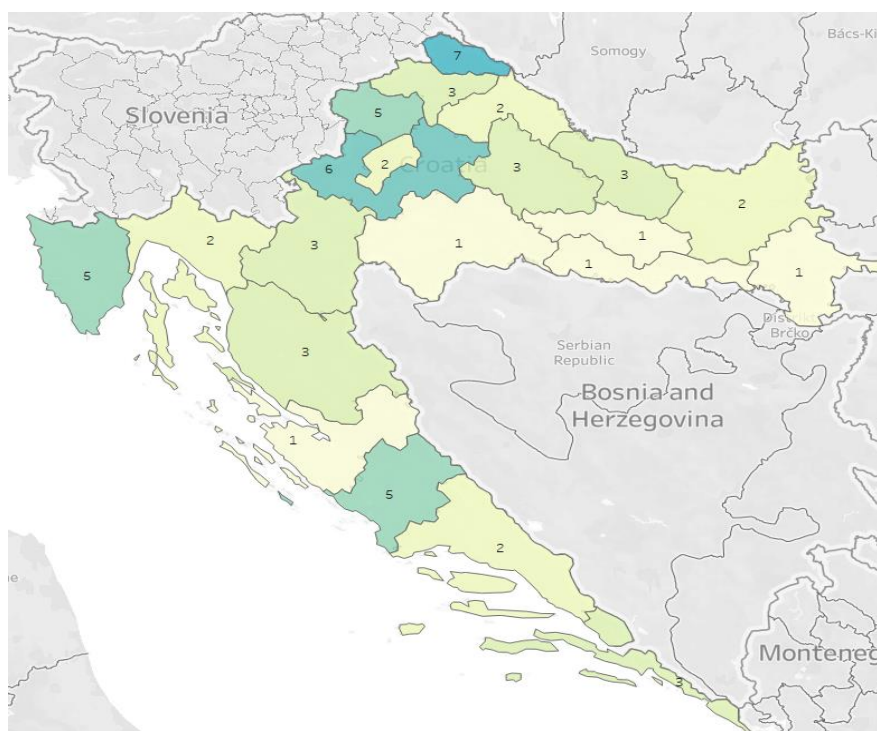
4. REZULTATI

4.1. Uzorkovanje sirovina i uzoraka craft piva

Uzorci slada, hmelja, kvasaca, vode i piva uzrokovani su sukladno uputama Europske komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani (EC, 2006). U nastavku na slici 15 može se vidjeti distribucija za sve sirovine i craft piva po županijama.



Slika 15. Distribucija uzorkovanja sirovina po županijama: a) hmelj, b) slad, c) kvasac i d) voda. Veći broj uzoraka je tamno zelene boje, a manji broj uzoraka je svjetlije zelene boje (autor)



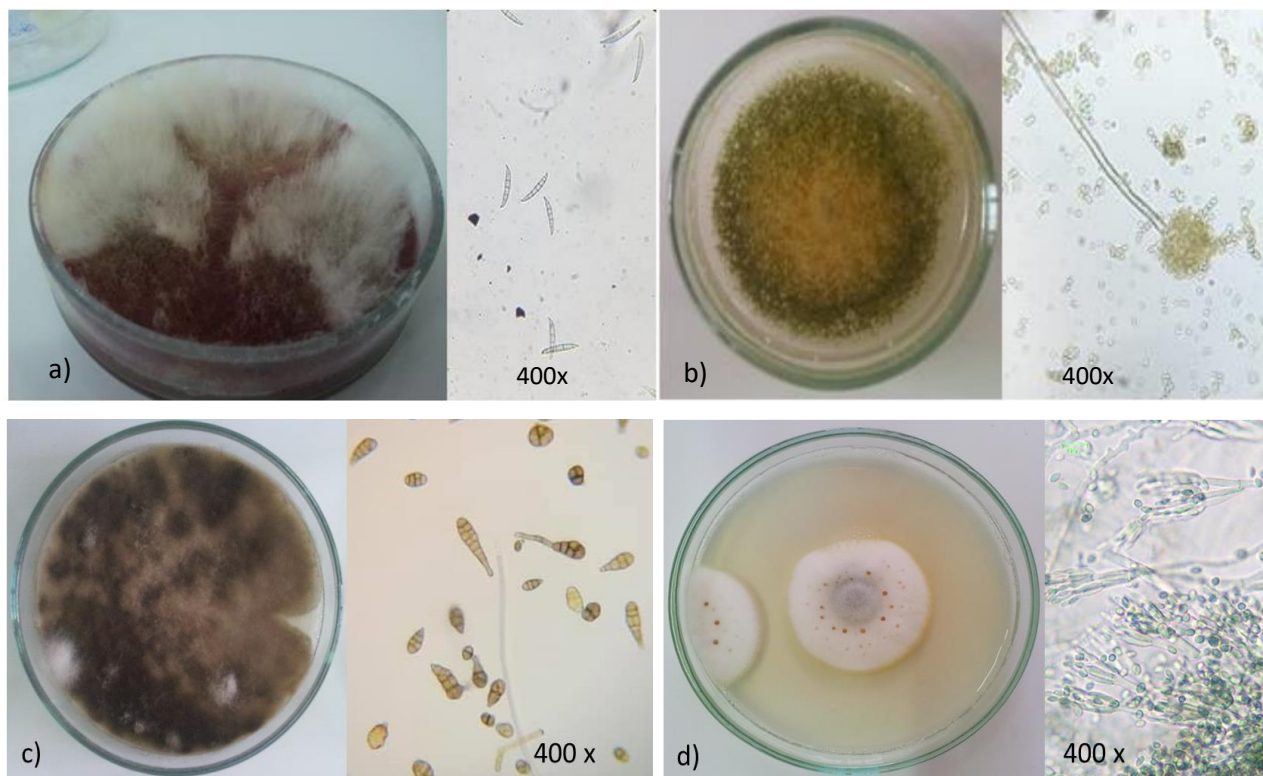
Slika 16. Distribucija uzorkovanja craft piva po županijama. Veći broj uzoraka je tamno zelene boje, a manji broj uzoraka je svjetlije zelene boje (autor)

4.2. Mikološka analiza hmelja i slada

Mikološka analiza uzoraka slada i hmelja provedena je na selektivnim hranjivim podlogama PDA i DG 18 kroz 7 dana na 25 °C, a rezultati stupanj onečišćenja slada i hmelja plijesnima su prikazani u tablici 6 i slici 17.

Tablica 6. Stupanj onečišćenja slada i hmelja plijesnima (autor)

<i>Plijesni</i>	Broj pozitivnih uzoraka			
	Slad		Hmelj	
	n/86	%	n/62	%
<i>Aspergillus sp.</i>	86/86	100	n/d	0
<i>Penicillium sp.</i>	75/86	87	n/d	0
<i>Alternaria sp.</i>	86/86	100	62/62	100
<i>Fusarium sp.</i>	86/86	100	61/62	98



Slika 17. *Alternaria* (a) i *Penicillium* (b) - kolonije plijesni na PDA podlozi nakon 7 dana pri 25 °C i mikroskopska slika plijesni pri povećanju 400x a) *Fusarium*; b) *Aspergillus*; c) *Alternaria*; d) *Penicillium* (autor)

4.3. *Fizikalno - kemijske analize uzoraka craft piva*

Svi uzorci craft piva prije same analize prethodno su bili dekarbnoizirani, a u tablicama 7 do 17 prikazane su vrijednosti fizikalno – kemijskih analiza uzoraka prema tipu craft i industrijskih piva.

Tablica 7. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipa *lager* craft piva (autor)

1. Tip piva: LAGER	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,86	14,52	29,00	5,96	1,03	3,01	2,83	0,57	0,36	1,19	1,97	4,87
standardna devijacija	0,31	18,18	36,35	0,78	0,04	1,60	1,23	0,80	0,17	1,12	0,92	0,98
Min. vrijednost	4,10	3,49	6,87	5,00	1,021	1,30	0,89	0,01	0,04	0,11	0,42	3,61
Maks. vrijednost	5,30	66,86	133,7	8	1,029	4,45	6,35	2,24	0,75	4,55	4,03	7,22
*>LOD	19	19	19	19	19	3	19	15	19	19	19	19
postotak (%)	100	100	100	100	100	16	100	79	100	100	100	100

*>LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 8. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *pilsner* craft piva

2. Tip piva: PILSNER	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	5,07	4,95	9,90	5,60	1,02	0,00	2,82	0,04	0,39	0,92	1,96	4,82
stand.devijacija	0,12	1,05	2,09	0,60	0,00	0,00	0,76	0,03	0,03	0,50	0,10	0,14
min. vrijednost	5,00	4,28	8,55	5,00	1,02	0	2,03	0,00	0,36	0,37	1,86	4,67
maks. vrijednost	5,2	6,15	12,31	6,2	1,03	0	3,53	0,06	0,41	1,33	2,06	4,94
*>LOD	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3
postotak (%)	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 9. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *pale ale* craft piva

3. Tip Piva: PALE ALE	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotriosa [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,87	8,27	16,54	5,36	1,02	2,75	3,71	0,23	0,43	1,21	1,89	4,69
stand.devijacija	0,20	3,24	6,47	0,67	0,00	4,68	2,97	0,41	0,19	0,62	0,22	0,52
min. vrijednost	4,50	2,76	5,53	4,20	1,02	0,37	1,27	0,00	0,06	0,76	1,58	3,91
maks. vrijednost	5,1	13,64	27,28	6,2	1,02	9,76	8,52	1,31	0,62	2,77	2,26	5,59
*>LOD	9	9	9	9	9	4	9	9	9	9	9	9
postotak (%)	100	100	100	100	100	44	100	100	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 10. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *ale* craft piva

4. Tip piva: ALE	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotriosa [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,85	15,50	31,00	6,13	1,05	5,18	2,24	0,10	0,41	0,92	2,38	4,94
stand.devijacija	0,30	14,82	29,65	1,10	0,06	0,94	2,11	0,15	0,15	0,66	0,53	1,13
min. vrijednost	4,50	3,25	6,50	5,00	1,02	4,51	0,40	0,01	0,27	0,11	1,51	3,26
maks. vrijednost	5,3	48,48	96,98	8,2	1,20	5,84	6,53	0,43	0,61	2,10	3,30	7,11
*>LOD	8	8	8	8	8	2	8	8	5	8	8	8
postotak (%)	100	10	100	100	100	25	100	100	63	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 11. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *amber ale* craft piva

5. Tip piva: AMBER ALE	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,95	15,30	30,59	6,40	1,03	0,00	3,60	0,02	0,38	0,71	2,20	5,71
stand.devijacija	0,07	2,60	5,21	0,57	0,00	0,00	2,85	0,02	0,24	0,77	0,32	0,42
min. vrijednost	4,90	13,46	26,91	6,00	1,02	0	1,58	0,00	0,21	0,17	1,98	5,42
maks. vrijednost	5	17,13	34,27	6,8	1,02	0	5,60	0,03	0,54	1,25	2,43	6,01
*>LOD	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
postotak (%)	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 12. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *american blonde ale* craft piva

6. Tip piva: AMERICAN BLONDE ALE	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,97	8,17	16,33	5,20	1,02	0,87	2,47	0,84	0,26	0,80	1,99	4,43
stand.devijacija	0,15	2,61	5,21	0,35	0,00	0,00	1,41	1,45	0,15	0,32	0,31	1,24
min. vrijednost	4,80	5,53	11,05	5,00	1,02	0,87	1,53	0,00	0,09	0,57	1,73	3,11
maks. vrijednost	5,1	10,74	21,48	5,6	1,02	0,86	4,09	2,52	0,39	1,18	2,33	5,56
*>LOD	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3
postotak (%)	100	100	100	100	100	33	100	100	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 13. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *blonde ale* craft piva

7.Tip piva: BLONDE ALE	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrijoza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,90	5,23	10,47	6,00	1,02	0,00	1,26	0,06	0,35	1,02	1,61	4,82
stand.devijacija	0,14	2,58	5,17	0,49	0,00	0,00	0,24	0,07	0,13	0,24	0,65	0,55
min. vrijednost	4,80	2,49	4,99	5,20	1,02	0	1,02	0,00	0,13	0,74	0,46	4,31
maks. vrijednost	5,1	9,2	18,4	6,4	1,02	0	1,59	0,11	0,48	1,39	1,96	5,73
*>LOD	4	5	5	5	5	0	5	2	5	5	5	5
postotak (%)	80	100	100	100	100	0	100	40	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 14. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *IPA* craft piva

8.Tip piva: IPA	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrijoza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	5,14	12,12	24,08	7,31	1,03	10,07	5,00	0,10	0,59	1,71	2,13	6,06
stand.devijacija	0,25	5,12	10,12	1,02	0,00	5,51	4,23	0,09	0,19	1,58	0,86	0,93
min. vrijednost	4,60	3,77	7,42	5,60	1,02	2,84	1,18	0,00	0,30	0,54	0,48	4,56
maks. vrijednost	5,3	18,31	36,08	8,8	1,03	15,61	13,37	0,24	0,85	4,89	2,99	7,35
*>LOD	7	7	7	7	7	4	7	6	7	7	7	7
postotak (%)	100	100	100	100	100	57	100	86	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 15. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *porter* craft piva

9. Tip piva: PORTER	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	M altoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,70	73,44	145,69	7,50	1,03	0	1,63	0,07	0,54	0,84	0,35	5,98
standardna devijacija	0,00	8,80	15,92	1,56	0,00	0	1,16	0,09	0,03	1,03	0,21	0,21
min. vrijednost	4,70	67,22	134,44	6,40	1,03	0	0,81	0,00	0,53	0,11	0,20	5,83
maks. vrijednost	4,70	79,66	156,94	8,6	1,02	0	2,45	0,12	0,56	1,57	0,49	6,12
*>LOD	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
postotak (%)	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 16. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u tipu *stout* craft piva

10. Tip piva: STOUT	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	Fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis, [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
srednja vrijednost	4,90	141,32	279,46	12,70	1,05	16,85	4,89	0,66	0,90	0,11	3,84	7,17
stand. devijacija	0,14	99,52	194,54	9,48	0,04	14,57	6,47	0,79	0,55	0,00	1,69	4,14
min. vrijednost	4,80	70,95	141,90	6,00	1,02	6,55	0,32	0,10	0,51	0,11	2,64	4,24
maks. vrijednost	5	211,68	417,02	19,4	1,08	27,15	9,46	1,21	1,29	0,11	5,03	10,09
*>LOD	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
postotak (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

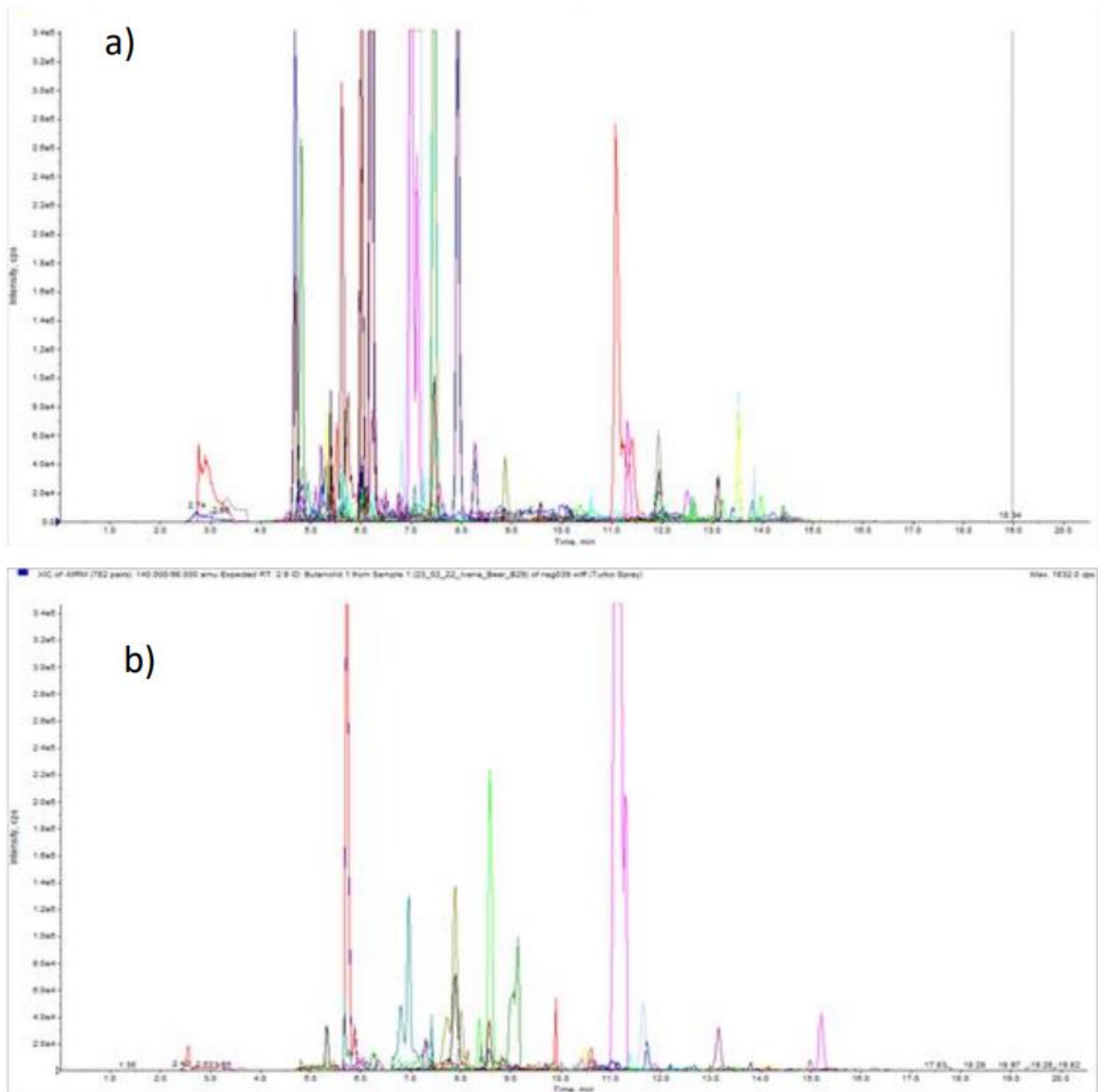
* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 17. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u industrijskim pivama

Industrijska piva	pH	SRM	EBC	ekstrakt [°Brix]	gustoća [20°/20°]	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	fruktoza [g L ⁻¹]	masne kis. [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
Lager	4.7	3.93	7.73	6.2	1.025	1.89	3.09	0.070	0.299	0.111	2.28	4.85
Stout	4.3	53.36	105.1 2	5	1.020		3.51	0.004	0.333	0.918	1.29	4.40
Ipa	4.9	17.78	35.02	9.8	1.039		5.62	0.321	0.510	1.158	1.75	6.67
Stout	4.8	57.48	113.2 5	8.4	1.034		4.37	0.656	0.397	1.554	1.83	6.61
Blonde ale	4.8	6.96	13.73	9	1.037		4.22	1.434	1.766	0.525	2.01	0.65
Pale ale	5.1	11.22	22.10	8	1.033		0.66	0.139	0.583	0.533	1.56	5.36

4.4. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu, craft pivu, kvascu i vodi UHPLC/MS/MS uređajem

U ovome poglavlju prikazane su vrijednosti za pojavnost mikotoksina u uzorcima hmelja, slada, craft piva, kvasca koji su analizirani UHPLC/MS/MS uređajem metodom prema Suylok i sur. (2020b) prema gore spomenutom poglavlju 3.2.3. Na slici 18 prikazani su primjeri ukupnog kromatograma iona pozitivnog i negativnog moda za uzorak piva.



Slika 18. Prikaz ukupnog kromatograma iona a) pozitivnog moda i b) negativnog moda za uzorak piva (autor)

Rezultati za određivanje mikotoksina provednih na *uzorcima vode* nisu prikazani jer vrijednosti za navedeno bile su ispod limita detekcije.

Pojavnost dokazanih mikotoksina i njihova koncentracija u sladu, hmelju, kvascu i uzorcima craft piva te za industrijska piva prikazne su u priložima, zbirni podaci za navedeno prikazani su tablicama od 18 do 30 sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom, rasponom kvantificiranih podataka, brojem uzoraka iznad limita detekcije te udjelom pojavnosti.

Tablica 18. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima lager craft piva (autor)

Tip piva: LAGER	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	51,68	45,83	2,34	0,24	25,80	0,63	10,99	2520,64	2288,47
stand.devijacija	33,75	32,77	0,00	0,17	17,21	0,84	4,69	2348,36	1896,66
min. vrijednost	6,44	18,74	2,34	0,12	9,15	0,09	4,89	23,63	801,43
maks. vrijednost	123,25	128,04	2,33	0,35	58,75	2,59	19,89	9082,31	6089,25
*>LOD	19	19	1	2	19	9	19	19	19
postotak (%)	100	100	5	11	100	47	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 19. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima pilsner piva (autor)

Tip piva: PILSNER	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	67,35	21,30	0,61	0,67	23,00	0,03	10,64	2141,04	1208,32
stand. devijacija	50,02	7,65	0,00	0,00	7,23	0,00	5,28	1012,41	235,74
min. vrijednost	22,72	14,46	0,61	0,67	16,68	0,03	5,40	1025,60	1028,95
maks. vrijednost	121,42	29,56	0,61	0,67	30,87	0,03	15,96	3001,78	1475,33
*>LOD	3	3	1	1	3	1	3	3	3
postotak (%)	100	100	33	33	100	33	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 20. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima amber ale piva (autor)

Tip piva: AMBER ALE	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih ... [ng mL ⁻¹]	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	65,91	31,82	0,00	0,01	36,93	0,00	6,49	3238,26	2781,34
stand.devijacija	40,94	7,49	0,00	0,00	41,00	0,00	2,23	1624,84	2420,07
min. vrijednost	36,97	26,52	0	0,01	7,94	0	4,91	2089,32	1070,09
maks. vrijednost	94,86	37,12	0	0,008	65,92	0	8,06	4387,28	4492,58
*>LOD	2	2	0	1	2	0	2	2	2
postotak (%)	100	100	0	50	100	0	100	100	100

Tablica 21. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima american blonde ale piva (autor)

Tip piva: AMERICAN BLONDE ALE	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	56,34	25,77	0,00	0,11	26,95	0,18	7,40	1376,03	3082,70
stand. devijacija	19,21	3,51	0,00	0,03	9,56	0,15	2,40	1093,67	1816,60
min. vrijednost	35,89	22,55	0,00	0,09	15,94	0,07	5,75	234,99	1053,32
maks. vrijednost	73,98	29,50	0,004	0,125	33,14	0,290	10,149	2415,2	4557,01
*>LOD	3	3	1	2	3	2	3	3	3
postotak (%)	100	100	33	67	100	67	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 22. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima blonde ale piva (autor)

Tip piva: BLONDE ALE	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	59,93	32,77	0,00	0,35	39,39	0,26	8,90	3278,73	1248,67
stand.devijacija	26,34	10,51	0,00	0,23	33,60	0,16	4,50	2055,58	418,63
min. vrijednost	17,75	20,45	0	0,17	13,19	0,15	4,20	24,44	816,89
maks. vrijednost	89,81	45,80	0	0,61	97,83	0,38	15,85	5041,77	1890,47
*>LOD	5	5	0	3	5	2	5	5	5
postotak (%)	100	100	0	60	100	40	100	100	100

Tablica 23. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima IPA piva (autor)

Tip piva: IPA	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	74,16	40,90	0,00	0,26	40,57	0,28	6,18	1744,30	1601,78
stand. devijacija	53,55	12,92	0,00	0,42	10,33	0,32	1,92	1105,39	998,90
min. vrijednost	36,67	29,46	0	0,04	22,89	0,05	4,16	272,80	928,87
maks. vrijednost	190,84 78	66,71	0	1,01	52,39	0,50	9,59	3848,24	3777,35
*>LOD	7	7	0	5	7	2	7	7	7
postotak (%)	100	100	0	71	100	29	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 24. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima pale ale piva (autor)

Tip piva: PALE ALE	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	86,54	100,95	0,00	0,20	45,43	0,78	9,37	3531,07	2387,65
stand.devijacija	30,18	173,56	0,00	0,09	25,19	1,03	2,50	2372,46	2075,74
min. vrijednost	47,80	25,48	0	0,12	18,55	0,02	5,90	113,40	863,40
maks. vrijednost	128,88	559,64	0	0,35	103,58	2,33	13,17	6960,74	5967,19
*>LOD	9	9	0	5	9	7	9	9	9
postotak (%)	100	100	0	56	100	78	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 25. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima ale piva (autor)

Tip piva: ALE	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	59,74	32,36	0	0,18	40,28	0,60	9,02	4199,87	3354,58
stand. devijacija	23,42	16,91	0	0,13	12,45	0,83	3,08	2667,65	1392,55
min. vrijednost	40,20	15,01	0	0,03	24,07	0,03	4,01	780,82	887,66
maks. vrijednost	114,80	68,52	0	0,32	53,78	1,72	12,74	9022,6	4891,68
*>LOD	8	8	0	4	8	6	8	8	8
postotak (%)	100	100	0	50	100	75	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 26. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima porter piva (autor)

Tip piva: PORTER	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	63,58	61,24	0,00	0,31	15,51	0,11	10,30	3010,83	3863,08
stand.devijacija	3,89	23,08	0,00	0,21	0,60	0,00	5,95	279,39	1430,42
min. vrijednost	60,83	44,92	0	0,16	15,09	0,11	6,09	2813,26	2851,62
maks. vrijednost	66,32	77,56	0	0,45	15,94	0,105	14,50	3208,38	4874,53
*>LOD	2	2	0	2	2	1	2	2	2
postotak (%)	100	100	0	100	100	50	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 27. Zbirne vrijednosti pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u uzorcima stout piva (autor)

Tip piva: STOUT	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	52,55	53,25	0,00	0,06	30,58	0,66	18,25	1964,29	4176,43
stand.devijacija	11,28	29,80	0,00	0,00	29,36	0,00	5,36	2064,17	1256,86
min. vrijednost	44,57	32,18	0	0,06	9,82	0,66	14,46	504,70	3287,70
maks. vrijednost	60,53	74,32	0	0,06	51,34	0,66	22,03	3423,87	5065,16
*>LOD	2	2	0	1	2	1	2	2	2
postotak (%)	100	100	0	50	100	50	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 28. Prikaz vrijednosti za pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u industrijskim pivama

INDUSTRIJSKA PIVA

	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungalnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
LAGER	66,24	39,11	<LOD	<LOD	41,26	<LOD	8,05	1435,68	3093,23
STOUT	28,99	20,72	<LOD	<LOD	10,46	43,35	6,23	281,96	2243,10
IPA	80,29	48,56	<LOD	2,17	34,37	0,49	8,13	3423,69	990,93
STOUT	39,72	20,79	<LOD	0,31	24,18	<LOD	5,06	1298,28	1158,75
BLONDE ALE	67,68	26,52	<LOD	0,06	27,31	0,21	7,26	3644,57	1760,46
PALE ALE	59,12	12,30	<LOD	1,07	17,76	549,6	9,24	7153,72	1179,19

U nastavku slijede zbirni podaci o pojavanoti mikotoksina te biljnih, bakterijskih i ostalih fungalnih metabolita u sirovinama: hmelj, slad i kvasac (tablice 29 – 31).

Tablica 29. Prikaz zbirnih vrijednosti o pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u hmelju (autor)

HMELJ	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	196,78	203,72	3037,17	28,08
stand.devijacija	270,79	258,28	779,05	18,12
min. vrijednost	5,28	0,0003	2,65	0,48
maks. vrijednost	1173,97	1495,24	4888	88,09
*>LOD	62	62	62	62
postotak (%)	100	100	100	100

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

Tablica 30. Prikaz zbirnih vrijednosti o pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita u sladu
(autor)

SLAD	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma bakterijskih metabolita	suma ergot alkalida [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	365,92	1356,42	0,57	1364,1 9	2407,44	6753,16	120,68	5,17	8580,63
stand. devijacija	365,92	1356,42	0,57	1364,1 9	2407,44	6753,16	120,68	5,17	8580,63
min. vrijednost	2,55	5,59	0,04	5,59	33,52	0,096	0,068	6,64	44,40
maks. vrijednost	2407,61	4671,22	1,53	4671,2 2	18619,74	31088	634,80	13,96	45924,8
*>LOD	86	86	10	85	86	77	75	2	86
postotak (%)	100	100	12	99	100	90	87	2	100

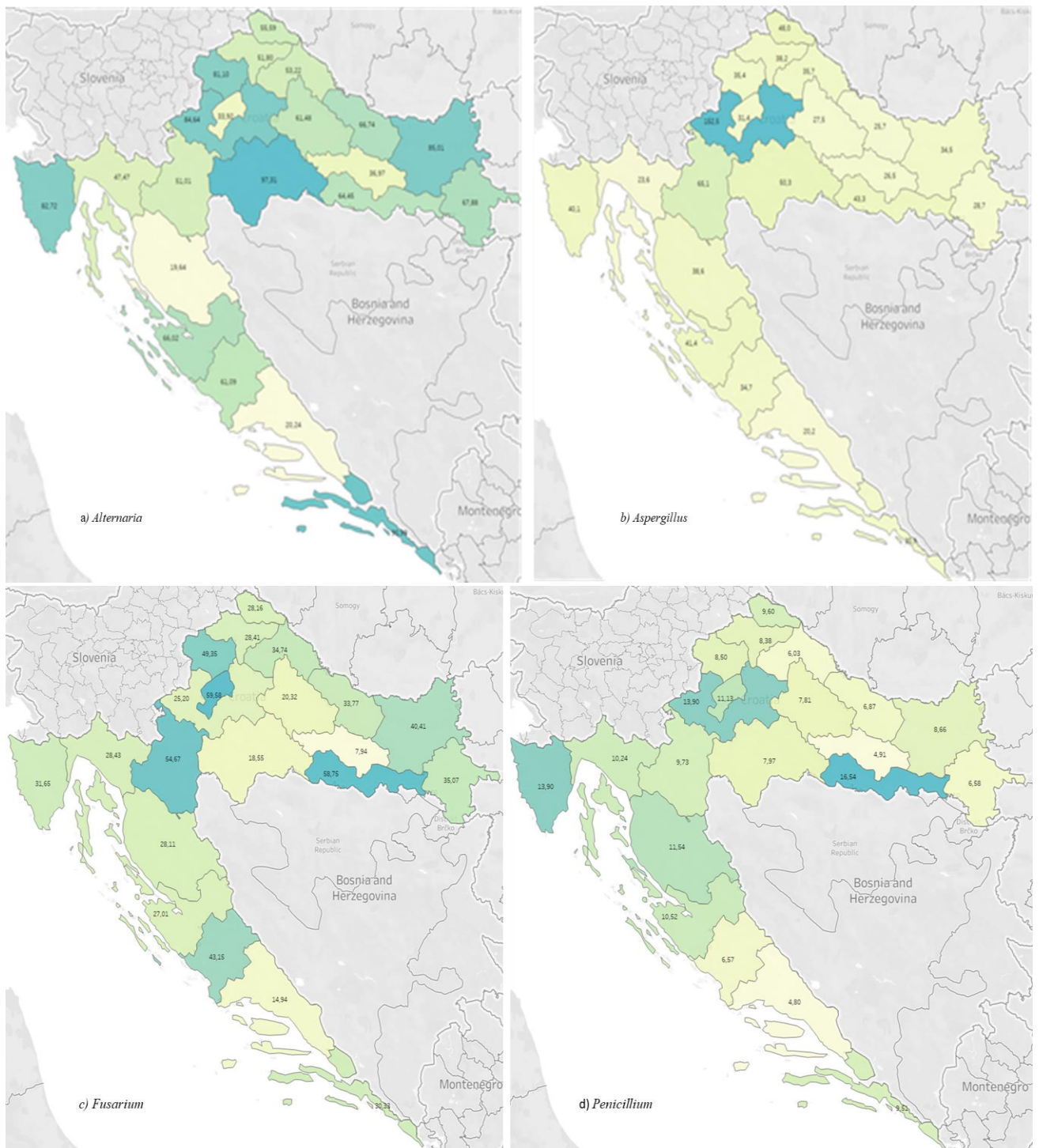
* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

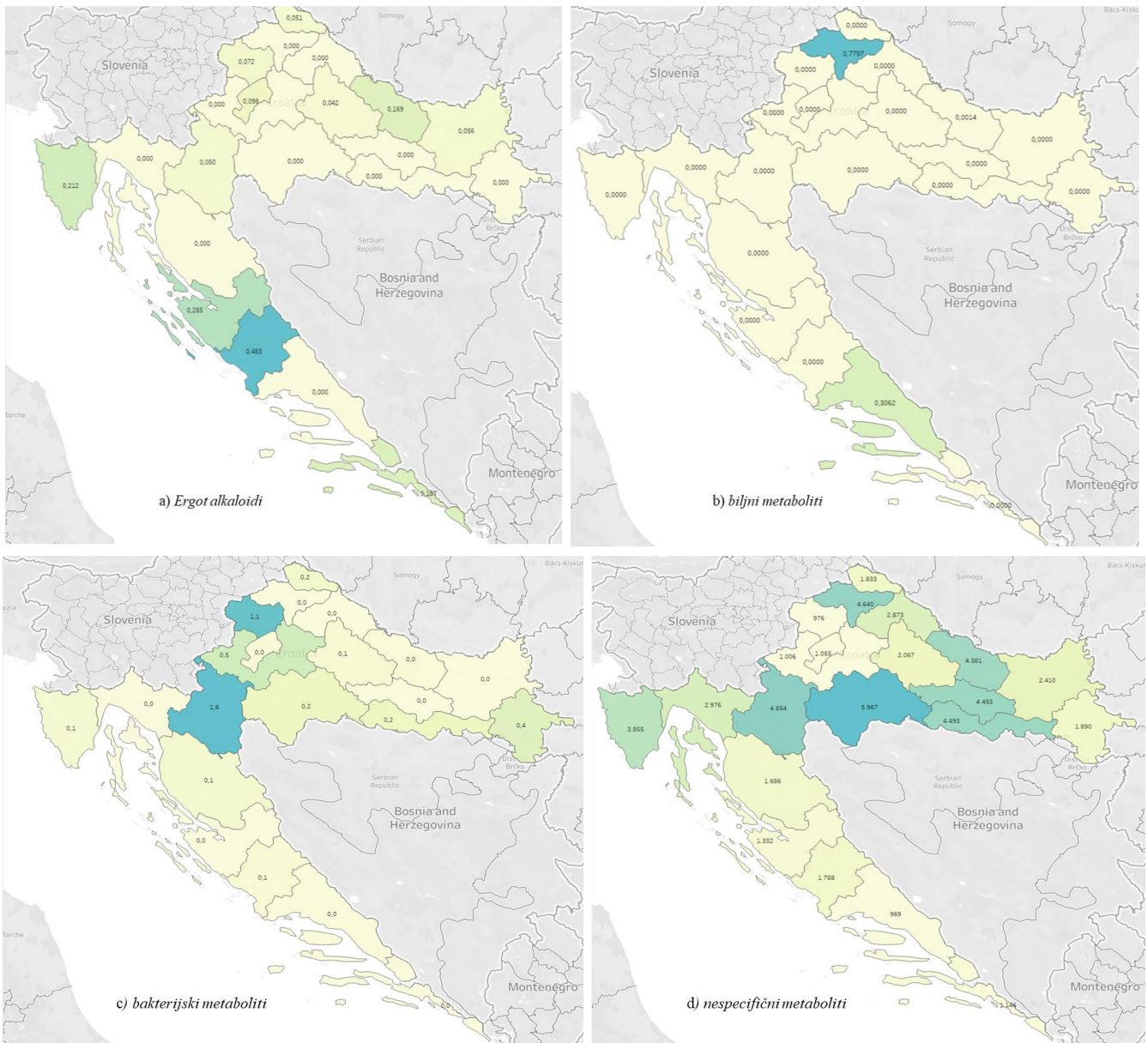
Tablica 31. Prikaz zbirnih vrijednosti o pojavnosti mikotoksina i ostalih metabolita za kvasac
(autor)

KVASAC	suma <i>Alternaria</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Aspergillus</i> [ng mL ⁻¹]	suma <i>Fusarium</i> [ng mL ⁻¹]	suma ostalih fungálnih metabolita	suma <i>Penicillium</i> [ng mL ⁻¹]	suma biljnih metabolita [ng mL ⁻¹]	suma nespecifičnih metabolita [ng mL ⁻¹]
srednja vrijednost	8,39	11,79	293,89	0,26	10,23	19,31	5,39
stand. devijacija	1,12	7,78	25,04	0,02	0,48	4,63	0,48
min. vrijednost	7,23	4,61	256	0,23	9,8	2,64	4,61
max. vrijednost	11,7	23,7	329	0,29	10,82	23,7	6,15
*>LOD	15	31	18	18	4	31	31
postotak (%)	48%	100%	58%	58%	13%	100%	100%

* >LOD - broj izmjerenih podataka iznad limita detekcije

U nastavku slijedi prikaz toplinskih mapa presjeka pojavnosti mikotoksina u pojedinim županijama (slike 19 –20).





Slika 20. Toplinska mapa presjeka pojavnosti mikotoksina po županijama iz kojih su prikupljeni analizirani uzorci piva gdje je tamnom bojom označena najviša koncentracija: a) ergot alkaloidi, b) biljni metaboliti, c) bakterijski metaboliti i ostali fungalni metaboliti d) nespecifični metaboliti (autor)

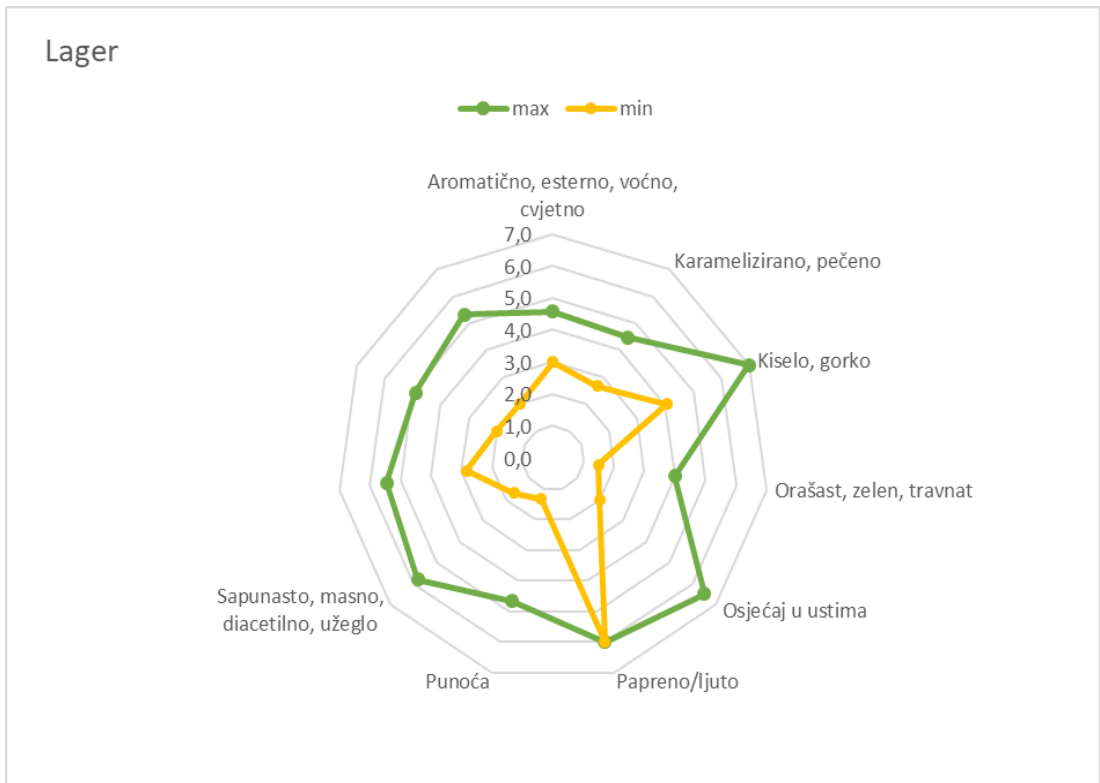
Iz slike 19 i 20 može se uočiti da je najveća pojava *Alternaria* mikotoksina u Sisačko- moslavačkoj županiji čija prosječna koncentracija svih analiziranih uzoraka piva iz te županije iznosi $97,31 \text{ ng mL}^{-1}$. U Zagrebačkoj županiji je najveća pojava *Aspergillus* mikotoksina čija prosječna koncentracija svih analiziranih uzoraka piva iz te županije iznosi

152,5 ng mL⁻¹. Najveća pojavaost *Fusarium* mikotoksina je u gradu Zagrebu s prosječnom koncentracijom svih analiziranih uzoraka piva od 59,58 ng mL⁻¹. U Brodsko–posavskoj županiji je pojavaost *Penicillium* mikotoksina s prosječnom koncentracijom od 16,54 ng mL⁻¹. Pojavaost *ergot alkaloida* u Šibensko-kninskoj županiji čija prosječna koncentracija iznosi 0,483 ng mL⁻¹, dok najveća pojavaost biljnih i bakterijskih metabolita je u Varaždinskoj županiji, a ostalih fungalnih metabolita u Karlovačkoj županiji s koncentracijom od 0,7797 ng mL⁻¹ odnosno 1,6 ng mL⁻¹. Najveća pojavaost ostalih nespecifičnih metabolita u pivu je u Sisačko-moslavačkoj županiji (5,967 ng mL⁻¹).

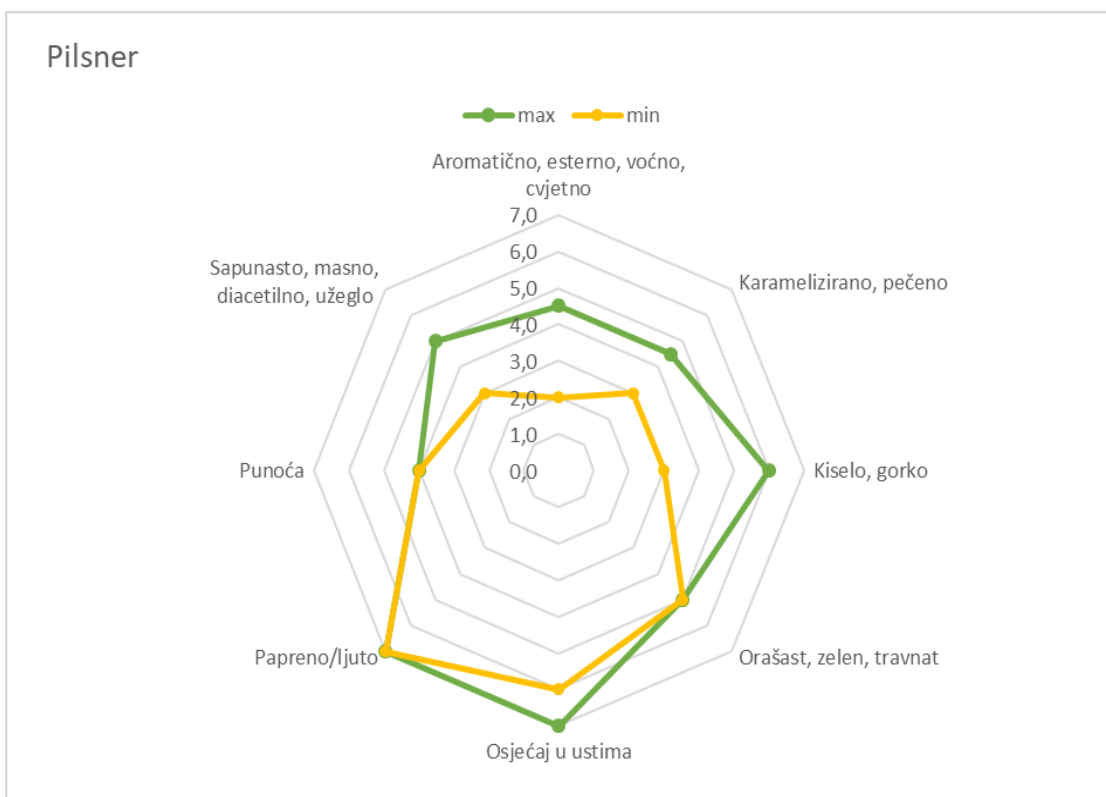
Rezultati istoga se ne mogu usporediti sa rezultatima drugih istraživanja jer nema nikakvih podataka o pojavaosti mikotoksina po županijama u Republici Hrvatskoj.

4.5. Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA)

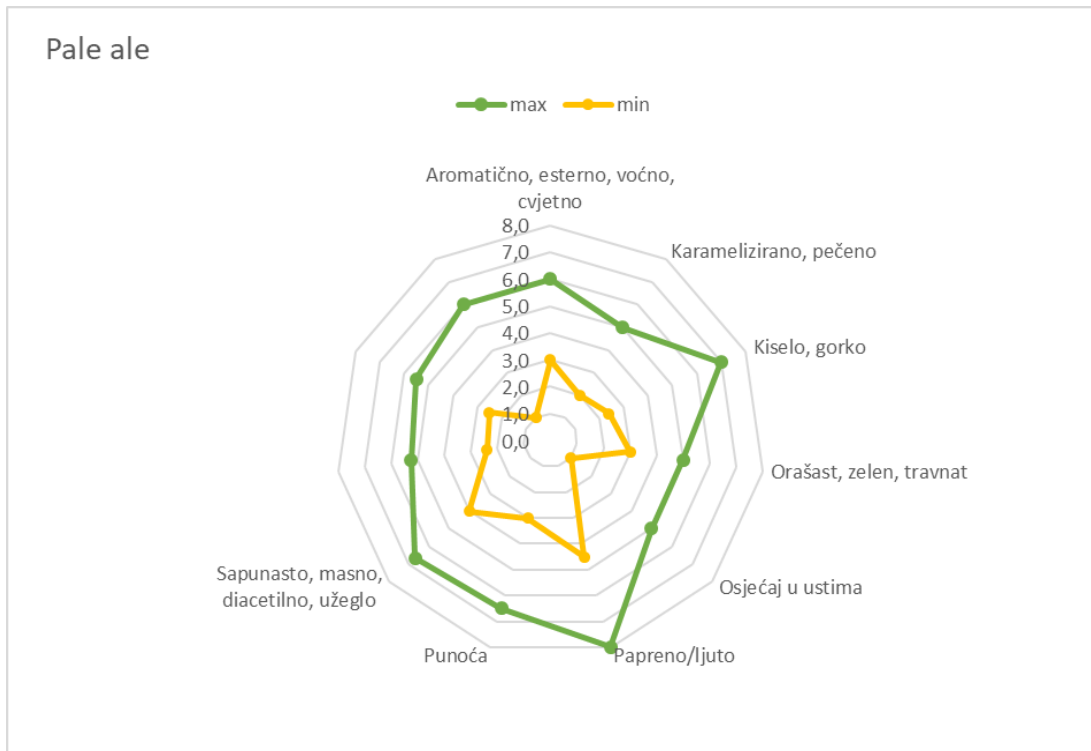
Prema cilju istraživanja za provođenje senzorske analize na svim prikupljenim uzorcima craft piva korištena je QDA metoda. Metoda uključuje educirane paneliste kako bi se utvrdilo senzorski profil craft piva. Dobiveni rezultati QDA metode ocjenjeni od strane panelista grafički su prikazani „paukovim mrežama“ (slika 21– 30).



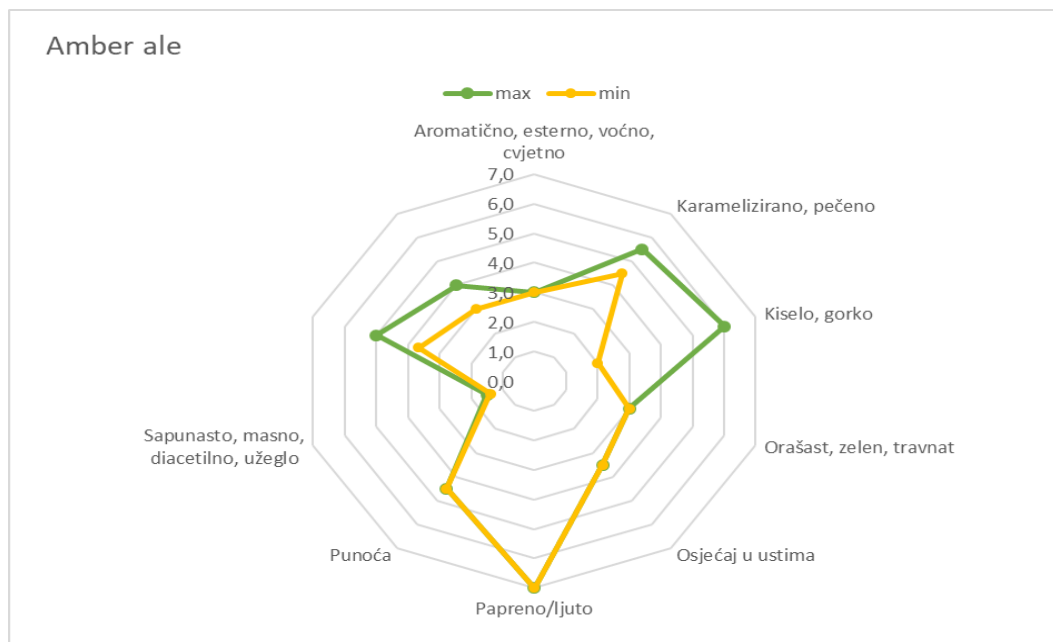
Slika 21. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *lager* craft piva (autor)



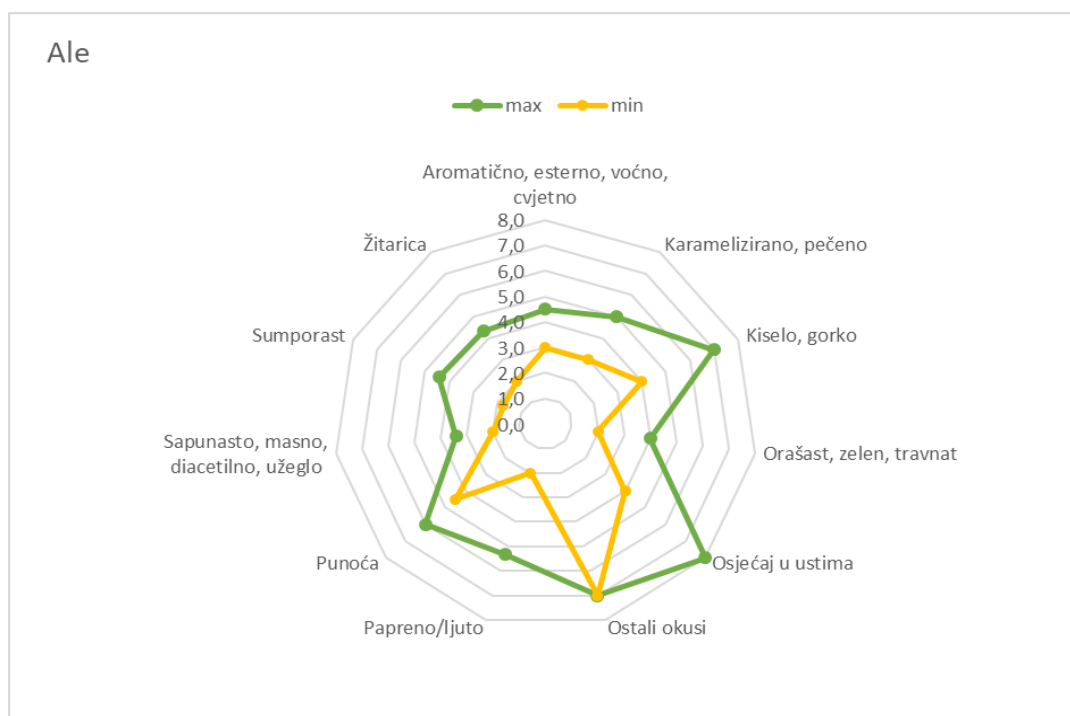
Slika 22. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *pilsner* craft piva
(autor)



Slika 23. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *pale ale* craft piva
(autor)



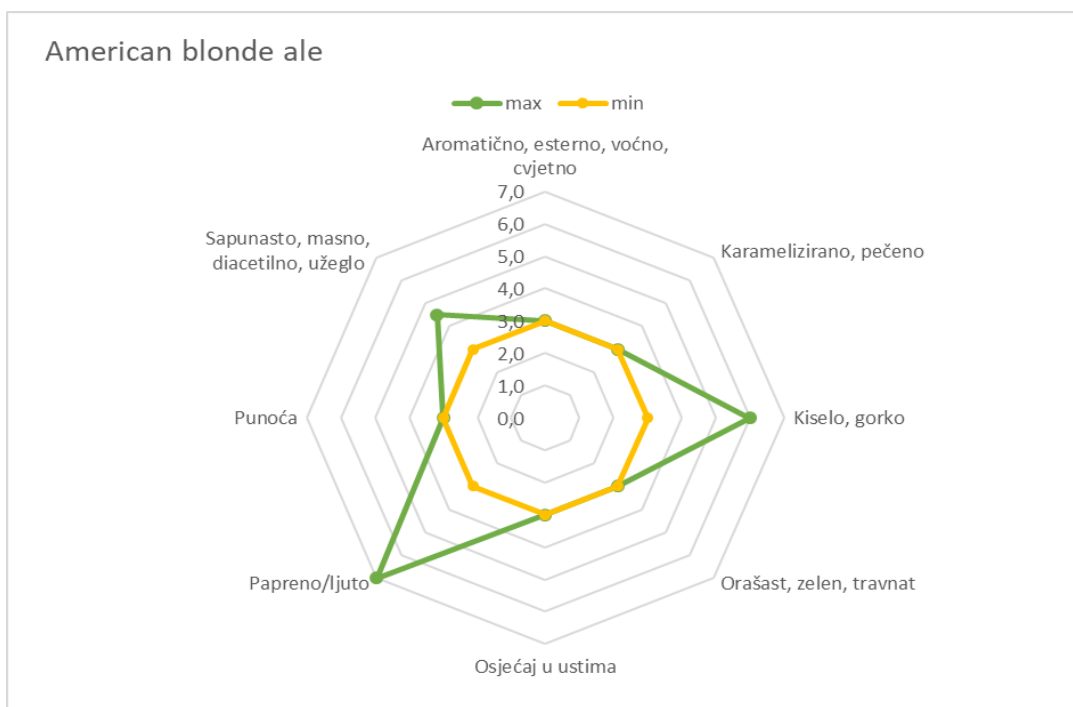
Slika 24. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *amber ale* craft piva
(autor)



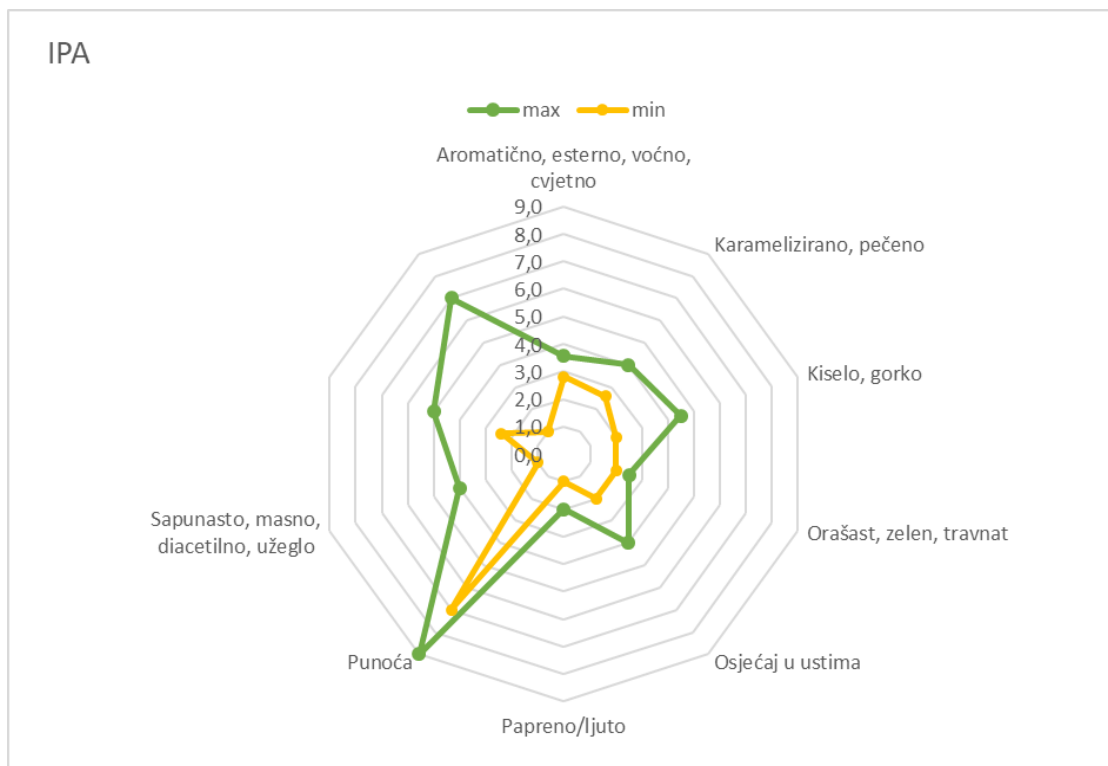
Slika 25. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *ale* craft piva (autor)



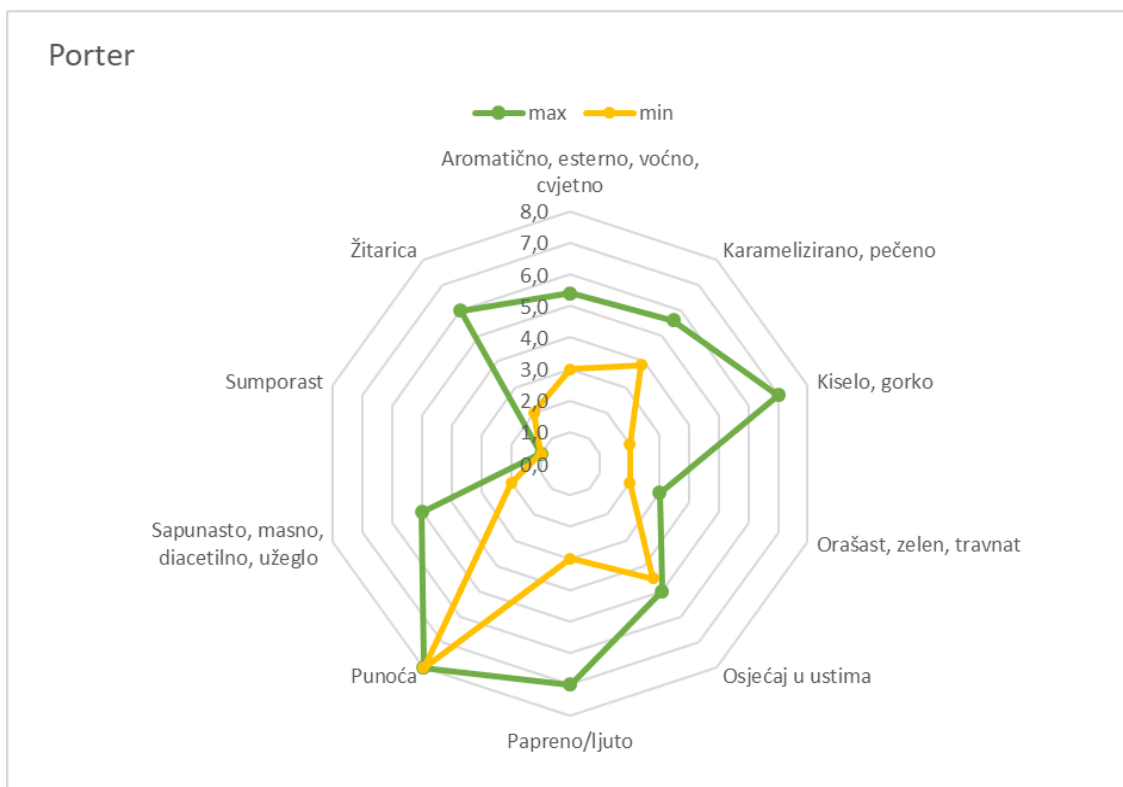
Slika 26. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *blonde ale* craft piva (autor)



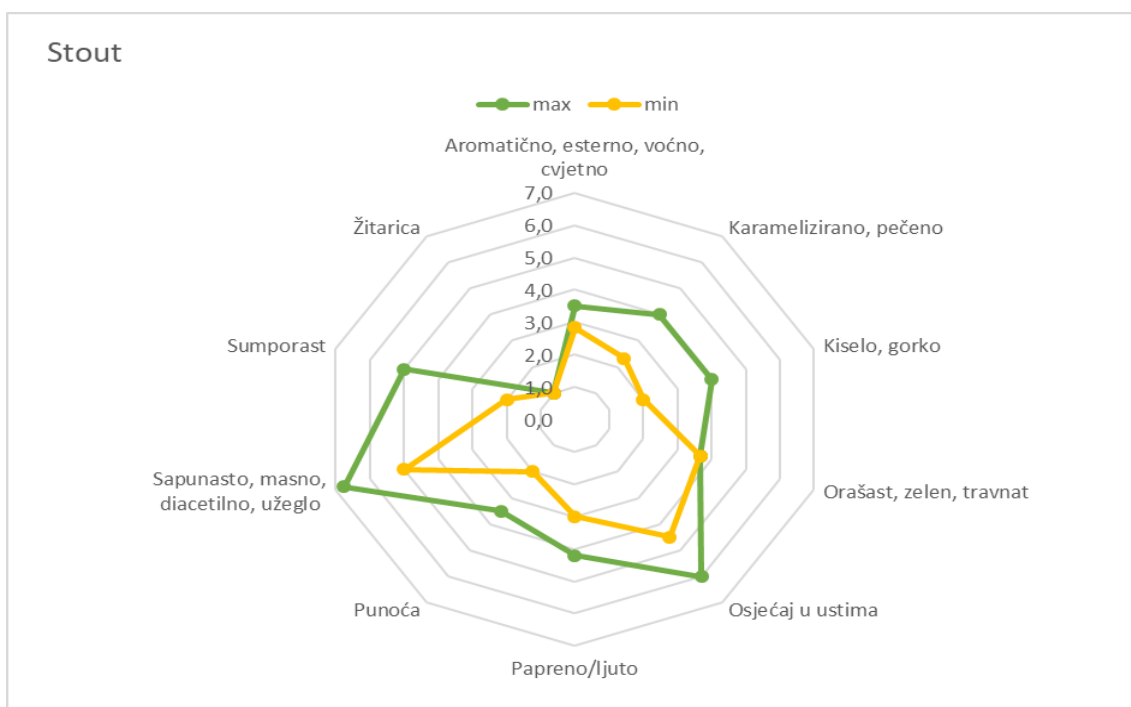
Slika 27. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *american blonde ale* craft piva (autor)



Slika 28. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *indian pale ale* craft piva (autor)



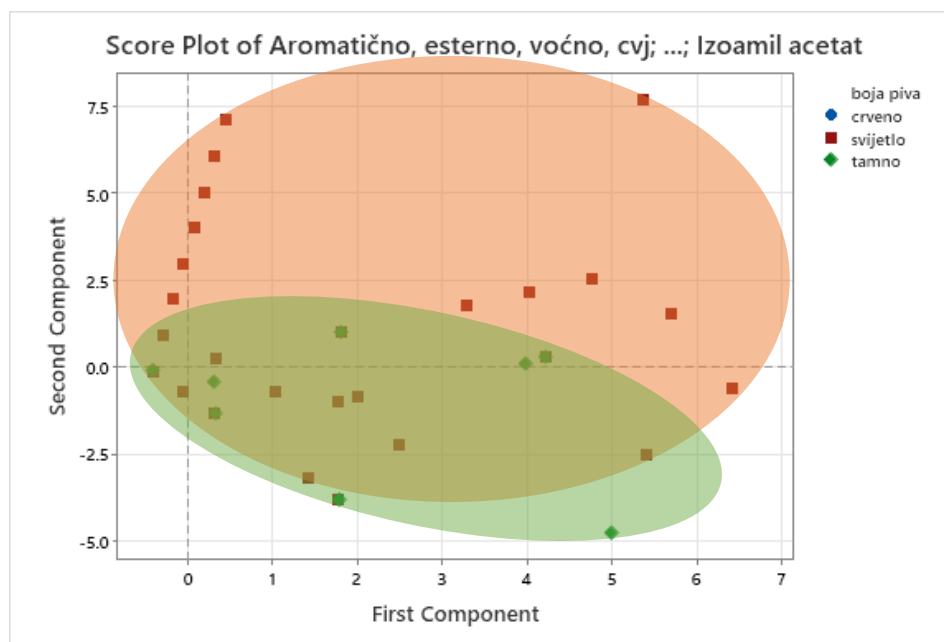
Slika 29. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *porter* craft piva (autor)



Slika 30. Dijagram „paukove mreže“ senzorskih deskriptora za *stout* craft piva (autor)

4.6. Statistička analiza dobivenih rezultata podataka

U tablicama 32 i 33 prikazani su rezultati testa normalnosti distribucije podataka pomoću Mann Whitney –im U testa, te prikaz koeficijenta korelacije sa statistički značajnim koeficijentima. Dok je provjera povezanosti varijabli provedena je PCA testom (slika 31)



Slika 31. PCA analiza aromatskog profila okusa ispitivanog piva grupirana prema boji piva (autor)

Tablica 32. Prikaz koeficijenta korelacije sa statistički značajnim koeficijentima (autor)

<i>Varijabla</i>	<i>srednja ocjena uzorka profila okusa svih craft piva</i>
<i>pH</i>	-0,048
<i>SRM</i>	0,287
<i>EBC</i>	0,286
<i>ekstrakt [°Brix]</i>	-0,114
<i>gustoća [20°/20°]</i>	-0,106
<i>maltotrioza [g L⁻¹]</i>	-0,132
<i>maltoza [g L⁻¹]</i>	-0,246
<i>glukoza [g L⁻¹]</i>	0,118
<i>fruktoza [g L⁻¹]</i>	-0,007
<i>masne kiseline [g L⁻¹]</i>	-0,795
<i>glicerol [g L⁻¹]</i>	-0,216

<i>Varijabla</i>	<i>srednja ocjena uzorka profila okusa svih craft piva</i>
<i>etanol [%]</i>	-0,434
<i>Kotanin A [ppb]</i>	-0,700
<i>suma Aspergillus metabolita [ppb]</i>	-0,052
<i>suma Ergot alkaloida [ppb]</i>	-0,050
<i>Bovericin [ppb]</i>	-0,656
<i>Bikaverin [ppb]</i>	-0,700
<i>Enniatin B1 [ppb]</i>	-0,739
<i>Fumonizin B1 [ppb]</i>	0,704
<i>Zearalenon-4-sulfat [ppb]</i>	0,683
<i>suma Fusarium metabolita [ppb]</i>	-0,186
<i>suma ostalih fungalnih metabolita [ppb]</i>	-0,051
<i>Felutinin A [ppb]</i>	-0,632
<i>Kvestomicin [ppb]</i>	-0,693
<i>suma Penicillium metabolita [ppb]</i>	-0,081
<i>suma biljnih metabolita [ppb]</i>	0,051
<i>Asperfenamat [ppb]</i>	-0,713
<i>Brevianamid F [ppb]</i>	-0,794
<i>ciklo(L-Ala-L-Pro) [ppb]</i>	-0,642
<i>suma nespecifičnih metabolita [ppb]</i>	0,568

❖ crveno označeni-statistički značajni koeficijenti

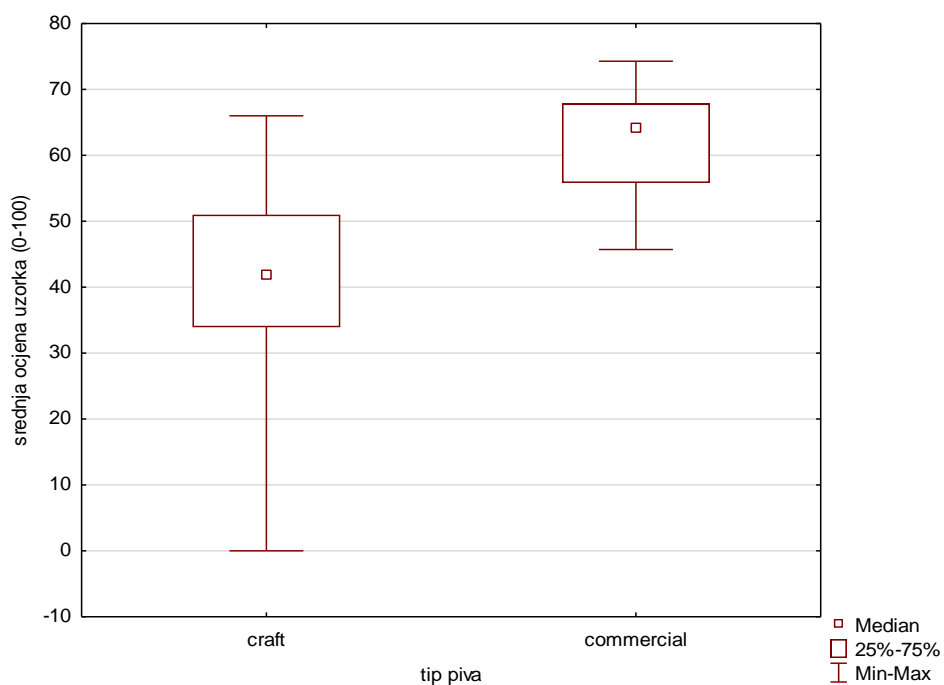
Tablica 33. Prikaz rezultata usporedbe distribucije podataka Mann Whitney –im U testom (autor)

<i>Varijabla</i>	<i>Rank suma (craft)</i>	<i>Rank suma (industrijska)</i>	<i>p- vrijednost</i>
<i>srednja ocjena uzorka piva (0-100)</i>	18626	1075	0,00
<i>pH</i>	2003	143	0,21
<i>SRM</i>	1962	249	0,29
<i>EBC</i>	1963	248	0,30
<i>ekstrakt [°Brix]</i>	1914	297	0,03
<i>gustoća [20°/20°]</i>	1919	293	0,04
<i>maltoza [g L⁻¹]</i>	1954	257	0,22
<i>glukoza [g L⁻¹]</i>	1490	221	0,27
<i>fruktoza [g L⁻¹]</i>	1792	224	0,46
<i>masne kiseline [g L⁻¹]</i>	2044	168	0,46
<i>glicerol [g L⁻¹]</i>	1995	150	0,28
<i>etanol [%]</i>	1906	239	0,36
<i>suma Alternaria toksina [ppb]</i>	28491	1644	0,76
<i>Kojična kiselina [ppb]</i>	27604	2532	0,00
<i>suma Aspergillus metabolita [ppb]</i>	28513	1622	0,70
<i>suma bakterijskih metabolita [ppb]</i>	28504	1631	0,73
<i>suma ergot alkaloida [ppb]</i>	28236	1899	0,49
<i>Kulmorin [ppb]</i>	28942	1193	0,04
<i>suma Fusarium metabolita [ppb]</i>	28628	1507	0,40
<i>suma ostalih fungalnih metabolita [ppb]</i>	28062	2073	0,17

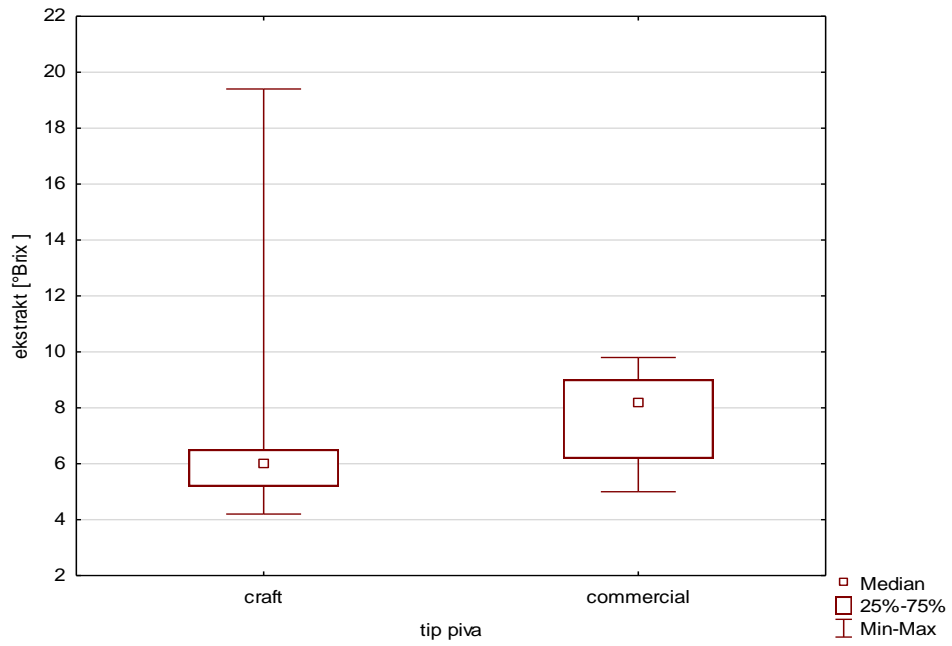
Varijabla	Rank suma (craft)	Rank suma (industrijska)	p- vrijednost
suma <i>Penicillium</i> metabolita [ppb]	28377	1758	0,89
Apscizinska kiselina [ppb]	28927	1208	0,05
Epiheterodendrin [ppb]	27740	2395	0,01
Lotaustralin [ppb]	27651	2484	0,00
suma biljnih metabolita [ppb]	28239	1896	0,50
Brevianamid F [ppb]	27559	2576	0,00
Rugulusovin [ppb]	27306	2829	0,00
suma nespecifičnih metabolita [ppb]	28045	2090	0,15

❖ crveno označeni-statistički značajni koeficijenti

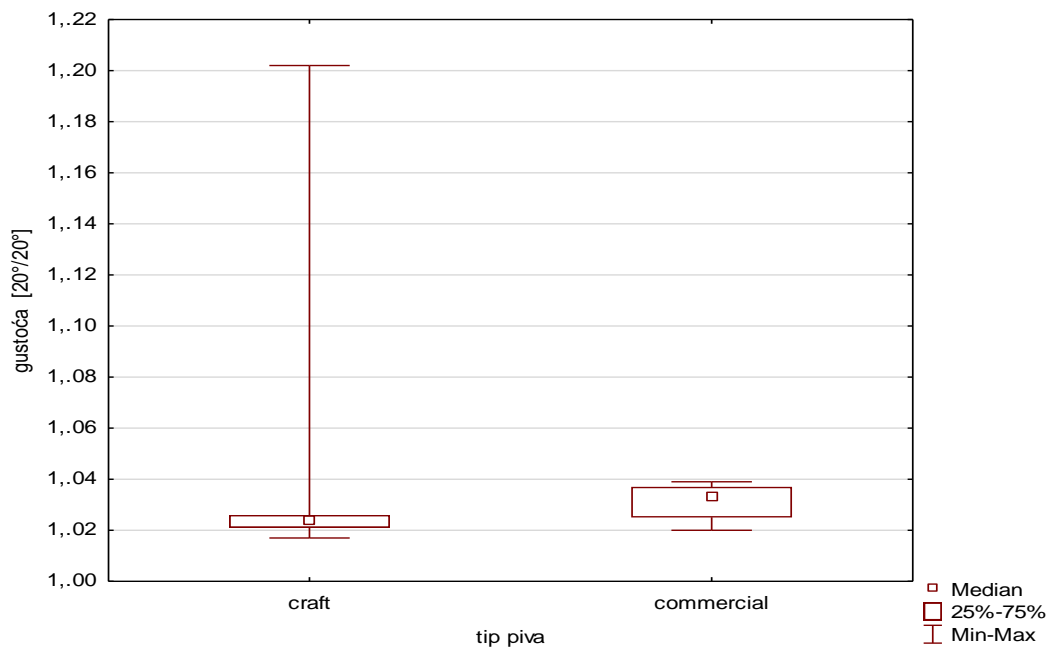
Slijede prikazi kutijastih dijagrama relevantnih statistički značajno različito distribuiranih podataka (slike 32 – 40).



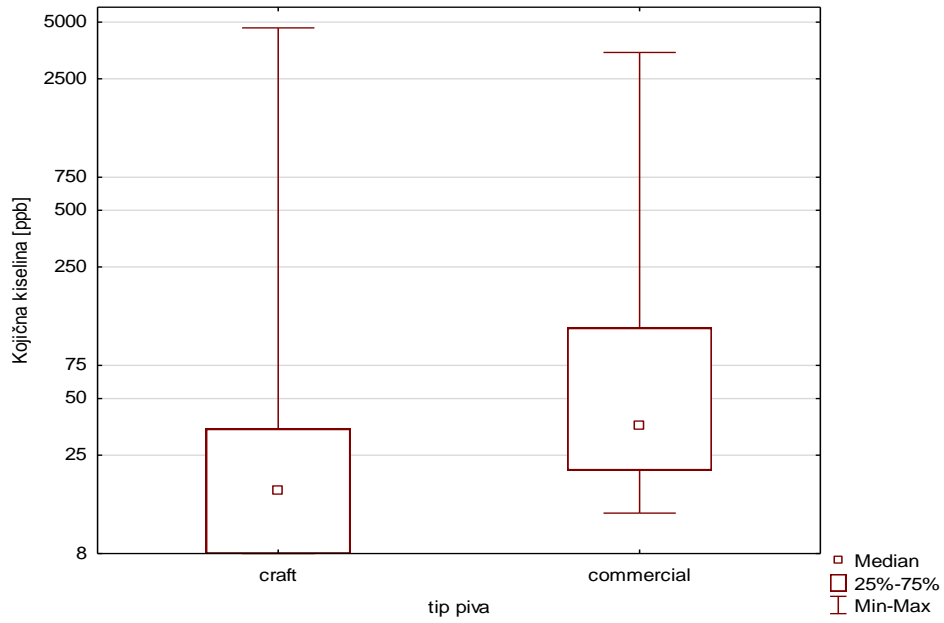
Slika 32. Kutijasti dijagram prosječne ocjene craft i industrijskog piva (autor)



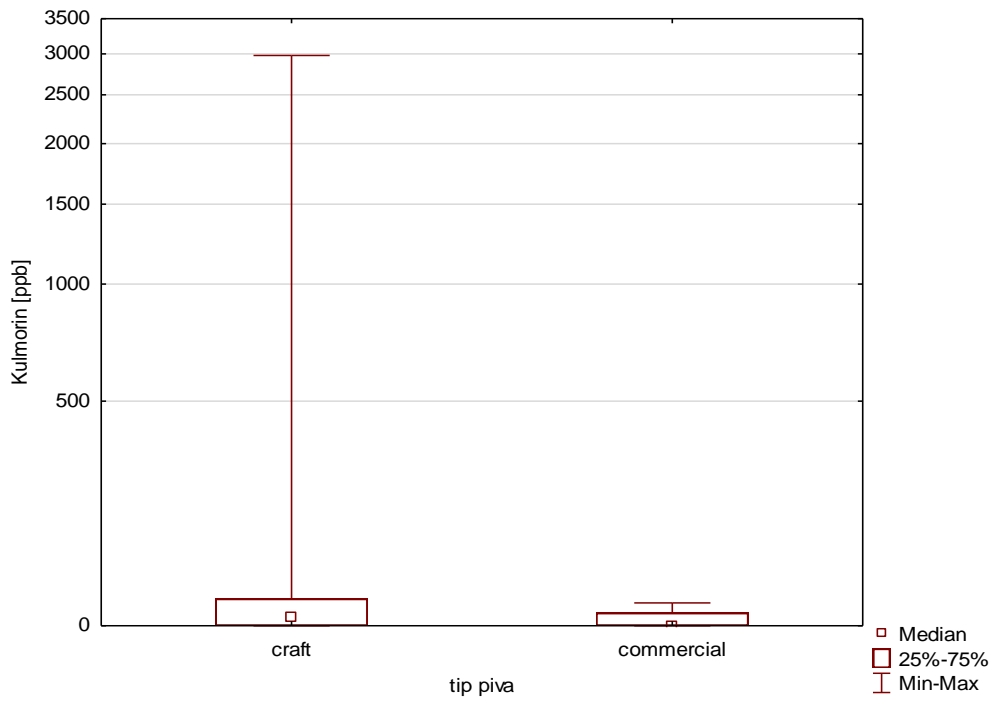
Slika 33. Kutijasti dijagram udjela ekstrakta u craft i industrijskom pivu (autor)



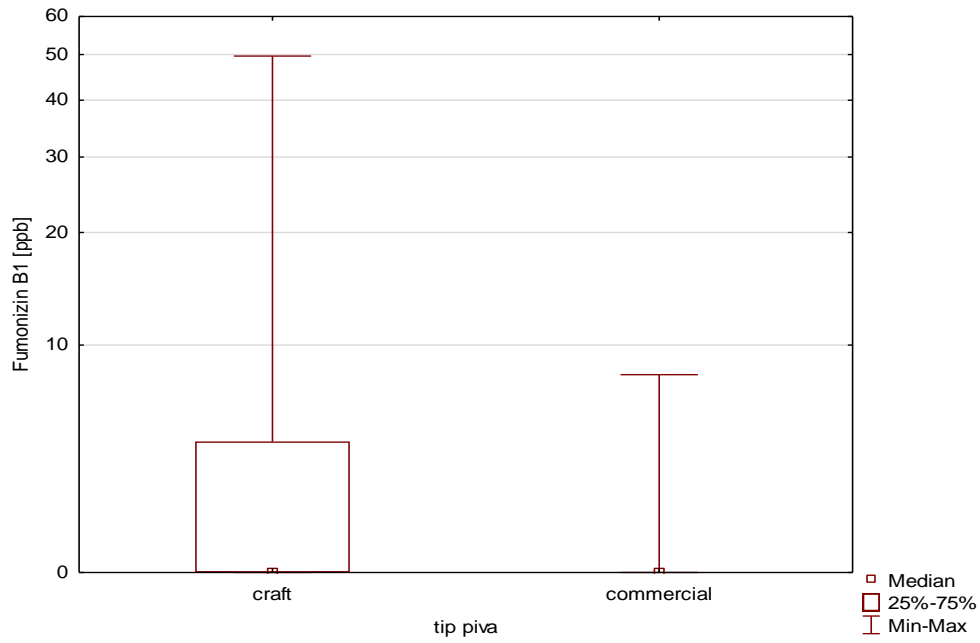
Slika 34. Kutijasti dijagram gustoće, craft i industrijskog piva (autor)



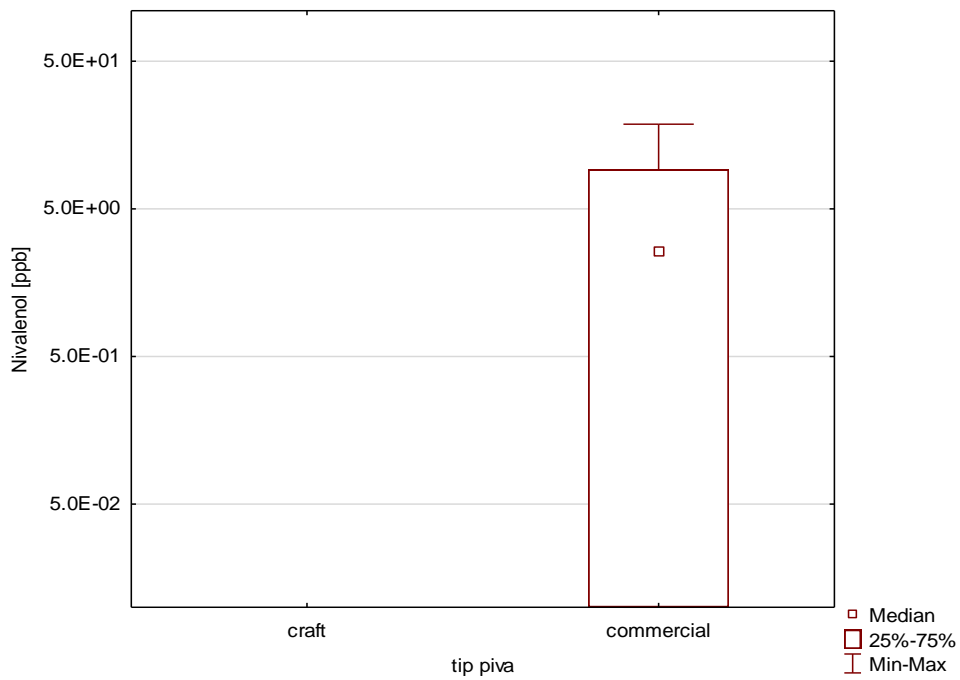
Slika 35. Kutijasti dijagram udjela kojične kiseline u craft i industrijskom pivu (autor)



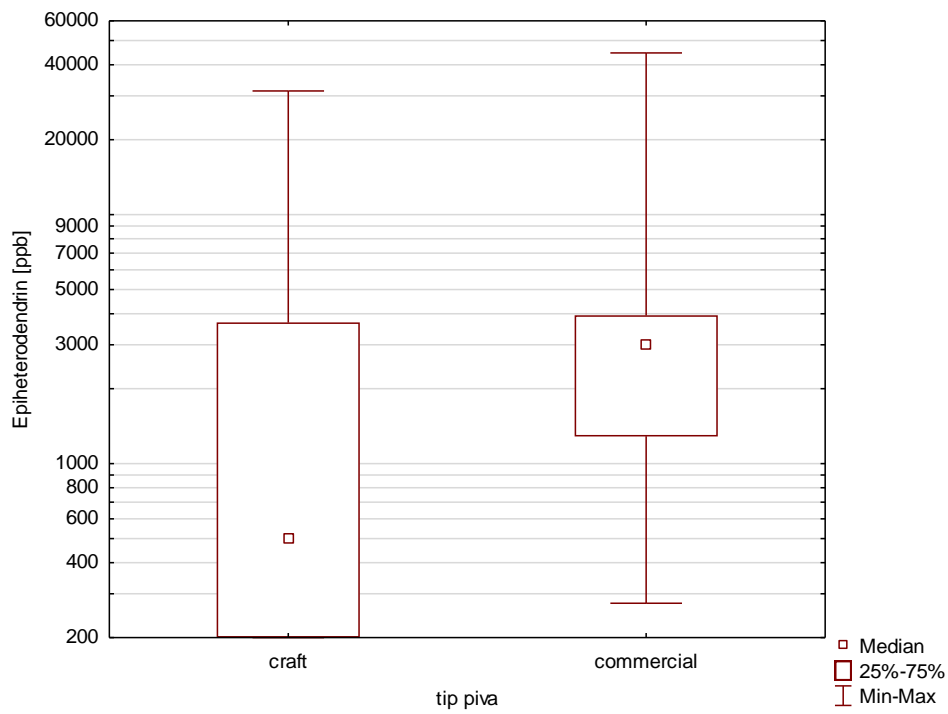
Slika 36. Kutijasti dijagram udjela kulmorina u craft i industrijskom pivu (autor)



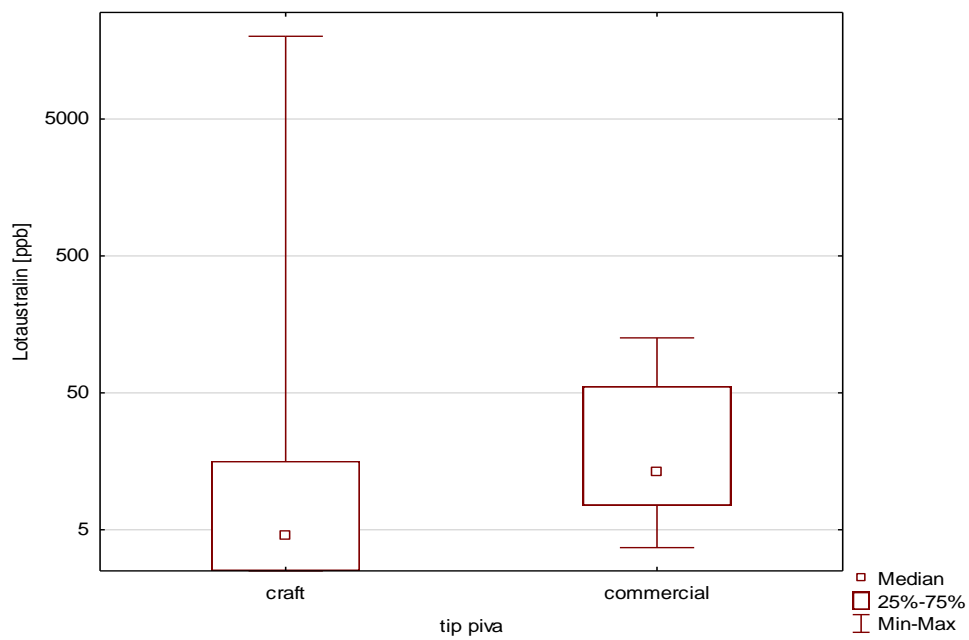
Slika 37. Kutijasti dijagram udjela fumonizina B1 u craft i industrijskom pivu (autor)



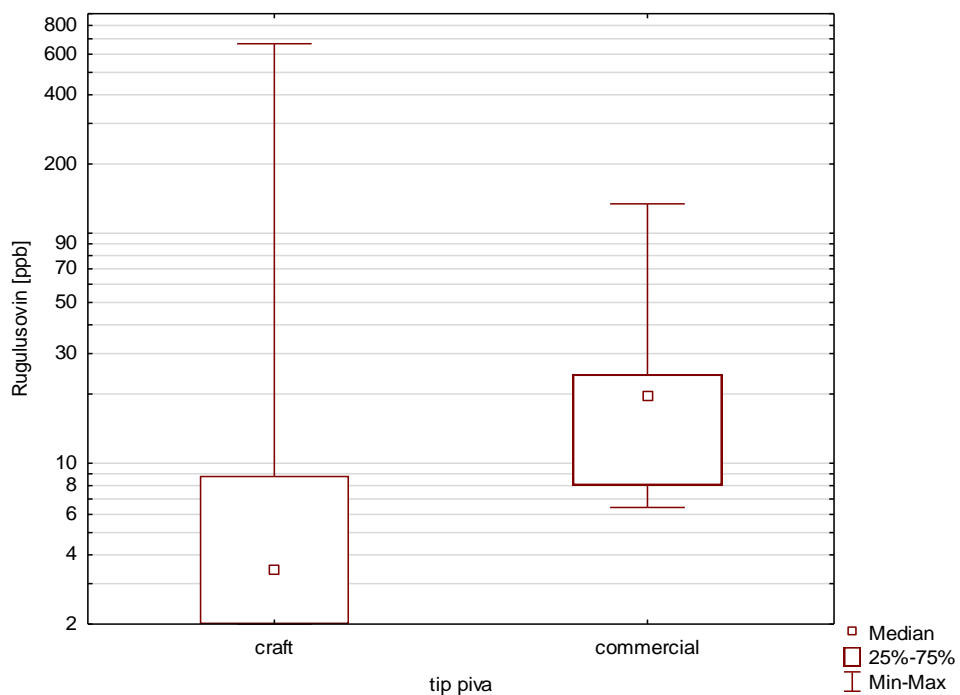
Slika 38. Kutijasti dijagram udjela nivalenola u craft i industrijskom pivu (autor)



Slika 39. Kutijasti dijagram udjela epiheterodendrina u craft i industrijskom pivu (autor)

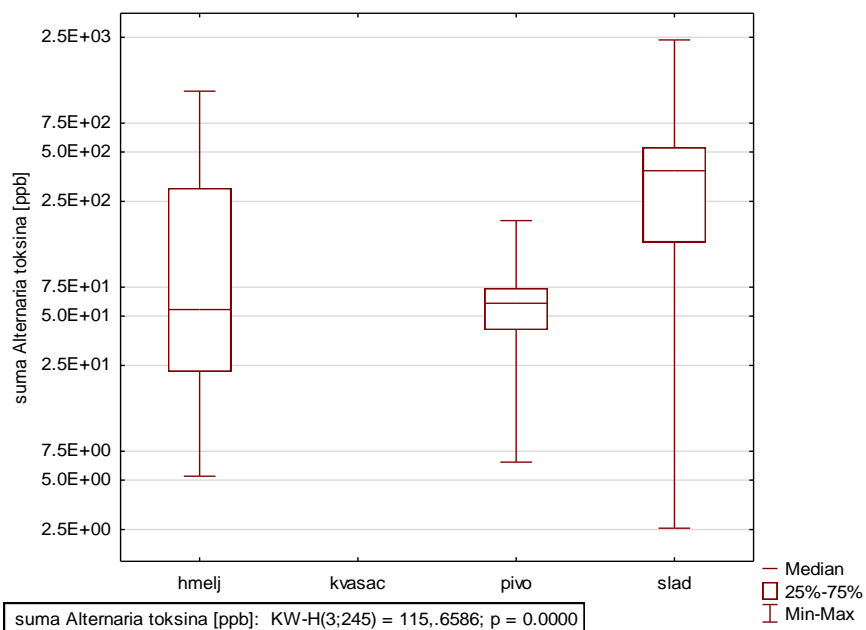


Slika 40. Kutijasti dijagram udjela lotaustralina u craft i industrijskom pivu (autor)

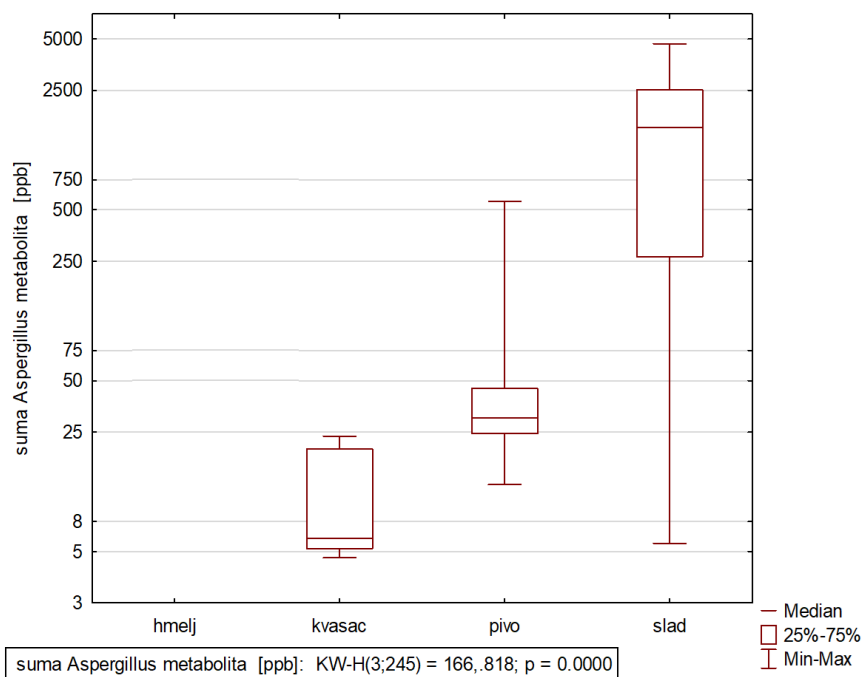


Slika 41. Kutijasti dijagram udjela rugulosolvina u craft i industrijskom pivu (autor)

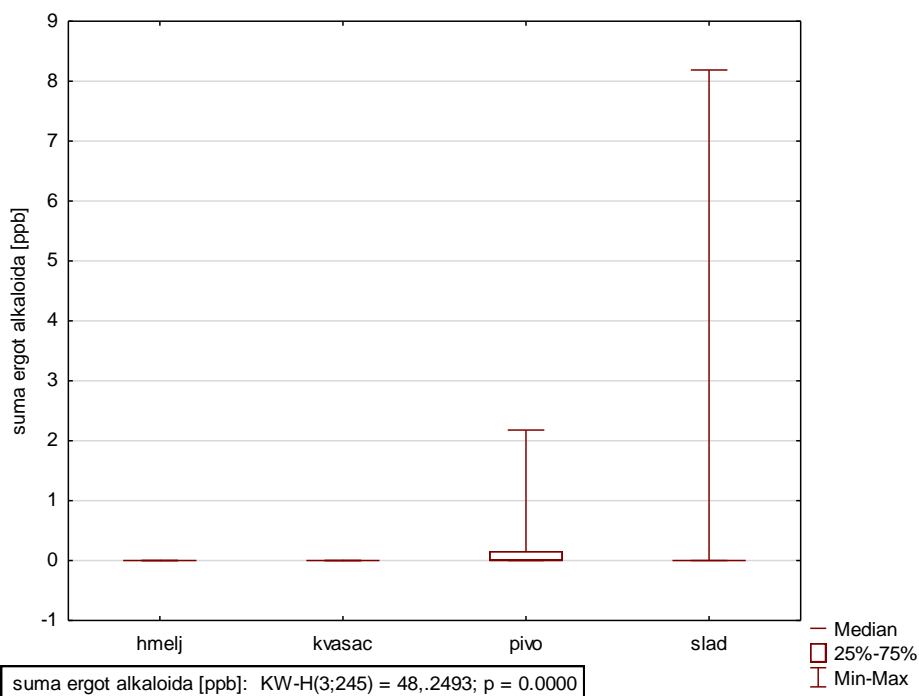
U nastavku su prikazani odabrani statistički značajno rezultati dobiveni Kruskal- Wallis ANOVOM (slike 42-49).



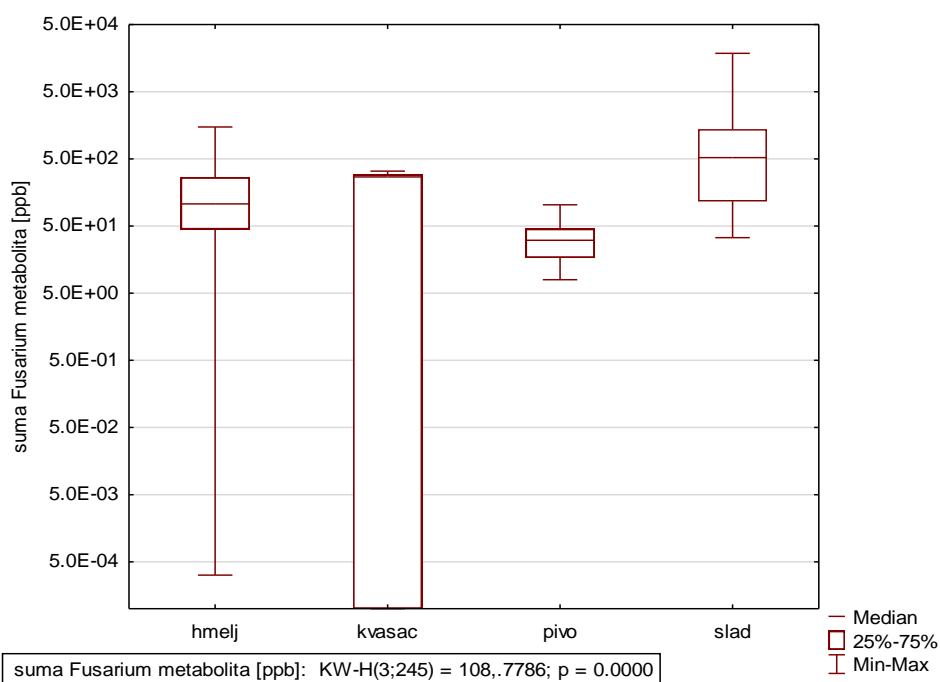
Slika 42. Kutijasti dijagram usporedbe sume *Alternaria* mikotoksina u analiziranim sirovinama hemlja, kvasca, piva i slada (autor)



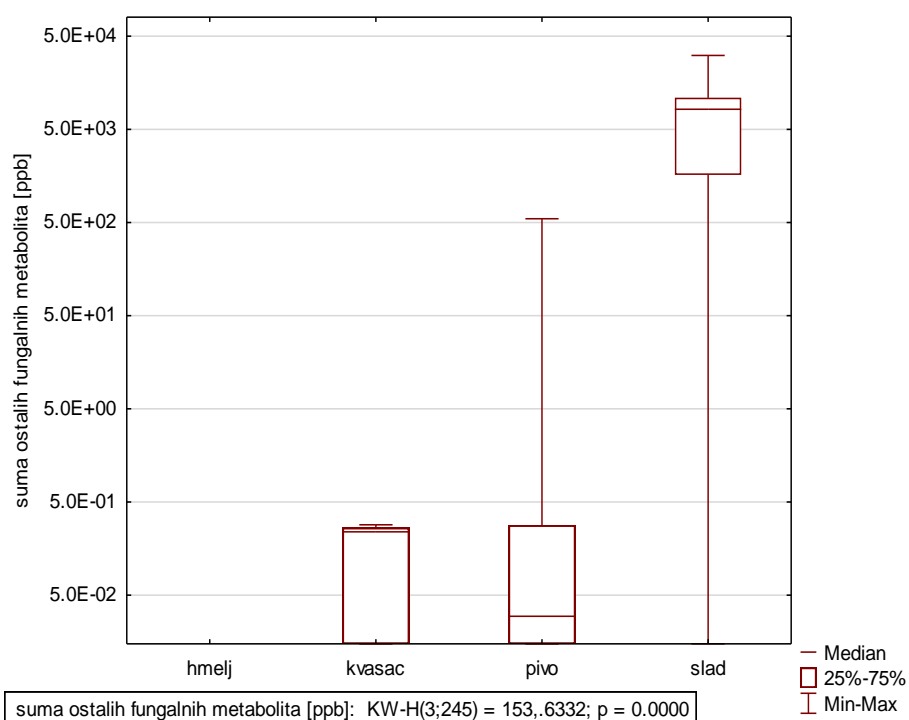
Slika 43. Kutijasti dijagram sume *Aspergillus* mikotoksina u analiziranim sirovinama hemlja, kvasca, piva i slada (autor)



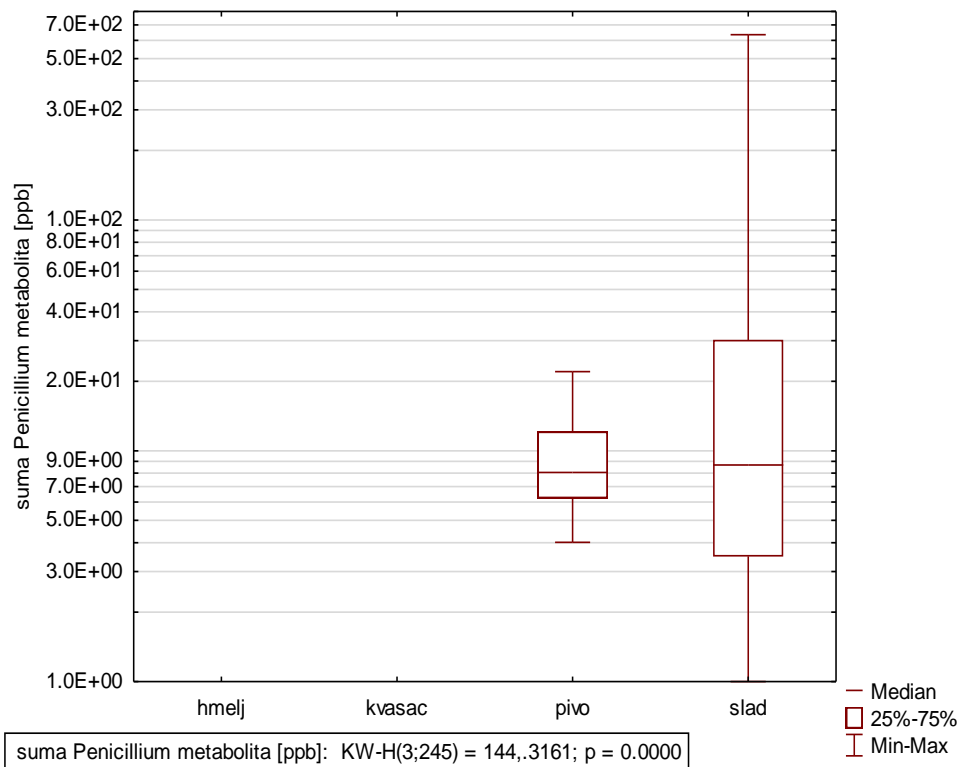
Slika 44. Kutijasti dijagram sume *Ergot alkaloida* u analiziranim sirovinama hemlja, kvasca, piva i slada (autor)



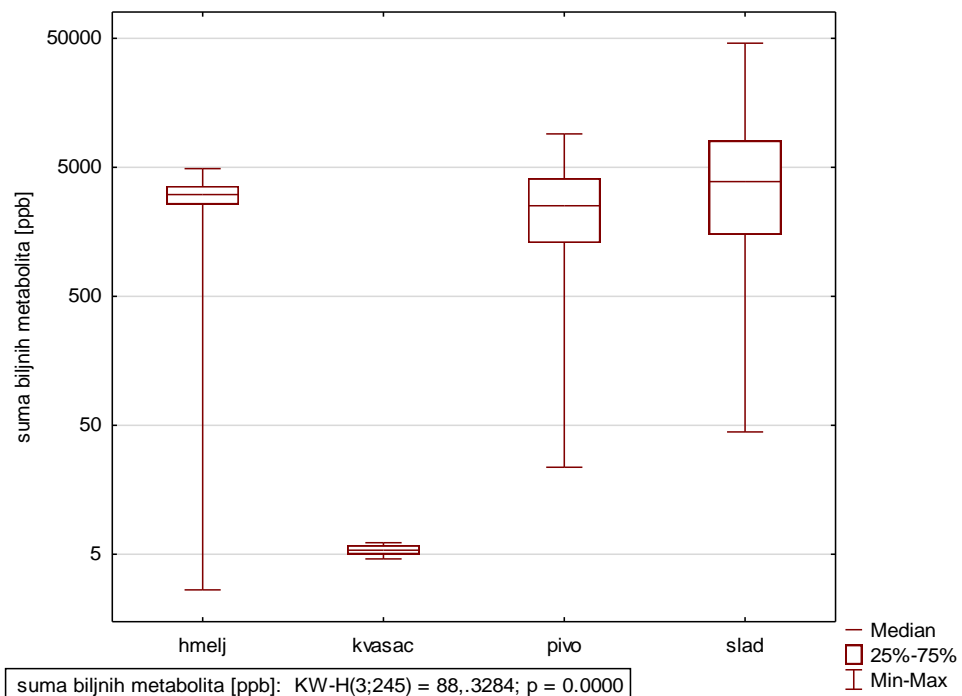
Slika 45. Kutijasti dijagram sume *Fusarium* mikotoksina u analiziranim sirovinama hmelja, kvasca, piva i slada (autor)



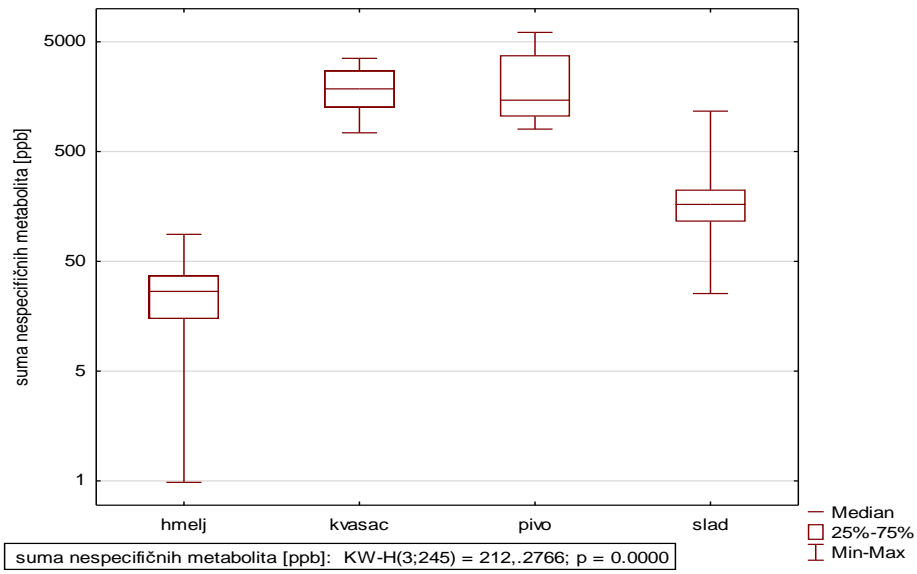
Slika 46. Kutijasti dijagram sume ostalih fungalnih metabolita u analiziranim sirovinama hmelja, kvasca, piva i slada (autor)



Slika 47. Kutijasti dijagram sume *Penicillium* mikotoksina u analiziranim sirovinama hemlja, kvasca, piva i slada (autor)



Slika 48. Kutijasti dijagram sume *biljnih metabolita* u analiziranim sirovinama hemlja, kvasca, piva i slada (autor)



Slika 49. Kutijasti dijagram sume *nespecifičnih metabolita* u analiziranim sirovinama hmelja, kvasca, piva i slada (autor)

5. RASPRAVA

U pivarskoj industriji koriste se sirovine poput ječama, hmelja, kvasca i vode, pri čemu većina njih je izložena kontaminaciji plijesnima te njihovim mikotoksinima. Obzirom na globalnu popularnost piva kao napitka, važno je razumijevanje prisutnosti mikotoksina i njihovih derivata. Kako u sirovinama te u gotovom proizvodu zbog njihovog potencijalnog utjecaja na sigurnost potrošača. Stoga je ovo istraživanje dalo uvid u prisutnost plijesni i mikotoksina u sirovinama kao i mikotoksina u konačnom proizvodu. Na temelju toga je utvrđena povezanosti između senzorskih svojstava piva i prisutnosti mikotoksina u craft pivu te kako prisutnost ključnih mikotoksina može utjecati na percepciju piva. Rezultati pokazuju da mikotoksini mogu značajno utjecati na senzorske karakteristike piva, uključujući okus i aromu.

5.1. Mikološka analiza hmelja i slada

Sirovine koje se koriste u proizvodnji piva mogu biti kontaminirane plijesnima tijekom uzgoja, slađenja i/ili skladištenja. Stoga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio izolacija i identifikacija plijesni u sirovinama, sladu i hmelju, te ih dovesti u vezu s kontaminacijom mikotoksinima u navedenim uzorcima.

U ispitivanim uzorcima slada (tablica 6 i slika 19) su identificirani rodovi plijesni *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* i *Penicillium*, najznačajniji producenti mikotoksina. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima drugih autora. Tako su Krstanović i sur. (2005) potvrdili kontaminaciju ječmenog i pšeničnog slada s *F. graminearum* i *F. culmorum* na području istočne Hrvatske (Krstanović i sur., 2005). Felšöciová i sur. (2021) su nakon devet mjeseci skladištenja u uzorcima slada dokazali prisutnost plijesni iz rodova *Alternaria*, *Arthrimum*, *Cladosporium*, *Epicoccum* i *Penicillium*. Također i u drugim istraživanjima slad je bio kontaminiran plijesnima roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Rhizopus* te je uzrokovao šikljanje piva (Gyllang i sur., 1976; Felšöciová i sur., 2021). Na provedenim istraživanjima u razdoblja od 2012. do 2014. godine utvrđena je kontaminacija uzoraka zrna pivarskog ječma rodovima plijesni *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Uzorci su uzeti izravno s polja prije žetve i iz skladišnog silosa. Plijesni su izolirane i identificirane u zrnu ječma prije proizvodnje slada te nakon namakanja i klijanja tijekom procesa proizvodnje slada. (Krasauskas, 2017).

Alternaria, *Fusarium*, *Cladosporium* ili *Helminthosporium* (*Bipolaris/Deschlera*) vrlo su česte poljske plijesni na usjevima. Štete od poljskih plijesni obično nastaju prije žetve i ne

povećavaju se tijekom skladištenja. One mogu promijeniti boju sjemena, uzrokovati slabljenje ili smrt embrija i stvarati spojeve toksične za ljude i životinje. Skladišne plijesni napadaju sjeme tijekom skladištenja i obično nisu prisutne u većoj mjeri prije žetve. Najčešće skladišne plijesni pripadaju rodovima *Aspergillus* i *Penicillium* i rastu pri vlažnosti sjemena u ravnoteži s relativnom vlagom od 65 do 90%. Druge manje relevantne vrste koje mogu napasti uskladištene žitarice su *Rhizopus*, *Mucor* ili *Chaetomium* (Martín i sur., 2022).

Stoga se može zaključiti da prisutnost rodova *Penicillium* i *Aspergillus* u uzorcima slada pokazuje najvjerojatnije kontaminaciju plijesnima prije i tijekom skladištenja žitarica i/ili slada. Dok su plijesni rodova *Fusarium* i *Alternaria* dospjele u žitarice na polju ili tijekom postupka slađenja.

Analiza mikotoksikogenih plijesni na uzorcima hmelja dokazala je prisutnost plijesni iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* (tablica 6 i slika 19) koji su relevantni producenti mikotoksina. Postoji nekoliko izvješća o infekcijama hmelja s plijesni *Alternaria alternata* poznatom proizvođaču *Alternaria* toksina, koji je nedavno reguliran u Uredbi (EC 553/2022).

Aspergillus je jedan od rodova plijesni koji još uvijek nije izoliran u prirodno zaraženom hmelju (Phalip i sur., 2006). Ekstrakti hmelja pokazali su izvrsna antifungalna svojstva protiv *Aspergillus* spp. (Ignacio Alonso-Esteban i sur., 2019). U ovom istraživanju također nisu dokazane vrste iz roda *Aspergillus* u hmelju, najvjerojatnije iz razloga jer je *Aspergillus* skladišna vrsta plijesni, a hmelj se drži u zamrzivaču zbog čega nije tipičan kontaminat istog.

Ovim istraživanjem utvrđena je prisutnost mikotoksikogenih vrsta plijesni na uzorcima hmelja kao i kod istraživanja Ignacio Alonso-Esteban i sur. (2019).

5.2. Fizikalno- kemijska analiza piva

Podjela piva u različite tipove temelji se na svojstvima poput sadržaja alkohola, boje, gorčine, bistrine, okusa i dr. Za lager piva koja su proizvedena od ječmenog slada pH se kreće u rasponu 4,00-5,00 (Spedding, 2024). U sličnom rasponu kreću se vrijednosti dobivene ovim istraživanjem za craft lager piva i industrijskog lager piva (tablica 7-17). Za Ale piva obično se kreću u rasponu od 3,00-6,00. pH vrijednosti za sve tipove ale craft piva u ovom istraživanju kreću se u rasponu od 4,7 do 5,14 (tablica 9-16). Tipovi kiselog piva kao što su belgijski lambic, Berliner Weisse i nova generacija craft kuhanog kiselog piva mogu imati pH

čak 3,30 (Spedding, 2024). Prema Prilogu 1 prosječna pH vrijednost svih analiziranih uzoraka piva iznosi 4,9. U jednom uzorku piva vrste Blond ale (BA) pH vrijednost iznosila je 6,4 vjerojatno zbog vrste vode koja ima veći udio CaCO_3 . Takvo pivo imalo je najniži pH ali i svi ostali parametri odstupaju u vrijednostima od svih analiziranih uzoraka. Dobiveni rezultati su slični pH vrijednostima koje su prijavili Granato i sur. (2010) čija se pH vrijednost za uzorke craft piva kretala od 4,13 do 4,97. Prema istraživanjima, piva iz Tanzanije imaju pH u rasponu od 3,9–5,5 (Tüsekwa *i sur.*, 2000). U pivarskoj se industriji pH vrijednost smatra jednim od važnih kriterija jer utječe na higijenske uvjete i druge fiziološke parametre poput boje, mirisa, okusa, biološku kao i na kemijsku stabilnost. Obično su za svijetla lager piva pH vrijednosti u rasponu od 3,90–4,20. To ima važnu ulogu tijekom procesa proizvodnje piva jer to uključuje enzimatsku učinkovitost, iskoristivost hmelja, koagulaciju proteina i praćenje aktivnosti kvasca u čistoj fermentaciji piva (Pai, T. *i sur.*, 2015).

Iz rezultata prikazanih u (tablicama 7-17) vidljivo je da se u analiziranim uzorcima craft piva srednja vrijednost ekstrakta dobivenih refraktometrijskom metodom kreće od 5,2 - 12,7° Brix. U prilog 1 najveća vrijednost u jednom uzorku piva od 19,4 °Brix što proporcionalno dovodi do povećanja parametara etanola, EBC vrijednosti te ugljikohidrata. Prosječna vrijednost ukupnog ekstrakta u svim analiziranim uzorcima iznosila je 6,4° Brix. Podaci analiziranih uzoraka sličnicu podacima istraživanja rada (Castro Marin *i sur.*, 2021).

Prema istraživanju na Tanzanijskim pivima dobivene su slične vrijednosti za ukupni ekstrakt čija se vrijednost kretala između 7,0 i 12,8° Brix (Tüsekwa *i sur.*, 2000). U istraživanju da Costa Jardim i sur. (2018) koncentracija za lager piva bila je 5,75 °Brix. Slična vrijednost je dobivena u analiziranim uzorcima lager craft piva te je iznosila 5,96 °Brix dok je u industrijskom iznosila 6,2 °Brix (tablica 17, Prilog1).

EBC metoda je kvantitativna i uključuje spektrofotometrijsko mjerenje boje uzorka piva u kiveti na valnoj duljini od 430 nm. Ovisno o korištenju sladne ili nesladne pšenice što u konačnici može utjecati na boju piva. Što se tiče dobivenih rezultata za boju piva, srednja vrijednost za EBC iznosi 9,9 kod pilsnera. Najviša vrijednost je bila detektirana 279 EBC kod stout piva. Prema prilogu 1 prosječna vrijednost na ljestvici EBC iznosila je 37,2 a za SRM 18,7. Najviša vrijednost za piva Stout na EBC ljestvici iznosi 438. Prema Baxter i Hughes (2001) EBC ljestvica se kreće od 4,5 do 1550. U njihovom istraživanju za piva Stout i jedno Oatmeal Stout utvrđene su veće vrijednosti za boje piva 122, 130 i 123 izražene u EBC, a predstavljaju tamna piva. Također u istraživanjima Polshin i sur. (2010) prijavljene vrijednosti

za EBC bile su niže za svijetlo pivo u odnosu na tamno pivo. Za svijetla piva EBC vrijednost je iznosila 8,58 -27,3 a za tamno pivo između 40,6 i 113,5 EBC-a (Polshin *i sur.*, 2010).

Prema istraživanju Mastanjević *i sur.* (2018) glicerol je iznosio također $2,0 \text{ g L}^{-1}$ kao i u ovom istraživanju (tablica 7-17, Prilog1), a njegova uloga je da daje punoću okusa i slatkoću pivu te također utječe na viskoznost. Većina glicerola koji se nalazi u pivu nastaje iz metabolizma kvasca, a manji dio potječe iz same žitarice. Pai *i sur.* (2015) predstavili su reducirajući sadržaj šećera u ispitivanim uzorcima piva u rasponu od $0,469 \text{ mg mL}^{-1}$ do $2,682 \text{ mg mL}^{-1}$. U ovom istraživanju srednja vrijednost za glicerol u analiziranim uzorcima piva kretala se od $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ do $3,84 \text{ mg mL}^{-1}$ (tablica 7-17, Prilog1).

Pivo je veoma složen matriks koji je sastavljen od ugljikohidrata, masnih kiselina, etanola, estera, vitamina, minerala, anorganskih iona i polifenola. Koncentracija reducirajućeg šećera važan je parametar u fermentaciji piva naročito za mikropivovare, jer im daje informaciju o optimizaciji i regulaciji procesa fermentacije za povećanjem prinosa i kvalitete konačnog proizvoda. Kvasac može koristiti samo određene šećere niže molekularne težine, kao što su fruktoza, glukoza, maltoza, saharoza i maltotrioza (Silva *i sur.*, 2020).

Glavninu šećera sladovine čine fermentabilni šećeri: maltoza, maltotrioza, glukoza, fruktoza i saharoza koji imaju važnu ulogu u proizvodnji pivskog "tijela" (Stewart, 2016). Prema rezultatima u analiziranim uzorcima za porter, blond ale, pilsner te amber ale pivu nema prisutnosti maltotrioze (tablica 8,11,13,15 Prilog1). Najvjerojatnije su dobiveni podaci rezultat sojevia kvasaca koji bolje iskorištavaju maltotriozu kao primarni izvor energije (Catallo *i sur.*, 2020). Najviša srednja vrijednost za glukozu iznosi $0,84 \text{ g L}^{-1}$ kod american blonde ale, a za fruktozu najviša je srednja vrijednost od $0,9 \text{ g L}^{-1}$ u stoutu analiziranim uzorcima piva. Za maltozu najviša srednja koncentracija u IPA uzorcima piva iznosi 5 g L^{-1} . Utvrđena najviša srednja vrijednost koncentracije za masne kiseline iznosi $1,71 \text{ g L}^{-1}$.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem za srednju specifičnu težinu u analiziranim uzorcima craft piva kreću se od 1,02 do 1,05 (tablica 7-16, Prilog1). Prema istraživanjima rezultati specifične težine craft piva iz različitih stilova varirali su od 1,004 za lager do 1,020 Oatmeal Stout (Meza-Márquez *i sur.*, 2024). Vrijednosti specifične težine bile su i unutar prihvatljivog raspona od 1,001-1,040 prema Beer Judge Certification Program.

Pivo je izvor alkohola, a njegov sadržaj varira ovisno o vrsti piva, sastojcima naročito šećera i fermentaciji. Volumni udio alkohola u pivu obično se kreće od 3 - 14 % kada se provodi normalna fermentacija. No, većina piva ima udio alkohola u rasponu od 3- 6%

(Bamforth, 2002). Rezultati udjela alkohola različitih tipova craft piva varirala su od 4,43 do 7,17 % (tablica 7-16, Prilog1). Postoci alkohola bili su unutar onih navedenih u literaturi za craft pivo (Gordon *i sur.*, 2018). Udio alkohola u industrijskim pivama se kretao od 4,41-6,68 % (Bamforth 2002; Silva *i sur.* 2022). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Bortoleto *i sur.* (2022.), koji su uočili da se sadržaj alkohola u uzorcima industrijskog piva kreće od 4,5 do 5,3%. U uzorcima crafta varijacija bila od 4,4 do 9,1% što ukazuje da sadržaj alkohola ima tendenciju biti veći u craft pivu (Bortoleto *i sur.*, 2022). Udio alkohola za rumunjsko svijetlo pivo kretao se od 3,4 do 3,9%, za tamno pivo od 3,7 do 4,6% . Za belgijska i nizozemska piva vrijednosti alkohola se kreću od 5,02 do 11,21% i za tamna piva od 5,98 do 11,9%. U pivu iz Belgije, Italije, Njemačke, Japana, Nizozemske, Češke, Kube, Meksika, Danske i Engleske, vrijednosti alkohola kreću se između 0,5 i 9,5% . Kod španjolskog piva vrijednosti alkohola kreću se od 1,31 do 5,55, koje su pak vrijednosti usporedive s rumunjskim pivama (Popescu *i sur.*, 2013).

5.3. Određivanje mikotoksina u hmelju, sladu i kvascu

Mikotoksini kao toksični sekundarni metaboliti plijesni obično nastaju u fazi intenzivnog rasta plijesni na različitim supstratima ali nisu nužni za rast plijesni, a plijesan ih sintetizira kao reakciju na okolinu. Budući da su kemijski i toplinski vrlo stabilni spojevi često se nalaze i u gotovom proizvodu ali je potrebno istaknuti da tijekom konzumacije hrane koja sadrži mikotoksine nema nikakvog senzorskog upozorenja. Posebno su opasni i zbog toga što odsutnost vidljivih plijesni u sirovini odnosno hrani ne isključuje njihovu pojavnost. S obzirom na navedeno, jedan od ciljeva ove disertacije bio je dokazati prisutnost mikotoksina u sirovinama za proizvodnju craft piva (hmelj, slad, kvasac) i njihov mogući transfer u konačan proizvod.

Rezultati sume mikotoksina te biljnih, fungalnih i nespecifičnih metabolita prisutnih u sirovinama za proizvodnju piva prikazani su u tablicama 18-27 i u prilogima 5.

Tablica 28 prikazuje rezultate sume mikotoksina i biljnih, fungalnih i nespecifičnih metabolita prisutnih u hmelju dok su svi podaci za isto prikazani u prilog 2. U prosjeku ima više *Fusarium* mikotoksina nego *Alternaria* mikotoksina. Najveća detektirana koncentracija je za sumu biljnih metabolita, a najniža za sumu nespecifičnih metabolita.

No, ovim istraživanjem je po prvi puta potvrđeno da postoje mikotoksini koji dolaze iz rodova *Fusarium* i *Alternaria* dok ostalih mikotoksina u analiziranim uzorcima nema. Primjerice Ignacio Alonso-Esteban i sur. (2019) utvrdili su prisutnost mikotoksikogenih vrsta plijesni na uzorcima hmelja no nema dokumentiranih rezultata za pojavnost mikotoksina u hmelju. Postoji samo jedan rad u kojem je po prvi puta potvrđena pojavnost mikotoksikogenih vrsta plijesni iz rodova *Fusarium* i *Alternaria* u hmelju (Dodlek Šarkanj i sur., 2024)

Rod *Fusarium* jedan je od najčešće dokazanih u hmelju, poznato je da uzrokuje fuzariozu hmelja (HF) (Kuzdraliński i sur. 2013), pjegavost, folijarnu nekrozu i uginuće zaraženih biljaka i uvenuće hmelja (HW) (Sabo i sur. 2002). Zbog relativno učestale visoke infekcije razvijeni su kvalitativni i kvantitativni PCR testovi za detekciju roda *Fusarium* u hmelju (Thomas i sur., 2022). *Alternaria alternata* koja je poznati proizvođač *Alternaria* toksina (Kovač i sur., 2018; Šarkanj i sur. 2020) jedna je od plijesni koja inficira biljku hmelja. Dobiveni rezultati ovim istraživanjem potvrđuju kontaminaciju hmelja sa *Alternaria* toksinima.

U svim testiranim uzorcima potvrđena je prisutnost najmanje jednog *Alternaria* toksina, pri čemu je najveća zastupljenost tenuazonske kiseline (TeA) u 100% uzoraka, zatim altersetina (ALT) 98% uzoraka, te alternariolmonometil etera (AME) u 82% uzoraka. Ostali *Alternaria* toksini kao što su infektopiron, altenusin, TTX i AOH bili su prisutni u manje od 5% uzoraka. Pojava TTX-a bila je niska u usporedbi s drugim matricama izmjenjenih koncentracija AOH, AME ili TeA. TeA je uvijek veća u koncentraciji i pojavi u usporedbi s drugim toksinima *Alternaria* vrsta.

Ukupni podaci o njihovoj pojavnosti dobro su sažeti u EFSA-inoj procjeni izloženosti prehrane *Alternaria* toksinima. Dobro je dokumentirano da *Alternaria* spp. proizvodi mikotoksine specifične za domaćina (Meena and Samal, 2019), tako da će svaka matrica imati svoju specifičnu distribuciju različitih *Alternaria* toksina. Budući da je ovo prvo izvješće, nije moguće usporediti rezultate s drugim objavljenim rezultatima.

Tri *Alternaria* mikotoksina preporučuju se za praćenje prema (EC 553/2022), ali ne u uzorcima poput hmelja, vjerojatno zbog nedostatka podataka o njegovoj pojavnosti. S ovim novim podacima, mogao bi biti uključen u plan praćenja, procjenu rizika od strane EFSA-e ili zakonodavstva zbog relativno visoke maksimalne koncentracije TeA ($1174 \mu\text{g kg}^{-1}$), koja premašuje većinu predloženih ograničenja prema preporukama (EC 553/2022) o praćenju prisutnosti toksina *Alternaria* vrsta u hrani.

Koncentracije druga dva spomenuta *Alternaria* toksina u zakonodavstvu ne prelaze predložene granice iako ih ne treba isključiti iz praćenja zbog njihove toksičnosti (Louro *i sur.*, 2024). Usporedbom mjesta uzorkovanja najveća prosječna količina svih *Alternaria* toksina je u Zagrebačkoj i Sisačko-moslavačkoj županiji, dok je najmanja prosječna količina svih *Alternaria* toksina izmjerena u uzorcima prikupljenim u gradu Zagrebu i Vukovarsko-srijemskoj županiji slika 19. Usporedbom rezultata utvrđena je statistički značajna razlika u pojedinačnoj i zbirnoj distribuciji svih *Alternaria* toksina između različitih hrvatskih županija ($p < 0,01$) (slika 42).

Rast roda *Penicillium* rijetko je zabilježen na hmelju. I rezultati ovog istraživanja to potvrđuju, jer nije dokazana prisutnost *Penicillium* vrsta (tablica 6). Dokazano je da ekstrakti hmelja inhibiraju rast nekoliko *Penicillium* vrsta (Nionelli *i sur.*, 2018; Ignacio Alonso-Esteban *i sur.*, 2019) ali s druge strane, *Penicillium* spp. je dokazan u hmelju najvjerojatnije kao izvor enzima diastaze koji pokreću "Hop Creep" u suho hmeljenom pivu (Cottrell, 2022; Young, Oakley and Fox, 2023). Nakon identifikacije prisutnosti *Penicillium* spp. nije bilo podataka o prisutnosti njihovih mikotoksina u hmelju.

Pomalo su iznenađujuće česte prijave kontaminacije plijesnima roda *Fusarium* i nepostojanje podataka o pojavi mikotoksina u hmelju. U ovom istraživanju potvrđena je prisutnost 15 različitih *Fusarium* toksina, a u prosjeku je 100% uzoraka bilo kontaminirano barem jednim od *Fusarium* mikotoksina (tablica 29, Prilog 2).

Od kvantificiranih mikotoksina, neki su regulirani u Uredbom Komisije EC 915/2023; kao što su DON, FB1; a neki pak su regulirani preporukama Komisije o prisutnosti T-2 i HT-2 toksina u žitaricama i proizvodima od žitarica prema (EC 165/2013). Iz poziva EFSA-e za kontinuirano prikupljanje podataka o pojavi kemijskih kontaminanata u hrani i hrani za životinje detektirani su BEA, ENNB, ENNB1, ENNB2, ENNB3, MON, NIV i drugi koji se ne spominju u legislativi (prilog 2).

No, zanimljivo je da nisu pronađeni modificirani ili maskirani oblici mikotoksina, vjerojatno zbog relativno niske kontaminacije specifičnih metaboličkih putova u hmelju koji ne uključuju glukuronidaciju i sulfataciju. Uridifosfaglukoziltransferaza (UGT) se koristi u biljkama za maskiranje mikotoksina, ali u hmelju također može modificirati aromu koju hmelj ima stvaranjem glukozida terpenoida bez okusa (Holt *i sur.*, 2019). Stoga su sorte hmelja koje se koriste u pivarstvu obično one s nižom UGT aktivnošću, što smanjuje njihovu sposobnost obrane od mikotoksina stvaranjem maskiranih oblika. Iako su analizirane i četiri lokalne

divlje sorte, one također nisu pokazale nikakvu sposobnost maskiranja mikotoksina u usporedbi s komercijalnim sortama.

Od nereguliranih *Fusarium* mikotoksina potvrđena je prisutnost bikaverina (BKV), butenolida (BUT), kulmorina (CUL) i sikanola (SIC). Uspoređujući regulirane mikotoksine s njihovim zakonskim granicama, najviša otkrivena razina DON-a ($768 \mu\text{g kg}^{-1}$) (prilog 2) prelazi granice za dječju hranu i prerađenu hranu na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu, kruh, peciva, kekse, grickalice od žitarica i žitarice za doručak, žitarice stavljene u promet za krajnjeg potrošača, brašno od žitarica, krupica, posije i klice kao finalni proizvod stavljeni u promet za krajnjeg potrošača te ostali proizvodi od mljevenja kukuruza koji nisu stavljeni u promet za krajnjeg potrošača.

S ovom otkrivenom razinom preporučljivo je izvršiti široki probir i dodatnu procjenu rizika, zbog upotrebe hmelja u proizvodima koji su uglavnom topivi u vodi kao što su pivo ili farmaceutski proizvodi. Uspoređujući razine T-2 i HT-2 sa zakonskim propisima, svi uzorci s utvrđenim HT-2 toksinom premašili su indikativne razine za hranu na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu.

Razine FB1 prilično su niske u usporedbi sa zakonskim granicama, dok je u ispitivanim uzorcima detektirana visoka koncentracija CUL od $1053 \mu\text{g kg}^{-1}$ kao i njegova visoka pojavnost u 55 % uzoraka što je zabrinjavajuće zbog smanjenja kapaciteta detoksikacije prema DON-u za potrošače takve hrane.

Druga dva neregulirana, ali vrlo česta mikotoksina su SIC i BUT u ispitanim uzorcima ali budući da o utvrđenim koncentracijama nema dovoljno toksikoloških podataka, njihovu toksikološku važnost tek treba istražiti.

Tablica 30. prikazuje rezultate pojavnosti sume mikotoksina, biljnih, fungalnih i nespecifičnih metabolita prisutnih u sladu dok su svi rezultati za isto prikazani u Prilogu 3. Rezultati su sukladni dobivenim rezultatima mikološke analize u kojoj je potvrđena 100% prisutnost vrsta iz rodova *Alternaria*, *Aspergillus* i *Fusarium*, a rod *Penicillium* je zastupljen sa 87% u sladu (tablica 6).

U uzorcima slada dokazana je najveća pojavnost *Fusarium* i *Aspergillus* mikotoksina, EA, a zatim *Alternaria* i *Penicillium* mikotoksina. Dok od ostalih metabolita najviše ima nespecifičnih metabolita, ostalih fungalnih, biljnih i bakterijskih metabolita.

U uzorcima su pronađeni *Alternaria* toksini koji su regulirani prema preporukama (EC 553/2022), za AOH, AME detektirani su iznad limita detekcije u 33 % uzoraka i TeA. Uz njih

su detektirani i mikotoksini s EFSA-ina popisa poziva za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminanata u hrani i krmivu poput TTX toksina te maskiranih oblika alternariol-9-glukozid i alternariolmonometileter- 9 - glukozid.

Detektirani *Alternaria* mikotoksini koji trenutno nisu regulirani ili su pod posebnim monitoringom su: altersetin u 86% uzoraka, infektopirona (92%), radikinina, zinndiola i zinniamida. Nakon njih sljedi TTX u 76% uzoraka koji spada u regulirane mikotoksine ali zakonska legislativa se još uvijek ne odnosi na slad ili ječam. Utvrđene vrijednosti ne prelaze maksimalno dozvoljene koncentracije za začinsku papriku, ali prelaze maksimalno dozvoljene koncentracije hrane za dojenčad i malu djecu te se takvi sladovi ne mogu koristiti u svrhu proizvodnje dječje hrane.

U preporukama (EC 553/2022) maksimalne pronađene koncentracije premašuju vrijednosti hrane za dojenčad i malu djecu na bazi žitarica gdje je propisano maksimalno 2 ng g⁻¹ za AOH i AME. AOH i AME jedini su *Alternaria* mikotoksini čiji maskirani metaboliti su detektirani u ovom istraživanju iako je njihova pojavnost vrlo niska za AOH- 9-Glc (2%) uzorka, i AME-9- Glc u 7 % uzorka (Prilog 3).

Biljke najčešće maskiraju mikotoksine tako da vežu glukozu na aktivno mjesto molekule mikotoksina u biljci te ih tako spremaju u vakoulu i to ih čini opasnima prema biljci. Nakon konzumacije biljke ili ekstrakta biljke koja sadrži maskirani mikotoksin mikroorganizmi crijevne mikroflore mogu svojim glikolitičkim enzimama odvojiti glukozu od molekula mikotoksina čime mikroorganizmi dobivaju glukozu za svoj rast i razvoj a domaćin je izložen povećanoj koncentraciji nativnog mikotoksina (Berthiller *i sur.*, 2013). Kod AME - 9- Glc to može biti problematično jer su utvrđene relativno visoke srednje vrijednosti.

U svim uzorcima slada potvrđena je prisutnost *Aspergillus* mikotoksina (Prilog 3). Detektirani su AFB1 i AFB2 koji su regulirani u Uredbi (EC 915/2023) te sterigmatocistin (STC) kao mikotoksin s EFSA-ina popisa poziva za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminata u hrani i krmivu. S najvećom pojavnosti detektiran je fenopirozin, kojična kiselina, triptostatin A, dok je STC detektiran u 10 % uzoraka

AFB1 i AFB2 koji su detektirani samo u jednom uzorku u koncentracijama od 2,43 ng g⁻¹, odnosno 0,68 ng g⁻¹ te prelaze maksimalno dozvoljene koncentracije za žitarice i proizvode dobivene od žitarica u kojem je najveća dopuštetna količina za AFB1 2 ng g⁻¹ odnosno suma AFB1, AFB2 AFG1 i AFG2 iznosi 4 ng g⁻¹. Pojavnost samo AF skupine B, upućuje na infekciju slada tijekom skladištenja s plijesni *Aspergillus flavus*.

Abebele (2020) je mjerio sumu AF pomoću ELISA, a 34 % uzoraka je bilo pozitivno sa rasponom detektiranih ukupnih AF između 0,0005 do 0,004 ng g⁻¹.

Nafuka i sur. (2019) potvrdili su prisutnost AB1 i AB2 u sirkovom sladu gdje je pojavnost bila 44% uzoraka što je više u odnosu na ovo istraživanje. Također detektiran je STC u 89 % uzoraka, značajno više koncentracije u odnosu na ovo istraživanje takvi rezultati su očekivani u afričkim uzorcima budući da imaju puno veću kontaminaciju s *Aspergillus* vrstama u odnosu na Europske uzorke (Nafuka i sur., 2019).

Rezultati ukazuju da od reguliranih fuzarijskih mikotoksina Uredbom (EC 915/2023) detektirani su: DON u 70 % uzoraka, slijedi T-2 toksin u 41% uzoraka, ZEN u 34%, HT-2 u 31%, dok su FB1 i FB2 detektirani u samo šest odnosno osam uzoraka. Od *Fusarium* mikotoksina s popisa EFSA-inog poziva detektirani su metaboliti DON-a: 15-Ac- DON u 50% i 3 -Ac- DON u 13 % uzoraka. Detektiran je DON -3 Glc u 78% uzoraka čija je prosječna vrijednost 159 ng g⁻¹, viša nego što je dokazano za sami DON od 3,56 ng g⁻¹ u 21% uzoraka (Prilog 3). To je specifičnost koja se događa u sladu kao obrambeni mehanizam biljke koja tijekom klijanja razgrađuje škrob te novonastale glukozne jedinice koristi za specifično vezanje mikotoksina čineći ih metabolički inaktivnim u biljkama. Kad se konzumiraju takve biljke crijevna mikoroflora cijepa glukozidnu vezu te su konzumenti tada izloženi višim koncentracijama mikotoksina od onih koji su bili detektirani kao nativni mikotoksini (Kovač i sur., 2018).

To je još jedna od opasnosti koje je EFSA prepoznala zbog čega je tražila dodatni monitoring maskiranih mikotoksina. U sladu je detektiran HT-2 glukozid u 37% ispitivanih uzorka i ZEN – 14 sulfat prisutan u 43 % uzoraka, pronađena pojavnost maskiranog oblika je viša nego nativnog oblika dok je maksimalna izmjerena koncentracija nešto niža nego u nativnom obliku dok je srednja vrijednost neznajno viša (1ng).

U ispitivanim uzorcima detektiran je i α – ZOL u 8% uzoraka, EFSA je u svom izvješću izračunala da je α - ZOL u projeku 60 puta toksičniji od nativnog oblika ZEN-a iako se zbog svoje male pojavnosti ne nalazi u legislativi.

Sljedeća skupina *Fusarium* mikotoksina s EFSA-inog popisa su ENN toksini, a detektirani su svi koji imaju vrlo visoku pojavnost u ispitivanim uzorcima: BEA, BEA A, ENNA, ENN1, ENNB, ENNB1 ENNB2, ENNB3 (Prilog 3). BEA je detektiran u svim ispitivanim uzorcima s rasponom vrijednosti od 0,20 do 15,3 ng g⁻¹, BEA A u 23 % uzoraka, dok su ENNA, ENN1, ENNB i ENNB1 detektirani su u svim ispitivanim uzorcima, ENNB2 u 90 %, a ENNB3 u 50% uzoraka. Uz regulirane FB1 i FB2 mikotoksine detektiran je i FB3 u

jednom uzorku. Na EFSA-inom popisu se također nalazi moniliformin koji je detektiran u 84% ispitivanih uzorka, a detektirani su također i MAS i DAS u 29 odnosno 21% uzorka.

Zadani detektirani *Fusarium* mikotoksin s EFSA -inog popisa je NIV detektiran u 56 % uzoraka, CUL (79%) i njegovi metaboliti 15- hidroksi kulmurin (62%) i 5-hidroksi kulmurin (5%).

Učestalo je dokazan i aurofuzarin te rubrofuzarin pigmenti koje *Fusarium* vrste mogu lučiti a detektirani su u 92 % odnosno 5 %. Bikaverin je također jedan od *Fusarium* mikotoksina koji se učestalo pronalazi u hrani (Kifer *i sur.*, 2021), a u ovom 6,60 ng g⁻¹ istraživanju je bio prisutan u 84 % uzoraka. Sljedeći su od nereguliranih *Fusarium* mikotoksina koji se pojavljuju u sladu dokazani su: krisogin (83 %), ekvisetin i epi-ekvisetin (55 % odnosno 10 %), apsidin ,(52 %).

Sikanol i giberelinska kiselina dokazani su u oko 50% uzorka. Giberelinska kiselina je biljni hormon rasta koji potiče rast i rano sazrijevanje biljke, a kojeg je *Fusarium* plijesan evolucijom uspješno sintetizirala kako bi natjerala biljku na brži rast čime joj pada imunitet te je tada lakši napad plijesni na same biljke (Berthiller *i sur.*, 2013; Kovač *i sur.*, 2018).

Prisutnost ostalih *Fusarium* mikotoksina butenolid, klamidospol i klamidospordioli antibiotik Y, butoksin fungerin i fuzarenska kiselina dokazani su u rasponu od 12 do 49 % uzoraka, dok je fuzaroproliferin dokazan u samo 3% uzoraka (Prilog 3).

Beccari *i sur.* (2018.) ispitivali su pojavnost fuzarijske paleži klasa u pivskom ječmu na pojavnost mikotoksina te utvrdili da su u sladu iz talijanskog ječma požnjelog 2014. godine bili prisutni sljedeći mikotoksini: DON u 15 % uzoraka, čije su koncentracije značajno niže od rezultata dobivenim ovim istraživanjem. Nadalje DON-3- GLc potvrđen u 19 %, DAS u 40% uzoraka za razliku od 21 % pozitivnih uzoraka u ovom istraživanju (prilog 3).

HT-2 toksin i HT-2 glukozid također su detektirani u njihovom istraživanju u višoj pojavnosti od 60 odnosno 54 % uzoraka dok je MAS bio detektiran u 62% uzoraka čija je prosječna koncentracija bila viša nego u ovom istraživanju

Isti autori su detektirali neosolaniol koji nije bio detektiran u ovom istraživanju najvjerojatnije zbog specifičnih *Fusarium* vrsta koje su prisutne na talijanskom tlu gdje se takve žitarice uzgajaju. Njihovim istraživanjem detektirana je neobično visoka pojavnost NIV od 83% iako su izmjerene koncentracije slične kao i u ovome istraživanju i iznosile su prosječno 25,9 ng g⁻¹.

T-2 toksin bio je detektiran u 65 % uzoraka što je više nego u ovom istraživanju kao i prosječne i maksimalne koncentracije koje su iznosile 14,9 i 102 ng g⁻¹. U istraživanju su

također kvantificirali depsipeptide (ENN) sa podjedanko visokom pojavnošću ENNB (100%), ENNB1 (94%), ENNA1 (81%), BEA (79%) i ENNA (60%). Od ostalih *Fusarium* metabolita pronađeni su 15-hidroksikulmurin u 40% uzoraka što je značajno niže nego u ovom istraživanju od 62%. Antibiotik Y bio je detektiran u 29%, apsicidin u 81% uzoraka, a slični rezultati dobiveni su i u ovom istraživanju.

U istraživanju Beccari i sur. (2018) ostali fuzarijski metaboliti (aurofuzarin, butenolid, krisogin, kulmurin, epiekvisetin i ekvisetin) detektirani su u koncentracijama koje su bile načajno niže u odnosu na rezultate u ovom istraživanju. Nadalje, isti autori su u svojim istraživanjima dokazali i prisutnost moniliformina u 23 % uzoraka i ZEN-a u 4 % uzoraka što je značajno niže u odnosu na rezultate dobivene u ovom istraživanju.

Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu za redovitom kontrolom salda koji se koristi u pivarskoj industriji odnosno mogućom potrebom za kontrolom mikotoksina u uzorcima piva kako bi se osiguralo zdravlje potrošača.

Pojavnost *Penicillium* mikotoksina u sladu detektirana je u 87% uzoraka slada. Od reguliranih mikotoksina Uredbom (EC 915/2023) detektirani su citrinin u 62% uzoraka i OTA u 5% uzoraka. A s EFSA-ina popisa za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminanata u hrani i krmivu detektrana je mikofenolna kiselina u 16% uzoraka. Dobiveni rezultati su u suglasju s istraživanjima drugih autora, pa su tako Čulig i sur. (2017) dokazali prisutnosti citrinina u hrvatskim žitaricama, a najveća kontaminacija citrininom zabilježna je u Osječko-baranjskoj županiji (slika 19) sa određenom maksimalnom koncentracijom 70 ng g⁻¹ (Prilog 3).

Mastanjević i sur. (2019) su u preglednom radu opisali mikotoksine koji se pojavljuju u sladu te kao najznačajnije naveli OTA i citrinin. Xiao i sur. (2016) razvili su brzu metodu za otkrivanje OTA u sladu gdje su potvrdili pojavnost OTA u 12,5% uzoraka. Od ostalih detektiranih *Penicillium* mikotoksina kao relevantne mogu se izdvojiti pirenocin A prisutan u 57% uzoraka, ciklopenin u 36% uzoraka, i restin A u 19 % uzoraka ali s relativno visoko detektiranom koncentracijom od 584 ng g⁻¹ te penicilinska kiselina u 17 % uzoraka s maksimalnom koncentracijom od 331 ng g⁻¹. Grizeofulvin i dihidrogrizeofulvin bili su prisutni u 12% odnosno 14% uzoraka, aurantiamin A u 12% uzoraka dok su ostali dektirani mikotoksini ove vrste bili prisutni su manje od 10% uzoraka (Prilog 3)

Europska Unija 2022. godine je donijela amman o regulaciji OTA u sladu (EC 1370/2022) (EU, 2022) gdje u članku četiri specifično navodi da treba dodatne podatke o

transferu OTA iz slada u bezalkoholna i alkoholna pića, kako bi se mogla kasnije postaviti pravilna legislativa za maksimalno dozvoljene koncentracije u sladu i pivu.

Međutim do danas nema EU legislative što upućuje na nedostatak znanstvenih rezultata koji su nužni za pravilnu procjenu rizika potrošača zbog čega su važna ovakva istraživanja.

Rezultati pojavnosti ergot alkaloida (EA) u uzorcima slada prikazani su u tablici 30 i Prilogu 3. Postoji više od 80 poznatih EA, najčešće iz *Claviceps* vrste: ergometrin (Em), ergotamin (Et), ergokristin (Ecr), ergokriptin (Ekr), ergozin (Es) i ergokornin (Eco) i njihovi inin-epimerni oblici ergotaminin (Etn), egometrinin (Emn), egokristinin (Ecrn), ergokriptinin (Ekrn), ergokroninin (Econ) i ergosinin (Esn). Ergotamin i ergozin su vrlo stabilni alkaloidi i zagrijavanje ne utječe na njihovu koncentraciju. Dok na ergokristin, ergokriptin, ergokornin i ergometrin zagrijavanjem se može smanjiti koncentracija ovih alkaloida. Ergopeptini i ergopeptinini su različiti u pogledu toksičnosti te bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava. Ergopeptini su biološki aktivni, a ergopeptinini su manje biološki aktivni. Kisele otopine ili alkalne otopine ubrzavaju pretvorbu ergopeptina u ergopeptinine. Ergopeptinini se također mogu pretvoriti u ergopeptine u metanolu, vodenom organskom otapalu i kiselinama (Agriopoulou i sur.2021).

Schwarz i sur. (2007) pratili su sudbinu EA tijekom slađenja i kuhanja piva, te su došli do sljedećih zaključaka: tijekom slađenja dolazi do 30%- tne redukcije EA zbog uklanjanja vodotopljivih alkaloida, dok nakon kuhanja u pivu zaostaje između 2 do 32% EA. U njihovom istraživanju dominantni EA bio je ergokristin dok je u ovom istraživanju bio dominantniji ergometrin u 19% uzoraka, a ergokristin samo u 2 % uzorka (Prilog 3).

U ječmenom sladu u istraživanju Schwarz i sur. (2007) uz ergokristin bili su prisutni i ergokornin ergotamin, ergozin te ergokriptin u značajno više koncentracijskih vrijednosti od detektiranih EA u ovom istraživanju.

Prema znanstvenom mišljenju EFSA (2012) utvrđena je akutna referentna doza (ARfD) od $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase za EA u hrani i hrani za životinje. Kanada i Sjedinjene Države za EA postavile su 300 mg kg^{-1} kao maksimalnu dopuštenu razinu u zrnu, a Kina je utvrdila 0,01% ukupnog sadržaja EA u zrnu.

EFSA je preporučila nastavak prikupljanja detaljnih podataka o EA u hrani i stočnoj hrani zbog njihovih visokih toksičnih učinaka. Dostupni analitički rezultati iz uzoraka hrane

prikupljenih između 2011. i 2016. u 15 različitih europskih zemalja omogućili su EFSA-i da izrazi svoje znanstveno mišljenje o izloženosti EA u prehrani ljudi i životinja.

Što se tiče pojavnosti bakterijskih metabolita, ostalih fungalnih metabolita i fitotoksina u sladu; od bakterijskih metabolita pronađeni su ciklički ionofori poznati kao makrotetrolidni antibiotici koje proizvode bakterije roda *Streptomyces* u koncentracijama iznad limita detekcije u 12% uzoraka. Fitoestrogeni su nađeni u 2% uzoraka iznad limita detekcije od kojih u paru dolaze kumestrol i daidzein, te u jednom uzorku prisutan je biokanin. Od ostalih fungalnih metabolita najveća je pojavnost teragina koji je prisutan u 80% uzoraka, zatim slijedi rubelin D u 69% uzoraka, monocerin u 40 % uzoraka te citohalasin E koji je prisutan u 29 % uzoraka (Prilog 3).

Habschid i suradnici (2019) su također detektirali metabolite ostalih fungalnih vrsta gdje je prednjačio rubelin D koji je bio pozitivno koreliran sa kontaminacijom plijesni *Fusarium graminearum*, dok su Penagos-Tabares i suradnici (2022) detektirali fungalne metabolite; monocerin u 5%, a rubelina D u 90% uzoraka u komini od proizvodnje piva.

Nafuka i suradnici (2019) istraživali su pojavnost multitoksina u sladu od slanutka te su potvrdili pojavnost monaktina u 40 % uzoraka, dok je monocerin bio prisutan u 100% uzoraka u koncentraciji od 293-1120 ng g⁻¹.

Drakopolous i suradnici (2021) u Švicarskom ječmu također su potvrdili visoku pojavnost rubelina D u 99 % uzoraka, a monocerina u 77 % uzoraka.

Rezultati pojavnosti biljnih metabolita i nespecifičnih metabolita u sladu bili su prisutni u 100% uzoraka (tablica 30). Od biljnih metabolita najveću pojavnost imao je epiheterodendrin i linamarin i lotaustralin koji su bili potvrđeni u svim uzorcima oni su iz skupine cijanogenih glukoziida a bili su prisutni u 94% odnosno 6% uzoraka iznad limita detekcije (Prilog 3) Rezultati ovih istraživanja u suglasju su s rezultatima drugih znanstvenika koji su potvrdili pojavnost cijanogenih glukoziida u sladu (Garda *i sur.*, 2005; Mastanjević *i sur.*, 2018; Habschied *i sur.*, 2019).

Pojavnost cijanogenih glukoziida je poznata u ječmu i žitaricama iako Nielsen i suradnici (2002) nisu pokazali cijanogenezu u ječmu. Tijekom fungalnog napada neke biljke pomoću cijanogenih glukoziida bore se protiv napada plijesni dok kod ječma ta aktivnost nije potvrđena. S druge strane cijanogenu aktivnost (otpuštanje cijanida) bilo je moguće β-glukozidazama iz kvasca *S. cerevisiae* tijekom proizvodnje piva i viskija. Poznata je toksičnost cijanida na aerobne organizme zbog čega se vjeruje da je to evolucijski korak ječma prema prirodnoj obrani od plijesni. Ksantotoksin prisutan je u 12 % uzoraka, dok je

kakonin bio prisutan u 3% uzoraka (Prilog 3)Wu i sur. (2022) napravili su pregled biološkog djelovanja ksantotoksina prirodnog furanokumarina odnosno bioaktivnog psoralena izoliranog iz bilja koji pokazuje značajne aktivnosti u tretiranju bolesti kože, a pokazuje i neuroprotektivno, osteoprotektivno, organoprotektivno, protuupalno antibakterijsko antioksidirajuće djelovanje protiv karcinoma dojke (Wu i sur., 2022).

Od nespecifičnih metabolita najveću pojavnost imaju triptofol, rugulusolvin, brevianamid F, koji su bili prisutni u 100 % uzoraka zatim emodin prisutan u 77 % uzoraka te citreorozein u 76 %. Ostali nespecifični metaboliti bili su dokazani u 2 – 34 % uzoraka (tablica 30, prilog 3)

Sličnu pojavnost nespecifičnih metabolita u sladu detektirali su i ostali autori koji su ispitivali sladove multitoksičnom metodom. Triptofol osim što je jedan od nespecifičnih metabolita služi kao za signaliziranje kvoruma kod kvasaca i za međustaničnu komunikaciju (Li i sur., 2023).

U tablici 31 prikazani su rezultati pojavnosti metabolita u uzorcima kvasaca, dok su ostale vrijednosti prikazane u Prilogu 4. Detektirana je prosječno niža koncentracija metabolita u odnosu na ostale sirovine za proizvodnju piva (hmelj, slad) izuzev triptofola koji je u ovim uzorcima statistički značajno viši u odnosu na koncentracije ostalih metabolita ($p < 0,05$).

Očekuje se da mikotoksini koji su detektirani u uzorcima kvasca dolaze iz podloga na kojima su se ti kvasci uzgajali a koje mogu sadržavati mikotoksine. U svim uzorcima detektirana je kojična kiselina. Fuzarijski mikotoksini su detekirani u 58% uzoraka s najvećom koncentracijom fuzarične kiseline, zatim CUL i klamidoprola dok su ostali detektirani mikotoksini bili ispod 1 ppb.

Od *Penicillium* metabolita detektiran je samo citrinin u 13% uzoraka. *Alternaria* toksini su detektirani u 48% uzoraka uz najveću pojavnost regulirane tenozoične kisline. Od ostalih fungalni metabolita monocerin je prisutan u 58 % uzoraka. Od fitoestrogena u svim uzorcima detektiran je biokannin, a od biljnih metabolita kakonin.

Od nespecifičnih metabolita najznačajniji pronađeni su triptofol i brevianamid F detektiran u 100 % uzoraka dok su ostali pronađeni u 35 % uzoraka.

Wall - Martinez i suradnici (2019) istraživali su utjecaj *Fusarium* mikotoksina na fermentaciju sladovine pomoći *Saccharomyces* kvasaca te su zaključili da prisutnost DON-a i ZEN-a nema statistički značajniji utjecaj na produkciju alkohola. Te da se u prosjeku adsorbira 3,11 % DON- a, 18,9 % ZEN-a na staničnu stjenku kvasca *S. cerevisiae*.

S druge strane Inoue i suradnici (2013) ispitivali su sudbinu mikotoksina tijekom kuhanja i fermentacije piva te su zaključili da od 14 ispitivanih mikotoksina koncentracija OTA, AFB2, AFB1, AFG1, FB2, ZEN, i PAT su reducirani na manje od 20% tijekom fermentacije od početne koncentracije u žitracima najvjerojatnije zbog vezanja na trop žitarica i staničnu stijeku kvasca (Inoue *i sur.*, 2013).

Pascari i sur. (2018) napravili su pregled utjecaja procesa proizvodnje piva na kontaminaciju mikotoksinima te su o utjecaju fermentacije dali nekoliko primjera vezanja mikotoksina za staničnu stjenku kvasaca gdje je najveći stupanj adsorpcije zabilježen za ZEN 75,1%, zatim OTA 59,4%, odnosno AFB1 48,1%. Pretpostavljaju da se nepolarni mikotoksini vežu za betaglukane iz stanične stijenke kvasca pomoću vodikovih veza i Vi erwalsovih sila (Pascari, Ramos, *i sur.*, 2018).

Pflieger i sur. (2015) napravili su pregledni članak o dekomntaminaciji mikotoksina pomoću kvasaca gdje su pokazali na koje sve načine stanica kvasca može vezati ili razgraditi određene mikotoksine, a također su pokazali i da je mogući transfer mikotoksina iz mikrobiološke podloge preko stanične stijenke kvasaca što je vjerojatno i razlog dobivenih rezultata ovog istraživanja (Pfliegler, Pusztahelyi and Pócsi, 2015).

5.4. Određivanje mikotoksina u craft pivu

U tablicama 18 do 28 prikazani su sumarni podaci pojavanosti mikotoksina, biljnih, fungalnih te nespecifičnih bakterijskih metabolita u različitim tipovima craft piva kao i industrijskom pivu. Dobiveni rezultati pokazuju da su u svim ispitivanim tipovima craft piva pronađeni *Alternaria*, *Aspegillus*, *Fusarium* i *Penicillium* mikotoksini, biljni metaboliti i nespecifični metaboliti.

U uzorcima lager piva, uz *Alternaria*, *Aspegillus*, *Fusarium* i *Penicillium* mikotoksine ostali fungalni metaboliti detektirani su u 47% uzoraka, EA u 11%, a bakterijski metaboliti u 5% uzoraka. Za razliku od industrijskog uzorka lager piva kod kojeg nisu bili detektirani bakterijski metaboliti, EA niti ostali fungalni metaboliti ali je bila viša koncentracija *Alternaria* i *Fusarium* mikotoksina, te nespecifičnih metabolita (tablica 18, Prilog 5)

U pilsner craft pivu prisutnost ostalih fungalnih metabolita, EA te ostalih bakterijskih metabolita je utvrđena u 33% uzoraka (tablica 19, Prilog 5). Kod amber ale piva u 50% uzoraka detektirani su EA i ostali fungalni metaboliti dok bakterijski metaboliti nisu pronađeni (tablica 20, Prilog 5). Prisutnost EA i ostalih fungalnih metabolita detektirana je u

67% uzoraka american blonde ale piva, a bakterijskih metabolita u 33% (tablica 21, Prilog 5), dok kod blonde ale piva, EA su detektirani u 60% uzoraka, ostali fungalni metaboliti u 40% , a bakterijskih metabolita nije utvrđeno ni u jednom uzorku (tablica 22, Prilog 5). U usporedbi sa industrijskim blonde ale pivom kod kojeg je utvrđena viša pojavnost EA i ostalih fungalnih metabolita u odnosu na craft piva. Koncentracija svih mikotoksina, bakterijskih metabolita i ostalih fungalnih metabolita bila je niža u industrijskom pivu u odnosu na craft piva. Jedino je detektirana povišena koncentracija biljnih metabolita te ostalih nespecifičnih metabolita (tablica 27, Prilog 5).

U uzorcima IPA piva zabilježen je sličan trend gdje su EA detektirani u 71% uzoraka, ostali fungalni metaboliti u 29% uzoraka, a bakterijski metaboliti nisu pronađeni ni u jednom uzorku. Industrijski uzorak IPA piva imao je više koncentracije EA, *Aspergillus* i *Penicillium* mikotoksina, ostalih fungalnih metabolita te biljnih metabolita. Dok je u craft pivu zabilježena viša koncentracija *Fusarium* mikotoksina te nespecifičnih metabolita (tablica 23, Prilog 5).

Drugačija situacija utvrđena je kod pale ale craft piva gdje su ostali fungalni metaboliti detektirani u 78% uzoraka, EA u 56% uzoraka, a bakterijski metaboliti nisu detektrani. U industrijskom pale ale pivu utvrđena je viša koncentracija sume EA, ostalih fungalnih metabolita te biljnih metabolita (tablica 24, Prilog 5). U Ale craft pivu (tablica 25) suma ostalih fungalnih metabolita detektirana je u 75% uzoraka, EA 50%, dok bakterijski metaboliti nisu bili detektirani. Prosječna vrijednost sume biljnih metabolita je najviša te je iznosila 4199,87 ng mL⁻¹.

Svi ispitivani uzorci porter craft piva bili su kontaminirani sa EA, 50% uzoraka sa ostalim fungalnim metabolitima dok bakterijskih metabolita nije utvrđeno. U poslijednjem stout tipu piva, EA i ostali fungalni metaboliti detektirani su u 50% uzoraka ali zato bakterijski metaboliti nisu bili detektirani. U stout pivu je zabilježena e najveća srednja vrijednost (4176 ng mL⁻¹) nespecifičnih metabolita. Kod stout industrijskog piva zabilježene su više koncentracije EA i ostalih fungalnih metabolita. Dok je za sve detektirane mikotoksine viša koncentracija bila utvrđena u craft uzorcima piva (tablica 26-27, Prilog 5).

U prosjeku se najviše *Alternaria*, *Aspergillus* i *Fusarium* mikotoksina, suma ostalih fungalnih metabolita i suma biljnih metabolita nalazi u pale ale craft pivu, dok je suma bakterijskih metabolita najviša u lager craft pivu. Najveća koncentracija EA je u pilsner craft pivu, a *Penicillium* mikotoksina i nespecifičnih metabolita u stout craft pivu (tablica 19 i 27, Prilog 5).

Što se tiče *Alternaria* mikotoksina njihova prisutnost dokazna je u svim ispitivanim uzorcima craft piva čije su vrijednosti prikazne u Prilogu 11. No, najveća pojavnost zabilježna je za tenuazoničnu kiselinu koja je regulirana prema Uredbi (EC 553/2022). Od ostalih reguliranih *Alternaria* toksina bili su prisutni alternariol (AOE) u 15% svih uzoraka i alternariolmetileter (AME) sa 35% uzoraka. Tentoksin jedan od mikotoksina koji je spomenut u EFSA-inom popisu mikotoksina poziva za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminanata u hrani i krmivu dokazan je u 58% uzoraka prosječne koncentracije 0,10 ng mL⁻¹. Zanimljiva je detekcija maskiranog oblika *Alternaria* mikotoksina, alternariolmonometileter-glukozid koji je detektiran u 15% uzoraka.

Prusova i suradnici (2022) su pratili transfer slobodnih i konjugiranih *Alternaria* i *Fusarium* mikotoksina tijekom proizvodnje slada i kuhanja piva i utvrdili su da se kod konvencionalnog slađenja reducira koncentracija *Alternaria* mikotoksina ali su najveće koncentracije i dalje zadržane u sladu dok su niže koncentracije utvrđene u korjenčićima za vrijeme klijanja slada u vodi.

Tijekom kuhanja piva koncentracija AOE i AME i TTX-a je padala dok je koncentracija tenuazonične kiseline porasla u odnosu na slad s kojim se pivo priprema. S druge strane kod ubrzanog slađenja došlo je do porasta koncentracije AOH, AME i tenuazonične kiseline dok je koncentracija TTX pala na 74% od početne koncentracije (Prusova i sur., 2022). Siegl i sur. (2010) napravili su skrining *Alternaria* mikotoksina tenuazonične kiseline u pivu s njemačkog tržišta čija je najveća koncentracija nađena u Bock pivu a koncentracije su niže od koncentracija utvrđene ovim istraživanjem što potvrđuje sezonski karakter infekcije *Alternaria* plijesnima sirovina za proizvodnju piva te potrebu za redovitim monitoringom i procjenom rizika od istih (Siegel i sur., 2010).

Scheibenzuber i sur. (2021) napravili su analizu 13 različitih *Alternaria* mikotoksina u 50 uzorka njemačkog piva te njihovih modificiranih oblika. Utvrdili su prisutnost samo tenuazonične kiseline u Bock pivu, dok u ovom istraživanju najveća koncentracije tenuazonične kiseline bila je u pale ale pivu značajno viša od detektiranih u ovom istraživanju (Scheibenzuber i sur., 2021).

Prelle i sur. (2013) su detektirali AOE u talijanskim uzorcima piva sa maksimalno uvrđenim koncentracijama koje su značajno više od maksimalne koncentracije utvrđene ovim istraživanjem (Prelle i sur., 2013). Rezultati ovog istraživanja slični su rezultatima istraživanja Bauer i sur (2016).

Dobiveni rezultati utvrđuju 100% prisutnost *Aspergillus* mikotoksina u svim uzorcima čije su vrijednosti prikazne u tablici 18-28 i Prilogu 5. Srećom za potrošače u uzorcima piva nema potvrđenih reguliranih mikotoksina ove vrste. Od ostalih relevantnih visoko pojavljujućih mikotoksina je fenopirozin koji je bio prisutan u 55% uzoraka, slijedi dekostriotkvalin A (24%) i kinadolin A (12%) ispitivanih uzorka. Pojavnost *Aspergillus* mikotoksina najčešće je povezana sa nepravilnim skladištenjem sirovina za proizvodnju piva. Također pojavnost *Aspergillus* mikotoksina nije prijavljena kod ostalih istraživanja koja su se fokusirala na regulirane mikotoksine.

Fusarium mikotoksini bili su prisutni u svim ispitivanim uzorcima craft piva tablica 1-27, Prilog 5 Najveća pojavnost od 94 % bila je zabilježena za mikotoksin kulmorin (CUL), 15 - hidroskikulmurin 89%, beauvericin (BEA) 91% ispitivanih uzoraka uz napomenu da je detektiran u svim craft uzorcima i ni u jednom industrijskom pivu. No, detektiran je FB3 (18%) koji nije reguliran ali je EFSA zatražila podatke o njegovoj pojavnosti sa čak nešto većom maksimalnom vrijednošću od FB2. Moniliformin detektiran je u 86% uzoraka ista pojavnost utvrđena je kod ENNB sa značajno manjom utvrđenom koncentracijom.

Dva regulirana mikotoksin prema (EC 915/2023), FB1 i FB2 detektirani su u 80% uzoraka. Od reguliranih mikotoksina DON je prisutan u 20% uzoraka uz napomenu da je pronađen u svim industrijskim pivima i u 7 uzoraka craft piva (B55,B56, B33, B09-B12). ZEN je detektiran u 9% svih uzoraka craft piva (B02,B08;B12;B23,B27) sa relativno niskim koncentracijama.

Varga i suradnici (2013) napravili su ispitivanje pojavnosti DON-a i njegovih konjugata DON-3-Glc, i 3-Ac- DON-a u 374 uzoraka piva među kojima 11 uzoraka industrijskih piva iz Republike Hrvatske. U svim ispitivanim uzorcima bila je potvrđena pojavnost DON-3-Glc, dok je DON bio potvrđen u 82 % uzoraka (Varga *i sur.*, 2013).

U usporedbi sa ovim istraživanjem utvrđena pojavnost DON-a i DON-3-Glc bila je niža za DON i iznosila je 20% od ispitivanih uzoraka, a za DON-3-Glc je iznosila 39%. Uz napomenu da je u svim industrijskim uzorcima piva utvrđen DON, dok DON-3-Glc nije bio potvrđen ni u jednom od uzorka. Utvrđena prosječna koncentracija u ovom istraživanju bila je nešto viša za DON od 12,0 ng mL⁻¹ u rasponu od 5,2 do 31,2 ng L⁻¹. Dok je za DON-3-Glc prosječna vrijednost bila nešto niža 8,13 ng mL⁻¹ u rasponu od 3,04 do 17,1 ng mL⁻¹. Utvrdili su da nije bio prisutan 3-Ac-DON ni u jednom od ispitivanih uzoraka što je dokazno i u ovom istraživanju (tablica 18-27, Prilog 5).

Od modificiranih mikotoksina s EFSA-inog popisa detektrani su sljedeći: modificirani oblici DON-a; 15-AC – DON koji je utvrđen u 11% uzoraka, a maksirani oblik DON-3- Glc u 39% uzoraka što je više nego nemaskirani oblik DON- a. Uz njega je detektiran NIV i nivalenol -3 - glukozid u 27% svih uzoraka. Također je pronađen modificirani oblik ZEN-a , ZEN -14- sulfat u 29% uzoraka češće nego ZEN u 9%. Detektiran je također maskirani oblik; metabolit β -zeralenol u 3 % uzoraka (Prilog 5).

Od skupine enniatina za koje je EFSA tražila posebno praćenje prema pojavnosti najčešće je detektriran BEA 91%, ENNB 86%, ENNB1 67%, ENNA1 15% , ENNB2 11%, ENNB13 15% te ENNA 2%, maksimalne koncentracije svih enniatina bile su redovito ispod 1 ng mL⁻¹ (Prilog 5).

T-2 i HT-2 toksini koji su regulirani pravilnikom (EC 165/2013) kao i HT-2- glukozid kao maskirani oblik HT-2 toksina najveću pojavnost imao je HT-2 toksin koji je bio detektiran u 32 % uzoraka, slijedi njegov glukozid u 26 % uzoraka, te T- 2 toksin koji je bio detektiran u 21% svih uzoraka craft piva . Uz navedene iz EFSA liste detektiran je i diacetoksiscirpenol (DAS) u 5% uzoraka i monoacetoksiscirpenol (MAS) u 8% uzoraka.

Od ostalih nereguliranih *Fusarium* mikotoksina koji nisu posebno spomenuti u pravilnicima ili EFSA uputi za monitoring pronađeni su: 15-hidroksi kulmurin (89%) bikaverin (8%), butenolid (30%), klamidospol (14%), krisogin (78%), dihidroklonektrin (32 %) i fungerin (42 %) i fuzarinska kiselina detektirana u 18% uzoraka (Prilog 5).

Mastanjević i sur. (2018) napravili su istraživanje prijenosa mikotoksina iz sirovina u pivo gdje je u dva ispitivana uzorka provjeravan sadržaj *Fusarium* mikotoksina nakon što je jedan uzorak bio kontaminiran sa sporama plijesni *Fusarium culmorum*. Drugi uzorak pšenice je bio prirodno kontaminiran u polju ali nije sadržavao kvantificirajuće koncentracije *Fusarium* mikotoksina. Dok uzorak koji je bio namjerno kontaminiran sadržavao je široki spektar i visoke koncentracije *Fusarium* mikotoksina u pivu koje je bilo proizvodno od kontaminirane pšenice. U takvom pivu je detektiran i ZEN u koncentraciji veće vrijednosti od dobivenih rezultata u ovom straživanju. Također je u uzorku detektiran BEA u koncentraciji što je niže i od minimalno određne koncentracije u ovom istraživanju što potvrđuje sezonsku pojavnost ENN (Mastanjević i sur., 2018). Detektirani su CUL i 15-hidroksi kulmurin u većim koncentracijama od nađenih u ovom istraživanju. Iako su pronađeni i neki drugi *Fusarium* mikotoksini u pšeničnom sladu kao NIV, NIV-3 Glc, aurofuzarin isti nisu nađeni u konačnom uzorku piva koje je bilo proizvedeno od takvog slada (Mastanjević i sur., 2018).

Mbugua i Gathumbi (2004) proveli su istraživanje o kontaminaciji lager piva sa *Fusarium* mikotoksinima gdje su na uzorku od 75 komercijalnih industrijskih piva pomoću ELISE određivali *Fusarium* mikotoksine DON, ZEN i FB1. U njihovom istraživanju u 100% uzoraka bila je utvrđena prisutnost DON-a i ZEN-a te FB1 (72%). Srednja vrijednost DON-a bila je niže koncentracije od utvrđenih koncentracija ovim istraživanjem (tablica 18, Prilog 5) (Mbugua and Gathumbi, 2004). Koncentracija ZEN-a i FB1 bile su nižih vrijednosti nego utvrđene ovim istraživanjem. Mogući razlozi zbog nižih vrijednosti u njihovom istraživanju su zbog utjecaja matrice na ELISA test koji je bio korišten ali ne i predviđen za mjernje mikotoksina u pivu ili zbog sezonske promjene pojavnosti mikotoksina u sirovinama iz kojih je isto proizvedeno (Mbugua and Gathumbi, 2004).

Peters i sur. (2017) napravili su skrining mikotoksina na 1000 uzoraka craft piva. Od *Fusarium* mikotoksina utvrđeni su bili DON, ZEN, FB, T-2 i HT- 2 toksini. Koncentracije za DON su bile potvrđene u 40,6% od ukupno ispitivanih uzoraka piva. Najveća utvrđena koncentracija za FB iznosila je 69 ng mL⁻¹ što je značajno više od koncentracija dobivene ovim istraživanjem uz napomenu da se uspoređuje suma svih FB. Razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti i činjenicom da su koristili ELISU koja ne razlikuje kemijski srodne mikotoksine. Usporedbom rezultata dobivenih ELISA-om te LC/MSMS metode utvrđeno je značajno odstupanje u rezultatima zbog moguće detekcije strukturno sličnih modificiranih mikotoksina pomoću njihovog mikrosfernog imunotesta provedenog na protočnoj citometriji (Peters i sur., 2017).

Bertuzzi i sur. (2011) su analizirali 106 piva iz nekoliko europskih država od čega 11 iz RH te utvrdili pojavanost DON-a u 66% ispitivanih uzoraka odnosno 54 % uzoraka iz RH. Utvrđena pojavanost DON-a u njihovim uzorcima je nešto viša od dobivenih rezultata u ovom istraživanju, ako pak se uspoređuju samo industrijska piva pojavanost je i veća. Dok Maksimalno detektirana koncentracija bila je nešto viša u ovom istraživanju ali kad se usporede samo industrijska piva oba istraživanja maksimalno određena koncentracija gotovo je jednaka a u ovom istraživanju je iznosila 18,8%.

Isti autori određivali su i pojavnost FB-a u određenim uzorcima piva gdje je FB1 utvrđen u 97% ispitivanih uzoraka dok je FB2 utvrđen u 58% uzoraka. Pojavnost u ovom istraživanju za FB1 iznosila je 83% dok je za FB2 80% jer metoda ima niži limit detekcije za FB2 što se očituje i po rasponu detektiranih koncentracija (Bertuzzi i sur., 2011).

Prusova i sur. (2022) odredili su *Fusarium* mikotoksine u pivu gdje su potvrdili NIV čija je prisutnost bila utvrđena u svih pet uzoraka što je više u odnosu na rezultate ovog

istraživanja. Potvrđeni su bili T-2 i HT-2 toksini sa značajno višom srednjom vrijednosti od ovog istraživanja .

U svim uzorcima craft piva utvrđeno je povećanje pojavnosti *Penicillium* mikotoksina u iznosu od 10 % u odnosu na slad (Prilog 5). Najvjerojatnije zbog nepravilnog skladištenja sirovina u pivovarama ili čak loše higijene prostora u kojem se pivo kuha te putem prašine mikotoksini mogu dospjeti u pivo. Od mikotoksina koji su regulirani Uredbom (EC 915/2023) u jednom uzorku detektiran je OTA, citrinin u 64%, mikofenolna kiselina u 45%, kurvulin 92% i hidroksikurvulin 27%, a bilaid A u 56 % uzoraka sa relativno niskim prosječnim koncentracijama 0,06 ng mL⁻¹ (Prilog 5). Slijedi grizeofulvin (24%), dihidrogrizeofulvin (11%), i deklorogrizeofulvin (3%), zatim citreohibridinol (23%), kinolaktin B i kinolaktin A (38%) odnosno 5% uzoraka. Felutanin A bio je detektiran u svim ispitivanim uzorcima, ostali mikotoksini bili su prisutni u manje od 15% svih ispitivanih uzoraka (Prilog 5).

Araguas i sur. (2005) analizirali su pojavnost OTA u 31 uzorku piva iz Španjolske u kojem je u 77% uzoraka utvrđena OTA čija je koncentracija slična s dobivenim rezultatima analiziranih uzorka piva u ovim istraživanju (Araguás i sur. 2005). Prado i sur. (2003) napravili su analizu na 30 uzoraka piva u Brazilu gdje su potvrdili pojavnost OTA u 23,1 % uzoraka.

Prelle i sur (2013) napravili su istraživanje u 30 europskih piva gdje je OTA bio prisutan u 16,7% uzoraka (Prelle i sur., 2013). Daško i sur. (2005) utvrdili su OTA u 20 uzorka piva iz Slovačke i 4 strana uzorka piva , gdje je OTA bio prisutan u 70%.

Ikalafeng i sur. (2013) utvrdili su sezonsku varijaciju pojavnosti citrinina u tradicionalno kuhanom afričkom pivu. U 100 % ispitivanih uzoraka dokazano je značajno više citrinina nego što je dobiveno ovoim istraživanjem. Međutim treba napomenuti da je u istraživanju korištena ELISA koja tvornički nije validirana za mjernje citrinina u pivu već su istraživači proveli internu validaciju. Lhotska i sur.(2016) razvili su brzu metodu za određivanje OTA i citrinina u lager pivima te su proveli mjerenje na 49 uzoraka piva iz Češke gdje je u 8% svijetlih lager piva potvrđen citrinnin. U pšeničnim pivima veća je pojavnost (17%) ali su detektirane koncentracije niže.

Pojavnost ostalih *Penicillium* mikotoksina koji su utvrđeni ovim istraživanjem nisu bili zabilježeni u znanstvenoj literaturi te su ujedno i znanstveni doprinos ovog istraživanja.

Ergot alkalodi i njihova pojavnost utvrđena je u 45% svih uzoraka craft piva sa relativno niskom prosječnom sumarnom koncentracijom 0,15 ng mL⁻¹ (tablice 18- 28, Prilog 5). Najčešće detektiran bio je ergometrin u 41% ispitivanih uzoraka. Svi ostali detektirani EA (ergin, ergokriptin, ergometrinin, ergozin, ergozinin) bili su prisutni s maksimalnom

vrijednosti manjom od $0,13 \text{ ng mL}^{-1}$ uz napomenu da su bile pronađene statistički značajno veće koncentracije u industrijskim pivama u odnosu na craft piva.

EFSA je 2012. godine propisala podnošljivi dnevni unos (Tolerable Daily Intake) (TDI) za sumu EA od $0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase. Izmjerne koncentracije ukupnih EA u pivu ne predstavlja značajan rizik za potrošače jer bi osoba prosječne tjelesne mase od 70 kg trebala popiti 19,27 litara piva da bi prešla TDI od $0,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase.

Bauer i sur. (2016) istraživali su pojavnost EA u 44 uzorka piva s njemačkog tržišta gdje je 93% uzoraka pozitivno na ergometin. U ovom istraživanju prosječne vrijednosti za ergometin bile su slične rezultatima Bauer i suranicima.

Schwarz i sur. (2007) pratili su transfer EA iz žitarica u pivo te su utvrdili da se EA transferiraju iz žitarica u pivo od 2 % do 14 %.

Dobiveni rezultati o *pojavnosti biljnih, bakterijskih i ostalih fungalnih metabolita u svim uzorcima craft piva*, ukazuju da su biljni metaboliti detektirani u 100% uzoraka dok su bakterijski metaboliti bili detektirani u samo 5% uzorka a ostali fungalni metaboliti detektirani su u 53% uzorka.

Drugi istraživači nisu pratili detektirane metabolite u pivu, detektirali su cijenogene glukozide u pivu, linamarin i lotaustralin (Mastanjević i sur., 2018).

Pojavnost ostalih nespecifičnih metabolita u pivu utvrđena je u svim ispitivanim uzorcima piva (Prilog 17, tablica X). Najveću pojavnost pokazali su triptofol, ruguluslovin, ciklički dipeptidi ciklo (L-Pro-L-Val), ciklo (L-Pro-L-Tyr), ciklo (L-Leu-L-Pro), ciklo (L-Ala-L-Pro) te brevianamid F koji su bili prisutni u svim uzorcima piva. Ostali nespecifični metaboliti su bili prisutni od 18 % do 91 % (tablica 18-27, Prilog 5).

Mastanjević i suradnici potvrdili su slične koncentracije nespecifičnih metabolita u uzorcima piva (Mastanjević i sur., 2018).

5.5. Senzorska analiza craft piva kvantitativnom deskriptivnom metodom (QDA)

U ovom istraživanju uzorci piva bili su senzorski procijenjeni korištenjem QDA metode deskriptivne analize. Mjernje su provodili educirani panelisti iz Carlsberg Croatia. Deskriptivna analiza uključivala je određivanje kvalitativnih i kvantitativnih svojstva različitih tipova craft piva i industrijskih piva putem osjetila panelista.

Kvalitativna faza uključivala je kušanje piva kako bi se odredili deskriptori za svaki tip piva. U kvantitativnoj fazi panelisti su procijenili intenzitet deskriptora ocjenom od 0 do 9, te konačni intenzitet senzorskog profila na stvaranje općeg dojma okusa piva od 0 do 100 za svaki tip piva. Svi uzorci piva bili su kodirani troznamenkastim brojem. Piva su ohlađena i servirana panelistima prema tipu piva dok se između svake serije piva provodila stanka.

Prema dobivenim rezultatima QDA analize rezultati za senzorski profil pojedinog tipa (lager, pilsner, ale, pale ale, indian pale ale, blond ale, american blond ale, amber ale, porter i stout) prepoznat je od panelista i ocjenjen prema Obrascu A, prilog 8. A rezultati su prikazani „paukovim mrežama“ na slikama 23 do 32.

Senzorski profil *lager* panelisti su okarakterizirali kao gorka, kisela te da imaju okus žitarica odnosno na biskvit/kruh. Od osjećaja u ustima izražen im je bio metalni okus što može utjecati na kvalitetu pjene i potiče stvaranje ustajalog i sumporastog okusa. Punoću piva ocjenili su lagano vodenastijom.

Pilsner piva u pravilu su okarakterizirana kao kisela te da imaju užegli okus, diacetil može dati pivu okus maslaca/otapala i užegli osjećaj u ustima. Za neke tipove piva, kao što su stout, scotch ale i pilsneri, prihvatljiva koncentracija diacetila malo iznad praga, i donosi opisani okus poput karamele (Humia *i sur.*, 2019). Kod aromatičnih nota prevlado je etil-heksanoat koji se smatra “Off-flavour“ u visokim koncentracijama te okus na ulje od hmelja (FlavorAct, 2019).

Pale ale tip piva okarakterizirana su kao aromatična sa cvjetnim i karameliziranim notama, te da im je okus gorak, te okusom na orašasto i biljnim notama i punoćom u ustima, te sumporast okus.

Amber ale piva okarakterizirana su kao gorka piva sa aromom na karamelu i zrnatim karakterom. Prisutnost biljnih nota je umjeren. Od ostalih okusa izdvaja se zemljani po pljesni i sumporast.

Ale stil piva okarakterizirana su kao gorka, aromatična sa hmeljnim i cvjetnim notama, aromom na karamelu, aromatičnim notama na ulje od hmelja, gorkog okusa i sumporasta. U ustima se osjeća okus na oksidirano i pljesnivom.

Blond ale piva pak su okarakterizirana kao aromatična na okus po žitaricama, aromatičan, karamelizirana te da imaju lagano gorak i sumporast okus. Ta piva imaju butiričan okus osjećaja u ustima.

American blond ale piva panelisti su okarakterizirali kao pivo koje ima aromu po žitaricama, te da je lagano aromatično, lagano gorkog i sumporstog te sa prisutnim biljnim i orašastim notama okusa.

Indian pale ale (IPA) panelisti su ovaj tip piva okarakterizirali kao ima lagano gorak okus, aromom na žitarice sa karamelnim i voćnim notama ali i izraženu punoću tijela. Te da im je osjećaj u ustima po pljesnivom.

Porter piva su okarakterizirana kao piva sa okusom izraženim aromom na žitarice, sa karameliziranim okusom, i na aromu kave. Okus im je oksidiran, po ustajalom, te da im je osjećaj u ustima po pljesnivom.

Stout piva su od panelista okarakterizirana sa srednje gorkim okusom, izraženom aromom na biskvit i karamelu, Te osjećaj u ustima ima na čokoladu, kavu, dim i med.

Analizirana craft piva dobivena su promjenama recepata klasičnih tipova bilo da se dodaju različiti novi sastojci. Ili pak razvojem metode alternativnog kuhanja piva prema uputama na web stranicama Certifikacijskog programa Beer Judge (Anonymous, 2023b) ili pak se koriste smjernice za određeni tip piva od udruge pivara 2023 (Anonymous, 2023a).

Primjerice panelisti su od ostalih okusa ili osjećaja u ustima utvrdili ustajali okus i okus „po pljesnivom“. Plijesni ne rastu u sladovini ili pivu, njihova prisutnost u ječmu može imati negativan utjecaj na kvalitetu slada, sladovine i u konačnici piva. Brojne plijesni mogu zaraziti ječam i uskladišteni slad, a neke vrste plijesni iz roda *Fusarium* povezane su sa šikljanjem piva (Vaughan, O’Sullivan and Van Sinderen, 2005). Ujedno prema istraživanju pivo koje je bilo kuhano kontaminiranim sladom s *Aspergillus fumigatus* imalo je izraženu „hrapavost“ i ustajali okus. Metaboliti plijesni se mogu prenijeti u pivo i okarakterizirati u obliku niza neugodnih okusa i mirisa (Vaughan, O’Sullivan and Van Sinderen, 2005).

5.6. Rezultati statističke analize

Dio statističke analize podataka proveden je korištenjem Microsoft Excela 2016. Senzorski profil okusa piva evaluiran je QDA metodom, a rezultati su u nastavku grafički prikazani putem „paukovih mreža“. Osnovna deskriptivna statistika izrađena je u softverskom paketu Statistica 13.3., gdje su izračunati podaci poput srednje vrijednosti, medijana, minimuma i maksimuma te standardne devijacije. Nakon toga, provedeno je ispitivanje normalnosti distribucije podataka korištenjem Shapiro-Wilksovog W testa, dok je homogenost varijanci ispitana Leveneovim testom. Rezultati testa normalnosti pokazali su da

nijedna varijabla nije imala normalnu distribuciju niti homogenu varijancu. Zbog čega su daljnje analize provedene koristeći neparametrijske testove kao što su Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis ANOVA i Spearmanov rang korelacije. Toplinske mape prosječne pojavnosti mikotoksina u pivima prema županijama izrađene su u Tableu 2023.1.1. Za ispitivanje povezanosti varijabli korišten je softver Minitab 20.4., gdje su sve varijable analizirane pomoću PCA (analize glavnih komponenata) testa, pri čemu su, prema potrebi, grupirane u pojedine skupine radi lakšeg utvrđivanja povezanosti. Razlike u distribuciji podataka smatrane su statistički značajnima ako je $p < 0,05$. Nakon provedene PCA analize, moglo se jasno izdvojiti komponente aromatskog profila između svijetlog i tamnog piva, što je vizualizirano obojenim elipsama na slici 33.

U tablici 32. Koeficijenti korelacije crveno označeni pokazuju statistički značajnu korelaciju između srednje ocjene uzorka svih craft piva i sa crveno označenim varijablama. Od svih statistički značajnih korelacija samo su korelacije između srednjih ocjena profila okusa svih craft piva te FB1 i ZEN-4 -sulfata, dok su ostali bili statistički negativno korelirani. Srednja ocjena ispitivanog uzorka svih craft piva bila je statistički značajno negativno korelirana sa koncentracijama masnih kiselina u ispitivanim uzorcima piva ($r = -0,0795$), što ukazuje da veća prisutnost masnih kiselina negativno utječe na ukupnu srednju ocjenu uzorka piva. Masne kiseline povezane su sa aromatskim profilom i kvalitetom piva što je utvrđeno i ovim istraživanjem. Također u nekim istraživanjima je utvrđeno da postoji negativna korelacija između koncentracije masnih kiselina i općeg dojma senzorskog profila piva, a koja je statistički značajna, jer kod većine ispitivača senzorski profil piva bio je povezan sa okusom na ulje od hmelja (Gordon *i sur.*, 2018). Ujedno su utvrđene statistički značajne negativne korelacije kod panelista i pojavnosti mikotoksina BEA, ENNB, ENNB1, BIK, lotaustralina, kotanina A, 15- hidrokikulmirina, dihidroksikalonektin, bilaid A, felutanina A, kvestomicina, asperfenamat, brevianamid F te ciklo (L-ala- L-Pro).

Od zanimljivih rezultata koji se nalaze u Prilogu 7, može se izdvojiti panelist 1 kod kojeg je utvrđena statistički značajna negativna korelacija između izmjernih koncentracija DON-a i srednje ocjene senzorskog profila okusa piva. Da bi se ovakve korelacije potvrdile potrebno bi bilo ponoviti istraživanje na većem broju uzorku.

U tablici 33. prikazani su rezultati usporedbe Mann Whitney U testa. U varijablama između craft i industrijskog piva potvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji podataka i to u sljedećim varijablama: srednja ocjena intenziteta okusa senzorskog profila piva i ekstrakta, gustoće, kojične kiseline, kulmurina, apsicinske kiseline, epiheterodendrina,

lotaustralina, brevianamida F, rugulusolvina dok je kod ostalih varijabli nije primjećena statistički značajna razlika.

Na slikama 32 do 41 prikazani su kutijasti dijagrami sa statistički značajno različitim distribucijama podataka među varijablama. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji srednjih ocjena profila okusa uzoraka između craft i industrijskog piva ($p=0,000551$) gdje industrijska piva imaju statistički značajno bolje srednje ocjene profila okusa piva. Iako se ovim dijagramom preklapaju maksimalne vrijednosti ocjenjivanja craft piva sa medijanom odnosno interkvartalnim rasponom ocjena profila okusa industrijskog piva i dalje postoji statistički značajna razlika u ocjenama istih (slika 32). Na slikama 33, 34 i 35 prikazana je distribucija podataka za ekstrakt ($^{\circ}$ Brix), gustoće i kojične kiseline između uzoraka craft i industrijskog piva koji pokazuje da postoji statistički značajna razlika između industrijskih i craft piva ($p=0,033$) gdje industrijska piva imaju višu medijalnu vrijednost ekstrakata u odnosu na craft piva iako craft piva imaju višu maksimalno izmjerenu vrijednost.

Slika 36-38 prikazuje kutijaste dijagrame distribucije podataka o pojavnosti izmjerenih koncentracija mikotoksina u uzorcima piva. Što ukazuje da je *Fusarium* mikotoksin (kulmorin) statistički značajno više prisutan u craft pivu ($p=0,0384$) kao i FB1 koji se statistički značajno češće i u višim koncentracijama pojavljuje u craft pivu ($p=0,044$). Za razliku od ova dva mikotoksina prisutnost NIV-a u industrijskom pivama ($p=0,023$) je statistički značajno viša u odnosu na craft piva.

Distribucija podatka izmjerenih koncentracija epihetrondendrina, te cijanogenoglukoziida između craft i industrijskih piva prikazana je na slikama 39 i 40. Iako se na slikama vide značajna preklapanja interkvartalnih vrijednosti kao i raspona, medijalna vrijednost industrijskog piva je statistički značajno viša u odnosu na craft piva ($p=0,007$). Za vrijednosti cijanogenoglukoziid; lotaustralina između craft i industrijskih piva postoji statistički značajna razlika u distribuciji utvrđenih koncentracija gdje industrijske vrste piva imaju statistički značajno višu medijalnu vrijednost u odnosu na craft piva ($p=0,0022$). Distribucija podataka koncentracija rugulslovina između craft i industrijskih vrsta piva prikazna je na slici 41, pri čemu industrijska piva pokazuju veću medijalnu vrijednost te interkvartalni raspon. Iako craft piva imaju višu zabilježenu maksimalnu vrijednost te se vidi da postoji statistički značajna razlika u distribuciji podatka između te dvije vrste piva ($p=0,000012$).

Usporedbom distribucije izmjerenih koncentracija sume *Altenaria* mikotoksina u analiziranim uzorcima hmelja, kvasca, piva i slada utvrđeno je da postoji statistički značajna

razlika između pojedinih vrsta sirovina prikazne na slici 42. Uz napomenu da u kvascu nije bilo zabilježnih relevantnih *Alternaria* toksina, dok su najviše medijalne vrijednosti i najviši raspon bili zabilježeni u sladu.

Usporedbom distribucije podatka Kruskal-Wallis ANOVA utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji sume *Aspergillus* mikotoksina i između pojedinih sirovina. Vidi se da je najviša koncentracija istih u sladu, a zatim slijedi pivo pa kvasac dok u hmelju nisu detektirani (slika 43). Kod izmjernih koncentracija sume EA vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji podataka između ispitivanih vrsta uzorka. Pivo ima najviše interkvartalne rezultate sume EA, slad ima najvišu izmjernu koncentraciju sume EA (slika 44), dok kvasac i hmelj nemaju detektirane EA.

Suma *Fusarium* mikotoksina najviša koncentracija i najveća medijalna vrijednost utvrđena je u uzorcima slada, zbog čega postoji statistički značajna različita distribucija podataka sume *Fusarium* mikotoksina između ispitivanih uzoraka (slika 45). Dok kod sume ostalih fungalnih metabolita u ispitivanim uzorcima najviše su izmjerene koncentracije u uzorcima slada. Postoji statistički značajna razlika u distribuciji podataka izmjerenih koncentracija sume ostalih fungalnih metabolita i između ispitivanih uzoraka hmelja, kvasca, piva i slada (slika 46).

Kod sume *Penicillium* mikotoksina u analiziranim uzorcima može se vidjeti da u uzorcima hmelja i kvasca nema izmjerenih mikotoksina. Najvjerojatnije zbog načina čuvanja istih (hladnjak ili hermetički zatvorenim pakiranjima) dok su najviše koncentracije utvrđene u sladu koji se čuva u skladištima. Isti se zatim transferiraju u pivo u kojem su također potvrđeni. Ovakva distribucija podataka jasno daje do znanja da postoji statistički značajna razlika u pojavnosti izmjernih koncentracija sume *Penicillium* mikotoksina između uzoraka hmelja, kvasca, pive i slada (slika 47).

Izmjerene koncentracije sume biljnih metabolita između ispitivanih uzorka hmelja, kvasca, piva i slada ukazuju da su očekivano najniže koncentracije istih detektirane u uzorcima kvasca. S druge strane najviše vrijednosti detektirane su u uzorcima slada (slika 48)

Najveća detektirana medijalna koncentracija nespecifičnih metabolita je u uzorcima kvasca čemu najviše doprinosi kvašćev metabolit triptofol koji nastaje tijekom fermentacije piva, a najviša interkvartalna i maksimalno detektirana vrijednost je u uzorcima piva (slika 49), slične rezultate dobili su Matanjević i sur. (2019).

6. ZAKLJUČCI

1. Multitoksinskom metodom dokazana je prisutnost širokog spektra mikoto sirovinama i u craft pivama. Od utvrđenih mikotoksina detektirani su oni regulirani pravilnicima u EC 553/2022, EC 915/2023, EC 165/2022 i mikotoksin s popisa EFSA-inog poziva za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminanata u hrani i krmivu i neregulirani mikotoksini, biljni metaboliti (cijnogeniglukozidi) i ostali fungalni, bakterijski i nespecifični metaboliti.
2. U hemlju je po prvi puta potvrđena pojavnost mikotoksina koji se mogu naći i u craft pivima. Samim time je utvrđena je visoka prevalencija *Alternaria* i *Fusarium* toksina od kojih su najviše koncentracije i učestalost tenozoične kiseline i DON-a, oboje regulirani mikotoksini.
3. Od svih sirovina za proizvodnju piva, slad se pokazao kao najveći izvor kontaminacije mikotoksinima te se ujedno smatra najvećim rizikom transfera mikotoksina iz sirovina u craft pivo.
4. Određena je detaljna pojavnost mikotoksina u craft pivima pomoću kojih se može dalje napraviti procjena rizika za hrvatske potrošače.
5. U svim craft i industrijskim pivama QDA metodom je utvrđen senzorski profil craft i industrijskog piva. Industrijska piva su bolje ocjenjena od craft piva.
6. Ocjenjivači su okarakterizirali craft piva kao gorka, sa aromatičnim notama na ulje od hemlja, okusa na žitarce, biskvitni okus, sumporasti okus i okusa po pljesnivom ili ustajalom. Piva su srednjeg tijela im je osjećaj u ustima alkalni, metalni ili bezkarakterni.
7. Između craft i industrijskog piva potvrdila se statistički značajna razlika u distribuciji podataka i to u sljedećim varijablama: intenziteta okusa senzorskog profila piva i ocjenjivača. Te za varijable ekstrakt, gustoća, kojična kiselina, kulmurin, apsicinska kiselina, epiheterodendrin, lotaustralin, brevianamid F, rugulusolvin dok je kod ostalih varijabli primjećena razlika koja nije bila statistički značajna.
8. Zabilježene su statistički značajne negativne korelacije kod ispitivača i pojavnosti BEA, BIK, ENNB, ENNB1, kotanina A, 15- hidrokikulmirina, dihidroksikalonektin, Bilaid A, felutanina A, kvestomicina, lotaustralina, Asperfenamat, brevianamid F te ciklo (L-ala- L-Pro), rugulusolvin , ciklo (l- Pro-l- Val). Iznenađujuće statistički

značajne pozitivne korelacije zabilježne između pravilnikom reguliranog FB1, AME, AME -3-Glc, butirilakton 1, moniliformin, ZEN, ZEN-14- sulfata, anacin, hidrosikurvularin, cilo (L-Leu-L-Pro), triptofol, te suma nespecifičnih metabolita.

9. Statistički značajne negativne korelacije su između ocjena senzorskog profila okusa piva i sljedećih mikotoksina: kojična kiselina, kulmurin, apsicinska kiselina, epiheterodendrin, lotaustralin, brevianamid F, rugulusolvin. Što znači da se navedeni mikotoksini mogu povezati sa senzorskom procjenom okusa piva.

7. LITERATURA

Agriopoulou, S. ., Tundo, S. . and Kuzmanović, L. (2021) ‘Ergot Alkaloids Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Characteristics, Toxicity, Prevalence, and Control Strategies’, *Agronomy*, 11(5), p. 931. doi: 10.3390/AGRONOMY11050931.

Alexi, N. *i sur.* (2018) ‘Investigation of sensory profiles and hedonic drivers of emerging aquaculture fish species’, *Journal of the science of food and agriculture*, 98(3), pp. 1179–1187. doi: 10.1002/JSFA.8571.

Almaguer, C. *i sur.* (2014) ‘*Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review’, *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), pp. 289–314. doi: 10.1002/JIB.160.

Andersen, B., Smedsgaard, J. and Frisvad, J. C. (2004) ‘*Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), pp. 2421–2428. doi: 10.1021/JF035406K.

Anderson, H. E. *i sur.* (2019) ‘A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control’, *Analytica Chimica Acta*, 1085, pp. 1–20. doi: 10.1016/j.aca.2019.07.061.

Anonymous (2023a) *Brewers Association Beer Style Guidelines*. Available at: <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/#76> (Accessed: 20 February 2024).

Anonymous (2023b) *Introduction to Beer Styles – Beer Judge Certification Program*. Available at: <https://www.bjcp.org/beer-styles/introduction-to-beer-styles/> (Accessed: 12 June 2024).

Aquilani, B. *i sur.* (2015) ‘Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences’, *Food Quality and Preference*, 41, pp. 214–224. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2014.12.005.

Araguás, C., González-Peñas, E. and López De Cerain, A. (2005) ‘Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain’, *Food Chemistry*, 92(3), pp. 459–464. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2004.08.012.

Ares, G., Antúnez, L., de Saldamando, L., & Giménez, A. (2018) ‘Polarized Sensory Positioning’, in *Descriptive Analysis in Sensory Evaluation*, pp. 561–577. Available at: <https://sci-hub.se/10.1002/9781118991657.ch16> (Accessed: 21 February 2024).

Aroxa (2024) *AROXA FLAVOUR STANDARDS - aroxa™*. Available at: <https://aroxa.com/aroxa-flavour-standards/> (Accessed: 6 April 2024).

- Arroyo-Manzanares, N. *i sur.* (2021) ‘High-resolution mass spectrometry for the determination of mycotoxins in biological samples. A review’, *Microchemical Journal*, 166, p. 106197. doi: 10.1016/J.MICROC.2021.106197.
- Azam, M. S. *i sur.* (2021) ‘Critical Assessment of Mycotoxins in Beverages and Their Control Measures’, *Toxins*, 13(5), p. 323. doi: 10.3390/TOXINS13050323.
- Baert, J. J. *i sur.* (2012) ‘On the origin of free and bound staling aldehydes in beer’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), pp. 11449–11472. doi: 10.1021/JF303670Z/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2012-03670Z_0021.JPEG.
- Bamforth, C. W. (2002) ‘Nutritional aspects of beer - A review’, *Nutrition Research*, 22(1–2), pp. 227–237. doi: 10.1016/S0271-5317(01)00360-8.
- Bamforth, C. W. (2003) ‘BEERS | History and Types’, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, pp. 418–422. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00086-9.
- Baxter, E. D. and Hughes, P. S. (2001) ‘Beer: quality, safety and nutritional aspects’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(6), pp. 608–608. doi: 10.1002/JSFA.1576.
- Beltrán, E. *i sur.* (2009) ‘Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry’, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(12), pp. 1801–1809. doi: 10.1002/RCM.4077.
- Benešová, K. *i sur.* (2012) ‘Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry’, *Food Control*, 25(2), pp. 626–630. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.11.033.
- Berthiller, F. *i sur.* (2013) ‘Masked mycotoxins: A review’, *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), p. 165. doi: 10.1002/MNFR.201100764.
- Bertuzzi, T. *i sur.* (2011) ‘Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries’, *Food Control*, 22(12), pp. 2059–2064. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2011.06.002.
- Bertuzzi, T. *i sur.* (2018) ‘Known and Emerging Mycotoxins in Small- and Large-Scale Brewed Beer’, *Beverages*, 4(2), p. 46. doi: 10.3390/BEVERAGES4020046.
- Bortoleto, G. G. *i sur.* (2022) ‘Evaluation of the profile of volatile organic compounds in industrial and craft beers’, *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 12(2), pp. e5532–e5532. doi: 10.55251/JMBFS.5532.
- Bullerman, L. B. and Bianchini, A. (2014) ‘Good Food-Processing Techniques: Stability of Mycotoxins in Processed Maize-Based Foods’, *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, pp. 89–100. doi: 10.1002/9781118832790.CH7.
- Castro Marin, A. *i sur.* (2021) ‘Physico-Chemical and Sensory Characterization of a Fruit Beer Obtained with the Addition of Cv. Lambrusco Grapes Must’, *Beverages*, 7(2), p. 34. doi: 10.3390/BEVERAGES7020034.

Catallo, M. *i sur.* (2020) ‘Sourdough derived strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their potential for farmhouse ale brewing’, *Journal of the Institute of Brewing*, 126(2), pp. 168–175. doi: 10.1002/JIB.608.

Channaiah and Maier, D. E. (2014) *Best Stored Maize Management Practices for the Prevention of Mycotoxin Contamination., Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. Available at: <https://sci-hub.se/10.1002/9781118832790.ch6> (Accessed: 5 September 2023).

da Costa Jardim, C. *i sur.* (2018) ‘Sensory Profile, Consumer Preference and Chemical Composition of Craft Beers from Brazil’, *Beverages*, 4(4), p. 106. doi: 10.3390/BEVERAGES4040106.

Cottrell, M. T. (2022) ‘A Search for Diastatic Enzymes Endogenous to *Humulus lupulus* and Produced by Microbes Associated with Pellet Hops Driving “Hop Creep” of Dry Hopped Beer’, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 81(3), pp. 435–447. doi: 10.1080/03610470.2022.2084327.

Creppy, E. E. (2002) ‘Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe’, *Toxicology Letters*, 127(1–3), pp. 19–28. doi: 10.1016/S0378-4274(01)00479-9.

deLange, A. J. (2008) ‘The Standard Reference Method of Beer Color Specification as the Basis for a New Method of Beer Color Reporting’, *Journal of the American Society of Brewing Chemist*, 66(3), pp. 143–150. Available at: <https://sci-hub.se/10.1094/ASBCJ-2008-0707-01> (Accessed: 19 February 2024).

Didak Ljubas, B. *i sur.* (2022) ‘Production of Different Biochemicals by *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 From Pretreated Brewers’ Spent Grains’, *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 115. doi: 10.3389/FMICB.2022.812457/BIBTEX.

Dodlek Šarkanj, I. *i sur.* (2024) ‘First Report on Mycotoxin Contamination of Hops (*Humulus lupulus* L.)’, *Toxins*, 16(7), p. 293. doi: 10.3390/TOXINS16070293.

EC, E. C. (2006) *UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani- European Commission, Bruxelles, EC, European Commission*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R0401&from=HR> (Accessed: 31 August 2022).

EC, E. C. (2023) *Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006- European Commission, Bruxelles, EC, European Commission*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915> (Accessed: 4 April 2024).

EFSA, 2017 (2017) ‘Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed’, *EFSA Journal*, 15(9). doi: 10.2903/J.EFSA.2017.4718.

Eskola, M. *i sur.* (2020) ‘Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity

of the widely cited “FAO estimate” of 25%’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), pp. 2773–2789. doi: 10.1080/10408398.2019.1658570.

EU (2022) *UREDBA KOMISIJE (EU) 2022/1370 od 5. kolovoza 2022. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina okratoksina A u određenoj hrani, EU*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2022/1370/oj> (Accessed: 11 June 2024).

Faktor J *i sur.* (2012) ‘Identification and Characterisation of Pro-metastatic Targets, Pathways and Molecular Complexes Using a Toolbox of Proteomic Technologies Identifikace a karakterizace prometastatičkih cílů, drah a molekulárních komplexů s využitím proteomických technolo’, *Klin Onkol*, 25(2), pp. 2–70.

Fangel, J. U. *i sur.* (2018) ‘Tracking polysaccharides through the brewing process’, *Carbohydrate Polymers*, 196, pp. 465–473. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.05.053.

Felšöciová, S. *i sur.* (2021) ‘Effect of Long-Term Storage on Mycobiota of Barley Grain and Malt’, *Plants 2021, Vol. 10, Page 1655*, 10(8), p. 1655. doi: 10.3390/PLANTS10081655.

Freire, L. *i sur.* (2018) ‘A quantitative study on growth variability and production of ochratoxin A and its derivatives by *A. carbonarius* and *A. niger* in grape-based medium’, *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/S41598-018-32907-Z.

Freire, L. *i sur.* (2020) ‘From grape to wine: Fate of ochratoxin A during red, rose, and white winemaking process and the presence of ochratoxin derivatives in the final products’, *Food Control*, 113. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2020.107167.

Freire, L. and Sant’Ana, A. S. (2018) ‘Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects’, *Food and Chemical Toxicology*, 111, pp. 189–205. doi: 10.1016/J.FCT.2017.11.021.

Frisvad J. C. *i sur.* (2004) ‘Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*’, *IN MYCOLOGY*, 49, pp. 201–241.

Frisvad, J. C. (2018) ‘A critical review of producers of small lactone mycotoxins: Patulin, penicillic acid and moniliformin’, *World Mycotoxin Journal*, 11(1), pp. 73–100. doi: 10.3920/WMJ2017.2294.

Gagula, G. (2017) *Modeliranje promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži*. Available at: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:018965> (Accessed: 20 February 2024).

Garda, J. *i sur.* (2005) ‘Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes’, *Food Control*, 16(5), pp. 423–428. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2004.05.001.

Gholobova, D. *i sur.* (2018) ‘Human tissue-engineered skeletal muscle: a novel 3D in vitro model for drug disposition and toxicity after intramuscular injection’, *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-30123-3.

- Gilbert, J. and Anklam, E. (2002) 'Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(6–7), pp. 468–486. doi: 10.1016/S0165-9936(02)00604-0.
- Giovenzana, V., Beghi, R. and Guidetti, R. (2014) 'Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy', *Journal of Food Engineering*, 142, pp. 80–86. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2014.06.017.
- Gómez-López, J. (2020) 'Sensory evaluation of beer', in *The Craft Brewing Handbook*. Elsevier, pp. 191–215. doi: 10.1016/B978-0-08-102079-1.00007-2.
- González-Salitre, L.;Guillermo González-Olivares, L. and Antobelli Basilio-Cortes, U. (2023) 'Humulus lupulus L. a potential precursor to human health: High hops craft beer', *Food Chemistry*, 30 March, p. 134959. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2022.134959.
- Gonzalez Viejo, C. *i sur.* (2019) 'Integration of non-invasive biometrics with sensory analysis techniques to assess acceptability of beer by consumers', *Physiology & Behavior*, 200, pp. 139–147. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2018.02.051.
- Gordon, R. *i sur.* (2018) 'A Review on the Source of Lipids and Their Interactions during Beer Fermentation that Affect Beer Quality', *Fermentation*, 4(4), p. 89. doi: 10.3390/FERMENTATION4040089.
- Goyarts, T. *i sur.* (2007) 'Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs', *Food Additives and Contaminants*, 24(4), pp. 369–380. doi: 10.1080/02652030600988038.
- Gruber-Dorninger, C. *i sur.* (2017) 'Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), pp. 7052–7070. doi: 10.1021/ACS.JAFC.6B03413/SUPPL_FILE/JF6B03413_SI_001.ZIP.
- Gyllang, H. *i sur.* (1976) 'Studies on the mycoflora of malt', *Journal of the Institute of Brewing*, 82(6), pp. 350–352. doi: 10.1002/J.2050-0416.1975.TB06962.X.
- Habschid, K. *i sur.* (2011) 'Utjecaj mikroflora ječma i pšenice na kakvoću slada i piva', *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju*, 6(3–4), pp. 100–111. Available at: <https://hrcak.srce.hr/clanak/113244> (Accessed: 5 April 2022).
- Habschied, K. *i sur.* (2011) 'Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on Fusarium graminearum growing conditions', *Food Chemistry*, 129(2), pp. 329–332. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.064.
- Habschied, K. *i sur.* (2019) 'The Influence of Steeping Water Change during Malting on the Multi-Toxin Content in Malt', *Foods*, 8(10), p. 478. doi: 10.3390/FOODS8100478.
- Habschied, K. *i sur.* (2020) 'β-Glucan Degradation During Malting of Different Purpose Barley Varieties', *Fermentation*, 6(1), p. 21. doi: 10.3390/FERMENTATION6010021.

- Habschied, K., Krstanović, V. and Mastanjević, K. (2022) ‘Beer Quality Evaluation—A Sensory Aspect’, *Beverages*, 8(1), p. 15. doi: 10.3390/BEVERAGES8010015.
- Haque, M. A. *i sur.* (2020) ‘Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review.’, *Microbial Pathogenesis*, 142, pp. 104095–104095. doi: 10.1016/J.MICPATH.2020.104095.
- Hayward, L. *i sur.* (2020) ‘How do consumers describe cool climate wines using projective mapping and ultra-flash profile?’, *Food Quality and Preference*, 86, p. 104026. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2020.104026.
- Himmler, S. *i sur.* (2021) ‘What works better for preference elicitation among older people? Cognitive burden of discrete choice experiment and case 2 best-worst scaling in an online setting’, *Journal of Choice Modelling*, 38, p. 100265. doi: 10.1016/J.JOCM.2020.100265.
- de Hoffmann, E. & S. V. (2007) *Mass Spectrometry: principles and applications*, *Mass Spectrometry: principles and applications*. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Mass+Spectrometry%3A+Principles+and+Applications%2C+3rd+Edition-p-9780470033104> (Accessed: 29 December 2022).
- Holt, S. *i sur.* (2019) ‘The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages’, *FEMS microbiology reviews*, 43(3), pp. 193–222. doi: 10.1093/FEMSRE/FUY041.
- Howe, S. (2020) ‘Raw materials’, in *The Craft Brewing Handbook: A Practical Guide to Running a Successful Craft*, pp. 3–47. Available at: https://books.google.hr/books?hl=en&lr=&id=uue9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=R3eO6P970_&sig=caBrqTwQELNcIwOuEi18LPmybOs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (Accessed: 6 January 2024).
- Humia, B. V. *i sur.* (2019) ‘Beer molecules and its sensory and biological properties: A review’, *Molecules*, 24(8). doi: 10.3390/MOLECULES24081568.
- Humia, B. V. *i sur.* (2020) ‘Physicochemical and sensory profile of Beauregard sweet potato beer’, *Food Chemistry*, 312, p. 126087. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.126087.
- IARAC (2002) ‘AFLATOXIN’, *Chem. Abstr. Serv*, p. 10.
- IARC, 1993 (1993) ‘Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.’, *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56.
- Ignacio Alonso-Esteban, J. *i sur.* (2019) ‘Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds’. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.04.001.
- Inoue, T. *i sur.* (2013) ‘Fate of Mycotoxins during Beer Brewing and Fermentation’,

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(7), pp. 1410–1415. doi: 10.1271/BBB.130027.

Jaeger, S. R. *i sur.* (2018) ‘Number of terms to use in temporal check-all-that-apply studies (TCATA and TCATA Fading) for sensory product characterization by consumers’, *Food Quality and Preference*, 64, pp. 154–159. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2017.09.013.

Jaeger, Sara R. *i sur.* (2020) ‘Check-all-that-apply (CATA) questions: Sensory term citation frequency reflects rated term intensity and applicability’, *Food Quality and Preference*, 86, p. 103986. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2020.103986.

Jaeger, S.R. *i sur.* (2020) ‘Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. traditional-style flavor preferences’, *Food Quality and Preference*, 82. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2020.103884.

Jaeger, S. R. *i sur.* (2021) ‘Effects of “craft” vs. “traditional” labels to beer consumers with different flavor preferences: A comprehensive multi-response approach’, *Food Quality and Preference*, 87, p. 104043. doi: 10.1016/J.FOODQUAL.2020.104043.

Kadota, T. *i sur.* (2011) ‘Development of a simultaneous liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of type B trichothecenes, their derivatives, and precursors in wheat’, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(23), pp. 3481–3490. doi: 10.1002/RCM.5250.

Kifer, D. *i sur.* (2021) ‘Fungi and their metabolites in grain from individual households in Croatia’, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 14(2), pp. 98–109. doi: 10.1080/19393210.2021.1883746.

Kochman, J. ., Jakubczyk, K. . and Janda, K. (2021) ‘Mycotoxins in red wine: Occurrence and risk assessment’, *Food Control*, 129, p. 108229. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2021.108229.

Kovač, M. *i sur.* (2018) ‘Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next?’, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 69(3), pp. 196–214. doi: 10.2478/AIHT-2018-69-3108.

Krasauskas, A. (2017) ‘Fungi in malting barley grain and malt production’, *Biologija*, 63(3), pp. 283–288. doi: 10.6001/BIOLOGIJA.V63I3.3583.

Krska, R, Sulyok, M. and Schuhmacher, R. (2010) ‘Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds’, *Food Chemistry*, 119(1), pp. 408–416. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.042.

Krstanović, V. *i sur.* (2005) ‘Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001–2003 in eastern Croatia’, *Microbiological research*, 160(4), pp. 353–359. doi: 10.1016/J.MICRES.2005.02.009.

- Kuzdraliński, A., Solarska, E. and Muszyńska, M. (2013) 'Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method', *Food Control*, 29(1), pp. 22–24. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2012.06.003.
- Langstaff, S.A.; Guinard, J.-X. and Lewis, M. J. (2018) 'Sensory Evaluation of the Mouthfeel of Beer', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(2), pp. 54–59. Available at: <https://sci-hub.se/10.1094/ASBCJ-49-0054> (Accessed: 12 January 2024).
- Lawless, H. T. and Heymann, H. (2010) *Sensory Evaluation of Food*. New York, NY: Springer New York (Food Science Text Series). doi: 10.1007/978-1-4419-6488-5.
- Li, L. *i sur.* (2023) 'Quorum sensing: cell-to-cell communication in *Saccharomyces cerevisiae*', *Frontiers in Microbiology*, 14, p. 1250151. doi: 10.3389/FMICB.2023.1250151.
- Lodolo, E. J. *i sur.* (2008) 'The yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the main character in beer brewing', *FEMS Yeast Research*, 8(7), pp. 1018–1036. doi: 10.1111/J.1567-1364.2008.00433.X.
- Louro, H. *i sur.* (2024) 'Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health', *Archives of Toxicology*, 98(2), p. 425. doi: 10.1007/S00204-023-03636-8.
- Malachová, A. *i sur.* (2014) 'Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices', *Journal of Chromatography A*, 1362, pp. 145–156. doi: 10.1016/J.CHROMA.2014.08.037.
- Mardetko, N. (2022) *Razvoj biorafinerijskoga sustava za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina, Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.*
- Marin, S. *i sur.* (2013) 'Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment', *Food and Chemical Toxicology*, 60, pp. 218–237. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.047.
- Marques, C. *i sur.* (2022) 'An Overview of Sensory Characterization Techniques: From Classical Descriptive Analysis to the Emergence of Novel Profiling Methods', *Foods*, 11(3), p. 255. doi: 10.3390/FOODS11030255.
- Martín, I. *i sur.* (2022) 'Fungal Pathogens and Seed Storage in the Dry State', *Plants 2022, Vol. 11, Page 3167*, 11(22), p. 3167. doi: 10.3390/PLANTS11223167.
- Mastanjević, Kristina *i sur.* (2018) 'From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters', *Food chemistry*, 254, pp. 115–121. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.02.005.
- Mbugua, S. K. and Gathumbi, J. K. (2004) 'The contamination of Kenyan lager beers with *Fusarium* mycotoxins', *Journal of the Institute of Brewing*, 110(3), pp. 227–229. doi: 10.1002/J.2050-0416.2004.TB00207.X.

Meena, M. and Samal, S. (2019) 'Alternaria host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects', *Toxicology Reports*, 6, pp. 745–758. doi: 10.1016/J.TOXREP.2019.06.021.

Meilgaard, M. C.; Dalglish, C. E. & Clapperton, J. F. (1979) 'BEER FLAVOUR TERMINOLOGY1.', *Journal of the Institute of Brewing*, 85(1), pp. 38–42. Available at: <https://sci-hub.se/10.1002/j.2050-0416.1979.tb06826.x> (Accessed: 15 January 2024).

Meza-Márquez, O. G. *i sur.* (2024) 'The Prediction of Quality Parameters of Craft Beer with FT-MIR and Chemometrics', *Foods*, 13(8). doi: 10.3390/FOODS13081157/S1.

Mori, K. and Sakano, H. (2011) 'How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain?', *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), pp. 467–499. Available at: <https://sci-hub.se/10.1146/annurev-neuro-112210-112917> (Accessed: 12 January 2024).

Murray, J. M., Delahunty, C. M. and Baxter, I. A. (2001) 'Descriptive sensory analysis: past, present and future', *Food Research International*, 34(6), pp. 461–471. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00070-9.

Nafuka, S. N. *i sur.* (2019) 'Variation of Fungal Metabolites in Sorghum Malts Used to Prepare Namibian Traditional Fermented Beverages Omalodu and Otombo', *Toxins*, 11(3), p. 165. doi: 10.3390/TOXINS11030165.

Neme, K. and Mohammed, A. (2017) 'Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review', *Food Control*, 78, pp. 412–425. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2017.03.012.

Nionelli, L. *i sur.* (2018) 'Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 266, pp. 173–182. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.12.002.

NN 142/2011 (2011) *Pravilnik o pivu (2011), Narodne novine, 2867, Zagreb.*

NN 144/2021 (2021) *Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o trošarinama.* Available at: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2021_12_144_2463.html (Accessed: 31 January 2023).

O' Sullivan, M. . (2011) 'Sensory Evaluation and Consumer Research', in *Alcoholic Beverages*, pp. 42–47. Available at: https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=eJRwAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=wtAij6g29J&sig=VYDNvkdt7QIsz2c-mLo-Jy-Zxrc&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (Accessed: 30 January 2023).

Oladokun, O. *i sur.* (2016) 'The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer', *Food Chemistry*, 205, pp. 212–220. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.023.

- Oser, H. H. (2015) 'Producing quality barley for the malting industry'.
- Ostry, V. (2008) 'Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs', *World Mycotoxin Journal*, 1(2), pp. 175–188. doi: 10.3920/WMJ2008.X013.
- Ostry, V. i sur. (2017) 'Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification', *Mycotoxin Research*, 33(1), pp. 65–73. doi: 10.1007/S12550-016-0265-7/TABLES/2.
- Pai, T., V. i sur. (2015) 'Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential', *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), pp. 1414–1423. doi: 10.1007/s13197-013-1152-2.
- Papadopoulou-Bouraoui, A. i sur. (2007) 'Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay', *Food Additives and Contaminants*, 21(6), pp. 607–617. doi: 10.1080/02652030410001677745.
- Parker, D. K. (2012) 'Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis', in *Alcoholic Beverages*, pp. 133–158. Available at: <https://sci-hub.se/10.1533/9780857095176.2.133> (Accessed: 14 December 2022).
- Parker, J. K. (2017) 'Meat', *Springer Handbooks*, pp. 29–30. doi: 10.1007/978-3-319-26932-0_10.
- Pascari, X., Ramos, A. J., i sur. (2018) 'Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review', *Food Research International*, 103, pp. 121–129. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.038.
- Pascari, X., Ortiz-Solá, J., i sur. (2018) 'Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain', *LWT*, 92, pp. 87–91. doi: 10.1016/J.LWT.2018.02.021.
- Pascari, X. i sur. (2022) 'Relevant Fusarium Mycotoxins in Malt and Beer', *Foods*, 11(2), p. 246. doi: 10.3390/FOODS11020246.
- Patriarca, A. (2016) 'Alternaria in food products', *Current Opinion in Food Science*, 11, pp. 1–9. doi: 10.1016/J.COFS.2016.08.007.
- Peces-Pérez, R. i sur. (2022) 'Biomodulation of Physicochemical Parameters, Aromas, and Sensory Profile of Craft Beers by Using Non- Saccharomyces Yeasts', *ACS Omega*, 7(21), pp. 17822–17840. doi: 10.1021/ACSOMEGA.2C01035/SUPPL_FILE/AO2C01035_SI_001.PDF.
- Peters, J. i sur. (2017) 'Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer', *PLOS ONE*, 12(10), p. e0185887. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0185887.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2015) 'Mycotoxins – prevention and

decontamination by yeasts', *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), pp. 805–818. doi: 10.1002/JOBM.201400833.

Phalip, V. *i sur.* (2006) 'An overview of fungal community diversity in diseased hop plantations', *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), pp. 321–329. doi: 10.1111/J.1574-6941.2006.00102.X.

Piacentini, K. *i sur.* (2017) *Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B 1 and deoxynivalenol in beer quality*, *Food Chemistry*. Available at: <https://sci-hub.se/10.1016/j.foodchem.2016.09.062> (Accessed: 14 February 2022).

Pineau, N. *i sur.* (2022) 'Comparison of RATA, CATA, sorting and Napping® as rapid alternatives to sensory profiling in a food industry environment', *Food Research International*, 158, p. 111467. doi: 10.1016/J.FOODRES.2022.111467.

Pleadin, J. *i sur.* (2015) 'Fuzarijski miktoksini u hrani i hrani za životinje', *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 10(1–2), pp. 6–13.

Polshin, E. *i sur.* (2010) 'Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer', *Talanta*, 81(1–2), pp. 88–94. doi: 10.1016/J.TALANTA.2009.11.041.

Popescu, V. *i sur.* (2013) 'A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process', *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), pp. 111–115. doi: 10.1002/JIB.82.

Poutanen, K. S. (2020) 'Cereal raw material pretreatment', in *Breakfast Cereals and How They Are Made: Raw Materials, Processing, and Production*. Elsevier Inc., pp. 97–106. doi: 10.1016/B978-0-12-812043-9.00015-1.

Prelle, A. *i sur.* (2013) 'Comparison of Clean-Up Methods for Ochratoxin A on Wine, Beer, Roasted Coffee and Chili Commercialized in Italy', *Toxins 2013, Vol. 5, Pages 1827-1844*, 5(10), pp. 1827–1844. doi: 10.3390/TOXINS5101827.

Prusova, N. *i sur.* (2022) 'Free and conjugated Alternaria and Fusarium mycotoxins during Pilsner malt production and double-mash brewing', *Food Chemistry*, 369, p. 130926. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130926.

Puri, R. *i sur.* (2016) 'Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of Indian milk product cham-cham', *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), pp. 1238–1246. doi: 10.1007/S13197-015-2089-4/FIGURES/3.

Rani, H. and Bhardwaj, R. D. (2021) 'Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer"', *Journal of Food Science*, 86(8), pp. 3322–3340. doi: 10.1111/1750-3841.15858.

Sabo, J., Đurić, T. and Jasnić, S. (2002) 'Fusarium fungi as a pathogen causing hop wilt', <https://pps.agriculturejournals.cz/doi/10.17221/10476-PPS.html>, 38(SI 2-6th Conf EFPP), pp. 308–310. doi: 10.17221/10476-PPS.

- Sánchez, H. C. (2017) *The mathematics of brewing - Chalkdust*. Available at: <http://chalkdustmagazine.com/blog/the-mathematics-of-brewing/> (Accessed: 5 February 2022).
- Šarić, G. (2020) *Proizvodnja piva: Kako proizvesti pivo?*, *Gospodarski list*. Available at: <https://gospodarski.hr/rubrike/ostalo/prilog-broja-kako-proizvesti-pivo/> (Accessed: 19 January 2024).
- Šarkanj, B. *i sur.* (2013) ‘Urinary analysis reveals high deoxynivalenol exposure in pregnant women from Croatia’, *Food and Chemical Toxicology*, 62, pp. 231–237. doi: 10.1016/J.FCT.2013.08.043.
- Sarkanj, B., Sarkanj, I. D. and Shamtsyan, M. (2020) ‘Mycotoxins in food - How to prevent and what to do when things go bad’, in *E3S Web of Conferences*. doi: 10.1051/e3sconf/202021501004.
- Schabo, D. C. *i sur.* (2021) ‘Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved’, *Food Research International*, 141, p. 110114. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110114.
- Scheibenzuber, S. *i sur.* (2021) ‘Analysis of 13 Alternaria mycotoxins including modified forms in beer’, *Mycotoxin Research*, 37(2), p. 149. doi: 10.1007/S12550-021-00424-0.
- Schmelzle, A. (2009) ‘The Beer Aroma Wheel’, *BrewingScience*, 62, pp. 26–32. Available at: https://www.academia.edu/12015570/The_Beer_Aroma_Wheel (Accessed: 3 February 2024).
- Schwarz, P. B., Casper, H. H. and Beattie, S. (2018) ‘Fate and Development of Naturally Occurring Fusarium Mycotoxins During Malting and Brewing¹’, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53(3), pp. 121–127. doi: 10.1094/ASBCJ-53-0121.
- Siegel, D. *i sur.* (2010) ‘Quantification of the Alternaria mycotoxin tenuazonic acid in beer’, *Food Chemistry*, 120(3), pp. 902–906. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2009.10.070.
- Silva, R. *i sur.* (2020) ‘Dulce de leche submitted to ohmic heating treatment: Consumer sensory profile using preferred attribute elicitation (PAE) and temporal check-all-that-apply (TCATA)’, *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 134. doi: 10.1016/J.FOODRES.2020.109217.
- Simpson, W. J. (2016) ‘Sensory Analysis in the Brewery’, in *Brewing Materials and Processes*, pp. 257–289. Available at: <https://sci-hub.se/10.1016/B978-0-12-799954-8.00013-7> (Accessed: 12 January 2024).
- Sinkinson, C. (2017) *Triangle Test, Discrimination Testing in Sensory Science*. Available at: <https://sci-hub.se/10.1016/B978-0-08-101009-9.00007-1> (Accessed: 6 February 2024).
- Sobrova, P. *i sur.* (2010) ‘Deoxynivalenol and its toxicity’, *Interdisciplinary Toxicology*, 3(3), pp. 94–99. doi: 10.2478/V10102-010-0019-X.

- Spedding, G. (2024) *Craft Beer & Brewing*. Available at: <https://beerandbrewing.com/dictionary/Bc3C4qEYz3/> (Accessed: 29 August 2024).
- Šrédl, K. *i sur.* (2020) ‘Hop production in the Czech Republic and its international aspects’, *Heliyon*, 6(7). doi: 10.1016/J.HELIYON.2020.E04371.
- Stanciu, O. *i sur.* (2017) ‘Presence of Enniatins and Beauvericin in Romanian Wheat Samples: From Raw Material to Products for Direct Human Consumption’, *Toxins 2017, Vol. 9, Page 189*, 9(6), p. 189. doi: 10.3390/TOXINS9060189.
- Steiner, D. *i sur.* (2021) ‘Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(1), pp. 25–34. doi: 10.1007/S00216-020-03015-7/FIGURES/3.
- Stewart, G. G. (2016) ‘Beer: Raw Materials and Wort Production’, *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 355–363. Available at: <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/GG-Stewart-2107960727> (Accessed: 17 August 2023).
- Stone, H. *i sur.* (2008) ‘Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis’, *Descriptive Sensory Analysis in Practice*, pp. 23–34. doi: 10.1002/9780470385036.CH1C.
- Stone, H. (2018) ‘Example food: What are its sensory properties and why is that important?’, *npj Science of Food 2018 2:1*, 2(1), pp. 1–3. doi: 10.1038/s41538-018-0019-3.
- Su, X. *i sur.* (2022) ‘Sensory lexicon and aroma volatiles analysis of brewing malt’, *npj Science of Food 2022 6:1*, 6(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41538-022-00135-5.
- Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R. (2007) ‘A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), pp. 1505–1523. doi: 10.1007/S00216-007-1542-2/FIGURES/4.
- Sulyok, M. *i sur.* (2020) ‘Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(11), pp. 2607–2620. doi: 10.1007/S00216-020-02489-9/FIGURES/7.
- Szuets, P. *i sur.* (1997) ‘Early telarche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in foodstuffs’, *Cereal Research Communications*, 25(3 I), pp. 429–436. doi: 10.1007/BF03543747.
- Thomas, W. J. *i sur.* (2022) ‘A Quantitative PCR Assay for Detection and Quantification of *Fusarium sambucinum*’, *Plant Disease*, 106(10), pp. 2601–2606. doi: 10.1094/PDIS-02-22-0269-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-02-22-0269-REF2.JPEG.
- Tola, M. and Kebede, B. (2016) ‘Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review’, <http://www.editorialmanager.com/cogentagri>, 2(1), p. 1191103. doi:

10.1080/23311932.2016.1191103.

Tüsekwa, A. B. *i sur.* (2000) 'Traditional alcoholic beverages of Tanzania: production, quality and changes in quality attributes during storage', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(2), pp. 135–143. doi: 10.1080/096374800100831.

Udovicki, B. *i sur.* (2018) 'Overview on the mycotoxins incidence in serbia in the period 2004–2016', *Toxins*, 10(7). doi: 10.3390/TOXINS10070279.

Varga, E. *i sur.* (2013) 'Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples', *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 30(1), pp. 137–146. doi: 10.1080/19440049.2012.726745.

Vaughan, A., O'Sullivan, T. and Van Sinderen, D. (2005) 'Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review', *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), pp. 355–371. doi: 10.1002/J.2050-0416.2005.TB00221.X.

Vilela, A. *i sur.* (2019) 'Beverage and Food Fragrance Biotechnology, Novel Applications, Sensory and Sensor Techniques: An Overview', *Foods*, 8(12), p. 643. doi: 10.3390/FOODS8120643.

Visconti, A. *i sur.* (2008) 'Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain', *Food Additives and Contaminants*, 25(2), pp. 193–202. doi: 10.1080/02652030701744546.

Wan, J. *i sur.* (2020) 'Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 1–26. Available at: <https://sci-hub.se/10.1111/1541-4337.12546> (Accessed: 14 February 2022).

Wang, T. *i sur.* (2018) 'Fabricating microstructures on glass for microfluidic chips by glass molding process', *Micromachines*, 9(6). doi: 10.3390/MI9060269.

WHO, 2017 (2017) 'Evaluation of certain contaminants in food', *World Health Organization technical report series*, pp. 1–166.

Wu, A. *i sur.* (2022) 'Xanthotoxin (8-methoxypsoralen): A review of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity', *Phytotherapy Research*, 36(10), pp. 3805–3832. doi: 10.1002/PTR.7577.

Young, J., Oakley, W. R. M. and Fox, G. (2023) 'Humulus lupulus and microbes: Exploring biotic causes for hop creep', *Food Microbiology*, 114, p. 104298. doi: 10.1016/J.FM.2023.104298.

Young, T. W. (2021) *beer* / *Definition, History, Types, Brewing Process, & Facts* / *Britannica, Encyclopedia Britannica*.

Zinedine, A. *i sur.* (2007) 'Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin', *Food and Chemical*

Toxicology, 45(1), pp. 1–18. doi: 10.1016/J.FCT.2006.07.030.

8. PRILOZI

Prilog 1 Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u svim uzorcima piva(autor)

šifra piva	pH	ekstrakt [°Brix]	EBC	SRM	maltotrijoza [g L ⁻¹]	maltoza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	fruktoza [g L ⁻¹]	masne kiseline [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
B01	4.9	7.4	15.8	7.9	<LOD	4.13	1.88	0.59	0.11	4.03	7.23
B02	4.8	5.0	21.5	10.7	0.87	1.79	2.52	0.09	0.57	1.90	4.63
B03	4.6	6.0	25.0	12.5	5.84	4.00	0.43	0.32	2.11	2.64	5.23
B04	4.7	6.4	156.9	79.7	<LOD	0.81	0.13	0.56	0.11	0.20	5.83
B05	4.7	8.6	134.4	67.2	<LOD	2.45	0.00	0.53	1.57	0.50	6.12
B06	4.8	6.0	141.9	71.0	6.55	0.32	0.10	0.51	0.11	2.64	4.24
B07	5.2	8.8	7.4	3.8	15.61	13.36	0.02	0.30	1.01	2.56	5.89
B08	5.2	7.0	36.1	18.3	12.73	5.17	0.00	0.69	0.77	2.49	6.71
B09	5.3	7.8	12.8	6.4	<LOD	5.94	0.24	0.85	1.42	1.77	6.20
B10	4.6	5.6	27.5	13.8	<LOD	1.18	0.13	0.46	4.89	0.48	5.26
B11	5.3	8.0	27.1	13.5	2.84	1.67	0.05	0.61	2.66	2.79	6.47
B12	5.1	6.8	29.3	14.6	<LOD	5.87	<LOD	0.46	0.54	1.78	4.56
B13	5.2	8.0	41.1	20.8	4.45	1.91	0.12	0.76	0.45	2.83	6.28
B14	5.0	6.0	116.2	58.1	<LOD	3.49	<LOD	0.39	2.09	1.34	4.69
B15	4.6	6.6	97.0	48.5	<LOD	0.40	0.02	0.34	0.93	1.51	3.26
B16	4.1	6.2	133.7	66.9	3.30	0.89	<LOD	0.04	4.56	0.42	4.51
B17	5.1	6.0	58.1	29.0	<LOD	2.88	0.01	0.25	1.17	1.19	3.76
B18	5.0	19.4	417.0	211.7	27.16	9.46	1.22	1.29	0.11	5.03	10.09
B19	5.3	6.2	25.7	12.9	<LOD	1.19	0.04	<LOD	0.53	1.93	5.37
B20	4.7	5.0	12.6	6.3	<LOD	0.91	0.09	0.61	0.14	2.29	5.32
B21	5.0	5.2	13.6	6.8	4.51	1.82	0.02	<LOD	1.21	2.43	4.70
B22	4.5	5.0	6.5	3.3	<LOD	2.63	0.01	<LOD	1.06	2.70	4.35
B23	4.9	8.2	18.3	9.2	<LOD	0.47	0.01	0.51	1.24	2.26	4.17
B24	5.3	7.2	28.4	14.4	9.12	1.82	0.14	0.75	0.66	3.00	7.35
B25	6.4	6.4	5.0	2.5	<LOD	1.60	<LOD	0.13	1.39	0.46	4.31
B26	4.8	6.0	8.4	4.2	<LOD	1.13	<LOD	0.35	0.90	1.80	4.48
B27	4.8	6.0	18.4	9.2	<LOD	1.40	<LOD	0.43	1.03	1.92	5.73
B28	4.9	6.4	12.5	6.2	<LOD	1.02	0.11	0.48	0.74	1.90	4.81
B29	5.0	5.0	16.5	8.2	<LOD	4.09	0.01	0.39	0.66	1.73	5.56
B30	5.1	5.6	11.1	5.5	<LOD	1.53	0.00	0.28	1.18	2.33	3.11
B31	5.1	5.2	8.1	4.1	<LOD	1.14	0.00	0.36	1.05	1.96	4.80
B32	5.1	6.4	10.6	5.3	<LOD	4.67	0.12	0.35	1.56	1.51	4.64
B33	4.7	6.0	14.2	7.1	<LOD	2.66	0.02	0.44	2.02	<LOD	<LOD
B34	5.1	6.0	11.8	5.9	<LOD	1.92	0.56	0.27	0.49	1.40	4.29
B35	5.0	6.0	6.9	3.5	<LOD	2.16	0.50	0.39	0.45	2.35	4.21
B36	4.8	5.0	11.0	5.5	<LOD	2.32	0.57	0.16	0.54	1.57	4.55
B37	4.5	6.0	13.4	6.7	<LOD	2.79	0.15	0.17	0.11	2.68	4.81
B38	4.4	5.0	11.3	5.6	<LOD	2.78	2.08	0.57	2.87	0.51	4.20
B39	4.6	4.2	10.3	5.2	<LOD	1.64	0.07	0.21	1.32	2.11	3.91
B40	4.9	5.6	9.4	4.7	1.30	3.48	2.24	0.40	1.66	2.33	5.16

Prilog 1 Prikaz fizikalno-kemijskih parametara u svim uzorcima piva(autor)

šifra piva	pH	ekstrakt [°Brix]	EBC	SRM	maltotrioza [g L ⁻¹]	maltotioza [g L ⁻¹]	glukoza [g L ⁻¹]	fruktoza [g L ⁻¹]	masne kiseline [g L ⁻¹]	glicerol [g L ⁻¹]	etanol [%]
B41	5.2	5.0	12.3	6.2	<LOD	2.90	0.04	0.39	0.37	2.07	4.85
B42	4.7	5.0	16.6	8.3	<LOD	2.28	<LOD	0.28	0.11	2.38	3.61
B43	5.3	5.4	7.1	3.5	<LOD	1.85	<LOD	0.44	1.13	1.42	4.20
B44	5.0	5.6	8.8	4.4	<LOD	2.03	0.06	0.41	1.04	1.95	4.67
B45	5.2	5.4	17.8	8.9	<LOD	2.88	0.06	0.54	0.76	1.98	4.57
B46	5.1	6.1	8.5	4.2	<LOD	2.78	0.03	0.39	1.19	1.91	4.81
B47	5.0	6.2	8.6	4.3	<LOD	3.54	0.00	0.36	1.34	1.86	4.95
B48	4.6	5.2	13.4	6.7	<LOD	1.57	0.02	0.22	1.12	2.23	5.22
B49	5.0	6.0	26.9	13.5	<LOD	1.58	0.00	0.21	1.26	2.43	5.42
B50	5.0	6.0	21.5	10.8	<LOD	8.16	0.11	0.63	1.07	1.93	4.53
B51	4.9	5.8	20.6	10.3	<LOD	1.27	0.00	0.44	0.76	1.58	5.59
B52	4.8	6.0	18.5	9.3	<LOD	1.76	0.03	0.45	0.84	1.92	4.93
B53	4.5	5.0	27.3	13.6	0.40	8.53	0.12	0.59	1.08	1.89	4.88
B54	4.7	6.6	34.2	17.1	<LOD	6.36	0.20	0.26	0.16	3.56	7.06
B55	5.2	6.8	49.3	24.6	<LOD	6.53	0.20	0.27	0.11	3.31	7.12
B56	5.1	5.0	17.3	8.7	9.76	1.90	0.00	0.47	0.96	1.60	4.34
B57	5.0	5.0	5.5	2.8	0.44	2.22	1.32	0.43	0.77	1.76	4.23
B58	4.9	5.0	13.8	6.9	0.37	1.98	0.22	0.06	2.78	2.27	4.64
B59	5.0	6.2	14.0	7.0	<LOD	5.93	0.21	0.62	1.34	1.92	5.20
B60	4.9	6.8	34.3	17.1	<LOD	5.61	0.03	0.55	0.17	1.98	6.01
B105	4.7	6.2	7.7	3.9	1.89	3.09	0.07	0.30	0.11	2.28	4.85
B106	4.3	5.0	105.1	53.4	<LOD	3.51	0.00	0.33	0.92	1.29	4.41
B107	4.9	9.8	35.0	17.8	<LOD	5.62	0.32	0.51	1.16	1.75	6.68
B108	4.8	8.4	113.3	57.5	<LOD	4.37	0.66	0.40	1.55	1.83	6.62
B109	4.8	9.0	13.7	7.0	<LOD	4.23	1.43	1.77	0.52	2.01	4.66
B110	5.1	8.0	22.1	11.2	<LOD	0.66	0.14	0.58	0.53	1.58	5.36
average	4.9	6.4	37.2	18.7	6.3	3.1	0.3	0.4	1.1	2.0	5.1
sd	0.317	1.997	60.255	30.501	7.022	2.399	0.597	0.263	0.913	0.811	1.264
min	4.1	4.2	4.9875	5	0.094	586	49	132	467	146	4,23
max	6.4	19.4	417.02	211.68	27.15	13.36	2.521	1.766	4.892	5.031	10.09
median	4.9	6	16.925	8.4625	159	578	629	553	42	1.927	814
IQR	0.4	1.5	17.9	9.0	7.8	2.5	0.2	0.2	0.8	0.8	1.2
above LOD prevalence	66	66	66	66	17	66	58	63	66	65	65
	100%	100%	100%	100%	26%	100%	88%	95%	100%	98%	98%

Prilog 2 Pojavnost mikotoksina u uzorcima hmelja (autor)

name of hops	Alternaria spp.										Fusarium spp.										plant metabolite	unspecific										
	Altemariol [µg/kg]	Altenus in [µg/kg]	Altemariolmethylether [µg/kg]	Altersetin [µg/kg]	Infectopyrone [µg/kg]	Tentoxin [µg/kg]	Tenuazonic acid [µg/kg]	sum Alternaria [µg/kg]	Beauvericin [µg/kg]	Bikaverin [µg/kg]	Butenolid [µg/kg]	Culmorin [µg/kg]	Deoxynivalenol [µg/kg]	Enniatin B [µg/kg]	Enniatin B1 [µg/kg]	Enniatin B2 [µg/kg]	Enniatin B3 [µg/kg]	Fumonisin B1 [µg/kg]	HT-2 toxin [µg/kg]	Moniliformin [µg/kg]		Nivalenol [µg/kg]	Siccanol [µg/kg]	T-2 toxin [µg/kg]	sum Fusarium [µg/kg]	Abscisic acid [µg/kg]	3-Nitropropionic acid [µg/kg]	Brevianamid F [µg/kg]	Citreosonein [µg/kg]	cyclo(L-Pro-L-Val) [µg/kg]	Tryptophol [µg/kg]	sum unspecific [µg/kg]
Amirino 2021	<LOD	<LOD	<LOD	9.43	<LOD	<LOD	11.4	208	<LOD	4.35	<LOD	<LOD	0.049	0.044	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.44	3286	1.27	0.16	<LOD	1.14	14.0	16.6	
Amber Ale	<LOD	<LOD	<LOD	0.36	20.85	<LOD	511	532	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.13	0.055	<LOD	<LOD	<LOD	14.3	<LOD	186	<LOD	201	2787	<LOD	0.83	<LOD	1.67	26.2	28.7	26.2	28.7	
Bobek	<LOD	<LOD	<LOD	0.37	9.12	<LOD	1164	1174	<LOD	<LOD	<LOD	27.1	26.8	1.91	0.647	<LOD	<LOD	15.7	<LOD	249	<LOD	321	3930	<LOD	0.50	0.20	<LOD	43.5	44.2	43.5	44.2	
Cascade	<LOD	<LOD	<LOD	0.02	14.05	<LOD	3.74	17.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	14.9	<LOD	15.7	<LOD	30.7	3158	<LOD	0.32	<LOD	0.18	6.58	7.08	6.58	7.08	
Cascade	<LOD	<LOD	<LOD	0.12	8.7	<LOD	9.72	18.6	<LOD	<LOD	<LOD	4.74	<LOD	0.578	0.030	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	62.6	3466	<LOD	0.11	<LOD	0.81	13.5	14.4	13.5	14.4	
Cascade	<LOD	<LOD	<LOD	0.04	6.54	<LOD	68.3	74.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.0	<LOD	<LOD	<LOD	27.1	1439	1.19	0.58	<LOD	<LOD	13.9	15.7	13.9	15.7	
Cascade (Aba)	<LOD	<LOD	<LOD	0.08	10.58	<LOD	9.49	20.1	<LOD	<LOD	<LOD	8.51	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8.51	2019	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.30	5.30	5.30	5.30	
Cascade 2020	<LOD	<LOD	<LOD	0.21	5.98	<LOD	5.63	11.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3864	<LOD	0.12	<LOD	0.48	0.60	0.48	0.60
Celeia	<LOD	<LOD	<LOD	0.02	11.19	<LOD	783	795	<LOD	<LOD	<LOD	1053	<LOD	0.36	0.161	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	44.2	<LOD	1495	3053	<LOD	0.23	<LOD	<LOD	18.7	18.9	18.7	18.9	
Centennial	<LOD	<LOD	<LOD	0.13	10.64	<LOD	14.1	24.8	<LOD	<LOD	<LOD	2.03	68.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16.0	<LOD	<LOD	<LOD	86.8	3843	<LOD	0.38	<LOD	0.92	20.2	21.5	20.2	21.5	
Centennial	<LOD	<LOD	<LOD	0.48	12.24	<LOD	10.2	22.9	<LOD	<LOD	<LOD	4.31	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	17.2	<LOD	<LOD	<LOD	21.5	3416	<LOD	<LOD	<LOD	2.74	63.8	66.5	63.8	66.5	
Centennial (Aba)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	18.18	<LOD	34.6	52.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	17.4	<LOD	<LOD	<LOD	17.4	3587	<LOD	<LOD	<LOD	1.86	9.13	11.0	9.13	11.0	
Centennial 2020	<LOD	<LOD	<LOD	0.34	7.62	<LOD	31.6	39.6	<LOD	<LOD	<LOD	7.82	23.6	<LOD	0.23	0.005	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	42.3	2861	<LOD	<LOD	<LOD	1.54	32.9	34.4	32.9	34.4	
Challenger 2021	<LOD	<LOD	<LOD	0.53	12.95	309.3	376	699	<LOD	<LOD	<LOD	8.12	46.9	<LOD	0.51	0.310	<LOD	<LOD	<LOD	11.2	<LOD	168	3578	0.91	0.87	0.67	4.13	37.7	43.2	37.7	43.2	
Chinook	<LOD	<LOD	<LOD	0.63	2.81	<LOD	6.92	10.4	<LOD	<LOD	<LOD	197	2.78	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.7	<LOD	<LOD	<LOD	215	3224	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	23.6	24.6	23.6	24.6	
Chinook (Aba)	<LOD	<LOD	<LOD	0.06	9.87	<LOD	13.4	23.3	<LOD	<LOD	<LOD	153	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.1	<LOD	40.9	<LOD	209	1990	<LOD	0.30	<LOD	2.04	16.4	18.7	16.4	18.7	
Citra	<LOD	<LOD	<LOD	0.49	9.90	<LOD	11.6	22.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	19.2	<LOD	25.5	<LOD	44.7	2549	<LOD	0.25	<LOD	<LOD	87.8	88.1	87.8	88.1	
Citra 2021	<LOD	<LOD	<LOD	0.36	17.68	<LOD	4.49	22.5	<LOD	<LOD	<LOD	5.25	<LOD	0.213	0.022	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	26.6	3634	<LOD	0.06	0.20	<LOD	58.3	58.6	58.3	58.6	
Columbus	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	24.86	<LOD	23.0	47.9	<LOD	<LOD	<LOD	6.26	93.2	<LOD	0.058	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	99.5	3579	0.32	0.94	<LOD	9.35	4.26	14.9	4.26	14.9	
Eldorado	<LOD	<LOD	<LOD	0.10	15.36	<LOD	31.3	46.8	<LOD	<LOD	<LOD	90.9	<LOD	0.008	0.080	<LOD	<LOD	16.1	<LOD	<LOD	<LOD	107	4341	<LOD	0.14	<LOD	2.72	31.2	34.0	31.2	34.0	
Fuggle Bio	<LOD	<LOD	<LOD	0.73	14.85	173.9	56.5	262	<LOD	<LOD	<LOD	30.9	15.1	0.92	0.379	<LOD	<LOD	15.9	<LOD	89.1	<LOD	152	2202	0.51	1.05	<LOD	3.26	62.1	67.0	62.1	67.0	
Gerweiss Magnum	<LOD	<LOD	<LOD	0.74	6.75	<LOD	473	480	0.06	<LOD	<LOD	29.2	12.5	<LOD	<LOD	0.597	0.208	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	265	2816	<LOD	0.68	<LOD	1.41	34.0	36.1	34.0	36.1	
Golding	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	19.55	<LOD	864	883	0.29	<LOD	<LOD	27.3	<LOD	0.32	0.339	<LOD	<LOD	15.8	<LOD	51.5	<LOD	559	2982	<LOD	0.29	<LOD	0.15	2.34	2.77	2.34	2.77	
H.M.180	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	13.60	<LOD	34.5	48.1	0.15	<LOD	<LOD	4.93	<LOD	1.68	0.698	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	92.4	<LOD	118	3187	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.92	4.92	4.92	4.92	
Hallerbauer Magnum	<LOD	<LOD	<LOD	0.71	9.12	<LOD	351	361	0.88	<LOD	<LOD	26.2	13.6	18.1	2.54	0.750	<LOD	<LOD	<LOD	64.7	<LOD	278	2790	<LOD	0.35	0.05	2.07	27.5	30.0	27.5	30.0	
Hopsi, Seaz	<LOD	<LOD	<LOD	0.18	13.74	<LOD	42.9	56.8	<LOD	<LOD	<LOD	10.8	<LOD	0.11	0.095	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.38	<LOD	80.1	3947	<LOD	0.18	<LOD	0.64	21.6	22.5	21.6	22.5	
Local Wild	<LOD	<LOD	<LOD	0.20	17.39	<LOD	91.8	109	<LOD	<LOD	<LOD	16.4	<LOD	0.19	0.026	<LOD	<LOD	16.4	<LOD	84.4	<LOD	101	2499	<LOD	0.46	0.04	0.39	16.5	17.4	16.5	17.4	
Local wild	<LOD	<LOD	<LOD	0.46	13.27	<LOD	21.2	35.0	0.13	<LOD	<LOD	7.70	<LOD	0.13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	27.1	<LOD	35.0	3094	<LOD	0.91	<LOD	3.42	27.4	31.7	27.4	31.7	
Local wild	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	26.62	<LOD	22.0	45.4	<LOD	<LOD	<LOD	15.4	<LOD	0.043	<LOD	<LOD	<LOD	14.8	<LOD	33.9	<LOD	326	3515	<LOD	1.11	<LOD	2.86	30.4	34.4	30.4	34.4	
Local wild 2019	<LOD	<LOD	<LOD	0.04	23.42	<LOD	22.0	45.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.00	0.314	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	55.1	<LOD	90.6	4013	<LOD	0.29	<LOD	2.00	21.7	22.0	21.7	22.0	
Magnum	<LOD	<LOD	<LOD	0.79	6.55	<LOD	711	718	0.62	<LOD	<LOD	26.0	12.2	<LOD	2.50	0.970	<LOD	<LOD	<LOD	198	<LOD	287	2582	<LOD	0.47	<LOD	2.05	29.4	31.9	29.4	31.9	
Magnum	<LOD	<LOD	<LOD	0.64	8.77	<LOD	292	301	0.20	<LOD	<LOD	39.1	<LOD	1.36	0.452	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	135	<LOD	196	2923	<LOD	0.37	<LOD	2.16	34.6	37.1	34.6	37.1	
Magnum	<LOD	<LOD	<LOD	0.85	5.62	<LOD	349	356	<LOD	<LOD	<LOD	39.4	19.1	<LOD	2.95	0.791	0.199	0.002	14.9	<LOD	264	3016	<LOD	0.67	<LOD	1.83	43.9	46.4	43.9	46.4		
Magnum (Aba)	<LOD	<LOD	<LOD	0.82	5.30	<LOD	377	383	<LOD	<LOD	<LOD	31.2	29.9	<LOD	1.07	0.405	<LOD	<LOD	16.1	24.3	<LOD	284	3096	<LOD	0.60	<LOD	2.37	34.9	37.9	34.9	37.9	
Magnum 2018	<LOD	<LOD	<LOD	0.35	25.41	<LOD	349	374	0.05	<LOD	<LOD	9.22	44.8	<LOD	1.34	0.588	<LOD	<LOD	<LOD	17.2	<LOD	228	3226	<LOD	0.86	<LOD	6.44	21.0	28.3	21.0	28.3	
Mandarina Bavaria	<LOD	<LOD	<LOD	0.68	2.48	<LOD	47.6	50.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.004	<LOD	<LOD	<LOD	16.2	<LOD	76.5	<LOD	92.7	2355	<LOD	0.23	<LOD	0.09	42.4	42.7	42.4	42.7	

Prilog 2 Pojavnost mikotoksina u uzorcima hmelja (autor)

name of hops	Fusarium spp.										plant metabolite	unspecific																			
	sum Alternaria [µg/kg]	Altersetin [µg/kg]	Infectopyrone [µg/kg]	Tentoxin [µg/kg]	Tenuazonic acid [µg/kg]	sum Alternaria [µg/kg]	Beauvericin [µg/kg]	Bikaverin [µg/kg]	Butenolid [µg/kg]	Culmorin [µg/kg]	Deoxynivalenol [µg/kg]	Enniatin B [µg/kg]	Enniatin B1 [µg/kg]	Enniatin B2 [µg/kg]	Enniatin B3 [µg/kg]	Fumonisin B1 [µg/kg]	HT-2 toxin [µg/kg]	Moniliformin [µg/kg]	Nivalenol [µg/kg]	Siccanol [µg/kg]	T-2 toxin [µg/kg]	sum Fusarium [µg/kg]	Abscisic acid [µg/kg]	3-Nitropropionic acid [µg/kg]	Brevianamid F [µg/kg]	Citreosone in [µg/kg]	cyclo(L-Pro-L-Val) [µg/kg]	Tryptophol [µg/kg]	sum unspecific [µg/kg]		
Mendariina Bravaria (Ale)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	41.7	44.2	<LOD	<LOD	<LOD	0.15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.1	27.42	<LOD	0.35	<LOD	0.51	2.90	37.6		
Mendariina Bravaria 2021	<LOD	0.19	3.68	<LOD	<LOD	35.3	39.2	<LOD	<LOD	88.6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	88.6	23.55	<LOD	0.42	<LOD	<LOD	17.6	18.0		
Mosaic	<LOD	0.86	11.00	<LOD	<LOD	4.77	16.8	<LOD	<LOD	0.8	<LOD	0.002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	47.9	36.69	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	32.6	32.6		
Mosaic 2019	<LOD	0.64	12.44	<LOD	<LOD	6.37	19.4	<LOD	<LOD	8.64	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	47.9	33.04	<LOD	0.29	<LOD	<LOD	17.7	18.0		
Mosaic 2020	<LOD	0.84	10.80	<LOD	20.0	4.86	5.95	<LOD	<LOD	10.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	127	25.92	<LOD	0.13	<LOD	<LOD	25.9	26.0		
Mosaic 2021	<LOD	0.27	13.63	<LOD	<LOD	7.34	21.2	<LOD	<LOD	30.4	<LOD	0.013	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	386	26.88	0.12	0.56	<LOD	1.24	25.3	27.2		
Nugget	<LOD	0.75	13.71	<LOD	<LOD	25.6	40.0	<LOD	<LOD	10.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	62.2	41.97	<LOD	0.95	<LOD	2.64	33.2	36.8		
Premium	<LOD	0.12	17.01	<LOD	<LOD	207	224	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.022	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	80.2	40.32	<LOD	0.82	<LOD	1.41	43.2	45.4		
Saaz	<LOD	0.24	12.64	<LOD	<LOD	47.0	59.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.094	0.080	<LOD	<LOD	15.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	141	37.07	<LOD	0.22	<LOD	<LOD	28.0	28.2		
Saaz 2021	<LOD	<LOD	17.09	95.1	<LOD	47.3	160	<LOD	<LOD	406	<LOD	0.20	0.050	<LOD	<LOD	14.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	487	21.87	<LOD	0.29	<LOD	<LOD	14.7	15.0		
Saaz 2020	<LOD	25.07	<LOD	<LOD	<LOD	3.13	62.6	<LOD	<LOD	582	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	53.6	40.66	<LOD	0.13	<LOD	1.42	6.62	8.17		
Simcoe 2020	<LOD	0.0015	0.20	15.61	<LOD	10.1	25.9	<LOD	<LOD	9.17	<LOD	0.082	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	58.2	22.96	<LOD	0.54	<LOD	1.17	9.47	11.2		
Sladek	<LOD	0.23	24.69	<LOD	<LOD	164	188	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	120	3.22	138	48.88	<LOD	1.93	<LOD	8.01	49.9	59.9
Staročeško Magnum	<LOD	1.02	6.22	<LOD	<LOD	310	317	<LOD	<LOD	51.8	12.2	1.11	0.282	<LOD	<LOD	16.0	21.4	28.8	<LOD	<LOD	<LOD	303	31.20	<LOD	1.22	<LOD	2.41	45.7	49.3		
Styrian Aurora	<LOD	0.32	16.51	<LOD	<LOD	55.8	72.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.16	<LOD	<LOD	<LOD	15.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	107	27.46	<LOD	0.55	<LOD	0.91	34.4	35.8		
Styrian Aurora 2021	<LOD	0.18	20.08	<LOD	<LOD	61.4	81.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.26	0.051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	88.5	34.72	<LOD	0.35	<LOD	1.72	39.1	41.2		
Styrian Cardinal (Ale)	<LOD	0.33	13.80	<LOD	<LOD	158	172	<LOD	<LOD	30.0	<LOD	0.035	<LOD	<LOD	<LOD	15.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	156	37.42	<LOD	0.68	<LOD	0.60	28.9	30.1		
Styrian Fox 2021	<LOD	0.24	8.57	<LOD	<LOD	71.5	81.3	<LOD	<LOD	6.63	<LOD	0.13	0.048	<LOD	<LOD	15.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	149	25.09	<LOD	<LOD	0.09	<LOD	8.82	8.91		
Styrian Goldline	<LOD	0.06	12.47	<LOD	<LOD	678	691	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	0.39	0.304	<LOD	<LOD	14.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	591	27.42	<LOD	0.43	<LOD	<LOD	12.3	12.7		
Styrian Golding 2021	<LOD	0.08	15.30	<LOD	20.1	688	724	0.46	0.37	<LOD	<LOD	0.32	0.113	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	805	32.42	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	20.3	20.3		
Styrian Golding Celeia	<LOD	<LOD	22.66	<LOD	<LOD	689	715	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.56	0.267	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	691	25.73	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.48	0.48		
Styrian Wolf 2021	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.28	5.28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.013	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.01	12.55	<LOD	0.51	<LOD	<LOD	47.3	47.9		
Yakima Cascade	<LOD	0.15	6.87	<LOD	<LOD	7.23	14.3	<LOD	<LOD	16.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	18.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	34.4	22.58	<LOD	0.10	<LOD	0.98	14.0	15.1		
Yakima Chinook	<LOD	0.75	5.76	<LOD	<LOD	8.68	15.3	<LOD	<LOD	4.02	46.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	51.0	18.83	<LOD	0.15	<LOD	<LOD	25.3	25.5		
Yakima Citra	<LOD	0.29	5.86	<LOD	<LOD	8.54	14.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	9.99	<LOD	<LOD	<LOD	15.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	32.3	26.77	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	54.4	54.4		
Yakima Columbus	<LOD	0.07	10.28	<LOD	<LOD	13.1	23.5	<LOD	<LOD	53.6	768	0.015	<LOD	<LOD	<LOD	18.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	840	27.66	0.74	0.64	<LOD	1.15	6.30	8.83		
average	24.41	0.0839	0.3772	12.71	192.8	20.09	172.8	196.8	0.292	0.373	15.99	108.5	97.09	0.585	0.304	0.203	0.002	15.77	19.78	24.42	19.59	171.1	1.314	207.1	30.57	0.724	0.508	0.196	2.113	26.24	28.08
sd	9.342	0.1159	0.284	6.212	108.3	0.079	264.3	270.8	0.278	0.008	14.62	208.6	236.2	0.807	0.277	0.006	0	1.07	4.758	8.327	18.47	182.4	1.195	239.1	71.2	0.432	0.358	0.22	1.974	17.64	18.12
min	15.84	0.0015	0.0166	2.475	95.14	20.03	3.13	5.285	0.059	0.371	2.006	0.805	2.792	0.002	0.003	0.199	0.002	14.22	13.09	10.7	4.39	6.507	0.2	0.013	12.55	0.124	0.058	0.045	0.087	0.485	0.85
max	34.37	0.2163	1.0152	26.63	309.3	20.14	1164	1174	0.881	0.375	51.78	1053	768	2.954	0.97	2.028	0.002	19.2	24.27	30.42	55.06	803.7	3.218	1495	48.88	1.272	1.928	0.675	9.35	87.84	88.09
me dian	23.04	0.0338	0.3221	12.44	173.9	20.09	38.52	54.78	0.176	0.373	8.506	29.94	19.74	0.185	0.267	0.203	0.002	15.78	20.87	28.97	12.8	117	0.759	107.1	30.74	0.745	0.426	0.119	1.972	25.32	26.61
IQR	9.266	0.1074	0.5009	7.941	107.1	0.056	260.3	268.1	0.338	0.002	20.99	76.02	15.81	0.868	0.397	0.005	0	1.05	3.623	9.58	17.15	107.6	1.364	216.7	9.94	0.635	0.422	0.129	1.581	20.61	22.06
above LOD	3	3	51	61	3	2	62	62	10	2	34	1	41	29	2	1	35	4	6	7	39	6	61	62	7	50	7	39	62	62	
prevalence	5%	82%	98%	5%	3%	100%	100%	16%	3%	34%	53%	16%	69%	47%	3%	2%	55%	6%	10%	11%	63%	10%	98%	100%	100%	11%	84%	11%	63%	100%	

*mikotoksini regulirani u EC 553/2022

**mikotoksini s popisa EFSA-inog poziva za kontinuirano skupljanje podataka o pojavnosti kemijskih kontaminanata u hrani i krmivu

***mikotoksini regulirani u EC 915/2023

**** mikotoksini regulirani u EC 165/2022

Popis oznaka, kratica i simbola

AF	aflatoksini
AFB1	aflatoksini AFB ₁
AME	alternariol monometil eter
AOH	alternariol
ASTM	Američko društvo za ispitivanje i materijale, (eng. <i>American Society for Testing and Materials</i>)
ATA	alimentarna toksična aleukija
BWS	Metoda najbolje-najgore skaliranje
CATA	Metodologija check-all-that-apply (CATA)
DCE	Metoda diskretnog izbora
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DON	deoksinivalenol
EBC	Europska konvencije o pivarstvu
ESI	ionizacija elektrosprejom
FB	fumonizini
FB1	fumonizin B1
FCR	profiliranje po slobonom izboru (eng. <i>Free-choice profiling</i>)
HACCP	Analiza opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (eng. <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>)
HT-2	HT-2 toksin
IBU	Međunarodna jedinica za gorčinu (eng. <i>International bittering unit IBU</i>)
IRAC	Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC; eng. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija u kombinaciji s tandemskom masenom spektrometrijom
LOD	granica detekcije (eng. <i>limit of detection</i>)
LOQ	granica kvantifikacije (eng. <i>limit of quantification</i>)
MS	maseni spektrometar
NMR	nuklearne magnetske rezonancije
OTA	okratoksin A
PAE	Metoda preferiranih atributa
PCA	analiza glavnih komponenata

PM	Projektivno mpiranje (PM)
PSP	Polarizirano senzorsko pozicioniranje
QDA	kvantitativna deskriptivna analiza (eng. <i>Quality descriptive analysis</i>)
RATA	Rate-all-that-apply (RATA)
T-2	T2 toksin
TC	trihoteceni
TDS	vremenska domainacija osjeta (eng. <i>Temporal Dominance of Sensations</i>)
TeA	tenuazonska kiselina alternariol
UFP	ultra-flash profiliranje
U-HPLC	ultravisokotlačne tekućinske kromatografije
ZEN	zearalenon

9. ŽIVOTOPIS

Ivana Dodlek Šarkanj rođena je 14. prosinca 1984. godine u Čakovcu. Nakon završene srednje Medicinske škole u Varaždinu, 2003. upisuje Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, smjer Prehrambeno inženjerstvo.

Diplomira 2008. godine te stječe stručno zvanje diplomirani inženjer prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva. Od veljače 2015. godine zapošljava se na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku kao tehnički suradnik na Katedri za kakvoću hrane, Katedri za prehranu u sklopu Zavoda za ispitivanje hrane i prehrane.

Na Sveučilištu Sjever počinje raditi 2019. godine kao stručni suradnik, dok 2020. godine pa sve do danas radi u svojstvu predavača na Odjelu za prehrambenu tehnologiju, Sveučilišta Sjever Koprivnica. Iste godine na Fakultetu organizacije i informatike u Zagrebu stječe pedagoške kompetencije.

Godine 2021/2022. upisuje poslijediplomski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu prehrambeno inženjerstvo.

Svojom predanošću, odgovornosti u nastavi u svojstvu predavača te odnosu prema studentima od rektora dobiva priznanje za izvrsnost u nastavi i radu sa studentima u akademskoj godini 2022./2023. na prijediplomskom studiju Prehrambena tehnologija, Sveučilišta Sjever.

Svojim doprinosom u znanosti doprinjela je objavom tri znanstvena rada iz skupine a1, jedan iz skupine a2, jedan iz skupine a3 te sudjelovala na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima.

Objavljeni znanstveni radovi:

A1 radovi

Dodlek Šarkanj, I.; Vahčić, N.; Markov, K.; Haramija, J.; Uršulin-Trstenjak, N.; Hajdek, K.; Sulyok, M.; Krska, R.; Šarkanj, B. First Report on Mycotoxin Contamination of Hops (*Humulus lupulus* L.). *Toxins*, **16** (2024), 7; 293-307. doi: 10.3390/toxins16070293 IF=3,9 (Q1)

Uršulin-Trstenjak, N.; **Dodlek Šarkanj, I.**; Sajko, M.; Vitez, D.; Živoder, I. (2021, 9. listopada) Determination of the Personal Nutritional Status of Elderly Populations Based on Basic Foodomics Elements. *Foods*, **10**(10); 2391, doi:10.3390/foods10102391. IF=5,2 (Q1)

Kovač, M.; Bulaić, M.; Jakovljević, J.; Nevistić, A.; Rot, T.; Kovač, T.; **Dodlek Šarkanj, I.**; Šarkanj, B.(2021, 21. siječnja) Mycotoxins, Pesticide Residues, and Heavy Metals Analysis of Croatian Cereals. *Microorganisms*, **9** (2); 216, doi:10.3390/microorganisms9020216. IF=4,5 (Q2)

A2 rad

Knežević, N., Palfi, M., Vrandečić, K., **Dodlek Šarkanj, I.**, & Ćosić, J. (2021). Oznake zemljopisnog porijekla poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda. *Meso*. 23(5), 420-429
CROSBI ID:1151735

A3 rad

Šarkanj, B., **Dodlek Šarkanj, I.**, Shamtsyan, M. Mycotoxins in food – how to prevent and whatto do when things go bad. E3S Web of Conf. Volume 215, 2020 International Scientific Conference on Biotechnology and Food Technology (BFT-2020) / M. Shamtsyan, S. Ignateva (ur.). Saint Petersburg Russia 27-29. listopad 2020. ISSN 2267-1242.
WOS:000659677100004