

# Arome kvarenja Lambic piva

---

Jukić, Ljubica

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:550300>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**AROME KVARENJA *LAMBIC* PIVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**LJUBICA JUKIĆ**

**Matični broj: 62**

**Split, srpanj 2024.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**AROME KVARENJA *LAMBIC* PIVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**LJUBICA JUKIĆ**

**Matični broj: 62**

**Split, srpanj 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
GRADUATE STUDY  
FOOD TECHNOLOGY**

**AROMAS OF DECAYING LAMBIC BEER**

**DIPLOMA THESIS**

**LJUBICA JUKIĆ**

**Parent number: 62**

**Split, July 2024**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Diplomski studij prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** prehrambena tehnologija  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### AROME KVARENJA *LAMBIC* PIVA

Ljubica Jukić, 62

**Sažetak:** Pivo je jedno od najstarijih i najpopularnijih pića na svijetu. Proces proizvodnje je složen, ali se tijekom povijesti nije značajno mijenjao. S obzirom na proizvodnju, piva se mogu podijeliti na ona koja se proizvode u velikim količinama, a nazivaju se komercijalna ili *lager* piva, te na *craft* piva koja se proizvode po tradicionalnim recepturama i u manjim količinama. Procesom spontane fermentacije nastaje i jedinstveno belgijsko *lambic* pivo karakteristične voćne arome. Bez obzira na način proizvodnje, pivo predstavlja složenu mješavinu sastojaka koja nastaje kuhanjem vode, hmelja i slada, te fermentacijom pripravljene sladovine posredstvom kvasaca. Sadrži visok raspon kemijskih spojeva koji nastaju u svim fazama proizvodnje, a brojni spojevi piva imaju važnu ulogu u formiranju njegovog okusa. U ovom su radu identificirani i analizirani spojevi arome iz triju uzoraka *lambic* piva korištenjem dviju metoda izolacije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i ekstrakcija tekuće-tekuće. Dobiveni rezultati pokazali su veliku raznolikost identificiranih aromatskih spojeva. Vidljive su određene sličnosti u izoliranim spojevima između uzoraka – najzastupljenije skupine izoliranih spojeva pripadaju alkoholima, kiselinama, aldehidima, ketonima, esterima i fenolima, a 2-feniletanol pojavljuje se u svim ispitivanim uzorcima.

**Ključne riječi:** *lambic* pivo, arome, metode izolacije

**Rad sadrži:** 46 stranica, 13 slika, 9 tablica, 41 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - član
3. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović - član – mentor

#### Datum obrane:

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## DIPLOMA THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology**  
**Graduate study of Food Technology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Supervisor:** Zvonimir Marijanović, PhD, Associate Professor

### AROMAS OF DECAYING LAMBIC BEER

Ljubica Jukić, 62

**Abstract:** Beer is one of the oldest and most popular beverages in the world. The production process is complex, but has not significantly changed throughout history. In terms of production, beers can be divided into those produced in large quantities, known as commercial or lager beers, and craft beers produced according to traditional recipes and in smaller quantities. The process of spontaneous fermentation creates a unique Belgian lambic beer with a characteristic fruity aroma. Regardless of the production method, beer represents a complex mixture of ingredients that is created by boiling water, hops and malt, and by fermenting the prepared wort with the help of yeasts. It contains a wide range of chemical compounds that are formed in all stages of production, and numerous beer compounds play an important role in the formation of its taste. In this study, aromatic compounds from three samples of lambic beer were identified and analyzed using two isolation methods: solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. The results showed a great diversity of identified aromatic compounds. Certain similarities in the isolated compounds between samples are evident – the most prevalent groups of isolated compounds belong to alcohols, acids, aldehydes, ketones, esters, and phenols, with 2-phenylethanol appearing in all tested samples.

**Keywords:** lambic beer, aromas, isolation methods

**Thesis contains:** 46 pages, 13 images, 9 tables, 41 literary references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. Ivica Blažević, PhD, Full Prof.            | - chairperson |
| 2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, Assoc. Prof. | - member      |
| 3. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof.    | - supervisor  |

#### **Defence date:**

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academics archives and repositories of the National and University Library.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zvonimira Marijanovića u razdoblju od lipnja do rujna 2023. godine.*



## *ZAHVALA*

*Prvenstveno zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na susretljivosti i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada usmjeren je na istraživanje aroma *lambic* piva. Teorijski pristup obuhvaća povijest pivarstva, pregled osnovnih sirovina za proizvodnju piva, analizu aroma piva kao i uvid u opće karakteristike *lambic* piva. Nadalje, eksperimentalni dio zadatka diplomskog rada temelji se na identifikaciji i analizi aroma kvarenja *lambic* piva. Korištena su tri uzorka *lambic* piva (uzorak piva s okusom jabuke, uzorak piva s okusom maline, uzorak piva s okusom breskve). Arome iz uzoraka izolirane su korištenjem metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi te ekstrakcijom tekuće-tekuće uporabom različitih otapala, a instrumentalna analiza provedena je vezanim sustavom plinske kromatografije-spektrometrije masa. Dobivene rezultate usporediti s literaturnim podacima.

## SAŽETAK

Pivo je jedno od najstarijih i najpopularnijih pića na svijetu. Proces proizvodnje je složen, ali se tijekom povijesti nije značajno mijenjao. S obzirom na proizvodnju, piva se mogu podijeliti na ona koja se proizvode u velikim količinama, a nazivaju se komercijalna ili *lager* piva, te na *craft* piva koja se proizvode po tradicionalnim recepturama i u manjim količinama. Procesom spontane fermentacije nastaje i jedinstveno belgijsko *lambic* pivo karakteristične voćne arome. Bez obzira na način proizvodnje, pivo predstavlja složenu mješavinu sastojaka koja nastaje kuhanjem vode, hmelja i slada, te fermentacijom pripravljene sladovine posredstvom kvasaca. Sadrži visok raspon kemijskih spojeva koji nastaju u svim fazama proizvodnje, a brojni spojevi piva imaju važnu ulogu u formiranju njegova okusa. U ovom su radu identificirani i analizirani spojevi arome iz triju uzoraka *lambic* piva korištenjem dviju metoda izolacije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i ekstrakcija tekuće-tekuće. Dobiveni rezultati pokazali su veliku raznolikost identificiranih aromatskih spojeva. Vidljive su određene sličnosti u izoliranim spojevima između uzoraka – najzastupljenije skupine izoliranih spojeva pripadaju alkoholima, kiselinama, aldehidima, ketonima, esterima i fenolima, a 2-feniletanol pojavljuje se u svim ispitivanim uzorcima.

**Ključne riječi:** *lambic* pivo, arome, metode izolacije

## **SUMMERY**

Beer is one of the oldest and most popular beverages in the world. The production process is complex, but has not significantly changed throughout history. In terms of production, beers can be divided into those produced in large quantities, known as commercial or lager beers, and craft beers produced according to traditional recipes and in smaller quantities. The process of spontaneous fermentation creates a unique Belgian lambic beer with a characteristic fruity aroma. Regardless of the production method, beer represents a complex mixture of ingredients that is created by boiling water, hops and malt, and by fermenting the prepared wort with the help of yeasts. It contains a wide range of chemical compounds that are formed in all stages of production, and numerous beer compounds play an important role in the formation of its taste. In this study, aromatic compounds from three samples of lambic beer were identified and analyzed using two isolation methods: solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. The results showed a great diversity of identified aromatic compounds. Certain similarities in the isolated compounds between samples are evident – the most prevalent groups of isolated compounds belong to alcohols, acids, aldehydes, ketones, esters, and phenols, with 2-phenylethanol appearing in all tested samples.

**Keywords:** lambic beer, aromas, isolation methods

# Sadržaj

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Povijest pivarstva.....	2
1.2. Sirovine za proizvodnju piva .....	3
1.2.1. Voda.....	3
1.2.2. Slad.....	3
1.2.3. Hmelj.....	4
1.2.4. Kvasac .....	4
1.3. Arome piva .....	6
1.3.1. Viši alkoholi .....	6
1.3.2. Esteri.....	7
1.3.3. Karbonilni spojevi .....	7
1.3.4. Sumporni spojevi.....	8
1.4. Kvarenje piva .....	9
1.5. <i>Lambic</i> pivo .....	10
1.6. Metode izolacije aroma <i>lambic</i> piva .....	12
1.6.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	12
1.6.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće .....	14
1.7. Instrumentalna analiza aroma <i>lambic</i> piva.....	15
1.7.1. Plinska kromatografija-spektrometrija masa .....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
2.1. Opis uzoraka .....	18
2.1.1. <i>Lambic</i> pivo s okusom breskve (uzorak 101).....	18
2.1.2. <i>Lambic</i> pivo s okusom jabuke (uzorak 202) .....	18
2.1.3. <i>Lambic</i> pivo s okusom maline (uzorak 303) .....	19
2.2. Eksperiment – izolacija i analiza aroma <i>lambic</i> piva .....	20
2.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	20
2.2.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	21
2.2.3. GC-MS analiza aroma.....	22
3. REZULTATI.....	24
3.1. Rezultati mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi uz upotrebu sivog vlakna .....	24

3.2. Rezultati ekstrakcije tekuće-tekuće uz upotrebu smjese otapala pentan:dietil-eter (1:2).....	28
3.3. Rezultati ekstrakcije tekuće-tekuće uz upotrebu organskog otapala diklormetana .....	32
4. RASPRAVA .....	37
5. ZAKLJUČAK .....	40
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA .....	42
7. LITERATURA .....	43

## UVOD

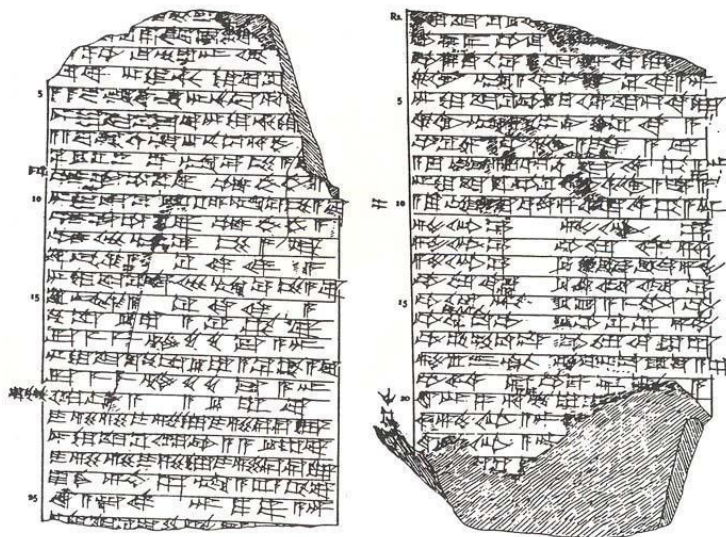
Pivo se smatra jednim od najdrevnijih i najpoznatijih alkoholnih pića na svijetu.<sup>1</sup> Definira se kao proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura.<sup>2</sup> Za proizvodnju ovog pjenušavog, slabog alkoholnog pića gorkog okusa potrebna su četiri osnovna sastojka - voda, slad, hmelj i kvasac. Proces proizvodnje je složen, ali se tijekom stoljeća nije značajno mijenjao.<sup>1</sup> Temelji se na alkoholnom vrenju (fermentaciji) vodenog ekstrakta slada uz dodatak hmelja pri čemu kvasci fermentiraju jednostavne šećere u alkohol i ugljikov dioksid. Nakon glavnog vrenja sladovine slijedi naknadno vrenje (dozrijevanje) mladog piva te njegova dorada i punjenje u ambalažu. Dorada podrazumijeva stabilizaciju piva, dodavanje aroma i često obogaćivanje piva ugljikovim dioksidom (karbonizacija). Naposljetku, komercijalno pivo se pasterizira i skladišti dok se *craft* pivo ne pasterizira i ne filtrira.<sup>3</sup>

Piva se mogu podijeliti na ona koja se proizvode u pivovarama u velikim količinama te se nazivaju komercijalna ili *lager* piva te na *craft* piva koja se proizvode po tradicionalnim recepturama i u ograničenim količinama. Tako se, u recepturi *craft* piva mogu pronaći različiti zanimljivi i netipični sastojci koji pridonose boljoj organoleptici i prepoznatljivosti proizvoda. Mali proizvodni kapaciteti *craft* pivovara omogućuju im bolju spremnost za odgovor na specifične zahtjeve potrošača i inovacije u usporedbi s industrijskim pivovarama. *Craft* piva zbog kvalitete i jedinstvenog okusa postaju sve popularnija na tržištu.<sup>4</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Povijest pivarstva

Još se uvijek ne može sa sigurnošću tvrditi kada su ljudi počeli proizvoditi pivo, ali najraniji kemijski tragovi ječmenog piva pronađeni su u obliku naslaga kalcijevog oksalata, takozvanog pivskog kamena, koji potječu od prije 5 000 godina iz doba Sumerana. Zapisi pronađeni na glinenim pločicama u Sumeru (Slika 1.) otkrivaju neku vrstu recepta za pripremanje ovog napitka. Naime, natpisi nisu bili samo hvalospjevi božici piva Ninkasi, već su pružali informacije o pivu kojeg su svećenice pripravlјale, a koje je općenito moralo nalikovati onome što su žene kuhale kod kuće za svoje obitelji. Sumerani su tako razlikovali najmanje 20 različitih vrsta piva: crno, bijelo, crveno, slatko itd., često i začinjeno egzotičnim aromama. U himni, božica Ninkasi pripravlјa pivo natapanjem proklijalog zrna u vodi, zatim sušenjem kako bi se zaustavilo klijanje te kuhanjem s medom i vinom. Također, božica pripravlјa ječmeni kruh koji vjerojatno simbolizira potrebu za unosom kvasca u pivo. Ninkasi zatim izlјeva konačni proizvod u bačvu prije nego se posluži kao „nalet Eufрата i Tigrisa“. Ovaj se proizvod pio s velikim oduševljenjem, a to potvrđuju zapisi na pločama na kojima je urezano da napitak „raduje srce“ i „usrećuje jetru“.<sup>1</sup>



Slika 1. Himna božici Ninkasi<sup>5</sup>



## 1.2. Sirovine za proizvodnju piva

Voda, slad, hmelj i kvasac su osnovne sirovine za proizvodnju piva i prilikom njihove nabave potrebno je poštivati unaprijed definirane kriterije kvalitete. Kvaliteta ovih sastojaka ključna je za dobivanje ukusnog i vrijednog proizvoda.<sup>6</sup>

### 1.2.1. Voda

Voda je glavni sastojak piva. Mora biti pitka, čista i bez patogena kao i udovoljavati dodatnim zahtjevima kvalitete.<sup>6</sup> Sastav vode koja se koristi za proizvodnju piva uvelike utječe na boju, okus i kvalitetu piva.<sup>7</sup> pH-vrijednost je posebno važna jer se različiti proizvodni koraci odvijaju optimalno samo pri određenim pH vrijednostima. Kuhanjem se tijekom procesa proizvodnje piva otpuštaju znatne količine iona iz slada koji reagiraju s ionima vode i uzrokuju promjene pH-vrijednosti. Zemnoalkalijski metali, kalcij i magnezij, snižavaju pH-vrijednost vode, dok je hidrogenkarbonatni ioni povećavaju.<sup>6</sup> Tvrdoća vode također predstavlja značajan čimbenik u proizvodnji određenog tipa piva. Za proizvodnju tamnijih piva s manje hmelja koristi se tvrda voda, dok se za proizvodnju svijetlih piva koristi meka voda. U prošlosti su se pivari morali prilagođavati tvrdoći raspoložive vode pa je tip piva bio predodređen. Danas, pivari od raspoložive vode mogu napraviti bilo koju vrstu piva zahvaljujući napretku znanosti i tehnologije.<sup>7</sup>

### 1.2.2. Slad

Slad je sirovina koja se koristi u proizvodnji piva, a nastaje klijanjem i sušenjem ječma.<sup>8</sup> Ječam je, nakon vode, količinski drugi najvažniji sastojak piva i osnova za proizvodnju slada.<sup>6</sup> Slad igra ključnu ulogu u okusu piva te je primarni izvor ugljikohidrata, proteina, lipida i polifenolnih spojeva.<sup>8</sup> Ostali usjevi, poput pšenice, pira i raži također su pogodne sirovine za proizvodnju piva i uglavnom se dodaju ječmenom sladu.<sup>6</sup> Takve sirovine su i ekonomski prihvatljivije jer su jeftinije od ječma te doprinose promjeni okusa samog piva.<sup>8</sup>

### 1.2.3. Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je višegodišnja zeljasta biljka penjačica iz porodice konoplji (*Cannabinoideae*). Pridonosi karakterističnoj aromi i gorčini piva. Igra ključnu ulogu u stvaranju pjene te se tradicionalno dodaje tijekom kuhanja zbog svojih konzervirajućih učinaka.<sup>6,8</sup> Hmelj sadrži znatan broj različitih kemijskih spojeva, a od posebne su važnosti smole, eterična ulja i fenoli.<sup>8</sup> Najznačajnija područja za uzgoj hmelja u svijetu nalaze se u Sjedinjenim Američkim Državama i Njemačkoj.<sup>6</sup>

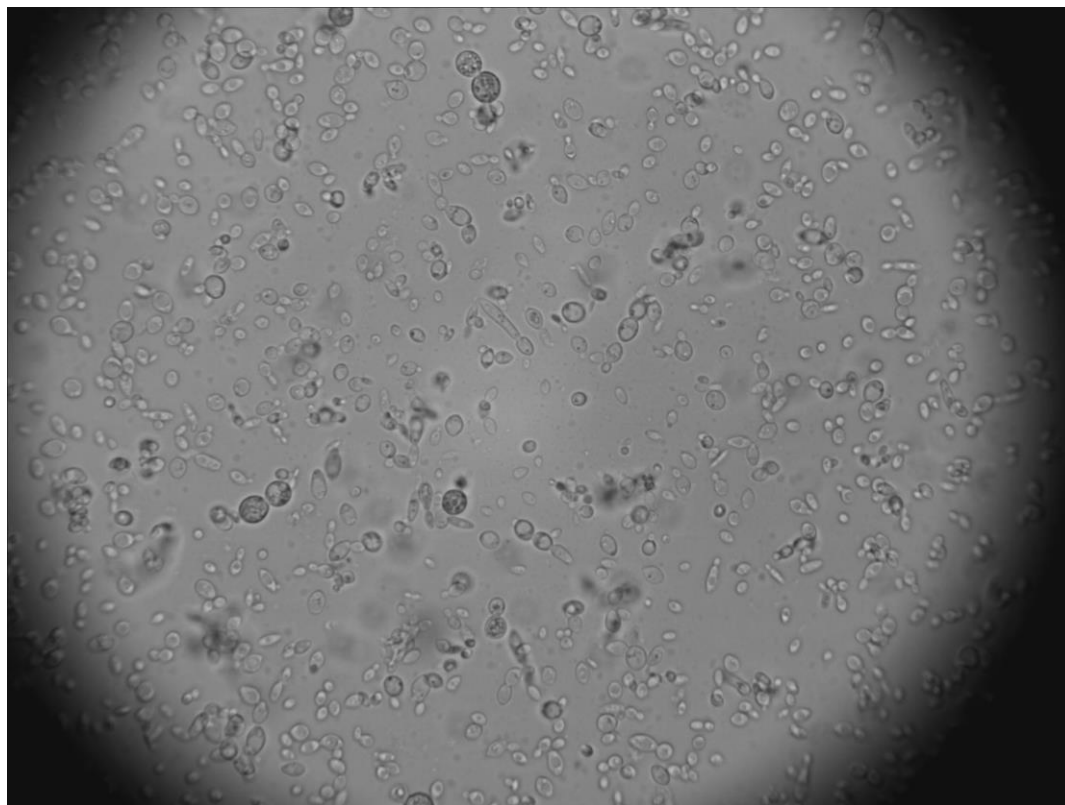


**Slika 2.** *Humulus lupulus* L.<sup>9</sup>

### 1.2.4. Kvasac

Kvasci su najvažniji mikroorganizmi koji se koriste za proizvodnju fermentiranih pića, pa tako i piva. Karakteristike piva uvelike ovise o vrsti upotrijebljenog kvasca jer isti ne proizvodi samo etanol i ugljikov dioksid već i ostale spojeve poput viših alkohola, estera, aldehida, ketona i organskih kiselina koji imaju ključnu ulogu u senzorskom profilu piva.<sup>8</sup> Općenito se koriste kvasci roda *Saccharomyces* iako se za proizvodnju specijalnih piva mogu

upotrebljavati i drugi poput roda *Brettanomyces*. Slad je idealna hrana za kvasce jer se ugljikohidrati iz slada javljaju kao iskoristivi šećeri (glukoza, fruktoza, maltoza, maltotrioza, saharoza). Također, u sladu se nalazi i dušik u obliku aminokiselina, peptida i proteina koji je neophodan za razmnožavanje kvasaca i fermentaciju. Optimalno razmnožavanje kvasaca i brza fermentacija neophodni su za visokokvalitetnu proizvodnju piva. Metabolizmom kvasaca tijekom alkoholnog vrenja, osim etanola i ugljikovog dioksida, nastaju i drugi spojevi kao na primjer viši alkoholi poput 2-metil-butanola i 2-fenil-etanola koji mogu snažno utjecati na aromu gotovog proizvoda. Esteri su najvažnija komponenta arome u pivima gornjeg vrenja jer pridonose voćnoj aromi piva, dok sumporov dioksid kao prirodni antioksidans doprinosi stabilnosti okusa. Nedostatkom hrane za kvasce počinje sinteza rezervnih ugljikohidrata (na primjer glikogena) koji su također važni u samom vrenju.<sup>6</sup>



**Slika 3.** Mikroskopski prikaz kvasca roda *Brettanomyces bruxellensis*<sup>10</sup>

### 1.3. Arome piva

Proizvodnja piva u svom najjednostavnijem obliku predstavlja najstariju biotehnologiju čovječanstva. Pivo je složena mješavina različitih sastojaka; prvenstveno vode, hmelja, slada i kvasca koje prolaze kroz proces kuhanja i fermentacije. Pokazalo se da mnoge vrste nastalih spojeva imaju važnu ulogu u formiranju okusa piva. Tako hlapljivu frakciju piva može činiti preko 800 različitih spojeva, a samo nekoliko desetaka tih spojeva mogu imati aktivnu ulogu u formiranju okusa tijekom konzumacije proizvoda. Ti spojevi mogu se svrstati u nekoliko kemijskih skupina uključujući estere, alkohole, masne kiseline, karbonilne i sumporne spojeve itd.<sup>11</sup>

#### 1.3.1. Viši alkoholi

Viši alkoholi nastaju tijekom procesa vrenja uz pomoć metabolizma kvasaca - kvasci uklanjaju amino skupine iz aminokiselina te ih zamjenjuju hidroksilnim skupinama iz alkohola. Ovi spojevi imaju veću molekularnu masu pa se nazivaju i fuzel ulja, a izazivaju glavobolju i nelagodu nakon pretjerane konzumacije piva.<sup>11</sup> Viši alkoholi mogu imati pozitivni i negativni utjecaj na aromu i okus alkoholnih pića, a najzastupljeniji među njima su alifatski alkoholi kao što su propanol, 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol te aromatski alkoholi  $\beta$ -feniletanol i benzil-alkohol. Ako su navedene komponente prisutne u koncentracijama višim od 300 mg/L piva, narušava se sensorika tj. pivo poprima oštar miris i okus. Povećana koncentracija izoamil-alkohola negativno utječe na pitkost piva jer okus postaje „teži“. Također, izobutil-alkohol ima nepoželjan učinak na kvalitetu piva ako njegova količina prelazi 20 % ukupne količine izoamil-alkohola, izobutil-alkohola i propanola. S druge strane, optimalna razina ovih komponenti pozitivno utječe na organoleptička obilježja piva.<sup>11</sup> Valja spomenuti i etilni alkohol (etanol) koji je, iako ne spada u grupu viših alkohola, najvažniji alkohol u pivu te mu koncentracija varira između 30 do 50 g/L.<sup>8</sup>

### 1.3.2. Esteri

Hlapljivi esteri odgovorni su za voćni karakter fermentiranih pića te zbog toga čine važnu skupinu aromatskih spojeva piva.<sup>12</sup> Nastaju tijekom alkoholnog vrenja kao rezultat metabolizma kvasaca te su produkt enzimski kataliziranih reakcija između acetil koenzima A i viših alkohola.<sup>11,12</sup> Soj kvasca može utjecati na količinu i vrstu proizvedenih estera u pivu pa tako divlji kvasci roda *Hansenula* i *Pichia* proizvode velike količine etil-acetata koji je zaslužan za tzv. “loše arome” piva.<sup>8</sup> Iako su esteri spojevi u tragovima, njihova prisutnost može imati sinergijski učinak na pojedinačne okuse piva. Najznačajniji esteri piva imaju različite arome pa tako izoamil-acetat ima voćnu aromu, fenil-etilacetat cvjetnu aromu te aromu po medu dok etil-kaproat ima aromu po kiseloj jabuci.<sup>11,12</sup> Esteri pivu daju puninu okusa iako njihova previsoka koncentracija može imati negativan utjecaj na kvalitetu piva budući da pretjerana voćna aroma nije privlačna većini potrošača.<sup>11</sup>

### 1.3.3. Karbonilni spojevi

Aldehidi su najznačajniji predstavnici karbonilnih spojeva u kemiji arome piva.<sup>13</sup> Iako se u pivu nalaze u niskim koncentracijama, iznimno su važni u formiranju organoleptike krajnjeg proizvoda.<sup>11</sup> Tako je povećanje njihove koncentracije u uskoj poveznici sa stvaranjem “odležanih okusa” u pivu.<sup>13</sup> Nekoliko ključnih puteva poput Maillardovih reakcija i oksidacije lipida te procesa fermentacije dovode do stvaranja niza aldehida odgovornih za okus piva, ali ostaje nejasno u kojoj se mjeri isti razvijaju nakon punjenja u boce.<sup>11,13</sup> Pretpostavlja se da tek formirani aldehidi tijekom procesa proizvodnje piva ostaju vezani na druge spojeve, ostajući neotkriveni senzorskim i instrumentalnim analizama te se tijekom vremena oslobađaju uzrokujući ustajali okus.<sup>13</sup> Glavni aldehid u pivu je acetaldehid (prisutan udjelom većim od 95 %) koji, ako se u pivu nalazi iznad graničnih vrijednosti, pridonosi neugodnom mirisu „po travi“.<sup>11,13</sup> Također, brojni drugi spojevi pridonose ustajalom okusu piva ako se nalaze u višim koncentracijama, a najpoznatiji među njima je (*E*)-non-2-enal uzrokujući okus „po kartonu“.<sup>13</sup> Ketoni, kao i aldehidi, pripadaju skupini karbonilnih spojeva, a najvažniji ketoni u pivu su diacetil (butan-2,3-dion) te srodni spoj pentan-2,3-dion.

Diacetil je najvažniji sastojak koji utječe na aromu piva. Iznad vrijednosti od 15 mg/L, pivu daje slatkasti, karamela okus koji odgovara aromi maslaca. Pentan-2,3-dion ima sličan učinak iznad koncentracije od 0,9 mg/L. Oba su spoja vrlo aromatična i nepoželjna u svjetlijem pivu.<sup>8</sup>

#### 1.3.4. Sumporni spojevi

Sumporni spojevi u pivu potječu iz sirovina, najčešće slada, ali mogu nastati i metabolizmom kvasaca kao i aktivnošću nepoželjnih mikroorganizama.<sup>8,13</sup> Zahvaljujući svojemu antimikrobnom i stabilizacijskom djelovanju, sumporni spojevi često se dodaju pivu u različitim oblicima prije pakiranja u boce. Djeluju kao antioksidansi, poboljšavajući stabilnost okusa piva, na način da inhibiraju lančane reakcije oksidacije hvatanjem slobodnih radikala, te kao antimikrobni agensi.<sup>13</sup> Najčešći hlapljivi spojevi sumpora prisutni u pivu su sumporov dioksid i sumporovodik, ali i niz drugih organskih sumpornih merkaptana (tioli) i organskih sulfida. Sirovine koje se koriste u proizvodnji piva mogu sadržavati različite količine sumporovog dioksida koji obično nestaje tijekom kuhanja sladovine, dok jedan dio obično nastaje za vrijeme fermentacije. Sumporovodik je spoj koji nastaje iz aminokiselina s pomoću kvasaca te je odgovoran za neugodan miris piva po pokvarenim jajima. Tijekom fermentacije ga iz sustava obično „izbacuje“ ugljikov dioksid koji se razvija. Dimetil sulfid je nusprodukt razgradnje *S*-metil-metionina i ima miris po svježem kukuruzu te nije u skladu s aromom piva. Merkaptani su tioalkoholi što znači da im je hidroksilna skupina zamijenjena tiolnom. Najvažniji je 3-metilbut-2-en-1-tiol koji doprinosi neugodnom okusu pri duljoj izloženosti piva suncu. Nastajanje ovog spoja u pivu je razlog zašto je isto pakirano u smeđe ili tamnozeleno staklene boce pružajući tako zaštitu od fotolize.<sup>8</sup>

## 1.4. Kvarenje piva

Pivo je mikrobiološki stabilno, široko konzumirano fermentirano piće proizvedeno uz pomoć slada, vode, kvasca i hmelja. U posljednje vrijeme raste interes za *craft* pivima pripremljenih od jedinstvenih sastojaka, bogatijeg okusa i arome. Shodno tome, masovna proizvodnja tzv. *lager* piva opada.<sup>14</sup> No bez obzira na vrstu, pivo predstavlja nepovoljan supstrat za rast i razvoj mikroorganizama i to zbog prisustva etanola (0,5-10% w/w), gorkih spojeva hmelja koji djeluju antimikrobno, niskog pH (3,8-4,7), niskog udjela kisika i hranjivih tvari te visokog udjela ugljikovog dioksida. Pojedine vrste bakterija i kvasaca, usprkos spomenutim uvjetima, mogu rasti u pivu i pokvariti ga pa se nazivaju mikroorganizmima kvarenja piva.<sup>14,15,16</sup> To je posebno izraženo kod *craft* piva koja nisu pasterizirana ili sterilno filtrirana.<sup>14</sup> Najpoznatiji mikroorganizmi kvarenja piva su bakterijski rodovi *Lactobacillus*, *Pectinatus*, *Pediococcus*, *Megasphaera* te divlji kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Dekkera* spp. Valja spomenuti kako su vodeći uzročnici kvarenja piva bakterije mliječne kiseline u koje se ubrajaju spomenuti rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Kvarenje piva bakterijama mliječne kiseline očituje se u promjeni boje piva, povećanom zamućenju te promjeni u okusu i to zbog nastanka novih spojeva poput diacetila i mliječne kiseline.<sup>14,15</sup> Izvori kontaminacije bakterijama mliječne kiseline su raznovrsni i mogu se pratiti od sirovina koje se koriste za preradu piva do samog okruženja pivovare. *Lactobacillus brevis* je najopsežnije proučavana bakterija mliječne kiseline u pivu. Razlog tomu je najveća stopa pronalaska iste u pokvarenom pivu. Njena sposobnost kvarenja piva varira ovisno o soju, a najčešće uzrokuje talog i zamućenje piva. *Lactobacillus lindneri* posebno je zanimljiv uzročnik kvarenja obzirom da se prisutnost iste uglavnom ne očitava na mikrobiološkim testovima kvalitete. Spomenuta bakterija je vrlo otporna na antimikrobne spojeve hmelja te tvori sediment i uzrokuje zamagljenost piva. *Pediococcus damnosus* je bakterija koju karakterizira stvaranje egzopolisaharida čineći pivo gustim i želatinoznim kao i stvaranje diacetila što doprinosi neugodnom okusu piva „po maslacu“. Rodovi *Pectinatus* i *Megasphaera* najčešće kontaminiraju pakirana piva s obzirom na to da su strogi anaerobi. Rod *Pectinatus* karakterizira stvaranje sumporovodika te posljedično, uzrokuje neugodan miris piva „po pokvarenim jajima“. Također, uzrokuje zamućenje piva i stvaranje sedimenta. Kontaminacija piva *Megasphaerom* ne očituje se toliko osjetilom vida koliko osjetilom okusa. Stvara

sumporovodik, maslačnu te kaprionsku kiselinu čime pivo postaje nepitko. Kombinirana kontaminacija piva bakterijama mliječne kiseline rodovima *Pectinatus* i *Megasphaera* također je moguća.<sup>15</sup> Divlji kvasci roda *Saccharomyces* također mijenjaju senzoriku piva zbog sposobnosti dekarboksilacije fenolnih kiselina, poput *trans*-cimetne, što uzrokuje neugodan okus piva.<sup>16</sup>

## 1.5. *Lambic* pivo

Vrlo stara pivarska tradicija Belgije nudi najraznovrsnija piva na svijetu među kojima se posebno ističe tzv. *lambic* pivo koje postaje sve popularnije diljem svijeta zahvaljujući svojoj osvježavajućoj kiselosti i voćnim notama. *Lambic* pivo proizvod je spontane fermentacije koja se odvija u drvenim bačvama i traje od jedne do tri godine nakon čega se pivo dorađuje i puni u boce. Proces karakterizira spontana inokulacija mikroorganizama iz okoliša poput enterobakterija, bakterija mliječne i octene kiseline te kvasaca.<sup>17,18</sup> Iako je ovakva vrsta spontane fermentacije moguća diljem svijeta, specifičan sastav mikroorganizama te genetička raznolikost unutar kvasaca iste vrste doprinosi jedinstvenosti finalnog okusa *lambic* piva. Kiselkasti karakter *lambic* piva pripisuje se divljim kvascima *Brettanomyces*, i to *B. bruxellensis* i *B. lambicus*. Samo ime ovih kvasaca ukazuje na porijeklo piva.<sup>19</sup> Naime, *lambic* piva tradicionalno se proizvode u krugu od 15 km od Bruxellesa uključujući i okolna poljoprivredna sela Payottenland i dolinu rijeke Senne zbog odgovarajuće mikrobne flore koju nalazimo samo na tom području.<sup>17,18,19</sup> Porijeklo imena *lambic* povezuje se s glagolom latinskog porijekla *lambere* što znači pijuckati, ali i s imenom sela Lembeek u Payottenlandu.<sup>17</sup> Tradicionalno se ova vrsta piva proizvodi od listopada do svibnja kako visoke temperature tijekom toplijih mjeseci ne bi negativno utjecale na proces fermentacije. Inokulacija sladovine lokalnom mikrobnom florom postiže se ostavljanjem vruće sladovine da se hladi preko noći u plitkoj i širokoj posudi te se sljedećeg jutra prebacuje u drvene bačve u kojoj se sladovina dodatno obogaćuje mikroorganizmima zaostalim u drvetu iz prethodne uporabe. Kombinirana aktivnost kvasaca i bakterija tijekom procesa spontane fermentacije u razdoblju od svega nekoliko mjeseci dovodi do stvaranja jedinstvene arome *lambic* piva. Počinje od tri do sedam dana nakon hlađenja sladovine razvojem *Kloeckera* kvasaca i



enterobakterija koji proizvode značajne količine octene kiseline. Nakon dva do tri tjedna ove organizme preplave kvasci *Saccharomyces cerevisiae* koji završe glavno alkoholno vrenje za tri do četiri mjeseca. Slijede ih bakterije mliječne kiseline *Pediococcus* i *Lactobacillus* uzrokujući veliki pad pH u sladovini zbog proizvodnje velike količine mliječne kiseline. Nakon pet do osam mjeseci u sladovini se pojavljuje nova populacija divljih kvasaca *Brettanomyces* koji *lambicu* daju pozitivne okusne karakteristike. *Brettanomyces* kvasci imaju nezamjenjivu ulogu u stvaranju spojeva arome *lambic* piva. Proizvode nekoliko hlapljivih fenolnih spojeva, masne kiseline te mnoge estere poput etil-acetata, etil-laktata i etil-kaprata koji je uglavnom odsutan u *lager* pivima.<sup>18</sup> *Lambici* različite starosti se zatim miješaju i pune u boce te na takav način nastaje *gueuze* - mješavina mladog i starog *lambic* piva. Slijedi sekundarna fermentacija koja se odvija u boci, slično kao u proizvodnji šampanjca. Osim *gueuze*, postoji još stilova *lambic* piva, a jedno od njih je i *faro* - pivo zaslađeno šećerom. Najpoznatiji voćni derivat *lambica* je zasigurno *kriek* koji se proizvodi maceracijom cijelih plodova trešanja s mješavinom mladih *lambica*. Prije kušanja *gueuzea* ili *krieka* važno je razumjeti da su neke senzorske karakteristike (pretjerana kiselost, trpkost, malo ili nimalo gorčine, puno voćne arome), koje se u drugim pivima smatraju nedostacima, izrazito poželjne u *lambic* pivu. Važnost *lambic* piva u svakodnevnom životu Belgijanaca očituje se kroz belgijsku umjetnost, književnost i gastronomiju. Belgijski kafići, često zvani *estaminets*, važan su dio *lambic* tradicije. Ispijanje piva poslije posla bila je i još je uvijek dobro razvijena navika Belgijanaca, a opravdava je bogata ponuda specijaliziranih belgijskih piva s više od 400 vrsta, koja osim domaćem stanovništvu, nudi jedinstven užitak i pivoljupcima diljem svijeta.<sup>17</sup>



Slika 4. Kafić u Belgiji<sup>20</sup>

## 1.6. Metode izolacije aroma *lambic* piva

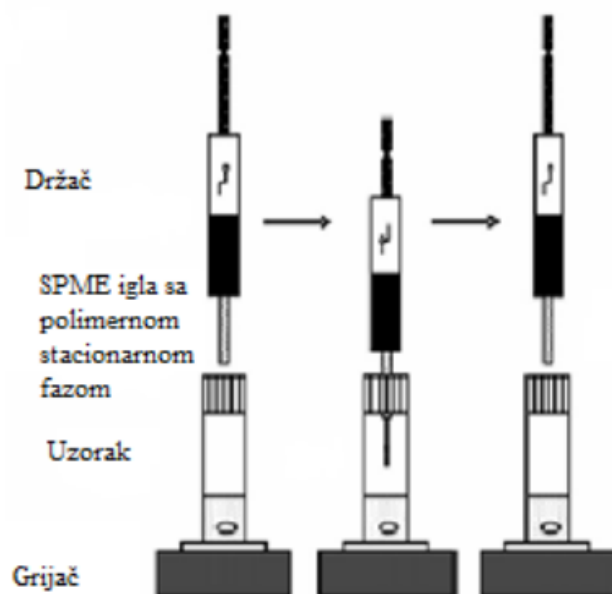
Odjeljivanje spojeva odgovornih za okus i miris proizvoda u njihovom izvornom obliku postiže se primjenom različitih tehnika izolacije. Razne su metode za koncentriranje i/ili ekstrakciju spojeva arome no kod svake postoji rizik od potencijalnog uništenja komponenti arome i/ili stvaranja artefakata. Upravo je zbog toga važno osigurati blage uvjete izolacije kako bi se očuvala izvorna aroma s minimalnim gubitcima te kako bi se izbjegla neželjena oksidacija, termalna degradacija, promjena pH vrijednosti te druge kemijske i biokemijske promjene. Vrlo je važno poznavanje uzorka te aromatskih spojeva koji se mogu očekivati kako bi se odabrala optimalna metoda izolacije.<sup>21</sup>

U ovom radu, arome *lambic* piva izolirane su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi s pomoću sivog vlakna te ekstrakcijom tekuće-tekuće.

### 1.6.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*; HS-SPME) jednostavna je, brza i točna metoda koja se u kombinaciji s plinskom kromatografijom i spektrometrijom mase (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*; GC-MS) razvila za analizu hlapljivih i poluhlapljivih organskih spojeva iz plinovitih, tekućih i krutih uzoraka, a zauzima vodeće mjesto među metodama mikroekstrakcije. Jednostavna aparatura za SPME metodu uključuje vlakna duljine od 1 do 2 cm koja se nalaze na nosaču te su prevučena odgovarajućim polimerima i zaštićena čeličnom iglom. Nakon što se uzorak stavi u bočicu, SPME igla probija gumenu membranu (septum), vlakno se produžuje u bočicu te nakon točno određenog vremena ponovno uvlači u iglu, a ekstrahirani spojevi desorbiraju i razdvajaju na kromatogramu. Temeljno načelo SPME metode temelji se na podjeli analita između vlakna i uzorka. Prijenos mase vođen je drugim zakonom termodinamike i počinje nakon uranjanja vlakna u tekući uzorak ili izlaganjem vlakna parama analita iznad uzorka (HS-SPME). Nakon ekstrakcije, kad se postigne ravnoteža, SPME vlakno se unosi u injektor kromatograma gdje se zbiva desorpcija analita s vlakna te daljnje odvajanje i analiza. Udio

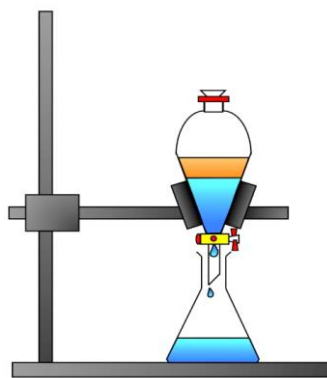
ekstrahiranih spojeva ovisi o vremenu trajanja ekstrakcije kao i o udjelu hlapljivih spojeva u uzroku. Prednosti ove metode su jednostavnost i brzina, osjetljivost, nekorištenje organskih otapala kao i linearni rezultati za širok raspon koncentracija i analita. Neki od nedostataka ove metode su relativno niska preporučena radna temperatura (240-280 °C), nestabilnost, lomljenje i ograničen vijek trajanja vlakana te niska učinkovitost ekstrakcije kod hlapljivih, polarnih i termički nestabilnih analita. U području analize hrane SPME metoda primjenjuje se za voće i povrće, masti i ulja, mliječne i mesne proizvode, vino i druga pića.<sup>22</sup>



**Slika 5.** Prikaz HS-SPME ekstrakcije<sup>23</sup>

## 1.6.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*) jednostavna je metoda prijenosa sastojaka iz jedne tekuće faze u drugu, pri čemu su ove faze u međusobnom kontaktu i nemješljive ili tek djelomično topljive jedna u drugoj. Ova se metoda često koristi za razdvajanje različitih komponenti iz tekuće smjese i to zbog njene jednostavnosti, relativno kratkog vremena separacije komponenti i niskih troškova korištenih kemikalija.<sup>24</sup> Izbor odgovarajućeg otapala ključan je korak za učinkovito odvajanje komponenti pomoću ekstrakcije tekuće-tekuće. Neki od kriterija za pravilan odabir otapala su njegova selektivnost, gustoća, toksičnost, kemijska i termička stabilnost, dostupnost i cijena. Organsko otapalo treba imati veći afinitet prema željenoj organskoj tvari u usporedbi s drugim otapalom, uglavnom vodom.<sup>25</sup> Često korištena organska otapala su benzen, kloroform, diklormetan, toluen itd.<sup>25,26</sup> Uobičajeno se ekstrakcija izvodi u lijevku za odjeljivanje (slika 6.), izmučivanjem smjese kako bi se kapljice raspršile iz jedne tekuće faze u drugu.<sup>26</sup> Prijelaz tvari odvija se na dodirnoj površini između tekućih faza i rezultat je termodinamičke sile u obliku razlike u kemijskom ili elektrokemijskom potencijalu kemijskih vrsta.<sup>26,27</sup> Da bi ekstrakcija bila što uspješnija potrebno je što više povećati međufaznu površinu, a to se postiže upravo mehaničkim miješanjem.<sup>27</sup> Ekstrakcija tekuće-tekuće klasična je metoda za pročišćavanje proizvoda i primjenjuje se u mnogim industrijama poput prehrambene, farmaceutske i kemijske. Obično se koristi kad druge metode separacije poput destilacije i kristalizacije nisu moguće.<sup>27</sup>



**Slika 6.** Klasična aparatura za ekstrakciju tekuće-tekuće<sup>28</sup>

## 1.7. Instrumentalna analiza aroma *lambic* piva

Nakon izolacije aroma *lambic* piva primjenjuje se analiza i identifikacija istih. U ovom radu za analizu je korištena metoda plinske kromatografije - spektrometrije masa (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS).

### 1.7.1. Plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija često je korištena tehnika separacije u kojoj se smjesa nošena pokretnom fazom razdvaja putujući po selektivnoj stacionarnoj fazi. Uključuje isparavanje uzorka i njegovo ubrizgavanje u injektor kromatografske kolone. Uzorak se kroz kolonu prenosi mobilnom fazom-strujom inertnog plina. Kolona sadrži i stacionarnu fazu koja je adsorbirana na površini krutine. Ova metoda ima široku primjenu u pročišćavanju spojeva te kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi smjesa. Plinska kromatografija predstavlja nezamjenjiv alat u području kemije i to zbog svoje jednostavnosti, osjetljivosti i učinkovitosti.<sup>29</sup>

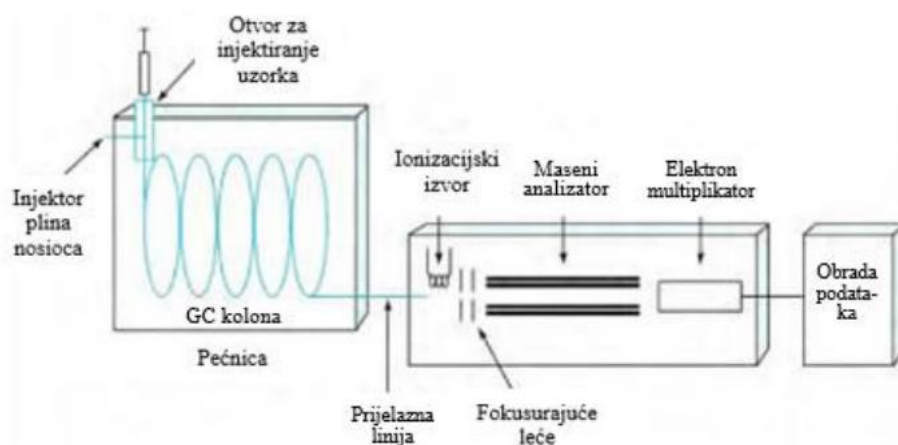
Masena spektrometrija temeljena je na ionizaciji spojeva. Ako se komponente razdvojene kromatografijom ili dobivene u čistom obliku nekom drugom metodom, ubrizgaju u vakuum komoru, razbijaju se strujom elektrona u fragmente odnosno ione. Raznim fragmentima je moguće analizom utvrditi molekulsku masu.<sup>30</sup>

Uzimajući u obzir moć razdvajanja kromatografije i moć identifikacije masene spektrometrije, izravna kombinacija ove dvije tehnike pruža nam nevjerojatnu sposobnost prepoznavanja svih komponenti složenih smjesa, čak i kad su iste prisutne u količinama poput  $10^{-12}$  g. Smjese mogu dolaziti iz svih aspekata ljudske aktivnosti: hrane, okoliša, industrije itd.<sup>30</sup>

Aparatura za provedbu plinske kromatografije-masene spektrometrije sastoji se od plinskog kromatografa, opremljenog kapilarnom kolonom i spojenog na spektrometar mase (slika 7.). Plinski kromatograf razdvaja kemijske spojeve u smjesi na temelju njihove hlapljivosti i interakcije sa stacionarnom fazom. Mogućnost razdvajanja komponenata uzorka ovisi, između ostalog, o prirodi stacionarne faze stupca. Iz tog razloga, komercijalno su dostupne

različite faze kapilarnih stupaca koje pružaju specifične interakcije analita i stacionarne faze. Za razdvajanje nepolarnih spojeva koristi se nepolarni stupac dok se za analizu polarnih spojeva koriste polarni stupci. Spektrometar mase mjeri omjer mase i naboja iona, pružajući informacije o molekulskoj masi spojeva. Temelji se na ionskom izvoru koji radi snopom elektrona od 70 eV. Identifikacija se olakšava usporedbom dobivenih masenih spektara s referentnim masenim spektrima čistih spojeva pohranjenih u posebnim MS knjižnicama i bazama podataka. Međutim, identifikacija komponenti u složenim smjesama može postati izazovna kada se komponente ubrizgane smjese nisu potpuno razdvojile što se očituje kao preklapajući vrhovi u plinskom kromatogramu. Ipak, identifikacija je i dalje moguća pomoću postupka obrade GC-MS podataka koji je implementiran u nekoliko računalnih programa.<sup>31</sup>

Hrana i piće sadrže mnoge aromatske spojeve prisutne u izvornom obliku ili nastale tijekom obrade. GC-MS se koristi u njihovoj analizi, ali i za detekciju i mjerenje kontaminanata u hrani i piću kao i različitih znakova kvarenja i patvorenja. Koristi se u analizi brojnih spojeva poput piperina i mentola, kao i u detekciji spojeva kvarenja *lambic* piva korištenog za potrebe ovog diplomskog rada.<sup>29</sup>



**Slika 7.** Shematski prikaz rada GC-MS uređaja<sup>23</sup>



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Opis uzoraka

U sklopu ovog istraživanja, korišteni su uzorci piva koji su prvotno upotrebljavani u veljači 2023. godine, u svrhu drugog diplomskog rada. Ti uzorci ponovno su uporabljeni četiri mjeseca poslije, tijekom lipnja, za potrebe ovog eksperimentalnog rada. Do analiza uzorci su bili obloženi parafinom i pohranjeni u laboratorijskom hladnjaku na temperaturi od + 4°C do + 8°C.

#### 2.1.1. *Lambic* pivo s okusom breskve (uzorak 101)

*Lambic* pivo s okusom breskve, zlatne boje, proizvedeno je iz mladog *lambic* piva (starog barem jednu godinu) u kojem je macerirano 30% svježih filtriranih breskvi. Voćno pivo je punog i svježeg okusa, dobro uravnoteženo između karakteristične kiselosti *lambica* i slatkog okusa breskve. Sadrži 2,5% alkohola i puni se u boce od 375 mL. Najbolje je poslužiti ga hladno (temperature 2-3 °C). Odlično se slaže s kozjim sirom, salatama, desertima poput palačinki ili belgijskih vafli, te mesnim jelima kao što je karamelizirana svinjetina i piletina na žaru.<sup>32</sup>

#### 2.1.2. *Lambic* pivo s okusom jabuke (uzorak 202)

*Lambic* pivo s okusom jabuke, zlatne boje meda s bijelom pjenom, proizvedeno je miješanjem soka od nekoliko sorti jabuka s mladim *lambic* pivom starim barem jednu godinu. Voćno pivo, s početno ostrim i punim okusom, se u kombinaciji sa slatkoćom crvenih jabuka i svježinom zelenih jabuka stapa u slatko-kiselkastu ravnotežu svojstvenu *lambicima*. Sadrži 3,5% alkohola i puni se u boce od 375 mL. Poslužuje se hladno (temperature 2-3 °C) te se dobro slaže s raznim salatama i francuskim jelom *Foie gras*.<sup>32</sup>



### 2.1.3. *Lambic* pivo s okusom maline (uzorak 303)

*Lambic* pivo s okusom maline, tamno roze boje sa svijetlo rozom pjenom, proizvedeno je iz mladog *lambic* piva (starog barem jednu godinu) u kojeg se macerira najmanje 30% svježe filtrirane maline. Tijekom kušanja piva ističe se aroma maline s naznakom karamele, praćena blago kiselkastim završetkom tipičnim za *lambic* piva. Sadrži 2,5% alkohola i puni se u boce od 375 mL. Poslužuje se hladno (temperature 2-3 °C) te se najčešće slaže s desertima poput čokoladne torte, sladoleda i tortom od sira.<sup>32</sup>



Slika 8. Uzorci *lambic* piva

## 2.2. Eksperiment – izolacija i analiza aroma *lambic* piva

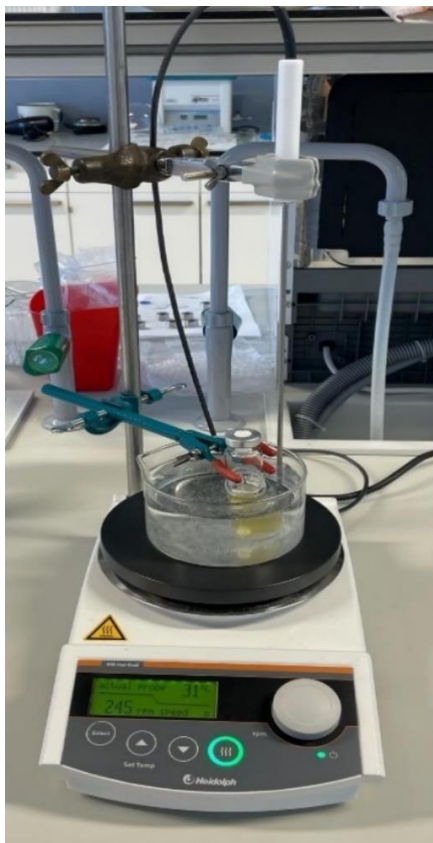
Arome iz tri uzorka *lambic* piva izolirane su dvjema različitim metodama izolacije i to mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi pomoću sivog vlakna i ekstrakcijom tekuće-tekuće. Nakon izolacije, proveda se analiza aroma i to uz pomoć vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

### 2.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Izolacija aroma iz tri uzorka *lambic* piva HS-SPME metodom provedena je uporabom sivog vlakna, dužine 5 cm, s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., SAD).

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi provedena je na uzorcima od 1 mL piva pri čemu se svaki uzorak prelio u staklenu posudu zapremnine 15 mL koja je zatim hermetički zatvorena teflonskom septom. Staklena posuda se zatim stavila u vodenu kupelj prethodno zagrijanu na 60 °C. Kupelj ima termostat (Heidolph EKT 3001) radi održavanja konstantne temperature. Sadržaj u posudi se miješao pomoću magnetske miješalice (Heidolph MR Her Standard) koja može raditi u rasponu brzina od 100 do 1 400 okr/min. Na slici 9. prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Prema uputama proizvođača (Supelco Co., SAD) sivo vlakno se aktivira kondicioniranjem tijekom 60 minuta na temperaturi od 270 °C te se koristi za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Uzorak je kondicioniran 15 minuta, a potom je HS-SPME igla postavljena u posudu. Provedena je ekstrakcija vršnih para pomoću vlakna u trajanju od 45 minuta uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka *lambic* piva (1000 okr/min). Nakon uzorkovanja, HS-SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min) gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.



**Slika 9.** Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi

### 2.2.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija aroma iz uzoraka *lambic* piva provedena je diskontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće koristeći organsko otapalo diklormetan te smjesu organskih otapala pentan:dietil-eter (1:2, v/v).

U Erlenmeyerovu tikvicu stavljeno je 20 mL uzorka voćnog piva, 60 mL smjese otapala pentan:dietil-eter u omjeru 1:2, dvije žličice kuhinjske soli (NaCl) i magnet. Erlenmeyerova tikvica postavljena je na magnetsku miješalicu, u kupelj na hladno kako bi se spriječilo stvaranje emulzije, a broj okretaja podešen je na 200 okr/min. Ekstrakcija je provedena na sobnoj temperaturi, a sam postupak ekstrakcije trajao je 45 min.

Završetkom ekstrakcije tekuće-tekuće smjese je ostavljena nekoliko minuta kako bi se slojevi odvojili. U gornjem dijelu smjese izdvojio se ekstrakt pentana i dietil-etera što predstavlja organski sloj, dok se u donjem dijelu izdvojio vodeni sloj. Organski sloj kapaljkom je odijeljen od vodenog sloja i filtriran preko vate na koju je prethodno stavljeno sredstvo za sušenje- bezvodni natrijev sulfat ( $\text{NaSO}_4$ ) te je na takav način iz organskog sloja uklonjen ostatak vode.

Cijeli postupak ekstrakcije ponovljen je još jednom za sve uzroke, ali koristeći organsko otapalo diklormetan volumena 50 mL.

### 2.2.3. GC-MS analiza aroma

Kvalitativna i kvantitativna analiza spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa koristeći plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo (slika 10.).



**Slika 10.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Separacija i analiza sastojaka provedena je s pomoću kolone s nepolarnom stacionarnom fazom HP-5MS, proizvođača Agilent Technologies. Kolona je duga 30 m i široka 0,25 mm, sa slojem stacionarne faze, kemijskog sastava 5 % difenil - 95 % dimetilpolisiloksan, debljine 0,2  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj, u ovom slučaju helij, prolazi kroz kolonu s hlapljivim spojevima pri protoku od 1 mL/min. Omjer cijepanja je 1:50. Volumen injektiranog uzorka iznosi 1  $\mu\text{L}$ , a temperatura injektora 250 °C. Kao detektor upotrijebljen je spektrometar masa čija temperatura iznosi 230 °C. Energija ionizacija uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV.

Identifikacija pojedinih spojeva provedena je usporedbom njihovih retencijskih vremena s vremenima zadržavanja već poznatih tvari iz smjesa hlapljivih spojeva prethodno analiziranih GC-MS sustavom, kao i uspoređujući njihove masene spektre sa spektrima iz biblioteke masenih spektara Wiley 09 (Wiley MS library) i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD).

Za svaki analizirani uzorak kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podatci:

- kromatogram ukupne ionske struje- graf koji vizualizira varijacije intenziteta ionskog signala u ovisnosti o vremenu tijekom analize,
- retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja pojedinog kemijskog spoja koje je na kromatogramu predstavljeno pikom,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postocima što omogućuje kvantifikaciju prisutnih spojeva i procjenu njihove koncentracije,
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje što omogućuje identifikaciju spojeva.

Navedeni podatci sinergijski doprinose cjelovitoj analizi s pomoću metode plinske kromatografije-spektrometrije masa pružajući osnovu za preciznu identifikaciju, kvantifikaciju i karakterizaciju spojeva u analiziranom uzorku.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Rezultati mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi uz upotrebu sivog vlakna

**Tablica 1.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od breskve

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	butan-2,3-dion (diacetil)	21,36
2.	<900	2-metil-butanoat	0,14
3.	<900	etil-butanoat	0,28
4.	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	2,09
5.	<900	2-furankarboksialdehid	3,93
6.	<900	heks-3-en-1-ol	0,38
7.	<900	heksan-1-ol	1,44
8.	<900	3-metil-but-1-ol-acetat	3,29
9.	965	benzaldehid	0,23
10.	976	heksanska kiselina	1,23
11.	996	etil-heksanoat	1,65
12.	1101	linalol	6,95
13.	1105	nonanal	0,51
14.	1116	2-feniletanol*	23,33
15.	1170	4-etilfenol	0,80
16.	1174	oktanska kiselina	8,14
17.	1194	$\alpha$ -terpineol	4,55
18.	1198	etil-oktanoat	3,07
19.	1207	dekanal	0,38
20.	1256	2-feniletal-acetat	3,43
21.	1277	2-metoksibenzil-alkohol	8,36
22.	1397	etil-dekanoat	0,36
23.	1500	pentadekan	0,27
24.	1571	5-heptil-dihidrofuran-2(3H)-on	1,40
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>97,57%</i></b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od jabuke

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	butan-2,3-dion (diacetil)	14,59
2.	<900	etil-butanoat	0,63
3.	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	2,93
4.	<900	2-furankarboksialdehid	2,09
5.	<900	etil-2-metilbutanoat	6,44
6.	<900	heks-3-en-1-ol	0,71
7.	<900	heks-1-ol	15,11
8.	<900	3-metil-but-1-ol-acetat	1,64
9.	965	benzaldehyd	3,04
10.	976	heksanska kiselina	1,24
11.	995	butil-butanoat	0,84
12.	996	etil-heksanoat	0,53
13.	1008	heks-3-enil-acetat	1,89
14.	1074	oktan-1-ol	0,31
15.	1105	nonanal	1,05
16.	1116	2-feniletanol*	20,80
17.	1170	4-etilfenol	0,41
18.	1173	etil-benzoat	0,34
19.	1174	oktanska kielina	6,64
20.	1198	etil-oktanoat	0,94
21.	1207	dekanal	0,56
22.	1256	2-feniletal-acetat	1,34
23.	1273	nonanska kiselina*	1,48
24.	1277	2-metoksibenzil-alkohol	4,47
25.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	6,53
26.	1400	tetradekan	0,42
27.	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3 <i>H</i> )-on	1,46
28.	1500	pentadekan	0,81
29.	1600	heksadekan	0,30
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>99,54%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

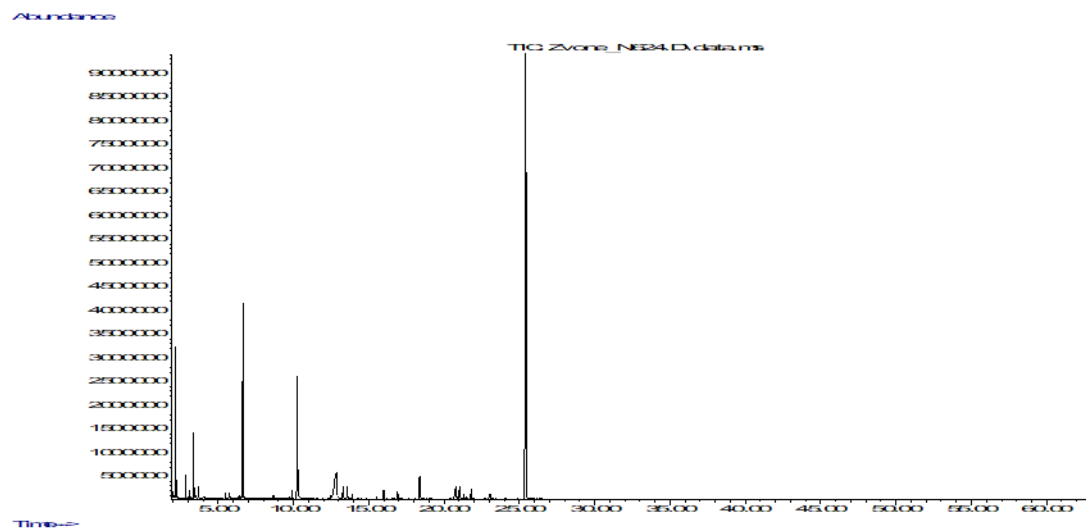
**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od maline

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	butan-2,3-dion (diacetil)	5,92
2.	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	0,91
3.	<900	2-furankarboksialdehid	0,62
4.	<900	heks-3-en-1-ol	2,85
5.	<900	3-metil-but-1-ol-acetat	0,70
6.	965	benzaldehid	0,33
7.	974	heksanska kiselina	0,45
8.	996	etil-heksanoat	0,20
9.	1008	heks-3-enil-acetat	11,76
10.	1074	oktan-1-ol	0,35
11.	1101	linalol	0,19
12.	1105	nonanal	0,59
13.	1116	2-feniletanol*	9,76
14.	1174	oktanska kiselina	7,30
15.	1194	$\alpha$ -terpineol	0,99
16.	1198	etil-oktanoat	0,92
17.	1200	dekanal	0,37
18.	1256	2-feniletil-acetat	1,05
19.	1277	2-metoksibenzil-alkohol	0,65
20.	1382	dekanska kiselina*	1,97
21.	1388	<i>trans</i> - $\beta$ -damascenon	0,39
22.	1397	etil-dekanoat	0,83
23.	1485	$\beta$ -jonon	45,49
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>94,59%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja





**Slika 11.** Reprezentativni kromatogram uzorka *lambic* piva od maline izoliranog pomoću HS-SPME

3.2. Rezultati ekstrakcije tekuće-tekuće uz upotrebu smjese otapala pentan:dietil-eter (1:2)

**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od breskve

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	49,63
2.	974	heksanska kiselina	0,34
3.	1035	limonen	0,37
4.	1070	2-furankarboksilna kiselina	4,72
5.	1116	2-feniletanol*	18,34
6.	1162	benzojeva kiselina	0,37
7.	1170	4-etilfenol	0,22
8.	1182	terpinen-4-ol	3,46
9.	1189	5-hidroksimaltol	0,25
10.	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	1,42
11.	1260	geraniol	3,83
12.	1277	2-metoksibenzil-alkohol	0,68
13.	1284	2-hidroksisukcinska kiselina (jabučna kiselina)	0,37
14.	1382	dekanska kiselina	0,24
15.	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	7,82
16.	1571	5-heptil-dihidrofuran-2(3 <i>H</i> )-on	0,56
17.	1749	1 <i>H</i> -indol-3-etanol	2,32
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>94,94%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

**Tablica 5.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od jabuke

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	heks-3-en-1-ol	5,41
<b>2.</b>	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	41,12
<b>3.</b>	1035	limonen	0,47
<b>4.</b>	1112	maltol	0,34
<b>5.</b>	1116	2-feniletanol*	10,35
<b>6.</b>	1219	4-vinilfenol	0,81
<b>7.</b>	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	1,24
<b>8.</b>	1260	geraniol	3,56
<b>9.</b>	1284	2-hidroksisukcinska kiselina (jabučna kiselina)	4,38
<b>10.</b>	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	24,19
<b>11.</b>	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3 <i>H</i> )-on	0,48
<b>12.</b>	1749	1 <i>H</i> -indol-3-etanol	0,75
<b>13.</b>	2182	oktadekanska kiselina	0,22
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>93,32%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

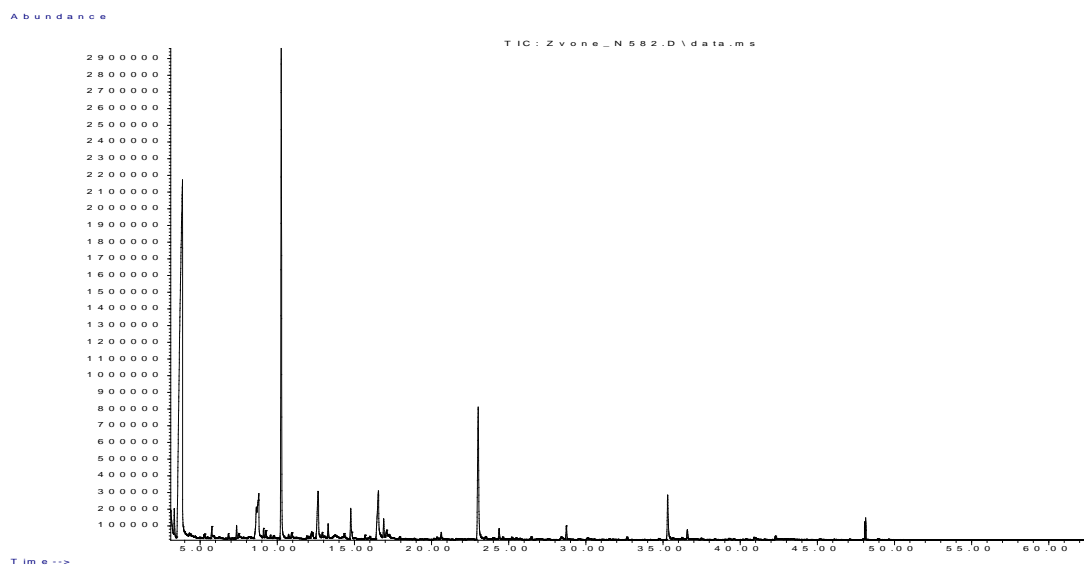
\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

**Tablica 6.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od maline

<b>Red. Broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	heks-3-en-1-ol	3,24
<b>2.</b>	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	54,24
<b>3.</b>	974	heksanska kiselina	0,36
<b>4.</b>	1007	heks-3-en-1-ol-acetat	0,43
<b>5.</b>	1035	limonen	0,57
<b>6.</b>	1037	benzil-alkohol	0,36
<b>7.</b>	1070	2-furankarboksilna kiselina	2,50
<b>8.</b>	1116	2-feniletanol*	18,07
<b>9.</b>	1162	benzojeva kiselina	2,23
<b>10.</b>	1177	terpinen-4-ol	3,47
<b>11.</b>	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	0,11
<b>12.</b>	1251	2-feniloctena kiselina*	0,20
<b>13.</b>	1294	4-metoksibenzil-alkohol (anisil-alkohol)	2,37
<b>14.</b>	1379	dekanska kiselina	0,29
<b>15.</b>	1397	4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid (vanilin)	0,19
<b>16.</b>	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	3,90
<b>17.</b>	1485	$\beta$ -jonon	1,05
<b>18.</b>	1963	heksadekanska kiselina*	0,32
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>93,90%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



**Slika 12.** Reprezentativni kromatogram uzorka *lambic* piva od breskve izoliranog pomoću smjese pentan:dietil-eter (1:2, v/v)

### 3.3. Rezultati ekstrakcije tekuće-tekuće uz upotrebu organskog otapala diklormetana

**Tablica 7.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od breskve

<b>Red. Broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	10,94
<b>2.</b>	1070	2-furankarboksilna kiselina	1,29
<b>3.</b>	1116	2-feniletanol*	6,96
<b>4.</b>	1173	etil-benzoat	4,02
<b>5.</b>	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	2,19
<b>6.</b>	1284	2-hidroksisukcinska kiselina (jabučna kiselina)	0,64
<b>7.</b>	1362	eugenol	3,16
<b>8.</b>	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	9,83
<b>9.</b>	1443	4-metoksibenzaldehid ( <i>p</i> -anisaldehid)	1,18
<b>10.</b>	1525	2,4-di(1,1-dimetiletil)fenol	0,55
<b>11.</b>	1749	1 <i>H</i> -indol-3-etanol	2,07
<b>12.</b>	1808	4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-okso-but-1-enil)-cikloheks-2-en-1-on	1,17
<b>13.</b>	1856	kofein	49,44
<b>14.</b>	2400	tetrakosan	2,15
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>95,59%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

**Tablica 8.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od jabuke

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	6,83
<b>2.</b>	1116	2-feniletanol*	12,02
<b>3.</b>	1219	4-vinilfenol	0,81
<b>4.</b>	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	2,50
<b>5.</b>	1284	2-hidroksisukcinska kiselina (jabučna kiselina)	3,76
<b>6.</b>	1314	4-vinil-2-metoksifenol	1,59
<b>7.</b>	1362	eugenol	3,97
<b>8.</b>	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	6,87
<b>9.</b>	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3 <i>H</i> )-on	0,83
<b>10.</b>	1749	1 <i>H</i> -indol-3-etanol	1,30
<b>11.</b>	1856	kofein	41,44
<b>12.</b>	2400	tetrakosan	7,84
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>89,76%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

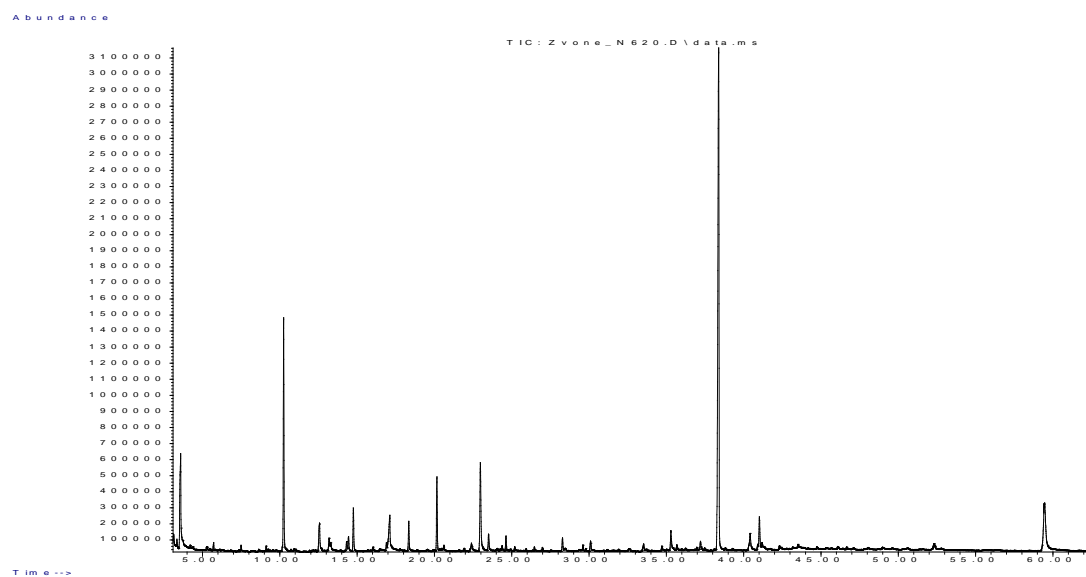
**Tablica 9.** Kemijski sastav i udio aroma *lambic* piva od maline

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	heks-3-en-1-ol	1,14
<b>2.</b>	<900	2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina)	4,30
<b>3.</b>	1037	benzil-alkohol	0,52
<b>4.</b>	1116	2-feniletanol*	9,72
<b>5.</b>	1162	benzojeva kiselina	1,67
<b>6.</b>	1219	4-vinilfenol	2,99
<b>7.</b>	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	1,81
<b>8.</b>	1294	4-metoksibenzil-alkohol (anisil-alkohol)	1,41
<b>9.</b>	1314	4-vinil-2-metoksifenol	2,43
<b>10.</b>	1362	eugenol	3,85
<b>11.</b>	1425	4-hidroksibenzil-alkohol	5,24
<b>12.</b>	1485	$\beta$ -jonon	0,95
<b>13.</b>	1554	4-(4-hidroksifenil)-buta-2-on (malina keton)	0,46
<b>14.</b>	1749	1 <i>H</i> -indol-3-etanol	1,30
<b>15.</b>	1856	kofein	55,32
<b>16.</b>	2400	tetrakosan	0,46
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>93,57%</b>

**RI** = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja





**Slika 13.** Reprezentativni kromatogram uzorka *lambic* piva od jabuke izoliranog pomoću diklormetana



## 4. RASPRAVA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je izolirati i identificirati arome kvarenja *lambic* piva. Iste su izolirane metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi uz pomoć sivog vlakna te ekstrakcijom tekuće-tekuće uz korištenje dvaju otapala: smjese organskih otapala pentan:dietil-eter (1:2, v/v) te diklormetana. Nakon izolacije, spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa te su rezultati prikazani u tablicama. Za korištene metode prikazani su i reprezentativni kromatogrami uzoraka.

Metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi uz upotrebu sivog vlakna, izolirani spojevi *lambic* piva s okusom breskve prikazani su u tablici 1. U uzorku je identificirano 24 spoja koji čine 97,57% ukupnih spojeva u uzorku. U uzorku prevladava 2-feniletanol (23,33%), -viši alkohol koji pivu daje aromu po ruži<sup>8,11</sup>, slijedi butan-2,3-dion (21,36%), zatim 2-metoksibenzil-alkohol (8,36%) i oktanska kiselina (8,14%) koja pivu daje aromu koja podsjeća na miris i okus kozjeg mlijeka<sup>8</sup>. U uzorku je prisutan i linalol (6,95%) – organski spoj koji pivu daje cvjetnu aromu.<sup>33</sup> U manjim količinama potvrđeni su i esteri etil-butanoat (0,28%), etil-heksanoat (1,65%) i etil-oktanoat (3,07%) koji pridonose poželjnim, voćnim karakteristikama piva ako se nalaze u optimalnim razinama.<sup>8,34</sup> Etil-oktanoat (3,07%) i etil-dekaonoat (0,36%) tradicionalno se nalaze u *lambic* pivu i smatraju se spojevima koji daju tipičnu aromu *lambicu*.<sup>34</sup> Zanimljiva je i prisutnost 2-hidroksipropionske (mliječne) kiseline (2,09%) koja je pokazatelj „kvarenja piva“ uz prisustvo bakterija mliječne kiseline.<sup>14</sup> Međutim, u proizvodnji nekih stilova piva, poput kiselog piva (*lambic*), mliječna kiselina se namjerno dodaje. Najčešće je prirodno proizvedena djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Ove bakterije fermentiraju šećere u kiseline, za razliku od većine kvasaca, koji fermentiraju šećer u etanol.<sup>17,35</sup> Malolaktička fermentacija, koju provode ove bakterije, će biti sporija kod nižih temperatura, čime se povećava proizvodnja butan-2,3-diona (diacetila). S druge strane, proizvodnja octene kiseline raste s brzinom malolaktičke fermentacije.<sup>36</sup> Korišteni uzorci su bili otvoreni u razdoblju od četiri mjeseca te su čuvani u hladnjaku od +4°C do +8°C te je moguća povećana koncentracija butan-2,3-diona.

Na isti način izolirano je i 29 spojeva *lambic* piva s okusom jabuke što čini 99,54% ukupnih spojeva u uzorku kao što je i prikazano u tablici 2. 2-Feniletanol je spoj s najvećim udjelom od 20,8%. Slijede ga heks-1-ol (15,11%) i butan-2,3-dion (14,59%). Postotak mliječne

kiseline u ovom uzorku iznosi 2,93%. U uzorku je potvrđena i prisutnost aldehida nonanala (1,05%) i dekanala (0,56%).

Tablica 3. prikazuje aromatski profil piva s okusom maline dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi. Ukupni broj izoliranih spojeva iznosi 23 što čini 94,59% ukupnih spojeva u uzorku. Najzastupljeniji je  $\beta$ -jonon koji čini gotovo polovicu (45,49%) od ukupnog udjela spojeva u uzorku. To je mirisni spoj koji se često koristi u industriji parfema zbog svojega tipičnog mirisa ljubičice. Prisutan je u mnogim biljkama, voću i povrću.<sup>37</sup> Slijede heks-3-enil-acetat (11,76%), 2-feniletanol (9,76%), oktanska kiselina (7,3%) i butan-2,3-dion (5,92%). Ostali spojevi u uzorku prisutni su u udjelu manjem od 5,92%.

Metodom ekstrakcije tekuće-tekuće uz pomoć otapala pentan:dietil-eter (1:2, v/v) izolirano je 17 spojeva iz uzorka piva s okusom breskve što čini 94,94% ukupnih spojeva u uzorku. Dominira mliječna kiselina koja čini gotovo polovicu hlapljivih spojeva u uzorku (49,63%). Ovaj rezultat je očekivan, budući da je mliječna kiselina potpuno topljiva u dietil-eteru i drugim organskim otapalima koja se miješaju s vodom.<sup>38</sup> Slijede 2-feniletanol (18,34%) i 4-hidroksibenzil alkohol (7,82%). Ostali spojevi nalaze se u nižim koncentracijama, ali valja spomenuti 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), aldehyd koji je također detektiran u uzorku (1,42%), a pivu daje okus po zagorjelom<sup>4</sup>. Prisutna je i 2-hidroksisukcinska kiselina (jabučna) (0,37%) koju bakterije mliječne kiseline kao i neki kvasci razgrađuju do mliječne kiseline te benzojeva kiselina s istim udjelom od 0,37%. Benzojeva kiselina pripada skupini fenolnih kiselina koju divlji kvasci dekarboksiliraju stvarajući neugodnu aromu piva.<sup>16</sup>

Ekstrakcijom tekuće-tekuće uz pomoć iste smjese otapala izolirano je 13 spojeva arome čineći značajan postotak od 93,32% ukupnih spojeva koji se nalaze u uzorku piva s okusom jabuke (tablica 5.). U uzorku dominira mliječna kiselina (41,12%), zatim 4-hidroksibenzil alkohol (24,19%), 2-feniletanol (10,35%), heks-3-en-1-ol (5,41%). Uz to su zabilježeni i drugi spojevi poput 5-HMF (1,24%), jabučne kiseline (4,38%) i geraniola (3,56%). Geraniol je spoj koji potječe iz hmelja, a pivu daje cvjetnu aromu.<sup>33</sup>

U tablici 6. prikazano je 18 spojeva koji čine 93,9% ukupnih spojeva u uzorku piva s okusom maline. Mliječna kiselina (54,24%) je najzastupljeniji spoj u uzorku. Slijedeći spojevi s većim udjelom su: 2-feniletanol (18,07%), 4-hidroksibenzil alkohol (3,9%), terpinen-4-ol (3,47%) i  $\beta$ -jonon (1,05%) koji je karakterističan spoj ploda maline.

Ekstrakcijom tekuće-tekuće uz upotrebu diklormetana, izolirano je 14 spojeva koji čine 95,59% ukupnih spojeva uzorka piva s okusom breskve (tablica 7.). Najdominantniji spoj jest kofein koji se pojavio u količini od 49,44%. Prisutnost kofeina u pivu rezultat je procesa proizvodnje piva. Proizvodnja piva podrazumijeva četiri osnovna sastojka - vodu, slad, hmelj i kvasac. Upravo hmelj, koji pivu daje gorčinu, u svom sastavu sadrži ksantohumol, spoj koji djeluje kao prekursor kofeina. Procesom kuhanja ksantohumol se transformira u kofein.<sup>40</sup> Mliječna kiselina se također nalazi u većem postotku (10,94%), a slijedi 4-hidroksibenzil-alkohol (9,83%) te 2-feniletanol (6,96%). Ostali spojevi u uzorku se nalaze u manjim količinama.

Tablica 8. prikazuje 12 spojeva arome izoliranih iz uzorka piva s okusom jabuke i to ekstrakcijom tekuće-tekuće uz diklormetan kao otapalo. I ovdje dominantan spoj je kofein s najvećim postotkom zastupljenosti od 41,44%. Uz kofein ostali prisutni spojevi su: 2-feniletanol (12,02%), tetrakosan (7,84%), 4-hidroksibenzil alkohol (6,87%), mliječna (6,83%) i jabučna kiselina (3,76%), te 5-HMF (2,5%).

Rezultati ekstrakcije tekuće-tekuće uz upotrebu diklormetana kao otapala otkrili su 16 spojeva čineći značajnih 93,57% ukupnih spojeva u uzorku piva s okusom maline (tablica 9.). Vidljivo je kako više od polovice spojeva otpada na kofein (55,32%), a ostali spojevi su: 2-feniletanol (9,72%), 4-hidroksibenzil alkohol (5,24%), mliječnu kiselinu (4,3%), eugenol (3,85%), 4-vinilfenol (2,99%), 4-vinil-2-metoksifenol (2,43%) te ostali spojevi prisutni u manjoj količini. Spoj 4-(4-hidroksifenil)-butan-2-on, odnosno malina keton koji se u uzorku pojavljuje u niskom postotku od 0,17%, karakterističan je za aromu ploda maline. Osim u malini, nalazi se i u drugim voćkama poput breskve, grožđa i jabuke.<sup>41</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu provedeno je ispitivanje aroma *lambic* piva s posebnim naglaskom na one koji se mogu pojaviti kao potencijalni produkti njegovog kvarenja. Na temelju provedenog istraživanja i analize mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Dobiveni rezultati pokazuju veliku raznovrsnost identificiranih aromatskih spojeva ovisno o korištenoj metodi izolacije.
- Proučavajući svaku metodu izolacije zasebno vidljive su određene sličnosti u izoliranim aromama između uzoraka (najzastupljenije skupine izoliranih spojeva pripadaju alkoholima, kiselinama, aldehidima, ketonima, esterima i fenolima, a 2-feniletanol – viši alkohol koji pridonosi pozitivnim karakteristikama piva svojom slatkastom aromom po ruži, pojavljuje se u svakom ispitivanom uzorku korištenjem bilo koje od navedenih metoda izolacije).
- Uočene razlike u aromatskom profilu mogu se objasniti različitim recepturama proizvođača kao i različitim čimbenicima proizvodnog procesa.
- Mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi uz upotrebu sivog vlakna izoliran je najveći broj spojeva (29) što predstavlja i najviši udio spojeva iz ispitivanih uzoraka (99,54%) i to iz uzorka piva s okusom jabuke.
- Ekstrakcijom tekuće-tekuće izolirani su spojevi za koje se smatra da pridonose neželjenim senzorskim karakteristikama piva ukoliko se nalaze u prekomjernim količinama, a to su 2-hidroksipropionska kiselina (mliječna kiselina) te 5-HMF. Valja naglasiti kako su ti spojevi izolirani uz upotrebu obaju otapala: smjese pentana i dietil-etera (1:2, v/v) te diklormetana.
- Ekstrakcijom tekuće-tekuće uz upotrebu diklormetana kao otapala izoliran je kofein. Pretpostavlja se da kofein potječe iz hmelja koji je jedan od osnovnih sirovina u proizvodnji piva. Hmelj u svom sastavu sadrži ksantohumul koji djeluje kao prekursor kofeina.
- Eksperimentalni dio ovo rada jasno ukazuje kako nakon otvaranja *lambic* piva, ono postaje izloženo okolini što može dovesti do promjena u aromi piva. Međutim, u ovom slučaju, kod triju uzoraka piva koja su bila otvorena i čuvana u hladnjaku od

+4°C do + 8°C te obložena parafinom tijekom četiri mjeseca, nije došlo do značajnog kvarenja. Ovaj rezultat se može pripisati niskim temperaturama koje usporavaju malolaktičku fermentaciju, odnosno stvaranje mliječne kiseline, dok se istovremeno povećava stvaranje diacetila. Povećana koncentracija diacetila može utjecati na okus piva dajući mu „maslastu“ notu, što nije uvijek poželjno.

- Vidljivo je da niska temperatura usporava kvarenje.

## 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

w/w – (*engl. weight per weight*) – masa po masi, maseni postotak

HS-SPME – (*engl. headspace solid phase microextraction*) – mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

GC-MS – (*engl. gas chromatography-mass spectrometry*) – plinska kromatografija-masena spektrometrija

DI-SPME – (*engl. direct immersion solid phase microextraction*) – izravna imerzija mikroekstrakcija čvrste faze

DVB/CAR/PDMS – (*engl. divinylbenzene/carbamoyl/polydimethylsiloxane*) – divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan

okr/min – okretaj u minuti

v/v – (*engl. volume per volume*) – volumen po volumenu, volumni postotak

NIST17 – (*engl. National Institute of Standards and Technology*) – Nacionalni institut za standarde i tehnologiju



## 7. LITERATURA

1. *R. DeSalle, I. Tattersall*, A Natural History of Beer. Yale University Press, New Haven, 2019, str. 16-17.
2. *NN*, Narodne novine, Pravilnik o pivu.
3. *I. Generalić Mekinić*, Tehnologija alkoholnih pića, Nastavni materijal, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2022.
4. *A. Baiano*, Craft beer: An overview. CRFSFS, **20(2)** (2020) 1829–1856, doi: 10.1111/1541-4337.12693.
5. URL:<https://brooklynbrewery.tumblr.com/post/128433150648/the-hymn-to-ninkasi-from-a-19th-century-bc> (5. 8. 2023.)
6. *S. Wunderlich, W. Back*, Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria, Beer in Health and Disease Prevention, **1** (2009) 3–16, doi: 10.1016/B978-0-12-373891-2.00001-8.
7. *L. Punčochářová, J. Pořízka, P. Diviš, V. Štursa*, Study of the Influence of Brewing Water on Selected Analytes in Beer, Potr. S. J. F. Sci., **13** (2019) 507-514, doi: 10.5219/1046.
8. *S. Buiatti*, Beer Composition: An Overview. Beer in Health and Disease Prevention, **20** (2009) 213–225, doi: 10.1016/b978-0-12-373891-2.00020-1.
9. URL:<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:303502-2> (10.8. 2023.)
10. URL:<https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/03/27/brettanomyces-bruxellensis-microscopy-pictures/> (10.8. 2023.)
11. *A. O. Olaniran, L. Hiralal, M. P. Mokoena, B. Pillay*, Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. JIB, **123(1)** (2017) 13–23, doi: 10.1002/jib.389.
12. *K. J. Verstrepen, G. Derdelinckx, J. P. Dufour, J. Winderickx, J. M. Thevelein, I. S. Pretorius, F. R. Delvaux*, Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. JBB, **96(2)** (2003) 110–118, doi: 10.1016/s1389-1723(03)90112-5.

13. *J. J. Baert, J. De Clippeleer, P. S. Hughes, L. De Cooman, G. Aerts*, On the Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer. *J. Agric. Food Chem.*, **60(46)** (2012) 11449–11472, doi: 10.1021/jf303670z.
14. *C. Garofalo, A. Osimani, V. Milanović, M. Taccari, L. Aquilanti, F. Clementi*, The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *J. Food Sci.*, **80(12)** (2015) 2845–2852, doi: 10.1111/1750-3841.13112.
15. *K. Suzuki*, 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *JIB*, **117(2)** (2011) 131–155, doi: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x.
16. *L. Jespersen, M. Jakobsen*, Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.*, **33(1)** (1996) 139–155, doi: 10.1016/0168-1605(96)01154-3.
17. *J. X. Guinard*, *Lambic*, Brewers Publications, Colorado, 1990, str. 2-22
18. *J. De Roos, L. De Vuyst*, Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *J. Sci. Food Agric.*, **99** (2018) doi: 10.1002/jsfa.9291.
19. *A. Stoffelen*, Revitalising place-based commercial heritage: A Cultural Political Economy approach to the renaissance of lambic beers in Belgium, *Int. J. Herit. Stud.*, **28(1)** (2020) 16–29, doi: 10.1080/13527258.
20. URL: <https://alamortsubite.com/en> (30. 11. 2023.)
21. *A. Sides*, Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods, *TRAC*, **19(5)** (2000) 322–329, doi: 10.1016/s0165-9936(99)00225-3.
22. *S. Merkle, K. Kleeberg, J. Fritsche*, Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review, *Chromatography*, **2(3)** (2015) 293–381, doi: 10.3390/chromatography2030293.
23. *A. Lovrić*, Optimizacija i validacija HS SPME GC MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2016.
24. *P. G. Mazzola, A. M. Lopes, F. A. Hasmann, A. F. Jozala, T. C. Penna, P. O. Magalhaes, C. O. Rangel-Yagui, A. Pessoa Jr*, Liquid–liquid extraction of

- biomolecules: an overview and update of the main techniques, *JCTB*, **83(2)** (2008) 143–157, doi: 10.1002/jctb.1794.
25. *F. M. Antony, D. Pal, K. Wasewar*, Separation of bio-products by liquid–liquid extraction, *Phys. Sci. Rev.*, **6(4)** (2021) doi: 10.1515/psr-2018-0065.
  26. *F. F. Cantwell, M. Losier*, Chapter 11 Liquid–liquid extraction, *Compr. Anal. Chem.*, **37** (2002) 297–340, doi: 10.1016/s0166-526x (02)80048-4.
  27. *P. Amani, M. Amani, G. Ahmadi, O. Mahian, S. Wongwises*, A critical review on the use of nanoparticles in liquid–liquid extraction, *Chem. Eng. Sci.*, (2018) **183** 148–176, doi: 10.1016/j.ces.2018.03.001.
  28. URL: <https://javamem.com/pictures/separating-funnel> (13. 12. 2023.)
  29. *A. Fauzi Al-Rubaye, I. H. Hameed, M. J. Kadhim*, A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants, *IJTPr*, **9(1)** (2017) 81-85, doi: 10.25258/ijtpr.v9i01.9042.
  30. *W. Karasek, R.E. Clement*, Basic gas chromatography-mass spectrometry principles and techniques, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, Elsevier, 1988.
  31. *M. M. Salvatore, R. Nicoletti, F. Salvatore, D. Naviglio, A. Andolfi*, GC–MS approaches for the screening of metabolites produced by marine-derived *Aspergillus*, *Mar. Chem.*, **206** (2018), doi: 10.1016/j.marchem.2018.08.003.
  32. URL: <https://www.lindemans.be> (18. 12. 2023.)
  33. *M. Dresdel, T. Praet, F. Van Opstaele, A. Van Holle, D. Naudts, D. De Keukelerie, L. De Cooman, G. Aerts*, Comparison of the Analytical Profiles of Volatiles in Single Hopped Worts, and Beers as a Function of the Hop Variety, *BrSc*, **68** (2015) 10-12
  34. *K. Witrick, E. R. Pitts, S. F. O’Keefe*, Analysis of Lambic Beer Volatiles during Aging Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GCMS) and Gas Chromatography–Olfactometry (GCO), *Beverages*, **6(2)** (2020) 31, doi: 10.3390/beverages6020031.
  35. *B. A. Nummer*, *Lactobacillus Beer – Brewing With Lactic Acid Bacteria*, (2012)
  36. URL: <https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/malolakticna-fermentacija/2517/> (13.6.2024.)
  37. *Y. Kotseridis, R. L. Baumes, A. Bertrand, G. K. Skouroumounis*, Quantitative determination of  $\beta$ -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope

- dilution assay, *J. Chromatogr. A.*, **848(1-2)** (1999) 317-325, doi: 10.1016/s0021-9673(99)00422-7.
38. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid> (13.6.2024.)
39. *J. De Roos, M. Verce, S. Weckx, L. De Vuyst*, Temporal Shotgun Metagenomics Revealed the Potential Metabolic Capabilities of Specific Microorganisms During Lambic Beer Production, *Front. Microbiol.*, **11** (2020) 1692, doi: 10.3389/fmicb.2020.01692.
40. URL: <https://flightwinebar.com/alcohol/beers/does-beer-have-caffeine/> (22. 1. 2024.)
41. *J. Beekwilder, I. M. van der Meer, O. Sibbesen, M. Broekgaarden, I. Qvist, J. D. Mikkelsen, R. D. Hall*, Microbial production of natural raspberry ketone, *Biotechnol. J.*, **2(10)** (2007) 1270–1279, doi: 10.1002/biot.200700076.