

Hlapljivi spojevi piva

Petrić, Melita

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:167:830462>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

HLAPLJIVI SPOJEVI PIVA

DIPLOMSKI RAD

MELITA PETRIĆ

Matični broj: 8

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

HLAPLJIVI SPOJEVI PIVA

DIPLOMSKI RAD

MELITA PETRIĆ

Matični broj: 8

Split, listopad 2020.

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

VOLATILE COMPOUNDS OF BEER

DIPLOMA THESIS

MELITA PETRIĆ

Parent number: 8

Split, October 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**

Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**

Tema rada: je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko – tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI PIVA

MELITA PETRIĆ, 8

Sažetak:

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva komercijalnih piva pivskih stilova: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* i *hefeweizen*. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem dva različita vlakna te su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija–spektrometrija masa (GC-MS), a dobiveni rezultati su uspoređeni. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri, terpeniski spojevi i karbonilni spojevi.

Ključne riječi: piva, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 42 stranice, 27 slika, 7 tablica, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--------------------------------------|-------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić | predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Marina Zekić | član |
| 3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović | član-mentor |

Datum obrane: 30. listopada 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology. Session no. 28th.

Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

VOLATILE COMPOUNDS OF BEER

MELITA PETRIĆ, 8

Abstract:

In this paper, the chemical composition of volatile compounds of commercial beers of beer styles: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* and *hefeweizen*, was analyzed. Volatile compounds were isolated by solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers and were analyzed by the gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) system in order to compare the results obtained. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters, terpene compounds and carbonyl compounds.

Keywords: beers, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 42 pages, 27 figures, 7 tables, 40 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|-------------|
| 1. Ani Radonić, PhD, associate prof. | chairperson |
| 2. Marina Zekić, PhD, assistant prof. | member |
| 3. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date: October 30th, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad izrađen je u Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju
Kemijско- tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira
Marijanovića, u razdoblju od lipnja 2020. godine do kolovoza 2020. godine.*

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na prihvaćanju mentorstva i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada kao i na uvijek ljubaznom pristupu.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog školovanja.

Najveću zahvalnost dugujem mami, sestri i Vinku koji su svojom podrškom, strpljenjem i razumijevanjem doprinijeli završetku ovog studija.

Na kraju, hvala onom koji me naučio prve korake. Nadam se da si ponosan tamo gore u nebeskim visinama.

Melita Petrić

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz četiri uzorka komercijalnih piva različitih stilova: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* i *hefeweizen*.

U tu svrhu bilo je potrebno:

- ❖ Izolirati hlapljive spojeve uzorka komercijalnih piva metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći dva vlakna i to:
 - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm,
 - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm.

- ❖ Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te usporediti dobivene rezultate.

SAŽETAK

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva komercijalnih piva pivskih stilova: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* i *hefeweizen*. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem dva različita vlakna te su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija–spektrometrija masa (GC-MS), a dobiveni rezultati su uspoređeni. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri, terpeni spojevi i karbonilni spojevi.

Ključne riječi: piva, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

SUMMARY

In this paper, the chemical composition of volatile compounds of commercial beers of beer styles: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* and *hefeweizen*, was analyzed. Volatile compounds were isolated by solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers and were analyzed by the gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) system in order to compare the results obtained. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters, terpene compounds and carbonyl compounds.

Key words: beers, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Povijest pivarstva	2
1.2. Pojmovno određenje piva i osnovnih pivarskih sirovina	3
1.3. Podjela piva	9
1.3.1. Podjela piva prema vrsti kvasca	9
1.3.2. Podjela piva prema boji	11
1.3.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju slada	12
1.3.4. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini	12
1.3.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola	12
1.4. Tehnologija proizvodnje piva	13
1.5. Hlapljivi sastojci piva	16
1.6. Metoda izolacije hlapljivih sastojaka piva	18
1.6.1. Mikroekstrakcija na krutoj fazi	18
1.7. Analiza hlapljivih sastojaka piva	19
1.7.1. Kromatografija	19
1.7.2. Masena spektrometrija	21
1.7.3. Vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	24
2.1. Opis uzoraka	24
2.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	24
2.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa	26
3. REZULTATI	28
3.1. Prikaz rezultata	28
4. RASPRAVA	36
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	40

UVOD

Pivo je jedno od najstarijih i najpopularnijih alkoholnih pića u svijetu koje se proizvodi više od 5000 godina. To je pjenušavo, slabo alkoholno piće gorkog okusa i hmeljne arome čija proizvodnja i potrošnja ima važnu ulogu u kulturnim, političkim i ekonomskim aktivnostima mnogih društava.¹

Počeci pivarstva vežu se za prapovijesno razdoblje drevnog Babilona, Sumerije i Egipta. Povjesničari pretpostavljaju da je pivo nastalo slučajno spontanom fermentacijom kruha u vodi ili na kiši. Prvotno pivo je bilo mutno, gusto i kašasto, a najčešće se radilo od pšenice i ječma. Koristilo se kao piće, hrana, lijek, platežno sredstvo, ali i za vjerske svrhe.¹

Pivo se dobiva fermentacijom pivske hmeljene sladovine pomoću pivskog kvasca koji je za mnoge stilove piva presudan u dobivanju željene arome piva. Danas postoji nebrojeno mnogo stilova i vrsta piva, ovisno o procesu kuhanja i korištenim sastojcima. Faza fermentacije je najvažnija po pitanju hlapivih spojeva koji u pivu značajno doprinose organoleptičkim svojstvima te na taj način utječu na kvalitetu finalnog proizvoda. Stoga je, s obzirom na sve veću svjetsku potrošnju piva te kontinuirani rast mikropivovara, očita važnost analize hlapljivih spojeva za okus piva.^{1,2}

Cilj istraživanja ovog rada je identifikacija i kvantifikacija i usporedba hlapljivog aromatskog profila četiri komercijalna piva različitih stilova i vrsta fermentacije: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* i *hefeweizen*. Hlapljivi spojevi piva su izolirani mikroekstrakcijom na krutoj fazi i analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom koje su primijenjene na uzorke.

1. OPĆI DIO

1.1. Povijest pivarstva

Prvi dokazi o postojanju piva datiraju iz vremena Sumerana koji su od većine svojih žitarica pekli pogače dok su ostatke pogača topili u vodu i dobivali proizvod sličan pivu. Ovaj način proizvodnje piva preuzeli su Egipćani, potom Grci i Rimljani, a s vremenom se proizvodnja piva proširila i Europom. Pivo je u sjevernoj Europi ubrzo postalo svakodnevno piće radi tamošnje hladne klime koja ne pogoduje uzgoju vinove loze. Međutim, piva proizvedena u davnim vremenima su bila lako kvarljiva i mutna s ostacima sjemenki žitarica. Iz tih razloga su Grci i Rimljani pivo smatrali barbarskim napitkom, a vino pićem kulturnih naroda uspoređujući ga s nektarom. Nekoliko stoljeća kasnije, za vrijeme vladavine Karla Velikog, proizvodnja piva se razvila do razine proizvodnje vina. U to vrijeme se kao dodatak pivu počinje upotrebljavati hmelj koji je zamijenio dotadašnje mješavine aromatičnih trava. Uporabom hmelja došlo je do stvaranja pića koje je najbližnje današnjem pivu. 1516. godine u Njemačkoj je donesen Zakon o čistoći piva (*njem. Deutsche Reinheitsgebot*) koji vrijedi i danas, a prema kojemu se pivo smije proizvoditi samo od vode, hmelja i ječmenog slada (slika 1). Kasnije je taj popis dopunjen pivskim kvascem za koji se u tadašnje vrijeme još nije znalo. Sve do polovice 19. stoljeća, pivarstvo je bilo tek zanatsko umijeće, a fermentacija spontan proces. Tek 1857. godine francuski znanstvenik Louis Pasteur dokazuje da su živi mikroorganizmi, odnosno kvasci, odgovorni za fermentaciju. Zahvaljujući Pasteurovim činjenicama i tehnološkom napretku pivo se počelo proizvoditi na način sličan suvremenoj pivarskoj proizvodnji.¹

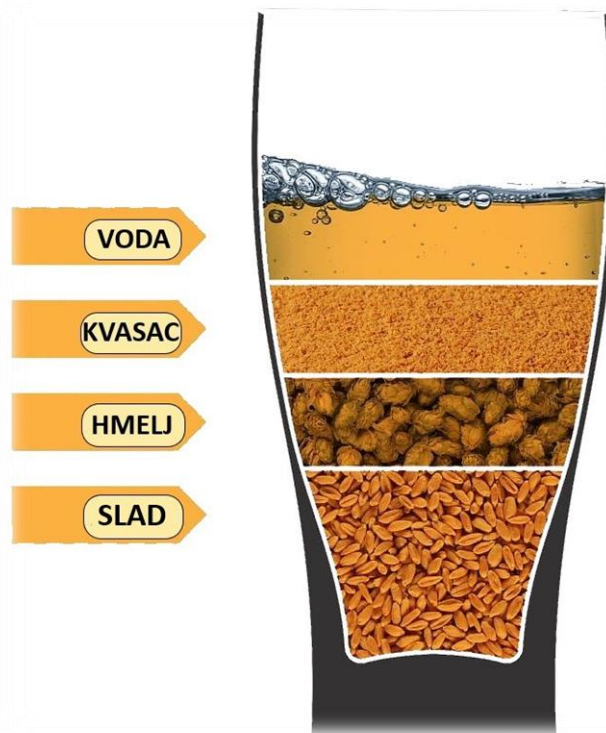


Slika 1. Njemački Zakon o čistoći piva iz 1516. godine.³

1.2. Pojmovno određenje piva i osnovnih pivarskih sirovina

Prema Pravilniku o pivu,⁴ pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Dakle, pivo se dobiva alkoholnim vrenjem pivske sladovine slično kao što se vino dobiva vrenjem mošta. Pivska sladovina je vodeni ekstrakt dobiven toplinskom i enzimskom razgradnjom pivskog slada koji je zapravo osušeno zrno isklizalog ječma ili pšenice, ovisno o vrsti piva koje se proizvodi, a koje je obogaćeno hidrolitičkim enzimima. Ječmeni i/ili pšenični slad se može djelomično nadomjestiti s drugim žitaricama ili proizvodima od žitarica, šećerom i ostalim saharidima te šećernim i škrobnim sirupima.^{1,4}

Pivo ima preko 600 sastojaka, a po udjelu su, ovisno o vrsti najzastupljeniji voda, alkohol i neprevreli ekstrakti.¹ U nastavku teksta su detaljnije opisani osnovni sastojci za proizvodnju piva (slika 2).



Slika 2. Osnovni sastojci piva.⁵

❖ SLAD

Za proizvodnju pivarskog slada većinom se upotrebljava pljevičasti dvoredni ječam (*Hordeum distichum L.*) koji se može sijati u proljeće (jari ječam) ili u jesen (ozimi ječam). Sorte dvorednog jarog ječma (slika 3) najviše udovoljavaju zahtjevima pivarske industrije, pa se stoga najčešće i koriste. Budući da ječam sadrži škrob koji se ne može otopiti u vodi, ne koristi se izravno u proizvodnji piva, već se podvrgava postupku slađenja.¹



Slika 3. Pivarski ječam.⁶

Slad je namočeno, proklijalo, osušeno i otklijano zrno neke žitarice (ječma, pšenice, heljde) nastalo u kontroliranim uvjetima. Osnovni sastojak zrna svakog slada je škrob koji je netopljiv u vodi. Cilj slađenja je da se aktiviraju amilolitički enzimi koji će škrob pretvoriti u šećer. Sušenjem se dobiva slad različitih svojstava, boje i okusa. Ovisno o duljini sušenja i temperaturi razlikuju se svijetli, tamni, karamelizirani, bečki, kiseli i pšenični slad. Jako svijetli tipovi slada koriste se u proizvodnji piva za široku potrošnju. Boja tamnih sladova povezana je s većom razgrađenošću i većim udjelom proteina, ali i nešto nižim ekstraktom te smanjenom aktivnošću enzima.⁷

Postupak prerade žitarica u slad je složen proces i sadrži tri osnovne faze: močenje, klijanje i sušenje. Prvo se zrna sortiraju, a potom moče do otprilike 45 %

vlažnosti kako bi iz stanja anabioze prešla u stanje bioze tj. počela klijati. Nakon toga slijedi klijanje pa sušenje do udjela suhe tvari od 95 do 97 %. Naposljetku se uklanjaju korjenčići koji su higroskopni, a imaju i gorak okus. Klijanje, za vrijeme kojeg se odvijaju biokemijski procesi poput sinteze enzima i razgradnje sastojaka zrna, se zaustavlja zagrijavanjem, odnosno nadziranom sušenjem proklijaloga zrna (zelenoga slada), kako bi se sačuvali enzimi i dobio stabilan suhi proizvod (suhi slad). Tokom tog procesa se netopljivi sastojci endosperma zrna (škrob, bjelančevine) prevode u topljivi oblik i u velikoj se mjeri hidroliziraju do jednostavnih šećera i aminokiselina. Shodno tome slad sadrži višu koncentraciju šećera (ponajviše glukoze i maltoze) od žitarica te ima slatkast okus. O sladu ovisi punoća okusa i koncentracija osnovnog ekstrakta piva.¹

Ječmeni slad (slika 4) je najpopularniji fermentabilni materijal koji se koristi u pivarstvu. Za dobivanje kvalitetnog slada ključno je da zrna ječma potječu od iste sorte. Žitarice, poput riže, kukuruza, zobi, raži i pšenice se mogu dodati u postupak kuhanja s ječmom radi postizanja određenog okusa, ali i zbog toga što su navedene žitarice jeftinije od ječma.



Slika 4. Ječmeni slad.⁸

❖ Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus L.*) je višegodišnja biljka iz porodice konopljevki (Cannabaceae). Dodaje se tijekom kuhanja sladovine. Može se koristiti u obliku šišarki, peleta ili hmeljnog ekstrakta (slika 5). Pivu daje potreban stupanj gorčine i arome širokog spektra: voćne, citrusne, cvjetne, zemljaste, travnate itd.¹ Najvažniji kemijski spoj u hmelju su α -kiseline ili humuloni koje se tijekom kuhanja prevode u izo- α -kiseline. Izomerizirane α -kiseline su za razliku od α -kiselina, prilično topljive u sladovini što doprinosi gorčini piva. One također stabiliziraju pivsku pjenu i sprječavaju rast mikroorganizama u pivu. Budući se oslobađaju kuhanjem, hmeljevi s većom količinom α -kiselina se dodaju na početku kuhanja, dok se aromatični hmeljevi dodaju pri kraju kuhanja kako bi se što manje aroma izgubilo iskuhavanjem. Hmelj također sadrži β -kiseline ili lupulone koje tijekom kuhanja ostaju nepromijenjenog oblika. One ne daju toliko gorčine poput α -kiselina, ali utječu na aromu. β -Kiseline su podložnije oksidaciji koja može negativno utjecati na okus piva. Iz tog razloga mnogi pivari uglavnom odabiru hmelj s niskim sadržajem β -kiselina.^{9,10}

Upravo zbog visokih koncentracija α -kiselina i drugih gorkih tvari koje imaju antiseptični učinak, hmelj djeluje kao konzervans piva.¹

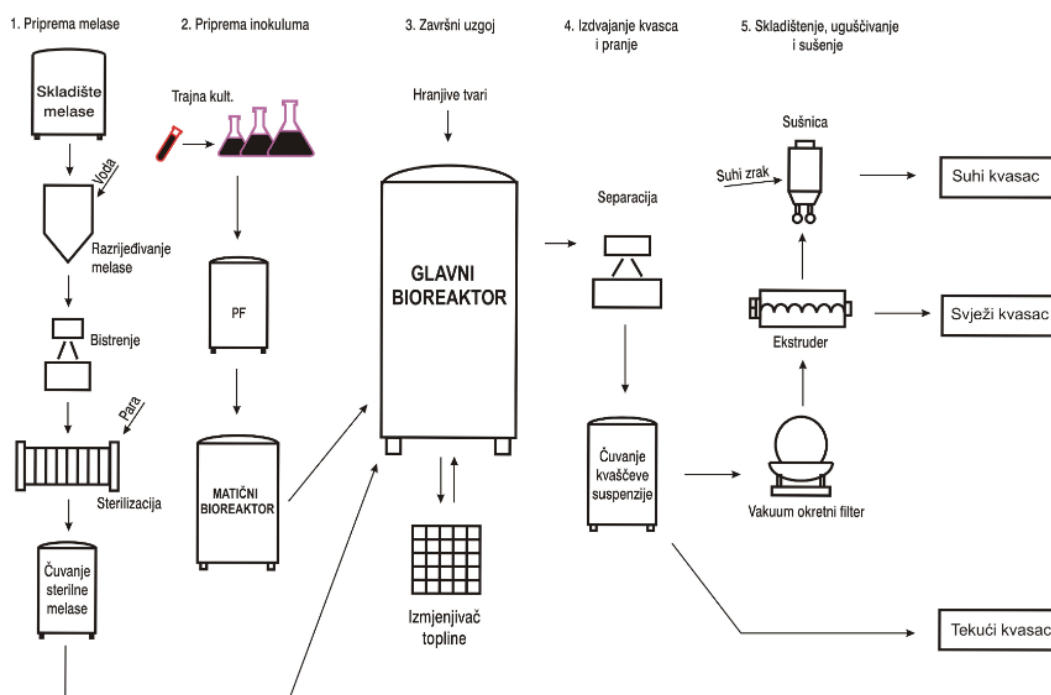


Slika 5. a) Šišarke hmelja¹¹; b) Peleti hmelja¹²; c) Ekstrakt hmelja.¹³

❖ Kvasac

Kvasac je jednostanična gljivica koja pripada grupi mikroorganizama, a koja je odgovorna za pretvorbu šećera u ugljikov dioksid i alkohol. Najpoznatija je gljivica roda *Saccharomyces* koja je važan uzročnik fermentacije. Kvasac ima široku primjenu u pekarstvu, proizvodnji piva, vina, žestokih alkoholnih pića i etanola. Upotrebljava se i u proizvodnji mikrobne biomase (za proizvodnju krmiva i gnojiva), kvašćeva ekstrakta (arome u hrani), limunske kiseline te kao sirovina za proizvodnju enzima, vitaminskih pripravaka (B-kompleks) te u procesima za obradu otpadnih voda kemijske industrije, gdje kvasci metaboliziraju aromatske spojeve.¹⁴

Najznačajniji za pivarsku industriju je *Saccharomyces cerevisiae*, poznat i kao pekarski, odnosno pivski kvasac. Pivski kvasac se najčešće proizvodi na melasi šećerne repe i šećerne trske ili na smjesi te dvije melase. Melasi se dodaju otopine soli i vitamini kako bi se pospješio rast kvašćevih stanica. Kvasac se uzgaja u bioreaktorima, a poslije uzgoja se izdvaja separacijom, nakon čega se dobije kvašćeva suspenzija, odnosno tekući kvasac.¹⁴ Osnovna shema proizvodnje različitih oblika kvasca prikazana je na slici 6.



Slika 6. Osnovna shema proizvodnog procesa suhog, svježeg i tekućeg kvasca.¹⁴

Kvasac (slika 7) je u pivarstvu zaslužan za metaboličke procese u kojima nastaju etanol, ugljikov dioksid te čitav niz drugih metabolita koji doprinose konačnom okusu i aromi piva. Danas u svijetu postoji nebrojeno puno vrsta i sojeva kvasaca za proizvodnju različitih tipova piva. Pivski kvasac se uobičajeno dijeli na kvasce gornjeg i donjeg vrenja o kojima je detaljnije napisano u poglavlju 1.3. ovog rada. Kvasci gornjeg vrenja proizvode piva s više estera odnosno izraženijim voćnim aromama, dok piva proizvedena kvascima donjeg vrenja zadržavaju karakterističnu sumporastu aromu.¹⁰



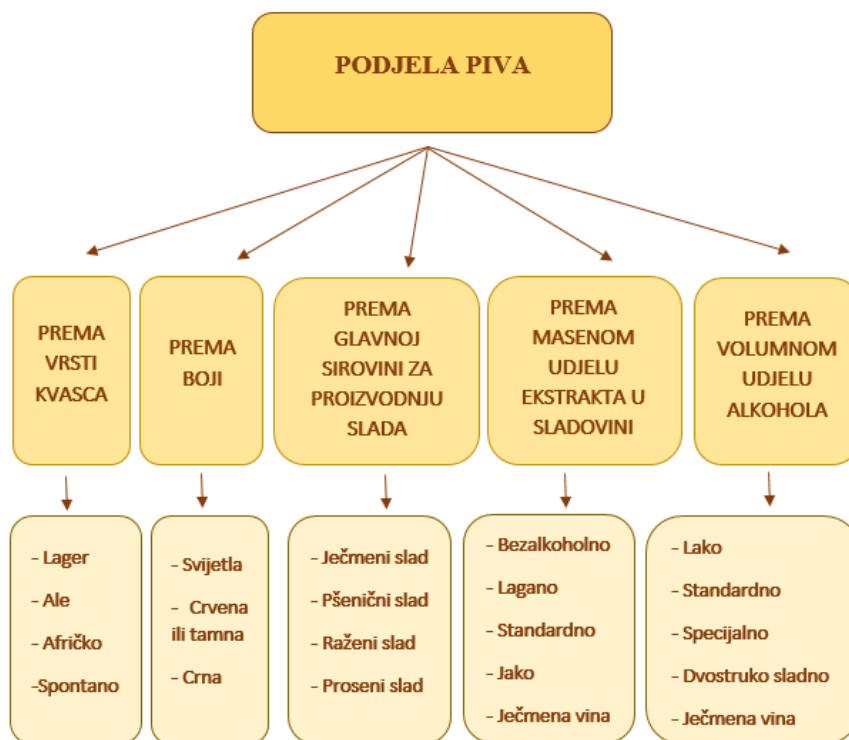
Slika 7. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.¹⁶

❖ **Voda**

Voda je neophodna u pripremi piva te ovisno o vrsti piva udio vode iznosi od 85 do 95 %. Kemijski sastav vode za proizvodnju piva je različit, jer se vode razlikuju prema ukupnoj, stalnoj i prolaznoj tvrdoći, alkalitetu i sadržaju pojedinih soli. Mineralne tvari iz vode predstavljaju tek neznatan dio ekstrakta piva (0,3-0,5 g/l), ali one neizravno utječu na enzimske i koloidno-kemijske reakcije do kojih dolazi tokom procesa proizvodnje piva pa naposljetku imaju važnu ulogu u stvaranju konačnog okusa piva. U pivarstvu se obično koristi voda iz gradskog vodovoda ili voda iz obližnjih izvora odnosno bunara. Tvrdoća vode uvelike utječe na okus piva. Mekša voda se uobičajeno upotrebljava za svijetla piva, a tvrda voda za tamna piva.¹ Priprema vode za proizvodnju piva uključuje različite procese poput deferizacije, demanganizacije, adsorpcije na aktivnom ugljenu, dekarbonizacije, demineralizacije vode, otplinjavanja i dezinfekcije vode.¹⁷

1.3. Podjela piva

Postoji više kriterija po kojima se pivo klasificira. Podjela piva (slika 8) na tipove i vrste rezultat je složenih tehnoloških procesa proizvodnje i kao takva nije proizvodljna nego je strogo definirana pravilnicima o kvaliteti piva proizašlih iz pivarske prakse. Pivo možemo podijeliti prema vrsti kvasca, boji, glavnoj sirovini za proizvodnju slada, masenom udjelu ekstrakta u sladovini i volumnom udjelu alkohola.¹



Slika 8. Podjela piva.¹

1.3.1. Podjela piva prema vrsti kvasca

❖ Lager

Lager ili piva donjeg vrenja su najrašireniji tip piva u svijetu. Proizvedena su vrenjem pivske sladovine pomoću čiste kulture pivskog kvasca vrste *Saccharomyces uvarum*. Vrenje započinje na 6-8 °C pa se naziva još i hladnim vrenjem, a završava pri 9-18 °C kada se najveći dio kvasca istaloži na dno spremnika i izdvoji, a mlado pivo potom dozrijeva u tankovima za odležavanje nekoliko tjedana pri 0 do 1 °C.¹

Kvasac donjeg vrenja se razmnožava staničnom diobom (pupanjem) čime nastaju potpuno samostalne stanice koje se ne drže zajedno, stoga pojedinačno ne mogu pružiti otpor mjehurićima ugljične kiseline te ne dopiju na površinu već potonu na dno spremnika - otuda i naziv donje vrenje.¹⁸

Lager pivo je punog okusa zahvaljujući velikom udjelu neprevrelog ekstrakta. Ima izraženu gorčinu i aromu po hmelju te daje bogatu i trajnu pjenu. Može biti svjetlo ili tamno, a konzumira se ohlađeno na 5-14 °C.¹ Također je popularnije zbog svoje svježine koja je rezultat navedenih nižih temperatura vrenja i odležavanja. Zbog toga sadrži puno više ugljikovog dioksida.¹⁸

❖ *Ale*

Ale ili piva gornjeg vrenja su proizvedena vrenjem pivske sladovine pomoću čiste kulture pivskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Budući da vrenje započinje na 10 °C naziva se još i toplim vrenjem. Završava pri 25 °C nakon čega najveći dio kvasca ispliva na površinu piva. Nakon obiranja kvasca s površine, mlado pivo dovire u tankovima za odležavanje, gdje dozrijeva pri 20 °C. Vrijeme dozrijevanja je nešto kraće nego kod *lagera*.¹

Kvasac gornjeg vrenja se razmnožava pretežito staničnom diobom. Stanice kvasca gornjeg vrenja nakon diobe ostaju u labavoj vezi te se samo vršcima drže zajedno. Iz tog razloga kvasac zajedno s ugljičnom kiselinom dopijeva na površinu i tu se na pjenu javlja kao prljavosmeđi, masni talog - otuda naziv gornje vrenje.¹⁸

Ale pivo je većinom manje punoće okusa u usporedbi s *lager* pivom pa je po okusu sličnije vinu. Izuzev iznimki, *ale* pivo daje minimalnu i nestabilnu pjenu, a konzumira se toplo na 20 °C.¹

❖ *Afričko*

Afrička piva su manje poznata piva proizvedena vrenjem prosenog slada pomoću specifične vrste kvasca *Schizomyces pombe*, prilagođene ekstremnim klimatskim uvjetima na temperaturama od 30-40 °C.¹

❖ *Spontano*

Spontano prevrela piva su dobivena vrenjem sladovine pomoću „divljih“ neselekcioniranih kvasaca. Iako se ovaj tip piva veže uz daleku povijest obrtničkog




pivarstva, danas je sve popularniji *Lambic*, tip belgijskog pšeničnog piva dobivenog procesom spontanoga vrenja, koje sadrži više neprevrelog ekstrakta i hlapljivih sastojaka, koji mu daju poseban „bouquet“.¹

1.3.2. Podjela piva prema boji

Točna nijansa boje piva može se odrediti prema EBC (European Brewing Convention) skali (slika 9). Piva se prema boji dijele na:

- ❖ *svijetla* - piva s intenzitetom boje do 15 EBC jedinica,
- ❖ *crvena ili tamna* - piva s intenzitetom boje od 16 do 40 EBC jedinica i
- ❖ *crna* - piva s intenzitetom boje iznad 40 EBC jedinica.

Na boju piva utječu polifenoli koji se nalaze u ječmu te se prilikom kuhanja sladovine oslobađaju te nastaju neki novi spojevi, a dolazi i do formiranja boje. Dva glavna procesa tijekom kojih dolazi do formiranja boje u pivu su karamelizacija i Maillardove reakcije. Maillardove reakcije doprinose boji piva tako što se tijekom njih formiraju melanoidini koji pivu daju tamniju boju. Također, neki produkti Maillardovih reakcija poput furana i pirola, utječu na boju piva.¹⁹

PRIMJER PIVA	BOJA	EBC
Svijetli lager		4
Njemački pilsner		6
Pilsner		8
		12
Pšenično pivo		16
Bass pale ale		20
		26
Tamni lager		33
		39
		47
Porter		57
Stout		69
		79
Imperial stout		138

Slika 9. Podjela piva prema EBC skali.²⁰

1.3.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju slada

Slad koji se koristi za proizvodnju piva može biti ječmeni, pšenični, proseni ili raženi. Ječmeni slad je osnovna sirovina za proizvodnju većine *lager* i *ale* piva, kojeg je moguće djelomično zamijeniti s neslađenim sirovinama, što mora biti istaknuto na deklaraciji piva. Neslađene sirovine uključuju sve neisklijale žitarice (ječam, pšenica, kukuruz, raž, riža) i njihove prerađevine (brašno, škrob, tekući šećeri). Zamjenom najmanje 50 % ječmenog slada s pšeničnim dobiva se pšenično pivo. Pšenični slad zbog visokog udjela mliječne kiseline daje bljeđu boju pivu nego ječmeni slad. Raženi slad nije česta sirovina u proizvodnji piva zbog gorkih i pikantnih obilježja paprene metvice.¹

1.3.4. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini

Na temelju masenog udjela ekstrakta u sladovini prije početka vrenja, piva se dijele na:

- ❖ *slaba ili laka piva* (6-9 %) - imaju mali udio alkohola i neprevrelog ekstrakta,
- ❖ *standardna piva* (10-12 %) - najčešće primjenjivana koncentracija ekstrakta,
- ❖ *specijalna piva* (12,5-14 %) - nazivaju se i „punim“ pivima jer sadrže više neprevrela ekstrakta
- ❖ *dvostruko sladna piva* (18-22 %) - sadrže povećan udio alkohola i neprevrelog ekstrakta pa se nazivaju i „jakim“ pivima,
- ❖ *ječmena vina* (16-26 %) - piva s volumnim udjelom alkohola sličnom vinima, ali su zbog velikog udjela neprevrelog ekstrakta „teška“ i izrazito punog okusa.¹

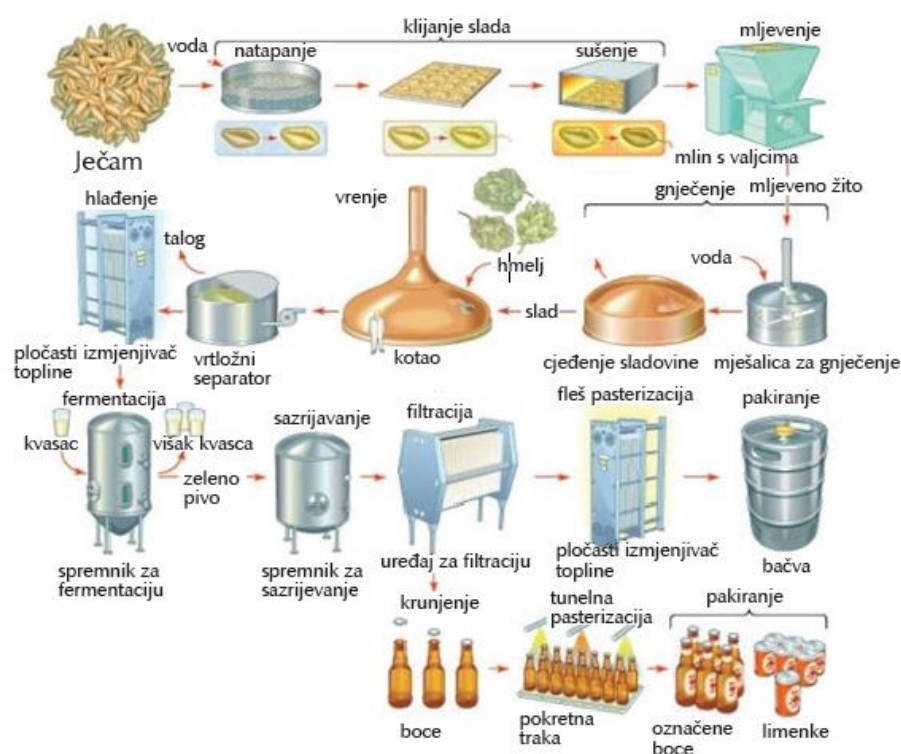
1.3.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola

Prema udjelu volumnog alkohola piva se dijele na:

- ❖ *bezalkoholna piva* - sadrže do 0,5 % vol. alkohola, osim u islamskim zemljama gdje pivo s tim nazivom ne smije sadržavati alkohol,
- ❖ *lagana piva* - sadrže do 3,5 % vol. alkohola,
- ❖ *standardna lager i ale piva* - sadrže preko 3,5 % vol. alkohola,
- ❖ *jaka piva* - sadrže više od 5,5 % vol. alkohola
- ❖ *ječmena vina* - sadrže preko 8 % vol. alkohola pa su slična vinima.¹

1.4. Tehnologija proizvodnje piva

Proizvodnja piva (slika 10) je vrlo složen i dugotrajan postupak koji uključuje kemijske, biokemijske i fizikalno-kemijske promjene, a sastoji se od proizvodnje slada, proizvodnje sladovine, vrenja sladovine, dozrijevanja mladog piva te filtriranja i pakiranja piva u ambalažu.²¹



Slika 10. Prikaz toka procesa proizvodnje piva.²²

❖ Proizvodnja slada

Kod proizvodnje slada prva operacija je čišćenje i sortiranje krupnih i ujednačenih zrna ječma. Nakon toga slijedi faza močenja ječma do 45 % vlažnosti. Za vrijeme te faze zrno povećava svoj volumen, postaje mekano i elastično te se ubrzano odvijaju biokemijski procesi, odnosno povećava se disanje zrna i aktiviraju fermentabilne tvari poput amilolitičkih i proteolitičkih enzima. Natopljeno zrno ide na fazu isključivanja sve dok njegova unutrašnjost ne postane rahla i brašnjava, a korjenčići proklijalog zrna ne dostignu duljinu 1,5-2 puta veću od duljine zrna. Od najvećeg značaja za pivarstvo je da se tijekom klijanja u zrnu smanjuje količina škroba, a raste udio mono- i disaharida uslijed

djelovanja fermentabilnih tvari. Tako dobiven tzv. „zeleni“ slad se potom suši u sušnicama u kontroliranim uvjetima dok se ne dobije tzv. „suhi“ slad.²¹

❖ **Proizvodnja sladovine**

U fazi proizvodnje sladovine, slad se melje na posebnim mlinovima i priprema za ukomljavanje. Ukomljavanje je postupak miješanja usitnjenog slada i neslađenih žitarica s 4-5 puta većom količinom tople vode s ciljem prevođenja njihovih netopljivih sastojaka (škroba, β -glukana i proteina) u topljivi oblik procesom enzimske hidrolize pomoću enzima sintetiziranih tijekom klijanja ječma. Budući da konverzija škroba nije vidljiva golim okom, koristi se jodna proba kako bi se doznao završetak na način da se kapne par kapi joda na malo sladovine. Ukoliko otopina potamni, u sladovini je još uvijek prisutan škrob, a ako ne dolazi do promjene boje može se sa sigurnošću zaključiti da je sav dostupan škrob konvertiran u šećer. Nakon ukomljavanja, komina se filtrira, a zaostaje vodena otopina ekstrahiranih sastojaka – sladovina.¹ Dobivena sladovina se potom u kotlu (slika 11) kuha sa hmeljom oko dva sata. Za vrijeme kuhanja sladovina se uparava do odgovarajućeg udjela suhe tvari, proteini koaguliraju, enzimi se inaktiviraju, tvari hmelja se otapaju čime sladovina poprima gorčinu i aromu, a time se postiže njena sterilnost.²¹ Završetkom vrenja, sladovina se bistri u taložnom separatoru, a topli talog koji je zaostao nakon cijedenja se odvaja. Topli talog su zapravo proteinske pahulje promjera 30-80 μm nastale denaturacijom proteina. Njihovo taloženje je obavezno jer onemogućuju potpuno bistrenje sladovine, lijepe se za kvaščeve stanice tijekom vrenja i općenito otežavaju filtraciju piva. Sladovina se nakon bistrenja hladi i aerira.¹



Slika 11. Kotao za kuhanje sladovine.²³

❖ Vrenje sladovine

Ohlađena i aerirana sladovina se pretače u fermentor gdje se inokulira čistom kulturom pivskog kvasca koji vrši alkoholnu fermentaciju. Fermentacija se odvija u određenim temperaturnim uvjetima ovisno o vrsti kvasca. Pri tome postupku kvasac pretvara veći dio fermentabilnih šećera iz sladovine u alkohol i ugljikov dioksid te se dobiva mlado, mutno, tzv. „zeleno“ pivo. Kvasac se za vrijeme vrenja razmnožava, povećava na 2-4 puta veću količinu u odnosu na početnu, a pred završetak izdvaja iz fermentora.²¹ Na slici 12 je prikazana fermentacija piva u otvorenom betonskom bazenu i cilindrično-konusnom spremniku.



Slika 12. Fermentacija piva: a) otvoreni betonski bazen²³; b) cilindrično-konusni spremnik.²⁴

❖ Dozrijevanje mladog piva

Mlado pivo nakon vrenja dozrijeva u tankovima za odležavanje. Tijekom tog perioda previru preostali šećeri, pivo se obogaćuje ugljičnom kiselinom, formiraju se tvari arome (esteri, aldehidi, ketoni, viši alkoholi, organske kiseline), nastaje pjena, pivo se bistri, a na dnu se taloži preostali kvasac.²¹

❖ Filtriranje i pakiranje piva u ambalažu

Odležano i zrelo pivo se u posljednjem koraku stabilizira, filtrira, pasterizira i puni u odgovarajuću ambalažu (bačve, limenke, boce). Naposljetku se skladišti i distribuira.¹

1.5. Hlapljivi sastojci piva

Hlapljivi spojevi u pivu su tvari koje značajno doprinose organoleptičkim svojstvima piva te na taj način utječu na kvalitetu proizvoda kako na pozitivan tako i na negativan način. Prvu skupinu hlapljivih spojeva čine produkti Maillardove reakcije koji nastaju tijekom sušenja i prženja slada. Drugu skupinu čine eterična ulja iz hmelja koja se ispuštaju u sladovinu tijekom kuhanja. Najvažnija faza u pogledu hlapljivih tvari je postupak fermentacije kada se razvija puno spojeva s niskim vrelištem.²⁵ Osim etanola i ugljikovog dioksida, stanice kvasca proizvode i širok raspon sekundarnih metabolita. Iako se ove tvari proizvode u vrlo niskim koncentracijama, odgovorne su za složene arome piva.²⁶ Nusproizvodi koji nastaju tijekom alkoholnog vrenja su: viši alkoholi, esteri, aldehidi, diacetil i sumporovi spojevi. Sastojci arome mladog piva (aldehidi, diacetil, sumporovi spojevi) su odgovorni za nezreli i nebalansirani okus mladog piva, a u višim koncentracijama nepovoljno utječu na kakvoću piva. Akumuliraju se tijekom glavnog vrenja, a uklanjaju tijekom naknadnog vrenja piva. Poželjni sastojci arome dozrelog piva (viši alkoholi i esteri) imaju presudan utjecaj na aromu gotovog piva. Njihova prisutnost u odgovarajućim koncentracijama je preduvjet za visoku kakvoću piva, a udio im se povećava tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva.²⁷

❖ Esteri

Esteri su najvažnije tvari arome u pivu koje daju konačnom proizvodu voćnu aromu i svježije note iako su zastupljeni u tragovima.²⁸ Tijekom alkoholne fermentacije može se stvoriti značajna količina estera kao rezultat metabolizma kvasca. To su organski spojevi koji nastaju reakcijom alkohola i masnih kiselina, a dijele se na acetatne i etilne estere. Acetatni esteri nastaju reakcijom octene kiseline i alkohola. Ova skupina estera uključuje izobutil-acetat, izoamil-acetat, feniletil-acetat i etil-acetat koji čini trećinu svih estera u pivu radi visoke koncentracije etanola od kojeg se formira. Acetatni esteri su kratkolančani i time lipofilniji te lako difundiraju kroz membranu kvasca u sladovinu. Etilni esteri potječu od srednjelančanih masnih kiselina i etanola. Najznačajniji su etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat. Brzina difuzije etilnih estera ovisi o veličini lanca masne kiseline (povećanjem duljine lanca, brzina difuzije opada).²⁶

Općenito, kvasci sintetiziraju estere u unutarstaničnom prostoru odakle difundiraju izvan stanice u sladovinu ovisno o veličini molekule, soju i količini kvasca, temperaturi vrenja i sadržaju kisika. Budući da esterifikaciju katalizira enzim alkohol acetat transferaza (AAT), povećanje udjela estera u pivu se postiže upotrebom onog soja kvasca koji proizvodi više tog enzima. Također do povećanja udjela estera dolazi i zbog blago povišene količine dodanog kvasca. Veći rast kvasca znači veću proizvodnju staničnih stijenki, odnosno veću proizvodnju AAT-a, budući da se nalazi u staničnim membranama pivskog kvasca. Porastom temperature vrenja se potiče brži rast kvasca i veća proizvodnja AAT-a, što također rezultira povećanjem sinteze estera. Analogno tome, *ale* piva imaju više estera u gotovom proizvodu zbog više temperature vrenja od *lager* piva. Međutim treba uzeti u obzir da za neka piva, poput njemačkih *hefeweizena*, voćni esteri definiraju stil, ali za druga piva, poput čistih *lagera*, stvaranje estera nije poželjno i smatra se nedostatkom.²⁹ U tablici 1 su prikazani najznačajniji esteri u pivu i njihove arome.

Tablica 1. Popis najznačajnijih estera u pivu i opis arome.²⁶

ESTER	AROMA
<i>Etil-acetat</i>	Voćno, slatkasto
<i>Izoamil-acetat</i>	Banana, jabuka
<i>2-Feniletal-acetat</i>	Ruže, med, jabuka, slatkasto
<i>Etil-butanoat</i>	Tropsko voće
<i>Etil-heksanoat</i>	Kisela jabuka
<i>Etil-oktanoat</i>	Kisela jabuka
<i>Etil-dekanoat</i>	Cvjetno

❖ Viši alkoholi

Viši alkoholi ili patočna ulja predstavljaju većinu hlapljivih sastojaka u pivu. Glavni su predstavnici propanol, izobutanol, izoamilalkohol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 2-feniletanol i tirozol. Tijekom glavnog vrenja nastaje preko 90 % viših

alkohola dok ostatak nastaje tijekom dozrijevanja. Ti spojevi mogu imati pozitivne i negativne utjecaje na aromu i okus. Velike količine ovih viših alkohola (> 300 mg / L) u pivu mogu dovesti do jakog, oštrog mirisa i okusa, dok optimalne razine daju željene karakteristike. Stvaranje viših alkohola povezano je s metabolizmom aminokiselina kvasca.^{1,26}

Izoamil-alkohol je kvantitativno najvažniji okusni spoj skupine viših alkohola. Utječe na pitkost piva jer se povećanjem njegove koncentracije okus piva opisuje kao „teži“.²⁶ U tablici 2 su prikazani najznačajniji viši alkoholi u pivu i njihove arome.

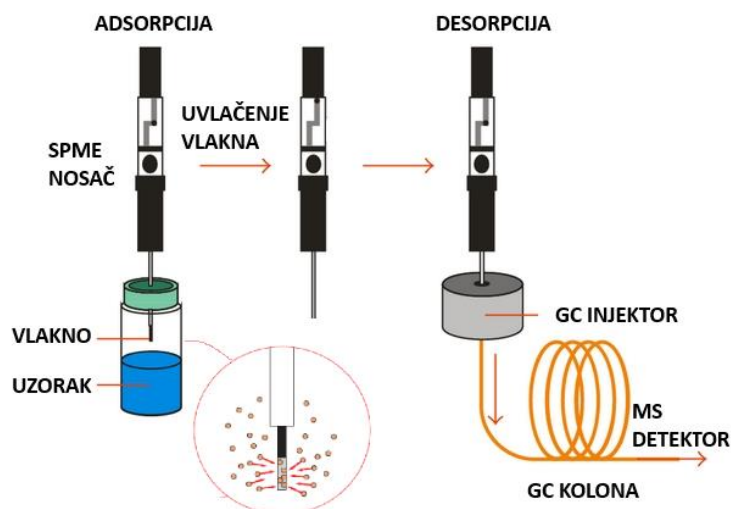
Tablica 2. Popis najznačajnijih viših alkohola u pivu i opis arome.²⁶

ALKOHOL	AROMA
<i>2-metilbutan-1-ol</i>	Banana, ljekovito
<i>3-metilbutan-1-ol</i>	Banana
<i>2-feniletanol</i>	Ruže, slatkasto
<i>2 – metilpropanol</i>	Otapalo
<i>Tirozol</i>	Gorko
<i>Geraniol</i>	Ruža

1.6. Metoda izolacije hlapljivih sastojaka piva

1.6.1. Mikroekstrakcija na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*; HS-SPME) je metoda koja se temelji na izolaciji hlapljivih spojeva iz različitih uzoraka na polimernom sorbensu nanesenom na silikonsko vlakno bez upotrebe organskog otapala^{30,31}. Na slici 13 je prikazan shematski prikaz HS-SPME ekstrakcije.



Slika 13. Shematski prikaz HS-SPME ekstrakcije.³²

Vlakna duljine 1 do 2 cm, prevučena odgovarajućim polimerima i zaštićena čeličnom iglom, nalaze se na nosaču sličnom mikrolitarskoj injekciji. Nakon probijanja septuma posudice u koju je prethodno stavljena određena količina uzorka, pritiskom na klip držača pomiče se vlakno kroz šuplju iglu u zračni prostor iznad uzorka. Nakon točno određenog vremena, vlakno se ponovno uvlači u iglu dok se igla vadi iz posudice. Zatim se igla uvodi u injektor plinskog kromatografa, vlakno se ispušta te se ekstrahirani spojevi desorbiraju i razdvajaju na kromatografskoj koloni.^{30,31}

Metoda „*headspace*“ ekstrakcije je povoljna za uzorke s velikim interferencijama u molekularnoj masi, a samo relativno hlapljivi spojevi se ekstrahiraju. Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije: polarna vlakna se koriste za polarne spojeve, a nepolarna za nepolarne spojeve. Udio ekstrahiranih spojeva, osim o polarosti i debljini filma ovisi i o vremenu ekstrakcije te o udjelu hlapljivih spojeva u uzorku.³¹

Prednosti ove metode su brzina, jednostavnost, mali volumeni uzoraka te neupotreba organskih otapala.³⁰

1.7. Analiza hlapljivih sastojaka piva

1.7.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja koja uključuje razdvajanje spojeva između dviju faze, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne),

ovisno o njihovoj topljivosti u svakoj fazi. Mobilna faza (neki plin ili tekućina) nosi sastojke smjese i kreće se iznad stacionarne faze. Prilikom svog putovanja molekule sastojaka smjese neprestano se sorbiraju i desorbiraju. Stacionarna faza mora biti tako odabrana da je zadržavanje molekula na njoj selektivno, pa različiti sastojci putuju različitom brzinom i tako se jedan od drugog odjeljuju.³³

Kromatografske metode se razlikuju ovisno o agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze. Temeljna podjela je na plinsku kromatografiju u kojoj je mobilna faza plin (plin nosilac) i na tekućinsku kromatografiju gdje je mobilna faza tekućina (eluens). Dalja podjela unutar tih dviju osnovnih grupa temelji se na prirodi stacionarne faze. Plinska kromatografija obuhvaća razdjelnu ili plinsko-tekućinsku kromatografiju (engl. *gas-liquid chromatography*; GLC) i adsorpcijsku, odnosno plinsko-adsorpcijsku kromatografiju (engl. *gas-solid chromatography*; GSC). Stacionarna faza kod razdjelne kromatografije je tekućina nanescna na čvrsti nosač, a kod adsorpcijske je to čvrsti adsorbens. U tekućinskoj kromatografiji je ta podjela puno šira, jer osim tekućine ili adsorbensa kao stacionarna faza može poslužiti ionski izmjenjivač i neionski umreženi polimer (gel). Također, kod adsorpcijske kromatografije se mogu primijeniti tri načina izvedbe kromatografskog procesa:

- ❖ *eluiranje ili ispiranje* - u kojem struja inertne mobilne faze nosi sastojke smjese razdvajane na stacionarnoj fazi,
- ❖ *frontalna analiza* - u kojoj je mobilna faza sama razdvajana smjesa i
- ❖ *istiskivanje* - u kojem se mobilna faza adsorbira jače od svakog sastojka u razdvajanoj smjesi i tako istiskuje sastojke s adsorbensa.³³

Kod razdjelne kromatografije, eluiranje ili ispiranje je najčešće jedini način izvedbe, budući da je proces separacije selektivno otapanje sastojaka.³³

Plinska kromatografija se provodi samo u zatvorenom sustavu sa stacionarnom fazom smještenom u koloni, a tekućinska kromatografija se izvodi i u koloni (kolonska kromatografija) i na otvorenim ploham (plošna kromatografija).³³

❖ **Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*; GC) obuhvaća kromatografske postupke u kojima je mobilna faza u plinovitom stanju. Određena

količina ispitivane smjese uvodi se strujom inertnog plina u kromatografsku kolonu u kojoj se sastojci razdjeljuju između stacionarne i mobilne faze. Ovisno o svojoj molekularnoj strukturi i topljivosti, kemijski spojevi se različito vežu na stacionarnu fazu, dok mobilna faza omogućava kretanje kroz kolonu. Onima s većom topljivošću u stacionarnoj fazi treba više vremena da izađu iz sloja nego onima s manjom topljivošću. Postupkom eluiranja se sastojci smjese mogu potpuno odvojiti, a po izlasku iz kolone pomiješani su samo s plinom nosiocem. To olakšava njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje i po potrebi sakupljanje, a kolona se stalno regenerira protjecanjem plina nosioca.³³

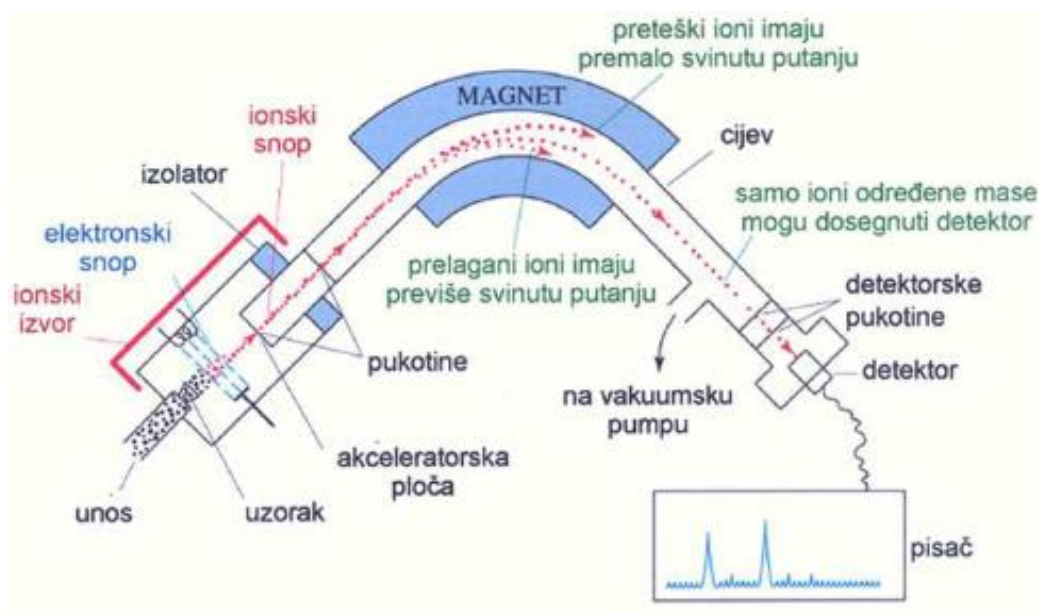
Plinski kromatograf se sastoji od uređaja za ubacivanje uzorka (injektora), kromatografske kolone u termostatski kontroliranoj pećnici koja sprječava njeno pregrijavanje, detektora i pisača. Uobičajeno je da se uzorak ubrizgava pomoću mikrolitarske šprice koja se provlači kroz gumeni septum na mjestu za ubrizgavanje. Kao plin nosač se najčešće koristi helij, vodik ili dušik komprimiran u bocama. Prisutnost odijeljenih sastojaka smjese u plinu nosiocu po izlasku iz kolone utvrđuje se u detektoru, uređaju koji količinu eluiranog sastojka kao funkciju vremena registrira na pisaču u obliku kromatograma koji prema broju međusobno odijeljenih sastojaka u koloni, sadrži razmjerni broj krivulja eluiranja ili pikova (engl. *peak*, vrh). Vrijeme zadržavanja je karakteristična veličina za svaki eluirani sastojak, a visina krivulje eluiranja i njena površina proporcionalni su količini sastojaka.³³

1.7.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička metoda kojom se analiziraju molekule na temelju razlike u omjeru njihove mase i naboja (m/z). Maseni spektrometri klasificirani su prema principu koji se koristi za odvajanje ionskih masa. Maseni spektrometar (slika 14.), koji radi u visokome vakuumu kako bi se izbjegli sudari iona sa drugim česticama, sastoji se od 4 osnovna dijela: sustava za unošenje uzorka, ionizatora, analizatora i detektora.³⁴

Masenu spektrometriju možemo podijeliti u dva odvojena procesa: ionizaciju i razdvajanje mase uz bilježenje nastalih iona. U ionizatoru se najprije ioniziraju atomi i molekule uzorka (obično bombardiranjem atoma i molekula elektronima) koji se potom

u električnom polju ubrzavaju te nastaje karakteristična skupina iona različitih masa. Nastali ioni ulaze u analizator (najčešće magnetsko polje) koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja. Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se redom registrirati ioni različitih masa, čime nastaje maseni spektar karakterističan za određeni kemijski spoj.³⁴



Slika 14. Shematski prikaz masenog spektrometra.³⁵

Masena spektrometrija primjenjuje se za vrlo točno određivanje relativnih atomskih i relativnih molekularnih masa, izotopnoga sastava i strukture njihovih molekula, tragova primjesa itd.³⁴

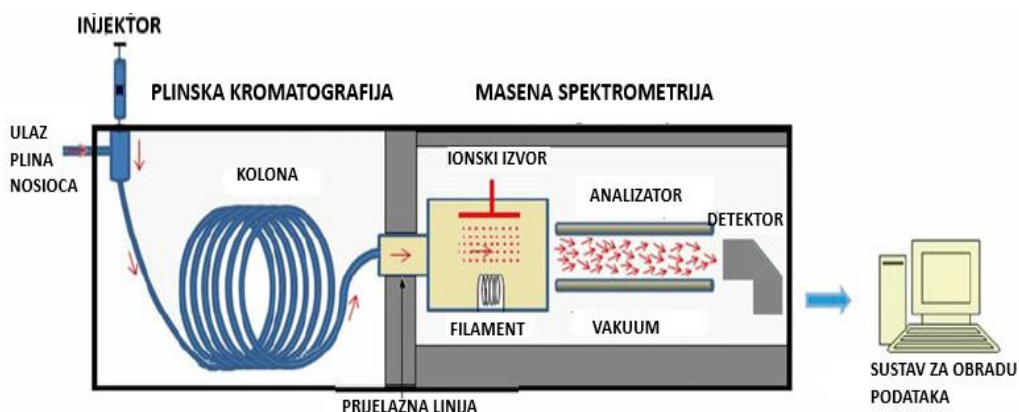
1.7.3. Vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija

Sastojke uzorka nepoznatog sastava je teško, a često i nemoguće jednoznačno identificirati samo na temelju podataka o njihovu vremenu zadržavanja u koloni. Međutim, kad je jednom sastojak na kromatografskoj koloni odijeljen od ostalih sastojaka smjese, moguće je vrstu spoja i njegove strukturne karakteristike utvrditi drugim metodama. Najbolja su rješenja tzv. vezani sustavi koji se sastoje od plinskog kromatografa izravno povezanog s instrumentom za identifikaciju odijeljenih sastojaka. Tada se osnovni uvjeti za uspješan rad svode na prikladno agregatno stanje eluiranog

sastojka, njegovu količinu i brzinu snimanja spektara. Izvanredne mogućnosti u analizi složenih smjesa pruža vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*; GC-MS).³³

GC-MS je kombinirana metoda razdvajanja i identificiranja komponenti iz složenih smjesa s vrlo selektivnim i osjetljivim masenim detektorom korištenjem dostupnih baza podataka spektara masa. GC-MS ima sposobnost kvantificirati tragove specifičnih organskih spojeva u prisutnosti stotina drugih tvari, od kojih su neke prisutne u tisućama puta višim koncentracijama od analita. Mogućnosti ovog sustava nisu samo zbroj dva instrumenta već je porast analitičkih sposobnosti eksponencijalan.³⁶

Neposredno po izlasku iz kromatografske kolone pojedini odijeljeni sastojci smjese ulaze redom u spektrometar masa u kojem se snima njihov spektar koji je jedinstven za svaki spoj kao i otisci prstiju kod ljudi.³³ Na slici 15 se nalazi shematski prikaz rada GC-MS uređaja.



Slika 15. Shematski prikaz rada GC-MS uređaja.³⁷

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Opis uzoraka

U tablici 3 prikazani su uzorci komercijalnih piva različitih stilova koji su korišteni u ovom radu.

Tablica 3. Uzorci komercijalnih piva različitih stilova.

<i>BR.</i> <i>UZORKA</i>	<i>STIL</i> <i>PIVA</i>	<i>PODJELA</i> <i>PREMA</i> <i>KVASCU</i>	<i>BOJA</i> <i>PIVA</i>	<i>VOLUMNI</i> <i>UDIO</i> <i>ALKOHOLA</i>	<i>MASENI</i> <i>UDIO</i> <i>EKSTRAKTA</i>	<i>OPIS</i>
1.	<i>pale lager</i>	<i>lager</i>	svijetlo	5 %	11,6 %	čisti, puni okus, odmjerena gorčina
2.	<i>dunkel</i>	<i>lager</i>	tamno	3,8 %	9,55 %	karamelizirani slad
3.	<i>pale ale</i>	<i>ale</i>	svijetlo	5,2 %	12 %	jače zahmeljeno
4.	<i>hefeweizen</i>	<i>ale</i>	svijetlo	5,5 %	12,5 %	pšenično, voćno/ <i>spicy</i> , slabo zahmeljeno

2.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

U staklenu posudu od 20 mL se stavi 2 mL uzorka piva i 1 g NaCl (Fluka Chemie, p.a.). Posuda se hermetički zatvori PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C), a sadržaj u njoj se miješa upotrebom magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard (100-1400 o/min) s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka). Na slici 16 je prikazana korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).



Slika 16. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).³⁸

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 min na 270 °C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Za adsorpciju hlapljivih spojeva piva su korištena sljedeća vlakna (slika 17):

- ❖ plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD),
- ❖ sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD).



Slika 17. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno).³⁸

2.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7820A, u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977E, spojenim na računalo (slika 18).

Separacija komponenti provedena je na kapilarnim kolonama:

- ❖ HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD),



Slika 18. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).³⁸

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- ❖ temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C min⁻¹,
- ❖ „solvent delay“: 3 min (vrijeme u kojem izlazi otapalo, a „solvent delay“ se koristio samo u slučaju kada su analizirani ekstrakti s otapalom),
- ❖ temperatura injektora: 250 °C,
- ❖ omjer cijepanja je 1 : 50,

- ❖ količina injektiranog uzorka: 1 μL ,
- ❖ plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin^{-1} .

Uvjeti rada spektrometra masa:

- ❖ energija ionizacije: 70 eV,
- ❖ temperatura ionskog izvora: 280 $^{\circ}\text{C}$,
- ❖ interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

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

- ❖ kromatogram ukupne ionske struje,
- ❖ naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- ❖ vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- ❖ relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME i šprice za ekstrakte s otapalom (injektirani volumen ekstrakata je 1 μL).

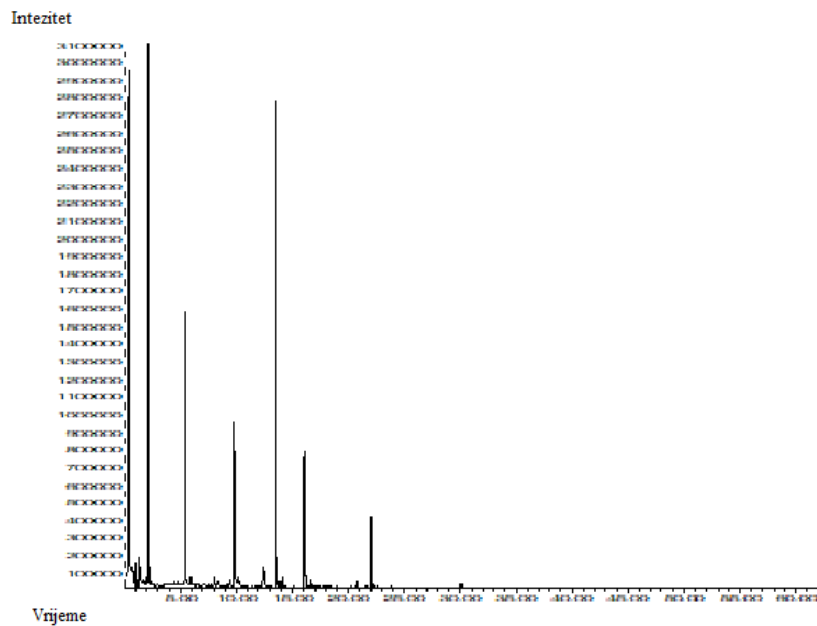
3. REZULTATI

3.1. Prikaz rezultata

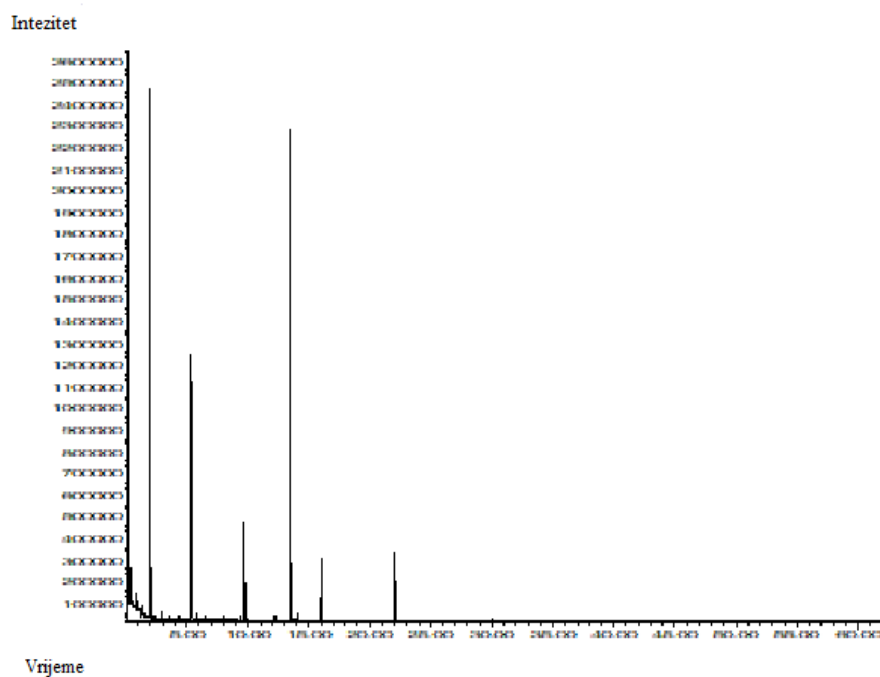
Analiza dobivenih hlapljivih spojeva piva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa. Rezultati su prikazani tablično i u obliku reprezentativnih kromatograma.

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva piva stila *pale lager*

Redni broj	RI	Spoj	Udio (%)	
			Sivo vlakno	Plavo vlakno
1.	<900	3-metilbutan-1-ol	11,62	14,22
2.	<900	2-metilbutan-1-ol	3,92	3,97
3.	<900	etil-butanoat	0,64	/
4.	<900	3-metilbutil-acetat	17,28	21,22
5.	996	etil-heksanoat	11,98	13,13
6.	1116	2-feniletanol	10,41	6,43
7.	1195	oktanska kiselina	2,06	/
8.	1198	etil-oktanoat	25,93	30,61
9.	1261	geraniol	7,40	4,09
10.	1593	etil-dekanoat	4,01	4,53
<i>Ukupno identificirano</i>			95,25 %	98,20 %



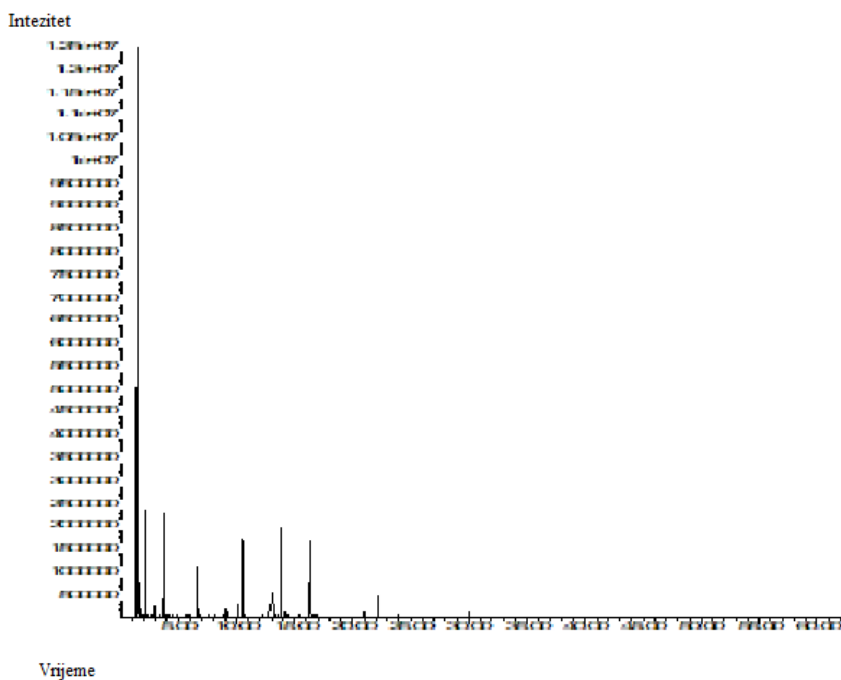
Slika 19. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *pale lager* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).



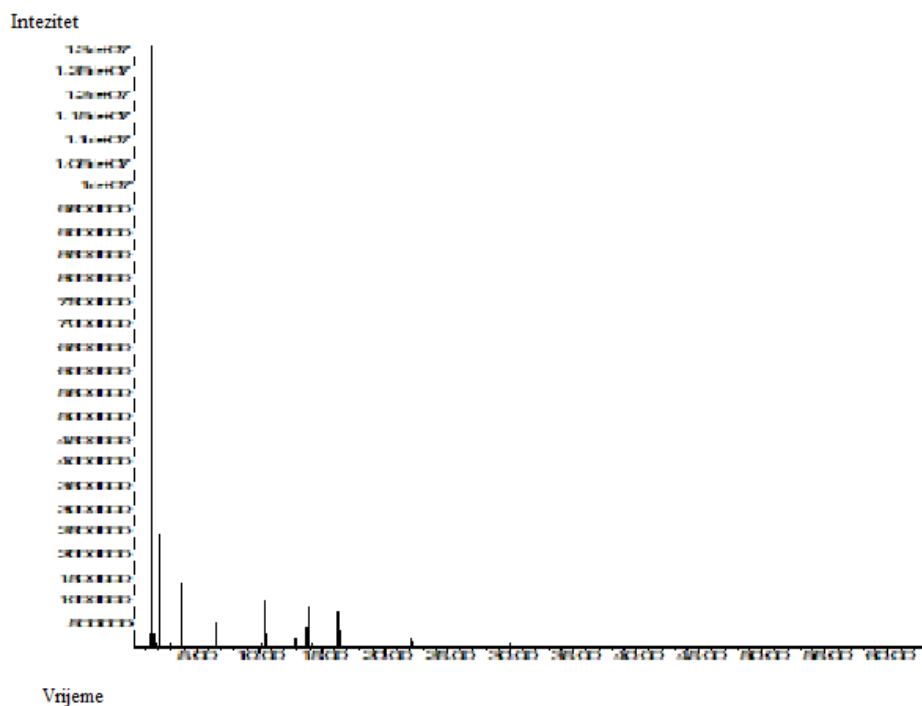
Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *pale lager* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva piva stila *dunkel*

Redni broj	RI	Spoj	Udio (%)	
			Sivo vlakno	Plavo vlakno
1.	<900	etil-acetat	0,47	/
2.	<900	3-metilbutan-1-ol	4,96	11,39
3.	<900	2-metilbutan-1-ol	2,17	4,27
4.	<900	etil-butanoat	0,20	/
5.	<900	3-metil-butil-acetat	6,68	9,14
6.	974	heksanska kiselina	0,64	/
7.	996	etil-heksanoat	6,10	6,79
8.	1007	oktanal	0,40	/
9.	1105	nonanal	1,55	0,70
10.	1116	2-feniletanol	16,66	20,53
11.	1189	oktanska kiselina	13,80	6,38
12.	1198	etil-oktanoat	15,25	16,93
13.	1207	dekanal	0,77	1,09
14.	1253	2-feniletetil-acetat	14,33	14,44
15.	1379	dekanska kiselina	1,67	/
16.	1397	etil-dekanoat	3,69	4,38
17.	1593	etil-dodekanoat	0,93	1,22
<i>Ukupno identificirano</i>			<i>90,27 %</i>	<i>96,96 %</i>



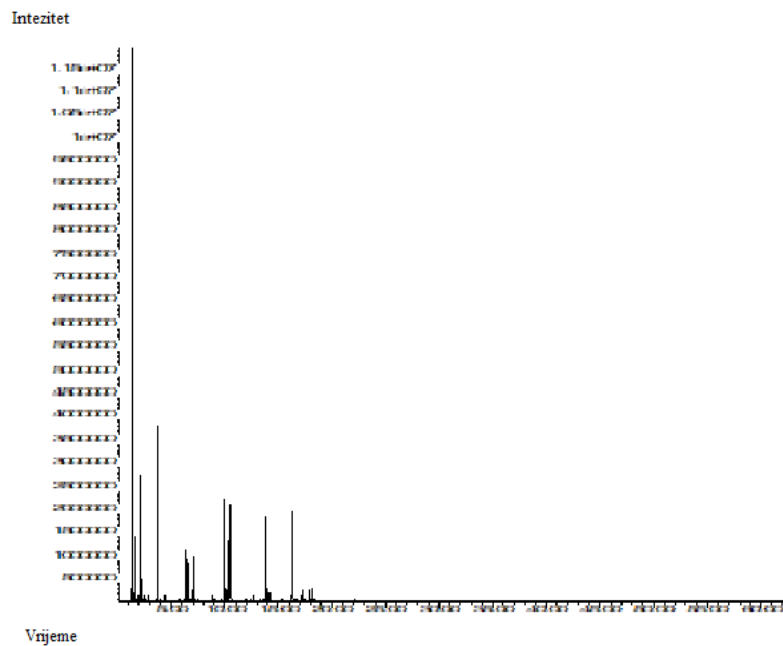
Slika 21. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *dunkel* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).



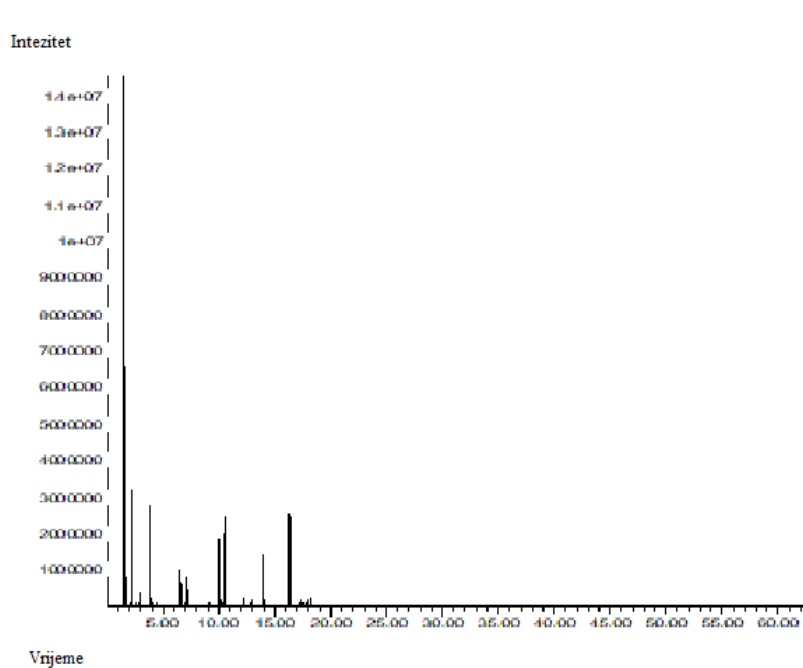
Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *dunkel* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva piva stila *pale ale*.

Redni broj	RI	Spoj	Udio (%)	
			Sivo vlakno	Plavo vlakno
1.	<900	etil-acetat	0,85	0,51
2.	<900	3-metilbutan-1-ol	4,97	5,83
3.	<900	2-metilbutan-1-ol	2,00	2,03
4.	<900	3-metilbutil-acetat	10,10	6,79
5.	993	β -mircen	5,38	4,68
6.	996	etil-heksanoat	4,36	6,49
7.	1021	α -terpinen	0,79	3,24
8.	1103	linalol	15,10	11,16
9.	1116	2-feniletanol	17,58	19,02
10.	1189	oktanska kiselina	/	2,02
11.	1198	etil-oktanoat	12,29	9,85
12.	1208	dekanal	1,25	/
13.	1261	geraniol	15,01	18,45
14.	1294	undekan-2-on	1,40	0,97
15.	1694	heptadecen	1,17	1,17
<i>Ukupno identificirano</i>			92,25%	92,21%



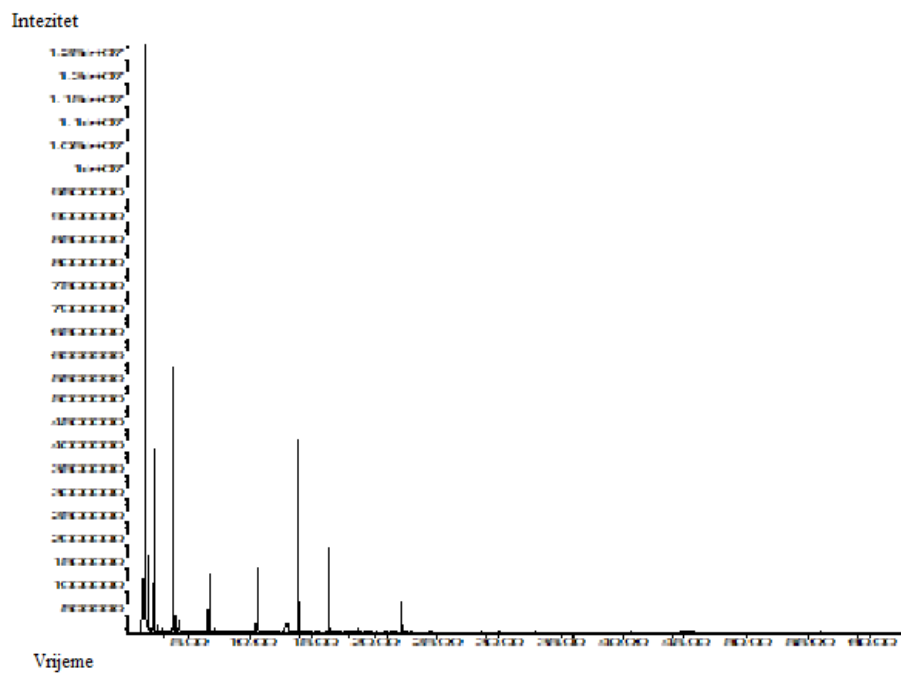
Slika 23. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *india pale ale* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).



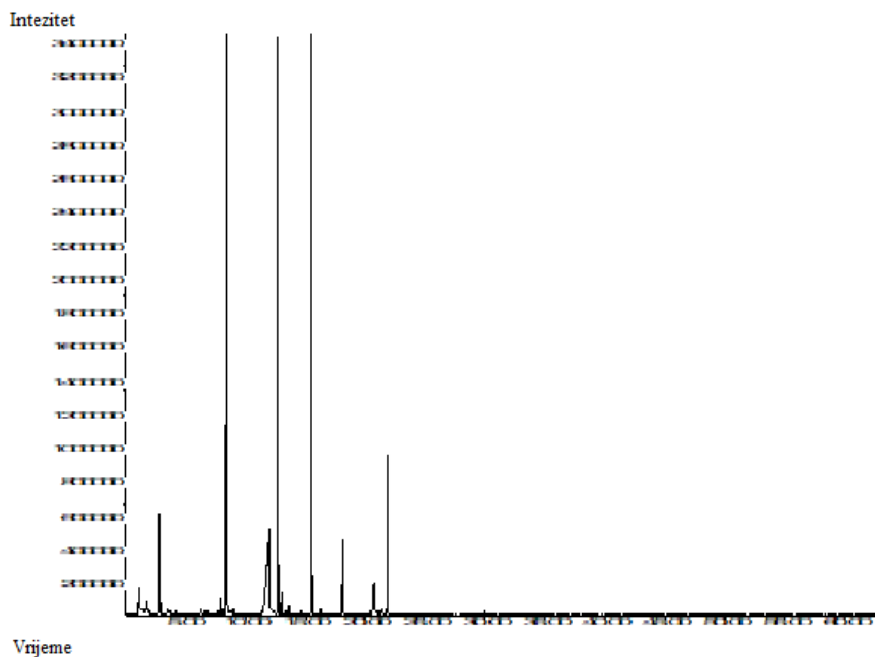
Slika 24. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *india pale ale* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva ko piva stila *hefeweizen*.

Redni broj	RI	Spoj	Udio (%)	
			Sivo vlakno	Plavo vlakno
1.	<900	etil-acetat	1,04	/
2.	<900	3-metilbutan-1-ol	7,03	/
3.	<900	2-metilbutan-1-ol	2,46	/
4.	<900	3-metilbutil-acetat	16,34	/
5.	<900	stiren	1,50	/
6.	996	etil-heksanoat	6,08	3,70
7.	1116	2-feniletanol	11,68	24,03
8.	1195	oktanska kiselina	3,61	13,41
9.	1198	etil-oktanoat	29,54	22,44
10.	1208	dekanal	/	0,82
11.	1261	geraniol	14,04	23,78
12.	1315	4-vinil-2-metoksifenol	/	2,96
13.	1370	dekanska kiselina	/	2,26
14.	1397	etil-dekanoat	5,03	6,13
<i>Ukupno identificirano</i>			98,35 %	99,53%



Slika 25. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *hefeweizen* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).



Slika 26. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva piva stila *hefeweizen* izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio istražiti hlapljive spojeve četiri različite vrste komercijalnih piva: *pale lager*, *dunkel*, *pale ale* i *hefeweizen*. Hlapljivi spojevi uzoraka su izolirani metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi korištenjem dva različita vlakna. Svi dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analize su prikazani u obliku tablica i kromatograma.

Profil hlapljivih spojeva komercijalnog piva stila *pale lager*, prikazan je u tablici 4. U uzorku rađenom sa sivim vlaknom identificirano 10 spojeva koji čine 95,25 % od ukupnog uzorka. U uzorku dominira etil-oktanoat (25,93 %), a kvantitativno značajni sastojci su i spojevi poput 3-metilbutil-acetata (17,28 %), etil-heksanoata (11,98 %), 3-metilbutan-1-ola (11,62 %) i 2-feniletanola (10,41 %). Svi ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim količinama. U uzorku je sa plavim vlaknom identificirano 8 spojeva koji čine 98,20 % od ukupnog uzorka. Ovdje je glavni sastojak etil-oktanoat (30,61 %), a slijede 3-metilbutil-acetat (21,22 %), 3-metilbutan-1-ol (14,22 %) i etil-heksanoat (13,13 %).

Aromatski profil hlapljivih spojeva komercijalnog piva stila *tamni lager* prikazan je u tablici 5. U uzorku je korištenjem sivog vlakna detektirano 17 spojeva što predstavlja 90,27 % od ukupnog uzorka hlapljivih spojeva. Najdominantnij spoj je 2-feniletanol (16,66 %), a kvantitativno značajniji spojevi su etil-oktanoat (15,25 %), 2-feniletil-acetat (14,33 %) i oktanska kiselina (13,80 %). Ostatak spojeva u ekstraktu se nalazi u manjim količinama. U uzorku je pomoću plavog vlakna identificirano 12 spojeva koji čine 96,96 % od ukupnog uzorka. Ovdje dominira 2-feniletanol (20,53 %), a ostali kvantitativno bitni spojevi su etil-oktanoat (16,93 %), 2-feniletil-acetat (14,44 %) i 3-metilbutan-1-ol (11,39 %). Kod ovog uzorka su u malim količinama detektirani aldehidi oktanal, nonalal i dekanal koji doprinose gorkoj, citrusnoj aromi.³⁹

Kemijski sastav i udio izoliranih spojeva komercijalnog piva stila *pale ale* prikazan je u tablici 6. U uzorku je korištenjem sivog vlakna registrirano 14 spojeva koji od ukupnog uzorka predstavljaju 92,25 %. U uzorku prevladava 2-feniletanol (17,58 %). Drugi važni spojevi su linalol (15,10 %), geraniol (15,01 %), etil-oktanoat (12,29 %) i 3-metilbutil-acetat (10,10 %). Svi ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim

količinama. U uzorku je sa plavim vlaknom identificirano 14 spojeva koji čine 92,21 % od ukupnog uzorka. Ovdje dominira 2-feniletanol (19,02 %), a kvantitativno značajniji sastojci su geraniol (18,45 %) i linalol (11,16 %).³⁹

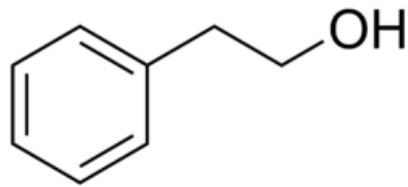
Također, jedino u ovom uzorku je pronađen β -mircen (4,68 % do 5,38 %) za koji se pretpostavlja da potječe od eteričnog ulja hmelja, kao i α -terpinen (od 0,79 % do 3,24 %) koji postoji u svim eukariotima, od kvasca do ljudi, a koji daje citrusnu i biljnu notu. Pretpostavka je da i ovaj spoj potječe od hmelja. U ovom uzorku je potvrđen i linalol (od 11,16 % do 15,10 %) koji pivu daje karakterističnu aromu naranče i borovih iglica, a značajan je sastojak šišarki hmelja. Jedan od sastojaka eteričnog ulja hmelja je i geraniol (od 15,01 do 18,45 %) koji daje aromu po ruži.³⁹ Međutim, procesom kuhanja sladovine neke komponente arome hmelja se gube pa da bi se povećala njihov aroma u pivu, uzgajaju se aromatične sorte hmelja koje se pivu dodaju pri kraju kuhanja sladovine. U ovom uzorku je identificirano više spojeva koji nisu pronađeni u ostalim uzorcima budući da je ovaj stil piva jače zahmeljen.

Konačno, kemijski sastav i udio izoliranih spojeva komercijalnog piva stila *svijetli pšenični ale* prikazan je u tablici 7. U uzorku je pomoću sivog vlakna identificirano 11 spojeva koji od ukupnog uzorka čine 98,35 %. Najdominantnij spoj je etil-oktanoat (29,54 %). Kvantitativno važniji spojevi su 3-metilbutil-acetat (16,34 %) i geraniol (14,04 %) i 2-feniletanol (11,68 %), dok su ostali spojevi u ekstraktu prisutni u manjem udjelu. U uzorku je korištenjem plavog vlakna detektirano 8 spojeva koji čine 99,53 % od ukupnog uzorka. Ovdje dominira 2-feniletanol (24,03 %), a slijede geraniol (23,78 %), etil-oktanoat (22,44 %) i oktanska kiselina (13,41 %). Plavim vlaknom je u ovom uzorku također identificiran spoj 4-vinil-2-metoksifenol (2,96 %) koji je karakterističan za pšenična piva, a koji nastaje metabolizmom sojeva kvasca koji se koriste za kuhanje pšeničnih piva. Navedeni spoj daje prepoznatljivu aromu klinčića.³⁹

Etil-oktanoat (9,16 % do 30,61 %) i etil-heksanoat (3,70 % do 11,98 %), predstavnici etilnih estera nositelja voćne arome, su identificirani u svim uzorcima.

Kvantitativno značajni spojevi koji su detektirani u prva tri uzorka i to korištenjem oba vlakna, a u četvrtom uzorku samo korištenjem sivog vlakna su: 3-metilbutil-acetat (od 6,75 % do 21,22 %), 3-metilbutan-1-ol (od 4,97 % do 14,22 %) i 2-metilbutan-1-ol (od 2,00 % do 4,27 %).

2-Feniletanol (od 6,43 do 24,03 %) je viši alkohol koji je registriran korištenjem oba vlakna u svim uzorcima u značajnom udjelu. Doprinosi aromi piva svojom slatkastom aromom po ruži.³⁹ Njegova strukturna formula je prikazana na slici 27.



Slika 27. Strukturna formula 2-feniletanola.⁴⁰

5. ZAKLJUČAK

Na temelju eksperimentalnih rezultata ispitivanja hlapljivih spojeva četiri uzorka komercijalnih piva različitih stilova može se zaključiti sljedeće:

- ❖ Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka komercijalnih piva izvršena je vezanim sustavom GC-MS.
- ❖ Iz prikazanih rezultata analiza može se zaključiti da su najzastupljenije skupine spojeva alkoholi, esteri, organske kiseline te karbonilni i terpeniski spojevi.
- ❖ U svim uzorcima su korištenjem oba vlakna identificirani etil-oktanoat i etil-heksanoat koji pripadaju skupini estera te 2-feniletanol koji je predstavnik viših alkohola.
- ❖ Najviše spojeva je detektirano u pivu stila *dunkel*, budući da je to jedino pivo tamne boje koja je nastala kao produkt karamelizacije slada. Kod ovog uzorka je pronađena i veća količina karbonilnih spojeva i organskih kiselina.
- ❖ 4-Vinil-2-metoksifenol je identificiran samo u pivu stila *hefeweizen*, što odgovara činjenici da nastaje metabolizmom sojeva kvasca koji se koriste za proizvodnju pšeničnih piva.
- ❖ Najviše terpeniskih spojeva je identificirano u pivu stila *pale ale*, a oni potječu od šišarki hmelja i hmeljnog ulja.
- ❖ Dobiveni rezultati su pokazali da je aromatični profil komercijalnih piva različitih stilova sličan, s manjim odstupanjima kod određenih stilova piva.

6. LITERATURA

1. Marić V., Pivo tekuća hrana, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
2. Kleinová J., Klejdus B., Determination of volatiles in beer using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography/mass spectrometry. Czech J: Food Sci., 32: 241–248., 2014
3. URL: http://blog.brunnenbraeu.eu/?page_id=369 (2.10.2020.)
4. NN, Narodne novine, Pravilnik o pivu, 142/11 (3.10.2020.)
5. URL: <https://br.pinterest.com/pin/78601955966461351/?send=true> (5.10.2020.)
6. URL: <https://alter.plus/jecam/> (10.10.2020.)
7. Šakić N., Blesić M., Osnovi tehnologija slada i piva, Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Sarajevo, 2011.
8. URL: <https://theitaliancraftbeer.wordpress.com/2016/10/05/rawmaterialsbarleymalt/> (10.10.2020.)
9. Verzele M., 10Years of Hop Chemistry and Its Relevance to Brewing. Journal of the Institute of Brewing. 92(1), 1986.
10. Goldammer T., The Brewer's Handbook, Apex Publishers, Centerville, 2008.
11. URL: <https://www.beveragedaily.com/Article/2020/01/21/Brain-hop-Kirin-to-develop-products-containing-mature-hop-bitter-acids-for-cognitive-benefits> (10.10.2020.)
12. URL: <https://pivovarium.si/hr/28-hmelj> (10.10.2020.)
13. URL: <https://www.indiamart.com/proddetail/hops-flower-extract-4752940391.html> (10.10.2020.)
14. URL: <https://tehnika.lzmk.hr/kvasac-2/> (11.10.2020.)
15. Grba S., Kvasci u bioltehnološkoj proizvodnji, Pleyada d.o.o., Zagreb, 2010.
16. URL: <http://ordinacija.vecernji.hr/zdravi-tanjur/hrana-kao-lijek/kvasac-moze-biticistac-organizma-i-prirodna-kozmetika-za-ljepsti-ten/> (11.10.2020.)

17. Lončarić A., Kovač T., Nujić M., Habuda-Stanić M., Priprema tehnološke vode za industrijsku proizvodnju piva, stručni rad, Osijek, 2017.
18. Vogel W., Pivo iz vlastitog podruma, ITD Gaudeamus d.o.o., Požega, 2005.
19. Spearot J.W., Influence of Beer Color on Perception of Bitterness, Master thesis, Drexel University, Philadelphia, 2016.
20. URL: <http://beersinthehall.blogspot.com/2011/08/srmebc-scale.html> (12.10.2020.)
21. Veselov I.J., Čukmasova M.A., Tehnologija piva, Poslovno Udruženje ind. piva, Beograd, 1966.
22. Lj. Matijašević, Održive tehnologije u procesima proizvodnje piva, Zaštita okoliša, Kem. Ind. 64 (9-10) (2015) 540–546
23. URL: [https://www.pivovarferdinand.cz/data/usr_046_default/web_5101\(1\).jpg](https://www.pivovarferdinand.cz/data/usr_046_default/web_5101(1).jpg) (13.10.2020.)
24. URL: <http://www.grainbrew.com/tags.php?/Beer+fermentation+vessel/> (13.10.2020.)
25. Kleinova J., Lejdus B., Determination of Volatiles in Beer using Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Czech J. Food Sci. Vol. 32, 2014, No. 3: 241–248
26. Olaniran, A. O., Hiralal. L., Mokoena, M.P. Pillay, B., Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control, J. Inst. Brew. 123, 13–23, 2017.
27. Pavlečić M. i sur., Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci nakakvoću piva tijekom skladištenja, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 7 (1-2), 118-125, 2012.
28. Humia B., Santos K., Barbosa A., Sawata M., Mendonça M., Padilha F., Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review, Molecules; 24(8):1568, 2019,
29. URL: <https://winning-homebrew.com/esters-in-beer.html> (14.10.2020.)
30. Klinčić D., Herceg Romanić S., Kemijske metode određivanja hidroksiliranih metabolita policikličkih aromatskih ugljikovodika i poliklorbifenila u biološkome materijalu, Arh Hig Rada Toksikol; 62:77-89, 2011.

31. Lovrić A., 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.
32. URL: https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-analysis-with-solid-phase-microextraction-gas-chromatography-mass-spectrometry_fig2_274709453
(16.10.2020.)
33. URL: <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/kromatografija.pdf>
(16.10.2020.)
34. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268> (16.10.2020.)
35. URL: https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf
(17.10.2020.)
36. W. Karasek and R.E. Clement, Basic gas chromatography-mass spectrometry principles and techniques, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, Elsevier, 1988.
37. URL: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-the-main-components-of-GC-MS-instruments_fig1_273955959 (18.10.2020.)
38. Marijanović Z., Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorska dizertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, 2014.
39. Dresel M., Praet T., Van Opstale F., Van Holle A., Naudts D., De Keukelerie D., De Cooman L. and Aerts G., Comparison of the Analytical Profiles of Volatiles in Single-Hopped Worts and Beers as a Function of the Hop Variety, *BrewingScience*; 10-12. ISSN: 1866-5195, 2015.
40. URL: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Fenetil-alkohol> (19.10.2020.)