

# Hlapljivi spojevi Lambic piva

---

**Vuleta, Deni**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:167:509261>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-11**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI LAMBIC PIVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**DENI VULETA**

**Matični broj: 53**

**Split, listopad, 2023.**



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

**HLAPLJIVI SPOJEVI LAMBIC PIVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**DENI VULETA**

**Matični broj: 53**

**Split, listopad, 2023.**

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

**VOLATILE COMPOUNDS OF LAMBIC BEER**

**DIPLOMA THESIS**

**DENI VULETA**

**Parent number: 53**

**Split, October, 2021.**



## 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  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović

### HLAPLJIVI SPOJEVI LAMBIC PIVA

Deni Vuleta, 53

#### Sažetak:

U ovom radu se provodi deskriptivna senzorska analiza, test preferencije te analiza kemijskog sastava hlapljivih spojeva u četiri različite vrste lambic piva. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog i plavog vlakna te su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te su dobiveni rezultati uspoređeni. Identificirani spojevi se mogu svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri i aldehidi, kiseline, ketoni i fenoli.

**Ključne riječi:** piva, lambic, senzorska analiza, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 49 stranica, 25 slika, 10 tablica, 48 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

- |  |                 |
|--|-----------------|
| 1. prof. dr. sc. Ivica Blažević            | - predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. Josipa Giljanović         | - 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 Split  
Graduate study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

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

### VOLATILE COMPOUNDS OF LAMBIC BEER

Deni Vuleta, 53

#### Abstract:

In this paper, a descriptive sensory analysis, a preference test and an analysis of the chemical composition of volatile compounds in four different types of lambic beer are carried out. Volatile compounds were isolated by the method of peak vapor microextraction on a solid phase (HS-SPME) using gray and blue fiber and were analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system, and the obtained results were compared. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters and aldehydes, acids, ketones and phenols.

**Keywords:** beers, Lambic, sensory analysis, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 49 pages, 25 images, 10 tables, 48 literary references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. PhD Ivica Blažević, Full Prof. - chairperson
2. PhD Josipa Giljanović, Full Prof. - member
3. PhD Zvonimir Marijanović, Assoc. Prof. - supervisor

#### Defence date:

**Printed and electronic (PDF) version 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 academic archives and repositories of the National and University Library.



*Završni 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 veljače do listopada 2023. godine.*

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na prenesenom znanju, susretljivosti i korisnim sugestijama koji su mi pomogli tijekom izrade završnog rada.*

*Hvala mojim roditeljima i momku Mirku na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak završnog rada bio je odrediti deskriptivnu senzorsku analizu, test preferencije i sadržaj arome tj. odrediti profil hlapljivih spojeva iz četiri uzorka lambic piva. Lambic piva s okusom jabuke, lambic piva s okusom maline, lambic piva s okusom breskve, lambic piva s okusom višnje. Koristeći metodu izolacije mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) zatim identificiranje izoliranih hlapljivih spojeva koristeći vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te analiziranje i uspoređivanje dobivenih rezultata s literaturom.



## **SAŽETAK**

U ovom radu se provodi deskriptivna senzorska analiza, test preferencije te analiza kemijskog sastava hlapljivih spojeva u četiri različite vrste lambic piva. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem sivog i plavog vlakna te su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te su dobiveni rezultati uspoređeni. Identificirani spojevi se mogu svrstati u sljedeće kemijske skupine: alkoholi, esteri i aldehidi, kiseline, ketoni i fenoli.

**Ključne riječi:** piva, lambic, senzorska analiza, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS

## **SUMMARY**

In this paper, a descriptive sensory analysis, a preference test and an analysis of the chemical composition of volatile compounds in four different types of lambic beer are carried out. Volatile compounds were isolated by the method of peak vapor microextraction on a solid phase (HS-SPME) using gray and blue fiber and were analyzed by a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system, and the obtained results were compared. The identified compounds can be classified into the following chemical groups: alcohols, esters and aldehydes, acids, ketones and phenols.

**Keywords:** beers, Lambic, sensory analysis, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1 Slad.....	2
1.2 Voda .....	2
1.3 Hmelj .....	2
1.4 Kvasac.....	3
1.5 Tehnološka shema proizvodnje piva .....	3
1.6 Podjela piva .....	6
1.7 Lambic piva .....	7
1.8 Senzorika piva .....	9
1.9 Hlapljivi spojevi u lambic pivu .....	11
1.10 Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	12
1.10.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi.....	13
1.10.2 Mikroekstrakcija vršnih para na tekućoj fazi.....	14
1.10.3 GC-MS .....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
2.1 Opis uzoraka .....	17
2.1.1 Piva s okusom maline .....	17
2.1.2 Piva s okusom jabuke .....	17
2.1.3 Piva s okusom višnje.....	17
2.1.4 Piva s okusom breskve.....	17
2.2 Eksperiment- SENZORSKA ANALIZA .....	18
2.3 Eksperiment- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	21
2.3.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi.....	22
2.3.2 GC-MS analiza hlapljivih slojeva.....	24
3. REZULATATI .....	26
3.1 Rezultati- SENZORSKA ANALIZA.....	26
3.2 Rezultati- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	29
4. RASPRAVA .....	41
4.1 Rasprava- SENZORSKA ANALIZA .....	41
4.2 Rasprava- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	41
5. ZAKLJUČAK.....	45
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	46

<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>
---------------------------	-----------



## UVOD

Piva je najstarije alkoholno piće na svijetu, a sam postupak proizvodnje stoljećima se nije puno promijenio. To je slabo alkoholno piće koje ima gorak okusa i hmeljnu aromu. Još u vrijeme Sumerana radio se proizvod sličan pivu. Oni su pekli pogače od žitarica, a ostatke topili u vodi i na taj način dobivali proizvod koji podsjeća na pivo. To se smatraju prvi dokazi o proizvodnji piva. Način proizvodnje su preuzeli antički narodi pa se s vremenom proširilo cijelom Europom. Za vrijeme vladavine Karla Velikog umjesto mješavina aromatičnih trava kao dodatak pivu počinje se koristiti hmelj. To je bila prekretnica gdje se dobila piva najsličnija onoj danas. U Njemačkoj je 1516. godine napisan Zakon o čistoći piva (*njem. Deutsche Reinheitsgebot*) koji je još uvijek na snazi. Po njemu pivo se smije proizvoditi samo od vode, hmelja i ječmenog slada, a kasnije je u taj zakon dodan i pivski kvasac.<sup>1</sup>

Piva se proizvodi fermentacijom sladovine hmelja uz pomoć pivskog kvasca. Faza fermentacije je najvažnija zbog nastanka brojnih spojeva koji doprinose organoleptičkim svojstvima. Proizvodnja piva unaprijedila se tehnološkim napretkom kroz godine.

Zadivljujuća je raznolikost stilova i okusa piva diljem svijeta, no Lambic piva se izdvajaju po svojoj jedinstvenosti zbog spontane fermentacije pomoću divljih kvasaca koji se nalaze u okolini pivovare i kompleksnosti okusa. Lambic piva potječu iz Belgije iz regije Pajottenland blizu Bruxellesa. Ova regija ima dugu tradiciju proizvodnje lambic piva.<sup>2</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Slad

Slad je ključan sastojak odgovoran za boju, okus i koncentraciju šećera u nefermentiranom pivu, poznatom kao sladovina. Odmah nakon vode, slad je najzastupljeniji sastojak u pivu. Slad obuhvaća različite žitarice koje mogu pružiti dovoljno ekstrahiranih šećera i ugljikohidrata u vodi. To uključuje ječam, pšenicu, kukuruz, rižu, heljdu, zob i druge žitarice. U proizvodnji piva najčešće se koristi ječam zbog visokog postotka ekstrahiranih šećera i prisustva enzima koji su važni za proces fermentacije.<sup>3</sup>

## 1.2 Voda

Voda je najzastupljeniji sastojak piva, a njezine karakteristike igraju ključnu ulogu u kvaliteti i okusu piva. Osnovne karakteristike vode za pivo uključuju tvrdoću, lužnatost, pH vrijednost i sastav iona. Tvrdoća vode odnosi se na količinu otopljenih soli kalcija i magnezija u vodi, koje se često nalaze u obliku hidrogenkarbonata, sulfata, nitrata ili klorida. Prolazna tvrdoća može se eliminirati zagrijavanjem vode, budući da se hidrogenkarbonati kalcija i magnezija talože pri zagrijavanju. S druge strane, stalna tvrdoća u vodi potječe od sulfata, nitrata i klorida i nije moguće ukloniti zagrijavanjem. Lužnatost vode odnosi se na ukupnu količinu karbonatnih i bikarbonatnih iona. Visoka lužnatost uzrokuje povećanje pH vrijednosti sladovine i piva, što može negativno utjecati na proces fermentacije i konačni okus piva. Idealno, voda za pivsku proizvodnju trebala bi biti blago kisela, kako bi održala prihvatljivu pH vrijednost za proces proizvodnje piva. Voda se smatra neutralnim pićem, što znači da njezina pH vrijednost iznosi 7, što je između kiselog i lužnatog raspona, čineći je prikladnom za pivsku proizvodnju.<sup>4</sup>

## 1.3 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus*) je višegodišnja penjačica iz porodice konopljarki (*Cannabaceae*). Ima ključnu ulogu u procesu proizvodnje piva. Hmelj se dodaje tijekom kuhanja sladovine, a ima nekoliko važnih funkcija. Prvo, djeluje kao prirodni konzervans, pomažući produžiti trajnost piva. Također, hmelj značajno utječe na okus piva, pružajući karakterističnu gorčinu i aromu. Ova gorčina potječe od alfa kiselina prisutnih u hmelju. Same alfa kiseline nisu same po sebi

gorke i nisu topive u vodi. Međutim, tijekom procesa kuhanja sladovine pri visokoj temperaturi, dolazi do izomerizacije alfa kiselina, pretvarajući ih u izo-alfa kiseline koje su gorke i topive u vodi. To daje pivu karakterističnu gorčinu i aromu koja varira ovisno o vrsti hmelja koji se koristi. Hmelj je stoga ključni sastojak u pivarskoj industriji, doprinoseći bogatstvu okusa i mirisa piva, te igrajući važnu ulogu u njegovoj stabilnosti i trajnosti.<sup>4</sup>

#### **1.4 Kvasac**

Kvasci kao aerobni i anaerobni mikroorganizmi spadaju u porodicu gljiva. Pivski kvasci pripadaju rodu *Saccharomyces* i igraju ključnu ulogu u procesu proizvodnje piva. Postoje dvije glavne vrste pivskih kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae*, koji su poznati kao ale kvasci ili kvasci gornjeg vrenja i *Saccharomyces pastorianus*, koji spadaju u lager kvasce ili kvasce donjeg vrenja. Ove dvije vrste kvasaca rade na različitim temperaturama, pri čemu ale kvasci fermentiraju pri temperaturi od 18-24°C, dok lager kvasci fermentiraju pri nižoj temperaturi od 10-13°C. Kvasci se dodaju u sladovinu, gdje prerađuju šećer iz sladovine u etanol i ugljikov dioksid u procesu nazvanom alkoholna fermentacija. Ovaj proces je ključan za stvaranje piva. Uz etanol i ugljikov dioksid, tijekom fermentacije nastaju i različiti sekundarni metaboliti, uključujući ketone i estere, koji utječu na okus i miris piva. Kvasci gornjeg vrenja takozvani ale kvasci, obično proizvode pivo s izraženim voćnim aromama zbog veće produkcije estera. S druge strane, piva proizvedena kvascima donjeg vrenja takozvani lager kvasci, često zadržavaju sumporastu aromu. Ovisno o željenom stilu piva, pivari pažljivo biraju vrstu kvasca i kontroliraju uvjete fermentacije kako bi postigli željeni profil okusa i mirisa u konačnom proizvodu.<sup>5</sup>

#### **1.5 Tehnološka shema proizvodnje piva**

Proizvodnja piva je složen proces koji uključuje niz koraka i preciznih postupaka kako bi se stvorilo ukusno i kvalitetno pivo. Sastoji se od dvije faze tehnologija slada i tehnologija piva.<sup>6</sup>

Proizvodnja sladovine se sastoji od pripreme slada koje obuhvaća čišćenje, pranje, sortiranje, namakanje i sušenje. Zatim započinje mljevenje slada u mlinu za mljevenje u ovom koraku se razara ljuska ječma i omogućava se pristup škrobu, što je potrebno za stvaranje sladovine, tekućine bogate šećerima za fermentaciju pive. Mora se postići odgovarajuća veličina mljevenih čestica ječma. Ako se previše usitni voda će otežano teći kroz zrnenu masu koja se može zgrudvati. To može uzrokovati probleme u ispiranju sladovine i smanjiti učinkovitost

ekstrakcije škroba. S druge strane ako se premalo usitni velike čestice mogu otežati enzimima da dospiju do škroba i razlože ga u šećere. To bi izazvalo manje efikasan proces fermentacije.<sup>7</sup> Sitno mljeveni slad se zagrijava s vodom kako bi sladna zrna nabubrila, pukla i stvorila škrobno ljepilo taj proces se naziva ukomljavanje. Zatim se škrobno ljepilo otapa i razgrađuje odnosno dolazi do hidrolize šećera.<sup>8</sup> Glavni cilj ovog procesa je dobivanje tih jednostavnih šećera kako bi ih mikroorganizmi tijekom fermentacije mogli pretvoriti u alkohol i druge proizvode.<sup>9</sup> Filtrirana sladovina se zatim kuha s hmeljom koji doprinosi gorčinu piva.<sup>6,8</sup> Ovim postupkom se također pospješuje taloženje i povećanje obojenosti jer se inaktiviraju određeni enzimi. Nakon toga ide bistrenje pa hlađenje sladovine na temperaturu pogodnu za rast kvasaca. Hladi se pomoću različitih izvedbi izmjenjivača topline. Sladovina sadrži visok udio bjelančevina koje se talože snižavanjem temperature.<sup>7</sup>

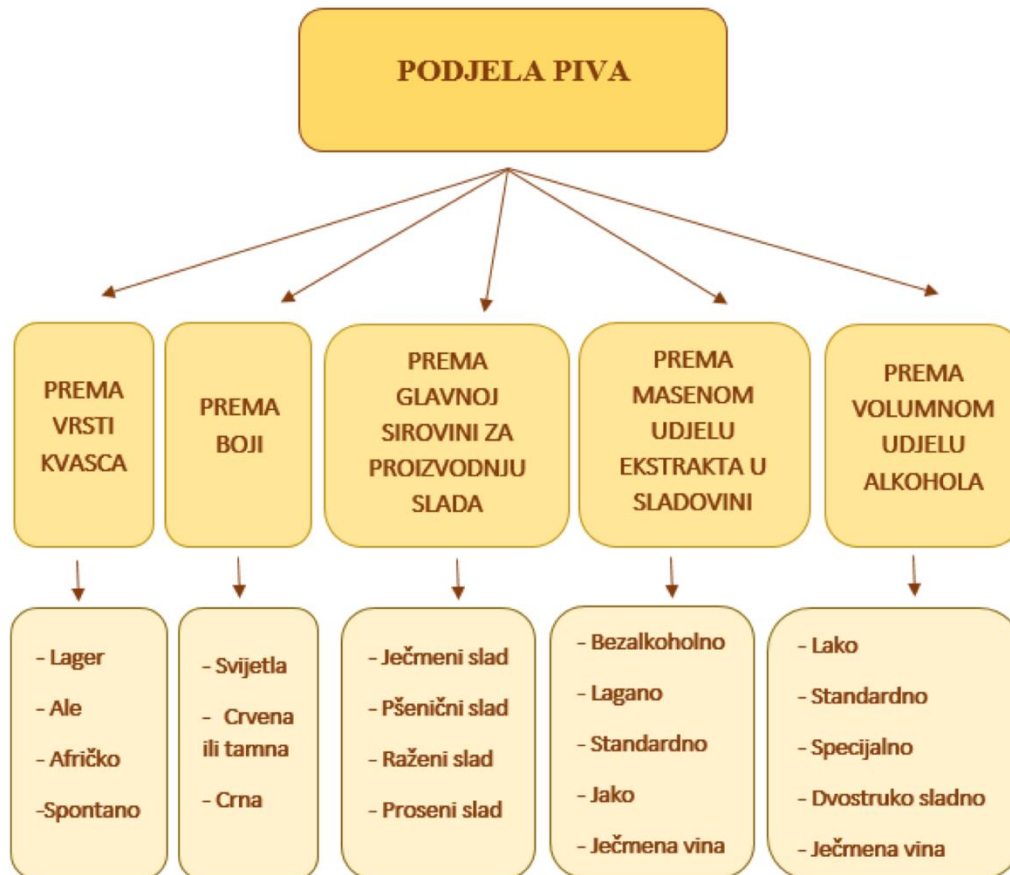
Druga faza je tehnologija piva i započinje dodavanjem kvasaca i fermentacijom. Ohlađena sladovina pretaka se fermentor gdje se inokulira pivskim kvascem. Kvasac je mikroorganizam koji metabolizira šećere u sladovini, pretvarajući ih u alkohol i ugljični dioksid. Ovaj proces obično traje nekoliko dana do tjedana, ovisno o vrsti piva i uvjetima fermentacije. U procesu proizvodnje piva, osim etanola i ugljikovog dioksida, nastaju i brojni drugi kemijski spojevi koji utječu na okusa piva. Ako njihova koncentracija postane previsoka, to može negativno utjecati na ukus, miris i stabilnost piva, uključujući i formiranje pivske pjene. Nepoželjni aromatski spojevi mogu uključivati povećane koncentracije diacetila, aldehida i sumpornih spojeva. Ovi spojevi često nastaju kao posljedica ubrzanog procesa fermentacije ili skraćenog razdoblja dozrijevanja piva. Poželjni aromatski spojevi obično uključuju više alkohole i estere, koji pridonose bogatijem i uravnoteženijem profilu okusa i mirisa piva. Tijekom fermentacije treba održavati stabilnu temperaturu kako bi se osigurala pravilna aktivnost kvasca. Različite vrste piva zahtijevaju različite temperature fermentacije. Kada kvasac završi svoj rad, fermentacija se zaustavlja. Na ovom se koraku alkohol sadržan u sladovini znatno povećava, a dodatne arome i okusi se razvijaju dok se kvasac odvaja od gotovog piva. Neka piva zahtijevaju dodatno sazrijevanje. Gotova piva se filtrira i puni u boce, limenke ili bačve za distribuciju.<sup>6</sup>



Slika 1. Tehnološka shema proizvodnje piva<sup>9</sup>

## 1.6 Podjela piva

Piva se klasificira po različitim kriterijima: prema vrsti kvasaca, prema boji, prema glavnoj sirovini, prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini, prema volumnom udjelu alkohola.<sup>1</sup>



Slika 2. Podjela piva<sup>1</sup>

Prema vrsti kvasca piva može biti:

- Lager- piva donjeg vrenja koristi se kvasac *Saccharomyces pastorianus* takozvani lagerni kvasac. Fermentacija se događa na nižim temperaturama, obično između 7 °C i 13 °C zato se naziva i hladno vrenje, kvasci se talože na dno posude. Ovaj kvasac fermentira sporije i daje pivu izraženu gorčinu i aromu po hmelju s manje voćnih aroma.
- Ale- kvasac *Saccharomyces cerevisiae* se koristi za fermentaciju na višim temperaturama, obično između 15 °C i 24 °C. Ova vrsta kvasca brže fermentira i često

daje voćne, cvjetne i začinske arome pivu. Naziva se piva gornjeg vrenja jer kvasac na kraju ispliva na površinu.

- Afričko- se proizvodi uz pomoć posebne vrste kvasca *Schizomyces pomb* koji djeluje na visokim temperaturama (30 – 40 °C). Razlikuje se od ostalih piva jer se proizvodi se od prosenog slada, a ne ječmenog kao većina.
- Spontano- prevrela piva predstavljaju tradicionalni način proizvodnje piva koji ima dugu povijest u svijetu pivarstva. Iako je ova metoda danas rijetka, neki industrijski proizvođači je i dalje prakticiraju posebno za proizvodnju Lambic piva. Ova piva su poznata po svojoj jedinstvenoj karakteristici. U ovom postupku, koriste se neselektirani divlji sojevi kvasaca koji dolaze iz okoline, dospijevajući u sladovinu iz zraka ili s površina posuda i prostorija. Ti divlji kvasci često sadrže više hlapljivih spojeva i neprevrelog ekstrakta, što pivu daje poseban vinski, voćni, ponekad i fenolni okus. Ova piva često dobivaju dodatnu aromu kada se fermentiraju uz dodatak voća, što pridonosi voćnoj slatkoći i mirisu pivu. Fermentacija Lambic piva odvija se u dvije faze. Prva faza traje 3 do 6 mjeseci, tijekom koje se proizvodi etanol. U drugoj fazi, koja traje 12 do 24 mjeseca, proizvode se uglavnom kiseline. Ova dugotrajna fermentacija i kompleksni procesi stvaraju jedinstvene arome i okuse, čineći Lambic piva jednim od najspecifičnijih stilova piva na svijetu..<sup>11,12</sup>

## 1.7 Lambic piva

Belgijanci s posebnim ponosom čuvaju svoju bogatu pivsku tradiciju koja datira još od 11. stoljeća. Izdvajaju se po jedinstvenom pivu lambic, pšenična piva koje se dobiva spontanom vrenjem s divljim kvascima, postupkom koji nije uobičajen ni na jednom drugom mjestu na svijetu. To je razlog zašto se Belgija smatra svjetskom prijestolnicom piva. Lokacija ima ogromnu prednost jer ima izuzetnu mikrofloru. Postoji stotina karakterističnih divljih kvasaca od kojih su najpoznatiji '*Brettanomyces Bruxellensis*' i '*Brettanomyces Lambicus*'. Ti mikroorganizmi omogućuju kuhanje piva prema iznimnoj metodi: spontana fermentacija, također poznata kao prirodna ili divlja fermentacija.<sup>2</sup>

Spontana fermentacija koristi se u tradicionalnoj proizvodnji piva, vina i jabukovače. Međutim, u proizvodnji piva, upotreba spontane fermentacije je rijetka zbog poteškoća u kontroliranju samog procesa fermentacije. Unatoč tome, lambic piva se ipak proizvodi putem spontane fermentacije. Ovaj poseban stil piva tradicionalno se proizvodi Belgiji u krugu od petnaest kilometara od Bruxellesa, dolina rijeke Senne i okolnoj regiji, jer to područje pruža optimalne

uvjete za spontanu fermentaciju, što znači da umjesto upotrebe uzgojenih sojeva kvasca, oslanja se na divlji kvasac i bakterije prisutne u okolišu kako bi fermentirala piva. Koncentracija voćnjaka i tradicionalnih seoskih pivovara stvara idealno okruženje za razvoj divljeg kvasca i bakterija koji postaju aerotransportirani tj. prenose se zrakom i to omogućava proizvodnju lambic piva. Postupak proizvodnje lambic piva uključuj ostavljanje mljeva (nefermentiranog piva) izloženog otvorenom zraku tijekom hlađenja. Dok se mljevo hladi, dolazi u kontakt s lokalnim mikroorganizmima prisutnima u zraku, posebno oko voćnjaka gdje divlji kvasac obiluje zbog prisutnosti voća i procesa fermentacije. Divlji sojevi kvasca kao što su *Saccharomyces* i *Brettanomyces* te različite bakterije poput *Lactobacillus* i *Pediococcus* koje su prirodno prisutne u okolišu, talože se na izloženom mljevu i započinju proces fermentacije.<sup>2</sup> Jedinstvena kombinacija ovih divljih mikroorganizama daje lambic pivu njegov prepoznatljiv okus. Kako bi očuvali tradicionalni aspekt proizvodnje lambic piva, mnogi pivari u regiji odbijaju koristiti uzgojeni kvasac i nastoje sačuvati jedinstvenu mikrobnu bioraznolikost svog određenog područja proizvodnje. Kao rezultat toga, lambic piva nije samo ukusno i intrigantno piće, već i živi dokaz interakcija između prirode i ljudske vještine u svijetu pivarstva. Sezona proizvodnje lambic piva počinje u rujnu i završava u travnju.<sup>14</sup> Tradicija je proizvoditi lambic piva tijekom hladnijih mjeseci godine kako bi se spriječilo potencijalno kvarenje mljeva tijekom toplijih ljetnih mjeseci. Mljevo se ostavlja da se preko noći hladi u otvorenim plitkim posudama (hladnjacima), a zatim se inokulira prirodnim mikroflorom prisutnom u okolini. Kada se mljevo do kraja noći ohladi, prebacuje se u metalne ili drvene bačve i pohranjuje u skladištima koja nemaju klimatizaciju. Temperature u tim skladištima mogu varirati od 0 do 25 °C.<sup>15</sup>

Proces fermentacije lambic piva može se podijeliti na četiri različite faze, pri čemu mikroorganizmi doprinose ključnim okusnim i aromatskim spojevima u svakoj fazi. U prvoj fazi fermentacije dominira *Kloeckera apiculata* (divlji kvasac) i enterične bakterije. U drugoj fazi fermentacije dominira *Saccharomyces sp.*, a slijede ih mliječnokiselinske bakterije u trećoj fazi. *Brettanomyces*, poznat i kao "brett", je divlji kvasac često povezan s kvarenjem crvenih vina i jabučnog soka. Kod lambic piva, brett donosi očekivane i pozitivne okusne karakteristike i dominira četvrtom i posljednjom fazom fermentacije.<sup>16</sup>

Hlapljivi i polu-hlapljivi spojevi koji se nalaze u lambic pivu potječu iz različitih kemijskih grupa, kao što su esteri, kiseline, viši alkoholi (fusilni alkoholi- mješavine viših alkohola proizvedeni kao nusproizvod alkoholnog vrenja) i fenoli. Esteri igraju važnu ulogu u aromatskom profilu ovog posebnog stila piva, a nastaju kao nusproizvodi različitih



mikroorganizama. Esteri su dobro poznati po svojim voćno-cvjetnim aromama. Dva najutjecajnije estera koji se proizvode u lambic pivima su etil-laktat i etil-acetat, koji potječu od mliječne i octene kiseline tijekom treće faze fermentacije.<sup>13</sup>

Gueuze piva su kombinacija mladog (starog 1 godinu) i starog (starog 2 i 3 godine) piva. Ova mješavina omogućuje da se različiti okusi i aromatični profil starijih lambic piva izmiješaju s blagim i svježim karakteristikama mladih lambic piva. Gueuze je sličan šampanjcu jer se sekundarna fermentacija odvija u boci.<sup>15</sup>

Lambic piva su važna u belgijskoj kulturi i pivskoj tradiciji. Ona su dio identiteta regije Pajottenland i imaju ključnu ulogu u očuvanju pivske baštine. Lambic piva su stekla globalnu popularnost među pivoljupcima koji cijene jedinstvenost i složenost ovog stila.<sup>2</sup>

## **1.8 Senzorika piva**

Senzorska analiza je znanstvena disciplina koja se bavi poticanjem, mjerenjem, analizom i interpretacijom reakcija osjetila vida, mirisa, okusa, dodira i sluha na karakteristike hrane i tvari. U ovoj disciplini nema upotrebe tehničkih mjernih instrumenata, već se oslanja na ljudska osjetila.<sup>17</sup>

Postoje različite vrste testova koji se koriste u senzorskim analizama:

Testovi razlika: Ovi testovi usmjereni su na utvrđivanje postoji li razlika između različitih uzoraka. Mogu biti opći testovi razlika (gdje se ispituje postojanje bilo kakvih razlika između uzoraka) ili testovi razlika u obilježjima (koji se fokusiraju na specifična obilježja proizvoda).

Testovi sklonosti: Ovi testovi uključuju testove preferencija i testove prihvatanja. Koriste se kako bi se razumjelo što potrošači vole i kako bi se razvijali novi proizvodi, istraživalo tržište te poboljšavala aroma, tekstura, okus i ukupni proizvod.<sup>18</sup>

Opisni testovi: Opisni testovi su najnaprednija vrsta testova za senzorsku analizu. Uključuju opis svih kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika proizvoda koje provode panelisti.<sup>19</sup>

Okus piva nije konstantan i može se mijenjati tijekom vremena. Stabilnost okusa igra ključnu ulogu u određivanju roka trajanja proizvoda. Stoga je važno pratiti promjene u okusu piva kako bi se osigurala njegova kvaliteta i sigurnost za potrošače. Samo oko 20% svjetske populacije ima talent za kušanje, što im omogućava da nakon senzorske obuke prepoznaju i ocijene intenzitet okusa u pivu.<sup>20,21</sup>



## 1.9 Hlapljivi spojevi u lambic pivu

U lambic pivima se tijekom procesa fermentacije proizvode mnogi spojevi kao metabolički intermediati ili nusproizvodi kvasca i bakterija, a najznačajniji su kiseline i esteri. Hlapljivi i polu-hlapljivi spojevi identificirani u lambic pivima dolaze iz različitih kemijskih klasa, uključujući alkohole, kiseline, estere, ketone, aldehide i fenole. Izvori nastanka spojeva mogu biti sirovine, nusprodukti metabolizma kvasaca ili kontaminirajućih mikroorganizama, mogu nastati skladištenjem.<sup>13,25</sup>

Sušenjem i prženjem slada nastaje prva skupina hlapljivih spojeva koju čine spojevi Maillardove reakcije. Drugu skupinu čine eterična ulja iz hmelja koja se ispuštaju kuhanjem. Najvažniji spojevi nastaju postupkom fermentacije.<sup>26</sup>

Razlike u relativnim koncentracijama spojeva prisutnih u pivu mogu se primijetiti jer lambic piva prolaze kroz dulje fermentacijske i sazrijevajuće periode (najmanje godinu dana, ponekad i do tri godine). Vremenom se formiraju i razgrađuju kemijski spojevi, što može utjecati na okus i aromu piva.<sup>13</sup>

Esteri su posebno važni za dodavanje voćnih nota u piva i smatraju se indikatorima starenja piva.<sup>27</sup> Neki esteri, poput izoamil-acetata koji daje pivu okus banane, mogu se s vremenom smanjiti ispod praga osjetljivosti, što rezultira gubitkom voćnosti u pivu. Međutim, drugi esteri, poput etil-izovalerata i etil-izobutirata, mogu se razvijati tijekom starenja piva. Njih u usporedbi s etanolom i ugljičnim dioksidom ima u znatno manjoj količini, ali igraju važnu ulogu u ukupnoj aromi gotovog proizvoda, jer imaju niski prag osjetljivosti na miris u pivu. Stoga je važno da pivari nastoje uravnotežiti koncentraciju estera s drugim okusnim spojevima. Esteri se uglavnom formiraju tijekom aktivne faze fermentacijskog procesa enzimskom kondenzacijom organskih kiselina i alkohola. Esteri se specifično sintetiziraju unutar intracelularnog prostora fermentacijske stanice kvasca. Esteri se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: acetatni esteri i etilni esteri srednjih lanaca masnih kiselina (MCFA). Acetatni esteri nastaju iz octene kiseline s etanolom ili višim alkoholom. Neki najznačajniji esteri i njihove arome: etil-acetat (voćno, slatkasto), izoamil-acetat (banana, jabuka), 2-feniletalacetat (ruža, med, jabuka, slatkasto), etil-butanoat (tropsko voće), etil-heksanoat (slatka jabuka), etil-oktanoat (kisela jabuka), etil-dekanoat (cvjetno).<sup>28,29</sup>

Zbog toga u pivu možemo prepoznati različite arome koje podsjećaju na jabuku (acetaldehid), slad (aldehidi razgranatog lanca), zemlju (metional), cvijeće (2-fenilacetaldehid) te badem ili

trešnju (benzaldehyd).<sup>30</sup> Važno je napomenuti da aldehidi prisutni u pivu mogu potjecati kako od kvasaca tako i od drugih izvora. Na primjer, acetadehid je direktni nusprodukt metabolizma kvasaca tijekom procesa vrenja piva, istovremeno služeći kao prekursor za stvaranje etanola u glikolitičkom putu. Prilikom sinteze nezasićenih masnih kiselina nastaju aldehidi razgranatog lanca i 2-fenilacetaldehyd, ali u niskim koncentracijama.

Hlapljivi spojevi identificirani korištenjem GC–MS-a dolaze iz različitih kemijskih grupa. Kod starijih piva može doći do drastične promjene zbog kontinuirane aktivnosti kvasca tijekom zrenja u boci i produljenog skladištenja. Kako piva stari, određeni esteri će se smanjiti, dok će drugi povećati, što dovodi do promjene arome piva koja podsjeća na vino.<sup>13</sup>

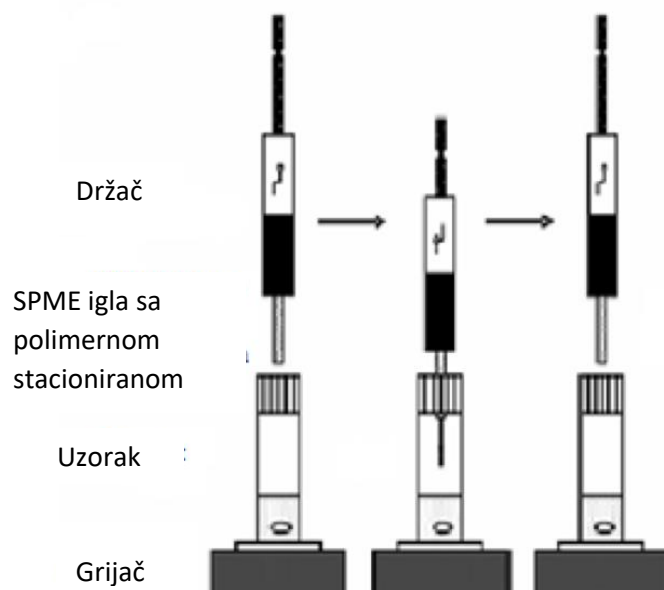
Ova raznolikost aroma u pivu doprinosi bogatstvu okusa i mirisa te čini pivski doživljaj raznolikim i uzbudljivim za ljubitelje piva. Važno je za pivare da razumiju i kontroliraju ove arome kako bi osigurali kvalitetu i konzistenciju svojih proizvoda.

#### **1.10 Metode izolacije hlapljivih spojeva**

Primjenom različitih tehnika izolacije dolazi do separiranja komponenti odgovornih za okus i miris proizvoda u njihovom izvornom obliku. Razne su metode za koncentriranje i/ili ekstrakciju hlapljivih spojeva, ali svaka nosi sa sobom izazov potencijalnog narušavanja sastojaka arome i/ili stvaranja neprirodnih aroma. Zbog ovoga je od velike važnosti osigurati blage uvjete izolacije kako bi se sačuvala izvorna aroma s minimalnim gubicima te kako bi se izbjegla neželjena oksidacija, promjena pH vrijednosti, termalna degradacija i druge kemijske ili biokemijske promjene. Važno je moći pretpostaviti koji će se hlapljivi spojevi pojaviti, pogotovo ako značajno utječu na aromu, kako bi se odabrala najbolja metoda izolacije. Kod određivanja aroma u lambic pivima koristili smo metodu mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi te GC-MS.<sup>31</sup>

### 1.10.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Krajem 20. stoljeća otkrivena je jednostavna, brza i učinkovita metoda ekstrakcije spojeva iz plinovitih, čvrstih i tekućih uzoraka. Metoda mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*; HS-SPME) koja pripada grupi sorpcijskih tehnika. HS-SPME se uspješno koristi za ekstrakciju hlapljivih i poluhlapljivih spojeva te se kombinira sa sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Prednost ove tehnike leže u integriranju ekstrakcije, koncentriranja i prijenosa u jednom koraku prema plinskom kromatografu. Postupak HS-SPME se sastoji od dva koraka. Spojevi se prvo distribuiraju između matrice uzorka i ekstrakcijske faze. Nakon toga slijedi drugi korak, gdje se koncentrirani ekstrakti desorbiraju iz faze ekstrakcije i prenose u analitički instrument. Aparatura je relativno jednostavna i sastoji se od nekoliko osnovnih komponenti. Izgleda poput modificirane šprice i sastoji se od igle, nosača i SPME vlakna slika 4. SPME vlakno je tanak sloj optičkog vlakna prekriven tankim slojem polimernog materijala, čija je osnovna svrha adsorbirati i koncentrirati organske spojeve iz uzorka. Odabir vrste SPME vlakna ima velik utjecaj na selektivnost ekstrakcije. Na primjer, polarna vlakna koriste se za izolaciju polarnih spojeva, dok se za nepolarne spojeve koristi nepolarno vlakno. Količina ekstrahiranih spojeva ovisi o trajanju ekstrakcije i koncentraciji hlapljivih spojeva u uzorku. Vrijeme ekstrakcije određuje koliko dugo SPME vlakno dolazi u kontakt s uzorkom. Prije upotrebe, vlakno se mora kondicionirati zagrijavanjem na visokoj temperaturi par sati. Pozitivne karakteristike ove ekstrakcije uključuju jednostavnost i brzinu izvođenja, nepotreban rad s otapalima, ponovljivost rezultata, visoku osjetljivost, stabilnost vlakna i potrebu za malom količinom uzorka. Međutim, nedostatak metode ovisi o količini hlapljivih spojeva, težini, duljini i vrsti vlakna, vremenu uzorkovanja i temperaturi.<sup>32,33</sup>



Slika 4. Shematski prikaz HS-SPME ekstrakcije<sup>32</sup>

### 1.10.2 Mikroekstrakcija vršnih para na tekućoj fazi

Metoda ekstrakcije tekuće-tekuće se bazira na varijaciji topljivosti tvari u otapalima koji se ne miješaju. Osnovna primjena ove metode uključuje upotrebu lijevka za odvajanje. Ovaj postupak se temelji na difuziji, gdje dolazi do separacije tvari između dvaju otapala, obično između vodene otopine tvari i organskog otapala koje se ne miješaju. Efikasnost ovog procesa može se povećati ponavljanjem postupka s manjim količinama otapala više puta, umjesto korištenja jednog velikog postupka s velikom količinom otapala. Ova metoda ima pozitivne karakteristike kao što su jednostavna primjena i učinkovita ekstrakcija aromatičnih spojeva. Nedostaci uključuju gubitak najlakših isparljivih spojeva prilikom uklanjanja otapala, stvaranje emulzije i velike količine uzorka kako bi se dobio koncentrirani ekstrakt.

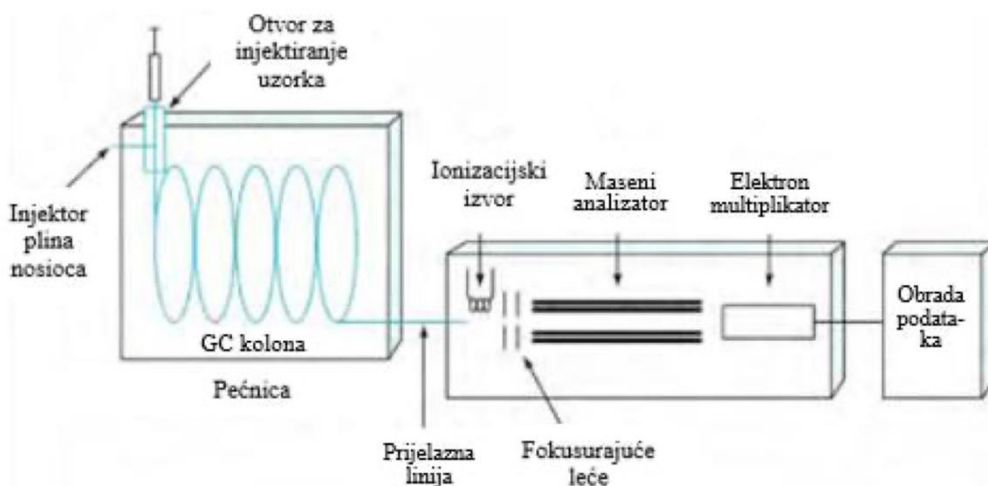
### 1.10.3 GC-MS

Nakon izolacije hlapljivih spojeva primjenjuje se analiza i identifikacija hlapljivih spojeva pomoću metode plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS).

GC-MS (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) je analitička metoda koja omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih spojeva u uzorcima. Ova tehnika kombinira dvije različite tehnologije: plinsku kromatografiju (GC) i maseni spektrometar (MS). Analiza plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (GC-MS) obavlja se za spojeve niske molekulske težine, umjerene ili niske polarnosti te često u niskim koncentracijama. Ove analize provode se u plinskom agregacijskom stanju kako bi omogućili razdvajanje i identifikaciju ovih spojeva. Jedan od izazova pri izvođenju analiza GC-MS-a jest razlika u tlakovima između plinskog kromatografa i masenog spektrometra. Ovaj problem rješava se primjenom vakuumske pumpe koja omogućuje prijenos spojeva iz plinskog kromatografa u maseni spektrometar. Također, kapilarni stupci plinske kromatografije često se koriste kako bi se poboljšala učinkovitost i razdvajanje spojeva.<sup>34</sup>

Proces započinje ubrizgavanjem uzorka u plinsku kromatografiju, gdje se komponente razdvajaju temeljem njihovih različitih interakcija s mobilnom (plinskom) i stacionarnom (kolonom) fazom. Svaki spoj prolazi kroz kolonu u različito vrijeme, što rezultira odvajanjem komponenata uzorka u vremenskom slijedu.<sup>35</sup>

Nakon razdvajanja u plinskoj kromatografiji, spojevi ulaze u maseni spektrometar. Ova tehnologija mjeri mase i ionske snage spojeva koji izlaze iz plinske kromatografije. MS generira maseni spektar za svaku komponentu, što omogućuje identifikaciju kemijskih spojeva na temelju njihove jedinstvene masene strukture.



Slika 5. Shematski prikaz GC-MS uređaja<sup>32</sup>

Kombinacija ovih dviju tehnika omogućuje visoku osjetljivost, preciznost i selektivnost pri analizi različitih spojeva u uzorcima. GC-MS se široko koristi u analizi hrane, pića, lijekova, kozmetike i svih složenih smjesa kao što je piva.

Uzorak se injektira u separacijsku termostabilnu kolonu. U toj koloni smjesa se razdvaja, a zatim plin nositelj odvodi komponente prema spektrometru mase ili detektoru. Nakon toga, dobiveni spektar masa uspoređuje se s bazom podataka pohranjenom u računalu. To omogućuje određivanje postotka podudaranja spektara i identifikaciju spoja. Osim toga, tehnika pruža informacije o retencijskom vremenu, što je vrijeme zadržavanja pojedinog spoja u koloni.<sup>35,36</sup>

Piva je kompleksno piće koje je rezultat brojnih bioloških i kemijskih reakcija koje proizvode stotine spojeva koji doprinose aromi i okusu pića.



## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1 Opis uzoraka**

#### **2.1.1 Piva s okusom maline**

Lambic piva s okusom maline. U mladu Belgijsku pivu staru najmanje godinu dana se macerira najmanje 30 % filtrata maline. Sadrži 375 mL, 2,5 % alkohola. Tamno roze boje sa svjetlo rozom pjenom. Sadrži 52 kcal (100 mL).<sup>2</sup>

#### **2.1.2 Piva s okusom jabuke**

Lambic piva s okusom jabuke. Mješavina više biranih sorti jabuka i mlade Belgijske pive stare najmanje godinu dana. Sadrži 375 mL, 3,5 % alkohola. Ima zlatnu boju meda s bijelom pjenom. Sadrži 53 kcal (100 mL).<sup>2</sup>

#### **2.1.3 Piva s okusom višnje**

Lambic piva s okusom višanja. Koristi se mlada Belgijska piva i 25 % filtrat svježih višanja koji se macerira prije filtriranja i pasterizacije piva. Sadrži 375 mL, 3,5 % alkohola. Crvene boje sa svjetlo crvenom pjenom. Sadrži 53 kcal (100 mL).<sup>2</sup>

#### **2.1.4 Piva s okusom breskve**

Lambic piva s okusom breskve. Koristi se mlada Belgijska piva stara najmanje jednu godinu. U kojoj se 30 % svježe filtrirane breskve macerira. Sadrži 375 mL, 2,5 % alkohola. Zlatno narančaste boje s svjetlijom pjenom. Sadrži 53 kcal (100 mL).<sup>2</sup>

## 2.2 Eksperiment- SENZORSKA ANALIZA

Senzorska analiza proučava svojstva hrane pomoću ljudskih osjetila vida, mirisa, okusa, sluha i dodira. Parametri poput mirisa, okusa, izgleda, teksture i zvuka igraju ključnu ulogu u ocjeni senzorske kvalitete proizvoda. Analizom tih karakteristika može se donijeti prosudba prihvaćanja određenog proizvoda.<sup>37</sup> i pouzdana, važno je odabrati odgovarajući broj reprezentativnih uzoraka za objektivno ocjenjivanje. Ovo osigurava da rezultati budu relevantni i pouzdani te da se dobije realna slika senzorskih svojstava proizvoda. Odabir uzoraka koji dobro predstavljaju proizvod pomaže osigurati da ocjenjivači mogu donijeti objektivne i konzistentne prosudbe o senzorskoj kvaliteti proizvoda. Senzorskim ispitivanjem određuju se različita svojstva npr. boja, mutnoća, gorčina, visina i trajnost pjene. Potrošače ponajviše zanima ocjena piva za osjetilo okusa zatim mirisa, svježina te intenzitet gorčine.

Kako bi se osigurala kvaliteta piva, provodi se interna organoleptička ocjena prije i nakon punjenja u ambalažu. Ocjenu obavljaju profesionalni ocjenjivači koji su prošli različite testove za raspoznavanje okusa razrijeđenog, zaslađenog i zagorčenog piva. Ovi stručnjaci imaju obučeno nepce i sposobnost preciznog procjenjivanja okusa i mirisa piva kako bi osigurali da proizvod ispunjava standarde kvalitete i ukusa. Ova interna organoleptička ocjena pomaže identificirati bilo kakve varijacije u kvaliteti piva prije i nakon što je punjeno u ambalažu. Ako se tijekom ovog procesa otkriju nepravilnosti ili odstupanja od očekivanog profila okusa i mirisa, to može ukazivati na probleme u proizvodnji ili skladištenju, a proizvođači mogu poduzeti odgovarajuće korake za ispravljanje tih problema kako bi se osigurala dosljedna kvaliteta proizvoda.<sup>38,39</sup>



Slika 6. Uzorci

Provedena je senzorska analiza lambic piva: lambic piva s okusom jabuke (uzorak 101), lambic piva s okusom maline (uzorak 202), lambic piva s okusom breskve (uzorak 303), lambic piva s okusom višnje (uzorak 404).

Zadatak ispitivača bio je metodom kvantitativne deskriptivne analize opisati proizvode iste kategorije. Deskriptivni testovi nam govore kako se proizvodi razlikuju u specifičnim senzorskim svojstvima, a kvantitativni deskriptivni testovi mjere intezitet kvalitativnih elemenata pomoću raznih ljestvica.<sup>38</sup> Ova lambic piva su proizvedena u istoj tvornici na isti tehnološki način, ali su dodane različite arome. Također je korišten test preferencije odnosno test rangiranja preferencije. Ova vrsta testova se koristi kada se ispituju dva ili više uzoraka. Od ispitivača se traži da dodijele redoslijed uzorcima prema svojim željama. U analizi je sudjelovalo 20 ispitivača te su poslužena četiri uzorka u vremenu od 10 do 11 sati. Ispitanici su savjetovani da prije senzorskog ocjenjivanja ne jedu, ne piju i ne puše najmanje 30-60 min te da ne koriste losione i parfeme. Prije ocjenjivanja ispitanici su dobili kratke i jasne verbalne upute, a uzorci su kodirani. Kao sredstvo za čišćenje nepca poslužena je voda i kreker.

Svaki ispitivač je ispred sebe dobio papir s četiri kotača (slika 7.) za kvantitativnu analizu sva četiri uzorka te tablicu za preferenciju (tablica 1.).



Slika 7. Izgled kotača za kvantitativnu deskriptivnu analizu<sup>40</sup>

Središte kotača predstavlja minimalni intenzitet svih okusa, oni rastu udaljavajući se od središta kotača prema nazivu određenog okusa te ja najjači na opsegu kruga.

Tablica 1. Izgled testa rangiranja preferencije

IME I PREZIME:	
DATUM:	
UZORAK	PREFERENCIJA
101	
202	
303	
404	

Tablica s četiri kodirana uzorka, preferencija se stavlja na idući način:

1. Pored uzorka koji se ispitivaču najviše sviđa
2. Pored uzorka koji se ispitivaču idući sviđa
3. Pored uzorka koji se ispitivaču idući sviđa
4. Pored uzorka koji se ispitivaču najmanje sviđa



Slika 8. Uzorci s lijeva na desno 101, 202, 303, 404

### **2.3 Eksperiment- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

U ovom radu korištena su četiri različita uzorka lambic piva u svrhu izoliranja i identificiranja hlapljivih spojeva. Izolacija hlapljivih spojeva je izvedena korištenjem metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Ova metoda uključuje korištenje dvaju vrsta vlakana s različitim polarnostima: sivo vlakno s ovojnicom (divinilbenzen /karboksen /polidimetilsiloksan) i plavo vlakno s ovojnicom (polidimetilsiloksan / karboksen). Nakon što su hlapljivi spojevi izolirani pomoću ovih vlakana, provodi se identifikacija tih spojeva pomoću GC-MS uređaja (plinska kromatografija-masena spektrometrija). Ova tehnika omogućuje analitičku analizu hlapljivih spojeva kako bi se utvrdili njihovi kemijski sastavi i strukture.

### 2.3.1 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), koristi se 1 mL uzorka piva, pri čemu svaki uzorak zasebno stavlja u staklenu posudu zapremine 15 mL. Nakon toga, posuda se hermetički zatvara teflonskom septom. Zatvorena posuda se postavlja u vodenu kupelj koja je zagrijana na 60 °C. Sadržaj u posudi se miješa uz pomoć magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard) koja može raditi u rasponu brzina od 100 do 1400 o/min. Kupelj također ima termostat (Heidolph EKT 3001) kako bi održavala konstantnu temperaturu. Slika 9. nam prikazuje korištenu aparaturu za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Prema uputama proizvođača (Supelco Co., SAD, plavo vlakno se aktivira kondicioniranjem tijekom 30 minuta na temperaturi od 250 °C. To se postiže tako da se SPME igle postave u injektor plinskog kromatografa. Sivo vlakno se također kondicionira na isti način, ali u ovom slučaju se kondicionira tijekom 60 minuta na temperaturi od 270 °C. Nakon što su vlakna kondicionirana, koriste se za ekstrakciju vršnih para uzoraka.



Slika 9. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi

Koristili ste dvije različite vrste SPME vlakana, plavo i sivo vlakno (slika 10). Preliminarnim istraživanjem utvrdili ste da su ova vlakna najpogodnija za ekstrakciju vršnih para uzoraka, s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama. Evo više detalja o korištenim vlaknima:

- Sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužina ovog vlakna iznosi 5 cm (Supelco Co., SAD),
- Plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužina ovog vlakna iznosi 5 cm (Supelco Co., SAD).

Kondicioniranje uzorka trajalo je 15 min. SPME igla postavlja se u posudu, a vlakno se izvlači i provodi se ekstrakcija vršnih para 45 min, uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka meda (1000 o/min). SPME vlakno je vraćeno u iglu nakon uzorkovanja te je izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250°C na 7 min) gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.



Slika 10. Sivo i plavo vlakno<sup>35</sup>



### 2.3.2 GC-MS analiza hlapljivih slojeva

Analize uzoraka provedene su pomoću kolone s nepolarnom stacionarnom fazom HP-5MS, proizvedene od strane Agilent Technologies. Ova kolona ima kemijski sastav od 5 % difenila i 95 % dimetilpolisiloksana, dimenzije 30 metara x 0,25 milimetara, te debljinu sloja stacionarne faze od 0,25 mikrometara. Plin nositelj je helij protoka od 1 mL/min. Omjer cijepanja je 1:50, temperatura injektora postavljena je na 250 °C, temperatura detektora na 230 °C, a energija ionizacije 70 eV.



Slika 11. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Uz navedene analitičke metode, identifikacija hlapljivih spojeva provodila se i usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima koji se nalaze u bibliotekama masenih spektara. Konkretno, koristili su se podaci iz biblioteka masenih spektara, kao što su Wiley 09 (Wiley MS library) i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD), kako bi se usporedili maseni spektri dobiveni iz analiziranih uzoraka s masenim spektrima poznatih spojeva iz literature.



Rezultati GC-MS analize za svaki analizirani uzorak uključuju sljedeće podatke:

- Kromatogram ukupne ionske struje- to je grafikon koji prikazuje kako se intenzitet ionskog signala mijenja s vremenom tijekom analize. Kromatogram ukupne ionske struje pruža pregled razdvajanja različitih komponenata u uzorku tijekom plinske kromatografije.
- Naziv spoja ili spojeva i postotak sličnosti- na temelju analize masenih spektara, identificiraju se spojevi prisutni u uzorku. Za svaki pika na kromatogramu ukupne ionske struje određenje se najbližnji spektar ili spektri poznatih komponenata, a sličnost se izražava postotkom. Ovo omogućuje identifikaciju hlapljivih spojeva.
- Retencijsko vrijeme pojedinog kemijskog spoja- retencijsko vrijeme odnosi se na vrijeme koje je potrebno da se određeni spoj provede kroz kolonu plinske kromatografije i pojavi na detektoru. To je važan parametar za razdvajanje različitih komponenata u uzorku.
- Relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima: Ovo je postotna koncentracija svake identificirane komponente u uzorku. To omogućuje kvantifikaciju prisutnih spojeva i procjenu njihove koncentracije.

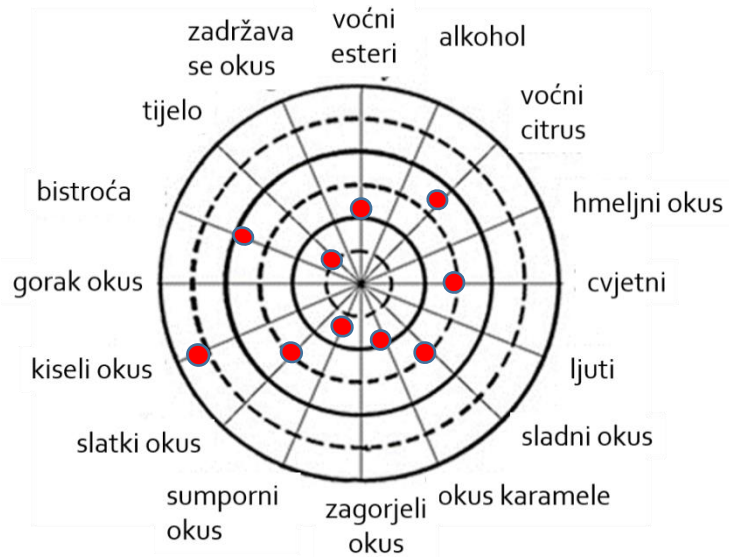
Ovi podaci zajedno čine kompletnu analizu GC-MS-a i omogućuju preciznu identifikaciju, kvantifikaciju i karakterizaciju hlapljivih spojeva u analiziranom uzorku.

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za HS-SPME.

### 3. REZULTATI

#### 3.1 Rezultati- SENZORSKA ANALIZA

UZORAK 101



Slika 12. Rezultati uzorka 101

UZORAK 202



Slika 13. Rezultati uzorka 202

UZORAK 303



Slika 14. Rezultati uzorka 303

UZORAK 404



Slika 15. Rezultati uzorka 404

Tablica 2. Rezultati testa preferencije

	1	2	3	4
101	10	7	3	/
202	4	4	3	9
303	2	4	8	6
404	4	5	6	5

Rezultati u tablici predstavljaj broj glasova od ukupno 20 ispitanika. Stupci označavaju preferenciju od 1 do 4. Dok redci predstavljaju broj uzorka.

### 3.2 Rezultati- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic jabuka -**plavo vlakno**

Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	5,11
2.	<900	heksanal	1,24
3.	<900	3-metil-butan-2-ol	1,46
4.	<900	2-furankarboksialdehid	2,07
5.	<900	etil-2-metilbutanoat	5,18
6.	<900	heks-3-en-1-ol	10,28
7.	<900	izoamil-acetat	1,29
8.	965	benzaldehid	3,90
9.	976	heksanska kiselina	0,86
10.	995	butil-butanoat	0,87
11.	996	etil-heksanoat	0,55
12.	1008	heks-3-enil-acetat	2,69
13.	1074	oktan-1-ol	0,31
14.	1105	nonanal	0,45
15.	1116	2-feniletanol*	10,50
16.	1170	4-etilfenol	0,69
17.	1173	etil-benzoat	0,34
18.	1174	oktanska kiselina	15,10
19.	1198	etil-oktanoat	2,26
20.	1256	2-feniletetil-acetat	2,69
21.	1273	nonanska kiselina*	1,03
22.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	6,53
23.	1382	dekanska kiselina*	8,33
24.	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3H)-on	5,57
25.	1570	dodekanska kiselina	0,60
26.	1976	heksadekanska kiselina	1,09
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>90,99</b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

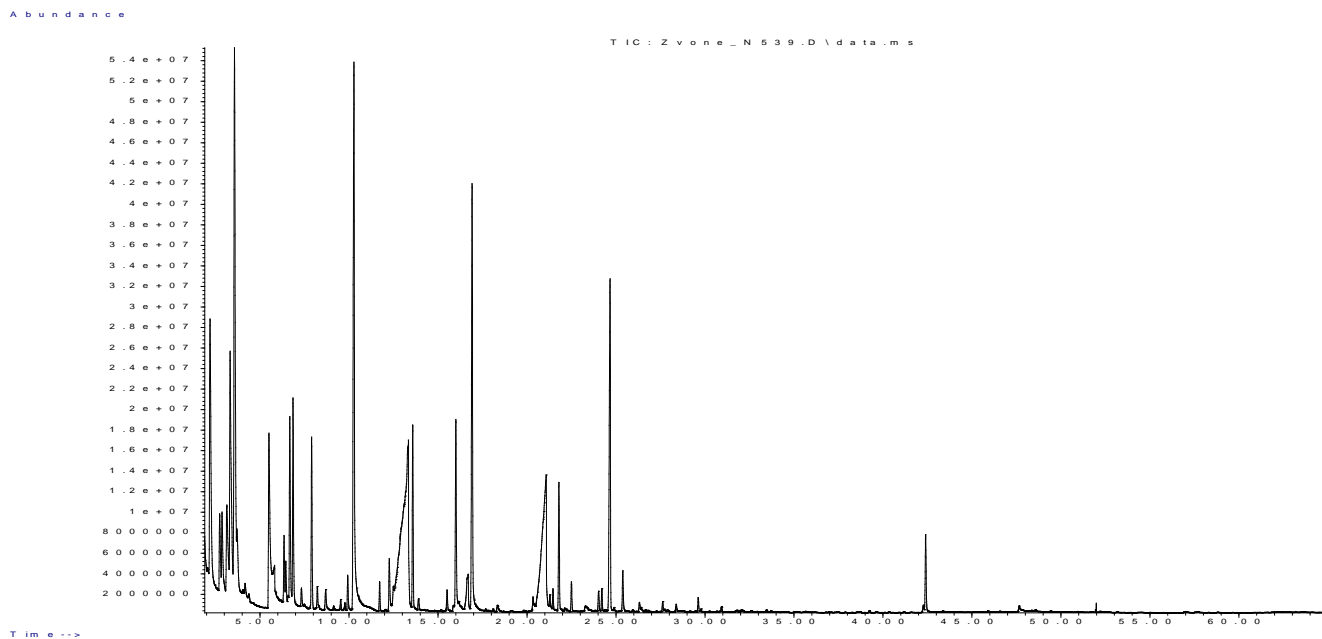
\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic jabuka -sivo vlakno

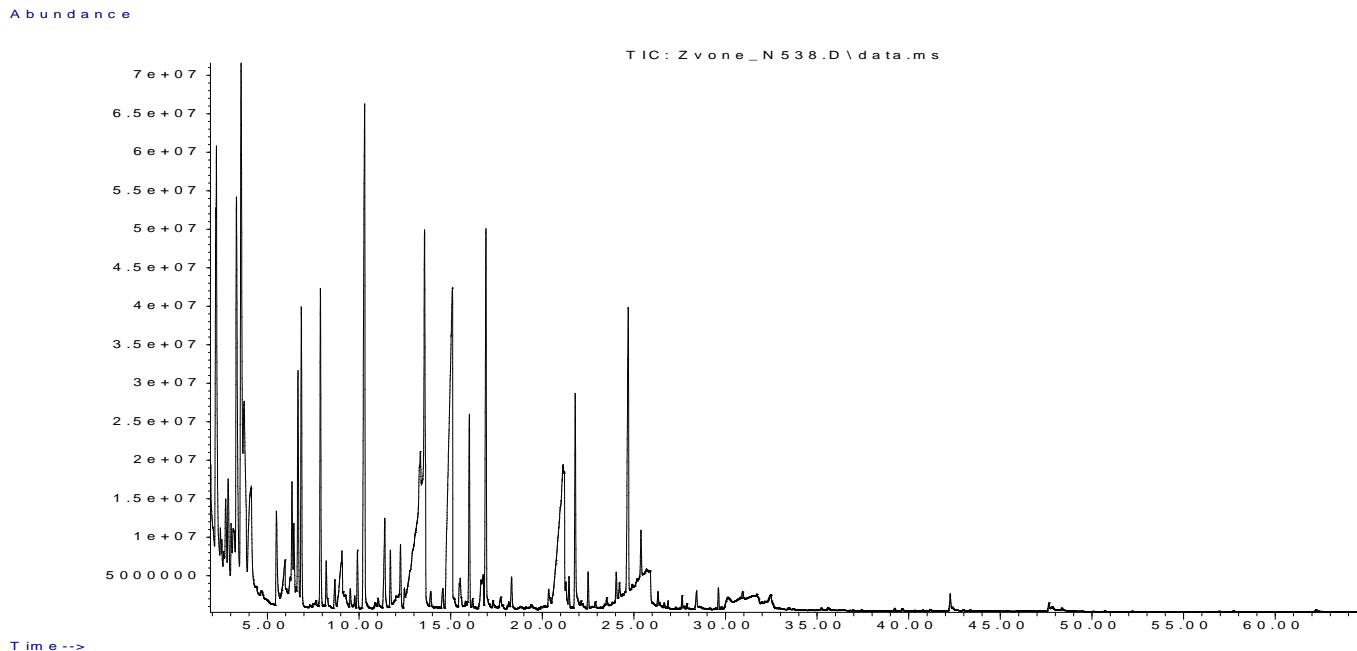
Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	5,32
2.	<900	2-furankarboksialdehid	0,96
3.	<900	heks-3-en-1-ol	4,97
4.	<900	izoamil-acetat	10,71
5.	965	benzaldehyd	1,20
6.	976	heksanska kiselina	1,34
7.	995	butil-butanoat	1,27
8.	996	etil-heksanoat	0,88
9.	1008	heks-3-enil-acetat	2,24
10.	1074	oktan-1-ol	0,28
11.	1105	nonanal	0,50
12.	1116	2-feniletanol*	6,38
13.	1145	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4 <i>H</i> -piran-4-on	1,10
14.	1170	4-etilfenol	0,95
15.	1173	etil-benzoat	0,18
16.	1174	oktanska kiselina	8,48
17.	1198	etil-oktanoat	6,50
18.	1230	5-hidroksimetilfurfural	10,71
19.	1256	2-feniletal-acetat	1,70
20.	1273	nonanska kiselina*	0,80
21.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	3,78
22.	1382	dekanska kiselina*	7,34
23.	1387	etil-dek-9-enoat	0,27
24.	1397	etil-dekanoat	1,98
25.	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3 <i>H</i> )-on	3,41
26.	1570	dodekanska kiselina	0,17
27.	1593	etil-dodekanoat	0,17
28.	1976	heksadekanska kiselina	0,15
<b>Ukupno identificirano</b>			<b>83,74</b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic jabuka izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).



Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic jabuka izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic malina -**plavo vlakno**

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	3,26
2.	<900	2-furankarboksialdehid	1,66
3.	<900	heks-3-en-1-ol	2,18
4.	<900	izoamil-acetat	0,67
5.	965	benzaldehid	0,77
6.	976	heksanska kiselina	0,59
7.	996	etil-heksanoat	0,39
8.	1003	oktanal	0,77
9.	1008	heks-3-enil-acetat	9,89
10.	1035	2-etil-heksan-1-ol	3,57
11.	1037	benzil-alkohol	0,59
12.	1074	oktan-1-ol	0,30
13.	1105	nonanal	4,42
14.	1116	2-feniletanol*	7,23
15.	1174	oktanska kiselina	5,00
16.	1198	etil-oktanoat	1,51
17.	1207	dekanal	0,31
18.	1256	2-feniletal-acetat	0,24
19.	1269	dek-2-enal	1,29
20.	1273	nonanska kiselina*	0,53
21.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	0,72
22.	1382	dekanska kiselina*	6,18
23.	1397	etil-dekanoat	1,28
24.	1485	$\beta$ -ionon	37,03
25.	1570	dodekanska kiselina	0,25
26.	1593	etil-dodekanoat	0,43
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>91,06</i></b>

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

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

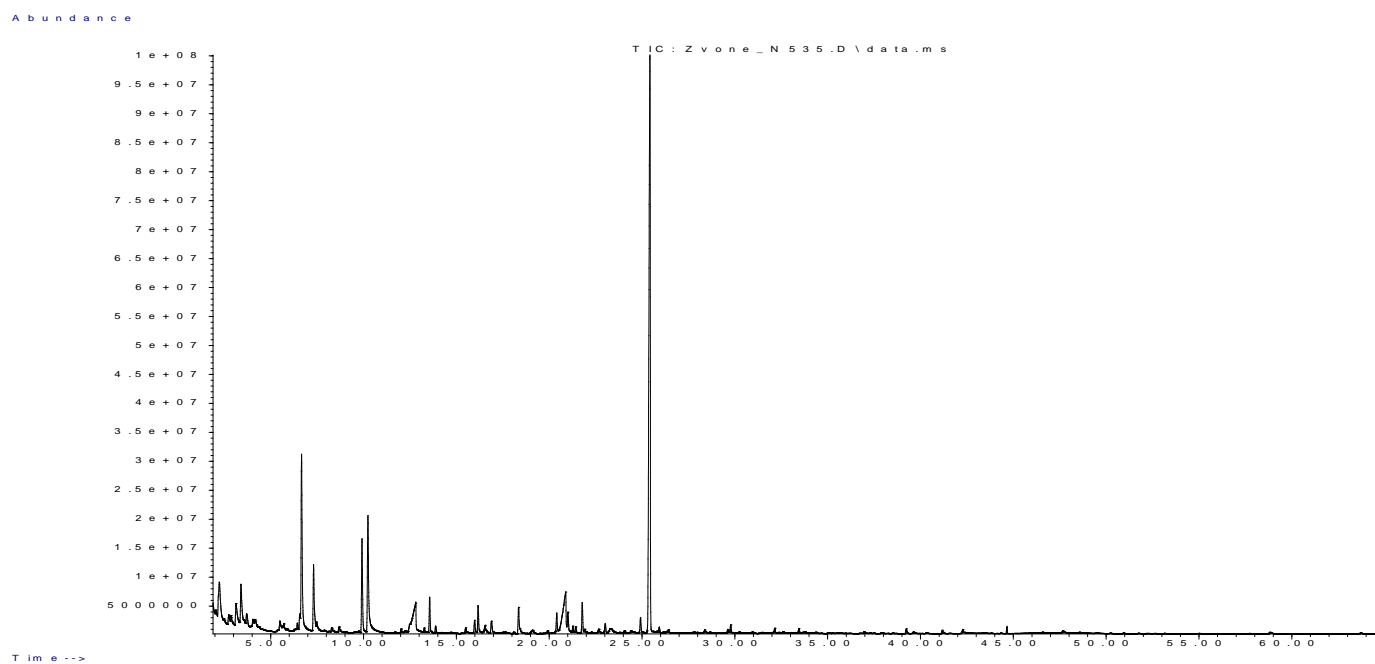


Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic malina -sivo vlakno

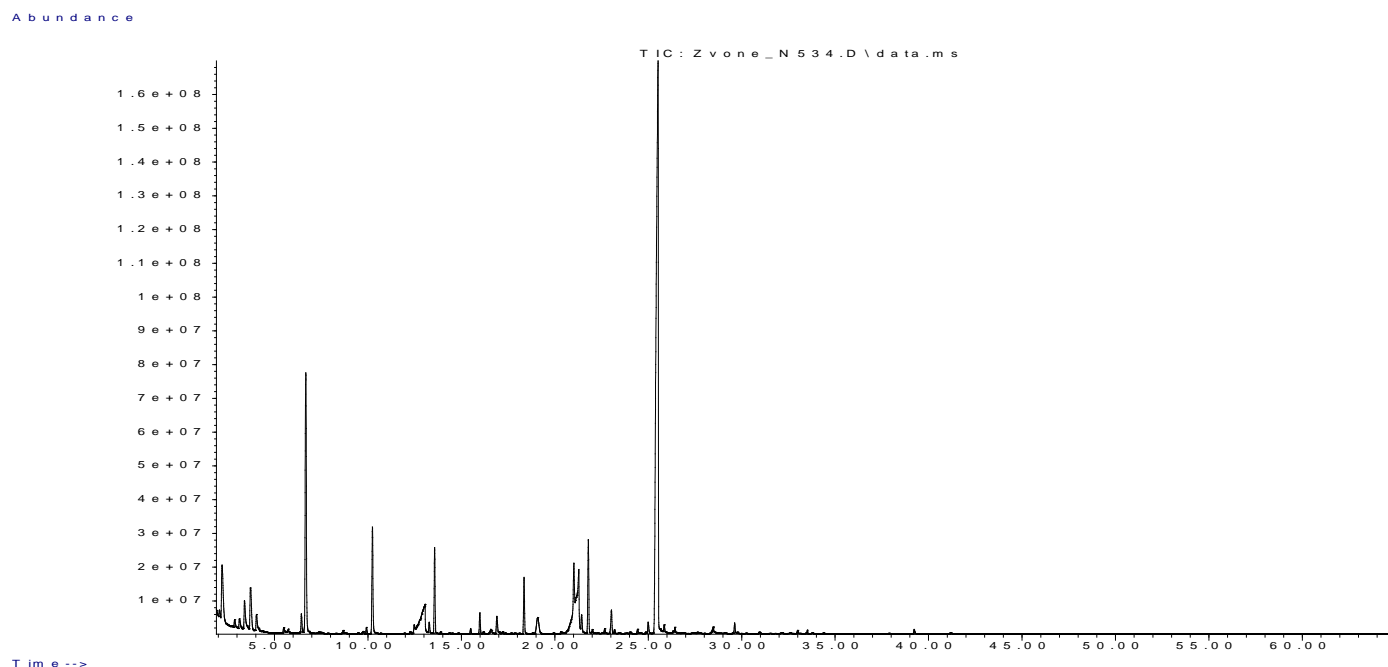
Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	2,98
2.	<900	2-furankarboksialdehid	0,49
3.	<900	heks-3-en-1-ol	1,57
4.	<900	izoamil-acetat	2,24
5.	965	benzaldehyd	0,22
6.	996	etil-heksanoat	0,64
7.	1008	heks-3-enil-acetat	10,70
8.	1105	nonanal	0,21
9.	1116	2-feniletanol*	3,92
10.	1173	etil-benzoat	0,35
11.	1174	oktanska kiselina	4,91
12.	1194	$\alpha$ -terpineol	0,39
13.	1198	etil-oktanoat	2,68
14.	1256	2-feniletal-acetat	0,16
15.	1273	nonanska kiselina*	0,25
16.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	0,62
17.	1382	dekanska kiselina*	5,48
18.	1397	etil-dekanoat	3,12
19.	1485	$\beta$ -ionon	45,00
20.	1554	4-(4-hidroksifenil)-buta-2-on (malina keton)	0,17
21.	1570	dodekanska kiselina	0,32
22.	1593	etil-dodekanoat	0,34
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>86,76</b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



Slika 18. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic malina izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).



Slika 19. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic malina izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic breskva -**plavo vlakno**

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	3,02
2.	<900	2-furankarboksialdehid	12,34
3.	<900	heksen-1-ol	3,74
4.	965	benzaldehyd	0,51
5.	976	heksanska kiselina	0,47
6.	994	$\beta$ -mircen	0,51
7.	996	etil-heksanoat	1,75
8.	997	oktanal	0,45
9.	1035	limonen	13,26
10.	1101	linalol	0,86
11.	1105	nonanal	3,22
12.	1116	2-feniletanol*	11,54
13.	1170	4-etilfenol	0,59
14.	1174	oktanska kiselina	4,98
15.	1194	$\alpha$ -terpineol	0,51
16.	1198	etil-oktanoat	8,16
17.	1207	dekanal	0,59
18.	1256	2-feniletal-acetat	2,62
19.	1269	dek-2-enal	0,91
20.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	5,66
21.	1382	dekanska kiselina*	4,00
22.	1383	geranil-acetat	0,32
23.	1387	etil-dek-9-enoat	0,57
24.	1397	etil-dekanoat	6,79
25.	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3H)-on	0,41
26.	1571	5-heptil-dihidrofuran-2(3H)-on	3,45
27.	1593	etil-dodekanoat	0,88
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>92,11</i></b>

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

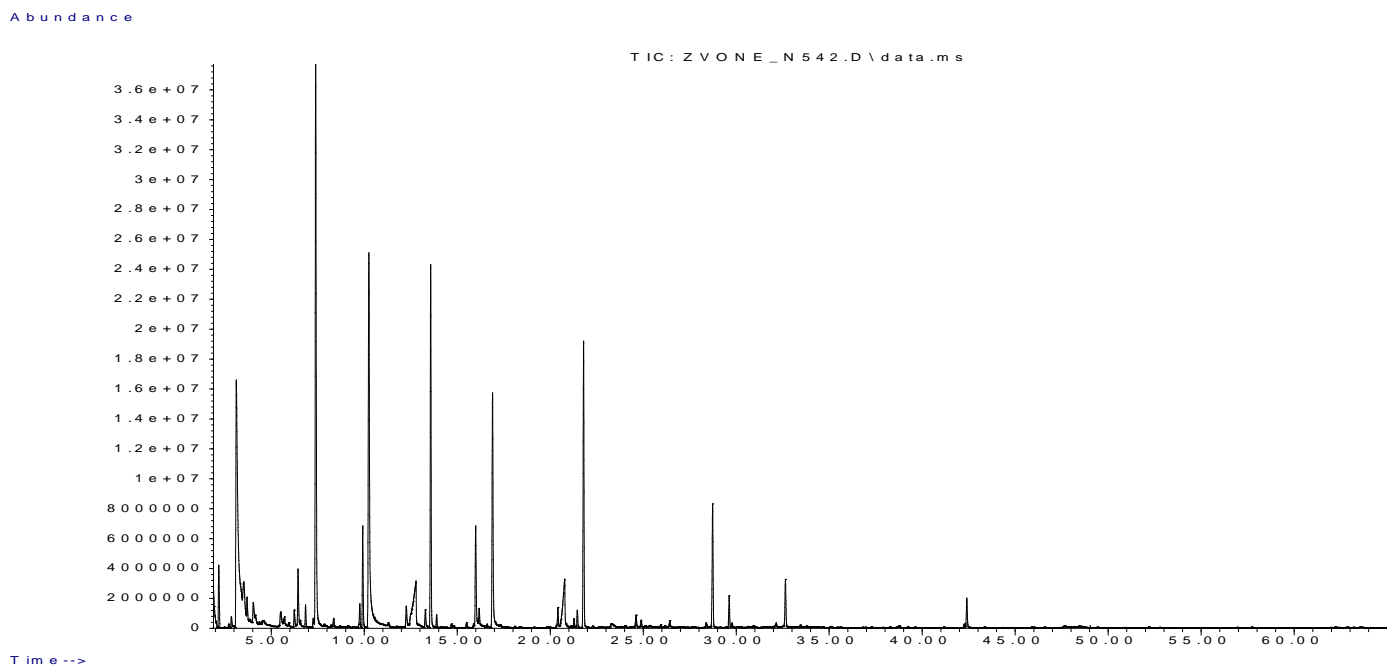
\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic breskva -sivo vlakno

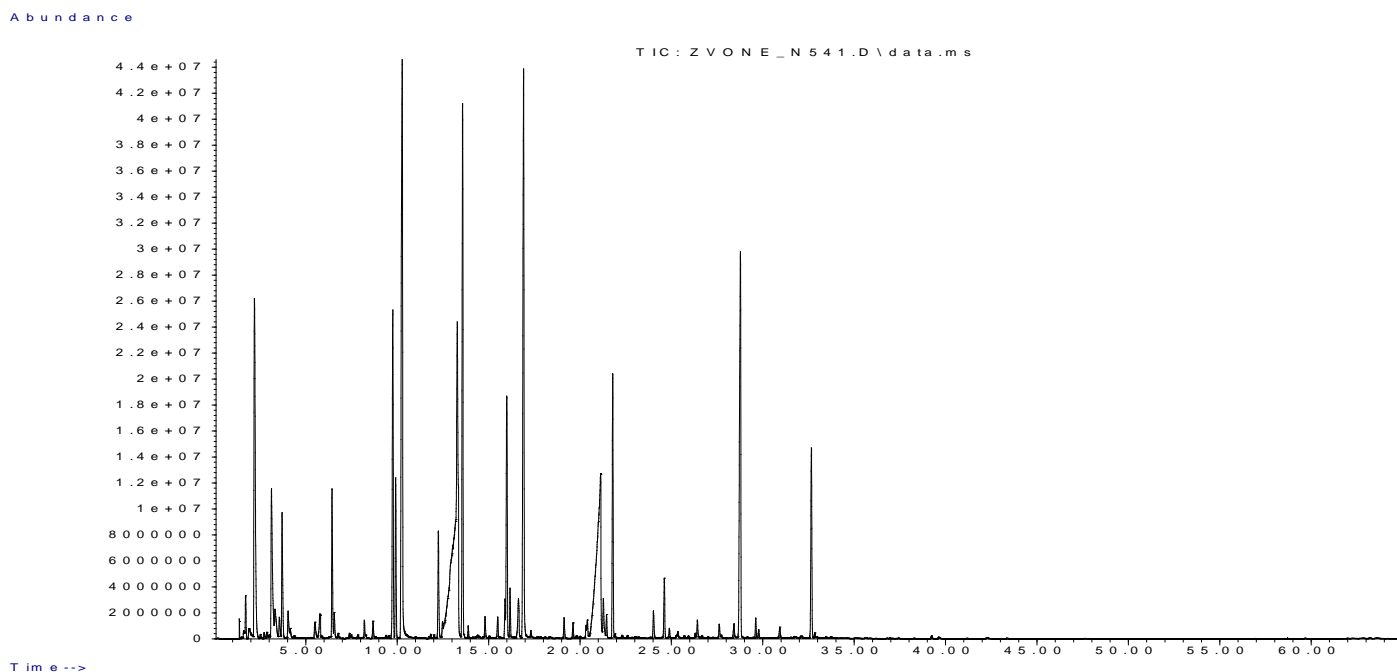
Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	6,53
2.	<900	2-furankarboksialdehid	2,98
3.	<900	izoamil-acetat	0,74
4.	<900	heksen-1-ol	0,31
5.	965	benzaldehyd	0,29
6.	976	heksanska kiselina	0,47
7.	996	etil-heksanoat	1,80
8.	997	oktanal	0,31
9.	1074	oktan-1-ol	0,23
10.	1101	linalol	4,42
11.	1105	nonanal	1,93
12.	1116	2-feniletanol*	11,03
13.	1170	4-etilfenol	1,44
14.	1173	etil-benzoat	0,23
15.	1194	$\alpha$ -terpineol	10,93
16.	1198	etil-oktanoat	6,89
17.	1255	geraniol	0,44
18.	1256	2-feniletetil-acetat	3,63
19.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	9,20
20.	1382	dekanska kiselina*	10,01
21.	1387	etil-dek-9-enoat	0,27
22.	1397	etil-dekanoat	3,23
23.	1467	5-heksil-dihidrofuran-2(3H)-on	0,97
24.	1571	5-heptil-dihidrofuran-2(3H)-on	7,00
25.	1593	etil-dodekanoat	0,22
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>85,50</b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic breskva izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).



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

Tablica 9. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic višnja-**plavo vlakno**

<b>Red. broj</b>	<b>RI</b>	<b>Spoj</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>1.</b>	<900	3-metil-butan-1-ol	2,79
<b>2.</b>	<900	2-furankarboksialdehid	1,60
<b>3.</b>	<900	izoamil-acetat	0,70
<b>4.</b>	965	benzaldehyd	29,55
<b>5.</b>	996	etil-heksanoat	1,53
<b>6.</b>	1008	heks-3-enil-acetat	0,75
<b>7.</b>	1037	benzil-alkohol	0,66
<b>8.</b>	1037	acetofenon	1,85
<b>9.</b>	1103	linalol	0,15
<b>10.</b>	1105	nonanal	0,25
<b>11.</b>	1116	2-feniletanol*	7,10
<b>12.</b>	1170	benzil-acetat	10,20
<b>13.</b>	1173	etil-benzoat	0,88
<b>14.</b>	1174	oktanska kiselina	10,26
<b>15.</b>	1194	$\alpha$ -terpineol	0,95
<b>16.</b>	1198	etil-oktanoat	3,63
<b>17.</b>	1256	2-feniletal-acetat	0,15
<b>18.</b>	1264	4-metoksi-benzaldehyd	4,57
<b>19.</b>	1276	dekan-1-ol	0,73
<b>20.</b>	1314	4-vinil-2-metoksifenol	3,76
<b>21.</b>	1331	piperonal	0,31
<b>22.</b>	1362	eugenol	0,38
<b>23.</b>	1382	dekanska kiselina*	8,06
<b>24.</b>	1387	etil-dek-9-enoat	0,16
<b>25.</b>	1397	etil-dekanoat	2,82
<b>26.</b>	1444	kumarin	0,41
<b>27.</b>	1600	heksadekan	0,23
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b>94,43</b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

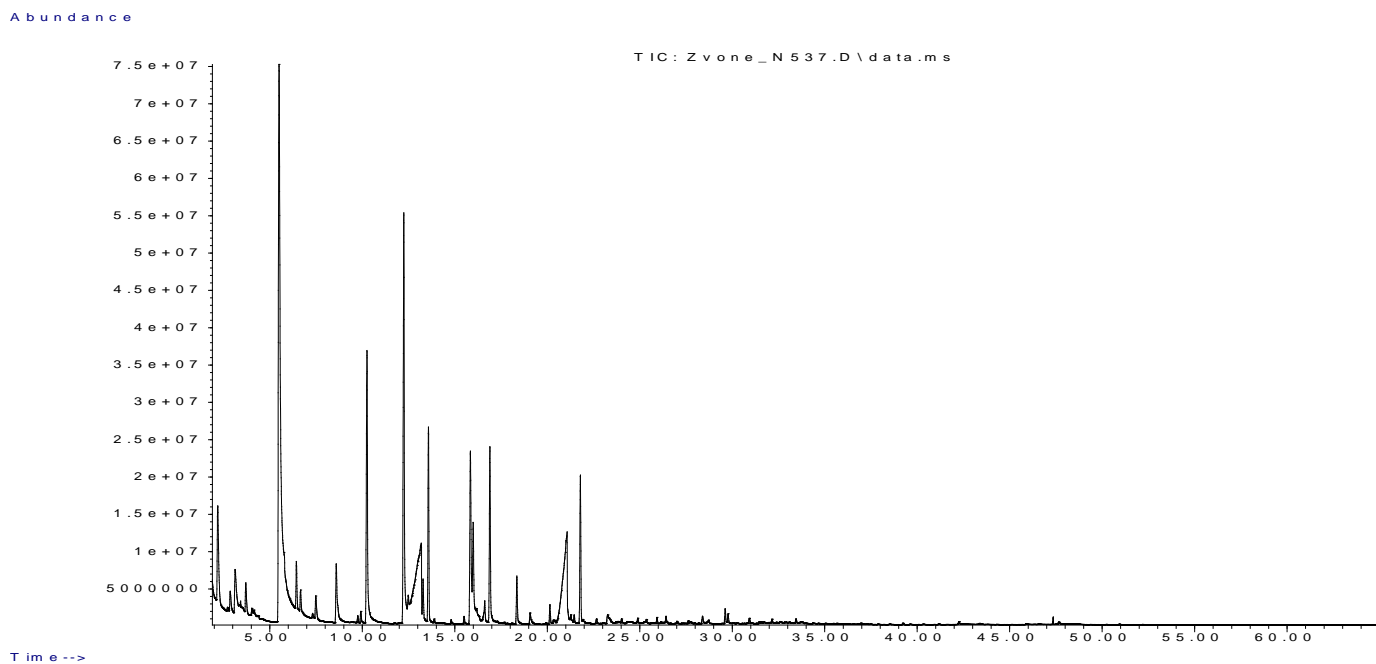
\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

Tablica 10. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva lambic višnja -sivo vlakno

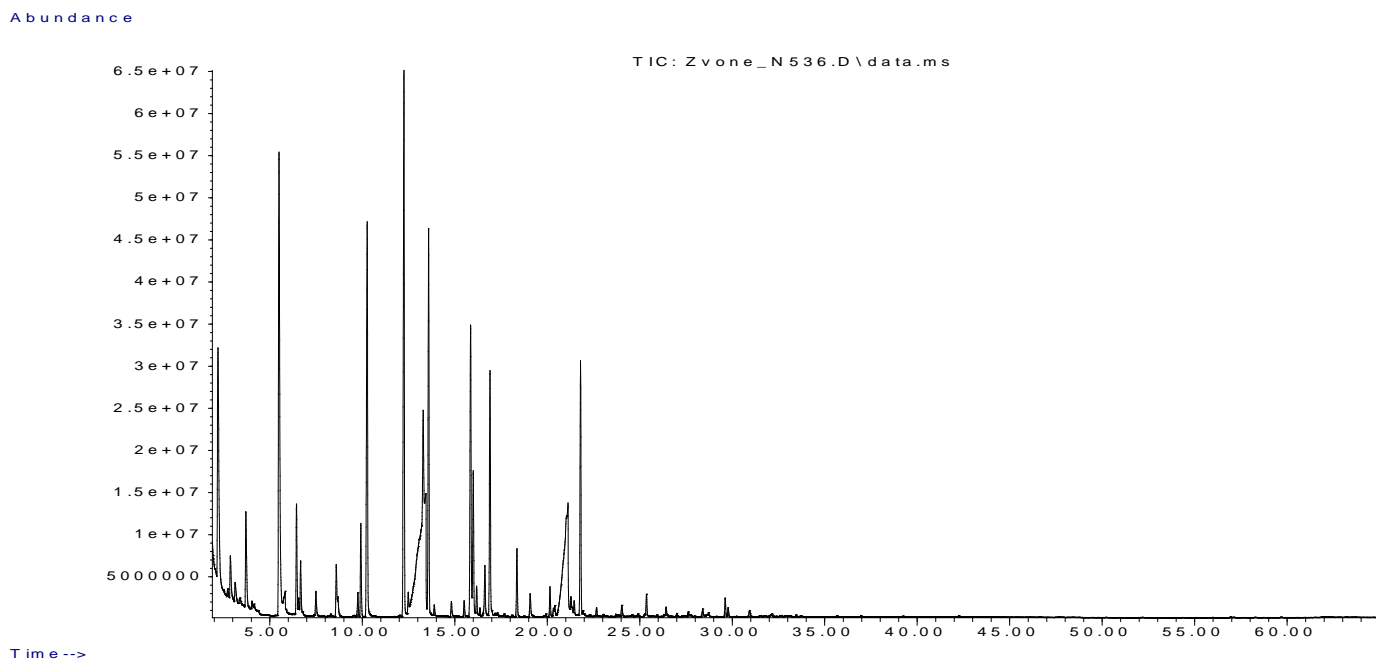
Red. broj	RI	Spoj	Udio (%)
1.	<900	3-metil-butan-1-ol	5,71
2.	<900	2-furankarboksialdehid	0,45
3.	<900	izoamil-acetat	1,89
4.	965	benzaldehyd	10,29
5.	974	heksanska kiselina	0,87
6.	996	etil-heksanoat	1,72
7.	1003	oktanal	0,23
8.	1008	heks-3-enil-acetat	0,81
9.	1037	benzil-alkohol	0,46
10.	1037	acetofenon	0,89
11.	1074	oktan-1-ol	0,36
12.	1103	linalol	0,39
13.	1105	nonanal	1,46
14.	1116	2-feniletanol*	7,52
15.	1170	benzil-acetat	9,65
16.	1173	etil-benzoat	0,47
17.	1174	oktanska kielina	6,25
18.	1194	$\alpha$ -terpineol	8,87
19.	1198	etil-oktanoat	6,19
20.	1207	dekanal	0,15
21.	1233	citronelol	0,26
22.	1256	2-feniletetil-acetat	0,25
23.	1264	4-metoksi-benzaldehyd	5,61
24.	1269	dek-2-enal	0,46
25.	1276	dekan-1-ol	0,96
26.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	4,27
27.	1331	piperonal	0,42
28.	1362	eugenol	0,45
29.	1382	dekanska kiselina*	8,65
30.	1387	etil-dek-9-enoat	0,23
31.	1397	etil-dekanoat	4,10
32.	1485	$\beta$ -ionon	0,43
33.	1570	dodekanska kiselina	0,14
34.	1593	etil-dodekanoat	0,30
35.	1600	heksadekan	0,15
<b><i>Ukupno identificirano</i></b>			<b><i>91,31</i></b>

RI = retencijski indeks na HP-5MS koloni

\*identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic višnja izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom PDMS/DVB (plavo vlakno).



Slika 23. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva lambic višnja izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno).



## **4. RASPRAVA**

### **4.1 Rasprava- SENZORSKA ANALIZA**

Slike 11., 12., 13. i 14. nam pokazuju srednje vrijednosti odgovarajućih okusa. Određivanje kvantitativne deskriptivne analize nije lagan zadatak. Nepca trebaju biti istrenirana kako bi se prepoznali svi okusi i odredili intenziteti istih. Kod svih uzoraka izražene su voćne arome (voćni citrus i voćni ester), ali različite jačine. Također kiselost i slatkoća prevladavaju u svim pivima kao i hmeljni okus koji je ipak najizraženiji u uzorku 303. Alkohol se osjeća u uzorcima 202 i 404. Bistroća raste od uzorka 202, 404, 303 do 101.

Iz testa preferencije možemo uočiti da su rezultati raznoliki i da je test dosta subjektivan što vidimo u gore navedenoj tablici 1. Ispitivačima se najviše svidio uzorak 101, a to je lambic piva s okusom jabuke. Taj uzorak je skupio čak deset glasova kao prvi odabrani, sedam glasova kao drugi, tri glasa kao treći i ni jedan glas kao zadnji. Uzorak 202 i 404 su četiri ispitanika stavili na prvo mjesto, ali devet ispitanika je stavilo uzorak 202 na zadnje mjesto preferencije te on time ima najviše glasova kao lambic piva koje se najmanje sviđa ispitanicima. Uzorak 303 su samo dva ispitanika stavili na prvo mjesto preferencije.

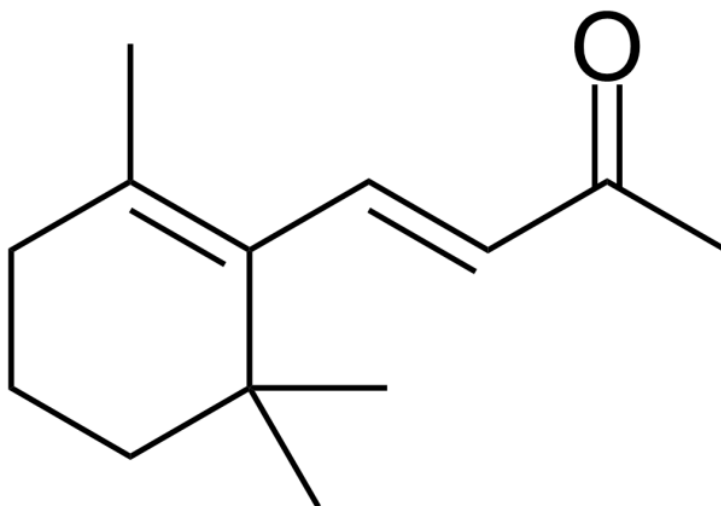
### **4.2 Rasprava- ANALIZA KEMIJSKOG SASTAVA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Cilj ovog rada bio je proučiti hlapljive spojeve prisutne u četiri različita lambic piva. Za izolaciju ovih spojeva primijenjena je metoda mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, pri čemu su korištena dva različita tipa vlakna za ekstrakciju. Svi dobiveni uzorci hlapljivih spojeva detaljno su analizirani primjenom plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) na nepolarnoj HP-5MS koloni. Rezultati analize prikazani su u obliku tablica i kromatograma.

Kemijski sastav i sadržaj izoliranih spojeva lambic piva s okusom jabuke pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi s plavim vlaknom prikazani su u tablici 3. U uzorku je identificirano 26 spojeva koji čine 90,99 % od ukupnog uzorka. U uzorku dominira oktanska kiselina (15,10%) koja je nusproizvod fermentacije<sup>41</sup>, a kvantitativno značajni sastojci su i drugi poput 2-feniletanol (10,50 %), heks-3-en-1-ol (10,28 %), dekanska kiselina (8,33 %), 4-vinil-2-metoksifenol (6,53%), 5-heksil-dihidrofuran-2(3*H*)-on (5,57%) i etil-2-metilbutanoat (5,18%). Svi ostali spojevi u ekstraktu prisutni su u manjim količinama. U uzorku sa sivim vlaknom (tablica 4.) identificirano je 28 spojeva koji čine 83,74% od ukupnog uzorka. U

najvećoj koncentraciji imamo izoamil-acetat (10,71%) i u istoj količini 5-hidroksimetilfurfural (10,71%). Zatim slijedi oktanska kiselina (8,48%), dekanska kiselina (7,34%), etil-oktanoat (6,50%), 2-feniletanol (6,38%) i ostalih spojeva, ali u manjim količinama poput heks-3-en-1-ol, heks-3-enil-acetat, 4-vinil-2-metoksifenol, 5-heksil-dihidrofuran-2(3*H*)-on, heksanska kiselina, 2-feniletil-acetat.

Aromatski profil hlapljivih spojeva lambic piva s okusom maline prikazan je u tablici 5. U uzorku je detektirano 26 spojeva koji čine 91,06% uzorka korištenjem plavog vlakna. Najdominantniji spoj je seskviterpen  $\beta$ -ionon (slika 24) koji čini čak 37,03%, hlapivi organski spoj koji potječe od maline i ima karakterističan drvenasti miris. Nastaje cijepanjem dioksidogeneze iz  $\beta$ -karotena koji se nalazi u malini.<sup>30</sup> Zatim slijedi heks-3-enil-acetat (9,89%), feniletanol (7,23%), dekanska kiselina (6,18%), oktanska kiselina (5,00%). Ostatak spojeva se nalazi u manjim količinama. Uz pomoć sivog vlakna (tablica 6.) identificirana su 22 spoja koji čine 86,76% od ukupnog uzorka. Ovdje također dominira  $\beta$ -ionon (45%). Kvantitativno značajniji spojevi su heks-3-enil-acetat (10,70%), dekanska kiselina (5,48%), oktanska kiselina (4,91%), ostali spojevi su u manjim količinama. Sivim vlaknom pronađen u maloj koncentraciji (0,17%) je malina keton tj. 4-(4-hidroksifenil)-buta-2-on, koji je jako karakterističan za malinu.<sup>45</sup>



Slika 24. Strukturna formula  $\beta$ -ionona<sup>46</sup>

Kemijski sastav i udio izoliranih spojeva lambic piva s okusom breskve prikazan je u tablici 7. Korištenjem plavog vlakna registrirano je 27 spojeva koji čine 92,11% ukupnog uzorka. U uzorku prevladava limonen (13,26%) koji potiče iz hmelja, 2-furankarboksialdehid (12,34%), 2-feniletanol (11,54%), etil-oktanoat (8,16%), etil-dekanoat (6,79%), 4-vinil-2-metoksifenol (5,66%), oktanska kiselina (4,98%). Svi ostali spojevi su prisutni u manjim količinama. Pojavljuju se oktanal (0,45%), nonanal (3,22%) i dekanal (0,59%) koji doprinose gorkoj, citrusnoj aromi.<sup>47</sup> U uzorku sa sivim vlaknom identificirano je 25 spojeva koji čine 85,50% ukupnog uzorka i prikazano je u tablici 8. Kvantitativno značajni spojevi su feniletanol (11,03%),  $\alpha$ -terpineol (10,93%), dekanska kiselina (10,01%), 4-vinil-2-metoksifenol (9,20%), 5-heptil-dihidrofuran-2(3*H*)-on (7,00%), etil-oktanoat (6,89%), 3-metil-butan-1-ol (6,53%), geraniol (0,44%) koji je jedan od sastojaka eteričnog ulja hmelja koji daje aromu po ruži.<sup>47</sup>

Konačno, kemijski sastav i udio izoliranih spojeva lambic piva s okusom višnje prikazan je u tablici 9. U uzorku je pomoću plavog vlakna registrirano 27 spojeva koji od ukupnog uzorka čine 94,43%. Najdominantniji spoj s 29,55% je benzaldehid slijedi oktanska kiselina (10,26%), benzil-acetat (10,20%), dekanska kiselina (8,06%), 2-feniletanol (7,10%). Ostali spojevi su u manjim količinama. Korištenjem sivog vlakna identificirano je 35 spojeva koji čine 91,31% ukupnog uzorka (tablica 10.). Najznačajniji spoj je benzaldehid (10,29%), zatim benzil-acetat (9,65%),  $\alpha$ -terpineol (8,87%), dekanska kiselina (8,65%), 2-feniletanol (7,52%), oktanska kiselina (6,25%). Ostali spojevi su u manjim koncentracijama.

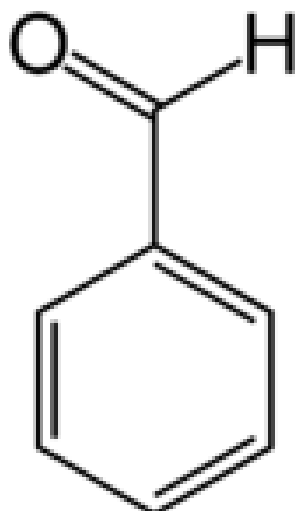
Najzastupljeniji spojevi su alkoholi, esteri i aldehidi, a nakon njih kiseline, ketoni i fenoli. Oni stvaraju različite arome, okuse i mirise koje doprinose kompleksnosti piva. Ovisno o vrsti piva i procesima proizvodnje, različite skupine spojeva mogu imati veći ili manji utjecaj na ukupni profil piva.

U pivama s okusom breskve i jabuke oba vlakna su identificirala 4-etilfenol za to je zaslužan kvasac *Brettanomyces* koji je jedini poznati mikroorganizam povezan s razvojem etilfenola.<sup>42</sup> *Brettanomyces* je ključni čimbenik u senzornom profilu lambic i gueuze piva. Karakteristični "brett" karakter povezan je s nizom različitih aroma i okusa, kao što su minerali, duhan, staja, koža i dimljeni.<sup>43</sup>

4-vinil-2-metoksifenol prisutan je u svim spojevima i karakterističan je za pšenična piva. Ovaj spoj nastaje kao rezultat metabolizma sojeva kvasaca koji se koriste u procesu pripreme pšeničnih piva i daje pivu aromu klinčića.<sup>47</sup>

Etil-oktanoat i etil-heksanoat nositelji su voćne arome i identificirani su u svim uzorcima.<sup>44</sup>

Benzaldehid je najjednostavniji i najvažniji aromatski aldehid koji je detektiran pomoću oba vlakna u svim uzorcima. Može doprinijeti karakterističnoj aromi badema, blago orašasta i voćna, s nijansom maraschino trešnje. Njegova struktura je prikazana na slici 25.



Slika 25. Strukturna formula benzaldehida<sup>48</sup>

Nakon benzaldehida najviše puta su se spomenuli 2-feniletanol spoj koji često doprinosi cvjetnoj, ružičastoj i blago voćnoj aromi i okusu pivu i  $\alpha$ -terpineol koji može pridonijeti citrusne note uključujući naranču, limun i grejp, također pridonosi i biljne note, blago cvjetne note. Ovaj spoj može doprinijeti složenosti i bogatstvu aroma i okusa u pivu kada je uravnotežen s ostalim komponentama iako ne treba biti u velikim količinama.<sup>47</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

Provedenim eksperimentom došli smo do zaključka kako senzorska analiza može uvelike pomoći proizvođačima kako bi došli do direktnih informacija od strane potrošača. Testom preferencije rezultati su bili raznovrsni. Mišljenja i ukusi su različiti, no rezultati našeg testa preferencije pokazuju da se ispitivačima najviše svidjelo piva s okusom jabuke zatim višnje, breskve te najmanje maline. Ispitivači nisu profesionalno osposobljeni, ali njihovo mišljenje također je bitno kao mišljenje potrošača i može pomoći u stvaranju novog ili poboljšanog proizvoda.

Na temelju eksperimentalnih rezultata ispitivanja hlapljivih spojeva četiri uzorka lambic piva istog proizvođača mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Iz GC-MS analize vidimo da su najzastupljenije skupine spojeva esteri, alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni i fenoli.
- Uglavnom isti su spojevi pronađeni korištenjem plavog i sivog vlakna, ali u različitim koncentracijama.
- Benzaldehid je spoj koji se javlja u svim uzorcima korištenjem oba vlakna i on je zaslužan za orašastu, bademastu aromu.
- Spoj koji se nalazi u najvećoj koncentraciji korištenjem oba vlakna je  $\beta$ -ionon iako se on javlja samo u lambic pivu s okusom maline. On izuzetno doprinosi aromi maline.
- Najviše različitih spojeva je identificirano u lambic pivu s okusom trešnje korištenjem sivog vlakna- 35.
- Najveći postotak hlapljivih kemijskih spojeva se nalazi u lambic pivu s okusom trešnje čak 94,43% i to je identificirano plavim vlaknom.

Lambic piva su jedinstvena i tradicionalna piva koja pomoću spontane fermentacije dobivaju jedinstveni karakter i složene arome.

## 6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

SPME - ( *engl. solid phase microextraction* ) - mikroekstrakcija čvrste faze

GC - ( *engl. gas chromatography* ) - plinska kromatografija

MS - ( *engl. mass spectrometry* ) - masena spektrometrija

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

DVB/CAR/PDMS- ( *engl. polydimethylsiloxane/divinylbenzene* )  
polydimethylsiloxane/divinylbenzene

(PDMS/DVB) – ( *engl. polydimethylsiloxane/divinylbenzene* ) -  
polidimetilsiloksan/divinilbenzen

°C- ( *engl. degree Celsius* ) - stupanj Celzijus

eV- ( *engl. electron volt* ) - elektronvolt

µm - ( *engl. micrometer* ) – mikrometar

µL - ( *engl. microliter* ) - mikrolitar

mL - ( *engl. milliliter* ) - mililitar

min - ( *engl. minute* ) – minuta

SAD - Sjedinjene Američke Države

## 7. LITERATURA

1. V. Marić, Pivo tekuća hrana, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
2. URL: <https://www.lindemans.be> (5. 8. 2023.)
3. S. E. Ullrich, Significance, Adaptation, Production, and Trade of Barley, Barley: Production, Improvement, and Uses, Blackwell Publishing Ltd. , (2011), doi: <https://doi.org/10.1002/9780470958636.ch1>
4. J. J. Palmer, How to brew: everything you need to know to brew great beer every time, u R. Mosher, C.Clby (ur), Brewers Publications, **4** (2017), 43-425.
5. M. N. Larroque, F. Carrau, L. Farina, E. Boido, E. Dellacassa, K. Medina, Effect of Saccharomyces and non-Saccharomyces native yeasts on beer aroma compounds, Int. J. Food Microbiol., **337** (2020.), 1-42, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.10
6. URL: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/tehnologija-proizvodnje-piva> (5. 8. 2023.)
7. P. M. Malcev, Tehnologija slada i piva, Beograd: Poslovno udruženje industrije piva 1964.
8. H. Rani, R. D. Bhardwaj, Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer", J. Food Sci. **86** (2021) 3322–3340, doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15858>
9. URL: <https://gospodarski.hr/rubrike/ostalo/prilog-broja-kako-proizvesti-pivo/> (10.8.2023.)
10. URL: <https://pivnica.net/tipovi-i-vrste-piva/107/> (10. 8. 2023.)
11. J. De Roos, L. Vermote, M. Cnockaert, P. Vandamme, S. Weckx, L. De Vuyst L., New insights into the role of key microorganisms and wooden barrels during lambic beer fermentation and maturation, Int. J. Food Microbiol., **394** (2023) 110163 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110163
12. A. Kenechukwu Review: Beer Production, SSRN Electronic Journal, 2019.
13. 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 (GO)." Beverages, **6** (2020), doi: <https://doi.org/10.3390/beverages6020031>
14. J.v.d. Steen, Geuze & Kriek: The Secret of Lambic, Lannoo, Tielt, Belgium, 2011.
15. D. Van Oevelen, M. Spaepen, P. Timmermans, H. Verachtert, Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in production of lambic and gueuze. J. Inst. Brew. **83** (1977) 356-360. Dostupno: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x>
16. S. Rayne, N. J. Eggers, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol estimating non-microbial sourced contributions and toxicological considerations, J. Environ. Sci. Health. B. **42** (2007) doi: 10.1080/03601230701623365.

17. URL: <https://www.brewer-world.com/a-beginners-guide-to-lambic-style-beer/> (1. 9. 2023.)
18. *K.T. Witrick, S.E. Duncan, K.E. , Hurley, S.F. O'Ke "Acid and Volatiles of Commercially-Available Lambic Beers."* *Beverages*, **4** (2017) doi: <https://doi.org/10.3390/beverages3040051>
19. URL: <https://byo.com/article/lambic-brewing/> (20.8.2023)
20. URL: <https://www.thespruceeats.com/lambic-beer-profile-352848> (20.8.2023)
21. H. Stone, J. L. Sidel, *Sensory Evaluation Practices*, Third Edition 2004.
22. H. T. Lawless, H. Heymann, *Sensory Evaluation of Food*, Secod Edition 2010.
23. M. Meligaard, G. V. Civille, B. T. Car, *Sensory Evaluation Techniques*, Fifth Edition 2016.
24. URL:<http://www.pencilandspoon.com/2013/01/a-new-beer-flavour-wheel.html> (20.8.2023)
25. J.X. Guinard, *Lambic*, Brewers Publications: Boulder, CO, USA, 1990; p. 159.
26. J. Kleinova, B. Lejdus, *Determination of Volatiles in Beer using Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, *Czech J. Food Sci.* **32** (2014) 241–248 doi: 10.17221/567/2012-CJFS
27. *B. Humia, K. Santos, A. Barbosa, M. Sawata, M. Mendonça, F. Padilha*, *Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review*, *Molecules*; **24** (2019.) 1568, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24081568>
28. *A. O. Olaniran, L. Hiralal, M.P. Mokoena, B. Pillay*, *Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control*, *J. Inst. Brew.* **123**, 13–23, (2017.) doi: <https://doi.org/10.1002/jib.389>
29. *H. Maarse* *Volatiles Compounds in Foods and Beverages*, Marcel Dekker Inc., **1** (1991), str. 581-616 doi: <https://doi.org/10.1201/9780203734285>
30. *J.J. Baert, J. De Clippeleer, P. S. , Hughes, C. De Cooman, G. Aerts*, *On the origin of free and bound staling aldehydes in beer*, *J. Agric. Food Chem.* , **60**, (2012), str. 11449–11472. doi:10.1021/jf303670z
31. *J. Pawliszyn*, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley VCH., (1997)
32. *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.
33. *D. Klinčić, S. Herceg Romanić*, *Kemijske metode određivanja hidroksiliranih metabolita policikličkih aromatskih ugljikovodika i poliklorbifenila u biološkome materijalu*, *Arh Hig Rada Toksikol* **62** (2011.) 77-89



34. *W. Karasek and R.E. Clement*, Basic gas chromatography-mass spectrometry principles and techniques, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, Elsevier, 1988.
35. *Z. Marijanović*, Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda, Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, (2014)
36. *D. Sinovčić*, Kemijska analiza hlapljivih spojeva craft piva "Mrka", Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020.
37. *A. Meštrić*, Senzorska analiza lager piva, Završni rad, Sveučilište u Karlovcu, 2015.
38. *V. Daems, F. Delvaux*, Multivariate analysis of descriptive sensory data on 40 commercial beer, *Food Quality and Preference* **8** (1997.) 373-380 doi: [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(97\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(97)00012-8)
39. *K. Habschied, V. Krstanović, K. Mastanjević*, Beer Quality Evaluation—A Sensory Aspect, *Beverages*, **8** (2022) doi: <https://doi.org/10.3390/beverages8010015>
40. URL: <https://appellationbeer.com/blog/a-few-good-beer-ideas/> (1.9.2023.)
41. *M. Spaepen, D. Vanoevelen, H. Verachtert*, Fatty-acids and esters produced during spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* **84** (1978) 278–282.
42. *T. Heresztyn*, Metabolism of volatile phenolic-compounds from hydroxycinnamic acids by *brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* **146** (1986) 96–98. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00690165>
43. *C. Boulton, D. Quain*, *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science, Iowa State University Press: Oxford, UK, Malden, MA, USA, Ames, IA, USA, 2001.
44. *Petrić M.*, Hlapljivi spojevi piva, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2020
45. *S. Sewenig, D. Bullinger, U. Hener, A. Mosandl*, Comprehensive Authentication of (E)-alpha(β)-Ionone from Raspberries, Using Constant Flow MDGC-C/P-IRMS and Enantio-MDGC-MS, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005.) 838–844. doi: <https://doi.org/10.1021/jf040356k>
46. URL: <https://www.medchemexpress.com/β-ionone.html> (1. 9. 2023)
47. *M. Dresel, T. Praet, F. Van Opstale, 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, *BrewingScience*; 10-12. ISSN: 1866-5195, 2015.
48. URL: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Benzaldehid> (1. 9. 2023)