



ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD/ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci na kakvoću piva tijekom skladištenja

The Effect of Total Oxygen Concentration in the Bottle on the Beer Quality During Storage

Mladen Pavlečić, Dino Tepalović, Mirela Ivančić Šantek, Tonči Rezić, Božidar Šantek*

Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb

Sažetak

U ovom istraživanju provedeno je ispitivanje utjecaja ukupne koncentracije kisika u staklenoj boci na kakvoću piva donjeg vrenja tijekom skladištenja. Pivo je bilo skladišteno na temperaturi od 22 - 25°C u tamnoj prostoriji, a u pivu je bio prisutan kisik u tri različite ukupne početne koncentracije: 0,09 mg/L, 0,29 mg/L i 0,63 mg/L. Tijekom skladištenja (98 dana) u pivu je praćena promjena koncentracije trans-2-nonenala kao indikatora procesa oksidacije (starenja) piva, a dobiveni rezultati pokazuju da koncentracija trans-2-nonenala nije direktno ovisna o ukupnoj koncentraciji kisika u boci piva. U ovom istraživanju provedena je i senzorska analiza uzoraka piva koja je pokazala da povećane ukupne koncentracije kisika u boci izravno utječu na ocjenu kakvoće piva.

Ključne riječi: pivo donjeg vrenja, staklene boce, oksidacija, trans-2-nonenal, senzorska analiza, kakvoća piva (aroma i okus)

Summary

In this research the effect of total packaging oxygen on the quality of bottled (glass bottle) lager beer during storage was studied. The beer was stored in a dark room at temperature of 22 - 25°C and it contained three different concentrations of total packaging oxygen: 0,09, 0,29 and 0,63 mg/L. During the 98 days storage period the concentration of trans-2-nonenal, a well known indicator of oxidation processes in the beer, was monitored. The results obtained in this research clearly show that the concentration of trans-2-nonenal is not directly related to the total oxygen concentration in the bottled beer. Sensory analysis of beer was also performed and obtained results clearly show that higher concentrations of total packaging oxygen directly effects beer quality and flavour.

Keywords: lager beer, glass bottle, oxidation, trans-2-nonenal, sensory analysis, beer quality and flavour

1. Uvod

Pivo je potpuno prirodni proizvod za čiju proizvodnju se koriste ove sirovine: voda, slad, hmelj i kvasac. Ono je osvježavajuće gazirano piće s malim udjelom alkohola, koje se proizvodi procesom alkoholnog vrenja ohmeljene pivske sladovine pomoću pivskog kvasca. Tvari koje su odgovorne za karakterističnu aromu i okus piva razvijaju se tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine kao i u procesu glavnog i naknadnog vrenja. Slatki okus piva rezultat je povećane koncentracije šećera u finalnom proizvodu. Taj šećer je uglavnom zaostali neprevreli ekstrakt sladovine. Tijekom kuhanja sladovine iz hmelja se oslobađaju izo- α -kiseline koje nastaju izomerizacijom α -kiselina koje su odgovorne za gorki okus piva. Alkoholnim vrenjem sladovine nastaju nusproizvodi koji imaju značajan utjecaj na kakvoću piva. Oni doprinose punoći okusa piva u optimalnim koncentracijama, a u velikim koncentracijama mogu negativno djelovati na okus i aromu piva, te na stabilnost pjene piva. Nusproizvodi koji nastaju tijekom alkoholnog vrenja su: viši alkoholi, diacetil, esteri, aldehidi i sumporni spojevi. Pri tome sastojci arome mladog piva (diacetil, aldehidi, sumporni spojevi) uzrokuju pojavu nečistog, neharmoničnog, nezrelog okusa mladog piva, a u povećanim koncentracijama negativno utječu na kakvoću piva. Nakupljaju se tijekom glavnog vrenja, a uklanjaju tijekom naknadnog vrenja piva. Poželjni sastojci arome dozrelog piva (viši alkoholi i esteri) imaju odlučujući utjecaj na aromu gotovog piva. Njihova pris-

utnost u odgovarajućim koncentracijama je preduvjet za visoku kakvoću piva, a udjel im se povećava tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva (Marić, 2009; Baxter i Hughes, 2001). Mnoge biokemijske reakcije koje se događaju u pivu tijekom naknadnog vrenja vezane su uz reakcije oksidacije i bit će ubrzane ukoliko dođe do značajnijeg kontakta piva s kisikom nakon što ono napusti fermentor. Kisik dolazi u kontakt sa sirovinama i pivom tijekom mljevenja slada, proizvodnje, kuhanja i aeracije sladovine odnosno tijekom filtracije piva (Depaetere i sur., 2007). Tvari koje utječu na okus i aromu piva nisu u termodinamičkoj ravnoteži u svježe napunjenom pivu, te tijekom skladištenja istog sudjeluju u mnogim biokemijskim reakcijama koje rezultiraju smanjenjem izvornog svježeg okusa piva, te pojavom okusa karakterističnog za oksidirano pivo. Nestabilnost okusa i arome piva velika je briga pivara budući da se treba osigurati da proizvod koji dopijeva na tržište ima svoja karakteristična svojstva te mora biti lako prepoznatljiv potrošaču (Vanderhaegen i sur., 2006). Na promjene arome i okusa tijekom skladištenja piva najveći utjecaj ima koncentracija kisika u pivu, način skladištenja (temperatura, premještanje i trajanje) te vrsta piva odnosno njegov kemijski sastav (Briggs i sur. 2004; Dalgliesh i sur. 1977).

Općenito se smatra da je oksidacija sastojaka piva glavni uzrok nestabilnosti arome i okusa piva. Kisik nije posebno aktivan kada je u svom molekulskom stanju (O_2), no on se može aktivirati pomoću iona metala (bakra, željeza), svjetla ili enzima te nastaje singlet kisik. Ovaj spoj je reaktivniji od molekul-

Corresponding author: bsantek@pbf.hr



skog kisika, a ujedno je i prekursor skupini spojeva nazvanom reaktivni kisikovi spojevi (eng. reactive oxygen species) (Baxter i Hughes, 2001). Reaktivnost kisikovih radikala raste s obzirom na redukcijski status (superoksid anion < hidrosiperoksil radikal < hidroksil radikal). Koncentracija slobodnih radikala tijekom skladištenja piva raste s porastom koncentracije iona željeza/bakra odnosno kisika u boci, te pri povišenim temperaturama (Kaneda i sur. 1992). Oksidacija može započeti ubrzo nakon izlaganja piva zraku što uzrokuje niz reakcija koje posljedično mijenjaju aromu i okus piva. Karakteristične promjene okusa koje se događaju tijekom oksidacije su promjena ravnoteže gorko - slatko, pri čemu se gorčina smanjuje, a slatkoća povećava, redukcija intenziteta karakterističnih aroma piva (npr. svježih voćnih aroma), povećanje osjeta punoće piva, tamnija boja piva, smanjenje svježih kvaščevo - sumpornih nota okusa te gubitak svježih aroma hmelja. Najprije se razvija okus papira, odnosno kartona, nakon čega slijedi pojava okusa kruha, karamela te meda zajedno s pojavom slamnatih, zemljanih i metalnih nota kod nekih vrsta piva. Na kraju se razvijaju drvenaste i kožne note arome, a pivo dobiva priokus po višnji (Briggs i sur. 2004).

Razina piva u tlačnom spremniku punilice piva ima velik utjecaj na koncentraciju kisika u pivu. Koncentracija kisika koja se otapa u pivu ovisi o geometriji i volumenu spremnika te o brzini strujanja piva tijekom punjenja odnosno pražnjenja. Kako bi se smanjila koncentracija kisika u pivu, u ovom slučaju potrebno je zadržavati stalni predtlak CO₂ u spremniku. Kisik tijekom punjenja može dospjeti u pivo zbog neispravnosti opreme, posebno ventila, te na mjestima spajanja cijevi (varovi). Kvasac ima snažno reducirajuće djelovanje i kao takav inhibira oksidaciju tijekom vrenja. Nakon što se kvasac odvoji od piva filtracijom, oksidacija može nastupiti znatno brže. Viši alkoholi se mogu oksidirati u aldehide koji su najčešće dugolančani, a općenito je prihvaćeno da arome dugolančanih aldehida nisu poželjne u pivu. Prag senzorske osjetljivosti ovih aldehida smanjuje se kako se povećava duljina lanca. Trans-2-nonenal je glavni izvor oksidiranog okusa piva koji ima relativno nizak prag prepoznavanja (0,1 µg/L) te je pri višim koncentracijama u većem dijelu odgovoran za pojavu papirnato/kartonskog okusa u pivu nakon dužeg vremena skladištenja (Drost i sur. 1990). Premda je ovaj karakteristični okus poznat kao obilježje starijeg piva povremeno se može detektirati i u pivu skladištenom tek 3 mjeseca. Trans-2-nonenal je nezasićeni aldehyd (C₉H₁₆O) koji nastaje u procesu slađenja te tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine. Najvažniji put nastanka trans-2-nonenala je oksidacija masnih kiselina, a supstrati su samo linolna i linolenska kiselina. Mehanizmi reakcije oksidacije su autooksidacija masnih kiselina i enzimski oksidacija s lipoksigenazama (LOX-1 i LOX-2). U autooksidaciji linolne kiseline djelovanjem peroksi radikala nastaju dva spoja: 9-hidroperoksioktadeka-10,12-dienolna kiselina (9-LOOH) i 13-hidroperoksioktadeka-9,11-dienolna kiselina (13-LOOH). U enzimskoj oksidaciji nastaju također ova dva spoja. 9-LOOH nastaje djelovanjem LOX-1, a 13-LOOH nastaje djelovanjem LOX-2. U procesu autooksidacije trans-2-nonenal nastaje iz 9-LOOH tijekom procesa mljevenja slada. Kod enzimski oksidacije trans-2-nonenal nastaje iz 9-LOOH djelovanjem enzima hidroperoksi izomeraze, peroksidaze (POX), te 9-hidroperoksi lijaze (HOPL) u procesu prženja slada, pri temperaturama nižim od 60°C i postotkom vlage višim od 40 % (Vanderhaegen i sur. 2006; Briggs i sur. 2004).

U ovom istraživanju proučavao se utjecaj različitih ukupnih koncentracija kisika u boci piva na proces oksidacije (starenja) piva tijekom skladištenja pri čemu je proces oksidacije piva praćen analitički (određivanjem koncentracije trans-2-nonenala) i organoleptički.

2. Materijali i metode

U ovom istraživanju proučavan je proces oksidacije piva donjeg vrenja koje je bilo napunjeno u staklene boce volumena 0,5 L i to u tri serije koje su se međusobno razlikovale po ukupnoj koncentraciji kisika u boci piva (0,09, 0,29 i 0,63 mg/L kisika). Nakon punjenja uzorci piva su skladišteni u tamnoj prostoriji na temperaturi od 22 - 25°C kroz period od 98 dana.

Određivanje fizikalno - kemijskih osobina piva donjeg vrenja

Određivanje fizikalno - kemijskih osobina piva donjeg vrenja kao što su: koncentracije alkohola, pravog ekstrakta, ekstrakta u osnovnoj sladovini i CO₂, te gorčine piva, pH i ukupna koncentracija kisika u boci (eng. total packaging oxygen, TPO) provedeno je prema EBC analitici (Anonymous 1, 1987). Koncentracija trans-2-nonenala određivana je plinskim kromatografom s plameno-ionizacijskim detektorom na koloni ZEBRON Phenomenex ZB-WAX plus (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). Priprema uzoraka za plinsku kromatografiju provedena je prema ovoj proceduri. U Erlenmayer tikvicu od 100 mL dodaje se redom 40 g NaCl, 150 mL otapala (dimetil klorida, 99 %), 1 mL otopine internog standarda (metil heptanoat, 20 µL na 100 mL dimetil klorida, te 200 mL piva). Vrh tikvice se prekrije aluminijskom folijom i stavi se na tresilicu kroz 2 sata pri brzini rotacije od 180 min⁻¹. Nakon što se uzorak skine s tresilice ostavlja se 30 min kako bi se odvojile faze. Tekuća faza (gornja) odstranjuje se pomoću pipete dok se ostatak otapala i emulzija (donja faza) prebacuju u kivete za centrifugu (200 mL), te se centrifugiraju 20 minuta pri brzini od 5000 min⁻¹. Gornji dio (ostatak piva) se tada ukloni pomoću pipete, a donji dio (otapalo sa ciljanim spojem) puni se u prethodno pripremljenu vialu (1,5 mL). Određivanje trans-2-nonenala na plinskom kromatografu provedeno je pri temperaturi ulaznog toka uzorka od 200°C odnosno plameno-ionizacijskog detektora od 220°C, a temperaturni režim analize bio je slijedeći: 70 °C / 2 min; 85 °C / 2 min; 220 °C / 15 min. Svaki uzorak piva analiziran je dva puta, a srednja vrijednost mjerenja uzimana je kao konačni rezultat određivanje koncentracije trans-2-nonenala (Stenroos i sur., 1984).

Senzorska analiza piva donjeg vrenja

Senzorsku analizu piva donjeg vrenja provodilo je 5 iskusnih senzorskih analitičara piva, a ocjenjivanje je provedeno svakih mjesec dana kroz razdoblje od 98 dana. Senzorska analiza uzoraka piva provodila se pomoću tzv. slijepog testiranja, te je stoga svakom senzorskom analitičaru servirano pivo u tri čaše (označene brojevima 1 - 3) koje su sadržavale sva tri uzorka piva. Senzorski analitičari su dobili izmješšan redosljed čaša s uzorcima te su trebali odrediti koji uzorak piva ima 0,09, 0,29 i 0,63 mg/L kisika. Nakon kušanja piva senzorski analitičari također su trebali ocijeniti pivo ocjenama od 1 - 9 pri čemu pivo s ocjenom nižom od 5 ne zadovoljava kriterije kakvoće piva prema standardima lokalne pivovare.



Određivanje brzine reakcije nastajanja trans-2-nonenala

Nastajanje trans-2-nonenala ovisi o brzini razgradnje i oksidacije nezasićenih masnih kiselina (linolne i linolenske). U ovom istraživanju praćena je samo koncentracija trans-2-nonenala kao produkta reakcije razgradnje nezasićenih masnih kiselina, a može se opisati jednadžbom:

$$dP/dt = k P \quad (1)$$

Nakon separacije varijabli i rješavanja diferencijalne jednadžbe prvog reda (1) jednadžba ima ovaj oblik:

$$\ln P - \ln P_0 = k t \quad (2)$$

gdje je P- koncentracija produkta (trans-2-nonenala) na kraju bioprocesa, P_0 - koncentracija produkta na početku bioprocesa, k - brzina nastajanja produkta i t - vrijeme. Na osnovi jednadžbe (2) određena je brzina nastajanja trans-2-nonenala iz eksperimentalnih podataka.

3. Rezultati i rasprava

Fizikalno - kemijska analiza piva donjeg vrenja

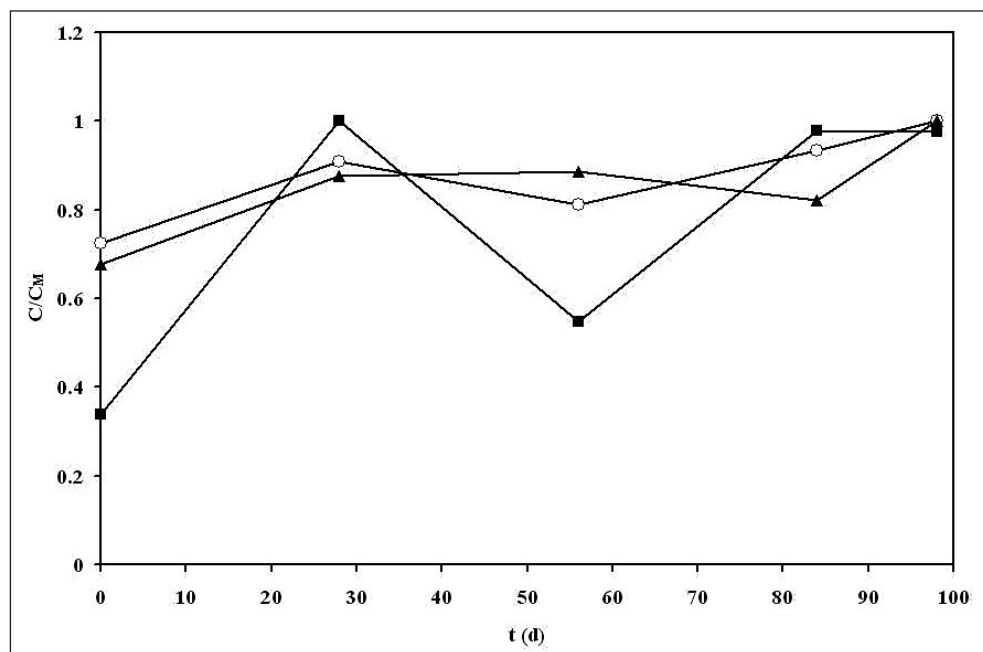
U ovom istraživanju provedeno je ispitivanje utjecaja ukupne koncentracije kisika u pivu na kakvoću odnosno aromu i okus piva. Pivo je bilo napunjeno u staklene boce volumena 0,5 L. Na početku istraživanja provedena je fizikalno - kemijska analiza piva, napunjenog po standardnom postupku, a rezultati su prikazani u Tablici 1. Na osnovi rezultata analize vidljivo je da pivo zadovoljava kriterije kakvoće prema Pravilniku o pivu

(Anonymous 2, 2011). U ovom istraživanju pivo je punjeno u tri serije. Prva serija punila se po standardnom postupku koji zadovoljava sve propisane kriterije za punjenje piva, dok se pri punjenju druge dvije serije namjerno načinio propust, koji se može dogoditi pri normalnom radu postrojenja zbog neis-

Tablica 1. Fizikalno - kemijske osobine piva donjeg vrenja na početku istraživanja
Table 1. Physical and chemical characteristics of lager beer at the beginning of research

Parametar / Parameter	Vrijednost / Value
Koncentracija alkohola (% vol/vol) Alcohol concentration (% vol/vol)	4,39
Pravi ekstrakt (% m/m) Real extract (% w/w)	3,95
Prividni ekstrakt (% m/m) Apparent extract (% w/w)	2,55
Ekstrakt u osnovnoj sladovini (% m/m) Orginal gravity (% w/w)	11,27
pH	4,32
CO ₂ (g/L)	4,82
Gorčina (IBU/L) Bitterness (IBU/L)	19,00

pravnosti opreme (nedovoljno siguran kontakt glave ventila za punjenje s grlom boce), a koji je rezultirao povišenom koncentracijom otopljenog kisika u bocama druge i treće serije. Na taj način su se dobile tri serije uzoraka piva i to s uobičajnom koncentracijom kisika ($\approx 0,05$ mg/L), povišenom koncentracijom kisika ($\approx 0,1$ mg/L) te jako visokom koncentracijom kisika ($\approx 0,33$ mg/L). Budući da je za istraživanje bio važan ukupni prisutni kisik u boci ukupna koncentracija kisika se određivala pomoću metode za ukupnu koncentraciju kisika u boci (TPO). Ukupna koncentracija kisika u boci prve serije iznosila je 0,09 mg/L, druge serije 0,29 mg/L te treće serije 0,63 mg/L. Uzorci su bili skladišteni u tamnoj prostoriji na temperaturi od 22 - 25°C. Kroz period od 98 dana u uzorcima piva se određivala koncentracija trans-2-nonenala, komponente koja je poznata kao indikator oksidacije, odnosno starenja piva. Ima karakterističan okus po papiru te vrlo nizak prag senzorske osjetljivosti (0,1 μ g/L). Iako je u znanstvenoj literaturi navedeno da se ovaj aldehid može senzorski prepoznati tek nakon 3 mjeseca skladištenja piva pri



Slika 1. Promjene normalizirane koncentracije trans-2-nonenala (C/C_M) tijekom skladištenja piva kod različitih početnih ukupnih koncentracija kisika u boci piva (\circ , 0,09 mg/L; \blacksquare , 0,29 mg/L; \blacktriangle , 0,63 mg/L).
Figure 1. Alteration of normalized concentration of trans-2-nonenal (C/C_M) during beer storage at different initial total oxygen concentration in bottled beer (\circ , 0,09 mg/L; \blacksquare , 0,29 mg/L; \blacktriangle , 0,63 mg/L).

normalnim temperaturama skladištenja (20 - 30°C) (Santos i sur., 2003), u ovom istraživanju namjera je bila dokazati da će se pri višim ukupnim koncentracijama kisika trans-2-nonenal razvijati brže i intenzivnije. Osim toga, u ovom istraživanju provodila se i senzorska analiza piva jednom mjesečno kako bi se usporedili analitički rezultati s rezultatima senzorske analize piva.

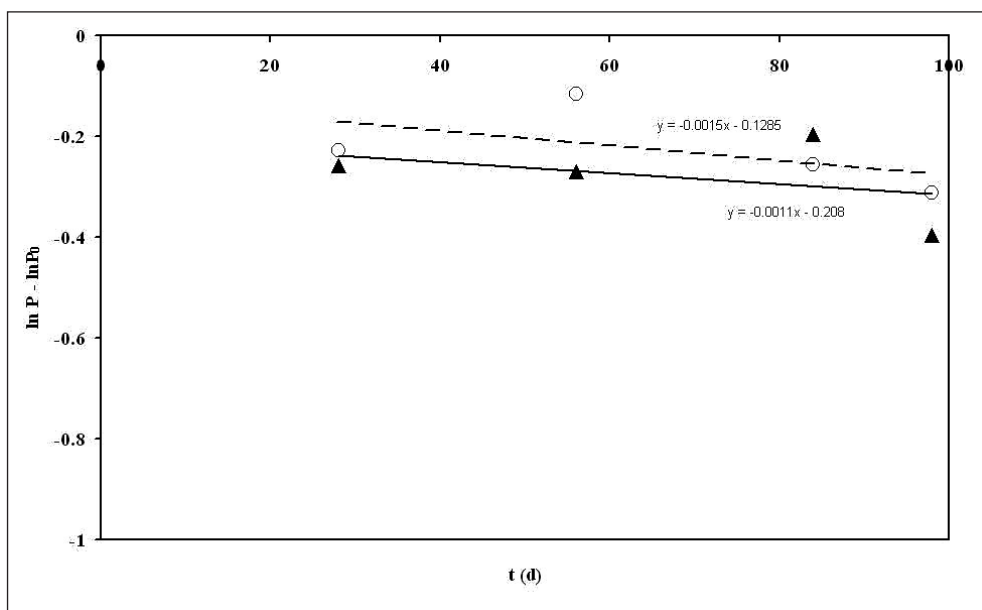
Oksidacija (starenje) piva donjeg vrenja tijekom skladištenja

U ovom istraživanju proces oksidacije (starenja) piva tijekom skladištenja praćen je određivanjem koncentracije trans-2-nonenala u uzorcima piva s različitom ukupnom početnom koncentracijom kisika u boci. Promjene relativne koncentracije trans-2-nonenala tijekom ovog istraživanja prikazane su na Slici 1. Iz prikazanih podataka je vidljivo da su sve tri serije uzoraka piva imale na početku određenu koncentraciju trans-2-nonenala, što je pokazatelj da je proces oksidacije nezasićenih masnih kiselina (uglavnom linolne i linolenske) započeo tijekom proizvodnje sladovine, odnosno piva. Navedena pojava je u skladu s literaturnim podacima (Drost i sur. 1990).

Tijekom skladištenja piva s početnom ukupnom koncentracijom kisika 0,09 mg/L i 0,63 mg/L uočen je blagi porast koncentracije trans-2-nonenala. Kod uzoraka piva s 0,29 mg/L ukupne koncentracije kisika u boci zabilježena je najmanja početna koncentracija trans-2-nonenala što je pokazatelj da su ti uzorci piva bili najmanje izloženi uvjetima koji pogoduju procesu oksidacije (starenja) piva. Najveće oscilacije koncentracije trans-2-nonenala zabilježene su kod ovog uzorka u periodu od 20 - 60 dana skladištenja, a najvjerojatnije su posljedice eksperimentalnih pogriješaka. Na kraju procesa skladištenja svi uzorci piva su imali približno jednaku koncentraciju trans-2-nonenala. Usporedba koncentracije trans-2-nonenala i ocjena kakvoće piva pokazuje da je trans-2-nonenal dobar indikator oksidacije (starenja) piva.

Za opis procesa nastajanja trans-2-nonenala koji ovisi o brzini razgradnje i oksidacije nezasićenih masnih kiselina (uglavnom linolne i linolenske) testi-

rano je nekoliko kinetičkih ovisnosti kao npr. kinetika reakcije 0 i I reda. Na osnovi odstupanja između modelnih i eksperimentalnih vrijednosti uočeno je da kinetika reakcije I reda najbolje opisuje eksperimentalne podatke. Rezultati određivanja konstante reakcije I reda odnosno brzine nastajanja trans-2-



Slika 2. Ovisnost brzine nastajanja trans-2-nonenala o vremenu skladištenja kod različitih početnih ukupnih koncentracija kisika u boci piva (○, 0,09 mg/L; ▲, 0,63 mg/L).

Figure 2. Dependence of the trans-2-nonenal formation rate on the storage time at different initial total oxygen concentration in bottled beer (○, 0,09 mg/L; ▲, 0,63 mg/L).

Tablica 2. Rezultati senzorske analize piva na početku istraživanja.

Table 2. Results of beer sensory analysis at the beginning of research.

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Redosljed pripreme uzorka / Sample preparation order		Ocjene senzorskog analitičara / Sensory analyst marks	
			Poredak / Order	Ocjena / Mark
1.	TPO 0,09	3	1	6,8
	TPO 0,29	2	2	6,8
	TPO 0,63	1	3	6,8
2.	TPO 0,09	1	3	7
	TPO 0,29	2	1	6,5
	TPO 0,63	3	2	6,5
3.	TPO 0,09	1	1	6,5
	TPO 0,29	3	3	6,5
	TPO 0,63	2	2	6,5
4.	TPO 0,09	2	2	6
	TPO 0,29	3	1	6
	TPO 0,63	1	3	6
5.	TPO 0,09	1	1	7
	TPO 0,29	3	2	6
	TPO 0,63	2	3	6

**Tablica 3.** Rezultati senzorske analize piva nakon 28 dana skladištenja.**Table 3.** Results of beer sensory analysis after 28 days of storage.

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Redosljed pripreme uzorka / Sample preparation order	Ocjene senzorskog analitičara / Sensory analyst marks	
		Poredak / Order	Ocjena / Mark
1.	1	1	7,0
	2	3	6,5
	3	2	6,5
2.	3	3	6,5
	2	2	6,0
	1	1	5,5
3.	2	3	7,0
	3	2	6,0
	1	1	5,0
4.	2	2	6,5
	3	1	6,0
	1	3	5,8
5.	3	3	6
	2	2	5,5
	1	1	5

Tablica 4. Rezultati senzorske analize piva nakon 56 dana skladištenja.**Table 4.** Results of beer sensory analysis after 56 days of storage.

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Redosljed pripreme uzorka / Sample preparation order	Ocjene senzorskog analitičara / Sensory analyst marks	
		Poredak / Order	Ocjena / Mark
1.	2	2	6,5
	3	1	6,0
	1	3	6,0
2.	1	1	7,0
	2	2	6,0
	3	3	5,5
3.	Nije sudjelovao u ovom ispitivanju / This analyst is not participated in this analysis		
4.	1	1	6,3
	2	3	5,5
	3	2	5,0
5.	3	3	6,5
	2	2	5,5
	1	1	5,5

nonenala prikazani su na Slici 2. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je brzina nastajanja trans-2-nonenala kod uzoraka s ukupnom koncentracijom kisika u boci piva od 0,09 mg/L i 0,63 mg/L bila na približno istoj razini (0,0015 odnosno 0,0011 $\mu\text{g/L}$ dan). Na Slici 2 nisu prikazani rezultati određivanja brzine sinteze trans-2-nonenala kod uzoraka s ukupnom koncentracijom kisika u boci od 0,29 mg/L zbog znatnih oscilacija koncentracije trans-2-nonenala koje su posljedice eksperimentalnih pogrešaka.

Na osnovi dobivenih brzina nastajanja trans-2-nonenala, te njihove ovisnosti o ukupnoj koncentraciji kisika u boci, vidljivo je da ne postoji jasna ovisnost između ta dva parametra što je u skladu s literaturnim podacima (Lermusieau i sur. 1999). Dobiveni rezultati pokazuju da prisutnost kisika ima utjecaj na proces nastajanja trans-2-nonenala kao indikatora oksidacije piva tijekom skladištenja. Da bi se što bolje proučila ova pojava, nužno je daljnje istraživanje ovog procesa uz poboljšanje analitičkog sustava (npr. primjena GC - MS sustava) kao i proširenje intervala ukupne koncentracije kisika u boci piva. Na osnovi dobivenih rezultata tih istraživanja moći će se s puno većom pouzdanošću opisati proces oksidacije (starenja) piva u boci.

Senzorska analiza piva tijekom skladištenja

Neposredno nakon pripreme uzoraka provedena je prva senzorska analiza piva čiji rezultati su prikazani u Tablici 2. Na osnovi rezultata senzorske analize vidljivo je da se u tako kratkom vremenskom periodu nisu dogodile značajnije promjene arome i okusa piva, a što se vidi i kroz ocjene kakvoće piva koje se nisu značajnije mijenjale s obzirom na ukupnu koncentraciju kisika u boci piva.

Rezultati organoleptičkog testiranja piva nakon 28 dana skladištenja prikazani su u Tablici 3. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su dva senzorska analitičara uspjela točno odrediti sva tri uzorka piva, tj. prepoznati oksidirano pivo, a što se vidi i po ocjenama kakvoće piva koje su sve na granici kriterija za kakvoću piva. Nadalje, tijekom ove senzorske analize piva niti jedan od ispitivača nije zamijetio papirnato/kartonski priokus piva.

U Tablici 4 prikazani su rezultati senzorske analize piva nakon 56 dana skladištenja, a u ovom ispitivanju sudjelovalo je samo četiri ispitivača. Kao i kod prethodne senzorske analize dva senzorska analitičara su točno odredila sva tri uzorka piva. Međutim, svi sudionici senzorske analize piva su prepoznali uzorak piva s najmanjom ukupnom koncentracijom kisika u boci (0,09 mg/L). Ocjene kakvoće

piva s povećanom ukupnom koncentracijom kisika (0,29 i 0,63 mg/L) su manje u odnosu na pivo s 0,09 mg/L kisika što pokazuje da se nakon 56 dana skladištenja piva može opaziti razlika između oksidiranog i neoksidiranog piva (Tablica 8.). Kao i u prethodnom ispitivanju niti jedan od ispitivača nije uočio papirnato/kartonski priokus piva.

Rezultati senzorske analize piva nakon 84 dana skladištenja prikazani su u Tablici 5. Kao i kod ispitivanja nakon 56 dana skladištenja samo dva senzorska analitičara su točno prepoznala sve uzorke piva. Osim toga, četiri analitičara prepoznaju jako oksidirano pivo, tj. pivo s 0,63 mg/L kisika. Međutim, iz prikazanih rezultata je vidljivo da redosljed degustiranja piva ima utjecaj na ocjenu kakvoće piva, a slično je zabilježeno i kod prethodnih senzorskih analiza piva.

Završna senzorska analiza piva provedena je nakon 98 dana skladištenja, a rezultati su prikazani u Tablici 6. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su samo dva senzorska analitičara točno odredila sva tri uzorka piva odnosno tri su ispitivača prepoznala uzorak piva s najvećom ukupnom koncentracijom kisika u boci (0,63 mg/L). Međutim, niti jedan od ispitivača nije zamijetio papirnato/kartonski priokus piva.

U Tablici 7 prikazana je sumarna uspješnost senzorskih analitičara u prepoznavanju različitih uzoraka piva, a bila je u intervalu od 46,4 - 66,6 %. Na osnovi prikazanih rezultata jasno je da različiti čimbenici imaju utjecaj na rezultat senzorske analize piva, te je stoga nužno razviti pouzdanu analitičku metodu za praćenje komponenata piva koje su povezane s procesom oksidacije piva. Razvoj pouzdane analitičke metode (relativno jednostavna za primjenu u pivovarama) za praćenje procesa oksidacije piva ne isključuje senzorsku analizu piva kao metodu za ocjenu kakvoće piva.

Prosječne ocjene kakvoće piva tijekom skladištenja prikazane su u Tablici 8, a iz prikazanih rezultata je vidljivo da su senzorski analitičari kao grupa uspješno pratili proces oksidacije piva tijekom skladištenja. Prosječna ocjena piva se smanjivala s obzirom na povećanje ukupne koncentracije kisika u boci što pokazuje da su senzorski analitičari kao grupa ispravno odredili sve uzorke piva. Na osnovi prethodno navedenog jasno je da što više analitičara sudjeluje u senzorskoj analizi piva, to će biti uspješnije određivanje kakvoće piva.

4. ZAKLJUČCI

Na osnovi fizikalno - kemijskih analiza piva te senzorske analize piva može se zaključiti da je pivo na početku ovog

Tablica 5. Rezultati senzorske analize piva nakon 84 dana skladištenja.

Table 5. Results of beer sensory analysis after 84 days of storage.

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Redosljed pripreme uzorka / Sample preparation order	Ocjene senzorskog analitičara / Sensory analyst marks	
		Poredak / Order	Ocjena / Mark
1.	2	2	6,5
	1	1	6,5
	3	3	5,5
2.	1	1	6,5
	3	3	6,0
	2	2	5,0
3.	2	1	6,5
	1	2	6,0
	3	3	5,5
4.	2	3	6,5
	3	2	5,8
	1	1	5,0
5.	1	1	6,0
	2	3	5,5
	3	2	5,5

Tablica 6. Rezultati senzorske analize piva nakon 98 dana skladištenja.

Table 6. Results of beer sensory analysis after 98 days of storage.

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Redosljed pripreme uzorka / Sample preparation order	Ocjene senzorskog analitičara / Sensory analyst marks	
		Poredak / Order	Ocjena / Mark
1.	1	3	6,0
	2	2	5,0
	3	1	5,0
2.	3	2	5,5
	2	3	5,5
	1	1	5,0
3.	3	3	6,0
	1	1	5,5
	2	2	5,0
4.	2	2	6
	3	3	5,8
	1	1	5,3
5.	2	2	6,0
	3	1	5,5
	1	3	5,5



Tablica 7. *Pojedinačna uspješnost senzorskih analitičara piva tijekom ovog istraživanja*
Table 7. *Individual efficiency of beer sensory analyst during this research*

Senzorski analitičar / Sensory analyst	Uspješnost senzorske analize piva (%) / Efficiency of beer sensory evaluation (%)					Prosječna uspješnost / Average efficiency (%)
	Dani skladištenja / Storage days					
	0	28	56	84	98	
1.	33	33	33	100	33	46,4
2.	0	100	100	100	33	66,6
3.	100	33	-	33	100	53,2
4.	33	33	33	33	100	46,4
5.	33	100	100	33	33	59,8

Tablica 8. *Prosječne ocjene kakvoće piva nakon senzorske analize piva*
Table 8. *Average beer quality marks after sensory analysis*

Uzorak / Sample (mg/L O ₂)	Dani skladištenja / Storage days	Prosječna ocjena po analizi / Average mark per analysis	Prosječna ocjena uzorka / Average sample mark
0,09	0	6,6	6,3
	28	6,4	
	56	6,6	
	84	6,2	
	98	5,7	
0,29	0	6,4	6,0
	28	6,2	
	56	5,6	
	84	6,2	
	98	5,5	
0,63	0	6,5	5,7
	28	5,6	
	56	5,6	
	84	5,3	
	98	5,4	

istraživanja odgovaralo kakvoći standardnog piva donjeg vrenja. Trans-2-nonenal je dobar pokazatelj procesa oksidacije (starenja) piva odnosno kakvoće piva. Međutim, povećanje ukupne koncentracije kisika u boci piva nije značajnije utjecalo na promjenu koncentracije trans-2-nonenala tijekom skladištenja što je dokaz da kisik nije jedini parametar koji utječe na proces nastajanja trans-2-nonenala odnosno na oksidaciju (starenje) piva. Na osnovi rezultata uspješnosti pojedinih analitičara u

senzorskoj analizi piva jasno je da različiti čimbenici imaju utjecaj na ocjenu kakvoće piva, te da je potrebna pouzdana analitička metoda za procjenu procesa oksidacije, tj. starenja piva kao pomoć pri senzorskoj analizi kakvoće piva. Senzorsku analizu piva treba provesti s većim brojem treniranih analitičara jer je u tom slučaju smanjena mogućnost pogrešne procjene kakvoće piva.



5. Literatura

- Anonymous 1 (1987) *Analytica-EBC*, 4 ed., Brauerei- und Getränke-Rundschau, Zürich, Switzerland.
- Anonymous 2 (2011), Pravilnik o pivu, *Narodne novine*, 142/2011, 2867.
- Baxter E. D., Hughes P. S. (2001) *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Briggs D. E., Boulton C. A., Brookes P.A., Stevens R. (2004) *Brewing Science and practice*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Dalgliesh, C. E. (1977) Flavour stability, Proceedings of the 16th European Brewery Convention Congress, Amsterdam, Holland, 623 - 659
- Depraetere S. A., Delvaux F., De Schutter D., Williams I.S., Winderickx J., Delvaux F. R. (2008) The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling process. *Food Chemistry*, 107, 242-249.
- Drost B. W., van der Berg R., Freijee F. J. M., van Velde E. G., Hollemans, M. (1990) Flavour stability, *Journal of American Sociate of Brewing Chemist*, 48, 124-131.
- Kaneda H., Kano Y., Koshino S., Ohyanishiguchi H. (1992) Behavior and role of iron ions in beer deterioration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 2102-2107.
- Lermusieau G., Noel S., Liegeois C., Collin S. (1999) Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. *Journal of American Sociate of Brewing Chemist*, 57, 29-33.
- Marić V. (2009) *Tehnologija piva*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska.
- Santos J. R., Carneiro J. R., Guido L. F., Almeida P. J., Rodrigues J.A., Barros, A. A. (2003) Determination of E-2-nonenal by high performance liquid chromatography with UV detection - assay for the evaluation of beer ageing. *Journal of Chromatography A*, 985, 395-402.
- Stenroos L. E., Grabowski D. W., Spearman J., Siebert K. J. (1984) The semi - routine use of capillary gas chromatography for analysis of aroma volatiles in beer, *Journal of American Sociate of Brewing Chemist*, 43, 203-208
- Vanderhaegen B., Nevin H., Verachttert H., Derdelinckx G. (2006) The chemistry of beer ageing - a critical review. *Food Chemistry*, 95, 357-381.