

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET

DOKTORSKA DISERTACIJA

ISPITIVANJE SADRŽAJA I  
ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI  
FENOLNIH KISELINA U TOKU  
PROIZVODNJE SLADA I PIVA

Mentor

Kandidat

*Prof. dr Olgica S. Grujić*

*Mr Jelena D. Pejin, dipl. inž.*

Novi Sad, 2009. godine

*Prijatna mi je dužnost da se najtoplije zahvalim Prof. dr Olgici Grujić, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, mentoru ovog rada, za iscrpnu i svesrdnu pomoć u postavljanju problematike, diskusije tokom eksperimentalnog rada i korisne savete koje mi je dala u toku pisanja doktorske disertacije. Najlepše se zahvaljujem na podršci i razumevanju.*

*Prof. dr Jasni Čanadanović-Brunet, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu najtoplije se zahvaljujem na velikoj pomoći oko eksperimentalnog dela rada kao i brojnim savetima koje mi je nesebično dala u toku pisanja doktorske disertacije. Takođe, najlepše se zahvaljujem na strpljenju, podršci i razumevanju.*

*Za svesrdnu saradnju, nesebičnu pomoć i usmeravanje eksperimentalnog rada iskreno se zahvaljujem Prof. dr Siniši Markovu, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.*

*Uz dužno poštovanje zahvaljujem se dr Novi Pržulju, naučnom savetniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu koji mi je obezbedio sorte ječma za istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji.*

*Za pomoć oko statističke obrade najlepše se zahvaljujem Dr Iliji Tanackovu, docentu Fakulteta Tehničkih nauka u Novom Sadu.*

*Najtoplije se zahvaljujem Prof. dr Gordani Četković, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu na korisnim savetima, podršci i razumevanju koje mi je pružila tokom izrade doktorske disertacije.*

*Za pomoć oko optimizacije metode za određivanje sadržaja fenolnih kiselina zahvaljujem se Mr Dipl. hem. Đuri Vujiću iz Bio-ekološkog Centra u Zrenjaninu.*

*Duboku zahvalnost dugujem Mr Sunčici-Kocić Tanackov, asistentu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i Dipl. inž. Predregu Stevanoviću, na svesrdnoj pomoći i podršci.*

*Za pomoć u toku izrade eksperimentalnog dela ovog rada zahvaljujem se Mr Vesni Tumbas, Mr Slađani Savatović, Ruži Ikonić, Zorici Panjak i Branislavu Bastaji.*

*Svojoj porodici, majci Dušanki, ocu Dušanu i bratu Radoslavu se najtoplije zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, stalnoj podršci i velikom razumevanju.*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA  
INFORMACIJA**

**Redni broj:**

**RBR**

**Identifikacioni broj:**

**IBR**

**Tip dokumentacije:**

**TD** Monografska dokumentacija

**Tip zapisa:**

**TZ** Tekstualni štampani materijal

**Vrsta rada:**

**VR** Doktorska disertacija

**Autor:**

**AU** Mr Jelena D. Pejin, dipl. inž. tehnologije

**Mentor:**

**MN** Dr Olgica Grujić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

**Naslov rada:**

**NR** "Ispitivanje sadržaja i antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina u toku proizvodnje slada i piva"

**Jezik publikacije:**

**JP** Srpski (latinica)

**Jezik izvoda:**

**JI** Srpski/engleski

**Zemlja publikovanja:**

**ZP** Srbija

**Uže geografsko područje:**

**UGP** Vojvodina

**Godina:**

**GO** 2009

**Izdavač:****IZ**                      **Autorski reprint****Mesto i adresa:****MA**                      **Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1****Fizički opis rada:****FO**                      **Broj poglavlja:                      7**  
**Strana:                                      181**  
**Literaturnih citata:                      241**  
**Tabela:                                      82**  
**Slika:                                        97****Naučna oblast:****NO**                      **Prehrambena biotehnologija****Naučna disciplina:****ND**                      **Tehnologija slada i piva****Predmetna odrednica/ključne reči:****PO**                      **Fenolne kiseline, ječam, slad, pivo, antioksidativna aktivnost, ESR****UDK:**                      **543.645:547.587:663.4****Čuva se:****ČU**                      **Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija****Važna napomena:****VN**                      **Nema****Izvod/abstrakt:****IZ**                      **Cilj istraživanja doktorske disertacije je bio da se u konitnuitetu ispita sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i anitoksidativna aktivnost (antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale) u toku proizvodnje slada i piva (u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu, sladu, sladovini, ohmeljenoj sladovini, sladovini tokom fermentacija, mladom pivu i pivu) proizvedenih od tri priznate sorte pivskog ječma: NS 525, NS 565 i NS 583.**  
**Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ječma je bio: NS 525 - 0,76; NS 565 - 0,75 i NS 583 - 0,70 mg GAE/g suve materije. Sadržaj ukupnih fenola u svim proizvednim sladovima (0,96; 0,94 i 0,91 mg GAE/g suve materije za NS 525; NS 565 i NS 583) je bio viši od sadržaja u ječmu. Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola tokom svih faza sladovanja, dok**

su sorte NS 565 i NS 583 imale niže sadržaje ukupnih fenola. Najniži sadržaj ukupnih fenola imala je sorta NS 583.

U svim ispitivanim sortama ječma ferulna, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina su bile dominantne u uzorcima ječma, tokom sladovanja i u proizvedenom sladu.

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ječmu je iznosio za sortu NS 525 - 200,98; NS 565 - 184,10 i za NS 583 – 177,27  $\mu\text{g/g}$  suve materije. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je rastao kod svih ispitivanih sorti tokom močenja i dostigao maksimum u toku prvog dana klijanja za NS 525 – 548,31; NS 565 – 518,65 i NS 583 – 517,17  $\mu\text{g/g}$  suve materije. Dobijeni rezultati su pokazali da je proces sladovanja imao značajan uticaj na sadržaj pojedinačnih i ukupnih fenolnih kiselina.

Sorta NS 525 je imala najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale ( $\text{EC}_{50}$  za NS 525 - 0,658; NS 565 - 0,667 i NS 583 - 0,758 mg/ml) što pokazuje da sorta ječma ima uticaja na antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Za ispitivane sorte ječma, antiradikalna aktivnost na DPPH radikale se povisila značajno tokom močenja. U proizvedenim sladovima antiradikalna aktivnost na DPPH radikale bila je viša nego u ječmu. Trend porasta i smanjenja antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom sladovanja je bio isti za sve ispitivane sorte ječma.

Antiradikalna aktivnost na hidroksil radikale, izražena kao  $\text{EC}_{50}$  vrednost, u ispitivanim sortama ječma je iznosila: NS 525 – 0,352; NS 565 – 0,385 i NS 583 – 0,455 mg/ml. Može se zaključiti da je sorta NS 525 imala najvišu antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale. Antiradikalna aktivnost na hidroksil radikale se znatno povisila tokom močenja. U proizvedenom sladu je antiradikalna aktivnost na hidroksil radikale bila viša nego u ječmu. Trend porasta i smanjenja antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom sladovanja je bio isti za sve ispitivane sorte ječma.

Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola kao i najvišu antioksidativnu aktivnost tj. DPPH i hidroksil antiradikalnu aktivnost. Ovi rezultati pokazuju da sorta ječma može da utiče na antiradikalne osobine slada. Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina i najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale u toku sladovanja.

U svim proizvedenim sladovinama, ohmeljenim sladovinama i pivima, ferulna, *p*-kumarinska, vanilinska i sinapinska kiselina su imale najviše sadržaje. Sadržaj svih ispitivanih fenolnih kiselina je povišen nakon hmeljenja. Najviši ukupni sadržaj fenolnih kiselina je određen u ohmeljenim sladovinama (NS 525 - 461,41, NS 565 - 426,22 i NS 583 - 423,56  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ). Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je u svim proizvedenim pivima bio niži u odnosu na odgovarajuće ohmeljene sladovine.

U sladovini proizvedenoj iz slada NS 525 je određena najviša antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale što ukazuje da antiradikalska aktivnosti komponenti slada ima uticaja na antiradikalnu aktivnost proizvedene sladovine. U ispitivanim sladovinama, nakon hmeljenja se znatno povisila antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale se smanjila tokom glavne i naknadne fermentacije.

U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 sa najvišim sadržajem ukupnih fenola i ukupnih fenolnih kiselina određena je najviša antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Tokom proizvodnje piva sadržaj ukupnih fenola se blago smanjio, što ukazuje da je proces proizvodnje imao uticaja na njihov sadržaj. Trend smanjenja antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale odgovara smanjenju sadržaja ukupnih fenola i ukupnih fenolnih kiselina tokom procesa proizvodnje piva.

Primenjena GC-MS metoda za određivanje sadržaja fenolnih kiselina tokom procesa proizvodnje slada i piva se pokazala kao osetljiva, specifična i dobre ponovljivosti. Može se primeniti za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu, sladu, sladovini, ohmeljenoj sladovini, tokom fermentacije i u pivu.

Sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost slada, koji se koristi za proizvodnju piva, imaju značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost piva. Razumevanje promena sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti tokom proizvodnje slada i piva može nam pružiti vredne informacije o zaštiti endogenih antioksidanata u proizvodnji piva. Na taj način mogu se proizvoditi piva sa višom antioksidativnom aktivnošću i prema tome i povišenom otpornošću prema lipidnoj oksidaciji i starenju piva.

**Datum prihvatanja teme od strane Nastavno-Naučnog Veća:**

**DP** 17.07.2006. godine

**Datum odbrane:**

**DO** 2009. godina

**Članovi komisije:**

(Naučni stepen/Ime i prezime/Zvanje/Fakultet)

**KO**

**Predsednik:** dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

**Član (mentor):** dr Olgica Grujić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

**Član:** dr Siniša Markov, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

**Član:** dr Novo Pržulj, naučni savetnik Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY**

<b>KEY WORD DOCUMENTATION</b>
-----------------------------------

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Document type:**

**DT**

**Monographic publication**

**Type of record:**

**TR**

**Textual material, printed**

**Contents code:**

**CC**

**Ph.D. thesis**

**Author:**

**AU**

**Jelena D. Pejin, M.Sc., B.Sc.**

**Mentor:**

**MN**

**Olgica S. Grujić, Ph.D., Full professor, Faculty of  
Technology, Novi Sad**

**Title:**

**TI**

**“Investigation of phenolic acids content and  
antioxidant activity during malt and beer production”**

**Language of text:**

**LT**

**Serbian (roman)**

**Language of abstract:**

**LA**

**Serbian (roman)/English**

**Country of publication:**

**CP**

**Serbia**

**Locality of publication:**

**LP**

**Vojvodina**

**Publication year:**

**PY**

**2009**



**Publisher:****PU****Author's reprint****Publishing place:****PP****Bulevar Cara Lazara 1, 21 0000 Novi Sad, Serbia****Physical description:****PD****Chapters: 7**  
**Pages: 181**  
**References: 241**  
**Tables: 82**  
**Figures: 97****Scientific field:****SF****Food Biotechnology****Scientific discipline:****SD****Malt and Beer Technology****Subject/key words:****SKW****Phenolic acids, barley, malt, beer, antioxidant activity, ESR****UC:****543.645:547.587:663.4****Holding data:****HD****Library of Faculty of Technology, Novi Sad,  
Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia****Note:****N****Ph. D. Thesis = Doktorska disertacija  
Faculty of Technology = Tehnološki fakultet****Abstract:****AB**

**Studies carried out in the frame of the doctoral thesis aimed at continuous determination of the content of total phenolics, phenolic acids and antioxidant activity (antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals) during malt and beer production (in barley, steeped barley, green malt, malt, wort, hopped wort, fermenting wort, green beer, and beer) produced from three accepted brewer's barley varieties: NS 525, NS 565, and NS 583.**

**The total phenolics content in the barley samples was 0.76 for NS 525, 0.75 for NS 565 and 0.70 mg GAE/g dry matter (d.m.) for NS 583. Higher content of total phenolics was determined in the malt samples in comparison with the barley samples: (0.96, 0.94, and**

0.91 mg GAE/g d.m. for NS 525, NS 565, and NS 583, respectively). Variety NS 525 was the highest in total phenolics content during all stages of malting when compared to the other varieties. The lowest content of total phenolics was found in the variety NS 583.

In all examined samples, ferulic, *p*-coumaric and vanillic acid dominated in the barley samples, during malting and in the produced malts.

Content of total phenolic acids in the barley samples was 200.98 for NS 525, 184.10 for NS 565 and 177.27 µg/g d.m. for NS 583. During steeping, the content of total phenolic acids increased for all samples reaching the maximum at the first day of germination (NS 525 – 548.31; NS 565 – 518.65, and NS 583 – 517.17 µg/g d.m.). The obtained results revealed that the malting process had significant impact on the content of total and individual phenolic acids.

Variety NS 525 showed the highest antiradical activity on DPPH radicals (EC<sub>50</sub> for NS 525 was 0.658, for NS 565 0.667, and for NS 583 0.758 mg/ml) indicating that barley variety influences the antiradical activity on DPPH radicals. Antiradical activity on DPPH radicals significantly increased during steeping for all investigated barley varieties. Higher antiradical activity on DPPH radicals was determined in produced malts when compared to corresponding barley varieties. Similar increasing and decreasing trends in the antiradical activity on DPPH radicals during malting were observed in all investigated barley varieties.

The antiradical activity on hydroxyl radicals, expressed as EC<sub>50</sub> value, in investigated barley varieties, was: 0.325 for NS 525, 0.385 for NS 565, and 0.455 mg/ml for NS 583. It can be concluded that barley variety NS 525 showed the highest antiradical activity on hydroxyl radicals. The antiradical activity on hydroxyl radicals significantly increased during steeping. Higher antiradical activity on hydroxyl radicals was determined in produced malts when compared to corresponding barley varieties. Similar increasing and decreasing trends in the antiradical activity on hydroxyl radicals during malting were observed in all investigated samples.

Variety NS 525 had the highest content of total phenolics and exhibited the highest antioxidant activity that is antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals. These results suggest that variety can influence the malt antiradical properties. Variety

NS 525 was the highest in total phenolics content, total phenolic acids content and antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals during malting.

The highest contents of ferulic, *p*-coumaric, vanillic, and sinapic acids were determined in all wort, hopped wort and beer samples. Increased contents of all phenolic acids were observed after hopping. The highest content of total phenolic acids was determined in the hopped worts (461.41 for NS 525, 426.22 for NS 565, and 423.56 µg/100 ml for NS 583). The beers contained less total phenolic acids when compared to the corresponding hopped worts.

Wort produced from NS 525 malt showed the highest antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals which indicates that the antiradical activity of malt components affects the antiradical activity in produced wort. After hopping, antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals significantly increased in all worts. The antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals decreased during primary and secondary fermentation.

Wort produced from NS 525 malt contained the highest total phenolic content, total phenolic acids content and showed the highest antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals. During beer production, content of total phenolic compounds slightly decreased which indicates that production process had an influence on their content. Similar decreasing trends between the antiradical activity on DPPH and hydroxyl radicals and the contents of total phenolics and total phenolic acids during beer production were observed.

The applied GC-MS method for determination of phenolic acids contents during malt and beer production was sensitive, specific and had good repeatability. It can be used for determination of phenolic acids content in barley, steeped barley, green malt, malt, wort, hopped wort, during fermentation and in beer.

The content of total phenolics, phenolic acids and antioxidant activity of malt used for beer production have significant influence on the beer antioxidant activity. Understanding how the phenolic acids and antioxidant activity change during malt and beer production can provide valuable information about the protection of endogenous antioxidants in beer production. In this way, the production of beer with enhanced antioxidant activity is possible and therefore

**higher resistance to lipid oxidation and longer shelf-life could be introduced.**

**Accepted by the Scientific Board on:**

**ASB 17.07.2006.**

**Defended on:**

**DE 2009**

**Thesis defend board:**

**(Names/Surname/Degree/Title/Faculty)**

**DB**

**President: Jasna Čanadanović-Brunet, Ph.D., Full professor, Faculty of Technology, Novi Sad**

**Member (mentor): Olgica Grujić, Ph.D., Full professor, Faculty of Technology, Novi Sad**

**Member: Siniša Markov, Ph.D., Associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad**

**Member: Novo Pržulj, Ph. D., Scientific advisor, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad**

**S A D R Ź A J**

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. OPŠTI DEO</b>	7
2.1. Slobodni radikali i oksidativni procesi	7
2.2. Kiseonik i reaktivne vrste kiseonika u tehnologiji slada i piva	9
2.3. Antioksidanti	12
2.3.1. Endogeni antioksidanti	14
2.3.2. Egzogeni antioksidanti	15
2.4. Polifenolna jedinjenja	16
2.4.1. Fenolne kiseline	19
2.4.2. Flavonoidi	21
2.5. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u ječmu	22
2.6. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u toku procesa sladovanja i u sladu	25
2.7. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u hmelju	30
2.8. Antioksidativna aktivnot polifenolnih jedinjenja u sladovini	35
2.9. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u ohmeljenoj sladovini	39
2.10. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja tokom fermentacije i u pivu	41
2.11. Potencijalne promene ukusa tokom starenja piva	53
2.12. Nastajanje mutnoće piva	56
2.13. Pregled metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti	60
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA</b>	63
3.1. Materijali	63
3.1.1. Hemikalije i pribor	63
3.1.2. Ječam	63
3.1.3. Hmelj	63
3.2. Metode rada	63
3.2.1. Analiza ječma	63
3.2.2. Mikrosladovanje	64
3.2.3. Analliza slada	64
3.2.4. Analiza hmelja	65
3.2.5. Priprema sladovine za fermentaciju	65
3.2.6. Priprema inokuluma za fermentaciju	65
3.2.7. Fermentacija	66
3.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih fenola, sadržaja fenolnih kiselina, antioksidativne aktivnosti (antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale)	66
3.2.9. Statiščka obrada dobijenih rezultata	71
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	72
4.1. Rezultati analize ječma	72
4.2. Rezultati mikrosladovanja ječma	73
4.3. Rezultati analize slada	74
4.4. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu	76

4.5. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu	77
4.6. Rezultati antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu	90
4.7. Rezultati antiradikalske aktivnosti na hidroksil radikale u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu	91
4.8. Rezultati analiza hmelja	94
4.9. Rezultati tehnoloških parametara sladovina	96
4.10. Rezultati tehnoloških parametara ohmeljenih sladovina za fermentaciju	96
4.11. Rezultati tehnoloških parametara tokom fermentacija i dobijenih piva	97
4.12. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima	100
4.13. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima	102
4.14. Rezultati antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima	109
4.15. Rezultati antiradikalske aktivnosti na hidroksil radikale u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima	111
<b>5. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA</b>	<b>115</b>
5.1. Modelovanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje slada i piva	115
5.2. Korelaciona analiza sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku procesa sladovanja i proizvodnje piva	118
5.3. Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalnih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja i proizvodnje piva	122
5.4. Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva	148
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>163</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>166</b>

## 1. UVOD

Pivo je jedno od najčešće konzumiranih alkoholnih pića u svetu. Bogato je hranljivim sastojcima, ugljenim hidratima, amino kiselinama, mineralima, vitaminima i fenolnim jedinjenjima (Gerhäuser, 2005). Pivo je osvežavajuće piće nastalo alkoholnom fermentacijom iz vodenog ekstrakta sladovanog ječma sa hmeljom. Proizvodnja piva je stoga višestepeni proces, koji obuhvata biološku konverziju sirovina u finalni proizvod (Walker, 1998). Za proizvodnju piva su potrebne četiri sirovine i to: ječam odnosno slad, hmelj, voda i kvasac. Kvalitet svih sirovina ima odlučujući uticaj, čak često presudan, na kvalitet gotovog proizvoda-piva (Grujić i sar., 2000).

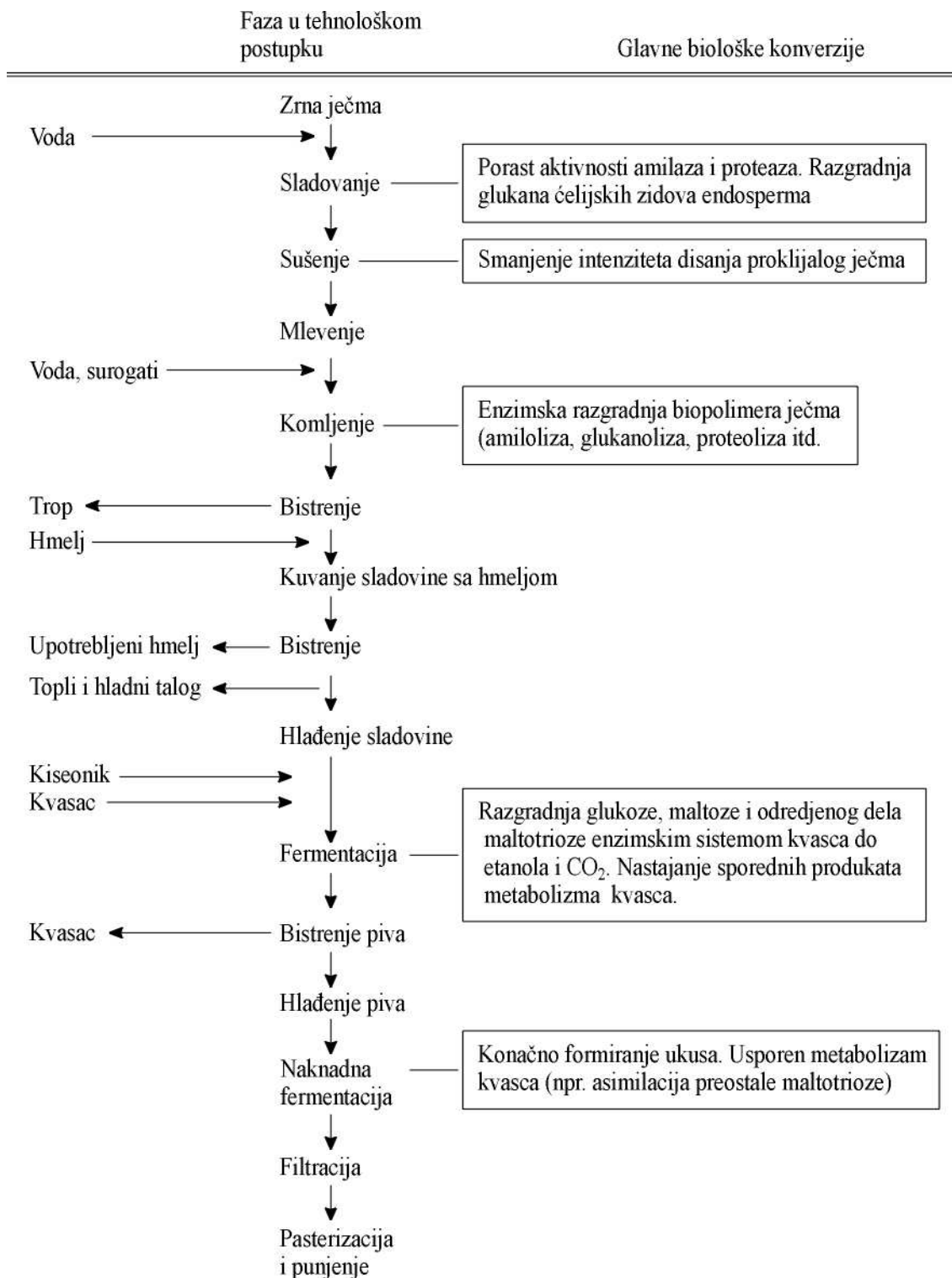
Prema definiciji datoj bavarskim Zakonom o čistoći proizvodnje piva ("Reinheitsgebot") 1516. godine, pivo je proizvod koji se mora dobijati samo iz sladovanog ječma, hmelja i vode, procesom fermentacije uz upotrebu pivskog kvasca (Grujić i Gaćeša, 1999; Kunze, 1998). U zemljama u kojima se za proizvodnju piva ne primenjuje Zakon o čistoći proizvodnje ("Reinheitsgebot"), mogu se koristiti i nesladovane sirovine (Grujić i sar., 2001; Grujić, 2002; Pejin i sar., 2006). Na Slici 1.1 data je pojednostavljena shema proizvodnje piva. Na osnovu prikazane sheme može se zaključiti da je proizvodnja piva veoma složen proces i da kvalitet gotovog piva zavisi od velikog broja parametara: sorte ječma, uslova sladovanja, temperature i pH tokom komljenja, sorte hmelja koji se dodaje tokom hmeljenja sladovine, soja kvasca i uslova fermentacije.

Karakteru piva najviše doprinose slad i kvasac, ali i bitno utiču i voda i hmelj koji se, takođe, primenjuju u proizvodnji piva. Skrob ječma obezbeđuje šećere za alkoholnu fermentaciju. Za razliku od drugih žitarica (pšenice), ječam ima plevicu koja formira filtracioni sloj kroz koji se odvaja sladovina (Bamforth, 2000).

Proizvodnja slada se sastoji iz tri glavne faze: močenja, klijanja i sušenja. Svrha sladovanja je sinteza i aktivacija enzima u ječmenom zrnju i razgradnja sastavnih delova zrna ječma. Sladovanje započinje močenjem očišćenog i sortiranog ječma u vodi na temperaturi 14-18°C u trajanju od 48 sati do stepena namočenosti od 42 do 46%. Nakon močenja sledi klijanje koje obično traje 3-5 dana na 16-20°C. Tokom klijanja enzimi razlažu ćelijske zidove i neke proteine endosperma u kome se nalazi skrob. Amilaze koji se sintetišu u procesu klijanja zrna ječma su važne za proces komljenja u proizvodnji piva. Sušenjem se snižava sadržaj vlage u zelenom sladu i zaustavlja se klijanje (Bamforth, 2000).

Proizvodnja piva započinje mlevenjem slada. Tokom mlevenja se mora očuvati plevica jer je neophodna kao filtracioni materijal u toku ceđenja komine. Nakon mlevenja usitnjeni slad se meša sa vodom i ovaj postupak se naziva komljenje. Tokom procesa komljenja sastojci slada se rastvaraju i prelaze u vodeni rastvor tj. u sastojke ekstrakta. Transformacije koje se odigravaju za vreme komljenja imaju odlučujući značaj u proizvodnji piva. Osnovni zadaci komljenja su dobijanje što je moguće više ekstrakta i to što boljeg sastava. Tokom komljenja najveći deo ekstrakta nastaje delovanjem enzima na optimalnim temperaturama (Kunze, 1998). Amilaze tokom komljenja razgrađuju skrob, ali tek nakon hidratacije i bubrenja skroba (želatinizacije). Nakon ošećerenja komine sledi bistrenje sladovine i kuvanje sladovine sa hmeljom. Hmeljenje sladovine traje obično oko sat vremena na temperaturi ključanja. Kuvanje sladovine sa hmeljom ima za cilj sterilizaciju sladovine, precipitaciju proteina (koji uzrokuju koloidnu nestabilnost piva ako se ne uklone) i smanjenje ukusa piva na ječam. Najvažniji sastojci hmelja za

pivarstvo su  $\alpha$ -kiseline i esencijalna ulja. Tokom hmeljenja  $\alpha$ -kiseline se izomerizuju u *izo- $\alpha$ -kiseline* koje daju gorčinu pivu (Bamforth, 2000). Ohmeljena sladovina se bistri, hladi, aeriše i zasejava pivskim kvascem (*Saccharomyces cerevisiae*).



Slika 1.1. Shema proizvodnje piva (Walker, 1998)



Fermentacija sladovine je proces koji se izvodi u anaerobnim uslovima na temperaturama nižim od 20°C (za proizvodnju piva donjeg vrenja na 8-15°C, a gornjeg vrenja na 15-20°C) i sastoji se od faze glavne i faze naknadne fermentacije. Glavna fermentacija u zavisnosti od uslova traje obično od 5 do 7 dana. Reakcije koje se odigravaju tokom fermentacije se samo uslovno mogu podeliti na one koje se dešavaju tokom glavne fermentacije i one koje se odigravaju za vreme naknadne fermentacije, jer se pojedine reakcije međusobno prepliću. Stoga se promene koje se dešavaju prilikom glavne i prilikom naknadne fermentacije moraju posmatrati kao međusobno zavisni procesi (Linko i sar., 1998). Naknadna fermentacija se vodi na nižim temperaturama (od -1°C do 1°C) i traje najmanje tri dana. Pod ovim uslovima dolazi do taloženja proteina pri čemu se smanjuje mogućnost kasnijeg zamućenja piva. Filtracija piva se izvodi sa minimalnim gubicima ugljen-dioksida. Nakon filtracije i pasterizacije pivo se puni u ambalažu (Bamforth, 2000).

Najvažniji sastojci ječma su skrob, proteini, bezazotne ekstraktivne supstance, masti, celuloza, mineralne supstance i fenolna jedinjenja. Skrob ima najveći udeo u suvoj materiji zrna ječma (oko 60%). Bezazotne ekstraktivne supstance čine oko 14%, proteini oko 11%, celuloza oko 6%, masti oko 3% suve materije ječmenog zrna (Schuster i sar., 1999). Sve ova jedinjenja neophodna su za proizvodnju slada i piva, ali značajan uticaj na kvalitet piva imaju i jedinjenja prisutna u ječmenom zrnu u znatno nižim sadržajima. Među njih spadaju i fenolna jedinjenja koja utiču na mnoge osobine piva. U ječmu se nalazi 0,1-0,3% suve materije fenolnih jedinjenja (Schuster i sar., 1999).

Najveći deo fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina u pivu potiče iz ječmenog slada (70-80%), a ostatak iz hmelja i nesladovanih sirovina (Hardwick, 1995; Garcia i saradnici, 2004; Vanderhaegen i saradnici, 2006). Sirovine za proizvodnju piva, kao što su ječmeni slad i nesladovane žitarice (kukuruz, pšenica i pirinač), koji se koriste kao surogati, hmelj i druge aromatične sirovine, doprinose sadržaju fenolnih i polifenolnih jedinjenja u početnim fazama proizvodnje. Fenolna jedinjenja u pivu su prisutna u različitim oblicima i njihova isparljivost zavisi od molekulske mase (Shahidi i Naczki, 2003).

Naziv fenol označava značajnu specifičnost monohidroksi derivata benzena i opšte je prihvaćen za sve derivate benzena i njemu slična jedinjenja koja imaju aromatični nukleus na kome je vezana jedna ili više (najviše tri) hidroksilnih grupa, tako da postoje mono-, di- i tri- hidroksi benzeni ili fenoli (Milić i sar., 2000). Fenoli su u pivu prisutni kao monomeri i polimeri. Monomeri su fenolne kiseline, flavonoli i njihovi glikozidi: katehini, antocijanidini i kumarini (Floridi i sar., 2003).

Stabilnost ukusa piva je danas jedna od najvažnijih tema istraživanja u pivarstvu. Iako se smatra da proizvodnja piva i proces punjenja imaju glavnu ulogu, pažnja je sve više usmerena prema osobinama sirovina za proizvodnju piva i tehnologiji sladovanja u cilju boljeg razumevanja faktora koji utiču na stabilnost ukusa piva. Smatra se da je nastajanje aldehida velike molekulske mase i prekursora tokom sladovanja i komljenja glavni mehanizam koji učestvuje u nastajanju nepoželjnih senzornih osobina i starenje piva (Guido i sar., 2005). U „starom“ pivu sa nepoželjnim senzornim osobinama su određene značajno povišeni sadržaji aldehida, ketona i estara (Varmuza i sar., 2002). Naročita pažnja je posvećena *trans*-2-nonenalu zato što ovo jedinjenje ima izuzetno nizak prag osetljivosti ukusa i najviše doprinosi nepoželjnom ukusu piva na „karton“ koji je karakterističan za „stara“ piva (Liégeois i sar., 2002a). Ovi aldehidi mogu nastati različitim metaboličkim putevima tokom sladovanja i komljenja, pri čemu se smatra da je

glavni izvor enzimska i neenzimska razgradnja polinezasićenih masnih kiselina (Guido i sar., 2005).

Izborom odgovarajuće sorte ječma i parametara procesa sladovanja može se proizvesti slad visoke antioksidativne aktivnosti bez primene egzogenih antioksidanta (Liégeois i sar., 2002). Ako se proizvede slad više antioksidativne aktivnosti dobiće se i pivo više antioksidativne aktivnosti, što povoljno utiče na stabilnost ukusa. Ovo može dovesti do veće potražnje slada sa višom antioksidativnom aktivnošću. Pored toga, vrlo je važna proizvodnja slada od domaćih sorti ječma. Takođe, nije u potpunosti ispitano kako se menja antioksidativna aktivnost tokom procesa sladovanja.

Proces sladovanja može imati uticaja na nestabilnost piva zbog proksidativnih i antioksidativnih aktivnosti (Guido i sar., 2005). Fenolna jedinjenja i fenolne kiseline prisutne u sladu su prirodni antioksidanti sposobni da odgode, uspore ili spreče procese oksidacije i prema tome imaju značajan efekat u tehnologiji slada i piva kao inhibitori negativnih posledica oksidacije (Friedrich i sar., 2000). U toku proizvodnje slada i piva odvijaju se oksidacione reakcije koje uključuju nastajanje i transformaciju velikog broja slobodnih radikala. Zaštita endogenih antioksidanata prisutnih u ječmu tokom sladovanja može povećati antioksidativni potencijal piva inhibirajući oksidacione procese koji negativno utiču na stabilnost ukusa piva i prema tome izbeći upotrebu sintetskih antioksidanta (Boivin i sar., 1995).

Kafena, *p*-kumarinska, vanilinska, ferulna i protokatehinska kiselina su prisutne u skoro svim biljkama. Fenolne kiseline su povezane sa bojom, senzornim karakteristikama, hranljivim i antioksidativnim osobinama hrane. Utiču na ukus (trpkost i oštrinu) (Schuster, 1999; Robbins, 2003), aromu, boju (Goupy i sar., 1999), fizičku i hemijsku stabilnost (Montanari i sar., 1999) i trajnost piva (Jandera i sar., 2005).

Od fenolnih kiselina u ječmu i sladu se u najvećim količinama nalaze ferulna i *p*-kumarinska (Briggs i sar., 2005). Sadržaj ferulne kiseline je najviši u ćelijskim zidovima aleuronskog sloja (Maillard i Berset, 1995; Holtekjølen i sar., 2006). Fenolne kiseline prisutne u hmelju su galna, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, kumarinska, ferulna, protokatehinska i kafena (Schuster i sar., 1988). U sladovini i pivu su nađene sledeće fenolne kiseline: galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, hlorogenska, 2,6-hidroksibenzoeva, vanilinska, homovanilinska, kafena, siringinska, ferulna, *p*-kumarinska, *m*-kumarinska, *o*-kumarinska (Montanari i sar., 1999; Floridi i sar., 2003; Bamforth, 2004).

Tokom poslednjih godina fenolna jedinjenja su privukla pažnju naučnika koji se bave hranom i medicinom zbog njihovih antioksidativnih, antiinflamatornih, antimutagenih i antikancerogenih osobina i njihovih sposobnosti da menjaju neke ključne funkcije ćelijskih enzima (Yu i sar., 2001; Baxter i Walker, 2001; Walker i sar., 2001). Smatra se da fenoli utiču na transdukciju, aktivaciju faktora transkripcije i ekspresiju gena (Nardini i Ghiselli, 2004).

Fenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidativnu, odnosno antiradikalnu aktivnost na sledeće načine: predajom H-atoma, direktnim vezivanjem („hvatanjem“) reaktivnih kiseonikovih i azotovih radikala, heliranjem prooksidativnih metalnih jona (Fe, Cu) i inhibicijom prooksidativnih enzima (lipoksigenaza, mijeloperoksidaza, ksantin-oksidaza, NAD(P)H oksidaza, enzimi citohroma P-450) (Rice-Evans i sar., 1996; Amorati i sar., 2006). Iako postoji nekoliko mehanizama smatra se da je dominantan oblik antioksidativne aktivnosti „hvatanje“ slobodnih radikala transferom vodonikovog atoma (Robbins, 2003).

Objavljeni rezultati ukazuju na efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih antioksidanata izolovanih iz biljaka, prehrambenih proizvoda, bezalkoholnih i alkoholnih pića (Namiki, 1990; Walker i sar., 2001; Zuo i sar., 2002). Dosadašnja ispitivanja su pokazala da i pivo poseduje antioksidativnu aktivnost. Walker i saradnici (2001) su utvrdili da 500 ml piva ima ukupnu antioksidativnu aktivnost 910-1340  $\mu\text{Mol}$  Trolox ekvivalenta. Bamforth (2004) navodi da pivo ima višu antioksidativnu aktivnost od belog vina i sokova od pomorandže i jabuke.

Sadržaj fenolnih kiselina u gotovom pivu zavisi od njihove ekstrakcije tokom komljenja slada sa vodom. Fenolne kiseline su u sladu vezane glikozidnim vezama koje se raskidaju tokom ključanja sladovine pri čemu se oslobađaju slobodne fenolne kiseline (Hardwick, 1995).

Tokom proizvodnje slada i piva posebna pažnja se posvećuje prisutnim antioksidantima tj. fenolnim jedinjenjima i proizvodima Maillard-ove reakcije da bi se proizvelo pivo sa visokom antioksidativnom aktivnošću i zbog toga povišene otpornosti na oksidaciju lipida (Pascoe i sar., 2003).

Maillard i Baret (1995) su utvrdili da fenolne kiseline iz plevice ječma mogu imati ulogu prirodnih antioksidanata u procesu proizvodnje piva. Daljim istraživanjima Maillard i saradnici (1996) su utvrdili da slad pokazuje višu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ječmom, zbog oslobađanja i modifikacije fenolnih kiselina tokom procesa sladovanja. Tokom procesa sušenja slada povećava se sadržaj slobodnih fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost (na temperaturama od 80-100°C). Na temperaturi sušenja 110°C sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost se snižava (Inns i sar., 2005).

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o istraživanjima sadržaja ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti tokom celokupnog procesa proizvodnje slada i piva. S obzirom da su fenolna jedinjenja veoma važni antioksidanti, njihovo određivanje je bitno da bi se utvrdilo kako se njihov sadržaj menja tokom procesa proizvodnje slada i piva i koji deo fenolnih kiselina iz ječma odnosno slada i hmelja dospeva u gotovo pivo. Pored uobičajanih tehnoloških parametara važnih za tehnologiju slada i piva tokom izrade ove doktorske disertacije pratio se sadržaj fenolnih kiselina, sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost (antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale) u ječmu, tokom mikrosladovanja, sladu, sladovini, hmelju, ohmeljenoj sladovini, sladovini u fermentaciji, mladom pivu i pivu.

**Cilj istraživanja doktorske disertacije je bio da se u konitnuitetu ispita sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost (antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale) u toku proizvodnje slada i piva (u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu, sladu, sladovini, ohmeljenoj sladovini, sladovini tokom fermentacije, mladom pivu i pivu) proizvedenih od tri priznate sorte pivskog ječma: NS 525, NS 565 i NS 583.**

Prvi zadatak doktorske disertacije bio je da se uradi optimizacija metode za određivanje sadržaja fenolnih kiselina. Optimizacija GC-MS metode za određivanje sadržaja fenolnih kiselina tokom svih faza procesa proizvodnje slada, sladovine i piva obuhvatila je definisanje uslova hidrolize (oslobađanja fenolnih kiselina iz vezanog oblika) i određivanja njihovog sadržaja GC-MS metodom.

Drugi zadatak je bio tehnološka ocena navedenih sorti ječma i analiza sadržaja ukupnih fenola i fenolnih kiselina, kao i određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale.

Treći zadatak ove doktorske disertacije je proizvodnja slada iz navedenih sorti ječma što je obuhvatalo mikrosladovanje navedenih sorti ječma. Mikrosladovanje je

uključivalo močenje ječma, klijanje i sušenje zelenog slada. Tokom procesa močenja praćen je stepen namočenosti ječma. U toku mikrosladovanja praćeni su ukupni gubici tj. gubici na disanje i klicu. Takođe, u svim fazama mikrosladovanja određivani su sadržaji ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antiradikalna aktivnost na DPPH i hidroksil radikale.

Četvrti zadatak doktorske disertacije bio je analiza proizvedenih sladova koja je obuhvatala određivanje tehnoloških pokazatelja i sadržaja ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. U hmelju je određen sadržaj ukupnih smola,  $\alpha$ -kiselina, ukupnih fenola i fenolnih kiselina kao i antiradikalna aktivnost na DPPH i hidroksil radikale.

Peti zadatak bio je proizvodnja sladovine, ohmeljene sladovine i fermentacija. U proizvedenim sladovinama i ohmeljenim sladovinama urađena je tehnološka ocena kvaliteta, kao i određivanje sadržaja ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. Tokom glavne i naknadne fermentacije praćeni su tehnološki parametri, kao i sadržaji ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. U proizvedenim pivima urađena je tehnološka ocena kvaliteta piva kao i sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antiradikalna aktivnost na DPPH i hidroksil radikale.

Statistička obrada dobijenih rezultata obuhvatila je modelovanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje slada i piva. U cilju određivanja zavisnosti sadržaja ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale urađena je korelaciona analiza sadržaja ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalnih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku proizvodnje slada i piva.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Slobodni radikali i oksidativni procesi

Slobodni radikali su atomi, joni i molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi (Čanadanović-Brunet, 1997). Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Nespareni elektron može se nalaziti na C-atomu, kao kod alkil radikala ( $\cdot\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$ ), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil- i superoksid anjon radikala ( $\text{RO}\cdot$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ ), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala ( $\text{NO}\cdot$ ) ili na S-atomu, kao kod tiil radikala ( $\text{n-C}_6\text{H}_9\text{S}\cdot$ ) i dr. Nespareni elektron imaju i atom vodonika ( $\text{H}\cdot$ ) i halogena ( $\text{Cl}\cdot$ ), alkalni metali ( $\text{Na}\cdot$ ) i neki joni metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Piletić i sar., 1992).

Reaktivne vrste se dele na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika („reactive oxygen species“ ROS), hlora („reactive chlorine species“ – RCS) i azota („reactive nitrogen species“ - RNS) date su u Tabeli 2.1 (Halliwell i Whiteman, 2004). Kiseonik je neophodan za nastajanje svih reaktivnih vrsta kiseonika, azota i hlora (Fang i sar., 2002).

Na osnovu relativne stabilnosti, slobodni radikali se dele na nepostojane („kratkoživeće“) i postojane („dugoživeće“). Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku karakteristiku koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron (Čanadanović-Brunet, 1997).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) su opšti termin koji uključuje i kiseonikove radikale i određene neradikale vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale ( $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell i Whiteman, 2004).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i azota (RNS) su endogeni intermedijeri koji neprekidno nastaju u živim ćelijama i imaju esencijalnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa. Oni su jedinjenja koja učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, inflamacija i adhezija. Narušavanje oksidoreduktivne ravnoteže dovodi do oksidativnog stresa i time do patoloških manifestacija (Vaya i Aviram, 2001).

Prihvaćeno je da ROS imaju različite uloge *in vivo*. Neke reaktivne vrste kiseonika su pozitivne i učestvuju u proizvodnji energije, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, signalizaciji ćelijskih funkcija i sintezi biološki važnih jedinjenja. Međutim, mogu biti štetne pošto „napadaju“ lipide ćelijskih membrana, proteine tkiva ili enzime, ugljene hidrate i DNK, uzrokuju oksidaciju i time izazivaju oštećenja membrana i DNK i modifikuju proteine (uključujući i enzime) (Pietta, 2000).

Obzirom da reaktivne vrste kiseonika nastaju ćelijskim metaboličkim procesima, ćelije su razvile nekoliko zaštitnih mehanizama u cilju sprečavanja nastajanja ili inhibicije reaktivnih vrsta kiseonika. Ovi mehanizmi uključuju antioksidativne enzime i antioksidante (Wu i Cederbaum, 2003).

Slobodni radikali reaguju brzo sa drugim jedinjenjima u cilju postizanja stabilnosti. Uopšteno, slobodni radikali „napadaju“ najbliže stabilne molekule, vezujući njihove elektrone. Kada molekul ostane sa nesparenim elektronom i sam postaje slobodni radikal, i započinje lančanu reakciju. Na primer, ovaj proces može inicirati lipidnu peroksidaciju koja dovodi do destabilizacije i razgradnje ćelijskih membrana (Kaur i Kapoor, 2001).

**Tabela 2.1. Nomenklatura reaktivnih slobodnoradikalskih i neradikalskih vrsta (Halliwell i Whiteman, 2004)**

Slobodnoradikalске vrste	Neradikalске vrste
<b>Reaktivne vrste kiseonika (ROS)</b>	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet -}$	Vodonik peroksid, $H_2O_2$
Hidroksil radikal, $OH^{\bullet}$	Hipobromna kiselina, HOBr
Hidroperoksil radikal, $HO_2^{\bullet}$	Hipohlorna kiselina, HOCl
	Ozon, $O_3$
Peroksil radikal, $RO_2^{\bullet}$	Singletni kiseonik, $^1\Delta_g O_2$
Alkoksil radikal, $RO^{\bullet}$	Organski peroksidi, ROOH
Karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet -}$	Peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup>
Ugljendioksidni radikal, $CO_2^{\bullet -}$	Peroksinitritna kiselina, ONOOH
<b>Reaktivne vrste hlora (RCS)</b>	
Atomski hlor, $Cl^{\bullet}$	Hipohlorna kiselina, HOCl
	Nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$
	Hloramini
	Hlor (gas) $Cl_2$
<b>Reaktivne vrste azota (RNS)</b>	
Azotmonoksidni radikal, $NO^{\bullet}$	Nitritna kiselina, $HNO_2$
Azotdioksidni radikal, $NO_2^{\bullet}$	Nitrozil katjon, $NO^+$
	Nitrozil anjon, $NO^-$
	Azot (III) oksid, $N_2O_3$
	Azot (IV) oksid, $N_2O_4$
	Peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup>
	Peroksinitritna kiselina, ONOOH
	Nitronijum katjon, $NO_2^+$
	Alkilperoksinitriti, ROONO
Nitronijum hlorid, $NO_2Cl$	

Smatra se da slobodni radikali izazivaju čitav niz poremećaja i patogeneza. Sa napretkom istraživanja ROS i RNS, otkriveno je da oni učestvuju u brojnim biološkim funkcijama. Oksidativni stres može izazvati oksidaciju lipida i proteina i time dovesti do promena njihove strukture i funkcije. ROS/RNS uzrokuju oštećenja DNK što je povezano sa razvojem malignih oboljenja, kardiovaskularnih bolesti, neuroloških poremećaja i bolesti pluća. Smatra se da je starenje organizma uzrokovano stalnom izlaganju organa negativnom uticaju ROS/RNS tokom života, istovremeno sa opadanjem antioksidativnog potencijala. Nutritivni antioksidanti doprinose uspostavljanju oksidoreduktivne ravnoteže u organizmu (Vaya i Aviram, 2001). Čelije se štite od toksičnog dejstva slobodnih radikala brojnim endogenim proteinima, enzimima i neproteinskim biomolekulima, koji zajedno čine antioksidativni sistem (Đorđević i sar., 2000).

Reaktivne vrste kiseonika ili slobodni radikali u biološkim sistemima mogu nastati dejstvom proksidativnih sistema enzima, lipidnom oksidacijom, iridacijom, inflamacijom, pušenjem i zagađenjem vazduha (Lee i sar., 2004). Toksični efekti kiseonika u biološkim sistemima kao što su oksidacija lipida, inaktivacija enzima, mutacija DNK, destrukcija ćelijskih membrana i same ćelije se pripisuju redukciji

molekula kiseonika do reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Wu i Cederbaum, 2003). Kliničke studije su pokazale da su reaktivne vrste kiseonika povezane sa mnogim degenerativnim bolestima starenja uključujući ateroskleroza i brže starenje, vazospazme, traumatu, moždani udar, astmu, artritis, infarkt srca, dermatitis, kataraktogenezu, oštećenje retine, hepatitis i oštećenje jetre. Poznato je i da reaktivne vrste kiseonika izazivaju apoptozu ćelija (Lee i sar., 2004).

## 2.2. Kiseonik i reaktivne vrste kiseonika u tehnologiji slada i piva

Kiseonik je esencijalan za metabolizam, ali pod određenim uslovima može biti veoma štetan (Valenzuela, 2002). Molekul kiseonika, O<sub>2</sub>, je stabilan i potrebno ga je prevesti u jedan od nekoliko slobodnih kiseonikovih radikala ili u aktivirani oblik pre nego što reaguje sa drugim vrstama. Aktivacija može biti izazvana jonima prelaznih metala ili drugim vrstama radikala. Pored toga, aktivaciju mogu izazvati enzimi, kao na primer lipoksigenaza. Iako je kiseonik stabilan molekul on igra kritičnu ulogu u tehnologiji slada i piva. U tehnologiji slada i piva smatra se da je lipoksigenaza najaktivnija tokom sladovanja. Osnovni put kojim se kiseonik troši u proizvodnji sladovine je tokom ukomljavanja i hmeljenja sladovine, oksidacijom polifenola katalizovanom peroksidazom i neenzimskom oksidacijom polifenola. Kiseonik, slobodni kiseonikovi radikali, oksidacija i sistemi zaštite su najviše razmatrani u svetlu očuvanja stabilnosti ukusa piva. Međutim, kiseonik i slobodni kiseonikovi radikali su važni i sa drugih aspekata u pivarstvu uključujući inaktivaciju enzima. Hidroksil radikal može da inaktivira β-glukanazu slada. Fitinska kiselina štiti od oksidacije „hvatanjem“ metalnih jona. Kiseonik je neophodan za disanje ječma tokom klijanja (Bamforth, 1993) i za aeraciju sladovine da bi se osigurao rast kvasca i dobra fermentacija. Ćelije kvasca ne sadrže dovoljno sterola i nezasićenih masnih kiselina na početku fermentacije. Steroli i nezasićene masne kiseline su esencijalne komponente ćelijskih membrana i moraju se sintetisati da bi ćelije kvasca rastle. Kiseonik je neophodan za biosintezu nezasićenih masnih kiselina i ergosterola. Zbog toga sladovina mora sadržati 8 mg/l kiseonika na početku fermentacije (Depraetere i sar., 2008).

Kiseonik u proizvodnji piva ima nekoliko mogućih efekata:

1. direktno učešće u reakciji lipoksigenaze,
2. kao izvor slobodnih kiseonikovih radikala za autoksidaciju nezasićenih masnih kiselina,
3. u oksidaciji sulfhidrilnih grupa u proteinima, dovodeći do unakrsnog vezivanja pri čemu se otežava ceđenje; ali takođe i u nastajanju vodonik peroksida koji je supstrat peroksidazama (od kojih postoji nekoliko veoma aktivnih u sladu) i
4. u reakciji (direktno ili preko nastajanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sa polifenolima, katalizovanoj peroksidazama u komini i neenzimskim putem u toku hmeljenja sladovine (Bamforth, 2006).

Poslednji od ovih efekata može biti od naročitog značaja jer su polifenoli glavni prirodni antioksidanti u sladu, hmelju i samom pivu. Ako se izgube oksidacijom u ovoj fazi (oni polimerizuju usled oksidacije i precipitiraju sa proteinima) proizvedeno pivo će imati nižu antioksidativnu aktivnost (Bamforth, 2006).

Procesi oksidacije se zbog asimilacije kiseonika tokom proizvodnje smatraju glavnim uzročnicima pogoršanja ukusa piva tzv. „starenja“ piva. Poznato je da je apsorpcija kiseonika u komini, tokom filtracije, hmeljenja sladovine u sladovini i pivu, dovodi do oksidacije, koja može pogoršati ukus piva. Nova tehnika obezbeđenja ćelija kvasca kiseonikom – „preoksigenacija“, omogućava izbegavanje aeracije sladovine, izlažući ćelije kvasca kiseoniku u kontrolisanim uslovima pre fermentacije (Depraetere i sar., 2008). Ova tehnika ne utiče na parametre fermentacije i fiziološke osobine kvasca koji mogu uticati na stabilnost ukusa piva (Guido i sar., 2004).

Molekul kiseonika u osnovnom stanju može se smatrati diradikalom, s obzirom da imaju dva nesparena elektrona, paralelnih spinova, lokalizovana u različitim  $\pi^*$  razvezujućim orbitalama. Postepenom redukcijom molekula kiseonika u osnovnom stanju nastaju i njegovi redukovani oblici. Nesparesni elektroni u molekulu kiseonika mogu promeniti smer svojih spinova. Tom prilikom prvo slabe, a potom se raskidaju O=O veze i grade različiti proizvodi, od kojih neki mogu biti i toksični (Čanadanović-Brunet, 1997).

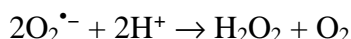
Reaktivnost slobodnih kiseonikovih radikala raste sa njihovim redukcionim statusom tj. superoksid anjon radikal <perhidroksil radikal <hidroksil radikal (Vanderhaegen i sar., 2006).

#### **Superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )**

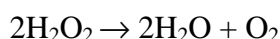
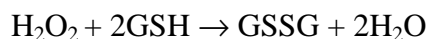
Superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), odnosno njegov protonovani oblik, perhidroksilni radikal ( $HO_2^{\cdot-}$ ), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida (Savatović, 2006). Superoksid anjon radikal nije jak oksidans, ali u vodenim rastvorima reaguje sa protonima pri čemu nastaje vodonik peroksid koji je supstrat za nastajanje hidroksil radikala i singletnog kiseonika (Lee i sar., 2004).

#### **Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ )**

Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) nije slobodni radikal, ali se ubraja u reaktivne vrste kiseonika (Wu i Cederbaum, 2003). Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom mutacijom, dejstvom superoksid dismutaze (Savatović, 2006):



Nastali vodonik peroksid je toksičan i mora se ukloniti iz ćelije. Dva enzima, glutation peroksidaza (GSH-Px) selen zavisna i katalaza (CAT) gvožđe zavisna su odgovorne za redukciju vodonik peroksida do vode (Surai, 2002):



Iako je vodonik peroksid slabo oksidaciono sredstvo, može da inaktivira enzime oksidacijom esencijalnih sulfhidrilnih grupa (Bamfroth, 1993). Vodonik peroksid ima mnogo značajniji efekat na sadržaj polifenola, tokom kopljenja, od molekularnog kiseonika usled veće sposobnosti da reaguje sa polifenolima naročito kada je reakcija katalizovana peroksidazama (Stephenson i sar., 2003). Vodonik peroksid može nastati



tokom komljenja oksidacijom sulfhidrilnih grupa proteina slada. Sulfhidrilne grupe stvaraju disulfidne veze (mostove) (pri čemu nastaju kompleksi koji otežavaju separaciju sladovine) i istovremeno nastaje vodonik peroksid (Bamforth, 2001).

### Singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ )

Singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ) nastaje enzimskim putem, u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza (Savatović, 2006). U poređenju sa ostalim reaktivnim kiseonikovim vrstama singletni kiseonik je slabiji oksidans (Lee i sar., 2004). Singletni kiseonik nije radikal i ne reaguje preko mehanizama radikala već uglavnom preko adicije na dvostruku vezu formirajući endoperokside koji se mogu redukovati do alkoksil radikala koji inicira radikalisku lančanu reakciju (Prior i sar., 2005).

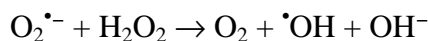
### Hidroksil radikal ( $\text{OH}^\bullet$ )

Hidroksil radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) je najreaktivniji slobodni kiseonikov radikal. Poluživot hidroskil radikala je izuzetno kratak ( $10^{-9}\text{s}$ ), jer odmah reaguje sa biomolekulima i praktično može „napasti“ svaki molekul prisutan u reakciji ograničenoj difuzijom: šećere, aminokiseline, fosfolipide, organske kiseline, purinske i pirimidinske baze koje se nalaze na udaljenosti od nekoliko nanometara od mesta njegovog nastanka (Đorđević i sar., 2000). Hidroksil radikali su jaki oksidansi i mogu privući atom vodonika iz bilo koje veze ugljenika i vodonika i oksidisati to jedinjenje (Lee i sar., 2004).

Hidroksil radikali mogu nastati kada postoje uslovi za Fenoton-ovu reakciju:



ili Haber-Vajsovu reakciju (Čanadanović-Brunet, 1997):



U reakciji sa biomolekulima (većina nisu radikali) pokreće lančane reakcije. Ima sposobnost da reaguje sa purinskim i pirimidinskim bazama DNK, uz stvaranje radikala koji mogu nadalje imati različite sudbine. Hidroksilacija se dešava u sve 4 baze, sa incidencom 7 modifikovanih na 1000 baza, uz značajni stimulatorni efekat gvožđa. Indirektni, ali i direktni dokazi pokazuju da je nastajanje hidroksil radikala udruženo sa oštećenjem lanca DNK. Katalaza, „čistači“ hidroksil radikala i helatori gvožđa inhibiraju i nastajanje hidroksil radikala i oštećenje DNK (Đorđević i sar., 2000). Potpuna inhibicija toksičnih efekata na DNK postiže se primenom katalaze, DMSO, manitola, Na-benzoata, fenatrolina i desferitocina koji se smatraju hvatačima („scavenger-ima“) hidroksil radikala. Hidroksil radikal može oduzeti vodonik mnogim biomolekulima. Oksidišući (na ovaj način) polinezasićene masne kiseline nastaju hidroperkosidi i na kraju aldehidi koji negativno utiču na ukus piva (Bamforth i sar., 1993).

U cilju održanja stabilnosti ukusa piva i drugih pokazatelja kvaliteta kao što su održanje enzimske aktivnosti i vijabilnosti kvasca od izuzetne je važnosti održanje kiseonika u molekulskom obliku ( $\text{O}_2$ ) (Bamforth i sar., 1993).

### 2.3. Antioksidanti

Antioksidanti su jedinjenja koja kada su prisutna u nižim koncentracijama, u odnosu na supstrate koje oksidišu, mogu da spreče ili značajno umanje njihovu oksidaciju (Halliwell i Gutteridge, 2007). Antioksidativna aktivnost je sposobnost nekog jedinjenja da inhibira oksidativnu degradaciju, na primer lipidnu peroksidaciju. Treba napraviti razliku između antioksidativne sposobnosti i reaktivnosti. Antioksidativna sposobnost daje informaciju oko trajanja antioksidativnog dejstva, a reaktivnost opisuje početnu dinamiku antioksidacije pri određenoj koncentraciji antioksidanta ili smeše antioksidanata (Roginsky i Lissi, 2005).

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da: deluju kao „hvatači“ („skevindžeri“) slobodnih radikala, daju elektrone, razgrađuju hidroperokside lipida koji su nastali u fazi propagacije, eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika, inhibiraju neke enzime, pokazuju sinergetske efekte i redukuju neka jedinjenja (Čanadanović-Brunet, 1997).

Pored karotenoida, vitamina C i E, najvažniji nutritivni antioksidanti su polifenolna jedinjenja koja štite tkiva organizma od oksidativnog stresa. Polifenoli su najviše zastupljeni antioksidanti u ljudskoj ishrani. Njihova hemijska struktura utiče na njihove biološke osobine: biodostupnost, antioksidativne aktivnosti, specifične interakcije sa ćelijskim receptorima i enzimima (Scalbert i Villiamson, 2000).

Antioksidanti ječma i slada mogu igrati značajnu ulogu u proizvodnji slada i piva zbog svojih antioksidativnih osobina. Antioksidanti mogu odložiti starenje piva i ograničiti nastajanje *trans*-2-nonenala putem inhibicije aktivnosti lipoksigenaze i neenzimske lipidne peroksidacije. Lipoksigenaza je glavni faktor inicijacije oksidacije masnih kiselina tokom proizvodnje sladovine, a lipidna oksidacija je odgovorna za neprijatan ukus piva na „karton“ koji nastaje tokom skladištenja piva (Goupy i sar., 1999; Sorvano i sar., 2006).

Antioksidati koji su poznati u proizvodnji slada i piva su (Chandra i sar., 2000; Chandra, 2002):

1. Fenolna jedinjenja – deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala i veoma su efikasni u inhibiciji neenzimske lipidne peroksidacije i dospevaju u sladovinu i pivo iz slada i hmelja. Verovatno je da su polifenoli iz ove dve sirovine različiti i njihove specifične osobine veoma zavise od stepena polimerizacije. Polifenoli malih molekulskih masa su naročito dobri antioksidanti. Sa porastom molekulske mase antioksidativna aktivnost i rastvorljivost polifenola se smanjuje. Dobro poznata osobina određenih polifenola je sklonost da stvaraju stabilne nerastvorne komplekse sa proteinima koji se talože tokom proizvodnje piva. Polifenoli veće molekulske mase imaju povišenu sklonost da stvaraju nerastvorne komplekse pri čemu njihova antioksidativna aktivnost u bilo kom trenutku proizvodnje piva zavisi od prisustva proteina.
2. Melanoidini i reduktioni – nastaju u sladu termičkom razgradnjom šećera i putem Maillard-ove reakcije koja se odigrava tokom zagrevanja redukujućih šećera sa amino kiselinama. Proizvodi Maillard-ove reakcije deluju kao „hvatači“ reaktivnih kiseonikovih vrsta kao što su peroksid, superoksid anjon i hidrosil radikali.

3. Tioli – poreklom iz ječma, međutim njihov sadržaj jako zavisi od sorte ječma. U oksidaciji se gube slobodni tioli nastajanjem disulfidnih mostova u proteinima pri čemu dolazi do aglomeracije i smanjenja moći redukcije.
4. Ne-fermentabilni redukujući šećeri – poreklom iz ječma, ali nastaju i iz skroba tokom klijanja.
5. Karotenoidi i vitamini – prisutni su u izuzetno niskim sadržajima u ječmu. Iako su efektivni antioksidanti, gube se tokom sušenja zbog visokih temperatura.

Od navedenih antioksidanta, fenolna jedinjenja i melanoidini su najznačajniji izvori prirodnih antioksidanata u pivu (Chandra, 2002). Smatra se da melanoidini suzbijaju oksidaciju *izo- $\alpha$* -kiselina i nezasićenih masnih kiselina. Međutim, melanoidini pospešuju oksidaciju viših alkohola (Bamforth, 2006). Proces proizvodnje piva je veoma složen pa su i hemijski i biohemijski procesi koji se odigravaju veoma različiti. Sastav i sadržaj antioksidanata se stalno menjaju tokom procesa proizvodnje. Male promene u strukturi ili samo u konfiguraciji mogu promeniti antioksidativnu aktivnost jedinjenja. Mešavina različitih tipova antioksidanta, koji deluju različitim mehanizmima mogu često pokazati sinergetski efekat, na primer razgradnja peroksida i inhibicija slobodnih radikala. Opšta aktivnost redukujućih jedinjenja tokom proizvodnje piva zavisi od njihove pojedinačne prirode i različitih količina oslobođenih iz sirovina (Chandra, 2002).

Pored polifenola veliki broj drugih jedinjenja u sladovini i pivu ima izraženu sposobnost heliranja metalnih jona, od kojih su najznačajniji amino kiseline, fitinska kiselina i melanoidini. Joni prelaznih metala koji se vezuju sa helatorima, ponekad imaju smanjenu sposobnost da pospešuju nastajanje slobodnih radikala, a nekad povećanu. U proizvodnji piva potrebno je svesti na minimum mogućnost jona gvožđa i bakra da dospeju u proizvod u bilo kom trenutku procesa proizvodnje piva (Bamforth, 2006).

Prema mestu nastajanja, antioksidanti se dele na endogene i egzogene. Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ćelijama biljaka, životinja i ljudi, dok se egzogeni unose putem hrane ili lekova, jer se u organizmu ne mogu sintetisati. Neki endogeni antioksidanti za svoju funkciju zahtevaju dnevno unošenje minerala (koenzima): Se (koenzim glutation peroksidaze) i Cu, Zn i Mn (koenzimi superoksid dismutaze). Endogeni antioksidanti su: enzimski sistemi (superoksid dismutaza - SOD, katalaza - CAT, glutation peroksidaza - GSH), mokraćna kiselina, bilirubin, tioli (na primer glutation, lipolna kiselina, N-acetil cistein), NADPH, NADH, koenzim Q10 (ubihinon), proteini koji kompleksiraju jone metala (albumin-bakar, ceruloplazmin-bakar, feritin-gvožđe, mioglobin-gvožđe, transferin-gvožđe) itd. U egzogene antioksidante ubrajaju se: vitamin C, vitamin E, karotenoidi ( $\beta$ -karoten), oksikarotenoidi (likopen), polifenoli (flavonoidi, fenolne kiseline, proantocijanidini itd.) i drugi. U Tabeli 2.2. date su reaktivne vrste kiseonika (ROS) i antioksidanti koji ih neutrališu (Percival, 1998).

U ječmu i sladu se nalazi veliki broj enzima čija je funkcija suzbijanje nakupljanja slobodnih kiseonikovih radikala. Takođe, važno je prisustvo neenzimskih molekula koji su „hvatači“ slobodnih radikala kao i eliminacija metalnih jona koji izazivaju nastajanje slobodnih kiseonikovih radikala (Bamforth i sar., 1993).

Najpoznatiji sintetički antioksidanti su: askorbil-palmitat – AP, *terc*-butil-4-hidroksianizol – BHA, *terc*-butil-4-hidroksitoluen – BHT, propil-galat - PG, butil-galat – BG, oktil-galat – OG, dodecil-galat – DG, *terc*-butil-hidrohinon – TBHG i limunska kiselina (Čanadanović-Brunet, 1997).

**Tabela 2.2. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i antioksidanti koji ih neutrališu (Percival, 1998)**

Reaktivne vrste kiseonika (ROS)	Antioksidanti koji neutrališu ROS
Hidroksil radikal	Vitamin C, glutation, flavonoidi
Superoksid anjon radikal	Vitamin C, glutation, flavonodi, SOD
Vodonik peroksid	Vitamin C, glutation, β-karoten, vitamin E, koenzim Q10, flavonoidi

### 2.3.1. Endogeni antioksidanti

Antioksidativni enzimi kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaze/reduktaze prevode reaktivne vrste kiseonika u nereaktivne molekule kiseonika (Lee i sar., 2004). Antioksidativne osobine enzima su date u Tabeli 2.3.

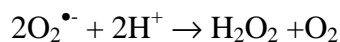
**Tabela 2.3. Antioksidativni enzimi (Lee i sar., 2004)**

Enzim	Funkcija
Superoksid dismutaza	Uklanjanje superoksid anjon radikala
Katalaza	Uklanjanje vodonik peroksida
Glutation peroksidaza	Uklanjanje vodonik peroksida
Glutation disulfid reduktaza	Oksidacija redukovanog glutationa
Peroksidaze	Razgradnja vodonik peroksida i hidroperoksida lipida

Pivski kvasac sadrži važne antioksidativne enzime kao što su superoksid dismutaza, katalaza ili glutation reduktazu. Međutim, pivski kvasac je takođe bogat neenzimskim antoksidantima kao što su redukovani glutation, ubihinon, hidrohionon, amino kiseline sa sulfidrilnom grupom i jone metala (Stephen i Jamieson, 1996; Bastin i saradnici, 2001). Otpornost ćelija pivskog kvasca na oksidativni stres zavisi od soja kvasca, stadijuma rasta, fiziološkog stanja i starosti ćelija (Martin i sar., 1999, Martin i sar., 2003).

#### Superoksid dismutaze (SOD)

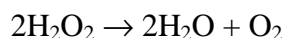
Superoksid dismutaze (SOD) predstavljaju grupu od četiri enzima: bakar-cink SOD (CuZnSOD, EC 1.15.1.1.), mangan SOD (MnSOD), gvožđe SOD (FeSOD) i ekstracelularna SOD (EcSOD). Superoksid dismutaze prevode superoksid anjon radikale u vodonik peroksid i kiseonik (Lee i sar., 2004):



U ječmu se nalaze najmanje tri izoenzima od kojih su dva oblika dominantna: bakar SOD i cink SOD. Aktivnost ovog enzima tipično se povišava oko šest puta tokom klijanja i ne inhibira se tokom početka sušenja. Inaktivira se tokom sušenja slada za proizvodnju piva gornjeg vrenja zbog visokih temperatura. Enzim se mnogo brže razgrađuje u procesu komljenja. Tokom komljenja zadržava aktivnost u intervalu od 45-55°C. Gubi aktivnost tokom komljenja u roku od 30 minuta na 65°C (Bamforth i sar., 1993).

**Katalaza (CAT)**

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6.) učestvuje u ćelijskoj detoksikaciji i prevodi vodonik peroksid do vode i kiseonika (Lee i sar., 2004):



Katalaza je određena u ječmu (Narziss i Sekin, 1974). Aktivnost katalaze raste tokom klijanja i ne smanjuje se tokom nižih temperatura sušenja slada. Katalaza se inaktivira kod visokih temperatura sušenja tamnog slada. Enzim se momentalno inaktivira tokom kumljenja na 65°C, pa se zbog toga ne može eliminisati peroksid nastao aktivnošću superoksid dismutaze tokom početka kumljenja na ovoj temperaturi (Bamforth i sar., 1991).

**Peroksidaze**

Peroksidaze su enzimi koji razlažu vodonik peroksid, kao i hidroperokside slobodnih masnih kiselina i hidroperokside fosfolipida (Savatović, 2006). U sladu i tokom ukumljavanja polifenolna jedinjenja su značajni supstrati na koje deluju peroksidaze. Dodatak vodonik peroksida u sladovinu dovodi do smanjenja antocijanidina i potpomaže taloženje polifenola sa proteinima (Clarkson i sar., 1989). Peroksidaze slada su veoma stabilne. Peroksidaze su prisutne u ječmu i njihova aktivnost se povećava dva puta tokom klijanja. Tokom kumljenja na 65°C u roku od 1 sata 52% aktivnosti peroksidaze je očuvano, a 45% od originalne aktivnosti očuva se kasnijim porastom temperature na 76°C. U toku kumljenja peroksidaza igra glavnu ulogu u potrošnji kiseonika (Bamforth i sar., 1993).

**Polifenoloksidaze**

Sadržaj polifenoloksidaza u ječmu je visok. Polifenoloksidaze utiču na direktnu reakciju polifenola sa kiseonikom bez učešća radikala. Međutim, aktivnost ovih enzima se smanjuje tokom sladovanja i oni se razgrađuju u procesu kumljenja i nemaju značaja u daljoj proizvodnji piva (Bamforth i sar., 1991).

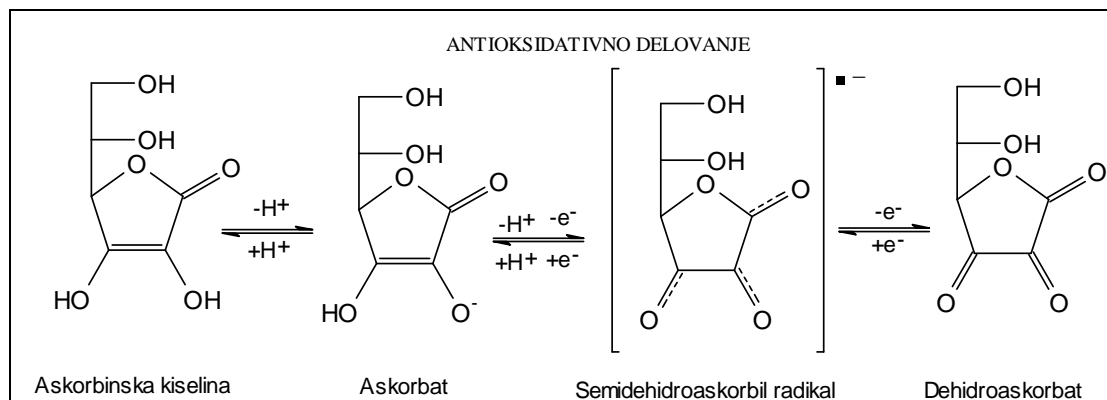
**Enzimi kvasca**

Smatra se da su među najjačim antioksidantima u fermentaciji piva ćelije kvasca. Pored toga što ćelije kvasca stvaraju SO<sub>2</sub>, redukuju i karbonilna jedinjenja (osim onih „adukata“ koji nastaju sa SO<sub>2</sub>) do njihovih ekvivalentnih alkohola. Nekoliko enzima kvasca učestvuje u redukciji karbonilnih jedinjenja, uključujući alkohol dehidrogenazu koja učestvuje u proizvodnji etanola (Bamforth, 2006).

**2.3.2. Egzogeni antioksidanti****Askorbinska kiselina (Vitamin C)**

Askorbinska kiselina je najpoznatiji u vodi rastvorljiv antioksidant (Percival, 1998). Oksidacijom askorbinske kiseline nastaje semidehidroaskorbil radikal, koji gubeći još jedan elektron, daje dehidroaskorbat (Slika 2.1). Antioksidativna svojstva askorbinske kiseline proizilaze iz sposobnosti da on deluje kao donor H-atoma i elektrona, pa je veoma dobar „hvatač“ mnogih slobodnih radikala i neradikalnih vrsta (Lee i sar., 2004).

Askorbat je prirodna komponenta ječma i slada. Enzim dehidroaskorbat reduktaza može da prevede askorbat u redukovani oblik posredstvom redukovanog glutaciona (GSH) koji se kasnije može oksidisati u ditiolni oblik (GSSG) prema jednačini:



**Slika 2.1. Antioksidativno delovanje askorbinske kiseline (Savatović, 2006)**

### Glutation

Redukovani glutation je „hvatač“ hidroksil radikala i može ponovo aktivirati enzime koji su bili izloženi visokim sadržajima kiseonika. Međutim, redukovani glutation može reagovati sa vodonik peroksidom pri čemu nastaju hidroksilni joni (Bamforth i sar., 1993).

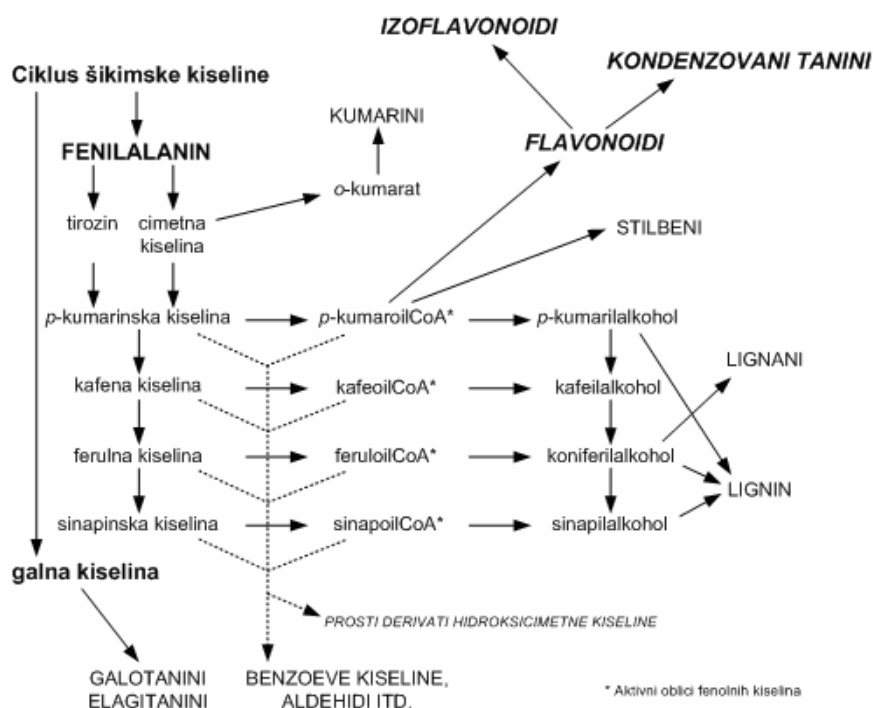
### Vitamin E

Vitamin E je najvažniji liposolubilni antioksidant, koji se sintetiše u biljkama pri procesu fotosinteze. Jedan je od najznačajnijih „hvatača“ slobodnih radikala.  $\alpha$ -Tokoferol je najaktivniji oblik liposolubilnog vitamina E (Frank, 2004). Antioksidativno delovanje  $\alpha$ -tokoferola ostvaruje se inhibiranjem oksidacije lipida eliminacijom peroksil radikala ( $\text{LOO}^\bullet$ ) iz lančane reakcije (Savatović, 2006). Vitamin E je rastvorljiv u mastima i ne primenjuje se u pivarstvu, ali se nalazi u ječmu i sladu gde može delovati antioksidativno tokom klijanja ječma (Bamforth i sar., 1993).

## 2.4. Polifenolna jedinjenja

Polifenolima pripadaju različita jedinjenja, ali su uglavnom to jedinjenja fenolne, odnosno polifenolne strukture. U prirodi se polifenolna jedinjenja nalaze slobodna ili u obliku glikozida, a mogu da stvaraju i komplekse sa nekim drugim molekulima. Ova jedinjenja su najčešće prisutna u biljkama, ali ih ima i u životinjama i mikroorganizmima. Polifenolna jedinjenja, odnosno aromatični prstenovi u prirodi mogu da nastanu na više načina (Četković, 2008). Fenoli su jedinjenja koja za aromatično jezgro imaju vezanu bar jednu hidroksilnu grupu (Mattila i sar., 2006). Najvažniji put sinteze polifenolnih jedinjenja, koji se odvija u višim biljkama, je ciklus šikimske kiseline (Robards, 2003). Kondenzacijom eritroza-4-fosfata i fosfoenolpirogroždane kiseline, preko niza međuproizvoda, nastaje šikimska kiselina, ključni intermedijer po kome je ova sinteza i dobila naziv. Iz šikimske kiseline dobijaju se aromatične amino kiseline, L-fenilalanin i

L-tirozin. Daljim transformacijama L-fenilalanina i L-tirozina dobijaju se različite klase polifenolnih jedinjenja (Slika 2.2) (Ćetković, 2008):



Slika 2.2. Biosinteza polifenolnih jedinjenja (Ćetković, 2008)

Šikimska kiselina se preko fenilalanina, prevodi u cimetnu kiselinu, odnosno *p*-hidroksicimetnu kiselinu, koja je ključni intermedijer u biosintezi fenilpropanskih struktura, fenilpropena, kumarina, lignana i lignina. S druge strane, u reakciji *p*-hidroksicimetne kiseline sa tri malonatne jedinice nastaju flavonoidi, odnosno izoflavonoidi (najbrojnije klase biljnih polifenola), ksantoni, stilbeni i proantocijanidini, odnosno kondenzovani tanini (Čanadanović-Brunet, 1997).

U literaturi se navode različite podele fenolnih jedinjenja. U Tabeli 2.4 je prikazna podela fenolnih jedinjenja prema broju konstitutivnih ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola.

Poslednjih godina su mnoga polifenolna jedinjenja privukla pažnju naučnika koji se bave medicinom i hemijom hrane zbog svojih antioksidativnih, antiinflamatornih, antimutagenih, antikancerogenih, antibakterijskih, antiviralnih, antiproliferativnih, vazodilatatornih osobina, kao i njihove sposobnosti da menjaju funkciju nekih ključnih ćelijskih enzima (Ho i Huang, 1992; Baxter i Walker, 2001; Walker i sar., 2001; Mattila i sar., 2006). Smatra se da polifenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost na sledeće načine: predajom H-atoma, direktnim vezivanjem („hvatanjem“) slobodnih kiseonikovih i azotovih radikala, heliranjem prooksidativnih metalnih jona (Fe, Cu) i inhibicijom prooksidativnih enzima (lipoksigenaza, mijeloperoksidaza, ksantin-oksidaza, NAD(P)H oksidaza, enzimi citohroma P-450) (Rice-Evans i sar., 1996; Robbins, 2003; Amorati i sar., 2006). Polifenoli manje molekulske mase su odlični antioksidanti. S porastom molekulske mase antioksidativna aktivnost se smanjuje (Vanderhaegen i sar., 2006).

Tabela 2.4. Podela fenolnih jedinjenja (Robards i sar., 1999)

Osnovni skelet	Klasa	Primer
C <sub>6</sub>	Jednostavni fenoli	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
	Benzohinoni	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	<i>Fenolne kiseline</i>	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	<i>Cimetne kiseline</i>	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, mirsticin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftohinoni	Juglon
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbeni	Rezveratol
	Antrahinoni	Emodin
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi	
	Flavoni	Sinensetin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidroksikvercetin i dihidroksikempferol glikoizdi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi pelargonidina, peonidina, delifinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin
	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignini	Pinorezinol
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi	Agatisflavon

Polifenoli mogu biti antioksidanti u proizvodnji piva zbog svoje sposobnosti da:

1. „hvataju“ slobodne kiseonikove radikale, superoksid i hidroksil, kao i peroksil radikale koji nastaju autokatalitičkom oksidacijom nezasićenih masnih kiselina,
2. inhibiraju lipoksigenaze i
3. heliraju metalne jone, kao što su gvožđe i bakar (Bamforth, 2006).

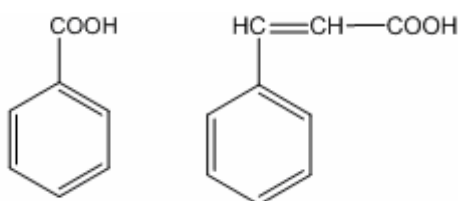
Polifenolna jedinjenja u pivu deluju pozitivno, negativno ili nemaju uticaja na stabilnost i senzorne osobine piva (Goupy i sar., 1999a). Većina polifenolnih jedinjenja prisutnih u pivu potiče iz slada (ječma) (70-80%), a ostatak iz hmelja (20-30%) (Vanderhaegen i sar., 2006; Zhao i sar., 2006). Polifenolna jedinjenja prisutna u pivu obuhvataju fenolne kiseline (hidroksi derivate benzoeve i cimetne kiseline), kumarine, katehine, di-, tri- i oligomerne proantocijanidine, halkone i flavonoide, kao i  $\alpha$ - i *izo*- $\alpha$ -kiseline poreklom iz hmelja (Gerhäuser, 2005). Razna polifenolna jedinjenja utiču na



aromu, boju (Goupy i sar., 1999), stabilnost pene, fizičku i hemijsku stabilnost (Montanari, 1999), trajnost (Jandera i sar., 2005) i antioksidativnu aktivnost piva (Dvořáková i sar., 2008). Polifenoli su u pivu prisutni kao monomeri i polimeri. Monomeri su fenolne kiseline, flavonoli i njihovi glikozidi: katehini, antocijanidini i kumarini (Floridi i saradnici, 2003).

### 2.4.1. Fenolne kiseline

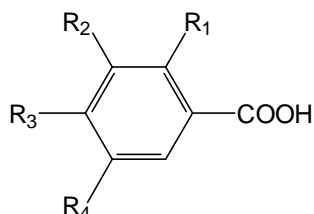
Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih jedinjenja koja se nalaze u hrani biljnog porekla (Mattila i sar., 2006). Fenolne kiseline su hidroksilovani derivati benzoeve i cimetine kiseline (Slika 2.3). Najzastupljeniji hidroksi derivati benzoeve kiseline su: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina, koje su prisutne uglavnom u obliku glukozida u hrani (Herrmann, 1989).



Slika 2.3. Benzoeva i cimena kiselina (Četković, 2008)

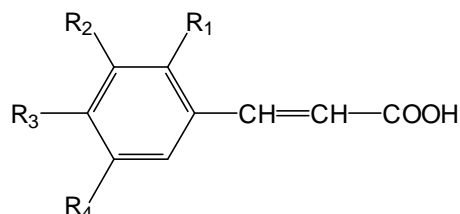
Na Slici 2.4 prikazane su strukturne formule najvažnijih fenolnih kiselina.

#### Hidroksi derivati benzoeve kiseline

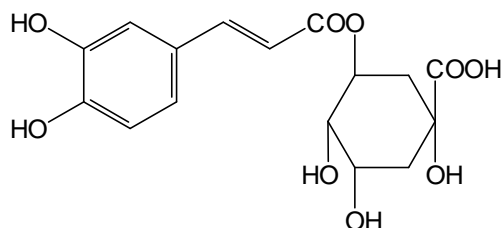


$R_1=R_2=R_4=H$ ,  $R_3=OH$   
*p*-Hidroksibenzoeva kiselina  
 $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=R_3=OH$   
Protokatehinska kiselina  
 $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OH$   
Vanilinska kiselina  
 $R_1=H$ ,  $R_2=R_3=R_4=OH$   
Galna kiselina  
 $R_1=R_4=OH$ ,  $R_2=R_3=H$   
Gentisinska kiselina  
 $R_1=R_2=OCH_3$   
Siringinska kiselina

#### Hidroksi derivati cimetine kiseline

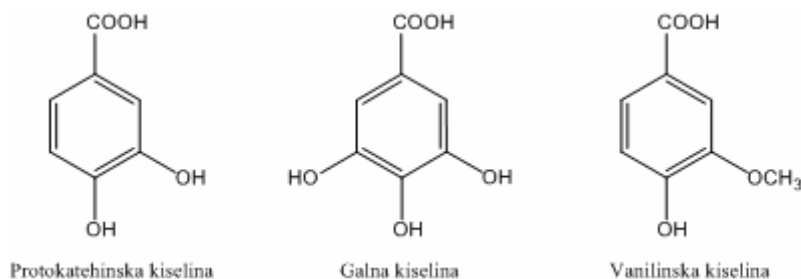


$R_1=R_2=R_4=H$ ,  $R_3=OH$   
*p*-Kumarinska kiselina  
 $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=R_3=OH$   
Kafena kiselina  
 $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ,  $R_3=OH$   
Ferulna kiselina  
Estar cimetine kiseline – hlorogenska kiselina (5-kafeoilkvinska kiselina)

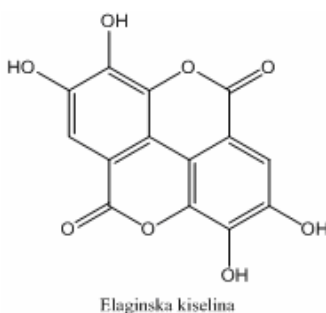


Slika 2.4. Strukturne formule najvažnijih fenolnih kiselina (Briggs i sar., 2004)

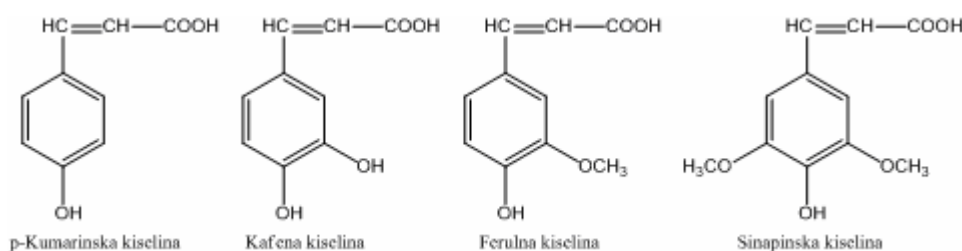
Protokatehinska kiselina je prisutna u biljkama različitih familija, a galna kiselina je komponenta mnogih taninskih materija (galotanini). Pored slobodnih hidroksilnih grupa za aromatično jezgo mogu biti vezane i metoksi grupe npr. kao kod vanilinske kiseline (Ćetković, 2008):



Molekuli galne kiseline mogu da grade novu C-C vezu, pri čemu nastaje heksahidroksidifenska kiselina, koja eliminacijom daje elaginsku kiselinu (Ćetković, 2008):



Najzastupljeniji hidroksi derivati cimetne kiseline su: *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina koje su često prisutne u hrani kao estri sa kvinskom kiselinom ili glukozom (Herrmann, 1989). Najpoznatiji estar kafene i kvinske kiseline je hlorogenska kiselina (Lafay i Gli-Izquierdo, 2008).



Fenolne kiseline su poznati antioksidanti ne samo zbog svoje sposobnosti da predaju vodonik ili elektron već i zato što njihovi stabilni intermedijeri radikala sprečavaju oksidaciju različitih komponenti žitarica, naročito masnih kiselina i ulja (Maillard i sar., 1996).

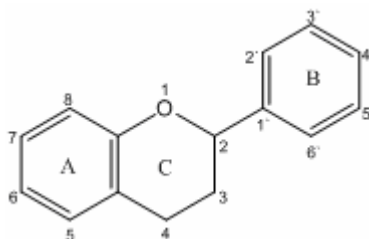
Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina je povezana sa strukturom tj. supstituentima i njihovim položajem na aromatičnom prstenu i strukturom bočnog niza (Natella i sar., 1999). Smatra se da prisustvo CH=CH-COOH grupe kod hidroksi derivata cimetne kiseline razlog za znatno višu antioksidativnu aktivnost nego COOH grupe kod hidroksi derivata benzojeve kiseline (Kim i sar., 2006). Takođe, veći broj hidroksilnih i

metoksilnih grupa i naročito prisustvo *o*-dihidroksi grupe na fenolnom prstenu povećava antioksidativnu aktivnost (kao na primer kod kafene kiseline) (Natella i sar., 1999). Zhou i saradnici (2006) su ispitivali antiradikalske aktivnosti pojedinačnih fenolnih kiselina i pokazali da prisustvo dodatne metoksilne grupe u orto položaju na fenolnom prstenu značajno utiče na povećanje antiradikalske aktivnosti prema superoksid anjon i DPPH radikalima, ali ne i hidrosil radikalima.

Fenolne kiseline imaju različite funkcije u biljkama uključujući asimilaciju hranljivih materija, sintezu proteina, aktivnost enzima i fotosintezu (Wu i sar., 1999; Wu i sar., 2000). Hidroksi derivati benzoeve i cimetine kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice) tj. nalaze se u svim delovima biljaka (u semenu, korenu, lišću, stabljici itd.) (Robbins, 2003). Samo manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina povezana estarskom, etarskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) (Andreasen i sar., 2000), ili sa polifenolima (flavonoidi), manjim organskim molekulima (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni) (Winter i Herrmann, 1986). Fenolne kiseline nisu jednako raspodeljene u biljnom tkivu. Pored toga, tokom različitih stadijuma rasta prisutne su različite fenolne kiseline. Uslovi rasta, kao što je temperatura, takođe utiču na sadržaj fenolnih kiselina (Robbins, 2003).

#### 2.4.2. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću grupu polifenolnih jedinjenja. Do danas je izolovano preko 4000 jedinjenja iz ove grupe (Lugasi i Hóvári, 2003). Ugljenikov skelet flavonoida ( $C_6-C_3-C_6$ ) sastoji se iz dva benzenova prstena (A i B) međusobno povezana tročlanim ugljeničnim nizom koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten C (Ćetković, 2008):



Posebno je značajna antioksidativna aktivnost flavonoida. Ova polifenolna jedinjenja inhibiraju oksidaciju lipida, koja se u biološkim sistemima dovodi u vezu sa starenjem ćelije i pojavom hroničnih oboljenja. Takođe, inhibiraju neke enzimske sisteme, utiču na nastajanje i transformaciju peroksil radikala i dr. (Ćetković, 2008). Flavonoidi su poznati „hvatači“ superoksid anjon i hidrosil radikala (Halliwell, 2008). Mogu da reaguju sa peroksil radikalom na isti način kao vitamin E i pri tome okončavaju autooksidaciju nezasićenih masnih kiselina (Bamforth i sar., 1993).

Flavonoidi imaju različite uloge u biljkama: odbrana od insekata, kao katalizatori u fotosintezi, kao regulatori metabolizma gvožđa u fosforilaciji i u zaštiti od stresa kao „hvatači“ kiseonikovih slobodnih radikala koji nastaju u fotosintezi. Zaštitni efekat flavonoida je dokazan *in vitro* i *ex vivo* (Madhujith i Shahidi, 2006).

Struktura polifenola je važna za njihovo antioksidativno delovanje. Polifenoli sa hidroksilnim grupama na C-3' i C-4' položaju na flavonskom prstenu (kao katehin) su antioksidanti (Irwin sar., 1991). Antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na C-3 atomu, a

većina njih su penta- ili heksa-supstituisani, pri čemu se supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) nalaze na C-5, C-7, C-3', C-4' i C-5' (Četković, 2008). Delifinidin ima supstituisanu hidroksilnu grupu na C-5' položaju i doprinosi starenju piva redukujući jone prelaznih metala do niže valentnih stanja (Irwin i sar., 1991).

Flavonoidi inhibiraju enzime odgovorne za nastajanje superoksid anjon radikala kao što su ksantin-oksidaza i protein kinaza C. Takođe, flavonoidi inhibiraju cikloksigenazu, lipoksigenazu, mikrozomalnu monoksigenazu i glutation S-transferazu, mitohondrijalnu sukcin oksidazu, NADH oksidazu, a ti enzimi učestvuju u nastajanju reaktivnih vrsta kiseonika. Mnogi flavonoidi heliraju jone metala koji igraju važnu ulogu u oksidativnom metabolizmu. Flavonoidi imaju niži redoks potencijal, pa su sposobni da redukuju jako oksidativne slobodne radikale, kao što su superoksid anjon, peroksil, alkoksil i hidroksil radikal, donacijom vodonikovog atoma (Pietta, 2000).

## 2.5. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u ječmu

U ječmu se nalazi 0,1-0,3% suve materije polifenolnih jedinjenja (Schuster i sar., 1999). Antioksidativna aktivnost ječma zavisi od sorte, ali je približno ista za ozime i jare sorte ječma (Chandra i sar., 2000). Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ječmu, pored sorte, zavisi od agrotehničkih mera, klimatskih uslova i sadržaja proteina (Schuster i sar., 1990). Ječam sadrži brojna polifenolna jedinjenja: fenolne kiseline (hidroksi derivate benzoeve i cimetne kiseline tj. hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline), flavonoide (flavone, flavonole, antocijanidine, proantocijanidine), tanine, halkone, hinone i amino fenolna jedinjenja, koja sva poseduje antiradikalske i antioksidativne osobine (Hernanz i sar., 2001; Bonoli i sar., 2004a; Papetti i sar., 2006; Kim i sar., 2007). Prema tome optimizacija prirodnih antioksidanata u sladovanom ječmu i ispitivanje sorti ječma koje se primenjuju u sladarstvu sa najvišim antiradikalnim osobinama je važno za proizvodnju piva sa visokom antioksidativnom aktivnošću (Chandra, 2002; Zhao, 2008). Polifenolna jedinjenja prisutna u ječmu i sladu mogu biti u slobodnom ili vezanom obliku. Većina slobodnih polifenolnih jedinjenja su flavonoli, dok fenolne kiseline čine većinu polifenolnih jedinjenja u vezanom obliku (Andreasen i sar., 2001).

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene u biljkama i druge po važnosti, iza flavonoida, kao sekundarni metaboliti biljaka. Razlikuju se od ostalih polifenolnih jedinjenja po svom kiselom karakteru. (Yu i sar., 2001). Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina u biljkama je neophodna jer su one supstrati u biosintezi aromatičnih aminokiselina (Waksmundzka, 1998). Žitarice sadrže širok opseg fenolnih kiselina. U biljakama fenolne kiseline mogu biti esterifikovane drugim manjim molekulima kao što su alifatični alkoholi, fenoli, fenolne kiseline, alkoholi i alkaloidi. Ova jedinjenja su u vodi rastvorni pentozani, koji su polisaharidi ksiloze i imaju nasumično vezane hidroksilne grupe esterifikovane fenolnim kiselinama. Ovi estri mogu biti hidrolizovani kiselinom pri čemu se oslobađaju fenolne kiseline. Fenolne kiseline se mogu pomoću svoje karboksilne i hidroksilne grupe vezati sa skrobom i drugim polisaharidima vodoničnim vezama, heliranjem, ili kovalentnim vezama, formirajući mostove ili unakrsne veze („cross-links“). Prema tome hidroliza kiselinom i  $\alpha$ -amilazom može osloboditi fenolne kiseline vezane sa skrobom (Yu i sar., 2001). Spoljašnji omotači zrna žitarica (plevica, oplodnjača, semenjača i aleuronski sloj) sadrže najviše polifenolnih jedinjenja, dok je njihov sadržaj znatno niži u endospermu (Kähkönen i sar., 1999; Madhujith i Shahidi, 2006). Fenolne kiseline se u žitaricama nalaze najvećim delom u oplodnjači, aleuronskom sloju i klici (Verardo i sar., 2008). Glikozidni estri fenolnih

kiselina su određeni u plevici i u ćelijama semenjače i aleuronskog sloja. Nerastvorno-vezane fenolne kiseline se nalaze u tragovima u endospermu.

Slobodni oblici *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, protokatehinske, *o*-, *m*- i *p*-kumarinske, siringinske, ferulne, i sinapinske su određeni u ječmu (Shahidi i Nazck, 2004). Yu i saradnici (2001) su nedavno identifikovali hlorogensku i protokatehinsku kiselinu u ječmu. Ferulna kiselina je dominantna slobodna fenolna kiselina u ječmenom zrnu (Shahidi i Nazck, 2004). Sadržaj slobodne hlorogenske i protokatehinske kiseline u trideset sorti ječma varira od 3,21 do 16,28 µg/g suve materije i od tragova do 2,88 µg/g suve materije (Yu i sar., 2001).

Andersson i saradnici (2008) su utvrdili da se manje od 3% fenolnih kiselina u ječmenom zrnu nalazi u slobodnom obliku u odnosu na sadržaj ukupnih fenolnih kiselina, ispitujući deset sorti ječma. Rastvorljive fenolne kiseline esterifikovane šećerima ili drugim komponentama male molekulske mase (na primer masnim kiselinama ili proteinima) (Kähkönen i sar., 1999) čine oko 25%, a nerastvorljive vezane sa polimerima (naročito arabinoksilanima) oko 73% od sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u ječmu. Verardo i saradnici (2008) su identifikovali nekoliko estara hidroksi derivata cimetnih kiselina sa pentozama i heksozama u ječmu.

Brojne fenolne kiseline koje su prisutne u vezanom obliku su identifikovane u ječmu nakon alkalne hidrolize: ferulna, *p*-kumarinska, vanilinska, sinapinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Ferulna i *p*-kumarinska su dominantne fenolne kiseline u ječmu nakon alkalne hidrolize (Shahidi i Nazck, 2004). Adom i saradnici (2002) su utvrdili da se ferulna kiselina najvećim delom nalazi u vezanom stanju u kukuruzu (98,9%), pšenici (98,8%), ovsu (97,8%) i pirinču (93,0%). Zupfer i saradnici (1998) su u 6 sorti dvoredog i 12 sorti šestoredog ječma odredili da sadržaj ferulne kiseline, u kiselim hidrolizatima uz dodatak  $\alpha$ -amilaze, varira od 365–605 µg/g suve materije. Takođe su utvrdili da sorte dvoredog ječma imaju niži sadržaj ferulne kiseline u odnosu na sorte šestoredog ječma.

Yu i saradnici (2001) su odredili prisustvo protokatehinske, vanilinske, hlorogenske i ferulne kiseline u kiselim hidrolizatima ječma. Kafena, *p*-hidroksibenzojeva, *p*-kumarinska su određene u kiselim hidrolizatima ječma uz dodatak  $\alpha$ -amilaze, a takođe i u hidrolizatima dobijenim tretmanom ječma sa kiselinom,  $\alpha$ -amilazom i celulazom.

Fenolne kiseline se uglavnom nalaze u spoljašnjem omotaču zrna koji sadrži 77,7–82,3 i 79,2–86,8% od ukupnih količina ferulne i *p*-kumarinske kiseline u zrnu ječma (Hernanz i sar., 2001) (Tabela 2.5).

Holtekjølén i saradnici (2006) su svojim istraživanjima utvrdili da sadržaj fenolnih kiselina varira između sorti sa i bez plevice. Ispitali su devet sorti ječma sa plevicom i sedam sorti bez plevice. Sadržaj fenolnih kiselina je značajno viši u sortama sa plevicom. Ferulna kiselina je bila dominantna fenolna kiselina i njen sadržaj je varirao od 403 do 723 µg/g suve materije, a udeo u ukupnim fenolnim kiselinama je bio 52–69%. U sortama ječma sa plevicom sadržaj ferulne kiseline je bio značajno viši nego u sortama bez plevice. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline je varirao od 15 do 374 µg/g suve materije i bio je znatno viši u sortama ječma sa plevicom u poređenju sa sortama bez plevice. Dvořákova i saradnici (2008) su takođe utvrdili viši sadržaj *p*-kumarinske kiseline u sortama sa plevicom.

**Tabela 2.5. Distribucija u procentima ferulne, *p*-kumarinske kiseline u frakcijama<sup>a</sup> ječmenog zrna razdvojenim mehanički (Hernanz i sar., 2001)**

Sorta	Frakcija zrna	% Frakcije <sup>b</sup>	<i>p</i> -Kumarinska kiselina <sup>c</sup>	Ferulna kiselina <sup>c</sup>
Boira	F1	47,5	78,0	77,7
	F2	27,0	20,5	20,4
	F3	25,5	1,49	1,89
Iranis	F1	54,4	81,4	78,7
	F2	27,2	16,9	20,1
	F3	18,4	1,74	0,01
Volga	F1	47,6	86,3	82,3
	F2	29,7	12,9	16,4
	F3	22,7	0,87	1,35

<sup>a</sup> F1 sa sastoji uglavnom od plevice i spoljašnjih omotača zrna, F2 je srednja frakcija, a F3 je endosperm

<sup>b</sup> % Frakcije = (g frakcije/g ječma) × 100

<sup>c</sup> % = (g u frakciji /g u tri frakcije) × 100

Nordkvist i saradnici (1984) su utvrdili prisustvo vanilinske, *p*-kumarinske, ferulne i diferulne kiseline u plevici, aleuronskom sloju i endospermu ječma. Najviši sadržaj ukupnih nerastvornih vezanih fenolnih kiselina (0,6-0,9%) je nađen u plevici i aleuronskom sloju ječma. Endosperm sadrži samo tragove nerastvornih vezanih fenolnih kiselina (<0,1%). Ferulna kiselina čini 0,14% suve materije ječmenog zrna. Ferulna kiselina je dominantna nerastvorna vezana fenolna kiselina i oko 75% je vezano u spoljašnjim omotačima (plevici i aleuronskom sloju) i oko 10% se nalazi u endospermu zrna ječma. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline je najniži u centru zrna i naglo raste prema spoljašnjim omotačima. *p*-Kumarinska kiselina je dominantna u plevici ječmenog zrna. Zidovi ćelija aleuronskog sloja su bogati arabinoksilanima i poznato je da je ferulna kiselina povezana za ovaj konstituent ćelijskog zida. Takođe je poznato da *p*-kumarinska kiselina stvara veze sa ligninima (Maillard i Barset, 1995; Shahidi i Nazck, 2004).

Hernanz i saradnici (2001) su odredili sadržaj ferulne, kafene i *p*-kumarinske kiseline u jedanaest sorti ječma u alkalnim hidrolizatima. Sadržaj ferulne kiseline varirao je od 359 do 624 µg/g suve materije, kafene od 6,9 do 16,1 µg/g suve materije, a *p*-kumarinske od 79 do 260 µg/g suve materije.

Hidroksi derivati cimetne kiseline su u ćelijskim zidovima biljaka uglavnom povezani sa polisaharidima. U zrnima žitarica su pretežno esterifikovani arabinoksilanima. Arabinoksilani su važni strukturni ugljeni hidrati plevice, oplodnjače, endosperma i aleuronskog sloja zrna žitarica (Vanbeneden i sar., 2008b) i čine 4-10% ječmenog zrna (Debyser i sar., 1997). U ječmu ćelijski zid aleuronskog sloja sadrži 71% arabinoksilana dok ćelijski zid skrobnog endosperma sadrži 20% arabinoksilna (Nordkvist i sar., 1984). Arabinoksilani se sastoje od β-(1→4) povezanih monomera ksiloze u kojima ksiloza može biti zamenjena arabinozom na C-2 i/ili C-3. Feruloil i *p*-kumaroil grupe mogu biti esterifikovane na arabinofuranozilnim ostacima na O-5. Arabinoksilani su polimeri visoke molekulske mase i uglavnom su rastvorni u vodi (Vanbeneden i sar., 2008b). Ferulna kiselina povećava hidrofobnost molekula arabinoksilana i prema tome smanjuje rastvorljivost (Humberstone i Briggs, 2000).

Prirodni antioksidanti žitarica mogu delovati kao „hvatači“ slobodnih radikala, redukciona sredstva i potencijalni helatori metalnih jona (Madhujith i Shahidi, 2006).

Hidroksi derivati benzoeve i cimetine kiseline su poznati antioksidanti koji deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala (Goupy i sar., 1999).

Fenolne kiseline su poznati antioksidanti, ne samo zbog sposobnosti donacije vodonika ili elektrona već i zbog elektronske stabilizacije njihovih nastalih radikala koji sprečavaju oksidaciju različitih sastavnih delova hrane, naročito lipida i ulja (Maillard i Baret, 1995; Rao i Muralikrishna, 2002).

Antioksidativna jedinjenja prisutna u ekstraktima ječma su složena i njihova aktivnost i mehanizam delovanja veoma zavise od sastava i uslova određivanja. Zbog toga je za određivanje antioksidativne aktivnosti ječma potrebno uraditi više od jednog tipa antioksidativnog merenja (Wong i sar., 2006). Tako se na primer određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale veoma često koristi (Yu i sar., 2002; Zhou i Yu, 2004; Zhao i sar., 2008). Hidroksil radikali mogu dovesti do nastajanja hidroperoksida što uzrokuje autooksidaciju nezasićenih masnih kiselina. Hidroperoksidi se razlažu do aldehida koji negativno deluju na ukus piva (Bamforth i sar., 1993). Prema tome, potrebno je odabrati antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale kao procenu antioksidativne aktivnosti ekstrakata ječma.

Polifenoli ječma su veoma važni zbog toga što su supstrati peroksidazama i zbog njihove direktne uloge kao „hvatača“ slobodnih radikala. Ukoliko polifenoli dospeju u gotovo pivo mogu ga štititi od oksidacije tj. „starenja“. Međutim, polifenoli mogu polimerizovati sa proteinima i formirati mutnoću piva (Hudson, 1981).

Maillard i Baret (1995) su istakle da naročito fenolne kiseline iz plevice ječma mogu imati značajnu ulogu kao prirodni antioksidanti u proizvodnji piva. Po najnovijim istraživanjima ovo je od naročitog značaja jer se većina slobodnih radikala nalazu u plevici ječma dok je najniži sadržaj slobodnih radikala u endospermu zrna ječma. Sadržaji slobodnih radikala u ječmu veoma zavise od uslova skladištenja (vlage, temperature i dosušivanja) (Methner i sar., 2008).

## **2.6. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u toku procesa sladovanja i u sladu**

Proizvodnja slada iz ječma se sastoji iz sledećih faza: močenje, klijanje i sušenje. Konverzija ječma u slad je složen proces u kojem mnogi faktori utiču na nastajanje antioksidativne aktivnosti. Razvoj antioksidativnih jedinjenja veoma zavisi od uslova tokom sladovanja. Uopšteno, dobro razgrađen slad doprinosi višoj antioksidativnoj aktivnosti sladovine, uključujući i više sadržaje polifenola, u poređenju sa manje razgrađenim slalom (Chandra, 2002). U toku klijanja kiseonik prvi put u procesu sladovanja može da pokaže svoje toksične efekte. Tokom disanja klice mogu nastati slobodni kiseonikovi radikali, koji mogu inaktivirati enzime i uzrokovati lipidnu peroksidaciju. Ovo nije problem u ranim fazama proizvodnje piva, ali može prouzrokovati probleme u kasnijim fazama. Proces sušenja je sledeća faza u kojoj kiseonik može uzrokovati oštećenja naročito zbog primene visokih temperatura. Enzimi koji su „hvatači“ slobodnih kiseonikovih radikala prisutni u ječmu mogu se inaktivirati procesom sušenja kao i enzimi koji učestvuju u klijanju. Time se zaštita protiv slobodnih kiseonikovih radikala može značajno smanjiti (Clarkson, 1990).

U toku močenja i klijanja ječma dolazi do značajnih promena u sastavu ječmenog zrna, pa se može pretpostaviti da se menja i sadržaj fenolnih kiselina.

Iskljajali ječam sadrži do 45 mg/g suve materije lipida, pri čemu je najzastupljenija linoleinska kiselina (50-60%). Tokom sladovanja sadržaj lipida se značajno smanjuje što

ukazuje na brzu razgradnju. Slobodne masne kiseline nastale tokom lipolize mogu se oksidisati autooksidacijom i dejstvom lipoksigenaze pri čemu nastaju visoko reaktivni hidroperoksidi. Iz hidroperoksida delovanjem enzima mogu nastati karbonilna jedinjenja uključujući i *trans*-2-nonenal (Maillard i sar., 1996).

Ječam i slad pokazuju antioksidativnu aktivnost uglavnom zbog prisustva fenolnih jedinjenja, naročito flavonoida i hidroksi derivati cimetne kiseline (Hernanz i sar., 2001; Papetti i sar., 2006). Ovi endogeni antioksidanti u ječmu i sladu mogu aktivno doprineti kontroli oksidativnih reakcija i zaštiti protiv starenja piva delujući kao „hvatači“ slobodnih radikala, redukciona sredstva i helatori metalnih jona. Smatra se da slad ima višu antioksidativnu aktivnost od ječma iz kojeg je proizveden (Maillard i sar., 1996), što upućuje da proces sladovanja utiče na porast antioksidativne aktivnosti i razvoj polifenolnih jedinjenja. Prema tome, endogeni antioksidanti prisutni u ječmu, koji inhibiraju oksidaciju piva i poboljšavaju stabilnost ukusa piva mogu biti zaštićeni i unapređeni u dobro vođenoj tehnologiji sladovanja.

Polifenoli se nalaze u plevici ječma, aleuronskom sloju, odnosno u rezervnim proteinima. Polifenoli iz plevice ječma jednim delom se uklanjaju u toku močenja, ali su ove promene po apsolutnoj vrednosti male. Sadržaj polifenola koji se nalaze u endospermu ječma se povećava sa forsiranom razgradnjom drugih sastojaka, i nastavlja se u toku klijanja, tako da se utvrđuje analizom kongresne sladovine. Uslovi u toku klijanja znatno utiču na razgradnju ukupnih polifenola i antocijanidina. Stepennamočenosti znatno utiče na razgradnju polifenola i to, pre svega, kod više vlagenamočenog ječma. Sa povišenjem stepena namočenosti od 40 do 46% sadržaj tanina i antocijanidina se povećava (Schuster i sar., 1999).

Antioksidanti slada mogu biti svrstani kao (Chandra, 2002):

- a) prirodni poreklom iz ječma i
- b) nastali tokom sušenja tj. proizvodi Maillard-ove reakcije.

Tubaro i saradnici (2007) su ispitivali uticaj promene pH vrednosti (5,0; 7,0 i 8,0) prve vode za močenje na antioksidativnu aktivnost tokom sladovanja. Rezultati ispitivanja su pokazali da primena vode za močenje sa višim pH vrednostima (7 i 8) negativno utiče na antioksidativne aktivnosti tokom sladovanja. Najniže vrednosti za sve ispitivane sorte su određene na kraju klijanja ječma. Tokom sušenja zelenog slada antioksidativna aktivnost je povišena kod svih ispitivanih sorti ječma. Autori su pretpostavili da je do porasta antioksidativne aktivnosti došlo zbog nastajanja proizvoda Maillard-ove reakcije.

Kellner i saradnici (2005) su ispitivali uticaj uslova močenja na sadržaj polifenola u pivu. Primenjivali su dve metode sladovanja: 1. do stepena namočenosti od 45% i uz odvođenje CO<sub>2</sub> tokom močenja i 2. do stepena namočenosti od 42% i bez odvođenja CO<sub>2</sub>. Dobijeni rezultati su pokazali da se primenom prvog postupka dobijaju viši sadržaji polifenola i antioksidativna aktivnost u pivu.

Redukujući šećeri prisutni u ječmu se koriste za rast klice. Dodatni redukujući šećeri nastali iz skroba se takođe koriste za rast klice. Tiolna jedinjenja, međutim, nastaju u većim količinama tokom sladovanja, verovatno usled modifikacije proteina u endospermu. Značajnija promena je stalni porast sadržaja u vodi rastvornih polifenola i tanoida kao rezultat modifikacije endosperma i proteolize. Optimizacija razgradnje proteina tokom proizvodnje slada je poželjna pošto je porast sadržaja polifenola povezan sa njihovim oslobađanjem iz kompleksa sa proteinima. Neki od ovih u vodi rastvorljivih



fenolnih jedinjenja se gube ekstrakcijom iz zrna tokom močenja. Takođe, enzimska aktivnost se povećava tokom klijanja i pri tome dolazi do smanjenja redoks potencijala preko enzimskih reakcija oksidacije u kojima učestvuju polifenoli specifične molekulske mase. Kao posledica, ukupni sadržaj polifenola u ovoj fazi zavisi od ravnoteže između ovih efekata. Kao rezultat, dolazi do porasta sadržaja polifenola tokom klijanja (Chandra, 2002).

U toku sušenja se odvija nekoliko reakcija. Smanjuje se sadržaj antocijanidina, verovatno usled delovanja oksidaza, koje tokom sušenja još uvek mogu imati znatne aktivnosti. Prilikom zagrevanja na temperature dosušivanja se sadržaj antocijanidina povišava. Oksidacijom polifenola mogu nastati veoma reaktivni difenili, koji dalje reaguju sa aminokiselinama i zatim polimerizacijom daju melanoidine (Schuster i sar., 1999).

Drugi važan doprinos antioksidativnoj aktivnosti slada tokom početnih faza proizvodnje slada je nastajanje prekursora melanoidina i reduktona tj. šećera i aminokiselina. Ova jedinjenja su važna za kasnije nastajanje antioksidanta delovanjem visokih temperatura tokom sušenja jer temperature tokom klijanja nisu dovoljno visoke za nastajanje proizvoda Maillard-ove reakcije (Chandra, 2002).

Tokom prvih 16-18 sati sušenja svetlog slada primenjuju se niske temperature (40-65°C) što omogućava enzimsku razgradnju endosperma zrna. U toku poslednjih 5-8 sati sušenja primenjuju se visoke temperature (80-95°C), denaturišu se enzimi kao što su proteaze i glukanaze i u ovoj fazi dolazi do nastajanja boje i formiranja ukusa (Woffenden i sar., 2002; Inns i sar., 2003).

Sušenje je najvažnija faza proizvodnje slada u pogledu nastajanja antioksidanata (Chandra, 2002). Takođe, sušenje slada ima najveći uticaj i na nastajanje slobodnih radikala u sladu (Methner i sar., 2008). Proizvodi Maillard-ove reakcije nastaju tokom sušenja iz aminokiselina i šećera delovanjem visokih temperatura. Veliki deo oksidativnih enzima prisutnih u zrnu na primer lipoksigenaza, se inaktivira na visokim temperaturama. Ovo je naročito važno za sledeću fazu tj. proizvodnju sladovine, u kojoj je prisutan kiseonik. U proizvodnji svetlog slada je to od naročitog značaja jer ne samo da su prisutne značajne količine preostale lipoksigenaze već antioksidativni potencijal nije u potpunosti dostignut. Poznato je da sladovina i pivo proizvedeni od svetlog slada imaju nižu antioksidativnu aktivnost od onih proizvedenih od tamnog slada (Chandra, 2002).

Nastajanje proizvoda Maillard-ove reakcije zavisi od: stepena razgrađenosti zelenog slada, profila temperatura koji se primenjuju kada se dostigne 5% vlage i finalne temperature sušenja (minimalno 100°C) (Liégeois i sar., 2002).

Maillard i Barse (1995) su utvrdile da ukoliko se za dosušivanje primeni temperatura viša od 80°C dolazi do sniženja sadržaja ukupnih fenolnih kiselina kao i ferulne i *p*-kumarinske kiseline kao što je prikazano u Tabeli 2.6. Udeli ispitivanih fenolnih kiselina se nisu značajno menjali tokom sušenja, ali je njihov sadržaj povećan za oko 130% do 80°C i opao za oko 20% do 90°C. Sniženje sadržaja hidroksi derivata cimetne kiseline na višim temperaturama sušenja se može objasniti na tri načina. Prvi je da se vezana fenolna jedinjenja mogu osloboditi tokom sušenja. Veze između *p*-kumarinske kiseline i lignina i ferulne kiseline i arabinoksilana mogu se razgraditi delovanjem visoke temperature. Drugi način je započinjanje razgradnje lignina, vodeći do oslobađanja derivata fenolnih kiselina. Lignini su polimeri cinamil alkohola, koji nastaju iz hidroksi derivata cimetne kiseline modifikovanih promenom supstituenta na aromatičnom nukleusu ili promenom stepena oksidacije bočnog lanca. Treći način je da započinje termička razgradnja.

**Tabela 2.6. Sadržaj nerastvornih vezanih fenolnih kiselina u zelenom sladu i u toku sušenja (Maillard i Baret, 1995)<sup>a</sup>**

Sušenje	Ukupne fenolne kiseline ( $\mu\text{g/g sm}$ )	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ( $\mu\text{g/g sm}$ )	Ferulna kiselina ( $\mu\text{g/g sm}$ )
Zeleni slad	303,44 $\pm$ 1,29	78,50 $\pm$ 0,16	177,79 $\pm$ 0,71
50°C	428,92 $\pm$ 9,76	99,48 $\pm$ 4,58	234,42 $\pm$ 2,81
64°C	639,37 $\pm$ 10,05	166,77 $\pm$ 1,50	360,24 $\pm$ 5,40
80°C	704,03 $\pm$ 4,09	176,05 $\pm$ 0,70	411,78 $\pm$ 1,65
85°C	625,47 $\pm$ 26,70	161,51 $\pm$ 2,58	350,31 $\pm$ 18,21
90°C	565,80 $\pm$ 5,60	152,79 $\pm$ 2,14	318,65 $\pm$ 2,23

<sup>a</sup> Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija na osnovu četiri merenja

Povišenjem temperature dosušivanja, pored povećanja sadržaja ukupnih polifenola i antocijanidina koji se mogu ekstrahovati (npr. sa alkoholom) povećavaju se i sadržaji ovih supstanci u kongresnoj sladovini (Tabela 2.7) (Schuster i sar., 1999).

**Tabela 2.7. Sadržaj taninskih sastojaka i antocijanidina koji se mogu ekstrahovati iz slada (Schuster i sar., 1999)**

Temperatura dosušivanja, °C	Tanini (mg/100g SM slada)	Antocijanidini (mg/100g SM slada)
50	377	146
60	357	138
70	366	151
85	386	159
90	418	162
100	520	169

Razlika vrednosti na 50°C i 60°C je ovo potvrdila, slično kao i to da sa povišenjem temperature dosušivanja sadržaji tanina i antocijanidini rastu. Ovo povećanje sadržaja polifenola se može pratiti i u sladovinama dobijenim od „jako“ dosušenog slada (Tabela 2.8) (Schuster i sar., 1999).

**Tabela 2.8. Sadržaj ukupnih polifenola i antocijanidina u sladovini u zavisnosti od temperaturi dosušivanja slada (mg 12%-ne sladovine) (Schuster i sar., 1999)**

Temperatura dosušivanja, °C	Tanini	Antocijanidini
70	183	59
85	211	78
100	236	95

Sadržaj antioksidativnih jedinjenja koji nastaju tokom sladovanja ima direktnu korelaciju sa intenzitetom boje slada. Porast antioksidativne aktivnosti je u vezi sa višim temperaturama usled kojih nastaju obojena jedinjenja kao što su melanoidini i polifenoli. Poznato je da primena tamnog slada poboljšava stabilnost gotovog piva kao i da tamnija piva imaju višu antioksidativnu aktivnost tokom skladištenja. Procesni parametri sušenja

mogu uticati na kvalitet dobijenog slada. Međutim, temperatura i sadržaj vlage imaju najveći efekat na antioksidativnu aktivnost slada (Chandra, 2002).

U sladu se nalaze:

- ❖ jedinjenja koja mogu postati prekursori nepoželjnih ukusa piva,
- ❖ supstrati za reakcije starenja piva,
- ❖ enzimi koji pospešuju pogoršanje ukusa piva (lipoksigenaze),
- ❖ enzimi sposobni da „hvataju“ kiseonik i slobodne kiseonikove radikale (peroksidaze i superoksid dismutaza),
- ❖ druga jedinjenja koja mogu da reaguju sa kiseonikom (na primer sulfihidrilna grupa u proteinima) i
- ❖ razni antioksidanti uključujući polifenole, fenolne kiseline i melanoidine (Bamforth, 2006).

Pretpostavljajući da je aktivnost lipoksigenaze nepoželjna, jasno je da će slad sušen po relativno intenzivnim režimima sušenja sadržati manje lipoksigenaze. Postupci koji usporavaju rast klice tokom sladovanja mogu doprineti stabilnosti ukusa piva kao na primer primena visokog hidrostatičkog pritiska. Intenzivnije sušen slad (naročito prženi slad) ima povišenu antioksidativnu aktivnost (Bamforth, 2006).

Slad sadrži prooksidativna i antioksidativna jedinjenja. Prooksidativna jedinjenja su oksidaze i oksidisani lipidi (Chanrda i sar., 2000). Slad sadrži veliki broj jedinjenja iz ječma (endogena polifenolna jedinjenja) ili iz procesa proizvodnje slada (proizvodi Maillard-ove reakcije) koji mogu igrati značajnu ulogu u proizvodnji slada i piva pomoću svojih antioksidativnih osobina. Ova jedinjenja mogu odložiti starenje piva i ograničiti nastajanje *trans*-2-nonenala inhibicijom aktivnosti lipoksigenaze i neenzimske peroksidacije lipida. Lipoksigenaza je glavni faktor inicijacije oksidacije masnih kiselina tokom proizvodnje sladovine, a lipidna oksidacija je uzročnik nepoželjnog ukusa piva na „karton“ („cardboard off-flavour“) koji se stvara tokom starenja piva. Flavon-3-oli se smatraju primarnim antioksidantima koji reaguju sa lipidnim radikalima prevodeći ih u mnogo stabilnije proizvode (Goupy i sar., 1999). Flavon-3-oli mogu biti u obliku monomera, (+)-katehin (C) i (-)-epikatehin i u obliku polimera koji se sastoje uglavnom od jedinica (+)-katehina i (+)-galokatehina (GC). Najzastupljeniji dimeri su prodelfinidin B3 (GC-C) i procijanidin B3 (C-C) (McMurrough, 1996). Najvažniji trimer je procijanidin C2.

Sorta ječma može imati uticaja na antiradikalnu aktivnost slada na DPPH radikale. Klimatski uslovi i sastav zemljišta imaju značajan uticaj na antiradikalnu aktivnost slada na DPPH i hidroksil radikale. Dužina skladištenja slada negativno utiče na antiradikalnu aktivnost slada (Mikyška i sar., 2005).

U sladovinama dobijenim od slada bez primene giberelinske kiseline, sadržaj polifenolnih jedinjenja iznosi 60-110 mg/l, zavisno od sorte ječma i tehnološkog postupka proizvodnje slada (stepen namočenosti ječma, temperatura klijanja). U sladu koji je dobijen uz primenu giberelinske kiseline je ukupni sadržaj polifenola za 20-40% viši. Sadržaji antocijanidina se menjaju slično, pri čemu dodatak giberelinske kiseline i postupak sladovanja izazivaju nešto jače promene, nego kod ukupnih polifenola. Tako je na primer sadržaj antocijanidina u kongresnoj sladovni dobijenoj iz slada dobijenog bez dodatka giberelinske kiseline 13-34 mg/l, dok je u sladovini od slada proizvedenog uz

Dodatak giberelinske kiseline 30-50 mg/l (Schuster i sar., 1999). Fry (1979) su pokazali da se primenom giberelinske kiseline, pored klijanja stimuliše i sinteza ferulne kiseline.

Antioksidanti određeni u sladu su takođe prisutni i u pivu. Slad je glavni izvor antioksidanata prisutnih u pivu (Chandra i sar., 2000).

## 2.7. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u hmelju

U pivarstvu se koriste ženski neoplođeni cvetovi hmelja. U njima se nalaze gorke smole i etarska ulja kojima se u pivo unose gorki i aromatični sastojci. Za primenu hmelja se koristi sledeća definicija: hmelj predstavlja osušene šišarice ženskih cvetova biljke, kao i proizvode koji su od njih dobijeni, koji potiču isključivo iz hmelja (Kunze, 1998).

U pivarstvu se koriste gorke i aromatične sorte hmelja (Strogl i sar., 1997). Hmeljne prerađevine koje se koriste u proizvodnji piva se mogu razvrstati u dve grupe: hmeljni prah i ekstrakti hmelja. Prilikom proizvodnje hmeljnog praha se šišarice fino melju i nalaze se na tržištu u obliku peleta. U prometu se nalaze pelete (Kunze, 1998; Sidor, 2006):

- ❖ tip 90 - od 100 kg nativnog hmelja dobija se 90 kg praha u kome su sačuvani svi značajni sastojci polaznog hmelja,
- ❖ tip 45 - to su pelete sa povećanim sadržajem lupulina,
- ❖ stabilizovane pelete - proizvodnja je zaštićena patentom, u procesu proizvodnje koristi se magnezijum-oksida kvaliteta za prehrambenu industriju koji se dodaje tokom mlevenja hmelja. Dodatak magnezijum-oksida daje povećanu stabilnost tokom skladištenja i doprinosi boljem iskorišćenju (približno 60% više nego pelete tip 90) i
- ❖ izomerizovane pelete - proizvodnja je zaštićena patentom, vrši se konverzija  $\alpha$ -kiselina u *izo*- $\alpha$ -kiseline. Iskorišćenje standardnih peleta uglavnom nije preko 45% i može biti čak i samo 20% kada se pelete dodaju kasno u toku kuvanja sladovine. Međutim, primenom izomerizovanih peleta iskorišćenje je minimum 60%.

Za ekstrakciju se pretežno primenjuju tečni CO<sub>2</sub> ili etanol (Kunze, 1998).

Koloidna stabilnost piva je jedna od najinteresantnijih i najkomplikovanijih tema u proizvodnji piva danas. Razlog ove aktuelnosti je ujedinjavanje tržišta piva kao i povećana očekivanja potrošača za bistrim pivom.

Jedinjenja koja učestvuju u formiranju mutnoće piva su polifenoli, proteini, polisaharidi, minerali i joni metala (Pöschl i Geiger, 2005). Koloidnu nestabilnost izazivaju polimerizovani proteini i polifenoli usled prisustva kiseonika (Wackerbauer i Anger, 1984; Siebert, 1999). Jedna od mogućnosti za unapređenje stabilnosti je izbor sirovine, na primer primena slada sa niskim sadržajem prolina i/ili antocijanidina. Iako najveći deo polifenola piva potiče uglavnom iz slada (75%), primena različitih proizvoda hmelja može takođe uticati na nastajanje mutnoće, u najboljem slučaju bez negativnog uticaja na penivost i ukus piva (Pöschl i Geiger, 2005).

U industriji piva se koristi oko 12 sorti hmelja koje se razlikuju po sadržaju i sastavu sekundarnih metabolita. Optimalni sadržaj vlage hmelja je 8-12%. Sušenje hmelja se odvija na 50-60°C u trajanju od 6 do 10 sati (Krofta i sar., 2008).

Hmelj doprinosi gorčini, penivosti, ukusu, antimikrobnoj aktivnosti i stabilnosti ukusa piva (Ting i sar., 2008). Polifenolna jedinjenja se pretežno nalaze u listićima

šišarica i u lupulinu, dok ih u centralnom vretenu i stabljici ima malo (Schuster i sar., 1988). Smatra se da aromatične sorte sadrže više polifenola u poređenju sa gorkim sortama (Strogl i sar., 1997). Polifenoli hmelja su monomeri, dimeri, trimeri, ali i složeniji oblici povezani sa azotnim komponentama (Keukeleire, 2000). Polifenoli hmelja su, za razliku od polifenola slada, kondenzovani u većem stepenu i reaktivniji su (Kunze, 1998). Sastav i sadržaj polifenola hmelja jako varira u zavisnosti od sorte, vremena sakupljanja, prerade i uslova skladištenja. Na primer, u hmelju sušenom pri temperaturama višim od 60°C ili 80°C, drastično se smanjuje sadržaj flavonola i proantocijanidina. Polifenoli veće molekulske mase doprinose boji piva i nastajanju mutnoće. S druge strane polifenoli mogu izazvati neprijatnu trpkost piva (EBC, 1997; Chandra, 2002). U hmelju se nalazi najmanje 100 komponenti koje mogu biti grupisane kako je dato u Tabeli 2.9.

**Tabela 2.9. Grupe polifenola hmelja (EBC, 1997)**

Grupa	Sadržaj (mg/kg)
Hidroksi derivati benzoeve kiseline	<100
Hidroksi derivati cimetine kiseline	100-300
Proantocijanidini	600-1500
Flavonoli	300-1100
Glikozidi kvercetina	500-2000
Glikozidi kempferola	500-1700
Flavonoli	<100-200

Polifenole hmelja čine monomerni fenoli, monomerni polifenoli i polimerni polifenoli. Prvi obuhvataju na primer galnu kiselinu, protokatehinsku kiselinu ili hlorogensku kiselinu, koje se nalaze u slobodnom ili vezanom obliku kao glikozidi i koje se kao takve mogu hidrolizovati. Među tanine koji mogu da kondenzuju ubrajaju se flavanoli (kvercetin i kempferol) i njihovi glikozidi, katehin i epikatehin, kao i flavani (leukocijanidin), koji se označavaju i kao antocijanidini ili proantocijanidini. Ova jedinjenja mogu se kondenzovati ili polimerizovati do dimera, trimera i dalje. Jednostavni flavanoli se na niskim temperaturama vodoničnim mostovima vezuju sa proteinima u stabilna jedinjenja. Pri tome se uspostavlja određena ravnoteža između slobodnih flavanola i flavanola vezanih za proteine. Dimeri i trimeri imaju sposobnost taloženja sa proteinima i obuhvataju se opštom analizom određivanja sadržaja tanoida. Prema molekulskim masama, koje se kreću između 600 i 3000, radi se o dimerima do grupa sa do 10 molekula flavanola (Schuster i sar., 1988).

Polifenolima hmelja se pripisuju osobine taloženja proteina, pri čemu u ovom pogledu deluju efikasnije od polifenola slada. Polifenoli takođe utiču na ukus piva, dajući mu punoću, pojačavaju gorčinu piva, koja kod polifenola sa malim molekulskim masama, može biti pozitivna. Međutim, oksidisane makromolekulske grupe izazivaju pojavu grubog, netipičnog ukusa piva; one mogu negativno uticati i na boju sladovine i piva. Pošto polifenoli mogu da vezuju kiseonik i na taj način štite ostale sastojke piva od oksidacije, pripisuju im se i antioksidativne osobine. Oksidisani polifenoli mogu katalizovati oksidaciju masnih kiselina i alkohola u aldehide; na ovaj način oni i direktno i indirektno podstiču pojavu priukusa od starenja piva. Taloženje proteina tj. reakcije između tanina i proteina mogu se objasniti na osnovu antioksidativnih osobina polifenola, jer se ove reakcije ne završavaju sa završetkom kuvanja sladovine. Izdvajanje taloga teče

i dalje, i na njega povoljno utiču sledeće promene: hlađenje, oksidacija, snižavanje pH i formiranje novih površina suspendovanih sastojaka. Na ovaj način, neprekidno se odvijaju reakcije između proteina i tanina, usled kojih dolazi do pojave taloga; čak i u filtriranom pivu, pre ili kasnije dolazi do zamućenja (Schuster i sar., 1988).

U grupu tanina koji mogu da se kondenzuju ubrajaju se monomeri polifenola, kao na primer flavoni, katehini i antocijanidini, koji se javljaju u slobodnom obliku i kao glikozidi. Šećer se pri tome vezuje za C-3 atom centralnog i  $\gamma$ -pironskog prstena. Nasuprot polifenolima ječma i slada, udeo antocijanidina u polifenolima hmelja je znatno viši. Više su zastupljeni i tanoidi, koji predstavljaju „aktivne“ polifenole molekulskih masa 600-3000 Da (Schuster i sar., 1988). Aromatične sorte hmelja imaju viši sadržaj polifenola od gorkih sorti, naročito tanoida i prema tome imaju višu antioksidativnu aktivnost (Chandra, 2002). Forster i sardanici (2001) su utvrdili da antioksidativnu aktivnost pokazuju i polifenoli i gorke materije hmelja.

Tokom čuvanja hmelja, sadržaj polifenola, ali više sadržaj antocijanidina u njemu, se snižava (Tabela 2.10). Ovo je naročito izraženo prilikom čuvanja na povišenim temperaturama. Pri tome, upotreba atmosfere inertnog gasa može uticati veoma povoljno, što se i koristi za čuvanje hmeljnog praha i ekstrakta hmelja (Schuster i sar., 1988). Tokom skladištenja, polifenoli hmelja takođe podležu oksidativnoj razgradnji, pa su prema tome tip proizvoda hmelja i uslovi skladištenja veoma važni za antioksidativnu aktivnost (Chandra, 2002).

**Tabela 2.10. Uticaj čuvanja hmelja na sadržaj polifenola (Schuster i sar., 1988)**

Sorta hmelja i uslovi čuvanja	Polifenoli (% suve materije)		Antocijanidini (% suve materije)	
	početak	kraj	početak	kraj
Čuvanje 15 meseci na 0°C				
❖ Hall. Hersbrucker	6,8	6,4	5,2	4,4
❖ Hall. Mittelfrüher	7,0	6,5	5,6	4,6
❖ Hall. Mittelfrüher	6,2	6,0	5,1	4,2
❖ Tettnanger	7,6	7,2	6,1	5,2
Čuvanje 15 meseci na 37°C				
❖ Tettnanger	7,2	3,0	5,8	1,3

Do oksidacije polifenola hmelja može doći i pod uticajem enzima. U hmelju postoji sistem oksidaza, koje se pod uticajem kiseonika mogu aktivirati. Takođe, može doći do pojave autooksidacije, na primer ukoliko se proizvode ekstrakti taninskih sastojaka prilikom ekstrakcije hmelja. U ovom slučaju sadržaj tanoida se znatno snižava (Schuster i sar., 1988).

Povećanjem oksidacije samo do određenog stepena dolazi do poboljšanja taloženja proteina sa polifenolima na primer sa tanoidima. Polifenoli sa višom molekulskom masom teže stupaju u reakciju, manje talože proteine i u većem stepenu zaostaju u pivu, izazivajući neprijatnu gorčinu, pojačanje boje i smanjenje stabilnosti sladovine i piva. Usled toga piva, koja su hmeljena starim hmeljom, imaju tamniju, najčešće crvenkastu boju (Schuster i sar., 1988).

Dodatak hmelja ne utiče negativno na penivost i boju piva. Velike količine hmelja i dugo kuvanje sladovine sa hmeljom mogu negativno uticati na koloidnu stabilnost piva (Forster i sar., 1995).

Goiris i saradnici (2005) su upoređivali sastav i antioksidativnu aktivnost između peletiranog hmelja i ekstrakata otpadnog hmelja dobijenog nakon ekstrakcije sa CO<sub>2</sub>. U Tabeli 2.11 dati su antioksidativna aktivnost i sadržaj polifenola u ekstraktima polifenola hmelja, poreklom iz različitih proizvoda hmelja. Na osnovu rezultata jasno je da antioksidativna aktivnost zavisi uglavnom od sorte hmelja. Antioksidativna aktivnost je u vezi sa sadržajem polifenola. Aromatične sorte, bogate polifenolima daju ekstrakte sa visokom antioksidativnom aktivnošću. Vrste polifenola zavise od sorte (Tabela 2.12). Gorke sorte, kao Magnum bogate su prenilovanim flavonidima (kao što je ksantohumol), ali sadrže relativno niske sadržaje drugih polifenola hmelja. Aromatične sorte kao Saatz i Hersbrucker Spät sadrže više flavonoida i glikozida flavonola (na primer rutin), ali niže sadržaje prenilovanih jedinjenja. Uklanjanje hmeljnih smola i ulja superkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> nije uticalo na gubitak određenih polifenola i antioksidativnu aktivnost. Šta više, antioksidativna aktivnost otpadnog hmelja je bila viša od antioksidativne aktivnosti odgovarajućih peleta. Prema tome, otpadni hmelj koji se dobija kao sporedni proizvod proizvodnje neizomerizovanog CO<sub>2</sub> ekstrakta hmelja je dobar izvor za izdvajanje polifenola hmelja.

**Tabela 2.11. Antioksidativna aktivnost i sadržaj polifenola u ekstraktima polifenola hmelja, poreklom iz različitih proizvoda hmelja (Goiris i sar., 2005)**

Proizvod hmelja	mg polifenola po g proizvoda hmelja	DPPH ( $\Delta A_{10 \text{ min}}/\text{mg}$ ekstrahovanog proizvoda hmelja)
Pelete sorte Saaz T90 rod 2002	41,0	1,404
Pelete sorte Hersbrucker Spät T90 rod 2002	32,9	1,133
Pelete sorte Hersbrucker Spät T45 rod 2002	30,0	1,199
Pelete sorte Magnum T90 rod 2002	15,0	0,502
Komercijalni otpadni hmelj sorte Magnum rod 2003	18,8	0,563
CO <sub>2</sub> ekstrakt iz otpadnog hmelja sorte Magnum T90 rod 2002	19,4	0,697
CO <sub>2</sub> ekstrakt iz otpadnog hmelja sorte Hersbrucker Spät T90 rod 2002	37,0	1,276
Vegetativni ostaci od pripreme peleta T45 sorte Hallertau rod 2002	41,2	1,299

**Tabela 2.12. Sadržaj marker jedinjenja u ekstraktima hmelja pripremljenim iz različitih proizvoda hmelja (Goiris i sar., 2005)**

Proizvod hmelja	Ksantohumol (mg/100g)	Rutin (mg/100g)	<i>p</i> -Kumarinska kiselina (mg/100g)	Ferulna kiselina (mg/100g)	(+)-Katehin (mg/100g)	Procijanidin B3 (mg <sub>ekv</sub> /100g)*	Prodelfinidin B3 (mg <sub>ekv</sub> /100g)*
Pelete sorte Saaz T90 rod 2002	264	117	2	10	341	192	3
Pelete sorte Hersbrucker Spät T90 rod 2002	164	113	2	12	302	150	4
Pelete sorte Hersbrucker Spät T45 rod 2002	336	102	2	8	236	133	4
Pelete sorte Magnum T90 rod 2002	427	50	2	4	106	61	3
Komercijalni otpadni hmelj sorte Magnum rod 2003	533	66	4	6	106	47	8
CO <sub>2</sub> ekstrakt iz otpadnog hmelja sorte Magnum T90 rod 2002	592	65	2	6	123	74	5
CO <sub>2</sub> ekstrakt iz otpadnog hmelja sorte Hersbrucker Spät T90 rod 2002	190	133	3	14	311	172	9
Vegetativni ostaci od pripreme peleta T45 sorte Hallertau rod 2002	58	118	2	9	415	232	4

\* Procijanidin B3 i prodelfinidin B3 su izraženi ekvivalenti katehina (mg<sub>ekv</sub>/100g)

Pöschl i Geiger (2005) su ispitivali uticaj različitih proizvoda hmelja na sadržaj polifenola sladovine sa naročitim osvrtom na sadržaje flavon-3-ola i ferulne kiseline. Za hmeljenje su korišćeni proizvodi aromatične sorte hmelja Hallertauer perle: peletirani hmelj (sa 6%  $\alpha$ -kiselina), etanolni ekstrakt hmelja (sa 43,1%  $\alpha$ -kiselina) i ekstrakt dobijen superkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> (sa 46,3%  $\alpha$ -kiselina). Najniži sadržaj flavon-3-ola u pivu je dobijen primenom ekstrakta hmelja dobijenog superkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub>. Sadržaj ferulne kiseline se nije bitno menjao tokom kuvanja sladovine sa navedenim proizvodima hmelja.

Dostálek i Karabín (2007) su određivali sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost u sladovini, ohmeljenoj sladovini, mladom pivu, pivu i pivu nakon skladištenja. Hmeljenje je izvođeno sa dva ekstrakta hmelja dobijena superkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> (EKST1 i EKST2) i dva vrste peletiranog hmelja (PEL1 i PEL2). Ekstrakti hmelja su sadržali niže sadržaje polifenola. Tokom kuvanja sladovine sa hmeljom antioksidativna aktivnost je povećana kod svih primenjenih vrsta hmelja (Tabele 2.13 i 2.14). Tokom glavne fermentacije antioksidativna aktivnost je opala, ali do približno istih vrednosti kao u sladovinama osim kod uzorka ohmeljenog sa PEL2 gde je antioksidativna aktivnost i nakon fermentacije ostala visoka. Razlike u antioksidativnim osobinama su rasle tokom naknadne fermentacije. Dok su mlada piva hmeljena peletiranim hmeljom zadržala antioksidativne osobine do gotovog piva, piva proizvedena od sladovine hmeljene sa ekstraktima nižeg sadržaja polifenola su izgubila značajan deo antioksidativne aktivnosti tokom ovih procesa. Antioksidativna aktivnost piva se smanjila tokom skladištenja i to približno isto kod svih vrsta piva.



**Tabela 2.13. Antiradikalska aktivnost na ABTS radikale tokom proizvodnje piva na poluindustrijskom nivou (Dostálek i Karabín, 2007)**

	Peletirani hmelj 1	Peletirani hmelj 2	Ekstrakt hmelja 1	Ekstrakt hmelja 2
Sladovina	42,90	43,19	41,85	40,88
Ohmeljena sladovina	54,09	60,11	49,78	45,91
Mlado pivo	40,89	51,08	41,61	40,75
Pivo	41,40	48,84	34,54	34,42
Pivo nakon skladištenja	36,54	40,19	28,14	27,84

**Tabela 2.14. Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale tokom proizvodnje piva na poluindustrijskom nivou (Dostálek i Karabín, 2007)**

	Peletirani hmelj 1	Peletirani hmelj 2	Ekstrakt hmelja 1	Ekstrakt hmelja 2
Sladovina	32,78	32,97	31,87	32,95
Ohmeljena sladovina	43,34	49,61	35,95	34,10
Mlado pivo	30,95	37,58	32,16	31,48
Pivo	25,87	29,81	28,17	26,51
Pivo nakon skladištenja	22,74	25,32	21,97	21,13

Krofta i saradnici (2008) su određivali antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih polifenola u češkim i stranim sortama hmelja tokom 3 godine. Pored toga ispitivan je uticaj sušenja, mlevenja, peletiziranja i skladištenja na antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih polifenola ispitivanih sorti. Dobijeni rezultati su pokazali da su najviši antioksidativnu aktivnost imale sorte Saaz i Spalter Select u opsegu od 70 do 80%. Antioksidativna aktivnost ostalih ispitivanih sorti varirala je od 40 do 60%. Sorte sa najvišim sadržajem polifenola su pokazale i najvišu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost zelenog i sušenog hmelja sorti Saaz, Spadek i Premiant značajno su se razlikovale. Tokom sušenja hmelja dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Gubici obično ne prelazi 5%. Mlevenje i peletiziranje hmelja nije uticalo na antioksidativnu aktivnost hmelja kao i na sadržaj polifenola. Skladištenje je imalo različit uticaj na antioksidativnu aktivnost hmelja u zavisnosti od temperature kao i oblika hmelja. Temperatura skladištenja hmelja nije značajno uticala na antioksidativnu aktivnost peleta hmelja upakovanih u višeslojnu foliju bez prisustva vazduha.

## 2.8. Antioksidativna aktivnot polifenolnih jedinjenja u sladovini

Komljenje je faza u kojoj kiseonik može izazivati poteškoće, kao i tokom klijanja i sušenja slada. Oksidacija različitih jedinjenja u komini je glavni uzrok nepoželjnih efekata u daljoj proizvodnji piva, na primer nastajanje nepoželjnih ukusa piva (Clarkson, 1990). Pored toga, kiseonik utiče na nastajanje boje i brzinu filtracije sladovine (Bamforth, 2006).

Postoji više mogućnosti da se smanji dostup vazduha u varionici:

- ❖ upotrebom predkomovnjaka da bi se omogućilo bolje mešanje usipka sa vodom uz nisku dostupnost vazduha,

- ❖ punjenjem uređaja sa dna,
- ❖ uključivanjem mešalice tek kada je pokrivena, a i tada samo kada je apsolutno neophodna radi izjednačavanja sadržaja i temperature u uređaju,
- ❖ dobro održavanje cevovoda i pumpi i
- ❖ isključivanje pumpi čim je sadržaj prebačen iz uređaja da bi se izbegao rizik Y usisavanja vazduha u sistem (Bamforth, 2006).

Pretpostavljajući da je aktivnost lipoksigenaze nepoželjna za stabilnost ukusa piva, potrebno je njenu aktivnost smanjiti, što se postiže snižavanjem sadržaja jednog od supstrata (kiseonika). Smanjenje aktivnosti lipoksigenaze se može postići i ukomljavanjem na što je moguće višoj temperaturi u skladu sa ostalim zahtevima komljenja (Bamforth, 2006). Lipoksigenaza je osetljiva na povišenu temperaturu; na 65°C se inaktivira (Parkes i Kiesbye, 2006).

Poželjno je da klica u toku mlevenja ne bude oštećena jer se time smanjuje ekstrakcija lipoksigenaze. Sniženje pH komine takođe snižava aktivnost lipoksigenaze. Ako su uređaji u varionici načinjeni od bakra, joni bakra mogu prevesti kiseonik u njegove nepoželjne reaktivne vrste (Bamforth, 2006).

Polifenoli svetlog slada se delimično rastvaraju i razgrađuju tokom komljenja, reakcijama oksidacije uglavnom katalizovanim peroksidazama i uz doprinos katalaze i polifenoloksidaze. Na prirodu polifenola u sladovini veoma utiču uslovi pod kojima je slad sušen, dostupnost kiseonika tokom komljenja i program komljenja (Briggs i sar., 2004). Oksidacija polifenola u toku procesa komljenja se odvija putem delovanja različitih sistema oksidaza. Dok se katalaze inaktiviraju u procesu sušenja, peroksidaze i polifenoloksidaze podnose sušenje i zadržavaju znatnu aktivnost. Obe deluju i u procesu komljenja. Peroksidaze imaju veoma jako dejstvo u opsegu temperature 50-65°C, naročito nakon ukomljavanja na 35°C, a inaktiviraju se na temperaturi 70-75°C. Polifenoloksidaze zadržavaju konstantne aktivnosti u toku 180 minuta komljenja. Inaktiviraju se na temperaturama preko od 85°C (Schuster i sar., 1988). Komljenje i ispiranje tropa na povišenim temperaturama dovode do ekstrakcije više polifenola u sladovinu (Briggs i sar., 2004).

Odnosi polifenola u procesu komljenja zavise od sledećih međusobno suprotnih pojava: oslobađanja u kominu, taloženja, oksidacije i polimerizacije. Sadržaj polifenola se bitno povećava sa povišenjem temperature komine, što odgovara i rastvaranju ekstrakta. Sadržaj antocijanidina se manje povišava u opsegu temperatura 20-45°C, što se dovodi u vezu sa delovanjem oksidaza. Razlika u sadržaju antocijanidina u komini dobijenoj na 80°C i u kominama dobijenim na drugim temperaturama, ukazuje na aktivnosti peroksidaza (na temperaturi oko 45°C) i polifenoloksidaza (na temperaturi oko 65°C). Eksperimenti izvedeni u atmosferi kiseonika, odnosno u atmosferi inertnog gasa su pokazali, da se na temperaturi od 45°C izgubi 42% polifenola, a na temperaturi od 65°C oko 65% polifenola. Ovaj gubitak polifenola nastaje usled oksidacije (Schuster i sar., 1988).

Uslovi tokom komljenja mogu favorizovati oksidativne reakcije koje utiču na kvalitet gotovog piva. Mešanje slada sa vodom i kontinualno mešanje tokom komljenja može efikasno aerisati kominu. Relativno niske temperature (od 35 do oko 75°C) osiguravaju značajnu rastvorljivost kiseonika. Temperature tokom komljenja su optimalne za mnoge enzimske reakcije. Proizvodi enzimske oksidacije polinezasićenih masnih kiselina tokom komljenja imaju značajan uticaj na kvalitet finalnog piva (Frederiksen i sar., 2008).

Mikyška i saradnici (2001) su pokazali da više od 50% antioksidativne aktivnosti sladovine potiče od polifenola slada. Antioksidativna aktivnost sladovine ima visoku pozitivnu korelaciju sa sadržajem ukupnih polifenola slada i antocijanidina.

Sadržaj fenolnih kiselina u gotovom pivu zavisi od njihove ekstrakcije tokom ukomljavanja slada sa vodom. Komljenje naročito povišava sadržaj hidroksi derivata cimetne kiseline usled njihovog oslobađanja. McMurrough i saradnici (1984), su objavili da komljenje slada povećava sadržaj ukupnih fenolnih kiselina sa 65 mg/kg pre komljenja na 191 mg/kg nakon komljenja. Ekstrakcija polifenola iz slada u sladovinu zavisi od odnosa količina slada i vode. Sladovina i pivo proizvedeni iz ređih komina (slad : voda = 1:4 i 1:5) sadrže više polifenola od onih dobijenih iz koncentrovanijih komina (1:3). Produženje ukomljavanja sa 105 na 180 i 360 minuta smanjuje sadržaj polifenola u pivu, ali takođe negativno utiče na ukus piva (Von Narzib i sar., 1979). S druge strane proizvodnjom sladovine infuzijom ili dekokcijom dobijaju se sladovine sa vrlo različitim sastavom polifenola i višim sadržajem polifenola koji mogu da oksidišu. Sadržaji ekstrahovanih oksidisanih i polifenola koji mogu da oksidišu utiču na stepen gubitaka polifenola tokom kuvanja sladovine i fermentacije (Kirby i sar., 1977).

Oksidacija tokom proizvodnje piva ima važan uticaj na brojne parametre kao što su separacija sladovine, boja, sadržaj polifenola, koloidna stabilnost i stabilnost ukusa piva. Sadržaj antioksidanata tokom faza proizvodnje piva je zbog toga veoma važan. Hemija proizvodnje piva je veoma složena i opšti antioksidativni potencijal sladovine, ohmeljene, sladovine u fermentaciji i piva zavisi od mnogih promenljivih. Antioksidativna aktivnost slada najviše utiče na antioksidativnu aktivnost sladovine. Doprinos slada u proizvodnji sladovine zavisi od sadržaja antioksidanata ekstrahovanih tokom komljenja. Sadržaj ekstrahovanih antioksidanata zavisi od njihove rastvorljivosti. Viši sadržaj antioksidanata u sladu, naročito rastvorljivih, može prema tome povisiti antioksidativnu aktivnost sladovine (Chandra i sar., 2000).

Tokom komljenja, približno 45% polifenola slada se ekstrahuje u sladovinu i doprinosi ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti. Tokom ukomljavanja ne može se izbeći oksidacija zbog aeracije. Stepent oksidacije dovodi do promene u antioksidativnoj aktivnosti tokom faza koje slede u proizvodnji piva (Chandra, 2002).

Antioksidativni profil sladovine nije konstantan tokom proizvodnje. Sastav i sadržaj antioksidativnih jedinjenja se stalno menja u zavisnosti od različitih hemijskih i fizičkih procesa. Povišenje endogene antioksidativne aktivnosti i istovremeno smanjenje faktora koji snižavaju antioksidativnu aktivnost tokom proizvodnje bi povećali antioksidativnu aktivnost gotovog piva (Chandra i sar., 2000).

Sastavni delovi piva se oksidišu tokom proizvodnje. Najveće promene se dešavaju tokom komljenja. Polifenoli, melanoidini i redukovane tiolne grupe proteina se brzo oksidišu tokom komljenja. Lipidna oksidacija, koja ima najveći negativni efekat na stabilnost ukusa je takođe problem procesa komljenja. Ovaj faktor je povezan sa integritetom plevice i izbegavanjem oštećenja lisne klice koja je bogata masnim kiselinama. Stepent oštećenja lisne klice u sladu direktno utiče na oslobađanje lipida tokom ukomljavanja (Chandra i sar., 2000).

Apsorpcija kiseonika tokom komljenja i kuvanja sladovine sa hmeljom snižava antioksidativnu aktivnost i sprečavanje apsorpcije kiseonika može pomoći u sprečavanju oksidacije lipida i polifenola. Polifenoli imaju tendenciju da stvaraju komplekse sa proteinima tokom proizvodnje sladovine i piva, pa dostupnost polifenolnih antioksidanata zavisi od prisustva proteina. Oksidativna polimerizacija polifenola i povećana sklonost ovih većih, polimerizovanih vrsta da stvaraju takve komplekse, dovodi do nastajanja

nerastvornih jedinjenja koja se gube taloženjem i filtracijom sladovine što može dovesti do sniženja antioksidativne aktivnosti. Uslovi tokom kumljenja takođe mogu dovesti do razlaganja dimernih polifenola i oslobađanja bolje rastvornih, manjih polifenola u sladovinu. Opšta antioksidativna aktivnost sladovine prema tome zavisi od ravnoteže ovih efekata (Chandra i sar., 2000).

U toku kumljenja, paralelno sa razgradnjom proteina i rastvaranjem ekstrakta, nastupa i rastvaranje polifenola. Na ovo povišenje suprotno utiču dve pojave i to:

1. taloženje zajedno sa visokomolekularnim proteinima na temperaturi preko 50-60°C i
2. oksidacija polifenola katalizovana enzimima, pri čemu se njihov indeks polimerizacije povišava, a usled smanjenja redukcionih osobina, jedine se sa proteinima. Ovako nastali kompleksi postaju nerastvorni tek prilikom hlađenja (Schuster i sar., 1988).

Između proteina i polifenola dolazi do nastajanja protein-taninske ravnoteže na primer u hladnoj sladovini, ali i u kasnijim stadijumima proizvodnje piva, pa i u gotovom pivu, posle koje u rastvoru ne mogu biti prisutni istovremeno izrazito taninski polifenoli i osetljivi proteini, bez da dolazi do taloženja. Rastvor je stabilan samo ako prevagne jedna od komponenta ili potpuno nedostaje druga (Schuster i sar., 1988).

Kada se polifenoli oksidišu, gorčina piva je jaka i dugo se zadržava. Visok sadržaj polifenola izaziva stimulaciju reakcija taloženja u toku kumljenja i u toku kuvanja sladovine, tako da se dobijaju stabilnija piva. Pena piva se pogoršava gubitkom visokomolekularnog azota, ali ovde igra ulogu još mnoštvo drugih faktora koji mogu pozitivno ili negativno uticati na penu. Niskomolekularni polifenoli imaju antioksidativne osobine i doprinose održavanju stabilnosti ukusa piva. Redukciona sposobnost ovih jedinjenja igra ulogu u denaturaciji proteina (Schuster i sar., 1988).

Polifenoli ne utiču neposredno na taloženje proteina, pošto sjedinjavanje taninskih sastojaka i molekula proteina počiva na pojavi vodoničnih mostova, koji su na povišenoj temperaturi nestabilni. Taložno delovanje polifenola moglo bi da dođe do izražaja tek na temperaturama ispod 80°C, tj. od momenta kada se sladovina, koja je iz kotla istekla bistra, prilikom hlađenja počne mutiti. Nastajanjem vodoničnih mostova u sladovini koja se hladi mogli bi se objasniti i analitički podaci, prema kojima su sadržaji azota i polifenola u filtriranoj i centrifugiranoj sladovini, nakon taloženja proteinsko-polifenolnih kompleksa na hladno niži; ovo je pogrešno pripisano delovanju polifenola hmelja u toku kuvanja sladovine. Polifenoli slada se odvajaju ranije tokom kumljenja sa tropom. Usled toga im je često pripisivan manji efekat s obzirom na taloženje proteina (Schuster i sar., 1988).

Značaj polifenola verovatno potiče od njihovih redukcionih osobina, koje sprečavaju oksidaciju -SH grupa, pa one ostaju slobodne za tiolno-disulfidnu izmenu. Ovim se može objasniti povoljnije delovanje visokog sadržaja polifenola u sirovinama koji je, kao što je poznato, u korelaciji sa povišenjem antioksidativne aktivnosti sladovine (Schuster i sar., 1988).

Na osnovu svega iznetog pozitivne su one mere, kojima se sastav polifenola u sladovini poboljšava: primena vode za proizvodnju piva sa nižim preostalim alkalitetom, primena zakišeljavanja komine, visoke temperature ukumljavanja prilikom primene slada dobrog kvaliteta i izbegavanje aeracije komine, na primer prilikom usitnjavanja, ukumljavanja ili primenom neadekvatne mešalice (Schuster i sar., 1988).

Arabinoksilani se tokom procesa proizvodnje sladovine ekstrahuju iz slada. Arabinoksilane mogu razgraditi nekoliko enzima. Dejstvom  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-endoksilanaze (EC

3.2.1.8) nastaju supstituisani ksilo-oligosaharidi, koji se mogu razgraditi aktivnošću  $\beta$ -D-ksilopiranozidaza (EC 3.2.1.37), pri čemu se oslobađa  $\beta$ -D-ksiloza sa neredukujućeg kraja. Dejstvom  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaze (EC 3.2.1.55) oslobađa se  $\alpha$ -L-arabinoza sa glavnog lanca. Esterifikovane hidroksi derivati cimetine kiseline mogu se osloboditi aktivnošću cinamoil esteraze (EC 3.1.1.73) tokom komljenja i nakon toga podleći dekarboksilaciji. Cinamoil esteraze, takođe poznate i kao feruloil i *p*-kumaroil esteraze, ili estereze ferulne i *p*-kumarinske kiseline su prisutne u ječmu, zelenom sladu i sladu (Debyser i sar., 1998; Vanbeneden i sar., 2008b).

Vanbeneden i saradnici (2008b) su ispitivali oslobađanje slobodne i estarski vezane ferulne kiseline tokom komljenja. Ispitivan je uticaj različitih procesnih parametara: temperature ukomljavanja, trajanje ukomljavanja, pH tokom ukomljavanja, gustina komine, režim mešanja i veličina čestica samlevenog slada. Tokom komljenja ferulna kiselina se rastvara u vodi i enzimski oslobađa dejstvom cinamoil esteraze. Rezultati su pokazali da temperatura ukomljavanja i pH komine bitno utiču na oslobađanje u vodi ekstraktivne i enzimski oslobođene ferulne kiseline. Enzimski hidroliza se može bolje kontrolisati tokom oslobađanja ferulne kiseline. Optimalna temperatura je 40°C, a pH komine 5,8. Gustina komine, veličina čestica samlevenog slada i režim mešanja su imali značajan efekat na oslobađanje ferulne kiseline u toku komljenja. McMurrough i saradnici (1996) su utvrdili da se ferulna kiselina iz slada oslobađa u sladovinu uz učešće enzima na optimalnoj temperaturi oko 45°C. Ako se ukomljavanje izvodi na 65°C sadržaj oslobođene ferulne kiseline je znatno niži. Briggs i saradnici (2004) su takođe naveli temperaturu od 45°C kao optimalnu za oslobađanje ferulne kiseline u sladovinu.

Vanbeneden i saradnici (2007) su ispitivali sadržaje ferulne i *p*-kumarinske u devet sorti slada poreklom iz dve sladare i u proizvedenim sladovinama. Dobijeni rezultati su pokazali veliku razliku u sadržaju ferulne i *p*-kumarinske kiseline u ispitivanim sortama slada i proizvedenim sladovinama. Samo mali deo ispitivanih kiselina je iz slada ekstrahovan u sladovinu tokom komljenja, a najveći deo je zaostao u tropu.

## 2.9. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja u ohmeljenoj sladovini

Doprinos polifenola hmelja ključalnoj sladovini zavisi od vremena dodatka hmelja. Kasno dodavanje hmelja u ključalu sladovinu dobijenu dekokcijom dozvoljava uključivanje polifenola, ali ne i kasnije uklanjanje polifenola koji mogu da oksidišu. Kasniji dodatak hmelja u ključalu sladovinu može čak dovesti i do potrebe za produženim tretmanom da bi se proizvelo koloidno stabilno pivo (Kirby i sar., 1977). Polifenoli hmelja imaju veći afinitet prema proteinima piva; prema tome imaju tendenciju da se talože potpunije tokom kuvanja sladovine sa hmeljom od polifenola ekstrahovanih iz slada (Bellmer, 1981).

Antioksidativna aktivnost ohmeljene sladovine i piva zavisi od količine polifenola hmelja i stepena oksidacije u varionici. Povišen stepen oksidacije uzrokuje smanjenje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti sladovine, ohmeljene sladovine i piva. Aeracije tokom komljenja snižava sadržaj polifenola za oko 7% i antocijanidina za oko 25% u sladovini (Mikyška i sar., 2001).

Kuvanjem sladovine sa hmeljom nastaje 4-vinilgvajakol termičkom dekarboksilacijom ferulne kiseline u količini od 0,3 mg/l. Ovaj sadržaj 4-vinilgvajakola,

koji je vrlo blizu njegovog praga osetljivosti ukusa, nastaje iz sladovina koje sadrže visoke sadržaje ferulne kiseline tj. više od 6 mg/l (McMurrough i sar., 1996).

Polifenoli koji se nalaze u hmelju rastvaraju se u sladovini koja ključa, pri čemu je njihova ekstrakcija iz šišarki hmelja sporija, nego iz hmeljnog praha ili ekstrakta u kojima ima taninskih sastojaka (Schuster i sar., 1988).

Od flavanola hmelja, tokom kuvanja sladovine smanjuju se sadržaji katehina i epikatehina, ali i dimera i trimera. Visok sadržaj kompleksnih polifenola – poreklom verovatno iz slada – zaostaje u sladovini, a 35-45% jednostavnih flavanola u hmeljenoj sladovini je poreklom iz hmelja (Schuster i sar., 1988).

Polifenoli manjih molekulskih masa, intenzivnije se vezuju sa proteinima nego viši polifenoli. Viši polifenoli su manje aktivni pa zaostaju u sladovini, izazivajući tamniju boju i širi spektar ukusa (Schuster i sar., 1988).

Uvid u delovanje polifenola slada i polifenola hmelja, dobijen na osnovu opštih metoda analiza, dat je u Tabeli 2.15.

**Tabela 2.15. Promene sadržaja polifenola slada i hmelja nakon 90 minuta kuvanja u sladovini (Schuster i sar., 1988)**

	Sladovina, kuvana bez hmelja		Sladovina bez polifenola slada, kuvana sa hmeljom		
	pre kuvanja	posle kuvanja	dodati hmelj	pre kuvanja	posle kuvanja
Polifenoli (mg/l)	239,6	236,5	96,2	10,0	64,1
Antocijanidini (mg/l)	104,7	83,8	84,0	9,4	21,5
Boja 100 mg polifenola, E430×10	0,33	0,56	-	0,99	0,99
Koagulirajući azot (mg/100ml)	5,3	2,8	-	5,3	2,3

Sadržaji polifenola slada se praktično ne smanjuju, dok se sadržaji polifenola hmelja smanjuju za oko 33%. Nasuprot tome, antocijanidini su znatno intenzivnije reagovali sa proteinima: kod slada, njihov sadržaj je opao za 20%, a kod hmelja čak za 75%. Boja polifenola hmelja je znatno tamnija od boje polifenola slada. Ovo ukazuje na činjenicu da se sa proteinima iz sladovine ne talože jako polimerizovani, tamnije obojeni polifenoli, već dolazi do izdvajanja polifenola nižeg stepena polimerizacije (Schuster i sar., 1988).

Samo kod svežeg hmelja dolazi do smanjenja sadržaja polifenola tokom kuvanja sladovine. Smanjenje sadržaja antocijanidina je utoliko veće, ukoliko su manje polimerizovani. Oksidisani, više polimerizovani antocijanidini zaostaju u sladovini. U sladovini zaostaju jedinjenja sa manje reaktivnim grupama. Ove grupe su jednim delom vezane sa proteinima, i u daljem procesu proizvodnje piva, na primer usled opadanja pH tokom fermentacije, ili usled hlađenja prilikom dozrevanja piva, delimično postaju nerastvorna i izdvajaju se kao talog. Pošto se ova „dehidracija“ nastavlja i nakon filtracije piva, ovo izaziva smanjenje njegove stabilnosti (Schuster i sar., 1988).

Tokom hmeljenja postoji mogućnost da se uklone mogući prekursori nepoželjnih jedinjenja koja izazivaju starenje piva. Reakcijama termičke razgradnje u virpulu mogu nastati jedinjenja nepoželjnog ukusa i zbog toga se predlaže primena vakuuma (od 0,5 bara) nakon ove faze (Bamforth, 2006).

## 2.10. Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja tokom fermentacije i u pivu

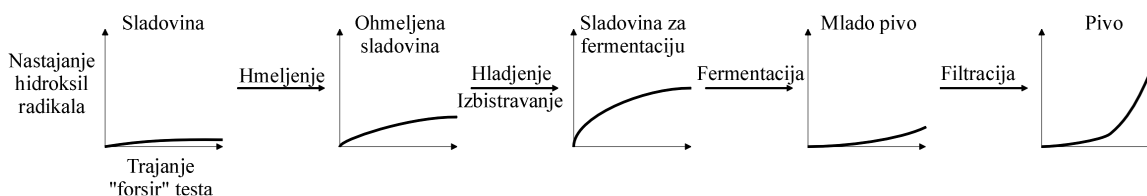
U sladovini pre fermentacije sadržaj kiseonika treba da bude minimalan tj. samo onoliko koliko je potrebno kvascu. Kvasac ima najmanje dva direktna uticaja na ukus piva: sposobnost da stvara  $\text{SO}_2$  i da redukuje karbonilna jedinjenja. Važno je obezbediti intenzivnu fermentaciju primenom utvrđenih procedura za održavanje visoke vijabilnosti i vitalnosti kvasca kao i inokulisanje sa odgovarajućom količinom inokuluma. Sadržaj  $\text{SO}_2$  se povećava ukoliko: kvasac ima dostupno više sulfata, ako je sladovina bistrija, ako su sniženi zasićenost sladovine kiseonikom i količina inokuluma i ako je temperatura fermentacije niža (Bamforth, 2006). Aeracija i istovremeno uklanjanje hladnog taloga flotacijom dovodi do smanjenja antioksidativne aktivnosti i stabilnosti ukusa. Sekundarna aeracija tokom fermentacije takođe smanjuje antioksidativnu aktivnost i stabilnost ukusa (Forster i Back, 2000).

Kaneda i saradnici (1988, 1991) su na osnovu svojih rezultata predložili puteve narušavanja ukusa piva tokom starenja. Molekularni kiseonik ne reaguje lako sa drugim komponentama piva, ali kada je aktiviran energijom (svetlost ili toplota) ili uz metale kao katalizatore prelazi u reaktivne vrste kiseonika (singletni kiseonik- $^1\text{O}_2$ , superoksid anjon radikal- $\text{O}_2^{\cdot-}$ , hidrosil radikal- $\cdot\text{OH}$  i hidroperoksid radikal- $\cdot\text{OOH}$ ). Iz molekularnog kiseonika nastaje superoksid anjon ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) u procesu autooksidacije tokom skladištenja piva. Hidrosil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) nastaje po Fenton-ovoj ili Haber-Vajs-ovoj reakciji iz superoksid anjona ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ove reaktivne vrste kiseonika reaguju sa komponentama piva kao što su: šećeri, izohumuloni, alkoholi, masne kiseline, polifenoli i iniciraju niz radikalskih reakcija u pivu pri čemu nastaju karbonilna jedinjenja. Neka od karbonilnih jedinjenja su direktno ili preko reakcija kondenzacije odgovorna za nastajanje nepoželjnih ukusa piva tokom starenja.

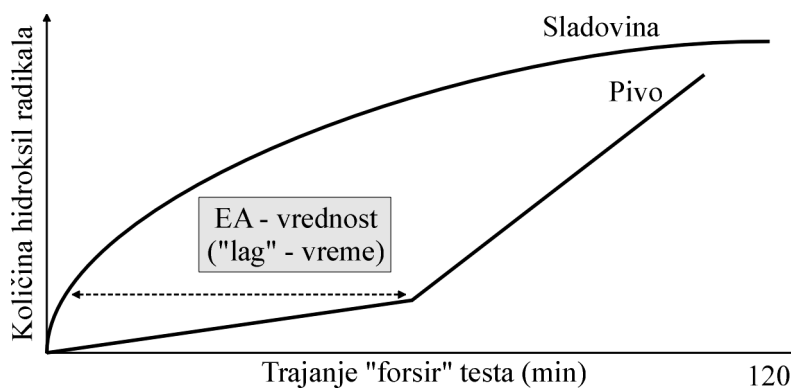
Uchida i Ono (1999) su pokazali da vodonik peroksid nastaje nakon definisanog „lag“ perioda (koji je specifičan za vrstu piva) u ranim stadijumima oksidativnog forsir testa (na  $60^\circ\text{C}$ ) pri čemu se deo nastalog  $\text{H}_2\text{O}_2$  odmah prevodi u hidrosil radikale u zavisnosti od sadržaja  $\text{Fe}^{2+}$  jona. Ovi rezultati su potvrdili teoriju da hidrosil radikali nastaju iz vodonik peroksida i da pojava „lag“ faze nastajanja hidrosil radikala može biti zbog vremena potrebnog za nastajanje vodonik peroksida tokom oksidativnog forsir testa što zavisi od endogene antioksidativne aktivnosti koja može sprečiti nastajanje hidrosil radikala. Endogena antioksidativna aktivnost (EA) piva se određuje na osnovu „lag“ faze tj. perioda pre nastajanja hidrosil radikala (Uchida i Ono, 1999, 2000). Senzorna ocena piva je pokazala da vrednost endogene antioksidativne aktivnosti piva ima dobru korelaciju sa brzinom pogoršanja ukusa piva i da je metoda bila korisna za brzo predviđanje stabilnosti ukusa piva pre distribucije piva iz pivare. Pored toga, istraživanja mehanizama za nastajanje hidrosil radikala dodatkom različitih hemijskih jedinjenja pokazuju da neka jedinjenja piva mogu igrati esencijalnu ulogu u vrednosti antioksidativne aktivnosti piva. Ova saznanja upućuju da možemo tehnološkim istraživanjima poboljšati stabilnost ukusa piva ukoliko možemo kontrolisati vrednosti endogene antioksidativne aktivnosti piva promenom uslova u proizvodnji piva (Uchida i Ono, 2000).

Uchida i Ono su razvili ESR metodu za određivanje nastajanja hidrosil radikala u pivu (1996) primenom tzv. forsir testa na  $60^\circ\text{C}$ . Ovu metodu su primenjivali za određivanje hidrosil radikala u fazama proizvodnje piva (Uchida i Ono, 2000). Krive brzine nastajanja hidrosil radikala su bile značajno različite za pojedine faze proizvodnje: komljenje, hmeljenje sladovine, uklanjanje toplog i hladnog taloga,

fermentacija, filtracija piva (Slika 2.5). U sladovini su određeni samo tragovi hidroksil radikala. Hidroksil radikali su određeni u ohmeljenoj sladovini i sladovini za fermentaciju, kao i u gotovom pivu. Hidroksil radikali su u ohmeljenoj sladovini i sladovini za fermentaciju nastali odmah na početku forsir testa. „Lag“ faza koja je određena u gotovom pivu nije primećena u ohmeljenoj sladovini i sladovini za fermentaciju. Tokom fermentacije „lag“ faza nastajanja hidroksil radikala je postepeno nastajala. U mladom pivu je određena relativno duga „lag“ faza. U gotovom pivu, nakon filtracije određena je tipična „lag“ faza. Ovi rezultati jasno upućuju da se može kontrolisati endogena antioksidativna aktivnost piva menjanjem uslova i operacija proizvodnje piva. Na osnovu rezultata datih na Slici 2.5 može se zaključiti da tri glavna procesa (visoka temperatura u varionici, fermentacija i filtracija piva) značajno utiču na nastajanje hidroksil radikala. Tipične krive nastajanja hidroksil radikala u sladovini i gotovom pivu date su na Slici 2.6. Nastajanje hidroksil radikala se intenziviralo tokom visokih temperatura tj. u toku hmeljenja sladovine i odvajanja taloga u virpulu. Krive nastajanja hidroksil radikala zavisile su od uslova i primenjene temperature u varionici.



**Slika 2.5. Tipične krive nastajanja hidroksil radikala u fazama proizvodnje piva. Na ordinati je prikazan sadržaj nastalih hidroksil radikala, a na apscisi vreme na 60°C (Uchida i Ono, 2000)**



**Slika 2.6. Definicija endogene antioksidativne aktivnosti sladovine i piva (Uchida i Ono, 2000)**

Tokom fermentacije nastajanje hidroksil radikala je opalo da bi nakon glavne fermentacije bila uočena duga „lag“ faza. Prema tome, regulacija uslova fermentacije je smatrana esencijalnom za povećanje endogene antioksidativne aktivnosti piva. U daljem istraživanju Uchida i Ono (2000) su ispitivali uticaj soja kvasca (Tabela 2.16) i količine inokuluma (Tabela 2.17) na endogenu antioksidativnu aktivnost gotovog piva. Rezultati su pokazali da soj kvasca značajno utiče na endogenu aktivnost piva. Vrednost endogene



aktivnosti kvasca sa sojem C je bila duža u poređenju sa sojevima A i B. Nije postojala korelacija između vremena fermentacije i endogene antioksidativne aktivnosti. Količina inokuluma je imala uticaja na endogenu antioksidativnu aktivnost gotovog piva. Sa povećanjem broja ćelija u inokulumu raste i endogena antioksidativna aktivnost, a vreme fermentacije se značajno skraćuje. Kod količine inokuluma  $54 \times 10^6$  ćelija/ml dobijen je različit sastav isparljivih komponenata piva.

**Tabela 2.16. Uticaj soja kvasca na endogenu antioksidativnu aktivnost gotovog piva (Uchida i Ono, 2000)**

	Soj kvasca		
	A	B	C
Endogena antioksidativna aktivnost piva	80	90	107
Vreme fermentacije (čas) <sup>a</sup>	84	83	112
Stabilnost ukusa	C > B > A		

<sup>a</sup> Vreme do postizanja prividne prevrelosti od 69%

**Tabela 2.17. Uticaj broja ćelija kvasca u inokulumu na endogenu antioksidativnu aktivnost piva (Uchida i Ono, 2000)**

	Broj ćelija kvasca $\times 10^6$ /ml			
	9	14	19	54
Endogena antioksidativna aktivnost piva	85	90	100	110
Vreme fermentacije (čas) <sup>a</sup>	133	124	108	68

<sup>a</sup> Vreme do postizanja prividne prevrelosti od 69%

Uchida i Ono (2000a) su takođe ispitivali efekat rastvorenog kiseonika u sladovini za fermentaciju na endogenu antioksidativnu aktivnost piva i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 2.18. Eksperimenti su izvođeni sa sledećim sadržajima rastvorenog kiseonika: 8, 16 i 24 mg/l. Porastom sadržaja rastvorenog kiseonika u sladovini od 8 do 16 mg/l dovelo je do skraćenja vremena fermentacije sa 112 na 83 sata, ali dalji porast sadržaja kiseonika od 16 do 24 mg/l nije doveo do skraćenja fermentacije. Međutim, endogena antioksidativna aktivnost piva se smanjila od 107 na 30 sa porastom rastvorenog kiseonika.

**Tabela 2.18. Uticaj sadržaja rastvorenog kiseonika u sladovini za fermentaciju na endogenu antioksidativnu aktivnost piva (Uchida i Ono, 2000a)**

	Sadržaj rastvorenog kiseonika u sladovini (mg/l)		
	8 (A)	16 (B)	24 (C)
Endogena antioksidativna aktivnost piva	107	60	30
Vreme fermentacije (čas) <sup>a</sup>	112	83	84
Stabilnost ukusa	A >> B >> C		

<sup>a</sup> Vreme do postizanja prividne prevrelosti od 69%

Sadržaj polifenola se može smanjiti tokom procesa fermentacije kao posledica precipitacije proteina. Šećeri prisutni u sladovini mogu stvarati vodonične veze i biti

kompeticija polifenolima za moguća mesta vezivanja. Kako proces fermentacije odmiče sadržaj šećera u sladovini se smanjuje pri čemu dolazi do porasta broja vodoničnih veza između polifenola i proteina piva (Shahidi i Nazck, 2004). Sadržaj fenolnih kiselina u finalnom pivu se samo malo razlikuje od sadržaja u sladovini pre dodatka hmelja. Sladovina komercijalnih piva donjeg vrenja ima nizak sadržaj kafene kiseline. U ključaloj sladovini sa hmeljom raste sadržaj *p*-kumarinske i *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Kasnije operacije u proizvodnji kao što su fermentacija, hladno dozrevanje, tretmani sa adsorbentima i filtracija dovode do blagog gubitka fenolnih kiselina (McMurrough i sar., 1984; Shahidi i Nazck, 2004).

Sadržaj fenolnih kiselina u odabranim britanskim, američkim, nemačkim i irskim pivima dat je u Tabeli 2.19.

**Tabela 2.19. Sadržaj fenolnih kiselina u odabranim pivima (mg/l) (McMurrough i sar., 1984)**

Fenolna kiselina	British export A	American Malt Liqour	German Rauchbier	Irish ale
<b><i>Hidroksi derivati benzojeve kiseline</i></b>				
Galna kiselina	1,8	1,4	3,5	0,3
Protokatehinska	1,0	0,5	1,2	0,2
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva	1,8	1,1	0,4	0,3
Vanilinska	5,4	2,5	12,7	1,5
Siringinska	1,2	0,8	2,2	0,7
<b><i>Hidroksi derivati cimetine kiseline</i></b>				
Kafena	tragovi	0,1	1,0	0,1
<i>p</i> -Kumarinska	1,1	1,9	4,6	1,0
Ferulna	2,7	4,2	10,8	1,1
Sinapinska	1,4	1,1	3,0	0,2
Ukupno	16,4	16,6	39,4	5,4

Najniži sadržaj fenolnih kiselina je nađen u irskom pivu gornjeg vrenja, dok nemačko pivo sadrži 5 puta više fenolnih kiselina. Sadržaj hidroksi derivata benzojeve kiseline u gotovom pivu je viši od sadržaja hidroksi derivata cimetine kiseline (McMurrough i sar., 1984). Italijanska piva donjeg vrenja sadrže samo 1,187 mg/l slobodnih fenolnih kiselina (Montanari i sar., 1999), dok španska, danska i nemačka piva sadrže 1,759 mg/l slobodnih fenolnih kiselina (Bartolome i sar., 2000). Glavne slobodne fenolne kiseline u italijanskim pivima su *m*-, *p*- i *o*-kumarinska i ferulna kiselina (Montanari, 1999), dok su vanilinska, ferulna i *p*-kumarinska dominantne fenolne kiseline u španskim, nemačkim i danskim pivima (Bartolome i sar., 2000). Sinapinska, vanilinska, hlorogenska, homovanilinska, *p*-hidroksibenzojeva, 2,6- i 3,5-dihidroksibenzojeva, siringinska, galna, protokatehinska i kafena kiselina su prisutne u malim količinama (Montanari i sar., 1999; Bartolome i sar., 2000). Drugi monomerni fenoli identifikovani u pivu uključuju tirozol, katehin, vanilin i dr. Monomerni fenoli čine 10-20% od ukupnog sadržaja fenola piva. Sa druge strane sastav polifenola istog piva može varirati zavisno od faze proizvodnje (Tabela 2.20).

**Tabela 2.20. Sadržaji fenolnih kiselina u uzorcima uzetim tokom procesa proizvodnje piva (mg/l) (McMurrough i sar., 1984)**

Fenolna kiselina	Sladovina	Sladovina u fermentaciji	Gotovo pivo
<b><i>Hidroksi derivati benzojeve kiseline</i></b>			
Galna kiselina	0,1	0,2	0,2
Protokatehinska	0,5	0,4	0,3
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,6	1,1	1,1
Vanilinska	1,4	1,6	0,9
Siringinska	0,6	0,4	0,3
<b><i>Hidroksi derivati cimetine kiseline</i></b>			
Kafena	0,1	0,4	0,3
<i>p</i> -Kumarinska	0,6	0,4	0,3
Ferulna	1,3	1,7	1,8
Sinapinska	0,4	0,5	0,4
Ukupno	5,6	8,0	6,7

Jandera i saradnici (2005) su ispitali promene sadržaja fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva u poluindustrijskim uslovima i rezultati su prikazani u Tabeli 2.21. Hmeljenjem sladovine povećan je sadržaj protokatehinske, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, hlorogenske i ferulne. U toku fermentacije se povećao, ili ostao isti, sadržaj skoro svih kiselina. Tokom naknadne fermentacije smanjen je sadržaj skoro svih ispitivanih kiselina.

**Tabela 2.21. Sadržaj fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva (Jandera i sar., 2005)**

Fenolna kiselina	Sadržaj (mg/l)			
	Sladovina	Ohmeljena sladovina	Mlado pivo	Pivo
Galna	4,38	3,18	5,66	- <sup>a</sup>
Protokatehinska	0,08	0,12	0,31	0,21
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,93	3,33	2,05	2,69
Vanilinska	0,28	0,55	0,59	0,57
Hlorogenska	- <sup>a</sup>	1,17	0,86	1,02
Kafena	0,20	- <sup>a</sup>	0,20	0,10
Siringinska	0,09	0,03	0,19	0,11
<i>p</i> -Kumarinska	0,33	0,33	0,37	0,35
Ferulna	1,31	1,35	1,47	1,41
Sinapinska	0,45	0,44	0,62	0,53

<sup>a</sup> – Koncentracija ispod limita detekcije

U bezalkoholnim pivima sadržaj polifenola je niži od sadržaja u standardnim pivima, a to se pripisuje razlikama u trajanju fermentacije, primeni različitih sojeva kvasca u fermentacijama standardnih i bezalkoholnih piva i gubicima usled izdvajanja alkohola u proizvodnji bezalkoholnih piva. Sve ovo utiče na sniženje sadržaja polifenola kao što su *p*-kumarinska, kafena i vanilinska kiselina itd. (Bartolomé i sar., 2000) (Tabela

2.22). García i saradnici (2004) su potvrdili ove rezultate ispitujući devet komercijalnih vrsta bezalkoholnog piva (Tabela 2.23).

**Tabela 2.22. Sadržaj polifenola (mg/l)<sup>a</sup> u u komercijalnim uzorcima bezalkoholnog i standardnog piva (Bartolomé i sar., 2000)**

Jedinjenje	Bezalkoholna piva	Standardna piva
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	0,073±0,019	0,092±0,030
(+)-Katehin	0,641±0,383	0,463±0,187
Vanilinska kiselina	0,347±0,088	0,477±0,110
Kafena kiselina	0,045±0,022	0,074±0,028
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,576±0,176	0,773±0,148
Ferulna kiselina	0,718±0,294	1,305±0,603
Sinapinska kiselina	0,073±0,033	0,090±0,036

<sup>a</sup> Srednja vrednost ± standardna devijacija

**Tabela 2.23. Sadržaj polifenola (mg/l)<sup>a</sup> u komercijalnim uzorcima bezalkoholnog piva (García i sar., 2004)**

Jedinjenje	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Galna kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Protokatehinska kiselina	0,66±0,04	2,7±0,2	3,4±0,2	2,7±0,2	-	4,7±0,3	0,93±0,05	5,1±0,3	4,5±0,3
(+)-Katehin	0,31±0,03	1,0±0,1	4,5±0,4	-	-	-	2,8±0,2	0,42±0,03	0,77±0,06
Gentistinska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kafena kiselina	-	-	0,24±0,01	0,32±0,02	-	0,41±0,02	0,19±0,01	-	-
(-)-Epikatehin	-	-	-	-	-	0,18±0,01	0,21±0,01	-	0,22±0,02
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,22±0,01	0,49±0,02	0,41±0,02	0,23±0,01	0,11±0,01	0,73±0,03	0,64±0,02	0,62±0,02	0,38±0,01
Ferulna kiselina	2,3±0,1	1,3±0,1	-	1,5±0,1	0,68±0,02	2,3±0,1	1,3±0,1	1,5±0,1	0,66±0,02
Salicilna kiselina	-	-	-	-	-	0,13±0,01	-	-	-
Kvercetin	-	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-
Ukupno	3,5	5,5	8,6	4,8	0,8	8,5	6,1	7,6	6,5

<sup>a</sup> Srednja vrednost ± standardna devijacija

Rivero i saradnici (2005) su ispitivali u tri tipa piva: tamnom, svetlom i bezalkoholnom, sadržaj ukupnih fenola, proantocijanidina, katehina i melanoidina i antioksidativnu aktivnost. Najviše ukupnih polifenola (489 mg/l) i melanoidina (1,49 g/l) su sadržala tamna piva i to skoro dva puta više nego bezalkoholna piva (Tabela 2.24). U sva tri tipa piva određena antioksidativna aktivnost je imala značajan stepen korelacije sa sadržajem ukupnih fenola, procijanidina, katehina i melanoidina.

**Tabela 2.24. Antioksidativna aktivnost, sadržaj ukupnih fenola, procijanidina, katehina i melanoidina u uzorcima piva (Rivero i sar., 2005)<sup>a</sup>**

Parametar	Tip piva		
	Tamno	Svetlo	Bezalkoholno
Antioksidativna aktivnost (TEAC, mg/l)	99±9 <sup>c</sup>	71±4 <sup>b</sup>	36±12 <sup>a</sup>
Ukupni fenoli (GAE, mg/l)	489±52 <sup>c</sup>	380±6 <sup>b</sup>	230±7 <sup>a</sup>
Procijanidini (mg/l, Cyn)	168±10 <sup>b</sup>	138±2 <sup>a</sup>	127±0,9 <sup>a</sup>
Katehin (mg/l, Cat)	60±5 <sup>b</sup>	26±2 <sup>a</sup>	22±2 <sup>a</sup>
Melanoidini	1,49±0,02 <sup>b</sup>	0,61±0,04 <sup>a</sup>	0,58±0,01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Rezultati su srednje vrednosti ± standardna devijacija (dobijeni na osnovu šest merenja)

Vrednosti sa oznakama <sup>b</sup> i <sup>c</sup> su značajno različite (p<0,05)

Lugasi i Hóvári (2003) su ispitivali sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost svetlih (Chimay, Tuborg, Amstel, Spaten, Gold Fassl) i tamnih piva (Leffe, DAB, Borsodi). Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti su bile: antiradikalska aktivnost na DPPH radikale, redukciona sposobnost, ukupni antioksidativni status i sposobnost heliranja (Tabela 2.25). Sadržaj ukupnih polifenola u tamnim pivima (380-600 mg/l) je bio viši nego u svetlim pivima (270-470 mg/l). Piva su imala značajnu antiradikalsku aktivnost na DPPH radikal pri čemu su tamna piva pokazala jaču antiradikalsku aktivnost (37,8-56,6 μl) u odnosu na svetla piva (58,8-116,3 μl). Utvrđena je značajna korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale. I svetla i tamna piva imala su značajnu redukcionu sposobnost. Takođe je utvrđena značajna korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i redukcionne sposobnosti. Svi ispitivani uzorci piva su imali značajnu sposobnost heliranja (1,65-2,14) i ukupni antioksidativni status (1,72-2,56 mmol/l za svetla i 2,06-3,08 mmol/l za tamna piva).

**Tabela 2.25. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost piva (Lugasi i Hóvári, 2003)**

Naziv piva	Ukupni polifenoli <sup>a</sup> (mg/l)	DPPH radikali <sup>b</sup> , EC <sub>50</sub> (μl)	Redukciona sposobnost <sup>c</sup> (ASE po ml)	Ukupni antioksidativni status <sup>d</sup> (mmol/l)	Sposobnost heliranja <sup>e</sup> , 1ml (A <sub>485</sub> /A <sub>530</sub> )
Chimay	390	64,6	2,61	2,56	1,71
Tuborg	270	116,3	1,83	1,72	2,14
Amstel	400	66,7	2,53	2,36	1,80
Spaten	350	85,8	2,04	1,86	1,88
Gold Fassl	470	58,5	3,13	2,48	1,75
Leffe	440	56,6	2,69	2,64	1,81
DAB	380	64,9	2,04	2,06	1,74
Borsodi	600	37,8	3,36	3,08	1,94
Lager piva, srednja vrednost ± SD	376 ± 73	78,4±23,5	2,43±0,51	2,20±0,38	1,86±0,17
Tamna piva, srednja vrednost ± SD	473±114	53,1±13,9	2,71±0,68	2,59±0,51	1,83±0,10

<sup>a</sup> Sadržaj ukupnih fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline. <sup>b</sup> Određivanje DPPH radikala spektrofotometrijskom metodom, EC<sub>50</sub> je količina uzorka potrebna za obezbojavanje 50% DPPH radikala na na 517 nm. <sup>c</sup> Redukciona sposobnost je data u ASE koja pokazuje količinu askorbinske kiseline izražene u μmol one redukcionne sposobnosti koja je jednaka redukcionoj sposobnosti 1ml uzorka. <sup>d</sup> Ukupni antioksidativni status je meren pomoću Randox Kit i izražena u Trolox ekvivalentima. <sup>e</sup> Sposobnost heliranja bakra je izražena kao odnos vrednosti dobijene za uzorak na absorbanciji 485 prema 530 nm (0,5 i 1 ml) u reakcionoj smeši koja sadrži Cu<sup>2+</sup> jone i tetrametilmureksid u heksamin puferu (pH 5,0). Udeo absorbancija reakcione smeše sa 1 ml destilovane vode umesto uzorka je 3,55 ± 0,05.

Walters i saradnici (1997) su utvrdili da (+)-katehin i ferulna kiselina imaju antioksidativne osobine tj. da (+)-katehin „hvata“ efikasnije superoksid anjon radikal u poređenju sa ferulnom kiselinom, a ferulna kiselina je bila mnogo efikasnija kao „hvatač“ hidroksil radikala. (+)-Katehin je pokazivao prooksidativne aktivnosti pri niskim sadržajima tokom određivanja antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale dok ferulna kiselina nije pokazivala prooksidativne aktivnosti. Ova jedinjenja inihibiraju lipidnu peroksidaciju.

Sojevi *Saccharomyces cerevisiae* koji nemaju sposobnost fermentacije daju nepoželjne ukuse pivu kao što su „fenolni“, „biljno fenolni“ i ukus na karanfilić. Dekarboksilacija fenolnih karboksilnih kiselina (*p*-kumarinska, ferulna i sinapinska) može biti odgovorna za nastajanje takvih ukusa. Piva koja imaju fenolni ukus sadrže značajne količine 4-vinilgvajakola, koji može nastati dekarboksilacijom ferulne kiseline prisutne u sladovini tokom fermentacije (Thurston i Tubb, 1981). Sladovine fermentisane sa divljim sojevima kvasca, koji nemaju sposobnost fermentacije, sadrže 10 puta više 4-vinilgvajakola u poređenju sa onima u uobičajenom pivu (Villarreal i sar., 1986) (Tabela 2.26).

**Tabela 2.26. Sadržaj 4-vinilgvajakola u pivima fermentisanim sa pivskim kvascem i divljim sojevima kvasca (Villarreal i sar., 1986)**

Soj kvasca	Sadržaj 4-vinilgvajakola (µg/l)
Divlji kvasac	1154
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	1914
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1035
<i>Saccharomyces willianus</i>	1333
<i>Saccharomyces uvarum</i> , J-3015	132
<i>Saccharomyces uvarum</i> , J-2270	150
<i>Saccharomyces uvarum</i> , J-2036	115
<i>Saccharomyces uvarum</i> , J-28C4	132

Neki divlji kvasci i bakterije imaju sposobnost da dekarboksiluju ferulnu kiselinu i stvaraju 4-vinilgvajakol i njihov fenotip je označen sa POF<sup>+</sup> (POF=“phenolic off-flavour“ – nepoželjni fenolni ukus). Sojevi *Saccharomyces cerevisiae* koji se koriste u proizvodnji piva i ne poseduju sposobnost da stvaraju 4-vinilgvajakol označavaju se sa POF<sup>-</sup>. Prisustvo 4-vinilgvajakola u mnogim pivima gornjeg i donjeg vrenja i „stout“ pivima je nepoželjno i može služiti kao indikator infekcije divljim kvascima i bakterijama. Međutim, u tradicionalnoj proizvodnji nemačkih pšeničnih i „Rauch“ piva se POF<sup>+</sup> kvasci odabiraju za proizvodnju jer 4-vinilgvajakol doprinosi ukusu tih vrsta piva (Madigan i sar., 1994). U Tabeli 2.27 su dati sadržaji ferulne kiseline i 4-vinilgvajakola u nekim komercijalnim pivima. Sadržaji 4-vinilgvajakola su bili ispod praga osetljivosti ukusa sem u pšeničnom pivu.

**Tabela 2.27. Sadržaji ferulne kiseline i 4-vinilgvajakola određeni u pivima (Madigan i sar., 1994)**

Tip piva	Ferulna kiselina (mg/l)	4-vinilgvajakol (mg/l)
Pivo gornjeg vrenja	0,52	0,04
Pivo donjeg vrenja	1,13	0,07
Stout	0,90	0,04
Pšenično pivo	2,50	0,68

U Tabeli 2.28 su dati sadržaji ferulne kiseline i 4-vinilgvajakola tokom fermentacije sa POF<sup>+</sup> sojem kvasca. Početni sadržaj 4-vinilgvajakola je posledica termalne fragmentacije ferulne kiseline u toku proizvodnje sladovine ili sterilizacije. U toku fermentacije sadržaj ferulne kiseline se smanjio oko 70% od početnog sadržaja. Sadržaj ferulne kiseline se smanjio za 3,8 mg/l, a odgovarajući porast sadržaja 4-vinilgvajakola je bio samo 2,1 mg/l umesto stehiometrijski očekivanih 2,9 mg/l. Moguće objašnjenje je da je deo 4-vinilgvajakola ispario tokom fermentacije (Madigan i sar., 1994).

**Tabela 2.28. Sadržaji ferulne kiseline i 4-vinilgvajakola tokom fermentacije sa POF<sup>+</sup> sojem kvasca (Madigan i sar., 1994)**

Dani	Ferulna kiselina (mg/l)	4-vinilgvajakol (mg/l)
1	5,5	0,36
2	5,3	0,31
3	4,8	0,27
4	5,0	0,28
5	4,5	0,36
6	4,1	0,66
7	2,8	1,68
8	1,7	2,44

Isparljiva fenolna jedinjenja doprinose aromi bezalkoholnih pića kao što su voćni sokovi i kafa, kao i alkoholnih pića kao što su pivo, vino, šeri i viski (Dorfner i sar., 2003; Vanbenden i sar., 2008).

Hidroksi derivati cimetne kiseline povezani sa polisaharidima u sladu se tokom proizvodnje piva oslobađaju i ekstrahuju. Dekarboksilacijom ili termalnom fragmentacijom, ili enzimskom aktivnošću specijalnih sojeva kvasca, hidroksi derivati cimetne kiseline, određeni *p*-kumarinska i ferulna kiselina mogu se transformisati u isparljiva fenolna jedinjenja 4-vinilfenol i 4-vinilgvajakol. Ova jedinjenja imaju značajan uticaj na ukus piva. Ferulna i *p*-kumarinska kiselina nema uticaja na ukus piva jer je njihov prag osetljivosti ukusa 660 i 520 mg/l. Prag osetljivosti ukusa 4-vinilgvajakola je samo 0,3 mg/l (Vanbeneden i sar., 2006). Temperatura kumljenja je niža od 80°C i nije dovoljno visoka za termičku dekarboksilaciju ferulne kiseline, pa se 4-vinilgvajakol ne nalazi u sladovini. Samo tokom režima dugog i intenzivnog kuvanja nastaju koncentracije fenolnih jedinjenja iznad praga osetljivosti ukusa (Vanbeneden i sar., 2007).

Do dekarboksilacije ferulne kiseline može doći usled visokih temperatura tokom proizvodnje piva tj. tokom kuvanja sladovine sa hmeljom, zadržavanja u virulpulu i pasterizacije ili dejstvom enzima kvasca gornjeg vrenja dekarboksilaze fenilakrilne

kiseline (Pad1 enzim) tokom fermentacije (Vanbeneden i sar., 2008b). Iako fenolne kiseline ne utiču na aromu piva poželjne su zbog svoje antioksidativne aktivnosti (Pascoe i sar., 2003) i samim tim i povećanja stabilnosti piva.

Ovo jedinjenje se smatra nepoželjnim kada je prisutno u povećanom sadržaju u pivima donjeg vrenja pils tipa. S druge strane doprinosi ukusu karakteristične arome belgijskih pšeničnih piva (proizvedenih od nesladovane pšenice), nemačkih pšeničnih piva (proizvedenih od sladovane pšenice) i „Rauch“ piva. Pored toga, u mnogim svetlim pivima gornjeg vrenja i specijalnim tamnim pivima fenolni ukus je esencijalan za opšti ukus (Vanbeneden i sar., 2008). Sadržaj isparljivog fenolnog jedinjenja 4-vinilsiringola se povišava tokom starenja piva lager tipa i verovatno nastaje kiselom hidrolizom glikozida ili dekarboksilacijom sinapinske kiseline (Callemien i sar., 2006).

Vanbeneden i saradnici (2008a) su određivali sadržaje slobodnih i vezanih hidroksi derivata cimetine kiseline i isparljivih fenola u različitim tipovima piva (Tabela 2.29). U pils pivima određeni su niski sadržaji 4-vinilfenola (0,036-0,065 mg/l) i 4-vinilgvajakola (0,087-0,175 mg/l). Pošto su ova piva dobijena pomoću kvasaca donjeg vrenja koji ne poseduju aktivnost dekarboksilaze fenilakrilne kiseline (Pad1 enzim), isparljivi fenoli su nastali u ovim pivima samo termičkom dekarboksilacijom tokom tretmana na visokim temperaturama u procesu proizvodnje (kuvanje sladovine i pasterizacija). U pivima pils tipa samo 3,8-5,8% *p*-kumarinske kiseline i 6,9-9,6% ferulne kiseline podleže dekarboksilaciji. Piva gornjeg vrenja, kao pšenična piva i specijalna svetla piva sadržala su značajno više 4-vinilfenola i 4-vinilgvajakola nego piva donjeg vrenja pils tipa. Kod specijalnih svetlih piva 20,3-91,1% *p*-kumarinske i 23,2-98,6% ferulne kiseline je dekarboksilacijom prevedeno u odgovarajuće isparljive fenole. Specijalna svetla piva sadrže značajno više isparljivih fenola nego specijalna tamna piva. Ovo se može objasniti inhibicijom dekarboksilacije u tamnim sladovinama tokom fermentacije ili zbog inhibicije aktivnosti cinamoil esteraze, tokom proizvodnje, jedinjenjima prisutnim u tamnim sladovima.

**Tabela 2.29. Sadržaji slobodnih hidroksi derivata cimetine kiseline i isparljivih fenola u komercijalnim pivima (Vanbeneden i sar., 2008a)**

Pivo	$\bar{x} \pm SD^a$ (min-max) <sup>b</sup> (mg/l)				
	<i>p</i> -Kumarinska	Ferulna	Sinapinska	4-vinilfenol	4-vinilgvajakol
Pils (n=5) <sup>c</sup>	1,34±0,501 (0,798-1,94)	2,00±0,450 (1,32-2,43)	0,319±0,082 (0,208-0,426)	0,044±0,012 (0,036-0,065)	0,138±0,037 (0,087-0,175)
Pivo gornjeg vrenja (n=5)	0,924±0,169 (0,730-1,04)	1,16±0,804 (0,408-2,36)	0,275±0,077 (0,141-0,331)	0,308±0,290 (0,041-0,705)	0,492±0,482 (0,065-1,08)
Belgijsko pšenično (n=14)	0,906±0,431 (0,348-1,67)	1,47±0,428 (0,897-2,02)	0,393±0,085 (0,283-0,516)	0,261±0,139 (0,055-0,488)	0,733±0,391 (0,136-1,52)
Nemačko pšenično (n=9)	0,826±0,418 (0,204-1,34)	0,814±0,442 (0,354-1,77)	0,371±0,150 (0,133-0,602)	0,374±0,217 (0,046-0,846)	1,11±0,570 (0,165-1,96)
Specijalno svetlo (n=16)	1,06±0,989 (0,129-2,77)	1,25±1,06 (0,071-3,27)	0,370±0,180 (0,155-0,775)	0,556±0,220 (0,206-0,963)	1,38±1,03 (0,470-3,76)
Specijalno tamno (n=8)	0,415±0,163 (0,199-0,597)	1,07±1,01 (1,097-3,20)	0,375±0,243 (0,092-0,879)	0,207±0,207 (0,047-0,663)	0,514±0,427 (0,053-1,12)
UKUPNO (n=58)	0,903±0,597 (0,199-2,770)	1,27±0,808 (0,071-3,27)	0,364±0,152 (0,092-0,879)	0,339±0,247 (0,047-0,963)	0,870±0,758 (0,053-3,76)

<sup>a</sup>  $\bar{x} \pm SD$ : Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija

<sup>b</sup> (min-max): Opseg sadržaja

<sup>c</sup> n: Broj analiziranih uzoraka



U Tabeli 2.30 su prikazani sadržaji ukupnih slobodnih i vezanih hidroksi derivata cimetne kiseline u komercijalnim pivima. Ukupni hidroksi derivati cimetne kiseline u pivu su jednaki zbiru slobodnih i estarski vezanih kiselina. Sadržaj vezanih kiselina izračunat je kao razlika ukupnih i slobodnih hidroksi derivata cimetne kiseline. Za svako pivo sadržaj slobodne ferulne i *p*-kumarinske kiseline je kompenzovan za sadržaj koji je preveden do 4-vinilgvajakola i 4-vinilfenola. Iz podataka datih u Tabeli 2.30 može se videti da su hidroksi derivati cimetne kiseline prisutni u pivu u vezanom obliku (*p*-kumarinska do 76%, ferulna do 95% i sinapinska do 97%) (Vanbeneden i sar., 2008a).

**Tabela 2.30. Sadržaji ukupnih slobodnih (kompenzovane za 4-vinilfenol i 4-vinilgvajakol) i vezanih hidroksi derivata cimetne kiseline u komercijalnim pivima (Vanbeneden i sar., 2008a)**

Pivo	$\bar{x} \pm SD^a$ (min-max) <sup>b</sup> (mg/l)					
	Ukupni slobodni hidroksi derivati cimetne kiseline			Vezani hidroksi derivati cimetne kiseline		
	<i>p</i> -Kumarinska +4-vinilfenol	Ferulna +4-vinilgvajakol	Sinapinska	<i>p</i> -Kumarinska	Ferulna	Sinapinska
Pils (n=5) <sup>c</sup>	1,40±0,517 (0,847-2,03)	2,18±0,490 (1,43-2,61)	0,319±0,082 (0,208-0,426)	0,585±0,480 (0,155-1,27)	10,1±2,26 (7,57-13,8)	1,96±0,333 (1,58-2,44)
Pivo gornjeg vrenja (n=5)	1,33±0,329 (1,05-1,69)	1,79±0,481 (1,37-2,60)	0,275±0,077 (0,141-0,331)	1,04±0,160 (0,926-1,15)	11,7±1,28 (9,77-13,11)	2,11±0,111 (1,94-2,19)
Belgijsko pšenično (n=14)	1,27±0,378 (0,903-2,06)	2,42±0,476 (1,54-3,01)	0,393±0,085 (0,283-0,516)	1,83±1,10 (0,687-3,43)	10,2±1,66 (7,25-13,0)	3,68±0,950 (1,90-5,67)
Nemčko pšenično (n=9)	1,359±0,409 (0,681-1,974)	2,24±0,667 (1,40-3,30)	0,371±0,150 (0,133-0,602)	2,37±0,977 (1,26-4,11)	9,80±0,852 (8,29-11,1)	3,82±0,781 (3,04-5,38)
Specijalno svetlo (n=16)	1,99±1,06 (1,11-3,48)	2,77±1,22 (1,24-4,85)	0,370±0,180 (0,155-0,775)	1,12±0,230 (0,907-1,48)	13,6±2,21 (9,48-16,3)	2,94±1,01 (1,59-4,61)
Specijalno tamno (n=8)	0,791±0,442 (0,421-1,43)	1,82±0,945 (0,610-3,27)	0,375±0,243 (0,092-0,879)	1,70±0,469 (1,00-2,01)	12,0±4,44 (9,07-20,8)	2,61±1,43 (1,62-5,43)
UKUPNO (n=58)	1,39±0,638 (0,421-3,48)	2,33±0,858 (0,610-4,85)	0,364±0,152 (0,092-0,879)	1,62±0,956 (0,155-4,11)	11,4±2,62 (7,25-20,8)	3,08±1,10 (1,58-5,67)

<sup>a</sup>  $\bar{x} \pm SD$ : Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija

<sup>b</sup> (min-max): Opseg sadržaja

<sup>c</sup> n: Broj analiziranih uzoraka

Isparljiva fenolna jedinjenja nastaju uglavnom enzimskom dekarboksilacijom tokom fermentacije pa je izbor odgovarajućeg soja kvasca važan korak u kontrolisanju finalnog sadržaja fenolnih jedinjenja u pivu (Vanbeneden i sar., 2008). Međutim, primenom istog soja kvasca i parametara fermentacije ipak dolazi do velikih razlika u sadržaju isparljivih fenola zavisno od šarže. Ovo dokazuje potrebu za kontrolom nastajanja prekursora koji se oslobađaju tokom komljenja. Važan parametar je izbor odgovarajuće sorte ječma tj. slada. Međutim, primena jedne sorte slada može dovesti do različitih sadržaja isparljivih fenola u pivu, usled različitih uslova i parametara tokom komljenja (Vanbeneden i sar., 2008b).

Ispitivanjem ukusa koji se menja tokom starenja piva utvrđeno je da je povezano sa proizvodima Maillard-ove reakcije, nastajanjem linearnih aldehida i estara, degradacijom estara, nastajanjem acetala i etara i degradacijom gorkih komponenata hmelja (Vanbeneden i sar., 2008c).

Antioksidativna aktivnost proizvedenog piva zavisi uglavnom od jednostavnih i polimerizovanih polifenola i melanoidina. Procesi koji se dešavaju tokom skladištenja piva su izuzetno složeni. Mnogi od njih imaju uticaja na antioksidante prisutne u pivu, iako intenzitet delovanja ovih efekata zavisi od sastava piva i parametara skladištenja. Antioksidanti „brzog“ delovanja su važni tokom procesa proizvodnje piva dok su antioksidanti „sporog“ delovanja mnogo važniji tokom skladištenja piva. Očigledan uticaj kiseonika koji se nalazi u slobodnom prostoru iznad piva u ambalaži će se ogledati u

smanjenju antioksidativne aktivnosti piva i nastajanju nepoželjnih ukusa piva uzrokovanih starenjem (Chandra, 2002).

Stabilnost ukusa piva je jedna od najvažnijih tema pivarstva tokom poslednje decenije. Opšte je prihvaćeno da je sadržaj kiseonika jedan od glavnih razloga za nestabilnost ukusa flaširanog piva i oksidaciju tokom proizvodnje piva. Kao posledica oksidacije nastaju nepoželjni ukusi piva, dolazi do pojave mutnoće, menjaju se gorčina i trpkost, a nekad i boja piva (Stephenson i sar., 2003; Zhao i sar., 2006).

Oksido-redukciono stanje gotovog piva ima vrlo važnu ulogu u stabilnosti ukusa piva. Ovo zavisi od sadržaja različitih komponenti piva koje su pod direktnim uticajem redoks reakcija i antioksidativnog potencijala tokom procesa sladovanja i proizvodnje piva. Antioksidativni potencijal gotovog piva zavisi od polifenola, melanoidina i redukujućih šećera. Kiseonik prisutan u ambalaži se troši tokom skladištenja i pogoršava ukus piva. Ukoliko je sadržaj kiseonika viši, pogoršanje ukusa je veće. Antioksidativni potencijal skladištenog piva zavisi od ravnoteže između raznih procesa i reakcija koje se dešavaju tokom skladištenja. Međutim, tokom vremena kiseonik se troši u reakcijama sa antioksidantima i antioksidativna aktivnost se smanjuje. Ukoliko je antioksidativni potencijal piva na punjenju viši, a uticaj prooksidanta niži, proizvedeno pivo će biti stabilnijeg ukusa (Chandra i sar., 2000)

Poznato je da sadržaj kiseonika u finalnom pakovanju piva mora biti što niži (Bamforth, 2006). Zahvaljujući modernoj opremi za punjenje piva sadržaj kiseonika u flaširanom pivu može biti samo 0,1 mg/l, ali se negativne promene ukusa ipak dešavaju. Zbog toga se velika pažnja mora posvetiti zaštiti i razvoju endogenog antioksidativnog potencijala tokom proizvodnje slada i piva (Uchida i Ono, 2000; Pascoe i sar., 2003). Polifenolna jedinjenja, proizvodi Maillard-ove reakcije i sulfiti se smatraju za tri glavna antioksidanta piva. Polifenolna jedinjenja su od naročitog interesa za pivare zato što igraju glavnu ulogu u odlaganju, smanjenju ili sprečavanju oksidacionih procesa u proizvodnji piva (Zhao i sar., 2006).

Antioksidanti, kao što su sulfiti, formaldehid i askorbati nekada su se dodavali u toku proizvodnje piva da bi unapredili stabilnost ukusa piva. Međutim, sumnja se u efikasnost ovih jedinjenja. Pored toga, teži se smanjenju upotrebe aditiva u proizvodnji piva zbog strožijih zakona i zahteva potrošača. Kao rezultat ovih nastojanja, pažnja je usmerena na endogene antioksidante piva i sirovine za proizvodnju piva tj. ječam i hmelj. Zbog toga je optimizacija prirodnih antioksidanta u pivskom ječmu i odabir sorti ječma sa najvišom antiradikalnom aktivnošću presudno za proizvodnju piva sa visokom antioksidativnom aktivnošću (Zhao i sar., 2008).

Nastajanje nepoželjnog oksidisanog ukusa piva je povezano sa nastajanjem isparljivih karbonilnih jedinjenja. Od ovih, *trans*-2-nonenal se smatra jednim od glavnih uzročnika ukusa na „staro“ pivo. Različiti mehanizmi nastajanja *trans*-2-nonenala iz različitih prekursora su predloženi: Štreker-ova razgradnja aminokiselina, oksidacija viših alkohola uz učešće melanoidina, oksidativna razgradnja izohumulona, aldolna kondenzacija aldehida male molekulske mase i enzimski ili neenzimski oksidacija masnih kiselina. Sadržaj *trans*-2-nonenala se povećava oko 3-9 puta tokom skladištenja na 20°C u trajanju do 6 meseci (Callemien i sar., 2006). Poznato je da izlaganje piva svetlosti ima negativan uticaj na ukus piva. Opšte je prihvaćeno da je enzimski degradacija lipida tokom sladovanja i komljenja, praćena autoksidacijom intermedijera u varionici i pri finalnom pakovanju, glavni mehanizam oksidacije piva (Chandra i sar., 2000; Keukeleire, 2000).

## 2.11. Potencijalne promene ukusa tokom starenja piva

Većina jedinjenja za koje se smatra da su značajne za starenje piva, naročito za ukus na „karton“ imaju karbonilnu grupu. Od svih karbonilnih jedinjenja *trans*-2-nonenal je najviše istraživani kao uzročnik ukusa na „karton“, ali ovo jedinjenje nije jedini uzročnik. Nonenal je samo jedno iz grupe jedinjenja odgovornih za dobijanje ukusa na „staro“ pivo. Sadržaj ovih jedinjenja je veoma nizak kada se uporedi sa sadržajima njihovih prekursora. Međutim, nonenal čiji je prag osetljivosti ukusa oko 0,1 µg/l će odmah biti primećen u ukusu piva (Bamforth, 2006). Pored *trans*-2-nonenala brojna karbonilna jedinjenja imaju nizak prag osetljivosti ukusa i mogu uticati negativno na stabilnost ukusa piva dajući mu gorak, oksidisani ukus na aldehide. To su: *cis*-4-heptanal (0,3-0,5µg/l), *trans*-2-oktenal (0,3-0,5µg/l), *n*-dekanal (5-7µg/l), *trans*-2-dekanal (1µg/l), 9-undekanal (1,5µg/l), 10-undekanal (3,5µg/l), *n*-dodekanal (4µg/l), *n*-undekanal (3-4µg/l). Pored ovih, sadržaj drugih karbonilnih jedinjenja kao što su furfural (150 mg/l), 2-metilpropanal (1 mg/l), 2-metilbutanal (1,5 mg/l), 3-metilbutanal (0,6 mg/l), fenilacetaldehid (1,6 mg/l), propanal (2,5 mg/l), heksanal (0,3-0,4 mg/l) i heptanal (0,05-0,1 mg/l) raste tokom skladištenja piva (Walters i sar., 1997).

### Metabolički putevi sinteze nastajanja nepoželjnih jedinjenja za ukus piva

Sledeće reakcije mogu dovesti do stvaranja karbonilnih jedinjenja nepoželjenih za ukus i miris piva (Wackerbauer i Hardt, 1997; Bamforth, 2006):

- ❖ Oksidacija viših alkohola
- ❖ Oksidacija izohumulona i *izo*- $\alpha$ -kiselina
- ❖ Maillard-ova reakcija i Štreker-ova razgradnja aminokiselina
- ❖ Oksidacija nezasićenih masnih kiselina
- ❖ Aldolna kondenzacija aldehida malih molekulskih masa

### Oksidacija viših alkohola katalizovana melanoidinima

Alkoholi u pivu mogu biti oksidisani do aldehida uz pomoć melanoidina kao oksidacionog sredstva. Molekularni kiseonik ne doprinosi trenutno ovoj reakciji, ali je može ubrzati. Reakciju inhibiraju izohumuloni i polifenoli (Wackerbauer i Hardt, 1997).

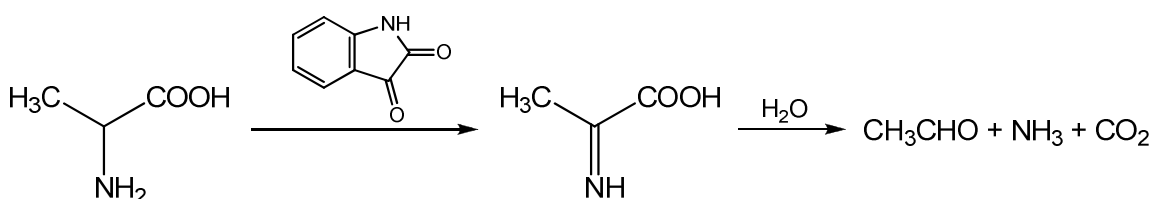
### Oksidacija izohumulona i *izo*- $\alpha$ -kiselina

Kiseonik u gotovom pivu ima jasan uticaj na oksidaciju izohumulona. Oksidacija izohumulona ne počinje u pivu već tokom kuvanja sladovine sa hmeljom. Viši sadržaji aldehida se mogu detekovati u starom hmelju. Uticaj karbonilnih jedinjenja nastalih tokom kuvanja sladovine sa hmeljom ili poreklom iz starog hmelja je mali jer se sadržaj isparljivih jedinjenja smanjuje isparavanjem tokom ključanja sladovine. S druge strane, pivski kvasac ima vrlo izraženu redukcionu moć i može karbonilna jedinjenja redukovati u odgovarajuće alkohole (Wackerbauer i Hardt, 1997).

U sladovini se retko oksidišu komponente ukusa, upućujući na moguću ulogu *izo*- $\alpha$ -kiselina kao prekursora ukusa starog piva. Redukovani bočni lanci *izo*- $\alpha$ -kiselina, koji mogu da posluže kao zaštita piva od svetlosti, ne razlažu se do karbonilnih jedinjenja nepoželjnog ukusa i kao rezultat piva hmeljena sa ovakvim sredstvima su možda otpornija na oksidaciju (Bamforth, 2006).

### Maillard-va reakcija i Štreker-ova razgradnja amino kiselina

U Maillard-ovoj reakciji nastaju  $\alpha$ -dikarbonilna jedinjenja koja mogu da reaguju sa amino kiselinama što predstavlja Štreker-ovu razgradnju (Slika 2.7). Amino kiseline se prevode u aldehide sa jednim ugljenikovim atomom manje. Polifenoli mogu igrati ulogu katalizatora (Bamforth, 2006). Maillard-ova reakcija i Štreker-ova razgradnja odvijaju se tokom sušenja slada, a i tokom ključanja sladovine. Porast sadržaja Štreker-ovih aldehida je takođe uočen tokom pasterizacije piva. Aldehidi koji nastaju u Maillard-ovoj reakciji i Štreker-ovoj razgradnji nisu među najvažnijim nepoželjnim karbonilnim jedinjenjima ukusa piva, iako se ukus na hleb koji nastaje tokom pasterizacije piva pripisuje Štreker-ovoj razgradnji (Wackerbauer i Hardt, 1997).



Slika 2.7. Štreker razgradnja amino kiselina (Bamforth, 2006)

### Oksidacija nezasićenih masnih kiselina

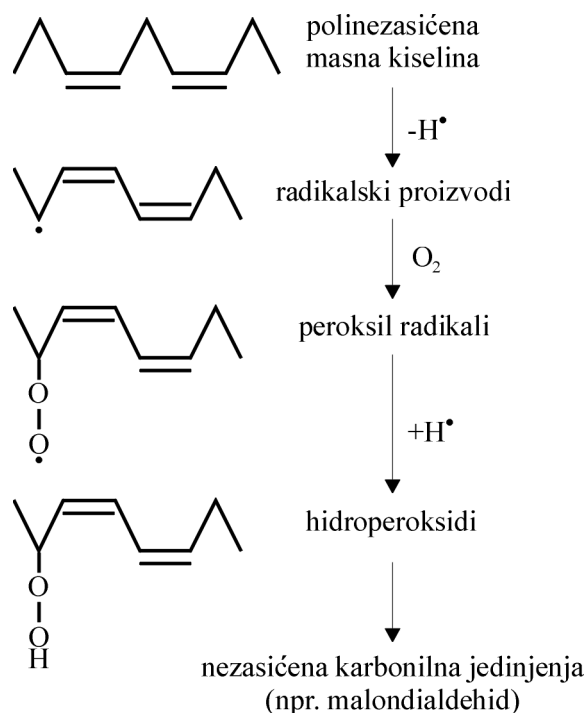
Oksidativna razgradnja lipida koja vodi do rancidnosti je dobro poznat put u starenju hrane. Može se odigrati enzimskom ili neenzimskom oksidacijom.

*Oksidacija nezasićenih masnih kiselina katalizovana lipoksigenazom* – U klici ječmenog zrna nalaze se dve lipoksigenaze – LOX-1 i LOX-2. Oba enzima su izuzetno osetljiva na povišenu temperaturu i njihova aktivnost se gubi tokom većine režima sušenja slada, s tim da je LOX-1 malo otpornija. Oba enzima su sposobna da deluju na polinezasićene masne kiseline (masne kiseline sa dve ili više dvostrukih veza među atomima ugljenika). Ustvari, jedini značajni supstrati poreklom iz ječmenog slada su linolna i linoleinska kiselina koje imaju dve, odnosno tri dvostruke veze, ali je linoleinska važnija (Bamforth, 2006). Aktivnost lipoksigenaza se izuzetno povećava tokom klijanja i predušenja dok se inaktivira tokom sušenja slada (Wackerbauer i Hardt, 1997).

Lipoksigenaze prevode linoleinsku kiselinu u hidroperoksi kiseline. Lipidna oksidacija se odvija najvećim delom na čvrstim česticama komine, a ne u rastvoru. Ovaj enzim je značajan samo pri nižim temperaturama komljenja (na primer 52°C). Aktivnost ovog enzima je manja pri nižim pH vrednostima (5,0) (Bamforth, 2006).

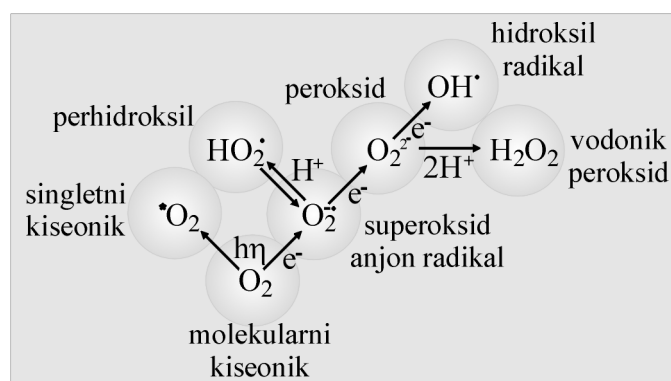
### *Neenzimska oksidacija nezasićenih masnih kiselina*

Neenzimski put dovodi do nastajanja hidroperoksida isto kao i enzimski (Slika 2.8) (Bamforth, 2006). Iz linolne kiselina mogu nastati tri hidroperoksida, dok iz linoleinske šest (de Man, 1999).



**Slika 2.8. Shematski prikaz oksidacije polinezasićenih masnih kiselina (Bamforth, 2006)**

Za započinjanje ovog procesa autooksidacije potrebne su visoko reaktivne vrste sposobne da privuku vodonik sa atoma ugljenika koji je vezan za drugi atom ugljenika dvostrukom vezom. Nastali peroksil radikali mogu da privuku vodonikove atome pri čemu nastaju hidroperoksidi. Međutim, samo ograničen broj radikalskih vrsta ima ovu sposobnost. Dve od njih su reaktivne vrste kiseonika: superoksid anjon radikal i hidroksil radikal (Slika 2.9) (Bamforth, 2006).

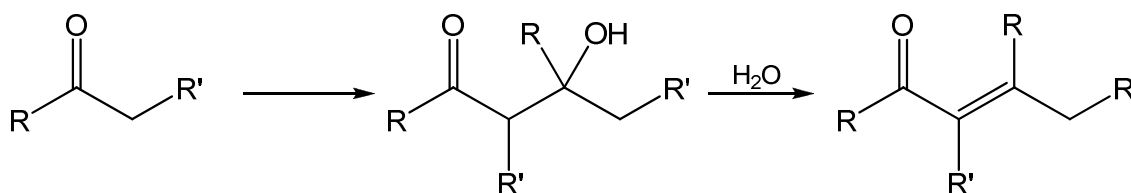


**Slika 2.9. Aktivacija kiseonika. Elektron mogu predati joni metala kao što su gvožđe i bakar.  $h\nu$  = svetlost (Bamforth, 2006)**

### Aldolna kondenzacija

Reakcija aldolne kondenzacije (Slika 2.10) se odvija između aldehida ili ketona, tokom koje *trans*-2-nonenal može nastati u reakciji između aldehida i heptanala. Druga karbonilna jedinjenja mogu nastati na ovaj način reakcijom sa učešćem imino kiseline

prolina (prisutne u pivu) kao katalizatora. Moguće je da aldehidi sa dužim lancem nastaju na ovaj način iz proizvoda Štreker razgradnje, oksidacije viših alkohola ili razlaganja gorkih materija (Bamforth, 2006).



**Slika 2.10. Aldolna kondenzacija (Bamforth, 2006)**

Smatra se da slobodni kiseonikovi radikali nastaju iz molekularnog kiseonika u gotovom pivu tokom pasterizacije i iniciraju radikalske reakcije i ubrzavaju starenje piva. Ovo sugerise da se pogoršanje ukusa piva tokom pasterizacije zasniva na istim reakcijama koje se odvijaju tokom skladištenja piva i te reakcije se intenziviraju porastom stepena pasterizacije (Kaneda i sar., 1994).

## 2.12. Nastajanje mutnoće piva

Postoje tri principijelna puta pogoršanja kvaliteta piva tokom vremena: starenje tj. promena ukusa piva, nastajanje mutnoće i infekcija. Ukus piva se može promeniti na različite načine. Najvažniji je oksidacijom. Poznato je i prihvaćeno da se reakcije oksidacije mogu odigrati tokom celog procesa proizvodnje piva i da se ukus piva može narušiti mnogo pre punjenja u ambalažu. Mutnoća piva može nastati iz različitih komponenata, ali principijelno nastaje unakrsnim povezivanjem određenih proteina i tanina (ili polifenola) (Bamforth, 2003).

Polifenoli u pivu mogu doprineti nastajanju mutnoće (Siebert i sar., 1996; Siebert, 1999; Siebert i Lynn, 2006) koja može sadržati i do 55% polifenola (Tabela 2.31).

**Tabela 2.31. Ukupni hemijski sastav mutnoće piva (%) (Shadidi i Nazck, 2004)**

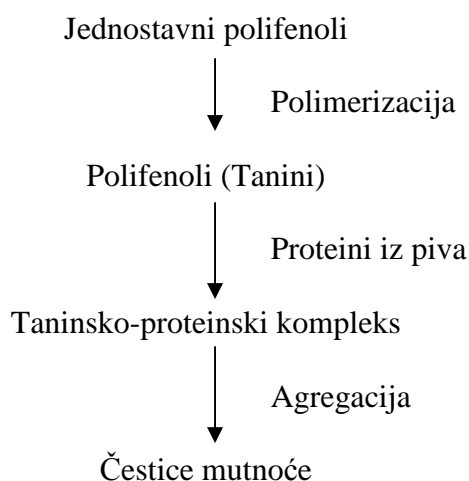
Sadržaj proteina	Sadržaj polifenola	Sadržaj ugljenih hidrata	Sadržaj pepela
40	45	2-4	1-3
58-77	17-55	2-12,4	2-14
40-76	17-55	3-13	-
15-45	1-3	50-80	-

Prema Siebert i Lynn (2001) polifenoli treba da imaju bar dva mesta za vezivanje da bi precipitirali u obliku mutnoće piva, od čega treba da imaju bar dve hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu. Do najvećeg замуćenja dolazi kada je broj mesta za vezivanje polifenola i proteina približno isti. Jedanaest fenolnih kiselina i dva flavonola (kvercetin i kempferol), kao i (+)-katehin i (-)-epikatehin su identifikovani u etarskim ekstraktima kiselo i alkalno tretirane mutnoće. Najčešći tipovi mutnoće piva su mutnoća koja nastaje pri hlađenju i trajna mutnoća. Mutnoća koja nastaje prilikom hlađenja se definiše kao mutnoća koja nastaje na 0°C i nestaje usled zagrevanja piva – hladna (reverzibilna) mutnoća. Mutnoća koja ostaje u pivu na ili iznad 20°C se zove trajna

mutnoća (Shahidi i Nazck, 2004). Glavne komponente hladne i trajne mutnoće su: polipeptidi, polifenoli i ugljeni hidrati sa minimalnom količinom metala u neorganskom pepelu (Dadic i Belleau, 1980).

Vezivanje polifenola za proteine raste sa porastom broja hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu, naročito ako su vicinalni, i sa porastom molekulske mase i složenosti jedinjenja. Jednostavni polifenoli retko se vezuju sa proteinima dok se jedinjenja sa dve ili tri hidroksilne grupe na aromatičnom prstenu vezuju u većem stepenu, naročito kada su hidroksilne grupe blizu (Siebert i Lynn, 2006). Proteini koji stvaraju mutnoću poreklom su iz hordeina (prolamina ječma). Polifenolna jedinjenja koja stvaraju mutnoću su proantocijanidini (dimeri i trimeri katehina, epikatehina i galokatehina) (Siebert i sar., 1996). Sadržaj proantocijanidina u pivu je povezan sa brzinom nastajanja mutnoće. Pokazano je da pivo proizvedeno iz ječma bez antocijanidina nije sklono stvaranju mutnoće i bez stabilizacije piva, pod uslovom da se hmeljenjem ne povisi sadržaj polifenola (Siebert i sar., 1996a).

Zamućenje koje nastaje pri hlađenju verovatno nastaje usled slabog intermolekularnog vezivanja, dok se trajna mutnoća stvara nakon nastajanja određenog broja kovaletnih veza između čestica mutnoće. Smatra se da se čestice mutnoće sastoje od jedinica molekulske mase 10000 do 100000 Da. Većina polisaharida i polipeptida u pivu ima stalnu veličinu, dok je polifenoli dostižu kroz proces polimerizacije (Slika 2.11). Oko 90% polifenola nađenih u „starom“ pivu imaju molekularnu masu 500 do 10000 Da, dok se fenoli molekulske mase preko 10000 Da mogu naći samo u tragovima. Zbog njihovog hemijskog karaktera i reaktivnosti, polifenoli mogu podleći oksidativnoj i kiselo katalizovanoj polimerizaciji u pivu tokom skladištenja. Od polifenola prisutnih u pivu katehini u slobodnom obliku su najosetljiviji na oksidativne promene tokom incijalnih stadijuma starenja. Katalizovana polimerizacija polifenola se odigrava u kasnijim stadijumima skladištenja piva, kada skoro i nema više vazduha u prostoru iznad površine piva. Nastajanje kompleksa polimerizovanih polifenola sa polipeptidima, prvo preko vodoničnih veza, stvara prekomernu hidrofobnost. Nerastvorljivost ovog kompleksa i usled toga nastajanje mutnoće su uglavnom određeni prirodom i distribucijom polifenola u kompleksu (Shahidi i Nazck, 2004).



**Slika 2.11. Učešće polifenola i tanina u nastajanju mutnoće u pivu (Shahidi i Nazck, 2004)**

Količina nastale mutnoće zavisi od sadržaja proteina i polifenola i od njihovog odnosa (Mikyška i sar., 2002). Ukoliko je sadržaj proteina koji učestvuju u stvaranju mutnoće konstantan, a sadržaj polifenola raste, mutnoća prvo raste, dostiže maksimum i nakon toga opada. Slično je i ako je sadržaj polifenola koji učestvuju u stvaranju mutnoće konstantan, a sadržaj proteina raste, mutnoća prvo raste, dostiže maksimum i nakon toga opada. Pored navedenog i pH piva utiče na nastajanje mutnoće tj. pri porastu pH vrednosti od 4 do 4,5 mutnoća raste i dostiže maksimum na pH 5 (Siebert i Lynn, 2001).

Monomerna fenolna jedinjenja se takođe nalaze u mutnoći piva, međutim o njihovoj ulozi u nastajanju mutnoće se još uvek ne zna dovoljno zato što su uglavnom bili identifikovani nakon alkalne hidrolize mutnoće ili u poliamidnim adsorbatima piva. Brzina nastajanja mutnoće zavisi od stepena polifenolne polimerizacije i raste od monomernih do dimernih, trimernih i konačno polimernih jedinica katehina. Struktura polifenola igra ulogu u nastajanju mutnoće zato što procijanidin-B3 (katehin-katehin) ubrzava nastajanje mutnoće brže nego procijanidin-B4 (katehin-epikatehin) (Shahidi i Nazck, 2004). Antocijanidini (procijanidin, prodelfinidin) su glavne polifenolne komponente mutnoće. Katehin, metoksilovani fenoli i fenolne kiseline (ferulna, sinapinska, vanilinska, siringinska, galna, protokatehinska i kafena) su takođe identifikovani u mutnoći piva. Hladna mutnoća sadrži više jednostavnih polifenola, dok trajna mutnoća sadrži više kondenzovanih tanina (Dadic i Belleau, 1980).

Dadic i Belleau (1980) su ispitali sastav hladne i trajne mutnoće (Tabela 2.32). Mutnoće 1 i 2 su hladne, a 3 i 4 su trajne mutnoće. Sveže pivo sadrži oko 10 mg/l fenolnih kiselina i daje oko 9 mg/l mutnoće. Mutnoća 1 je sadržala samo oko 7 µg fenolnih kiselina na 9 mg. To znači da je manje od 0,1% fenolnih kiselina prisutnih u pivu prešlo u mutnoću. Pivo držano na 60°C u trajanju od 72 sata („forsirano“ pivo) imalo je 17 puta više mutnoće (mutnoća 4) od svežih piva (mutnoće 1 i 2). Međutim, pivo skladišteno 2-4 nedelje na 4°C sadržalo je samo malo više mutnoće (mutnoća 3) od svežeg piva. Udeo ukupnih polifenolnih monomera koji se nalaze u mutnoći 3 je samo malo viši od onih koji prelaze u mutnoću svežih piva (mutnoća 1 i 2). Međutim, udeo ukupnih polifenolnih monomera koji se nalaze u mutnoći forsiranog piva (mutnoća 4) je mnogo veći od udela koji prelazi u mutnoću svežih piva.

Stabilizacijom piva sa PVPP uklanjaju se mnogi antioksidanti i time se utiče na ukus piva i na sadržaj prirodnih antioksidanata (Papp i sar., 2001). Stabilizacija piva tretmanom sa PVPP je uvek praćena smanjenjem ukupnih polifenola, flavonola, fenolnih kiselina, glikozida flavonola, katehina, proantocijanidina i kompleksa polifenola i proteina (McMurrough i sar., 1995). Delimično uklanjanje polifenolnih frakcija tretmanom piva sa PVPP snižava redukcionu sposobnost od 9 do 38%, ali ne čini pivo osetljivijim prema oksidativnim oštećenjima (Vanderhaegen i sar., 2006). Ferulna kiselina povišava stabilnost piva pri sadržaju od 2 do 5 mg/l, ali pri višim sadržajima deluje negativno na stabilnost piva. Ovo upućuje na mogućnost da se ferulna kiselina u pivu vezuje za mesta vezivanja proteina koji stvaraju mutnoći i na taj način sprečava reakciju sa dimerima i trimerima katehina (Papp i sar., 2001).

Whittle i saradnici (1999) su određivali uticaj dodatka PVPP (polivinilpolipirolidon) u pivo na sadržaj polifenola piva. PVPP je dodavan u količini od 20 g/l. Nakon dodatka PVPP-a u pivo većina ispitivanih fenolnih kiselina (vanilinska, kafena, ferulna, sinapinska) je delimično uklonjena iz piva sa PVPP, dok su galna i siringinska uklonjene u potpunosti.



Tabela 2.32. Polifenolni monomeri u hladnim i trajnim mutnoćama (Dadic i Belleau, 1980)

Jedinjenje	Sadržaj u mutnoći ( $\mu\text{g}/100\mu\text{g} \cdot 10^3$ )			
	1	2	3	4
Galna kiselina	5,3	5,9	3,5	7,5
Protokatehinska kiselina	6,0	5,0	5,4	17,8
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	18,5	13,4	43,0	22,5
D-(+)-Katehin	19,6	17,1	32,6	72,5
Vanilinska kiselina	5,7	5,6	5,3	18,2
Kafena kiselina	3,6	3,7	3,6	12,5
Hlorogenska kiselina	2,1	2,8	5,1	14,7
Siringinska kiselina	7,1	6,7	12,9	22,0
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	4,6	4,6	7,3	20,0
Ferulna kiselina	15,3	15,0	22,9	40,5
<i>trans</i> - <i>o</i> -Kumarinska kiselina	2,5	2,8	2,5	4,7
Sinapinska kiselina	6,4	7,5	7,3	19,5
L-(-)-epikatehin	17,8	17,7	19,0	43,7
Kvercetin	8,2	8,7	6,4	5,7
Kempferol	10,7	9,0	7,1	9,0
<b>Ukupno</b>	<b>133,4</b>	<b>123,5</b>	<b>183,9</b>	<b>330,0</b>
<b>Procenti</b>	<b>0,13</b>	<b>0,12</b>	<b>0,18</b>	<b>0,33</b>

### 2.13. Pregled metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti

Metoda po Folin-Ciocalteu se vrlo često primenjuje za određivanje sadržaja ukupnih fenola u analizi hrane. Polifenoli reaguju sa Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu se reagens redukuje uzrokujući promenu boje (nastajanja plave boje) koja se određuje spektrofotometrijski (Siebert i Lynn, 2006). Ova metoda je primenjena za određivanje sadržaja ukupnih fenola u ječmu, sladu i tokom sladovanja (Madhujith i sar., 2006; Madhujith i Shahidi, 2006; Lu i sar., 2007; Zhao i sar., 2008; Dvořáková i sar., 2008) i u voćnim sokovima i vinu (Tabart i sar., 2009).

Većina analitičkih procedura za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, zelenom sladu, sladu, hmelju, sladovini i pivu je zasnovana na HPLC (high-performance liquid chromatography) tehnici (McMurrough i sar., 1984; Maillard i Berset, 1995; Yu i sar., 2001; Pascoe i sar., 2003; Kellner i sar., 2003; Callemien i sar., 2003; García i sar., 2004; Inns i sar., 2005; Jandera et al., 2005; Holtekjølen i sar., 2006; Zhao i sar., 2006; Vanbeneden i sar., 2006; Dvořáková i sar., 2008; Kvasnička i sar., 2008) sa različitim vidovima detekcije (UV, ECD, MS). Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) je primenjena za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u uljanoj repici (Krygier i sar., 1982), pšenici (Wu i sar., 1999; Wu i sar., 2000), aromatičnim biljkama (Fiamegos i sar., 2004; Proestos i sar., 2006), soku od brusnice (Zuo i sar., 2002) i maslinovom ulju (Saitta i sar., 2002). U pregledanoj literaturi ne postoje podaci o primeni GC-MS metode za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, sladu i pivu. Analiza fenolnih kiselina u gasnoj fazi zahteva dodatnu pripremu uzorka-derivatizaciju. Procedura derivatizacije, koja se najčešće koristi, je siliranje (Robbins, 2003). Siliranje je idealna procedura za analizu neisparljivih i termolabilnih jedinjenja metodom gasne hromatografije. U poređenju sa jedinjenjima iz kojih su nastali, trimetilsilil derivati su više isparljivi, manje polarni i više termotolerantni (Proestos i sar., 2003). Zbog složenosti sastava uzorka i činjenice da retenciono vreme zavisi od sastava uzorka i uslova rada hromatografa u cilju sigurnije detekcije u ovom radu je korišćen gasni hromatograf sa maseno selektivnim detektorom. Ovim uređajem dobija se pored retencionog vremena i maseni spektar jedinjenja koja se ispituju. Samim tim je identifikacija mnogo preciznija nego primenom drugih tipova detektora.

Promene sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti tokom sladovanja i proizvodnje piva nisu detaljno ispitane. Ispitivanja su uglavnom usmerena na deo procesa sladovanja, naročito sušenje slada (Maillard i Berset, 1995; Maillard i sar., 1996; Woffenden i sar., 2002; Inns i sar., 2005), dok su ostale faze ovoga procesa (močenje i klijanje) manje ispitane.

Verdaro i saradnici (2008) su za oslobađanje vezanih hidroksi derivata cimetine kiseline iz ječma koristili kiselu hidrolizu. Zupfer i saradnici (1998) su primenom  $\alpha$ -amilaze za razgradnju skroba izolovali ferulnu kiselinu iz ječma. Njihova procedura je obuhvatala dva koraka: kiselu i hidrolizu amilazom nakon koje je određen sadržaj ferulne kiseline u opsegu 343-580  $\mu\text{g/g}$ . Bartolomé i Gómez-Cordovés (1999) su koristili komercijalne enzime (Viscozyme L, Ultraflo L, Termamyl i Lallzyme) za određivanje fenolnih kiselina u pivskom tropu. Andreasen i saradnici (1999) su koristili komercijalne enzime za razgradnju ćelijskih zidova. Enzimski tretmani su značajno poboljšavali ekstrakciju fenolnih kiselina iz raži. Yu i saradnici (2001) su uporedili različite postupke ekstrakcije i hidrolize: a) ekstrakcija toplom vodom za slobodne fenolne kiseline, b) kisela hidroliza za jednostavno esterifikovane fenolne kiseline, c) kisela hidroliza praćena

hidrolizom  $\alpha$ -amilazom za oslobađanje fenolnih kiselina vezanih za skrob i slične polisaharide i d) kiselina i hidroliza  $\alpha$ -amilazom i celulazom za razgradnju ćelijskih zidova zrna ječma da bi se oslobodile nerastvorne-vezane fenolne kiseline. Yu i saradnici (2001) su pokazali da priprema uzorka koja sadrži hidrolizu kiselinom,  $\alpha$ -amilazom i celulazom daje najviše sadržaje fenolnih kiselina, što upućuje da je većina fenolnih kiselina u ječmu primarno vezana za druge komponente zrna (na primer skrob, celulozu,  $\beta$ -glukan, pentozane i druge).

Za ekstrakciju fenolnih kiselina primenjuju se uobičajeni rastvarači: topla voda, metanol, etanol, aceton i etil-acetat (Robbins, 2003). Etil-acetat se najčešće koristi za ekstrakciju fenolnih kiselina iz različitih materijala i žitarica, uključujući ječam, slad i pivo (Krygier i sar., 1982; Maillard i Berset, 1995; Andreasen i sar., 1999; Goupy i sar., 1999; Bartolomé i Gómez-Cordovés, 1999; Hernanz i sar., 2001; Adom i Liu, 2002; Robbins, 2003; Holtekjølen i sar., 2006; Mpofu i sar., 2006).

Elektron spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. U hemiji slobodnih radikala ESR spektroskopija predstavlja osnovnu eksperimentalnu tehniku za ispitivanje oksido-redukcionih procesa, biradikalnih i triplet stanja molekula, strukture i reakcije polimera, mehanizama organskih reakcija slobodnih radikala itd. (Čanadanović-Brunet, 1997). ESR je jedina tehnika kojom se „vidi“ slobodne radikale direktno i specifično, zato što detektuje prisustvo nesparenih elektrona (Halliwell i Whiteman, 2004; Halliwell i Gutteridge, 2007).

ESR spektroskopija je izuzetno osetljiva metoda kojom mogu da se detektuju koncentracije slobodnih radikala i niže od  $10^{-10}$  mol/dm<sup>3</sup> pod uslovom da se radikali zadrže u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju. Za analiziranje nestabilnih slobodnih radikala primenjuje se tzv. „spin-trap“ metoda. Dodavanjem određenih organskih jedinjenja tzv. „spin-trap-ova“ („hvatača“ radikala) u sistem sa prisutnim reaktivnim radikalima, međusobnom reakcijom, nastaju relativno stabilni radikali, pogodni za detekciju ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1997; Halliwell i Gutteridge, 2007). Određivanje endogenog antioksidativnog potencijala pomoću ESR metode je veoma efikasno u predviđanju stabilnosti ukusa piva. Tokom poslednjih godina ESR metoda se sve više primenjuje za određivanje antioksidativne aktivnosti piva (Methner i sar., 2007). Antioksidativna aktivnost se može definisati kao EC<sub>50</sub> vrednost (mg/mL). EC<sub>50</sub> vrednost se definiše kao koncentracija ekstrakta potrebna za „hvatanje“ 50% DPPH ili hidroksil radikala pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Ovaj parameter se često koristi kao mera antiradikalne sposobnosti (Cuvelier i sar., 1992; Goupy i sar., 2003). Manja EC<sub>50</sub> vrednost odgovara višoj antioksidativnoj vrednosti.

Pregledom literature u tehnologijama slada i piva zaključeno je da je za procenu antioksidativne aktivnosti najčešće ispitivana antiradikalna aktivnost na stabilne DPPH radikale spektrofotometrijskom metodom i elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom. Spektrofotometrijsku metodu za određivanje antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u ječmu, tokom sladovanja i u sladu su primenjivali: Goupy i saradnici (1999), Duh i saradnici (2001), Zhao i saradnici (2006, 2008), Lu i saradnici (2007), Dvořáková i sar. (2008). ESR metoda je ređe primenjivanja za određivanje antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u poređenju sa spektrofotometrijskom metodom (Mikyška i sar., 2005; Madhujith i Shahidi, 2006).

Određivanje antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale je retko primenjivano u ječmu i proizvodnji slada. U tu svrhu korišćene su spektrofotometrijske metode (Zhao i

sar., 2006) i elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija (Duh i sar., 2001; Madhujith i Shahidi, 2006).

Spektrofotometrijsku metodu za određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale u proizvodnji piva (u sladovini, ohmeljenoj sladovini, mladom pivu i pivu) su primenjivali: Lugasi i Hóvári (2003) i Dostálek i Karabín (2007). Krofta i saradnici (2008) su isptivali antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale hmelja i proizvoda od hmelja ESR metodom.

Kaneda i saradnici (1988, 1994) su za detekciju hidroksil radikala u pivu primenjivali ESR „spin-trap“ metodu. Takaoka i saradnici (1988) su primenili ESR „spin-trap“ metodu za detekciju hidroksil radikala u pivu u industrijskim uslovima. Uchida i Ono (1996) su razvili ESR metodu za određivanje nastajanja hidroksil radikala u pivu primenom tzv. „forsir“ testa na 60°C. Ovu metodu su primenjivali za određivanje prisutnosti hidroksil radikala u fazama proizvodnje piva (Uchida i Ono, 2000, 2000a). Drugi istraživači su primenjivali ESR metodu za detekciju hidroksil radikala u sladovini i pivu primenom tzv. „forsir“ testa (Andersen i Skibsted, 1998; Forster i saradnici, 1999; Forster i Back, 2000; Franz i Back, 2002).

### 3. MATERIJALI I METODE RADA

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Hemikalije i pribor

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 5,5-dimetil-1-pirolin-*N*-oksid (DMPO), Folin-Ciocalteu reagens, referentni standardi: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, gentistinska, protokatehinska, siringinska, *p*-kumarinska, galna, ferulna, kafena, sinapinska, hlorogenska i elaginska kiselina su nabavljene od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, SAD). *p*-Aminobenzoeva kiselina (interni standard), heksan, etil-acetat i *N,N*-dimetilformamid (DMF) su nabavljeni od Merck (Darmstadt, Nemačka). Reagens za derivatizaciju - BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamid) + TMCS (trimetilhlorosilan) je nabavljen od Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI, SAD). Komercijalni enzimi Termamyl SC ( $\alpha$ -amilaza) i Celluclast (celulaza) su dobijeni od Novozymes (Danska). Sumporna kiselina, natrijum-acetat, natrijum-hlorid, natrijum-karbonat, anhidrovani natrijum-sulfat i anhidrovani piridin su nabavljeni od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka).

Za filtraciju hidrolizovanih uzoraka ječma, namočenog ječma, zelenog slada, slada i hmelja korišćen je filter papir MN 615  $\frac{1}{4}$ , prečnika 240 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Nemačka).

##### 3.1.2. Ječam

U radu su korišćene tri priznate sorte ozimog dvoredog pivskog ječma: NS 525, NS 565 i NS 583 poreklom iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Sorte NS 525 i NS 565 su priznate pivarske sorte ječma u Srbiji i Evropskoj Uniji, dok je sorta NS 583 priznata pivarska sorta ječma u Srbiji.

##### 3.1.3. Hmelj

Za dobijanje ohmeljene sladovine korišćen je hmelj, sorta Aroma, poreklom iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Departmana za hmelj, sirak i lekovito bilje, Bački Petrovac.

#### 3.2. METODE RADA

##### 3.2.1. Analiza ječma

Analize ječma su obuhvatale: mehaničke analize (hektolitarska masa, masa 1000 zrna, staklastost i sortiranje), fiziološke analize (energija klijanja i hidrosenzibilnost) i hemijske analize (sadržaj vlage, sadržaj proteina, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost). Tehnološki parametri ječma su određeni standardnim metodama po Analytica-EBC (1998) i MEBAK (1997).

### 3.2.2. Mikrosladovanje

Prilikom proizvodnje slada primenjen je klasičan postupak mikrosladovanja koji se koristi u tehnološkim ispitivanjima ocene kvaliteta ječma tj. standardno mikrosladovanje (Schuster i sar., 1999). Shema mikrosladovanja data je u Tabeli 3.1. Sladovano je po dva puta po 1,0 kg uzorka. Jedan uzorak je korišćen za praćenje tehnoloških parametara, a drugi je korišćen za određivanje sadržaja ukupnih fenola, sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti kao i proizvodnju sladovine iz proizvedenog slada. Mikrosladovanje svih šest uzoraka je izvedeno u mikrosladari tipa „Seeger“ (Plüderhausen, Nemačka). Voda koja je korišćena tokom močenja je bila iz novosadskog vodovoda.

**Tabela 3.1. Shema mikrosladovanja**

1. dan	6 h močenja u vodi 15°C 18 h bez vode u močioniku 15°C
2. dan	4 h močenja u vodi 15°C 20 h bez vode u kljajalištu 15°C
3. dan	2 h močenja u vodi 15°C 22 h bez vode u kljajalištu 15°C
4. dan	kljanje na 15°C; prevrtanje
5. dan	kljanje na 15°C; prevrtanje
6. dan	kljanje na 15°C; prevrtanje
7. dan	kljanje na 15°C, prebacivanje u sušnicu, sušenje po zadatom programu
8. dan	sušenje završeno, otklicavanje slada, merenje i pakovanje u polietilenske vrećice

Mikrosladovanje je obuhvatalo sledeće faze: močenje, kljanje i sušenje zelenog slada. Sušenje je obavljeno po sledećem programu za svetli slad: 12 sati na 40°C, 3,5 sata na 60°C i 4,5 sata na 85°C. Tokom mikrosladovanja praćeni su stepen namočenosti, sadržaj vlage zelenog slada, ukupni gubici (gubici disanjem i gubici na klicu) i određivani su sadržaj fenolnih kiselina, sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost.

### 3.2.3. Analliza slada

Analiza dobijenih sladova obuhvatala je: mehaničke analize (hektolitarska masa, masa 1000 zrna i staklastost) i hemijske analize (sadržaj vlage, sadržaj proteina, sadržaj ekstrakta grubo mlevenog slada, sadržaj ekstrakta fino mlevenog slada, razlika ekstrakta fino i grubo mlevenog slada, vreme ošecerjenja, brzina filtracije sladovine, boja sladovine, viskozitet sladovine, pH sladovine, bistrina sladovine, sadržaj rastvorljivog azota, Kolbach-ov broj, Hartong-ov broj (VZ 45°C), sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost. Tehnološki pokazatelji kvaliteta slada određivani su po standardnim metodama (MEBAK, 1997; Analytica-EBC, 1998).

### 3.2.4. Analiza hmelja

U hmelju su analizirani sledeći pokazatelji: sadržaj vlage, sadržaj ukupnih smola i sadržaj  $\alpha$ -kiselina. Ovi pokazatelji određivani su po Analytica-EBC (1998). Pored tehnoloških pokazatelja kvaliteta hmelja određivani su i sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost hmelja.

### 3.2.5. Priprema sladovine za fermentaciju

Sladovina je pripremana u šest mesinganih čaše kupatila za određivanje ekstrakta slada na sledeći način: 50 g fino samlevenog slada ukomljeno je sa 200 ml destilovane vode (temperirane u kupatilu za određivanje ekstrakta slada na 45°C) i dalji postupak je vođen po Kongresnoj metodi za određivanje sadržaja ekstrakta slada (Analytica EBC, 1998). Po završetku postupka sladovina je profiltrirana.

Ukupno je dobijeno oko 2000 ml sladovine. Za analize uzimano je 300 ml (tokom pripreme sladovine praćeno je vreme ošecerjenja, a nakon završene pripreme određivani su: sadržaj ekstrakta, brzina filtracije, bistrina sladovine, boja sladovine, pH vrednost sladovine, viskozitet sladovine i sadržaj rastvorljivog azota po standardnim metodama analiza – MEBAK, 1997; Analytica EBC, 1998), 200 ml je sterilisano za umnožavanje inokuluma za fermentaciju, a oko 1600 ml je ohmeljeno uz dodatak 2,3000 g usitnjenog hmelja u balonu zapremine 2 l uz povratni hladnjak. Zagrevanje je vršeno pomoću obloge za zagrevanje. Sladovina sa hmeljom je zagrevana do ključanja i na temperaturi ključanja držana 1 sat. Nakon toga balon sa vrelom ohmeljenom sladovinom je hermetički zatvoren. Hlađenje je izvođeno na sobnoj temperaturi 3-4 sata, a nakon toga balon je prenošen u hladnjak, na temperaturu od 4°C. U hladnjaku je balon sa ohmeljenom „sterilnom“ sladovinom čuvan do sledećeg dana. Sledećeg dana je pod sterilnim uslovima u „laminar flow“ komori uz plamenik ohmeljena sladovina odlivena u sterilne posude po Erlenmajeru (sa širokim grlom) zapremine 2 l i za analizu je odvojeno oko 300 ml (određivani su sledeći pokazatelji: sadržaj ekstrakta, gorčina, boja, pH vrednost, viskozitet ohmeljene sladovine, sadržaj rastvorljivog azota po standardnim metodama analiza – MEBAK, 1997; Analytica EBC, 1998). Ohmeljena sladovina je aerisana pola sata. U modifikovan sterilan EBC cilindar (Analitika-EBC III, 1985) (zapremine 2,5 l) unešen je inokulum. Nakon aeracije ohmeljena sladovina je pod sterilnim uslovima prenošena u EBC cilindar. Nakon zatvaranja fermentora sadržaj je homogenizovan.

U svim proizvedenim sladovinama i ohmeljenim sladovinama su pored tehnoloških pokazatelja određivani: sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost.

### 3.2.6. Priprema inokuluma za fermentaciju

Fermentacije su izvođene sa čistom proizvodnom kulturom soja kvasca B koja je storirana kao muzejska kultura i čuva se na predmetu Mikrobiologija Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Kultura je aktivirana presejavanjem na „novu sladnu podlogu“ (NSI) (Vrbaški i Markov, 1992) (uslovi gajenja: vreme 48-72 sata na temperaturi 28°C). Suspenzijom fiziološki aktivne kulture (minimalno  $5 \times 10^6$  ćelija/ml) u fiziološkom rastvoru zasejavane su podloge za gajenje inokuluma (uslovi gajenja: vreme 24 sata na sobnoj temperaturi pri mešanju od 300 o/min). Podloga za gajenje inokuluma je bila sladovina koja je pripremana za svaku fermentaciju posebno, odnosno inokulum je

umnožavan na sladovini u kojoj će se vršiti proces fermentacije. Broj ćelija u suspenziji, kao i u pripremljenom inokulumu određivan je metodom direktnog brojanja mikroorganizama u tečnim supstratima (Vrbaški i Markov, 1992).

### 3.2.7. Fermentacija

Fermentacija se sastojala od glavne i naknadne fermentacije. Glavne fermentacije su izvođene na 10°C u trajanju od sedam dana. Uzorci za ispitivanja su uzimani pod sterilnim uslovima preko slavine na sredini fermentora (Vrbaški i sar., 1992). Kvasac je odvajan centrifugiranjem na 3000 o/min u trajanju od 20 minuta. Kivete centrifuge su hermetički zatvarane nakon unošenja uzorka.

Tokom fermentacije praćeni su sledeći pokazatelji: sadržaj alkohola, sadržaj ekstrakta, gorčina, stepen prave i prividne prevrelosti, boja, pH vrednost, broj ćelija kvasca direktnom metodom (Vrbaški i Markov, 1992), sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost. Tehnološki pokazatelji su određivani po standardnim savremenim evropskim metodama analiza (MEBAK, 1993; Analytica EBC, 1998).

Nakon završene glavne fermentacije mlado pivo je pod sterilnim uslovima i uz uvođenje CO<sub>2</sub>, prenošeno u dve sterilne boce i zatvarano krunskim zatvaračem pod sterilnim uslovima. Boce sa mladim pivom prenošene su na naknadnu fermentaciju u termostat na 1°C. Naknadna fermentacije je izvođena u trajanju od 14 dana. Svakih sedam dana uzimana je po jedna boca, odvojen je kvasac centrifugiranjem na 3000 o/min u hermetički zatvorenim kivetama i vršeno je ispitivanje istih parametara koji su određivani tokom glavne fermentacije. Naknadna fermentacija je prekidana nakon dve nedelje i od dobijenog piva je odvojen kvasac i vršeno je ispitivanje istih parametara koji su određivani tokom glavne i naknadne fermentacije kao i kompletna analiza piva.

Analiza gotovih piva je obuhvatala: sadržaj alkohola, sadržaj ekstrakta, sadržaj prividnog ekstrakta, gorčinu, stepen prave prevrelosti, stepen prividne prevrelosti, pH vrednost piva, boju piva, sadržaj rastvorljivog azota po standardnim metodama analize, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina, antioksidativnu aktivnost i senzorne osobine (ukus, miris, gorčina). Tehnološki pokazatelji kvaliteta piva su određivani po standardnim metodama analize (MEBAK, 1993; Analytica EBC, 1998).

### 3.2.8. Određivanje sadržaja ukupnih fenola, sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti (antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidorksil radikale)

#### Priprema uzoraka ječma, namoćenog ječma, zelenog slada i slada

##### *Hidroliza*

Uzorci ječma, namoćenog ječma, zelenog slada i slada su izloženi hidrolizi kiselinom (za oslobađanje esterifikovanih fenolnih kiselina),  $\alpha$ -amilazom (za oslobađanje vezanih fenolnih kiselina sa skrobom i drugim polisaharidima) i celulazom (za razgradnju ćelijskog zida ječma i slada u cilju oslobađanja fenolnih kiselina).

Odmerena je ekvivalentna masa 11 g suve materije uzorka ječma ili namoćenog ječma ili zelenog slada ili slada, samlevena fino na laboratorijskom DLFU mlinu Bühler-Miag (Braunschweig, Nemačka) i obezmašćena 3 puta sa po 30 ml heksana. Hidroliza je izvođena po modifikovanoj metodi koju su predložili Yu i saradnici (2001). Odmerena je



tačna ekvivalentna masa 10 g suve materije, obezmašćenog uzorka ječma ili namočenog ječma ili zelenog slada ili slada u erlenmajeru sa šlifovanim grlom i dodato je 100 ml 0,2 N rastvora  $H_2SO_4$  i zagrevano u ključalom vodenom kupatilu 1 sat (pH 4,5). Kisela hidroliza prekinuta je hlađenjem uzoraka u ledenom kupatilu na 20°C pre dodatka 20 ml 2,5 M vodenog rastvora natrijum-acetata. Pre dodatka rastvora natrijum-acetata uzorci su prebačeni u laboratorijske čaše. Nakon podešavanja pH na 5,0 dodatkom natrijum-acetata uzorci su zagrevani na 85°C u kupatilu za ukomljavanje slada. Dodata je tehnička  $\alpha$ -amilaza (Termamyl SC) u višku prema preporuci proizvođača. Uzorci su držani na ovoj temperaturi 1 sat nakon čega su ohlađeni na 65°C u kupatilu za ukomljavanje slada. Kada je postignuta ova temperatura dodato je 10 ml 2,5 M vodenog rastvora natrijum-acetata i komercijalna celulaza (Celluclast) u višku prema preporuci proizvođača. Uzorci su držani na ovoj temperaturi 6 sati nakon čega su hlađeni na 20°C u kupatilu za ukomljavanje slada i filtrirani kroz naboranu filter hartiju (Macherey-Nagel 615 ¼). Filtrat je korišćen za analizu sadržaja ukupnih fenola, sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti.

### ***Ekstrakcija fenolnih jedinjenja***

U preliminarnim istraživanjima ispitivani su različiti rastvarači za ekstrakciju fenolnih jedinjenja: metilen-hlorid, aceton, metanol i etil-acetat. Najviši sadržaji fenolnih kiselina dobijeni su ekstrakcijom sa etil-acetatom, pa je ovaj rastvarač odabran za ekstrakciju fenolnih jedinjenja.

U uzorke (dobijeni filtrat) dodata je sumporna kiselina (do pH 1) i natrijum-hlorid (2 g). Fenolna jedinjenja su ekstrahovana iz dobijenog rastvora 4 puta sa etil-acetatom (4 × 30 ml). Organska faza je sakupljena i podeljena na tri jednaka dela (za određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu, sadržaja fenolnih kiselina GC-MS analizom i antioksidativne aktivnosti - antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale ESR analizom) i sušena preko anhidrovanog natrijum-sulfata pre uparavanja do suvog na vakuum uparivaču na temperaturi ispod 40°C. Dobijeni ekstrakti su sušeni i čuvani u eksikatoru. Suvi ostatak je rastvoren u etil-acetatu za GC-MS analizu i N,N-dimetilformamidu (DMF) za određivanje sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale.

### **Priprema uzoraka sladovine, hmelja, ohmeljene sladovine, sladovine tokom fermentacije, mladog piva i piva**

#### ***Hidroliza***

Uzorci sladovine, ohmeljene sladovine, sladovine u fermentaciji, mladog piva i piva su izloženi hidrolizi kiselinom (za oslobađanje esterifikovanih fenolnih kiselina). U uzorke (100 ml) je dodata sumporna kiselina (do pH 1) i uzorci su držani na sobnoj temperaturi 1 sat. Iz uzoraka sladovine u fermentaciji, mladog piva i piva kvasac je pre hidrolize odvojen centrifugiranjem na 3000 o/min u hermetički zatvorenim kivetama.

Fenolna jedinjenja su iz hmelja ekstrahovana po proceduri koju su predložili Asano i saradnici (1981): U 500 ml destilovane vode zagrejane na 80°C je dodato 5 g fino samlevenog hmelja i nakon toga zagrevano do ključanja uz povratni hladnjak i na temperaturi ključanja držano 1 sat da bi se ekstrahovala fenolna jedinjenja. Zagrevanje je vršeno pomoću obloge za zagrevanje. Nakon toga, ekstrakt je ohlađen na sobnu temperaturu i filtriran kroz naboranu filter hartiju (Macherey-Nagel 615 ¼).

Dobijeni filtrat je izložen hidrolizi kiselinom (na isti način kao i uzorci sladovine, ohmeljene sladovine, sladovine u fermentaciji, mladog piva i piva) dodatkom sumporne kiseline (do pH 1) u trajanju od 1 sat.

### **Ekstrakcija fenolnih jedinjenja**

U uzorke je dodato 2 g natrijum-hlorida (90 ml sladovine ili ohmeljene sladovine ili sladovine u fermentaciji ili mladog piva ili piva ili ekstrakta hmelja nakon hidrolize). Fenolna jedinjenja su ekstrahovana 4 puta etil-acetatom (4 × 30 ml). Organska faza je sakupljena i podeljena na tri jednaka dela (za određivanje sadržaja ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu, sadržaja fenolnih kiselina GC-MS analizom i antioksidativne aktivnosti - antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale ESR analizom) i sušena preko anhidrovanog natrijum-sulfata pre uparavanja do suvog na vakuum uparivaču na temperaturi ispod 40°C. Dobijeni ekstrakti su sušeni i čuvani u eksikatoru. Suvi ostatak je rastvoren u etil-acetatu za GC-MS analizu i N,N-dimetilformamidu (DMF) za određivanje sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale.

### **Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu**

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim tokom mikrosladovanja i proizvodnje piva je određivan spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu koju su opisali Singleton i saradnici (1999) i rezultati su izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g suve materije uzorka (ječma, namočenog ječma, zelenog slada i slada) ili mg ekvivalenta galne kiseline po 100 ml uzorka (sladovine, ohmeljene sladovine, sladovine u fermentaciji, mladog piva i piva).

Ukratko metoda se sastojala u sledećem: dobijeni suvi ekstrakti su rastvoreni u N,N-dimetilformamidu (DMF) da bi se dobila koncentracija 1 mg/ml. Reakciona smeša pripremana je na sledeći način: 0,1 ml ekstrakta + 7,9 ml destilovane vode + 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nakon 2 sata izmerena je apsorbancija na 750 nm. Za kalibraciju je napravljen rastvor galne kiseline 10 mg u 100 ml destilovane vode. Od rastvora galne kiseline uzimane su sledeće zapremine i prenošene u epruvete: 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml i 0,6 ml. Nakon toga dodati su destilovana voda (7,9-7,4 ml), Folin-Ciocalteu reagens (0,5 ml) i rastvor Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 ml). Slepa proba se sastojala od: 8,0 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### **Određivanje sadržaja fenolnih kiselina GC-MS metodom**

#### **Priprema uzoraka za GC-MS**

Etil-acetatni uzorci su upareni do suvog na vakuum uparivaču na temperaturi ispod 40°C u zoni azota i ostavljeni na sobnoj temperaturi u eksikatoru da bi se potpuno osušili. Suvi ostatak je rastvoren u anhidrovanom piridinu (koji je služio i kao rasvarač i kao katalizator). U 400 µl ovog rastvora je dodato: 100 µl sredstva za derivatizaciju (BSTFA+TMCS), 10 µl rastvora internog standarda (*p*-aminobenzoeva kiselina) u piridinu i 490 µl apsolutnog piridina. Uzorci su zagrevani 30 minuta na 75°C nakon čega su hlađeni na sobnu temperaturu. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi u trajanju od 4

sata, uzorci su analizirani GC-MS metodom. Rastvori standarda za kalibraciju su derivatizovani na isti način.

### ***Priprema standarda za kalibraciju fenolnih kiselina***

Osnovni rastvori su pripremani rastvaranjem pojedinačno 10 mg standarda 12 ispitivanih fenolnih kiselina u 10 ml piridina. Radni rastvori standarda koji su sadržali 12 fenolnih kiselina su pripremani mešanjem i razblaživanjem pojedinačnih osnovnih rastvora standarda da bi se dobile koncentracije u opsegu 1-100 µg/ml. Radni rastvor standarda je razblaživan da bi se dobile sledeće koncentracije rastvora za kalibraciju: 1, 3, 5, 8, 10, 20, 30, 50 i 100 µg/ml. Kalibracione krive su konstruisane linearnom regresijom udela površine pika pojedinačnog standarda fenolne kiseline prema internom standardu u odnosu na koncentraciju.

### ***Gasni hromatograf sa maseno selektivnim detektorom (GC-MS) i uslovi analize***

Uzorci su analizirani na GC-MS sistemu Agilent Technologies 6890N/5975B. Injektovana je zapremina od 3 µl u „splitless” modu, uz temperaturu injektora od 250°C. Kao gas nosač je korišćen helijum, sa konstantnim protokom 1,2 ml/min. Razdvajanje je izvršeno na HP-5MS koloni (Agilent Technologies) na bazi 5% fenil-metil-siloksana, dužine 30 m, prečnika 0,25 mm i debljine sloja 0,25 µm, uz temperaturno programiranje. Program je obuhvatao početnu temperaturu od 50°C, zagrevanje do 130°C brzinom od 20°C/min, zadržavanje na 130°C tokom 1 min, zagrevanje brzinom od 9°C/min do 280°C, i zadržavanje na toj temperaturi 11,33 min. Kao detektor je korišćen maseni detektor sa elektronskom jonizacijom (70 eV). Temperatura jonskog izvora bila je 230°C, kvadrupola 150°C, a transfer linije 280°C. Akvizicija je vršena u SIM („selective ion monitoring”) modu.

### ***Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina***

Identifikacija fenolnih kiselina u svakom uzorku je izvedena poređenjem retencionog vremena i masenog spektra sa autentičnim standardom. U svakom uzorku kvantifikacija fenolnih kiselina je izvedena poređenjem površine pika identifikovane kiseline i površine internog standarda, *p*-aminobenzojeve kiseline, koncentracije 100 µg/ml. Merenja standarda za kalibraciju i svih uzoraka izvedena su u tri probe. Za derivatizaciju fenolnih kiselina korišćen je BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamid) + TMCS (trimetilhlorosilan) reagens. Trimetilsilil derivati fenolnih kiselina su razdvajani i određivani gasnim hromatografom sa maseno selektivnim detektorom.

## **ESR analiza ekstrakata**

### **Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale**

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih tokom procesa sladovanja i proizvodnje piva je određena na osnovu antiradiklaske aktivnosti na stabilne 2,2-difenil-1-pikrohidrazil (DPPH<sup>•</sup>) radikale, kao i na reaktivne hidroksil (•OH) radikale. Slobodni radikali, nastali u ispitivanim sistemima, detektovani su primenom najsavremenije

analitičke metode za direktnu detekciju slobodnih radikala – elektron spin rezonantne (ESR) spektrometrije. Slepa proba je sadržala 400  $\mu\text{l}$  0,4 mM rastvora DPPH u metanolu i 200  $\mu\text{l}$  N,N-dimetilformamida. Glavna proba je sadržala  $x$   $\mu\text{l}$  10 mg/ml rastvora ekstrakta u N,N-dimetilformamidu, (200- $x$ )  $\mu\text{l}$  N,N-dimetilformamida i 400  $\mu\text{l}$  0,4 mM rastvora DPPH u metanolu. Koncentracija ispitivanih ekstrakata je bila u opsegu 0,1-1,0 mg/ml. Smeša je mešana 2 minuta i preneti u kvarcnu kivetu Bruker ER-160FT. ESR spektri su snimani na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Nemačka) pod sledećim uslovima:

❖ frekvencija modulacije	100 kHz
❖ amplituda modulacije	0,256 G
❖ vremenska konstanta	40,96 ms
❖ vremenski opseg merenja	327,68 ms
❖ centar polja	3440,00 G
❖ ukupan opseg merenja	100,00 G
❖ frekvencija mikrotalasnog područja	9,65 GHz
❖ jačina struje	$5,00 \times 10^5$
❖ snaga mikrotalasnog područja	20 mW
❖ temperatura merenja	23°C

Antiradikalska aktivnost ekstrakata različitih koncentracija ( $AA_{DPPH}$ ) na DPPH radikale je definisana kao:

$$AA_{DPPH} = 100 \cdot (h_0 - h_x) / h_0 [\%]$$

gde su  $h_0$  i  $h_x$  visine drugog pika ESR spektra DPPH radikala slepe i glavne probe.

Dobijeni rezultati antiradikalske sposobnosti na DPPH radikale su izraženi kao  $EC_{50}$  vrednosti. Antioksidativna aktivnost se može definisati kao  $EC_{50}$  vrednost (mg/mL).  $EC_{50}$  vrednost je koncentracija ekstrakta potrebna za “hvatanje” 50% DPPH ili hidroksil radikala pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Ovaj parameter se često koristi kao mera antiradikalske sposobnosti (Cuvelier i sar., 1992; Goupy i sar., 2003). Manja  $EC_{50}$  vrednost odgovara višoj antioksidativnoj vrednosti.

### Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale

Za određivanje hidroksil radikala korišćen je reakcioni sistem: 0,2 ml N,N-dimetilformamida, 0,2 ml 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,2 ml 10 mM  $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  i 0,2 ml 0,3 M DMPO u funkciji “spin trapa” (slepa proba). Uticaj ispitivanih ekstrakata na nastajanje i transformaciju hidroksil radikala je ispitivan dodatkom ekstrakta u Fenton-ov sistem u opsegu koncentracija 0,1-1,0 mg/ml. ESR spektri su snimani nakon 5 minuta na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Nemačka), pri sledećim uslovima spektrometra:

❖ frekvencija modulacije	100 kHz
❖ amplituda modulacije	0,512 G
❖ vremenska konstanta	81,92 ms
❖ vremenski opseg merenja	163,84 ms
❖ centar polja	3440,00 G

❖ ukupan opseg merenja	100,00 G
❖ frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz
❖ jačina stuje	$2,00 \times 10^5$
❖ snaga mikrotalasnog područja	20 mW
❖ temperatura merenja	23°C

Antiradikalska aktivnost ispitivanih ekstrakata na hidroksil radikale ( $AA_{OH}$ ) je definisana kao:

$$AA_{OH} = 100 \cdot (h_0 - h_x) / h_0 [\%],$$

gde su  $h_0$  i  $h_x$  visine drugog pika ESR spektra DMPO-OH "spin adukt" radikala slepe i glavne probe.

Dobijeni rezultati antiradikalske sposobnosti na hidroksil radikale su izraženi kao  $EC_{50}$  vrednosti.

### 3.2.9. Statiščka obrada dobijenih rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je uz primenu kompjuterskih programa Microsoft Excel i Statistica 4.5.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Rezultati analiza ječma

U ovom radu korišćene su kao sirovine za proizvodnju slada tri ozime sorte ječma: NS 525, NS 565 i NS 583. U Tabeli 4.1 dati su rezultati analize ječma sorti NS 525, NS 565 i NS 583.

**Tabela 4.1. Rezultati analize ječma sorti NS 525, NS 565 i NS 583**

Parametar	NS 525	NS 565	NS 583
<b>Senzorna ocena</b>			
Miris zrna	svež, na slamu	svež, na slamu	svež, na slamu
Boja zrna	svetlo žuta	svetlo žuta	svetlo žuta
Izgled zrna	puna	puna	puna
<b>Mehanička analiza</b>			
Sortiranje:			
iznad 2,8 mm (%)	53,9	54,8	75,2
iznad 2,5 mm (%)	42,1	40,9	21,4
I klasa (%)	96,0	95,7	96,6
II klasa (%)	3,1	3,6	2,7
III klasa (%)	0,9	0,7	0,7
Masa 1000 zrna (g s.m.*)	45,38	49,13	51,04
Hektolitarska masa (kg/hl)	71,4	71,0	74,2
Prosečna staklastost (%)	22,01	24,36	27,72
<b>Fiziološka analiza</b>			
Energija klijanja 3 dana (%)	99	98	99,5
Hidrosenzibilnost 3 dana (%)	0,5	1	0,5
Energija klijanja 5 dana (%)	100	100	100
Hidrosenzibilnost 5 dana (%)	0	0	0
<b>Hemijska analiza</b>			
Vlaga zrna (%)	9,09	9,12	9,19
Proteini (% s.m.**)	10,90	10,30	12,30

\* g. s.m. – grama suve materije, \*\* % s.m. - % suve materije

Ispitivane sorte ječma su prema senzornim osobinama imale zadovoljavajući kvalitet (boja, miris i izgled zrna). Na osnovu rezultata analize ječma datih u Tabeli 4.1 može se zaključiti da je udeo I klase kod sve tri sorte preko 95%. Smatra se da je ječam ujednačen ako je sadržaj I klase preko 85% (Schuster i sar., 1999).

Masa 1000 zrna je bolji pokazatelj za ocenu ječma od hektolitarske mase i u korelaciji je sa sortiranjem i sadržajem proteina. Masa 1000 zrna je karakteristika sorte ječma (Schuster i sar., 1999). Sve ispitivane su imale visoku masu 1000 zrna što je pozitivan pokazatelj kvaliteta pivskog ječma. Hektolitarska masa ozimog ječma je niža u odnosu na jari ječam. Hektolitarska masa pivskog ječma iznosi od 68 do 71 kg, a retko

više. Za sve ispitivane sorte ječma hektolitarska masa je iznosila preko 71 kg što je dobar pokazatelj kvaliteta ječma.

Energija klijanja je pokazatelj zrelosti ječma. Energija klijanja nakon tri dana treba da bude preko 96%, što sve ispitivane sorte zadovoljavaju. Hidrosenzibilnost takođe zavisi od stadijuma njegove tehnološke zrelosti i daje uvid u osetljivost ječma na prisustvo povećane količine vode tokom klijanja (Schuster i sar., 1999). Ispitivane sorte su imale vrlo malu hidrosenzibilnost (<10%). Ispitivani uzorci su imali relativno nizak sadržaj vlage što je povoljno za čuvanje uzoraka. Sadržaj proteina u pivskom ječmu iznosi od 9 do 11,5% suve materije. Ako je sadržaj proteina u ječmu viši dobija se slad sa nižim sadržajem ekstrakta i otežava se njegova prerada (Schuster i sar., 1999). Sorte NS 525 i NS 565 su imale zadovoljavajući sadržaj proteina prema navedenom kriterijumu, dok je sorta NS 583 imala povišen sadržaj proteina (12,30%).

#### 4.2. Rezultati mikrosladovanja ječma

Metoda mikrosladovanja je veoma rasprostranjena jer omogućava dobijanje slada iz male količine ječma (između 100 g i 1 kg) pod standardizovanim uslovima. Mikrosladovanjem se sladarska ili pivarska vrednost ječma može mnogo bolje proveriti nego što je moguće putem analize ječma. Mikrosladovanje je nezaobilazno u oceni ječma i utvrđivanju tehnoloških postupaka rada u sladari, kao i u oceni novih sorti ječma (Schuster i sar., 1999).

U Tabeli 4.2 prikazani su rezultati mikrosladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583.

**Tabela 4.2. Rezultati mikrosladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583**

Parametar	NS 525	NS 565	NS 583
Vlaga I močenje (%)	31,85	31,88	30,25
Vlaga II močenje (%)	39,55	38,84	38,22
Vlaga III močenje (%)	45,88	45,45	44,89
Vlaga zelenog slada (%)	45,10	44,36	44,77
Vlaga slada (%)	4,20	4,50	4,60
Gubici ukupno (% s.m.* ječma)	10,44	10,47	10,29
❖ gubitak disanjem (% s.m. ječma)	6,64	7,31	7,56
❖ gubitak na klicu (% s.m. ječma)	3,79	3,15	2,73

\* % s.m. – % suve materije

Za dobru razgrađenost endosperma i postizanje optimalnih enzimskih aktivnosti, potrebno je da stepen namočenosti ječma bude oko 44-48%. Sve ispitivane sorte su nakon močenja imale visok stepen namočenosti (NS 525 – 45,88%; NS 565 – 45,45% i NS 583 – 44,89%). Najintenzivnija enzimaska razgradnja se odvija tokom procesa sladovanja i pripreme sladovine. Polifenoloksidaze se u ječmu nalaze u znatnom sadržaju. Njihova sinteza se u toku klijanja odvija brzo, pri čemu je porast aktivnosti najveći od prvog do trećeg dana klijanja. Viši stepen namočenosti uslovljava bržu aktivaciju ovih enzima u toku klijanja, pri čemu se postižu i veće krajnje vrednosti aktivnosti. Posebno pri stepenu namočenosti višem od 40% količina enzima u toku poslednja tri dana nešto opada. Sadržaj polifenoloksidaza na kraju klijanja zavisi od sorte i uslova kultivacije ječma (Schuster i sar., 1999).

Ukupni gubici tokom sladovanja pri proizvodnji svetlog slada ne treba da budu viši od 10,5% (Kunze, 1998). Analizirajući gubitke za ispitivane sorte ječma, može se zaključiti da sve ispitivane sorte ječma imaju ukupne gubitke niže od 10,5%. Sladovanjem sorte NS 583 ostvareni su najniži gubici (10,29%). Međutim, ova sorta je tokom močenja primila najmanje vlage što se može objasniti višim sadržajem proteina u odnosu na sorte NS 525 i NS 583.

### 4.3. Rezultati analiza slada

U Tabeli 4.3 prikazani su rezultati analize proizvedenih sladova koji su korišćeni za proizvodnje sladovina.

**Tabela 4.3. Rezultati analize proizvedenih sladova**

Parametar	NS 525	NS 565	NS 583
<b>Senzorna ocena</b>			
Boja zrna	žuta	žuta	žuta
Miris zrna	čist, specifičan	čist, specifičan	čist, specifičan
<b>Mehanička analiza</b>			
Masa 1000 zrna (g s. m.*)	34,63	34,79	34,91
Hektolitarska masa (kg/hl)	53,3	53,4	51,7
Prosečna staklastost (%)	0,0	0,0	0,0
<b>Hemijska analiza</b>			
Vlaga slada (%)	4,20	4,50	4,60
Ekstrakt fino mlevenog slada (% s.m.**)	78,12	77,49	75,41
❖ vreme ošecerenja (minuta)	do 10	do 10	do 10
❖ bistrina sladovine	bistra	bistra	bistra
❖ boja sladovine (EBC jedinica)	2,5	3,0	2,5
❖ miris sladovine	odgovarajući	odgovarajući	odgovarajući
❖ ukus sladovine	odgovarajući	odgovarajući	odgovarajući
❖ filtracija (minuta)	14	14	20
❖ pH sladovine	5,63	5,65	5,64
❖ rastvorljivi azot (mg/100ml)	77,63	72,38	77,98
❖ rastvorljivi azot (% s.m.)	0,69	0,64	0,69
❖ viskoznost (mPas, 8.6%e)	1,550	1,575	1,598
Ekstrakt grubi (% s.m.)	77,63	76,95	74,74
Razlika ekstrakta (% s.m.)	0,49	0,54	0,67
Proteini (% s.m.)	10,47	10,02	12,02
Kolbach-ov broj (% s.m.)	40,22	40,20	36,10
Hartong VZ 45°C (% s.m.)	36,39	36,26	35,09

\* g. s.m. – grama suve materije, \*\* % s.m. - % suve materije



Vlaga svetlog slada po JUS-u (1997) treba da bude najviše 5,5%. Proizvedeni slad ispitivanih sorti zadovoljava ovaj kriterijum. Na osnovu rezultata staklastosti svih proizvedenih sladova može se zaključiti da je staklastost ječma bila “dobročudna” i da je najverovatnije uzrokovana visokim temperaturama tokom sazrevanja i žetve ječma (Schuster i sar., 1999). Dobro razgrađen slad ima hektolitarsku masu ispod 55 kg (Schuster i sar., 1999) i svi ispitivani uzorci zadovoljavaju dati kriterijum. Masa 1000 zrna slada iznosi od 25 do 35 g suve materije i niža vrednost upućuje na bolje razgrađen slad (Schuster i sar., 1999). Proizvedeni sladovi imaju vrednosti mase 1000 zrna ispod 35 g suve materije, pa ovaj pokazatelj ukazuje da su proizvedeni sladovi dobro razgrađeni.

Ekstrakt slada predstavlja najvažniji ekonomski pokazatelj kvaliteta slada. Prosečne vrednosti za ekstrakt slada na suhu materiju su u granicama od 76-84% (Schuster i sar., 1999). Na osnovu rezultata za ekstrakt fino mlevenog slada datih u Tabeli 4.3, može se zaključiti da je slad NS 525 i NS 565 imao odgovarajući sadržaj ekstrakta, dok je slad NS 583 imao nešto niži sadržaj ekstrakta.

Vreme ošćerenja predstavlja aktivnost  $\alpha$ -amilaze u njemu, odnosno dijastatsku snagu slada. Za svetli slad uobičajene vrednosti su 10-15 minuta (Schuster i sar., 1999). Svi proizvedeni sladovi su imali odgovarajuće vreme ošćerenja (do 10 minuta).

Schuster i saradnici (1999) navode da je boja sladovine karakteristična za tipove slada. Za svetli slad je u granicama 2,5-4,5 jedinice EBC, a po JUS-u (1997) najviše 4,5 EBC jedinice. Ispitivani sladovi su imali boju sladovine 2,5 i 3,0 EBC jedinice.

Dobijene sladovine su bile bistre, što je znak dobre razgrađenosti slada i odgovarajućeg postupka sušenja. Miris, ukus i brzina filtracije sladovine su bili uobičajeni za svetli slad. pH vrednost sladovine za svetli slad je u granicama od 5,5-6,0 (JUS, 1997). Po ovom pokazatelju svi ispitivani sladovi zadovoljavaju navedeni standard.

Viskoznost kongresne sladovine preračunata na 8,6% ekstrakta je u granicama 1,4-1,9 mPas. Na viskoznost bitno utiču dekstrini i  $\beta$ -glukan, dok šećeri imaju manji uticaj (Sadosky i sar., 2002). Na osnovu vrednosti viskoznosti svih proizvedenih sladovina, sladovi su bili dobro razgrađeni.

U sladu sadržaj proteina ne sme da bude preko 10,5% na suhu materiju (Schuster i sar., 1999). Kao što se iz rezultata datih u Tabeli 4.3 može zapaziti sadržaj proteina u uzorcima NS 525 i NS 565 bio je odgovarajući, dok je u uzorku NS 583 bio povišen. Povišen sadržaj proteina u sladu NS 583 je uzrokovan visokim sadržajem proteina u ječmu.

Sadržaj rastvorljivog azota i Kolbach-ov broj predstavljaju stepen razgrađenosti proteina slada. Proizvedeni sladovi imali su sadržaj rastvorljivog azota NS 525 - 77,63; NS 565 - 72,38 i NS 583 - 77,98 mg/100ml i Kolbach-ov broj NS 525 - 40,22; NS 565 - 40,20 i NS 583 - 36,10%. Prema Kolbach-ovom broju udeo rastvorljivog azota u ukupnom azotu je dobar za sorte NS 525 i NS 565, dok je za sortu NS 583 zadovoljavajući (Schuster i sar., 1999).

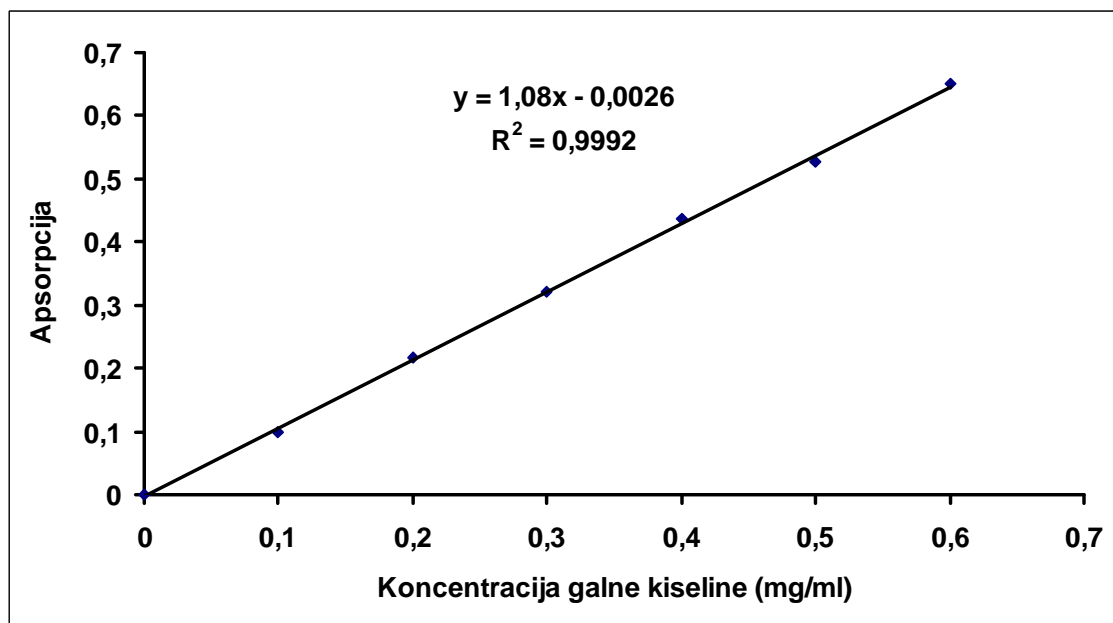
Razlika ekstrakta fino i grubo mlevenog slada predstavlja kriterijum citolitičke razgrađenosti i ocenjuje se prema odgovarajućoj skali, i na osnovu podatka u Tabeli 4.3, može se zaključiti da je razgrađenost svih proizvedenih sladova dobra (ispod 2,0% suve materije).

Hartong VZ 45°C ukazuje na aktivnosti svih enzima uz izuzetak  $\alpha$ -amilaze. Ako je sladovanje obavljeno dobro, ova vrednost se povećava paralelno sa porastom razgradnje proteina, takođe i sa sadržajem  $\alpha$ -aminoazota u kongresnoj sladovini. Uobičajena vrednost za Hartong VZ 45°C iznosi 36% i po ovom pokazatelju proizvedeni sladovi NS 525 i NS 565 zadovoljavaju kriterijum.

Na osnovu rezultata ispitivanih parametara datih u Tabeli 4.3 može se zaključiti da su proizvedeni sladovi dobro razgrađeni (na osnovu vremena ošecerenja, razlike ekstrakta, viskoznosti i Kolbach-ovog broja).

#### 4.4. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu

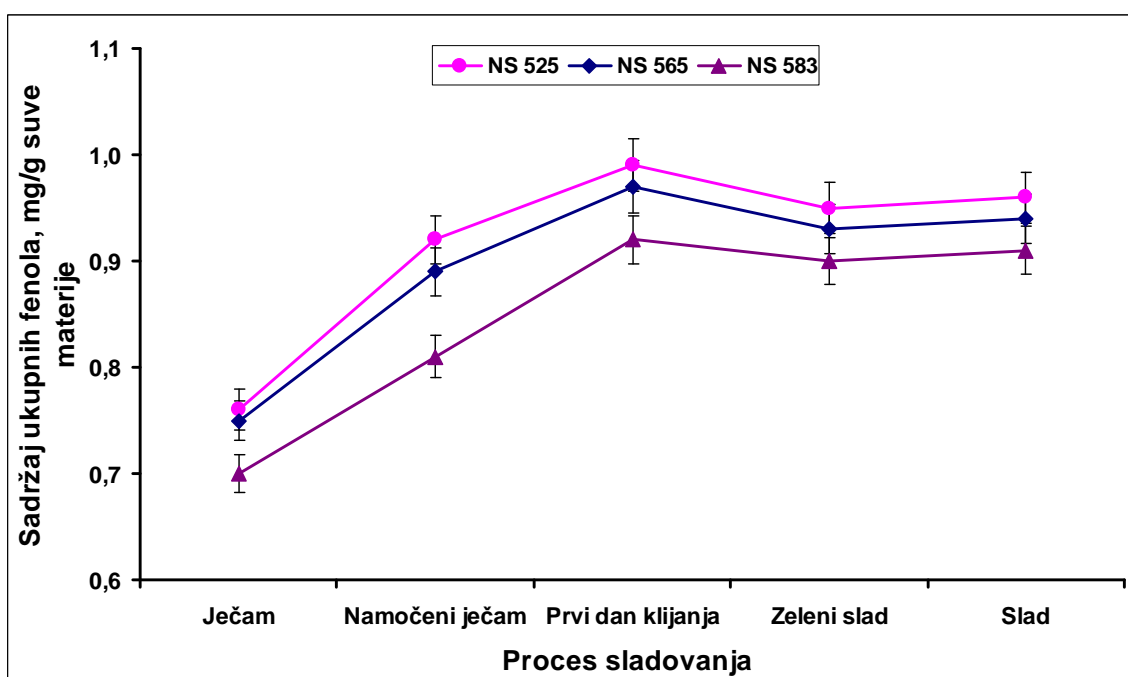
Pre određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorcima izvršena je kalibracija i kalibraciona kriva data je na Slici 4.1. Kalibracija je izvršena sa standardnim rastvorima galne kiseline. Na osnovu kalibracione krive i apsorbancije za ispitivane uzorke izračunat je sadržaj ukupnih fenola u uzorcima, a rezultati su izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g suve materije uzorka (ječma, namočenog ječma, zelenog slada i slada) ili mg ekvivalenta galne kiseline po 100 ml uzorka (sladovine, ohmeljene sladovine, sladovine tokom fermentacija, mladog piva i piva). Linearnost primenjene metode je bila zadovoljavajuća što se može zaključiti na osnovu koeficijenta determinacije koji je 0,9992.



**Slika 4.1. Kalibracija standardnih rastvora galne kiseline**

Tri sorte ječma, NS 525, NS 565 i NS 583 su sladovane i praćene su promene u sadržaju ukupnih fenola (TPC) i rezultati su prikazani na Slici 4.2. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ječma su bili 0,76, 0,75 i 0,70 mg GAE/g suve materije za NS 525, NS 565 i NS 583. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Ragaee i saradnika (2006) koji su u ječmu odredili sadržaj ukupnih fenola od 0,879 mg GAE/g suve materije, ali su niži od rezultata koje su dobili Maillard i saradnici (1996) i Zhao i saradnici (2008). Ova razlika je možda zbog različitih sorti ječma ili primenjenih metoda ekstrakcije. Tokom moćenja sadržaj ukupnih fenola se povećao za 21,05%, 18,67% i 18,57% za NS 525, NS 565 i NS 583. U toku prvog dana klijanja sadržaj ukupnih fenola se povisio za 7,61%, 8,99% i 13,58% za NS 525, NS 565 i NS 583. Tokom klijanja, sadržaj ukupnih fenola se blago snizio u svim uzorcima ječma. Sadržaj ukupnih fenola se povisio tokom sušenja

svih ispitivanih sorti ječma za: 1,05%, 1,07% i 1,11% za NS 525, NS 565 i NS 583. Sadržaj ukupnih fenola u svim proizvednim sladovima (0,96; 0,94 i 0,91 mg GAE/g suve materije za NS 525; NS 565 i NS 583) je bio viši od sadržaja u ječmu, što je skladu sa rezultatima koje su dobili Maillard i saradnici (1996) i Dvořákova i saradnici (2008). Ako je slad dobro razgrađen, sadrži više rastvorljivih polifenola, antocijanidina i tanina (Schuster i sar., 1988). Svi proizvedeni sladovi su sadržali više ukupnih fenola u odnosu na ječam iz kojeg su proizvedeni što upućuje na zaključak da su zrna ječma tokom proizvodnje slada dobro razgrađena pri čemu su se fenolna jedinjenja najverovatnije oslobodila iz vezanog oblika. Pokazatelji dobre razgrađenosti slada dati u Tabeli 4.3 doprinose ovom zaključku. Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola tokom svih faza sladovanja, dok su sorte NS 565 i NS 583 imale niže sadržaje ukupnih fenola. Najniži sadržaj ukupnih fenola imala je sorta NS 583.

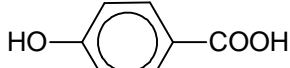
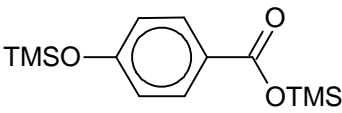
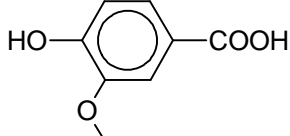
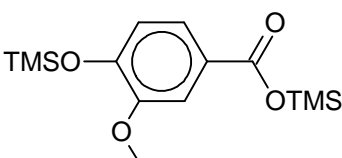
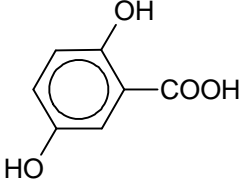
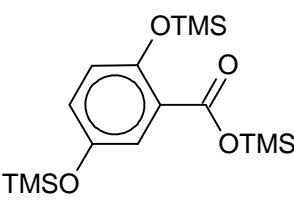
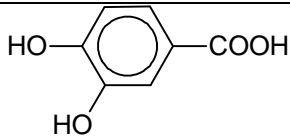
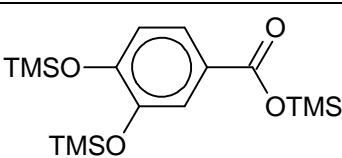
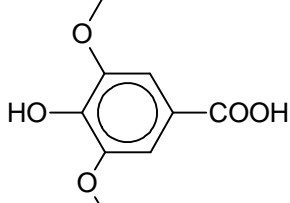
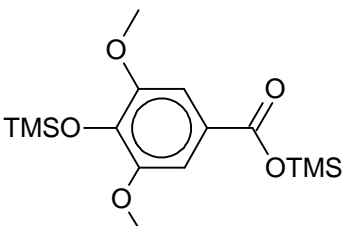
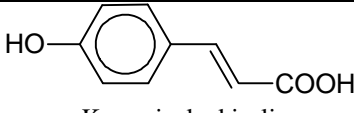
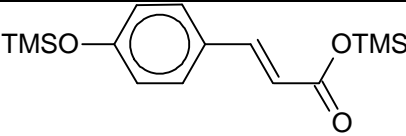
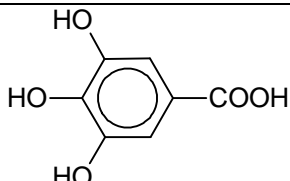
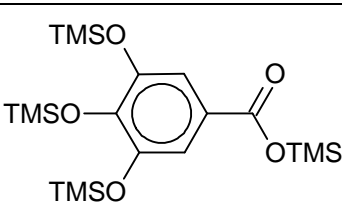
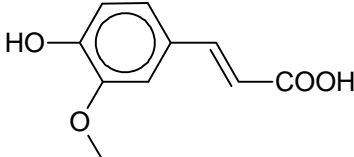
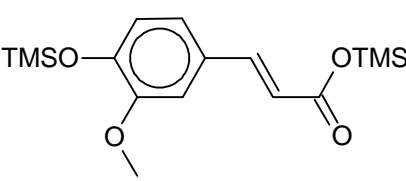


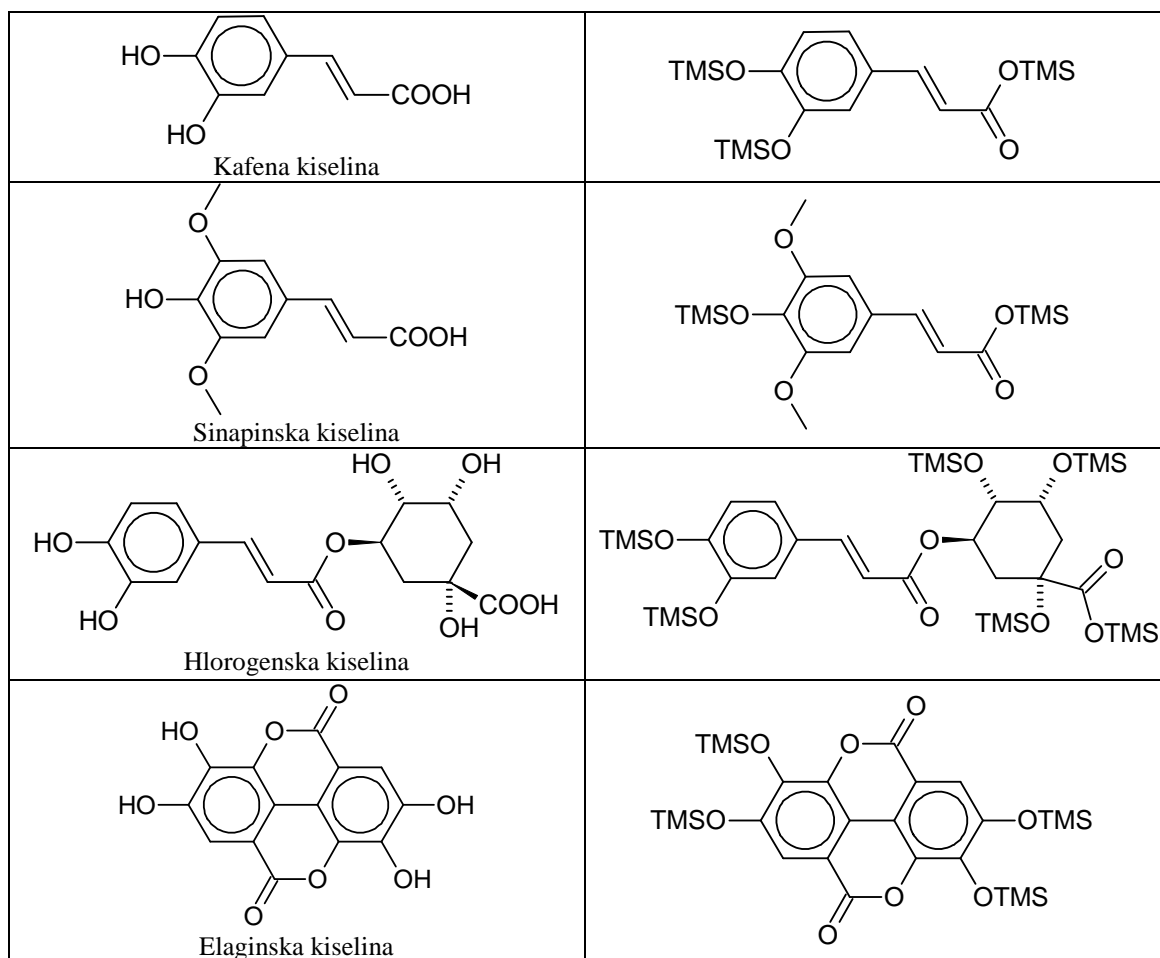
**Slika 4.2.** Promena sadržaja ukupnih fenola tokom procesa sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583. Vertikalne linije predstavljaju standardnu devijaciju ( $n=3$ ) za svaku vrednost.

#### 4.5. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu

Strukture ispitivanih fenolnih kiselina i njihovih odgovarajućih trimetilsilil (TMS) derivata dati su u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Strukture ispitivanih fenolnih kiselina i njihovih odgovarajućih trimetilsilil derivata

Fenolna kiselina	Trimetilsilil derivat (TMS) fenolne kiseline
 <p><i>p</i>-Hidroksibenzoeva kiselina</p>	
 <p>Vanilinska kiselina</p>	
 <p>Gentistinska kiselina</p>	
 <p>Protokatehinska kiselina</p>	
 <p>Siringinska kiselina</p>	
 <p><i>p</i>-Kumarinska kiselina</p>	
 <p>Galna kiselina</p>	
 <p>Ferulna kiselina</p>	



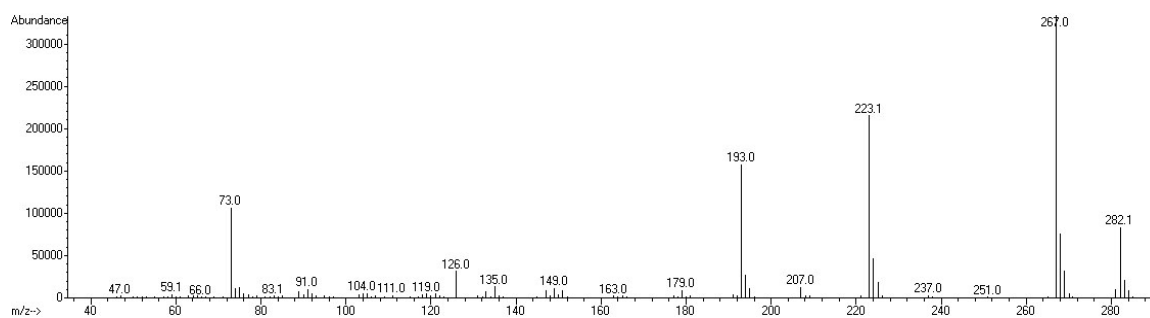
Detekcija je izvedena u SIM („selective ion monitoring“) modu i pikovi su identifikovani i kvantifikovani pomoću retencionih vremena i karakterističnih jona datih u Tabeli 4.5.

**Tabela 4.5. Retenciona vremena i karakteristični joni prisutni u masenim spektrima siliranih (TMS) derivata<sup>a</sup> u standardnim rastvorima i dobijenim ekstraktima**

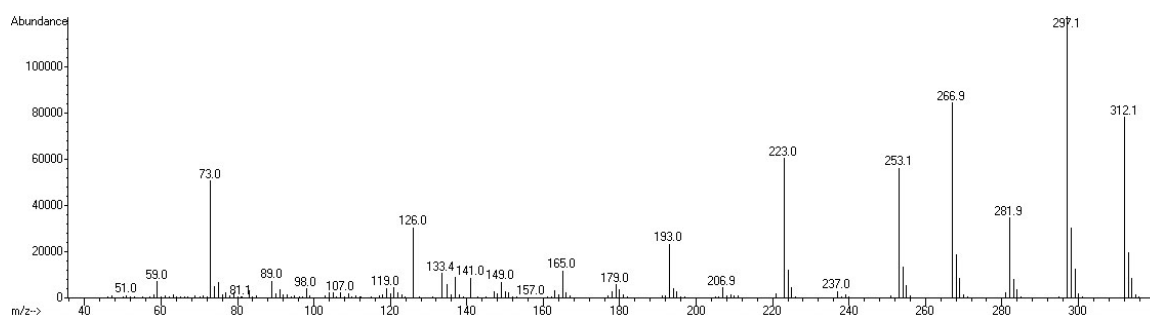
Fenolna kiselina	Retenciono vreme (min) <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)	Karakteristični joni
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	16,160±0,001	0,005	267,00; 223,10
Vanilinska	17,856±0,001	0,004	297,10; 267,00
Gentistinska	18,042±0,023	0,127	355,10; 356,10
Protokatehinska	18,543±0,001	0,003	193,00; 370,10
Siringinska	19,421±0,004	0,021	327,10; 342,10
<i>p</i> -Kumarinska	19,825±0,001	0,003	293,10; 219,00
Galna	20,151±0,001	0,006	458,20; 281,00
Ferulna	21,458±0,001	0,004	338,10; 323,10
Kafena	21,934±0,001	0,004	396,10; 219,00
Sinapinska	22,958±0,001	0,003	368,10; 338,10
Hlorogenska	32,797±0,005	0,014	345,10; 255,10
Elaginska	36,283±0,014	0,039	590,20; 575,20
<i>p</i> -Aminobenzoeva (IS)	18,629±0,024	0,130	267,00; 193,00

<sup>a</sup> Identifikovani kao trimetilsilil (TMS) derivati, <sup>b</sup> Svaka vrednost je srednje retenciono vreme ± standardna devijacija (SD), <sup>c</sup> RSD = SD/srednja vrednost × 100

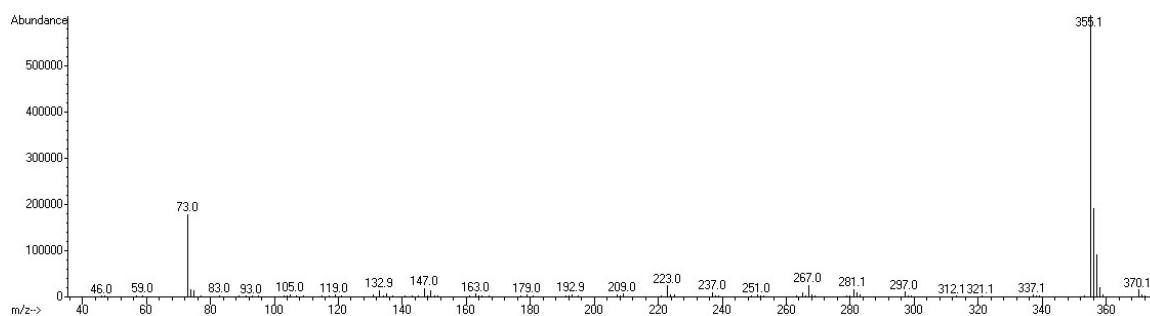
Na Slikama 4.3-4.14 dati su maseni spektri trimetilsilil (TMS) derivata *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne, ferulne, kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline.



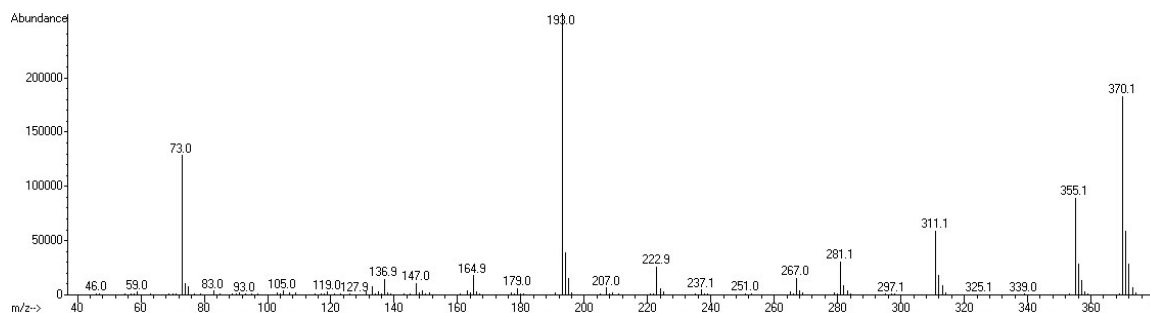
**Slika 4.3. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata *p*-hidroksibenzoeve kiseline**



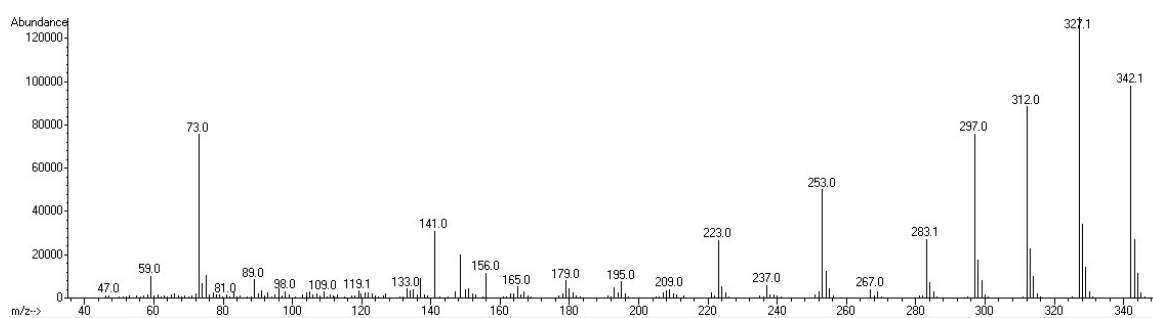
**Slika 4.4. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata vanilinske kiseline**



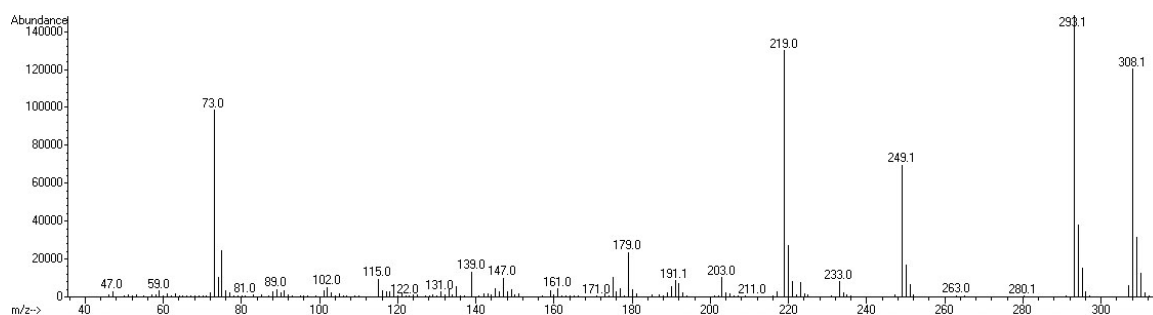
**Slika 4.5. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata gentistinske kiseline**



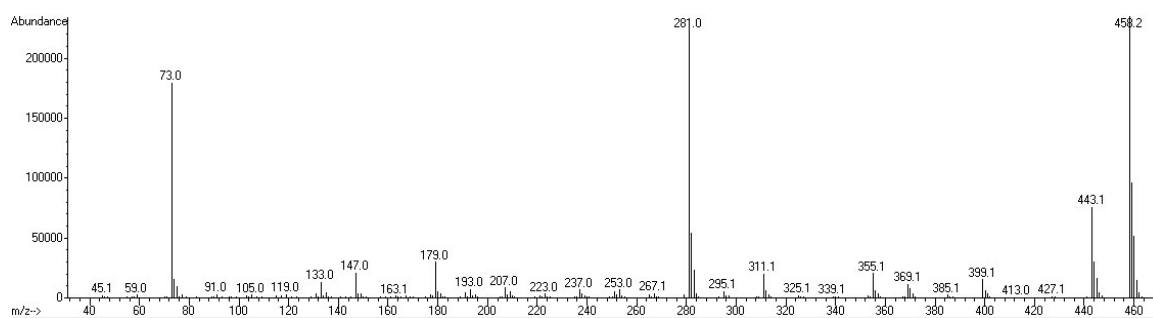
**Slika 4.6. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata protokatehinske kiseline**



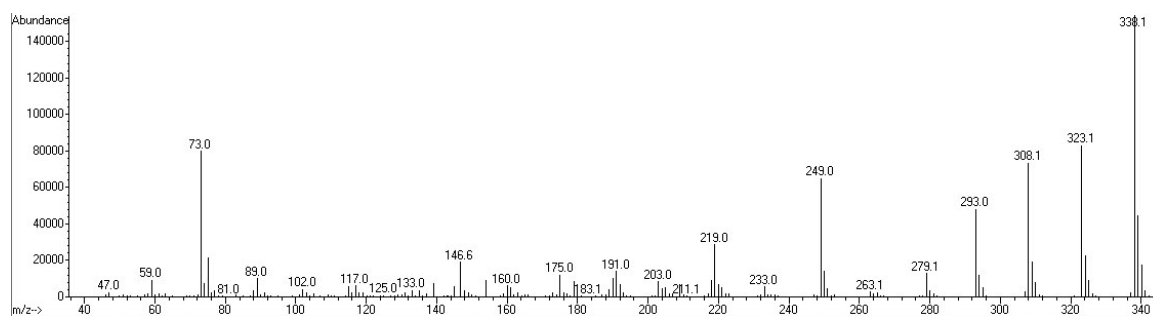
Slika 4.7. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata siringinske kiseline



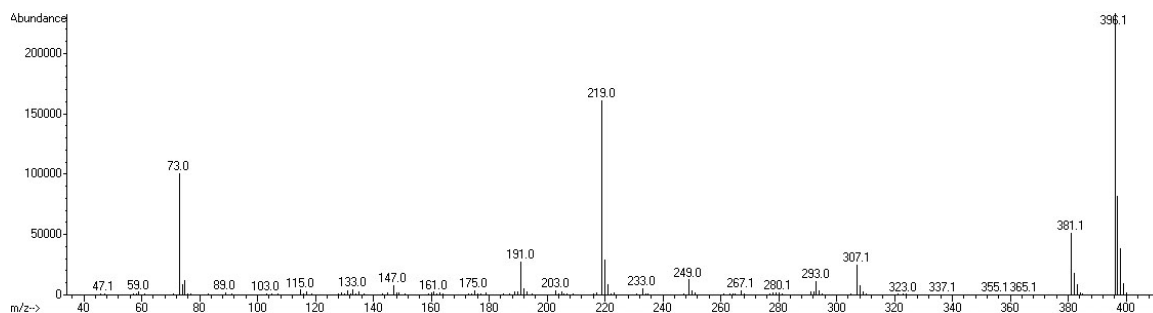
Slika 4.8. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata p-kumarinske kiseline



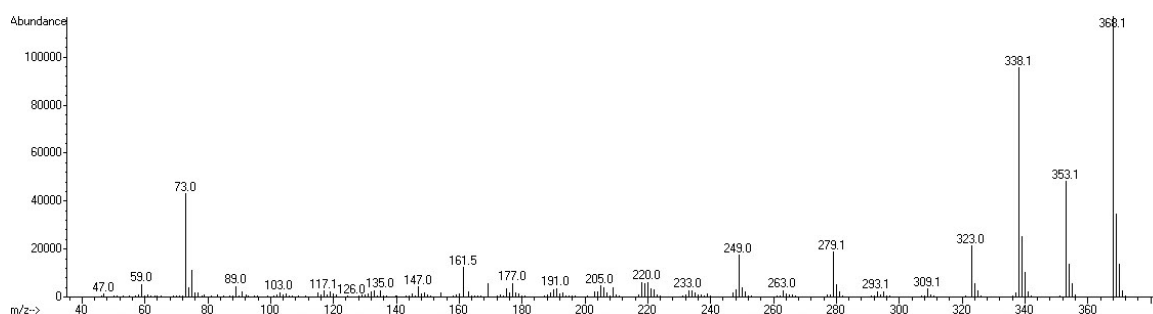
Slika 4.9. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata galne kiseline



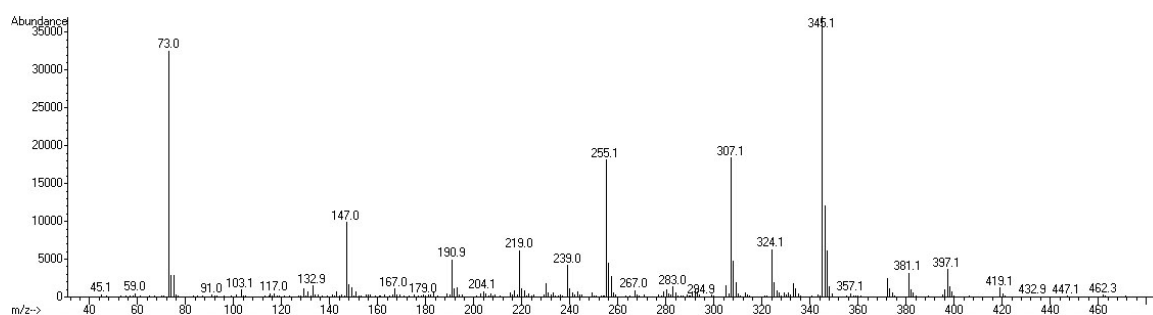
Slika 4.10. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata ferulne kiseline



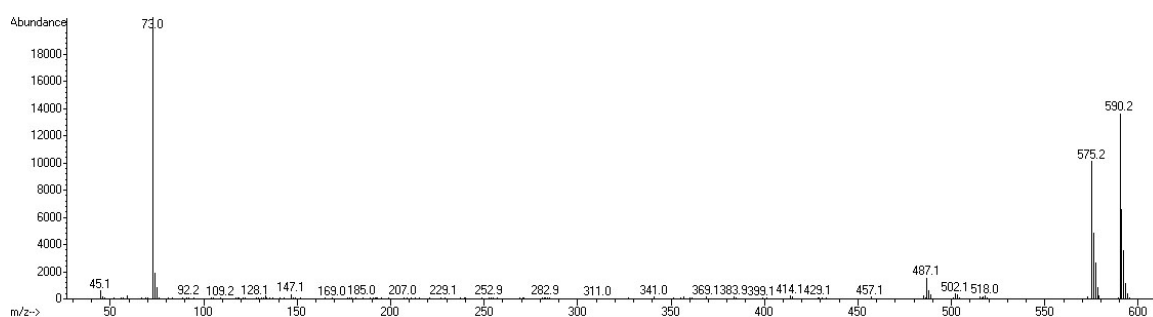
**Slika 4.11. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata kafene kiseline**



**Slika 4.12. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata sinapske kiseline**



**Slika 4.13. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata hlorogenske kiseline**



**Slika 4.14. Maseni spektar trimetilsilil (TMS) derivata elaginske kiseline**

Analički parametri GC-MS (SIM) metode su dati u Tabeli 4.6.



Tabela 4.6. Analitički parametri GC-MS (SIM) metode

Fenolna kiselina	Kalibraciona kriva		R <sup>2a</sup>	LOD <sup>b</sup> (µg/ml)	LOQ <sup>c</sup> (µg/ml)
	Nagib	Odsečak			
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	3,628	-0,213	0,9997	0,004	0,013
Vanilinska	2,302	-0,183	0,9997	0,016	0,051
Gentistinska	10,117	0,364	0,9981	0,005	0,015
Protokatehinska	4,752	0,011	0,9988	0,005	0,015
Siringinska	2,152	-0,101	0,9995	0,021	0,063
<i>p</i> -Kumarinska	2,763	-0,210	0,9994	0,013	0,040
Galna	3,293	-0,311	0,9997	0,011	0,032
Ferulna	2,594	-0,299	0,9993	0,023	0,070
Kafena	3,553	-0,429	0,9992	0,016	0,050
Sinapinska	2,163	-0,254	0,9991	0,033	0,100
Hlorogenska	0,984	-0,449	0,9910	0,071	0,212
Elaginska	1,170	-0,437	0,9961	0,072	0,214

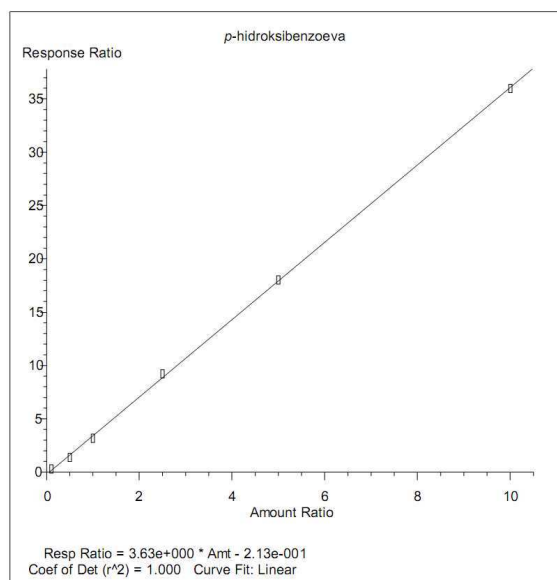
<sup>a</sup> Koeficijent determinacije. Izračunat na osnovu tri ponavljanja.

<sup>b</sup> Limit detekcije

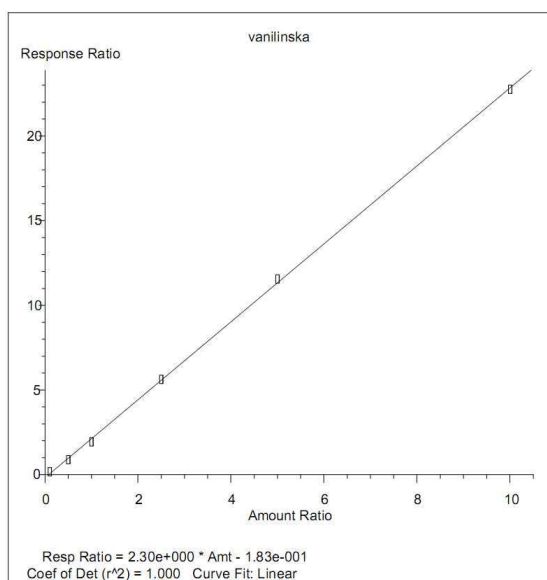
<sup>c</sup> Limit kvantifikacije

Linearnost optimizovane GC-MS (SIM) metode je bila odlična što se može zaključiti na osnovu koeficijenata determinacije koji su bili viši od 0,9900 tokom postupka validacije metode.

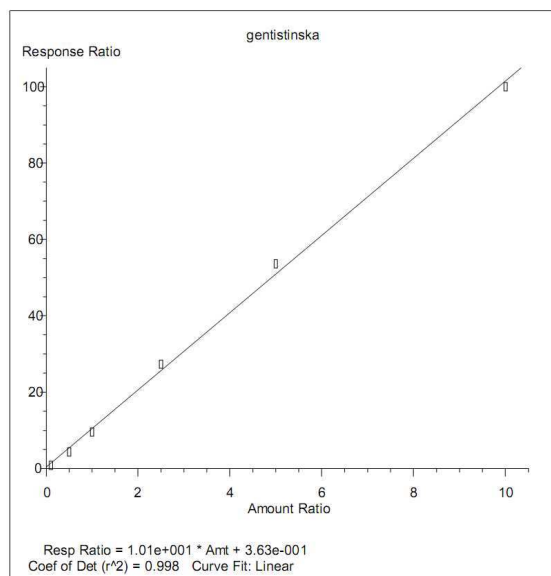
Rezultati kalibracije za ispitivane fenolne kiseline dati su na Slikama 4.15-4.26.



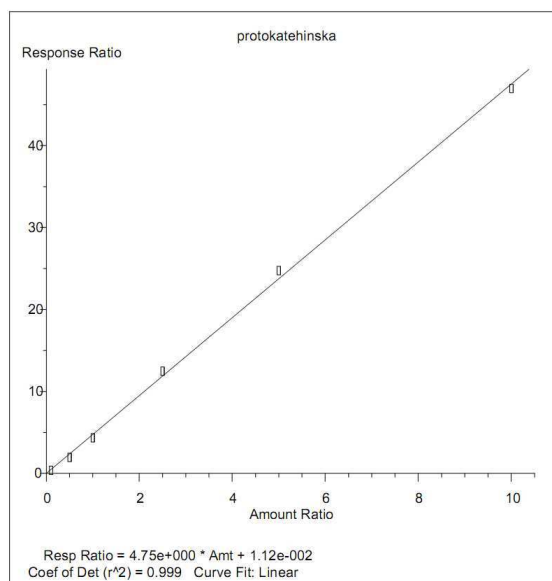
Slika 4.15. Kalibracija za *p*-hidroksibenzoevu kiselinu



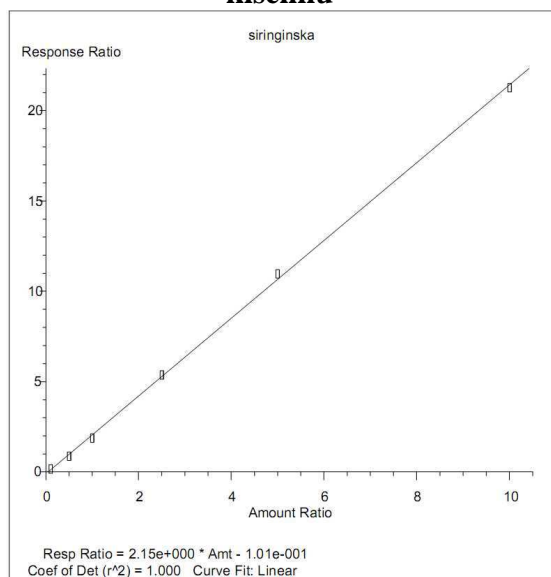
Slika 4.16. Kalibracija za vanilinsku kiselinu



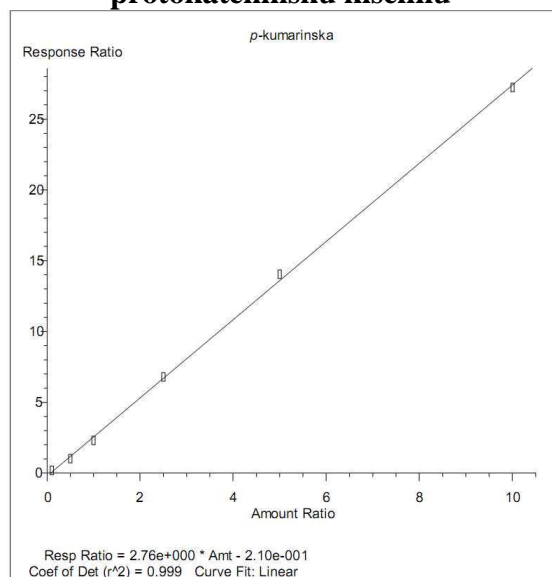
**Slika 4.17. Kalibracija za gentistinsku kiselinu**



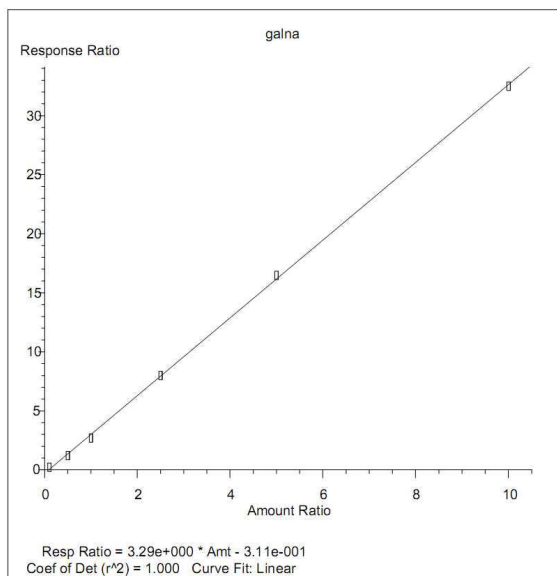
**Slika 4.18. Kalibracija za protokatehinsku kiselinu**



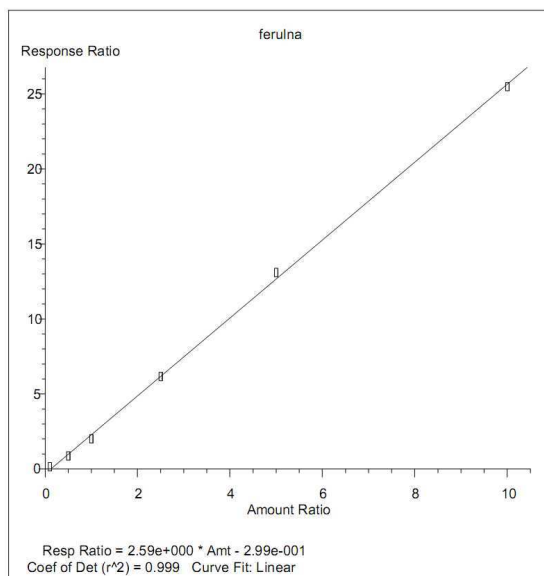
**Slika 4.19. Kalibracija za siringinsku kiselinu**



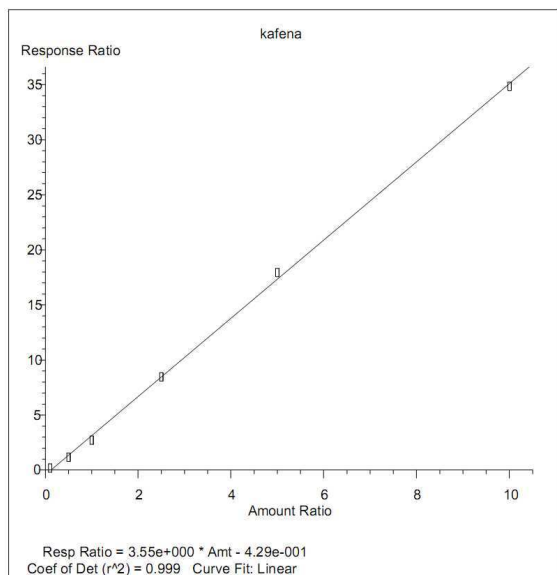
**Slika 4.20. Kalibracija za p-kumarinsku kiselinu**



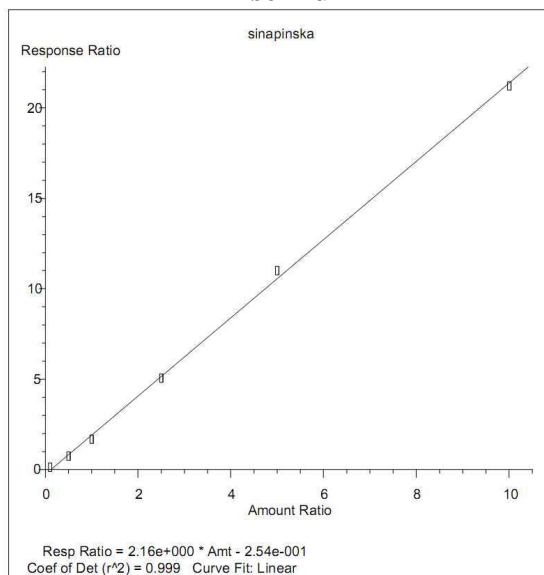
Slika 4.21. Kalibracija za galnu kiselinu



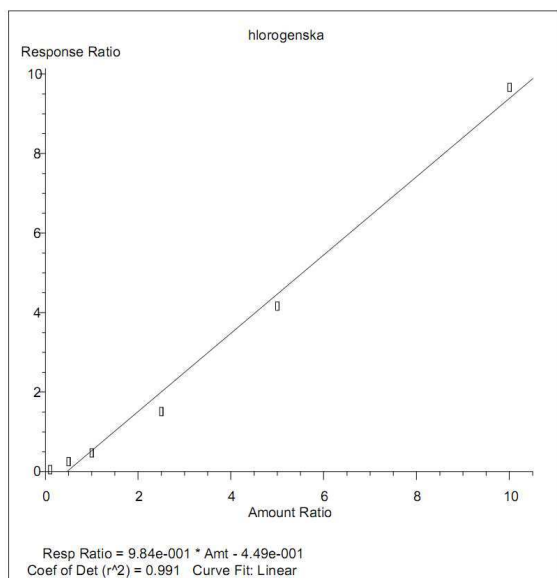
Slika 4.22. Kalibracija za ferulnu kiselinu



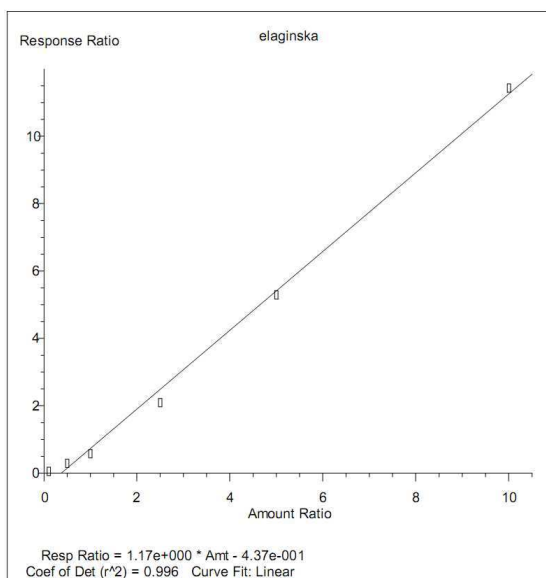
Slika 4.23. Kalibracija za kafenu kiselinu



Slika 4.24. Kalibracija za sinapinsku kiselinu



**Slika 4.25. Kalibracija za hlorogensku kiselinu**



**Slika 4.26. Kalibracija za elaginsku kiselinu**

Optimizacija pripreme uzorka ječma NS 525 za određivanje sadržaja fenolnih kiselina, obuhvatala je primenu dva postupka hidrolize (sa i bez dodatka enzima Termamyl SC i Celluclast). Viši sadržaji fenolnih kiselina postignuti su hidrolizom sa kiselinom, Termamyl-om SC i Celluclast-om (Tabela 4.7), pa je ovaj postupak hidrolize primenjivan u daljem radu (u Poglavlju 3.2.8 su detaljno opisani uslovi hidrolize). Ovaj postupak hidrolize kiselinom uz dodatak enzima Termamyl SC i Celluclast primenjivan je za hidrolizu svih uzoraka ječma, namočenog ječma, zelenog slada i slada.

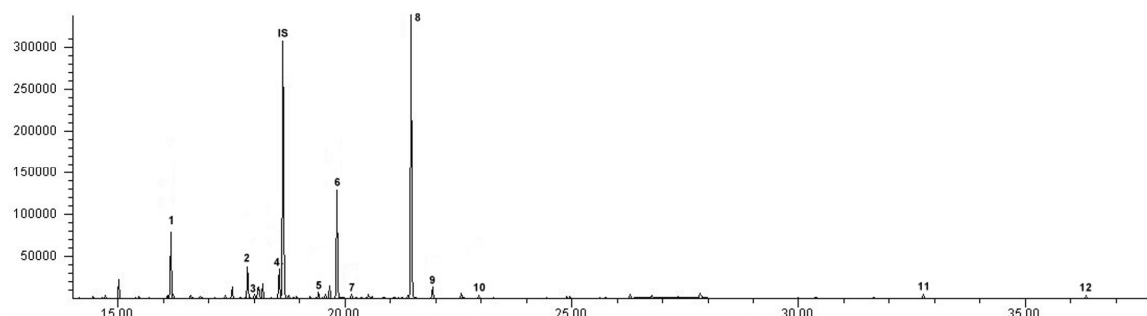
**Tabela 4.7. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u uzorku ječma NS 525 hidrolizovanom kiselinom i kiselinom, Termamyl-om SC i Celluclast-om<sup>a</sup>**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$ suve materije)	
	Hidroliza kiselinom	Hidroliza kiselinom, Termamyl-om i Celluclast-om
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	2,50 $\pm$ 0,11	3,16 $\pm$ 0,06
Vanilinska	10,89 $\pm$ 0,23	14,06 $\pm$ 0,04
Gentistinska	n.d. <sup>b</sup>	1,07 $\pm$ 0,03
Protokatehinska	2,52 $\pm$ 0,09	5,87 $\pm$ 0,16
Siringinska	4,95 $\pm$ 0,14	8,03 $\pm$ 0,21
<i>p</i> -Kumarinska	17,02 $\pm$ 0,28	23,79 $\pm$ 0,19
Galna	n.d. <sup>b</sup>	3,86 $\pm$ 0,11
Ferulna	120,33 $\pm$ 0,36	126,03 $\pm$ 0,20
Kafena	4,95 $\pm$ 0,18	7,04 $\pm$ 0,13
Sinapinska	2,97 $\pm$ 0,09	4,29 $\pm$ 0,11
Hlorogenska	n.d. <sup>b</sup>	0,97 $\pm$ 0,04
Elaginska	n.d. <sup>b</sup>	2,81 $\pm$ 0,07

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

<sup>b</sup> n.d. - Nije detektovana

U cilju praćenja promena u sadržaju fenolnih kiselina tokom sladovanja, njihovo prisustvo je određeno GC-MS metodom. Dvanaest fenolnih kiselina: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, gentistinska, protokatehinska, siringinska, *p*-kumarinska, galna, ferulna, kafena, sinapinska, hlorogenska i elaginska je identifikovano i kvantifikovano. Tipičan GC-MS (SIM mod) hromatogram ekstrakta dobijenog prvog dana klijanja sorte NS 525 dat je na Slici 4.27. Promene sadržaja fenolnih kiselina tokom sladovanja date su u Tabelama 4.8-4.10.



**Slika 4.27.** GC-MS (SIM mod) hromatogram ekstrakta dobijenog prvog dana klijanja sorte ječma NS 525. Pikovi: 1. *p*-hidroksibenzoeva, 2. vanilinska, 3. gentistinska, 4. protokatehinska, 5. siringinska, 6. *p*-kumarinska, 7. galna, 8. ferulna, 9. kafena, 10. sinapinska, 11. hlorogenska i 12. elaginska kiselina; IS – interni standard (*p*-aminobenzoeva kiselina)

**Tabela 4.8.** Promena sadržaja individualnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte ječma NS 525<sup>a</sup>

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (µg/g suve materije)				
	Ječam	Namočeni ječam	Prvi dan klijanja	Zeleni slad	Slad
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	3,16±0,06	28,30±0,36	35,94±0,17	49,09±0,85	26,84±0,35
Vanilinska	14,06±0,04	33,04±0,14	36,91±0,21	25,16±0,38	31,82±0,15
Gentistinska	1,07±0,03	3,21±0,12	3,41±0,10	3,29±0,14	1,64±0,13
Protokatehinska	5,87±0,16	15,44±0,22	18,76±0,31	16,02±0,24	17,79±0,13
Siringinska	8,03±0,21	11,83±0,26	12,27±0,12	14,19±0,44	11,13±0,23
<i>p</i> -Kumarinska	23,79±0,19	85,14±0,41	118,56±0,53	45,22±0,19	59,21±0,13
Galna	3,86±0,11	4,94±0,15	5,08±0,14	4,67±0,13	4,95±0,14
Ferulna	126,03±0,20	173,35±0,58	283,03±0,28	247,21±0,61	259,53±0,41
Kafena	7,04±0,13	7,24±0,23	14,46±0,35	8,05±0,24	10,23±0,12
Sinapinska	4,29±0,11	6,78±0,18	12,16±0,17	7,92±0,25	8,15±0,19
Hlorogenska	0,97±0,04	3,46±0,10	3,54±0,12	3,27±0,11	3,43±0,03
Elaginska	2,81±0,07	2,98±0,10	4,19±0,15	2,36±0,07	3,48±0,02
<b>Ukupno</b>	<b>200,98</b>	<b>375,71</b>	<b>548,31</b>	<b>426,45</b>	<b>438,20</b>

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

**Tabela 4.9. Promena sadržaja individualnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte ječma NS 565<sup>a</sup>**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (µg/g suve materije)				
	Ječam	Namočeni ječam	Prvi dan klijanja	Zeleni slad	Slad
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	2,56±0,04	24,16±0,22	33,73±0,18	45,28±0,13	21,19±0,10
Vanilinska	10,76±0,15	28,68±0,63	30,34±0,37	24,13±0,21	27,98±0,14
Gentistinska	0,84±0,02	3,24±0,10	3,57±0,13	3,33±0,15	1,41±0,06
Protokatehinska	3,98±0,04	12,93±0,34	14,16±0,18	11,89±0,24	12,21±0,17
Siringinska	5,38±0,15	11,35±0,32	11,97±0,28	13,15±0,24	9,98±0,17
<i>p</i> -Kumarinska	22,91±0,53	70,86±0,23	99,29±0,35	40,21±0,19	53,55±0,15
Galna	2,63±0,08	4,17±0,15	5,02±0,14	4,23±0,15	4,82±0,10
Ferulna	121,81±0,24	193,34±0,46	288,78±1,17	237,37±0,70	253,46±0,42
Kafena	6,99±0,16	9,89±0,19	14,09±0,44	8,88±0,22	9,52±0,29
Sinapinska	4,19±0,13	9,34±0,24	11,43±0,06	6,15±0,17	6,92±0,13
Hlorogenska	0,91±0,05	3,46±0,11	3,76±0,19	3,48±0,18	3,59±0,13
Elaginska	1,14±0,01	2,31±0,08	2,51±0,10	2,39±0,05	2,42±0,12
<b>Ukupno</b>	<b>184,10</b>	<b>373,73</b>	<b>518,65</b>	<b>400,49</b>	<b>407,05</b>

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

**Tabela 4.10. Promena sadržaja individualnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte ječma NS 583<sup>a</sup>**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (µg/g suve materije)				
	Ječam	Namočeni ječam	Prvi dan klijanja	Zeleni slad	Slad
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	2,61±0,08	26,11±0,21	34,54±0,25	45,25±0,73	27,19±0,73
Vanilinska	10,18±0,10	27,01±0,18	37,21±0,23	30,21±0,29	32,66±0,17
Gentistinska	0,65±0,04	3,27±0,09	3,34±0,18	3,08±0,11	1,47±0,04
Protokatehinska	4,67±0,12	15,62±0,28	17,01±0,30	12,84±0,19	15,93±0,18
Siringinska	5,31±0,14	9,46±0,20	11,24±0,27	12,87±0,25	9,67±0,07
<i>p</i> -Kumarinska	21,15±0,56	79,24±1,06	113,65±1,14	46,17±0,81	59,18±0,70
Galna	2,96±0,07	3,64±0,12	4,97±0,14	4,68±0,08	4,56±0,06
Ferulna	117,24±0,42	180,35±0,55	265,55±0,65	219,17±0,32	226,98±0,79
Kafena	6,72±0,22	8,99±0,24	13,16±0,49	8,06±0,30	7,89±0,26
Sinapinska	4,15±0,12	6,13±0,23	10,52±0,32	6,55±0,19	6,73±0,27
Hlorogenska	0,87±0,04	3,48±0,13	3,59±0,16	4,93±0,20	3,33±0,12
Elaginska	0,76±0,03	2,32±0,08	2,39±0,11	2,12±0,12	1,88±0,11
<b>Ukupno</b>	<b>177,27</b>	<b>365,62</b>	<b>517,17</b>	<b>395,93</b>	<b>397,47</b>

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

U svim ispitivanim sortama ječma ferulna, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina su bile dominantne u uzorcima ječma, tokom sladovanja i u proizvedenom sladu. Andersson i saradnici (2008) su takođe utvrdili u 10 ispitivanih sorti ječma da su ferulna, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina dominantne u ječmu. Takođe, su utvrdili da je sadržaj ukupnih vezanih fenolnih kiselina niži u ozimom dvoredom ječmu u odnosu na jari dvoredi ječam. Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima ječma sorti NS 525, NS 565 i NS 583 je bio 126,03, 121,81 i 117,24 µg/g suve materije. Sadržaji *p*-kumarinske i vanilinske kiseline u sorti NS 525 su iznosili 23,79 i 14,06, u NS 565 22,91 i 10,76 i u NS 583 21,15 i 10,18 µg/g suve materije. Sadržaji ferulne i *p*-kumarinske kiseline u uzorcima ječma su u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Yu i saradnici (2001). Holtekjølen i saradnici su (2006) su u dvoredom pivskom ječmu odredili znatno više sadržaje *p*-kumarinske i

ferulne kiseline, ali primenom drugačije pripreme uzoraka. Ferulna kiselina je fenolna kiselina najviše prisutna u svim žitaricama i uglavnom se nalazi u vezanom obliku (Adom i Liu, 2002). Određeni sadržaji kafene kiseline, od 6,72 do 7,04  $\mu\text{g/g}$  suve materije su u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Hernanz i saradnici (2001). Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u uzorcima ječma su iznosili: NS 525 – 200,98; NS 565 – 184,10 i NS 583 – 177,77  $\mu\text{g/g}$  suve materije što pokazuje da sadržaj fenolnih kiselina zavisi od sorte ječma što su pokazali i Mikyška i saradnici (2005).

Tokom močenja i na početku klijanja, sadržaji ispitivanih fenolnih kiselina, u svim uzorcima ječma su se povisili. Porast sadržaja određen je kod svih ispitivanih fenolnih kiselina i to: *p*-hidroksibenzoeve (od 11,37 za NS 525 do 13,23 puta za NS 583), *p*-kumarinske (od 4,98 puta za NS 525 do 5,37 puta za NS 583), gentistinske (3,20 puta za NS 525 do 5,14 puta za NS 583), hlorogenske (3,65 puta za NS 525 i 4,13 puta za NS 565 i NS 583), protokatehinske (od 3,19 puta za NS 525 do 3,64 puta za NS 583), vanilinske (od 2,62 puta za NS 525 do 3,65 puta za NS 583), ferulne (od 2,25 puta za NS 525 do 2,26 puta za NS 583), kafene (2,05 puta za NS 525 i NS 565, dok kod NS 583 za 1,95 puta) i galne (1,32 puta za NS 525 do 1,91 puta za NS 565) kiseline. Sve ispitivane kiseline sem siringinske i *p*-hidroksibenzoeve su imale maksimalan sadržaj u prvom danu klijanja. Siringinska i *p*-hidroksibenzoeva su dostigle maksimalni sadržaj u zelenom sladu.

Chandra (2002) objašnjava porast sadržaja fenolnih jedinjenja tokom klijanja kao posledicu modifikacije endosperma i proteolize. Aktivnosti enzima koji razgrađuju  $\beta$ -glukane i arabinoksilane rastu tokom klijanja ječma. U ječmu je prisutna i esteraza ferulne kiseline (Sancho i sar., 1999). Humberstone i Briggs (2000) su pokazali da aktivnost esteraze ferulne kiseline raste tokom prvih dana klijanja (od prvog do trećeg) nakon čega ostaje konstantna. Esteraza ferulne kiseline oslobađa ferulnu kiselinu vezanu za arabinoksilane i samim tim sadržaj ferulne kiseline raste tokom prvih dana klijanja. Sadržaj fenolnih kiselina, osim siringinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline, se snizio na kraju klijanja.

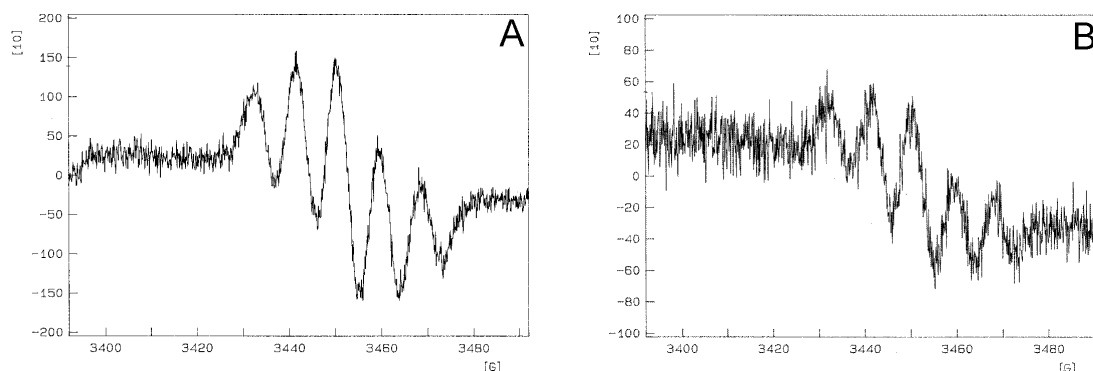
Maillard i Baret (1995) su pokazali porast ukupnog sadržaja fenolnih kiselina, ferulne i *p*-kumarinske kiseline tokom sušenja zelenog slada na temperaturama od 50 do 80°C. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u proizvedenim sladovima je bio 2,18 za NS 525, 2,21 za NS 565 i 2,24 za NS 583 puta viši od sadržaja u ječmu. Od ispitivanih fenolnih kiselina ferulna ima najviši sadržaj i nalazi se u vezanom obliku u ječmu što je u skladu sa literaturnim podacima (Bonoli i sar., 2004; Dvořáková i sar., 2008). Neki enzimi su aktivni tokom prvog dela sušenja i kako sušenje teče neki od njih se delimično ili potpuno denaturišu, u zavisnosti od njihove termostabilnosti i intenziteta toplotnog tretmana. Međutim, neki enzimi su termostabilni kao esteraza ferulne kiseline. Ovaj enzim može da „oslobodi“ ferulnu kiselinu iz ćelijskih zidova ječma što dovodi do porasta sadržaja ferulne kiseline u sladu (Samaras i sar., 2005a).

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ječmu je iznosio za sortu NS 525 - 200,98; NS 565 - 184,10 i za NS 583 – 177,27  $\mu\text{g/g}$  suve materije. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je rastao kod svih ispitivanih sorti tokom močenja i dostigao maksimum u toku prvog klijanja za NS 525 – 548,31; NS 565 – 518,65 i NS 583 – 517,17  $\mu\text{g/g}$  suve materije, što znači da je sadržaj povećan za 2,72 puta sa sortu NS 525, 2,81 puta za sortu NS 565 i 2,92 puta za sortu NS 583. U toku klijanja i na kraju klijanja sadržaj ukupnih fenolnih kiselina se smanjivao. U toku sušenja se sadržaj ukupnih fenolnih kiselina neznatno povećao.

Dobijeni rezultati su pokazali da je proces sladovanja imao značajan uticaj na sadržaj pojedinačnih i ukupnih fenolnih kiselina. Povišeni sadržaji fenolnih kiselina mogu se objasniti razgradnjom složenih jedinjenja za koje su fenolne kiseline vezane (usled delovanja amilaza, proteaza i  $\beta$ -glukanaza) i boljom ekstrakcijom.

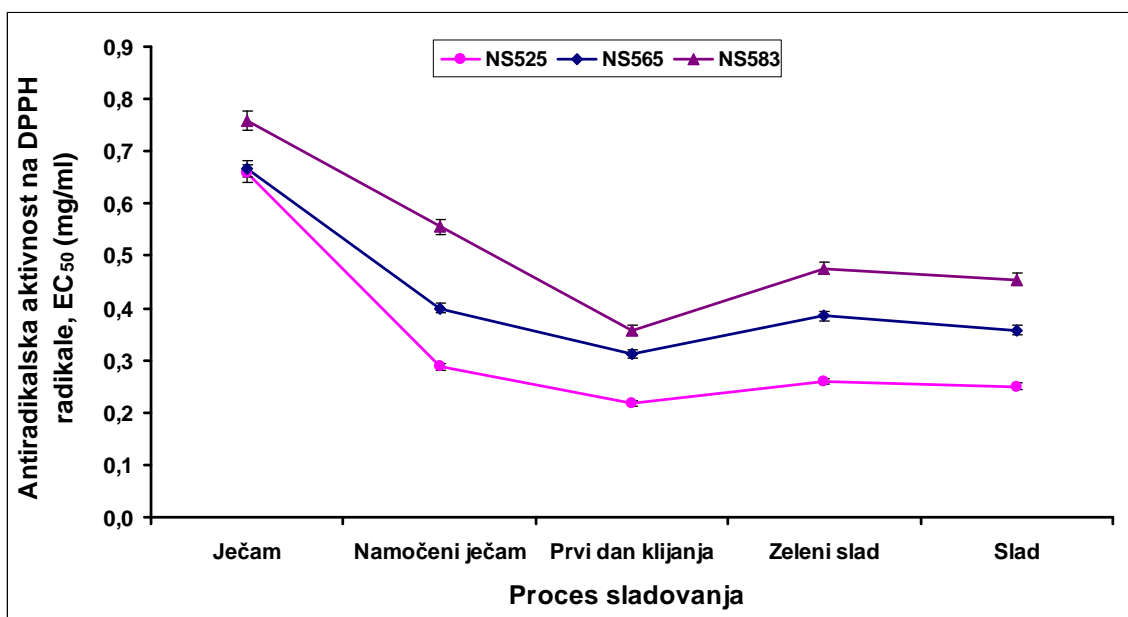
#### 4.6. Rezultati antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu i sladu

Primeri tipičnih spektara DPPH radikala bez (slepa proba) i sa ekstraktom su dati na Slici 4.28. DPPH radikal daje karakterističan ESR spektar koji se sastoji iz pet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja iznosi  $a_N=9,03$  (Četković i sar., 2004).



Slika 4.28. ESR spektri DPPH radikala A) bez ekstrakta (slepa proba), B) sa ekstraktom dobijenim prvog dana klijanja ječma NS 525

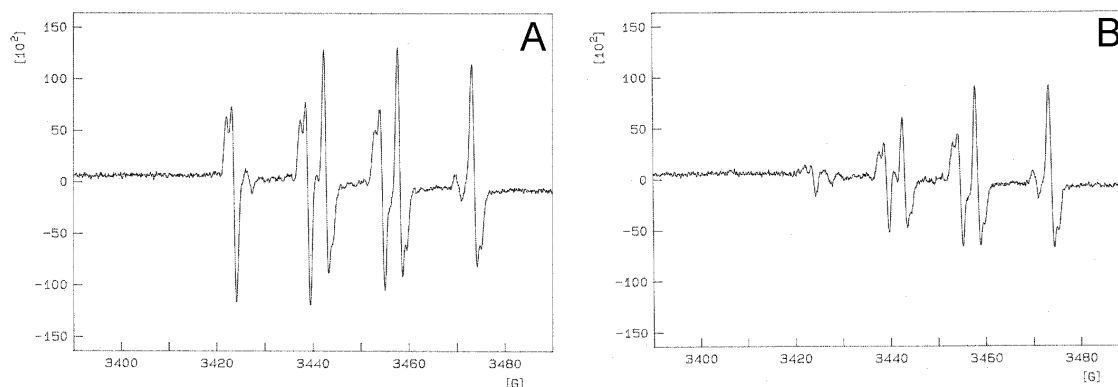
Antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583 su prikazane na Slici 4.29.



Slika 4.29. Antiradikalna aktivnost na DPPH radikale tokom sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583. Vertikalne linije predstavljaju standardnu devijaciju ( $n=3$ ) za svaku vrednost.



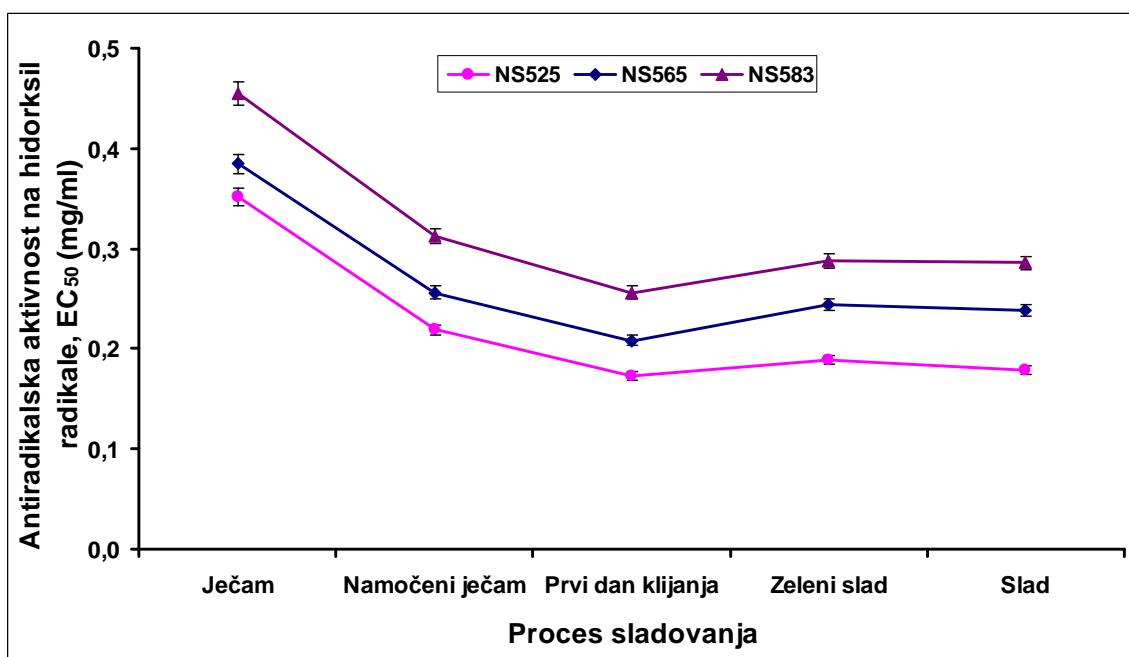




**Slika 4.30 ESR spektri DMPO-OH “spin adukata” A) bez ekstrakta (slepa proba), B) sa ekstraktom dobijenim prvog dana klijanja sorte ječma NS 525**

Konstante hiperfinog cepanja su za jedan  $^{14}\text{N}$ -atom ( $I=1$ )  $a_{\text{N}}=14,9$  G, i za jedan  $^1\text{H}$ -atom ( $I=1/2$ )  $a_{\text{H}}=14,9$  G (Čanadanović-Brunet, 2005).

Antiradikalaska aktivnost na hidrosil radikale tokom sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583 prikazana je na Slici 4.31.



**Slika 4.31. Antiradikalaska aktivnost na hidrosil radikale tokom sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583. Vertikalne linije predstavljaju standardnu devijaciju ( $n=3$ ) za svaku vrednost.**

Antiradikalaska aktivnost na hidrosil radikale izražena kao  $\text{EC}_{50}$  vrednost u ispitivanim sortama ječma je iznosila: NS 525 – 0,352; NS 565 – 0,385 i NS 583 – 0,455 mg/ml. Pošto niža  $\text{EC}_{50}$  vrednost pokazuje višu antiradikalasku aktivnost, može se zaključiti da je sorta NS 525 imala najvišu antiradikalasku aktivnost na hidrosil radikale. Madhujith i Shahidi (2006) su odredili u šest ispitivanih sorti ječma  $\text{EC}_{50}$  vrednost u

opsegu 2,20-9,65 mg/ml, što ukazuje da su u ovom radu ispitivane sorte imale znatno višu antiradikalisku aktivnost.

Antiradikaliska aktivnost na hidrosil radikale se znatno povisila tokom močenja za 37,84% za NS 525, 33,33% za NS 565 i 31,25% za NS 583. U toku prvog dana klijanja antiradikaliska aktivnost na hidrosil radikale je povišena za 21,21% za NS 525, 18,75% za NS 565 i 17,95% za NS 583 u odnosu na kraj močenja. Antiradikaliska aktivnost na hidrosil radikale se na kraju klijanja snizila (za NS 525 – 9,43%, NS 565 – 17,07% i NS 583 – 12,07%) i povisila tokom sušenja zelenog slada (za NS 525 – 5,36%, NS 565 – 2,38% i NS 583 – 0,58%). U proizvedenom sladu je antiradikaliska aktivnost na hidrosil radikale bila viša nego u ječmu: 49,27% za NS 525, 38,10% za NS 565 i 37,14% za NS 583. Trend porasta i smanjenja antiradikaliske aktivnosti na hidrosil radikale tokom sladovanja je bio isti za sve ispitivane sorte ječma.

Opšte je prihvaćeno mišljenje da slad ima višu antioksidativnu aktivnost od ječma. Porast antioksidativne aktivnosti između ječma i slada se može objasniti na dva načina:

1. Oslobođanjem fenolnih jedinjenja vezanih za ćelijske strukture uslovljava njihovu bolju ekstrakciju. Pored sinteze amilaza, proteaza i  $\beta$ -glukanaza koje uzrokuju razgradnju polimera, drugi hidrolitski enzimi mogu dovesti do oslobođanja fenolnih jedinjenja, uglavnom fenolnih kiselina vezanih za lignin i arabinosilane. Pored toga, sušenje dovodi do toga da zrna budu krta i „rastresita“, što verovatno omogućuje bolju ekstrakciju fenolnih kiselina koje su uglavnom vezane u spoljašnjim omotačima zrna.
2. Nastajanjem proizvoda Maillard-ove reakcije tokom sušenja. Liégeois i saradnici (2002) su objavili da endogeni antioksidanti, određeni u ječmu, najviše doprinose prirodnoj ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti svetlog slada. Proizvodi Maillard-ove reakcije utiču na ukupnu antioksidativnu aktivnost samo kada se slad intenzivno suši. Samaras i saradnici (2005) navode da ferulna kiselina reaguje sa intermedijerima Maillard-ove reakcije, koji nastaju iz glukoze i prolina, na temperaturama sušenja, pri čemu je antioksidativna aktivnost viša.

Chandra i saradnici (2000) su primenom standardnih, ali i intenzivnijih metoda sušenja pokazali da je antioksidativna aktivnost ječma vrlo slična sladu, što upućuje da glavni doprinos antioksidativne aktivnosti slada potiče od ječma. Doprinos antioksidativnih jedinjenja nastalih tokom sušenja je minimalan.

Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola, kao i najvišu antioksidativnu aktivnost, tj. DPPH i hidrosil antiradikalisku aktivnost. Ovi rezultati pokazuju da sorta ječma može da utiče na antiradikaliske osobine slada, što je u saglasnosti sa navodima Mikyška i saradnika (2005). Lu i saradnici (2007) su ispitivali sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativnu aktivnost tokom sladovanja dve sorte ječma. Sadržaj ukupnih fenola nakon završenog sladovanja bio je viši nego u ječmu, kao i ispitivanih fenolnih kiselina: ferulne, kafene, vanilinske, galne i protokatehinske kiseline kod obe ispitivane sorti. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina u sladu je bio viši za oko 10 $\mu$ g/g suve materije od sadržaja u ječmu. Antiradikaliske aktivnosti na DPPH i ABTS radikale, kao i redukciona sposobnost i sposobnost heliranja metala su bile više u sladu nego u ječmu, za obe ispitivane sorte. Postojala je značajna korelacija između antiradikaliske aktivnosti na DPPH i ABTS radikale, redukционе sposobnosti i sadržaja ukupnih fenola i fenolnih kiselina.

Zhao i saradnici (2008) su naveli da ječam sa najvišim sadržajem ukupnih fenola takođe ima visoku antioksidativnu aktivnost. Bonoli i saradnici (2004a), Ragaee i saradnici (2006) i Guido i saradnici (2007) su takođe utvrdili značajnu zavisnost između sadržaja ukupnih fenola u ječmu i sladu i antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale.

Enzimatsko oslobađanje vezanih fenola povisilo je sadržaj ukupnih fenola tokom sladovanja svih ispitivanih sorti ječma, kao i njihovu antioksidativnu aktivnost, što je u skladu sa rezultatima koje su objavili Dvořákova i saradnici (2008).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivane sorte ječma sadrže dovoljnu količinu fenolnih antioksidanata koji efektivno utiči na transformaciju i uklanjanje slobodnih radikala. Ispitivane fenolne kiseline deluju antioksidativno i na DPPH i hidroksil radikale, što je u skladu sa rezultatima koje su objavili Madhujith and Shahidi (2006).

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ječma su bili 0,76, 0,75 i 0,70 mg GAE/g suve materije za NS 525, NS 565 i NS 583. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ječmu je iznosio za sortu NS 525 - 200,98; NS 565 - 184,10 i za NS 583 - 177,27  $\mu\text{g/g}$  suve materije. Promena sadržaja ukupnih fenola i ukupnih fenolnih kiselina, u procesu sladovanja, u svim ispitivanim sortama ima približno isti tok. Sorta NS 525 je imala najvišu antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale ( $\text{EC}_{50}$  za NS 525-0,658; NS 565-0,667 i NS 583-0,758 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale u ispitivanim sortama ječma je iznosila: NS 525-0,352; NS 565-0,385 i NS 583-0,455 mg/ml. Na osnovu svih dobijenih rezultata analiza ječma i slada može se zaključiti da iako postoje male razlike u tehnološkim parametrima kvaliteta ječma (sadržaj proteina) i slada (sadržaj ekstrakta fino i grubo mlevenog slada, proteina i Kolbach-ov broj) među ispitivanim sortama, nije uočena bitna razlika u sadržaju ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina i antiradikalnoj aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale.

#### 4.8. Rezultati analiza hmelja

Za proizvodnju piva najznačajniji pokazatelj kvaliteta hmelja je sadržaj gorkih sastojaka (Kunze, 1998). Sadržaj gorkih sastojaka u hmelju zavisi od sorte, sadržaja  $\alpha$ - i  $\beta$ -kiselina, kao i njihovog udela u ukupnim kiselinama (Schuster i sar., 1988).

Rezultati analiza hmelja upotrebljenog za hmeljenje sladovine dati su u Tabeli 4.11.

**Tabela 4.11. Rezultati analiza hmelja**

Parametar	12,1	
Vlaga (%)	Vazdušno suv	Na suvu materiju
Ukupne smole (%)	17,44	19,84
$\alpha$ -kiseline (%)	7,78	8,85

Sadržaj ukupnih smola u hmelju prema Schuster i saradnici (1988) iznosi od 10 do 25% suve materije. Sadržaj  $\alpha$ -kiselina iznosi od 5,8 do 10,6% suve materije. Prema podacima datim u Tabeli 4.10, za ukupne smole i  $\alpha$ -kiseline, može se zaključiti da upotrebljeni hmelj zadovoljava tehnološke parametre neophodne za primenu u pivarstvu (Schuster i sar., 1988; Kunze, 1998).

U sastav polifenola hmelja ulazi približno 20% jedinjenja koja se mogu hidrolizovati i 80% jedinjenja koja podležu kondenzaciji. U prvu grupu ubrajaju se glikozidi monomernih fenola, kao što su galna, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, *p*-kumarinska i ferulna kiselina. U hmelju se nalaze protokatehinska i kafena kiselina. Ove kiseline nalaze se i u slobodnom obliku (Schuster i sar., 1988).

U ekstraktu hmelja identifikovane su i kvantifikovane sve ispitivane fenolne kiseline (Tabela 4.11), osim elaginske. Elaginska kiselina je teško rastvorljiva u vodi, tako da ova kiselina nije ekstrahovana iz hmelja primenom vodene ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz hmelja. Fenolna jedinjenja su ekstrahovana vodom iz hmelja (na temperaturi ključanja u trajanju od jednog sata) u cilju približavanja uslova koji se primenjuju u proizvodnji ohmeljene sladovine. U proizvodnji ohmeljene sladovine, hmelj se dodaje u sladovinu nakon čega se zagreva do ključanja i na toj temperaturi se vrši hmeljenje jedan sat. Sadržaj ukupnih fenola u hmelju iznosio je 0,56 mg/g suve materije. Ekstrakti hmelja su pokazali višu antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale ( $EC_{50}=0,119$  mg/ml) u odnosu na DPPH radikale ( $EC_{50}=0,190$  mg/ml).

U Tabeli 4.12 dati su rezultati sadržaja fenolnih kiselina u hmelju i sladovima koji su korišćeni za proizvodnju sladovina. Analizirajući date sadržaje fenolnih kiselina zaključeno je da hmelj sadrži više ukupnih fenolnih kiselina, oko 3 puta više protokatehinske i galne kiseline i oko 50 puta više hlorogenske kiseline u poređenju sa sadržajima navedenih fenolnih kiselina u sladovima. Sadržaj ferulne kiseline u hmelju je niži za oko 3,4-3,9 puta u odnosu na ispitivane sladove. Ferulna kiselina je dominantna fenolna kiselina u zrnima žitarica (Adom, 2000), pa je njen sadržaj u sladu takođe najviši u poređenju sa ostalim fenolnim kiselinama. Rezultati sadržaja *p*-kumarinske i ferulne kiseline u hmelju su u saglasnosti sa sadržajima koji su odredili Goiris i saradnici (2005).

**Tabela 4.12. Sadržaj fenolnih kiselina u hmelju i proizvedenim sladovima<sup>a</sup>**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$ suve materije)			
	Hmelj	Slad NS 525	Slad NS 565	Slad NS 583
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	32,76 $\pm$ 0,19	26,84 $\pm$ 0,35	21,19 $\pm$ 0,10	27,19 $\pm$ 0,73
Vanilinska	32,50 $\pm$ 0,27	31,82 $\pm$ 0,15	27,98 $\pm$ 0,14	32,66 $\pm$ 0,17
Gentistinska	4,92 $\pm$ 0,15	1,64 $\pm$ 0,13	1,41 $\pm$ 0,06	1,47 $\pm$ 0,04
Protokatehinska	61,00 $\pm$ 0,32	17,79 $\pm$ 0,13	12,21 $\pm$ 0,17	15,93 $\pm$ 0,18
Siringinska	7,81 $\pm$ 0,20	11,13 $\pm$ 0,23	9,98 $\pm$ 0,17	9,67 $\pm$ 0,07
<i>p</i> -Kumarinska	75,01 $\pm$ 0,24	59,21 $\pm$ 0,13	53,55 $\pm$ 0,15	59,18 $\pm$ 0,70
Galna	14,92 $\pm$ 0,19	4,95 $\pm$ 0,14	4,82 $\pm$ 0,10	4,56 $\pm$ 0,06
Ferulna	67,15 $\pm$ 0,31	259,53 $\pm$ 0,41	253,46 $\pm$ 0,42	226,98 $\pm$ 0,79
Kafena	16,26 $\pm$ 0,20	10,23 $\pm$ 0,12	9,52 $\pm$ 0,29	7,89 $\pm$ 0,26
Sinapinska	7,88 $\pm$ 0,14	8,15 $\pm$ 0,19	6,92 $\pm$ 0,13	6,73 $\pm$ 0,27
Hlorogenska	151,62 $\pm$ 0,34	3,43 $\pm$ 0,03	3,59 $\pm$ 0,13	3,33 $\pm$ 0,12
Elaginska	0	3,48 $\pm$ 0,02	2,42 $\pm$ 0,12	1,88 $\pm$ 0,11
<b>Ukupno</b>	<b>471,83</b>	<b>438,20</b>	<b>407,05</b>	<b>397,47</b>

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

### Rezultati tehnoloških parametara sladovina

Da bi se postigla reproduktivnost i mogućnost ponavljanja, kao i da bi se smanjila mogućnost greške, sladovine su pripremane u laboratorijskom uređaju za određivanje ekstrakta slada kao što je navedeno u poglavlju 3.2.5. U Tabeli 4.13 prikazani su rezultati tehnoloških parametara sladovina za fermentacije.

Sadržaj ekstrakta u dobijenim sladovinama bio je od 8,20 do 8,51% m/m. Optimalni sadržaj ekstrakta u sladovini za umnožavanje kvasca je od 7,5-12,5% m/m (Cahill i sar., 2000). Može se zaključiti da su proizvedene sladovine imale odgovarajući sadržaj ekstrakta za fermentaciju.

Slad dobijen iz ječma sorte NS 583 je imao najviši sadržaj proteina zbog toga što je i sorta NS 583 imala najviši sadržaj proteina. Samim tim je i sladovina NS 583 imala najviši sadržaj rastvorljivog azota (77,98 mg/100 ml).

**Tabela 4.13. Rezultati tehnoloških parametara sladovina za fermentacije**

Parametar	Sladovina od slada NS 525	Sladovina od slada NS 565	Sladovina od slada NS 583
Ekstrakt (% m/m)	8,51	8,42	8,20
Vreme ošecerjenja (minuta)	do 10	do 10	do 10
Boja sladovine (EBC jedinica)	2,5	3,0	2,5
Bistrina	slabo opalna	slabo opalna	bistra
Brzina filtracije (minuta)	14	14	25
Miris sladovine	normalan	normalan	normalan
Ukus sladovine	normalan	normalan	normalan
pH vrednost sladovine	5,63	5,65	5,64
Viskoznost (mPas, 8,6%e)	1,550	1,575	1,598
Rastvorljivi azot (mg/100ml)	77,63	72,38	77,98

#### 4.10. Rezultati tehnoloških parametara ohmeljenih sladovina za fermentaciju

Za vreme hmeljenja sladovine odigrava se čitav niz promena značajnih za proizvodnju piva: rastvaranje i transformacija sastojaka hmelja, nastajanje jedinjenja proteina i tanina i njihovo taloženje, sterilizacija sladovine, inaktivacija enzima, porast boje sladovine, zakišeljavanje sladovine, nastajanje antioksidativnih materija i promena sadržaja dimetilsulfida u sladovini. Tokom hmeljenja sladovine nastaju jedinjenja koja vezuju kiseonik, pa na taj način deluju antioksidativno (Kunze, 1998).

Tokom kuvanja sladovine dozira se hmelj koji se takođe kuva. Za vreme kuvanja sladovine sa hmeljom odigrava se izomerizacija  $\alpha$ -kiselina u *izo*- $\alpha$ -kiseline, pa pivo dobija plemenitu gorčinu. Nastoji se da se dobije gorčina koja odgovara tipu piva. Gorčina se izražava u jedinicama gorčine (BU - „bitterness units“), koje predstavljaju sadržaj gorkih sastojaka u pivu izraženih u mg/l (Kunze, 1998).

U Tabeli 4.14 prikazani su rezultati tehnološki parametara ohmeljenih sladovina za fermentaciju.

**Tabela 4.14. Rezultati tehnoloških parametara ohmeljenih sladovina za fermentacije**

Pokazatelj	Ohmeljena sladovina od slada NS 525	Ohmeljena sladovina od slada NS 565	Ohmeljena sladovina od slada NS 583
Ekstrakt (% m/m)	8,45	8,36	8,16
Boja sladovine (EBC jedinica)	8,0	8,0	9,0
pH vrednost sladovine	5,50	5,48	5,45
Viskoznost (mPas, 8,6%e)	1,541	1,551	1,572
Rastvorljivi azot (mg/100ml)	72,38	70,35	75,88
Gorčina (jedinica gorčina BU)	39,45	40,88	41,90

Iz rezultata datih u Tabeli 4.14 zapaža se da se sadržaj ekstrakta tokom hmeljenja nije znatno promenio. Tokom hmeljenja boja sladovine se povećala. Boja sladovine se povećava tokom hmeljenja zbog nastajanja melanoidina i tanina koji se oksidišu, što izaziva porast boje sladovine, koja je tamnija od piva proizvedenog iz nje (Kunze, 1998).

pH vrednost sladovina i viskoznost su se smanjili nakon hmeljenja. U toku kuvanja sladovine sa hmeljom pH vrednost sladovine opada (za 0,1-0,2 jedinice). Ova pojava posledica je dodatka gorkih kiselina hmelja, nastajanja proizvoda Maillard-ove reakcije, koji reaguju kiselo, i u najvećoj meri taloženja alkalnih fosfata. Prema tome, smanjenje pH vrednosti zavisi od razgrađenosti slada i od stepena njegovog dosušivanja jer u toku kuvanja sladovine nema mogućnosti za nastajanje jedinjenja koja učestvuju u Maillard-ovim reakcijama (Schuster i sar., 1988). Sadržaj rastvorljivog azota se kod svih sladovina smanjio, u odnosu na sladovine pre hmeljenja, usled taloženja proteina sa taninima.

#### 4.11. Rezultati tehnoloških parametara tokom fermentacija i dobijenih piva

Broj ćelija u inokulumima je bio  $1,2 \times 10^8$ . Ovaj broj je neophodan da bi posle prenošenja 200 ml inokuluma u fermentor, u fermentoru bilo oko  $1 \times 10^7$  ćelija/ml.

U toku faze glavne fermentacije dolazi do utroška najvećeg dela fermentabilnog ekstrakta iz sladovine (preko 90%) i nastajanja etanola, ugljen-dioksida, organskih kiselina, viših alkohola, estara i dr. Reakcija koja definiše dužinu trajanja ove faze je fermentacija prisutnih fermentabilnih šećera u etanol i ugljen-dioksid. Tokom fermentacije dolazi do smanjenje sadržaja fermentabilnih šećera tj. ekstrakta. Brzina fermentacije zavisi od soja kvasca, broja ćelija u inokulumu, fiziološkog stanja ćelija kvasca, veličine i geometrijskog oblika fermentora, sastava i pH vrednosti sladovine, temperature na kojoj se izvodi fermentacija i polaznog sadržaja rastvorenog kiseonika (Kunze, 1998).

U Tabelama 4.15-4.17 dati su rezultati tehnoloških parametara praćenih tokom fermentacija sladovina proizvedenih od sladova NS 525, NS 565 i NS 583.

**Tabela 4.15. Tehnološki parametri fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 525**

Dan	Etanol (% v/v)	Pravi ekstrakt (% m/m)	Prava prevrelost (%)	Prividna prevrelost (%)	Gorčina (jed. gorčine BU)	pH	Boja (jed. EBC)	Broj ćelija
3	1,66	5,74	32,03	40,71	33,30	4,74	7,10	$5,5 \times 10^7$
5	2,95	3,71	56,06	68,76	32,80	4,56	6,40	$3,4 \times 10^7$
7	3,36	3,05	63,91	78,46	29,97	4,48	5,90	$1,7 \times 10^7$
14	3,44	2,99	64,64	78,70	29,75	4,57	5,70	$6,5 \times 10^4$
21	3,46	3,00	64,53	78,82	29,97	4,56	5,80	$2,9 \times 10^4$

**Tabela 4.16. Tehnološki parametri fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 565**

Dan	Etanol (% v/v)	Pravi ekstrakt (% m/m)	Prava prevrelost (%)	Prividna prevrelost (%)	Gorčina (jed. gorčine BU)	pH	Boja (jed. EBC)	Broj ćelija
3	1,65	5,64	32,36	41,25	36,91	4,67	6,30	$5,6 \times 10^7$
5	2,99	3,60	56,80	69,30	36,45	4,51	5,60	$3,2 \times 10^7$
7	3,40	2,95	64,67	79,14	35,53	4,50	5,30	$1,5 \times 10^7$
14	3,42	2,92	64,97	79,38	35,00	4,51	5,30	$5,9 \times 10^4$
21	3,44	2,91	65,08	79,38	34,00	4,46	5,20	$2,0 \times 10^4$

**Tabela 4.17. Tehnološki parametri fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 583**

Dan	Etanol (% v/v)	Pravi ekstrakt (% m/m)	Prava prevrelost (%)	Prividna prevrelost (%)	Gorčina (jed. gorčine BU)	pH	Boja (jed. EBC)	Broj ćelija
3	1,35	5,96	26,95	34,68	38,75	4,65	6,10	$5,4 \times 10^7$
5	2,10	4,73	41,98	52,45	36,90	4,61	5,00	$3,1 \times 10^7$
7	3,05	3,23	60,39	74,26	36,75	4,58	4,95	$2,0 \times 10^7$
14	3,24	3,00	63,23	77,33	36,19	4,49	5,25	$6,1 \times 10^4$
21	3,34	2,89	64,64	78,92	35,95	4,48	5,60	$2,4 \times 10^4$

Tokom fermentacije smanjuje se sadržaj pravog i prividnog ekstrakta, a sadržaj etanola raste (fermentativna razgradnja šećera). Na osnovu određenih sadržaja pravog i prividnog ekstrakta i ekstrakta u osnovnoj sladovini izračunate su vrednosti prave i prividne prevrelosti. Stepenn prevrelosti se definiše kao merilo razgradnje šećera do etanola i CO<sub>2</sub>.

Analizirajući rezultate prikazne u Tabelama 4.15-4.17 može se zapaziti da prava i prividna prevrelost imaju sličan tok kod svih uzoraka sladovina. Prava i prividna prevrelost nakon 7 dana glavne fermentacije i 14 dana naknadne fermentacije su imale približne vrednosti kod svih dobijenih piva. Odlični rezultati prave i prividne prevrelosti pokazuju da je broj ćelija u inokulumima bio dovoljan da se uspešno izvedu fermentacije što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Manger i Annemüller (2000).



pH vrednost je tokom fermentacija opadala. pH vrednost naročito opada za vreme logaritamske faze rasta kvasca zbog nastajanje organskih kiselina, dezaminacijom organskih kiselina; potrošnje primarnih fosfata ćelijama kvasca; utroška amonijumovih jona i jona kalijuma i otpuštanja jona vodonika u pivo (Kunze, 1998). Brzina opadanja i konačne pH vrednosti piva su imale približne vrednosti kod svih uzoraka piva. pH vrednost piva nije dostizala vrednost 4,1 što je tehnološki povoljno.

Snižavanjem pH tokom fermentacije, postižu se pH vrednosti koje su u oblasti izoelektričnih tačaka velikog broja rastvorenih gorkih i taninskih sastojaka pri čemu se oni talože na mehurićima CO<sub>2</sub> ili se adsorbuju na ćelijama kvasca. α-Kiseline koje se nisu izomerizovale u procesu kuvanja sladovine talože se u fermentaciji zbog toga što je njihova rastvorljivost, na pH vrednosti ispod 5,0 i na temperaturama ispod 10°C, veoma mala. Deo izohumulona se izdvaja u penu piva jer su oni površinski aktivni i sakupljaju se na površini mehurića CO<sub>2</sub> (Kunze, 1998). Tokom svih izvedenih fermentacija sadržaj gorčine se smanjivao što je u skladu sa napred navedenim.

Boja piva se tokom fermentacija smanjivala. Prvih dana fermentacije boja se smanjuje za oko 3 EBC jedinice, što je posledica adsorpcije intenzivno obojenih sastojaka piva na ćelijama kvasca, u peni ili u talogu koji se izdvaja iz piva, usled snižavanja pH vrednosti (Kunze, 1998).

Broj ćelija kvasca tokom fermentacija raste do trećeg dana, a nakon toga opada do kraja fermentacije. Umnožavanje ćelija kvasca se smanjuje zbog toga što u sladovini nema dovoljno rastvorenog kiseonika (Geiger i sar., 1999). Nakon trećeg dana glavne fermentacije zapažen je početak flokulacije ćelija kvasca i njihovo taloženje na dnu fermentora.

U Tabeli 4.18 prikazani su rezultati tehnoloških parametara proizvedenih piva.

**Tabela 4.18. Rezultati tehnoloških parametara proizvedenih piva**

Parametar	Pivo proizvedeno od slada NS 525	Pivo proizvedeno od slada NS 565	Pivo proizvedeno od slada NS 583
<b>Hemijska analiza</b>			
Ekstrakt u osnovnoj sladovini (% m/m)	8,45	8,36	8,16
Etanol (% v/v)	3,46	3,44	3,34
Pravi ekstrakt (% m/m)	3,00	2,91	2,89
Prividni ekstrakt (% m/m)	1,79	1,72	1,72
Prava prevrelost (%)	64,53	65,08	64,64
Prividna prevrelost (%)	78,82	79,38	78,92
Boja (jedinica EBC)	5,8	5,2	5,6
pH vrednost	4,56	4,46	4,48
Rastvorljivi azot (mg/100 ml)	53,38	49,17	56,54
Gorčina (jedinica gorčine BU)	29,97	34,00	35,95
<b>Senzorne osobine</b>			
Ukus	čist, pun	čist, pun	čist, pun
Miris	čist	čist	čist
Gorčina	normalna	normalna	normalna

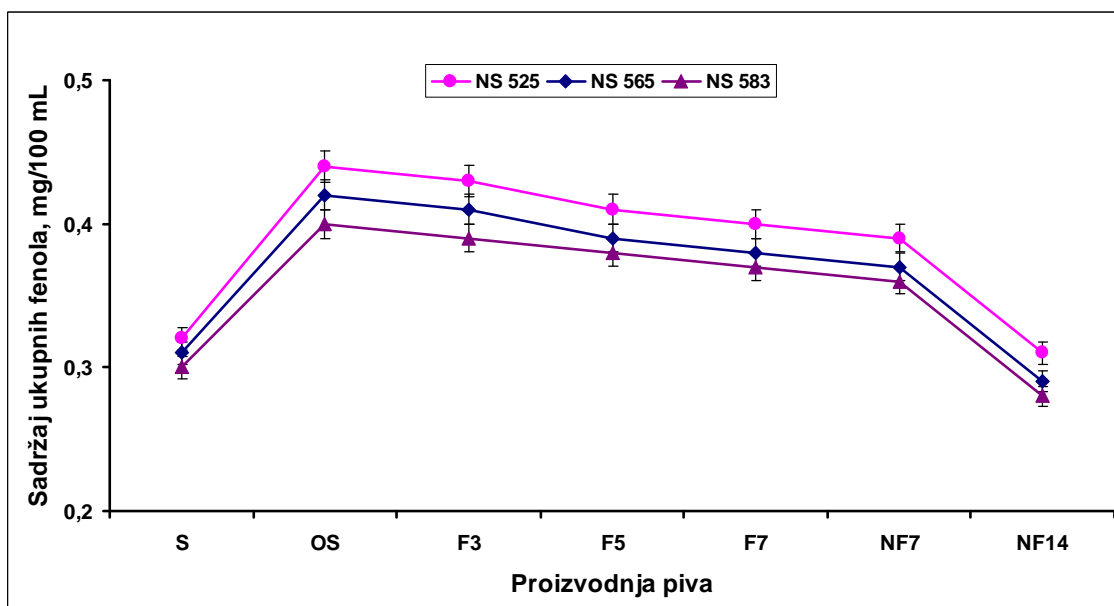
Analizirajući rezultate ispitivavnih parametara kvaliteta piva može se zaključiti da su sadržaji etanola i ekstrakta u pivima u saglasnosti sa sadržajima ekstrakta u osnovnim sladovinama. Prava i prividna prevrelost pokazuju da su fermentacije izvedene do približno istog stepena prevrelosti za sva proizvedena piva. Boja piva dobijenih iz sladovina proizvedenih od sladova NS 525, NS 565 i NS 583 je približno ista u svim proizvedenim pivima kao i pH vrednost. Gorčina piva je niža u odnosu na ohmeljene sladovine što ukazuje da je došlo do taloženja gorkih sastojaka na mehurićima CO<sub>2</sub> i adsorpcije na ćelijama kvasca tokom fermentacija. Sadržaj rastvorljivog azota u pivima je niži u odnosu na sadržaj rastvorljivog azota u ohmeljenim sladovinama, što je normalno jer je kvasac asimilovao i utrošio azot u svom metabolizmu.

Senzorne osobine dobijenih piva bile su zadovoljavajuće za sva proizvedena piva.

#### **4.12. Rezultati sadržaja ukupnih fenola u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima**

Tri proizvedene sladovine (od slada NS 525, NS 565 i NS 583) su ohmeljene i iz njih je fermentacijom proizvedeno pivo. Tokom proizvodnje piva (dobijanje sladovine, hmelenje sladovine, glavna i naknadna fermentacija) je određivan sadržaj ukupnih fenola i rezultati su prikazani na Slici 4.32. Sadržaji ukupnih fenola u sladovinama su iznosili 0,32 za NS 525, 0,31 za NS 565 i 0,30 mg GAE/100 ml za NS 583. Tokom hmelenja sladovina sadržaj ukupnih fenola se povećao i to 1,38 za NS 525, 1,35 za NS 565 i 1,33 puta za NS 583. Fantozzi i saradnici (1998) su dobili vrlo slične rezultate. Tokom fermentacija svih sladovina sadržaj ukupnih fenola se snižavao i na kraju naknadne fermentacije je bio neznatno niži u odnosu na sladovinu (za NS 525 – 3,12%, NS 565 – 6,45% i NS 583 – 6,67%) što je u skladu sa rezultatima koje su odredili Fantozzi i saradnici (1998) i Floridi i saradnici (2003). Fantozzi i saradnici (1998) su utvrdili da se tokom proizvodnje piva sadržaj ukupnih fenola smanjuje za oko 28% što pokazuje da primenjeni tehnološki postupak ima uticaj na sadržaj ukupnih fenola. U ovom radu određeno je smanjenje sadržaja ukupnih fenola za oko 29% tokom proizvodnje piva iz ohmeljene sladovine.

Pošto je u ovom radu primenjivan identičan postupak proizvodnje sladovina, ohmeljenih sladovina i piva može se zaključiti da je sorta ječma imala najveći uticaj na sadržaj ukupnih fenola u proizvedenim pivima. Pivo proizvedeno od sorte ječma NS 525 imalo je najviši sadržaj ukupnih fenola (0,31 mg GAE/100 ml piva), dok su piva proizvedena od sorti NS 565 i NS 583 imala neznatno niži sadržaj ukupnih fenola (0,29 i 0,28 mg GAE/100 ml piva). Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola tokom proizvodnje piva u poređenju sa drugim ispitivanim sortama.



**Slika 4.32. Promena sadržaja ukupnih fenola tokom fermentacija i dozrevanja piva NS 525, NS 565 i NS 583 (S-slادovina, OS-ohmeljena slادovina, F3, F5 i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; N7 i N14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Glavni efekat fenolnih jedinjenja na stabilnost ukusa piva je tokom komljenja i hmeljenja slادovine (Liegeois i sar., 2000; Mikyška i sar., 2002). Naročito fenolna jedinjenja ekstrahovana iz hmelja tokom hmeljenja značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti i efikasno smanjuju potencijal nonenala u slادovini (Lermusieau i sar., 2001). Senzornom ocenom piva je takođe potvrđen pozitivan efekat polifenola hmelja tokom proizvodnje piva na stabilnost ukusa (Mikyška i sar., 2002).

Da bi se utvrdilo koji sadržaj ukupnih fenola je ekstrahovan iz ispitivanih uzoraka slادa izračunati su procenti ekstrahovanih ukupnih fenola i dobijeni rezultati dati su u Tabeli 4.19. Sadržaj ekstrakta u slادovini proizvedenoj od slادa NS 525 iznosio je 8,51% m/m, od slادa NS 565 8,42% m/m i od slادa NS 583 8,20% m/m. Na osnovu sadržaja ukupnih fenola u slادu, slادovini i ekstrakta izračunat je sadržaj ukupnih fenola u slادovini izražen u mg GAE/g suve materije (Tabela 4.19) i izračunat je procenat ekstrahovanih ukupnih fenola.

**Tabela 4.19. Sadržaj ukupnih fenola u slادu i slادovini i udeo fenola ekstrahovanih u slادovinu**

Sorta	Slad (mg GAE/g s.m.*)	Slادovina (mg GAE/100ml)	Slادovina (mg GAE/g s.m.)	% ekstrahovanih
NS 525	0,96	0,32	0,0380	3,96
NS 565	0,94	0,31	0,0368	3,91
NS 583	0,91	0,30	0,0365	4,01

\* g s.m. – gram suve materije

Analizom rezultata datih u Tabeli 4.19 zapaža se da je procenat ekstrahovanih ukupnih fenola ujednačen kod ispitivanih sorti slada i iznosi 3,96% za slad NS 525, 3,91% za slad NS 565 i 4,01% za slad NS 583. Na osnovu navedenog može se zaključiti da se samo oko 4% ukupnih fenola slada ekstrahuje u sladovinu, a da ostatak ukupnih fenola zaostaje u tropu.

#### 4.13. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima

Optimizacija pripreme uzorka sladovine proizvedene od slada NS 525 za određivanje sadržaja fenolnih kiselina obuhvatala je primenu različitih temperatura hidrolize kiselinom (20°C, 40°C i 70°C). Najviši sadržaji ispitivanih fenolnih kiselina postignuti su hidrolizom kiselinom na 20°C (Tabela 4.20), pa je ovaj postupak primenjivan u daljem radu (u Poglavlju 3.2.8 je detaljno opisan postupak hidrolize). Ovaj postupak hidrolize kiselinom na 20°C primenjivan je za hidrolizu svih uzoraka sladovina, ohmeljenih sladovina, sladovina tokom fermentacija, mladih piva i piva.

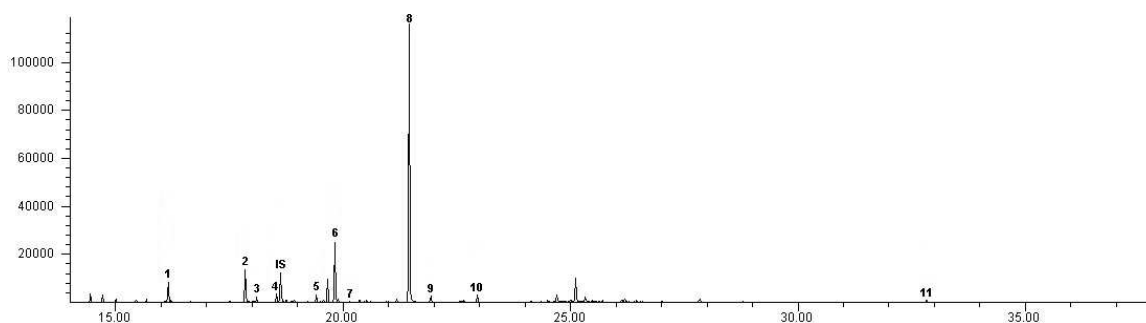
**Tabela 4.20. Rezultati sadržaja fenolnih kiselina u sladovini proizvedenoj od slada NS 525 i hidrolizovanoj kiselinom na različitim temperaturama<sup>a</sup>**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina u sladovini (µg/100ml) proizvedenoj od slada NS 525 i hidrolizovanoj kiselinom na		
	20°C	40°C	70°C
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	10,06±0,20	9,18±0,13	8,10±0,21
Vanilinska	39,02±0,25	37,97±0,15	36,91±0,30
Gentistinska	0,09±0,01	0,12±0,02	0,10±0,02
Protokatehinska	2,18±0,08	2,11±0,10	2,07±0,07
Siringinska	11,10±0,27	10,82±0,33	10,74±0,23
<i>p</i> -Kumarinska	43,59±0,39	42,97±0,25	42,15±0,37
Galna	0,26±0,01	0,19±0,02	0,11±0,02
Ferulna	250,14±0,31	247,50±0,27	246,70±0,28
Kafena	7,10±0,19	6,03±0,16	5,79±0,18
Sinapinska	25,24±0,49	23,77±0,18	23,59±0,50
Hlorogenska	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
Elaginska	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

<sup>b</sup> n.d. Nije detektovana

Sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima tokom proizvodnje piva je određivan GC-MS metodom. Jedanaest fenolnih kiselina: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, gentistinska, protokatehinska, siringinska, *p*-kumarinska, galna, ferulna, kafena, sinapinska i hlorogenska je identifikovano i kvantifikovano. Elaginska kiselina nije identifikovana u ispitivanim uzorcima. Elaginska kiselina je teško rastvorljiva u vodi (The Merck Index, 1996) što verovatno ima za posledicu da nije ekstrahovana tokom proizvodnje sladovina. Tipičan GC-MS (SIM mod) hromatogram da je na Slici 4.33.



**Slika 4.33. GC-MS (SIM mod) hromatogram ekstrakta dobijenog iz ohmeljene sladovine NS 525. Pikovi: 1. *p*-hidrokibenzoeva, 2. vanilinska, 3. gentistična, 4. protokatehinska, 5. siringinska, 6. *p*-kumarinska, 7. galna, 8. ferulna, 9. kafena, 10. sinapinska i 11. hlorogenska kiselina, IS – interni standard (*p*-aminobenzoeva kiselina)**

Promene sadržaja fenolnih kiselina tokom fermentacija sladovina proizvedenih od slada NS 525, NS 565 i NS 583 date su u Tabelama 4.21-4.23.

U svim proizvedenim sladovinama, ohmeljenim sladovinama i pivima, ferulna, *p*-kumarinska, vanilinska i sinapinska kiselina su imale najviše sadržaje. Sadržaj ferulne kiseline u sladovinama proizvedenim od slada NS 525, NS 565 i NS 583 iznosio je: 250,14; 251,26 i 225,89  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  što je u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Vanbeneden i saradnici (2006). Sadržaji *p*-kumarinske i vanilinske kiseline u sladovini proizvedenoj od slada NS 525 iznosili su 43,59 i 39,02, od slada NS 565 48,02 i 37,63 i od slada NS 583 45,50 i 38,48  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ . Sadržaj sinapinske kiseline je u sladovini proizvedenoj od slada NS 565 bio znatno niži u poređenju sa sladovinama od slada NS 525 i NS 583. Hlorogenska kiselina nije detektovana ni u jednoj ispitivanoj sladovini. Sadržaji fenolnih kiselina su u skladu sa rezultatima koje su objavili Jandera i saradnici (2005).

Nakon hmeljenja sladovina, hlorogenska kiselina je određena u svim ohmeljenim sladovinama (3,86; 2,68 i 3,98  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  u ohmeljenoj sladovini proizvedenoj od slada NS 525, NS 565 i NS 583) što upućuje da je ekstrahovana iz hmelja. Prema rezultatima prikazanim u Tabelama 4.21-4.23, sadržaj svih ispitivanih fenolnih kiselina je povišen nakon hmeljenja. Najviši ukupni sadržaj svih fenolnih kiselina je određen u ohmeljenim sladovinama (proizvedenoj od slada NS 525-461,41, NS 565-426,22 i NS 583-423,56  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ). Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je hmeljenjem povećan za 18,68% u uzorku NS 525, 17,01% u uzorku NS 565 i 17,04% u uzorku NS 583. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je u svim proizvedenim pivima bio niži u odnosu na odgovarajuće ohmeljene sladovine što je u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili McMurrough i saradnici (1984).

Tabela 4.21. Promena individualnih fenolnih kiselina tokom fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 525<sup>a</sup> (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5 i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )									
	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14			
p-Hidroksibenzojeva	10,06±0,20	11,95±0,24	14,46±0,34	15,44±0,16	16,47±0,49	14,83±0,18	14,62±0,26			
Vanilinska	39,02±0,25	41,54±0,31	44,77±0,23	55,76±0,11	63,64±0,58	61,05±0,37	57,89±0,31			
Gentisinska	0,09±0,01	0,27±0,02	0,26±0,01	0,26±0,01	0,35±0,02	0,35±0,02	0,27±0,01			
Protokatehinska	2,18±0,08	4,83±0,12	4,48±0,13	6,35±0,15	7,43±0,17	7,43±0,21	6,86±0,08			
Siringinska	11,10±0,27	13,64±0,33	14,22±0,09	15,74±0,22	17,40±0,45	17,17±0,35	16,98±0,31			
p-Kumarinska	43,59±0,39	47,71±0,18	45,02±0,11	44,50±0,62	44,55±0,84	41,82±0,18	39,24±0,29			
Gaba	0,26±0,01	0,78±0,04	0,59±0,02	0,85±0,04	1,11±0,05	1,21±0,03	1,17±0,04			
Ferulna	250,14±0,31	293,79±0,47	285,00±0,58	278,98±0,75	267,19±0,26	218,71±0,27	215,47±0,37			
Kafena	7,10±0,19	9,19±0,23	5,56±0,13	6,34±0,16	8,88±0,23	7,82±0,14	7,67±0,19			
Šinapinska	25,24±0,49	33,85±0,26	32,01±0,21	29,97±0,50	29,49±0,42	24,93±0,21	22,13±0,14			
Hlorogenska	n.d. <sup>b</sup>	3,86±0,08	2,21±0,06	2,32±0,10	2,38±0,09	2,22±0,07	1,55±0,05			
<b>Ukupno</b>	388,78	461,41	448,58	456,51	459,09	397,54	383,85			

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

<sup>b</sup> n.d. - Nije detektovana

**Tabela 4.22. Promena individualnih fenolnih kiselina tokom fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 565<sup>a</sup> (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5 i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )										
	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14				
p-Hidroksibenzoeva	9,79 $\pm$ 0,18	12,88 $\pm$ 0,22	14,40 $\pm$ 0,29	18,26 $\pm$ 0,16	17,33 $\pm$ 0,21	16,78 $\pm$ 0,34	15,25 $\pm$ 0,20				
Vanilinska	37,63 $\pm$ 0,21	40,53 $\pm$ 0,36	48,47 $\pm$ 0,28	69,60 $\pm$ 0,19	63,76 $\pm$ 0,38	59,03 $\pm$ 0,26	57,89 $\pm$ 0,33				
Gentistinska	0,17 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,02				
Protokatehinska	1,93 $\pm$ 0,05	5,39 $\pm$ 0,15	5,59 $\pm$ 0,13	8,81 $\pm$ 0,25	9,02 $\pm$ 0,24	8,37 $\pm$ 0,21	8,28 $\pm$ 0,07				
Siringinska	7,33 $\pm$ 0,17	11,98 $\pm$ 0,25	12,91 $\pm$ 0,20	18,37 $\pm$ 0,45	18,44 $\pm$ 0,17	16,67 $\pm$ 0,33	16,49 $\pm$ 0,42				
p-Kumarinska	48,02 $\pm$ 0,40	60,98 $\pm$ 0,52	60,60 $\pm$ 0,34	60,41 $\pm$ 0,21	57,61 $\pm$ 0,15	54,55 $\pm$ 0,07	51,72 $\pm$ 0,31				
Galna	0,17 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,02	1,36 $\pm$ 0,06	1,54 $\pm$ 0,04	1,51 $\pm$ 0,07	1,47 $\pm$ 0,05				
Ferulna	251,26 $\pm$ 0,15	270,86 $\pm$ 0,58	261,51 $\pm$ 0,38	222,92 $\pm$ 0,19	215,00 $\pm$ 0,37	210,33 $\pm$ 0,23	207,03 $\pm$ 0,19				
Kafena	3,46 $\pm$ 0,13	6,75 $\pm$ 0,17	6,50 $\pm$ 0,15	6,48 $\pm$ 0,19	6,45 $\pm$ 0,20	6,39 $\pm$ 0,16	6,35 $\pm$ 0,24				
Sinapinska	4,50 $\pm$ 0,12	13,21 $\pm$ 0,27	12,21 $\pm$ 0,14	12,15 $\pm$ 0,24	12,08 $\pm$ 0,27	12,05 $\pm$ 0,29	11,99 $\pm$ 0,15				
Hlorogenska	n.d. <sup>b</sup>	2,68 $\pm$ 0,08	2,58 $\pm$ 0,09	2,45 $\pm$ 0,08	2,30 $\pm$ 0,07	2,25 $\pm$ 0,06	2,23 $\pm$ 0,02				
Ukupno	364,26	426,22	425,80	421,34	404,07	388,47	379,22				

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

<sup>b</sup> n.d. - Nije detektovana



**Tabela 4.23. Promena individualnih fenolnih kiselina tokom fermentacije sladovine proizvedene od slada NS 583<sup>a</sup> (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5 i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )									
	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14			
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	10,22 $\pm$ 0,30	14,48 $\pm$ 0,24	18,76 $\pm$ 0,41	16,34 $\pm$ 0,10	15,01 $\pm$ 0,25	14,95 $\pm$ 0,31	14,50 $\pm$ 0,13			
Vanilinska	38,43 $\pm$ 0,14	48,97 $\pm$ 0,26	62,94 $\pm$ 0,33	64,97 $\pm$ 0,13	63,89 $\pm$ 0,56	58,22 $\pm$ 0,17	57,55 $\pm$ 0,24			
Gentistinska	0,25 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02			
Protokatehinska	1,99 $\pm$ 0,05	5,38 $\pm$ 0,15	6,23 $\pm$ 0,25	6,85 $\pm$ 0,20	6,89 $\pm$ 0,17	6,47 $\pm$ 0,15	6,45 $\pm$ 0,11			
Siminginska	7,56 $\pm$ 0,19	13,73 $\pm$ 0,29	15,95 $\pm$ 0,31	16,43 $\pm$ 0,41	15,88 $\pm$ 0,19	15,75 $\pm$ 0,32	15,55 $\pm$ 0,28			
<i>p</i> -Kumarinska	45,50 $\pm$ 0,28	54,02 $\pm$ 0,52	46,51 $\pm$ 0,43	45,96 $\pm$ 0,24	39,79 $\pm$ 0,36	37,24 $\pm$ 0,14	37,15 $\pm$ 0,22			
Galna	0,25 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,07	1,37 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,06			
Ferulna	225,89 $\pm$ 0,35	248,51 $\pm$ 0,40	195,26 $\pm$ 0,54	189,54 $\pm$ 0,23	179,25 $\pm$ 0,12	163,85 $\pm$ 0,27	162,11 $\pm$ 0,12			
Kafena	7,60 $\pm$ 0,19	8,86 $\pm$ 0,26	6,54 $\pm$ 0,18	6,60 $\pm$ 0,17	6,73 $\pm$ 0,19	6,72 $\pm$ 0,09	6,70 $\pm$ 0,21			
Sinapinska	24,23 $\pm$ 0,14	24,25 $\pm$ 0,42	17,89 $\pm$ 0,23	17,21 $\pm$ 0,38	17,18 $\pm$ 0,30	16,90 $\pm$ 0,14	16,18 $\pm$ 0,19			
Hlorogenska	n.d. <sup>b</sup>	3,98 $\pm$ 0,13	3,50 $\pm$ 0,11	2,90 $\pm$ 0,09	2,86 $\pm$ 0,10	3,08 $\pm$ 0,08	3,08 $\pm$ 0,09			
<b>Ukupno</b>	361,92	423,58	374,87	368,35	349,34	324,98	321,05			

<sup>a</sup> Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardna devijacija izračunata na osnovu tri određivanja

<sup>b</sup> n.d. - Nije detektovana



Tokom svih fermentacija sadržaji *p*-kumarinske, ferulne, kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline su se snižavali. Sadržaji *p*-kumarinske (1,22 puta u fermentaciji NS 525, 1,18 puta u fermentaciji NS 565 i 1,45 puta u fermentaciji NS 583) i ferulne (1,36 puta u fermentaciji NS 525, 1,31 puta u fermentaciji NS 565 i 1,53 puta u fermentaciji NS 583) su se snižavali tokom fermentacija. Smanjenje sadržaja ferulne kiseline tokom fermentacije je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Madigan i saradnici (1995). Ferulna i *p*-kumarinska kiselina često podležu dekarboksilaciji, ili termalnom fragmentacijom, ili usled dejstva kvasca. Neki sojevi kvasca mogu da transformišu ferulnu i *p*-kumarinsku kiselinu u vinil derivate ili u supstituisane fenil propionske kiseline (García i sar., 2004) snižujući sadržaj ovih kiselina tokom fermentacije. Poznato je da se tokom fermentacije piva donjeg vrenja ćelije kvasca talože na dnu fermentora. Sastojci piva se adsorbuju na ćelijama kvasca i talože zajedno sa njima, pa se njihov sadržaj snižava tokom fermentacije piva.

Na osnovu prikazanih rezultata može se videti da su *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, gentistinska, protokatehinska, siringinska i galna kiselina maksimalni sadržaj dostigle tokom fermentacije. Najviši porast sadržaja tokom fermentacije određen je kod gentistinske (3,89 puta za NS 525, 3,18 puta za NS 565 i 1,72 puta za NS 583), protokatehinske (3,41 puta za NS 525, 4,67 puta za NS 565 i 3,46 puta za NS 583), siringinske (1,57 puta za NS 525, 2,52 puta za NS 565 i 2,17 puta za NS 583) i galne kiseline (4,27 puta za NS 525, 9,06 puta za NS 565 i 5,72 puta za NS 583). McMurrough i saradnici (1984) su odredili više sadržaje *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske i galne kiseline u sladovini u fermentaciji, nego u sladovini. Jandera i saradnici (2005) su takođe odredili maksimalne sadržaje galne, protokatehinske, vanilinske i siringinske kiseline u mladom pivu što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu. U toku fermentacije sadržaj skoro svih kiselina se povećao, ili ostao isti. Fenolne kiseline (naročito vanilinske i kafene kiseline) nastaju tokom fermentacije metabolizmom kvasca (Pöschl i sar., 2007). Pascoe i saradnici (2003) su takođe utvrdili blagi porast sadržaja vanilinske kiseline tokom fermentacije piva.

Naknadnom fermentacijom smanjen je sadržaj skoro svih ispitivanih kiselina. Određeni sadržaji ispitivanih fenolnih kiselina su u saglasnosti sa rezultatima sadržaja fenolnih kiselina u standardnim pivima (Bartolomé i sar., 2000). Slične sadržaje *p*-kumarinske, ferulne i sinapinske kiseline sa sadržajima datim u Tabelama 4.21-4.23 odredili su Hayes i saradnici (1987).

Nizak sadržaj kafene kiseline određen je u uzorcima sladovine piva donjeg vrenja, dok hmeljenjem sladovine raste sadržaj *p*-kumarinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Kasniji tehnološki postupci u proizvodnji kao što su fermentacija, hladno dozrevanje, tretmani sa adsorbentima i filtracija dovode do blagog gubitka fenolnih kiselina (McMurrough i sar., 1984; Shahidi i Nazck, 2004).

Sadržaj polifenola se može smanjiti tokom procesa fermentacije i kao posledica precipitacije proteina. Šećeri prisutni u sladovini mogu stvarati vodonične veze i biti kompeticija polifenolima za moguća mesta vezivanja. Kako proces fermentacije odmiče sadržaj šećera u sladovini se smanjuje pri čemu dolazi se povećava broj vodoničnih veza između polifenola i proteina piva (Shahidi i Nazck, 2004).

Da bi se utvrdilo koji sadržaj fenolnih kiselina je ekstrahovan iz ispitivanih uzoraka slada izračunati su procenti ekstrahovanih fenolnih kiselina i dobijeni rezultati dati su u Tabelama 4.24-4.26. Sadržaj ekstrakta u sladovini proivedenoj od slada NS 525 iznosio je 8,51% m/m, od slada NS 565 8,42% m/m i od slada NS 583 8,20% m/m. Na osnovu sadržaja fenolnih kiselina u sladu, sladovini i ekstrakta izračunati su sadržaju

fenolnih kiselina u sladovini izraženi u  $\mu\text{g/g}$  suve materije (Tabela 4.24) i izračunat je procenat ekstrahovanih fenolnih kiselina.

**Tabela 4.24. Sadržaj fenolnih kiselina u sladu i sladovini proizvedenoj od slada NS 525 i udeo fenolnih kiselina ekstrahovanih u sladovinu**

Fenolna kiselina	Slad ( $\mu\text{g/g s.m.}^*$ )	Sladovina ( $\mu\text{g/100ml}$ )	Sladovina ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )	% ekstrahovanih
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	26,84	10,06	1,18	4,40
Vanilinska	31,82	39,02	4,59	14,41
Gentistinska	1,64	0,09	0,01	0,64
Protokatehinska	17,79	2,18	0,26	1,44
Siringinska	11,13	11,1	1,30	11,72
<i>p</i> -Kumarinska	59,21	43,59	5,12	8,65
Galna	4,95	0,26	0,03	0,62
Ferulna	259,53	250,14	29,39	11,33
Kafena	10,23	7,10	0,83	8,16
Sinapinska	8,15	25,24	2,97	36,39
Hlorogenska	3,43	0	0	0
Elaginska	3,48	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>438,20</b>	<b>388,78</b>	<b>45,69</b>	<b>10,43</b>

\* g s.m. – gram suve materije

Na osnovu rezultata datih u Tabeli 4.24 zapaža se da su se najviše ekstrahovale sinapinska (36,39%), vanilinska (14,41%), siringinska (11,72%), ferulna (11,33%), *p*-kumarinska (8,65%) i kafena kiselina (8,16%). Ukupne fenolne kiseline ekstrahovane iz slada iznosile su 10,43%.

**Tabela 4.25. Sadržaj fenolnih kiselina u sladu i sladovini proizvedenoj od slada NS 565 i udeo fenolnih kiselina ekstrahovanih u sladovinu**

Fenolna kiselina	Slad ( $\mu\text{g/g s.m.}^*$ )	Sladovina ( $\mu\text{g/100ml}$ )	Sladovina ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )	% ekstrahovanih
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	21,19	9,79	1,16	5,49
Vanilinska	27,98	37,63	4,47	15,97
Gentistinska	1,41	0,17	0,02	1,43
Protokatehinska	12,21	1,93	0,23	1,88
Siringinska	9,98	7,33	0,87	8,72
<i>p</i> -Kumarinska	53,55	48,02	5,70	10,65
Galna	4,82	0,17	0,02	0,42
Ferulna	253,46	251,26	29,84	11,77
Kafena	9,52	3,46	0,41	4,32
Sinapinska	6,92	4,5	0,53	7,72
Hlorogenska	3,59	0	0	0
Elaginska	2,42	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>407,05</b>	<b>364,26</b>	<b>43,26</b>	<b>10,63</b>

\* g s.m. – gram suve materije

Na osnovu rezultata datih u Tabeli 4.25 zapaža se da su se najviše ekstrahovale vanilinska (15,97%), ferulna (11,77%), *p*-kumarinska (10,65%), siringinska (8,72%) i sinapinska kiselina (7,72%). Ukupne fenolne kiseline ekstrahovane iz slada iznosile su 10,63%.

**Tabela 4.26. Sadržaj fenolnih kiselina u sladu i sladovini proizvedenoj od slada NS 583 i udeo fenolnih kiselina ekstrahovanih u sladovinu**

Fenolna kiselina	Slad ( $\mu\text{g/g s.m.}^*$ )	Sladovina ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Sladovina ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )	% ekstrahovanih
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	27,19	10,22	1,25	4,58
Vanilinska	32,66	38,43	4,69	14,35
Gentistinska	1,47	0,25	0,03	2,07
Protokatehinska	15,93	1,99	0,24	1,52
Siringinska	9,67	7,56	0,92	9,53
<i>p</i> -Kumarinska	59,18	45,50	5,55	9,38
Galna	4,56	0,25	0,03	0,67
Ferulna	226,98	225,89	27,55	12,14
Kafena	7,89	7,60	0,93	11,75
Sinapinska	6,73	24,23	2,95	43,91
Hlorogenska	3,33	0	0	0
Elaginska	1,88	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>397,47</b>	<b>361,92</b>	<b>44,14</b>	<b>11,10</b>

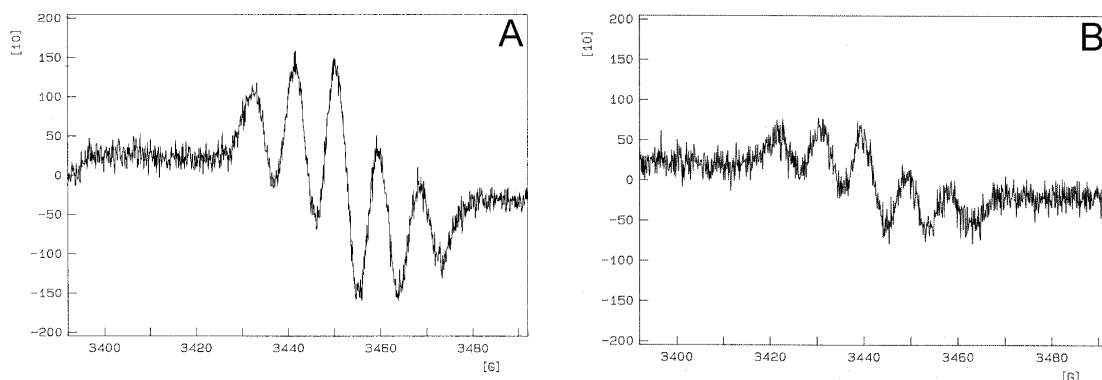
\* g s.m. – gram suve materije

Na osnovu rezultata datih u Tabeli 4.26 zapaža se da su se najviše ekstrahovale sinapinska (43,91%), vanilinska (14,35%), ferulna (12,14%), kafena (11,75%), siringinska (9,53%) i *p*-kumarinska kiselina (9,53%). Ukupne fenolne kiseline ekstrahovane iz slada iznosile su 11,10%.

Analizirajući podatke prikazane u Tabelama 4.24-4.26 može se zaključiti da je sadržaj ekstrahovanih pojedinačnih fenolnih kiselina različit i da zavisi od sorte ječma. Najveća razlika je u sadržaju ekstrahovane sinapinske kiseline: NS 525 - 36,39%, NS 565 - 7,72% i NS 583 – 43,91%. Udeo ostalih ekstrahovanih fenolnih kiselina u sladovinu nije se bitno razlikovao među sortama. Udeo ukupnih ekstrahovanih fenolnih kiselina bio je vrlo sličan za sve ispitivane sorte. Vanbeneden i saradnici (2007) su ispitivali sadržaj ferulne i *p*-kumarinske kiseline u sladovinama proizvedenim iz devet sorti ječmenog slada, kao i njihove udele u proizvedenim sladovinama. Udeo *p*-kumarinske kiseline u sladovinama iznosio je 2,3-5,3%, a ferulne kiseline 7,1-12,5%. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da najveći deo fenolnih kiselina ostaje u tropu, dok se samo mali deo ekstrahuje u sladovinu tokom komljenja.

#### **4.14. Rezultati antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima**

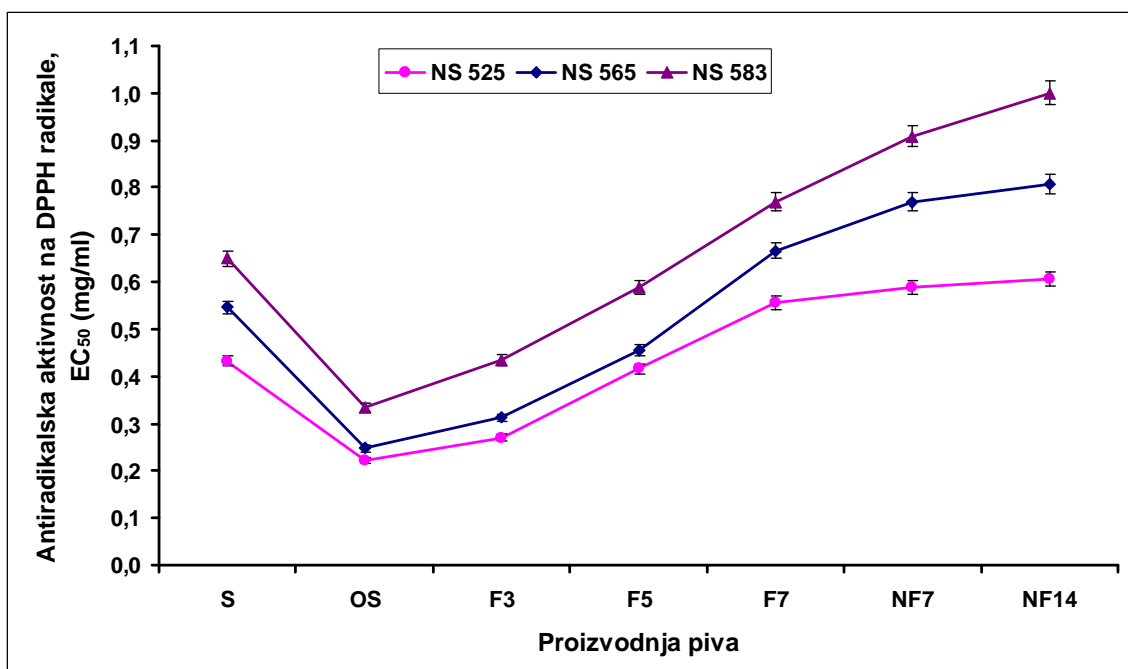
Primeri tipičnih spektara DPPH radikala bez (slepa proba) i sa ekstraktom su dati na Slici 4.34.



**Slika 4.34. ESR spektri DPPH radikala A) bez ekstrakta (slepa proba), B) sa ekstraktom dobijenim iz ohmeljene sladovine NS 525**

Antiradikalske aktivnosti ekstrakata na DPPH radikale tokom fermentacija sladovina proizvedenih od slada NS 525, NS 565 i NS 583 su prikazane na Slici 4.35. U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 je određena najviša antiradikalska aktivnost na DPPH radikale, obzirom da niža  $EC_{50}$  vrednost pokazuje višu antiradikalsku aktivnost ( $EC_{50}$  za NS 525-0,433; NS 565-0,546 i NS 583-0,649 mg/ml) što ukazuje da antiradikalska aktivnosti komponenti slada ima uticaja na antiradikalsku aktivnost proizvedene sladovine. Kellner i saradnici (2005) su utvrdili da antiradikalska aktivnost na DPPH radikale i antioksidativna aktivnost sladovine zavise od slada (ječma) upotrebljenog za proizvodnju sladovine. U ispitivanim sladovinama, nakon hmeljenja se znatno povisila antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ( $EC_{50}$  za ohmeljenu sladovinu proizvedenu od slada NS 525-0,223; NS 565-0,247 i NS 583-0,333 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale se tokom hmeljenja povećala kod NS 525 za 48,55%, NS 565 za 54,81% i NS 583 za 48,67%. Kaukovirt-Norja i saradnici (2005) su odredili porast antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale hmeljenjem za oko 70%. Franz i Back (2001) su takođe odredili porast antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale nakon hmeljenja sladovine. Dostálek i Karabín (2007) su utvrdili da hmeljenje sa peletiranim hmeljom uzrokuje porast antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale (oko 50%).

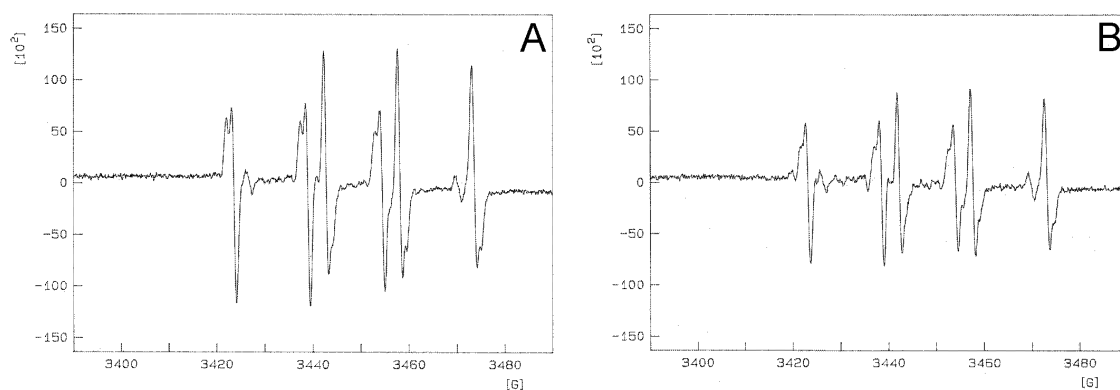
Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale se smanjila tokom glavne i naknadne fermentacije ( $EC_{50}$  za pivo proizvedeno od slada NS 525-0,606; NS 565-0,806 i NS 583-1,000 mg/ml) što je u saglasnosti sa rezultatima Kaneda i saradnika (1999). Smanjenje antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale se može objasniti sniženjem sadržaja ukupnih fenola i ukupnih ispitivanih fenolnih kiselina (Slika 4.32 i Tabele 4.21-4.23). Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale se najviše smanjila kod sorte NS 583. Pivo proizvedeno od slada NS 525 je na kraju fermentacije imalo znatno višu antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale u poređenju sa pivima proizvedenim od slada NS 565 i NS 583. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da sorta ječma ima dominantan uticaj na antiradikalsku aktivnost proizvedenog piva. Dostálek i Karabín (2007) su takođe utvrdili značajno smanjenje antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale tokom fermentacije (za oko 40%).



Slika 4.35. Antiradikalna aktivnost na DPPH radikale tokom fermentacija sladovina proizvedenih od slada NS 525, NS 565 i NS 583 (S-slادovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5, i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)

#### 4.15. Rezultati antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u sladovinama, ohmeljenim sladovinama, sladovinama tokom fermentacija, mladim pivima i pivima

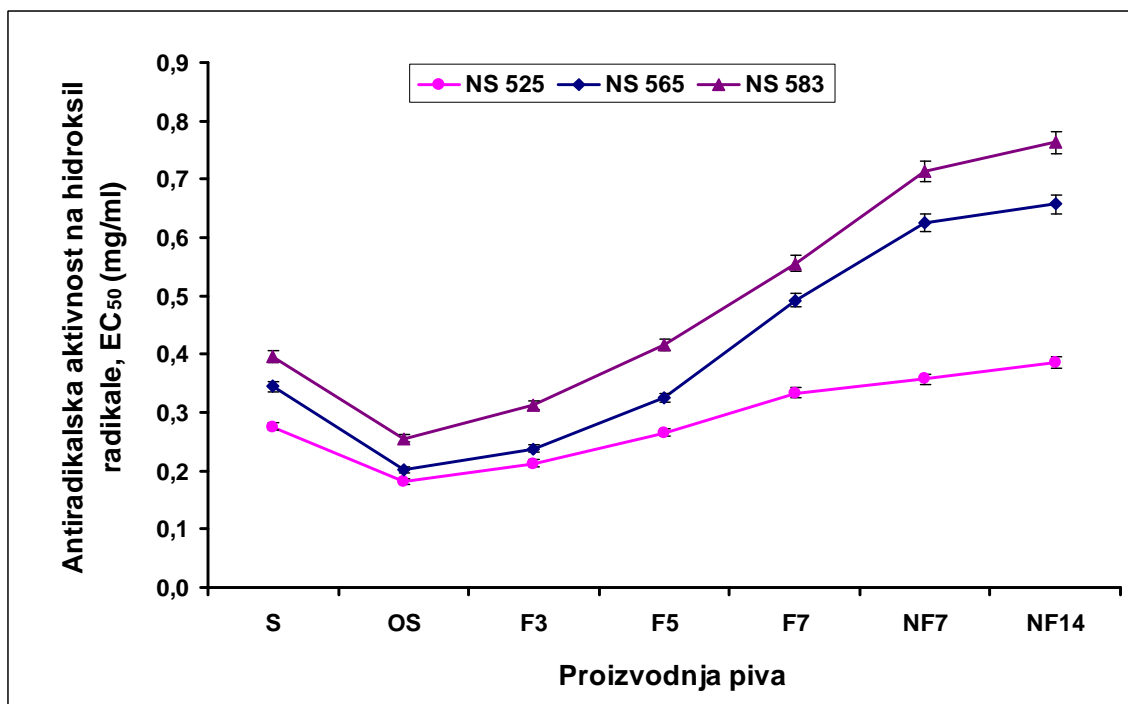
Primer ESR spektri DMPO-OH „spin adukata“ bez (slepa proba) i u prisustvu ekstrakata su dati na Slici 4.36.



Slika 4.36. ESR spektri DMPO-OH „spin adukata“ A) bez ekstrakta (slepa proba), B) sa ekstraktom dobijenim iz ohmeljene sladovine NS 525

Antiradikalna aktivnosti ekstrakata na hidroksil radikale tokom fermentacija sladovina proizvedenih od slada NS 525, NS 565 i NS 583 su prikazane na Slici 4.37. U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 je određena najviša antiradikalna aktivnost na hidroksil radikale, obzirom da niža  $EC_{50}$  vrednost pokazuje višu antiradikalnu aktivnost

(EC<sub>50</sub> za sladovinu proizvedenu od slada NS 525-0,275; NS 565-0,345 i NS 583-0,397 mg/ml). U ispitivanim sladovinama, nakon hmeljenja se znatno povisila antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale (EC<sub>50</sub> za ohmeljenu sladovinu NS 525-0,182; NS 565-0,201 i NS 583-0,256 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se tokom hmeljenja povećala kod NS 525 za 34,00%, kod NS 565 za 41,77% i kod NS 583 za 35,55%.



**Slika 4.37.** Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale tokom fermentacija NS 525, NS 565 i NS 583 (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5, i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)

Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se smanjila tokom glavne i naknadne fermentacije (EC<sub>50</sub> za pivo proizvedeno od slada NS 525-0,386; NS 565-0,658 i NS 583-0,763 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se najviše smanjila kod sorte NS 583. Pivo proizvedeno od slada NS 525 je na kraju fermentacije imalo znatno višu antiradikalisku aktivnost na hidroksil radikale u poređenju sa pivima proizvedenim od slada NS 565 i NS 583. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da sorta ječma ima dominantan uticaj na antiradikalisku aktivnost proizvedenog piva.

Uchida i Ono (1999, 2000) su utvrdili da pivo poseduje endogenu antioksidativnu aktivnost. Endogena antioksidativna aktivnost (EA) piva se određuje na osnovu „lag“ faze tj. perioda pre nastajanja hidroksil radikala (Uchida i Ono, 1999, 2000). Tokom procesa proizvodnje piva endogena antioksidativna aktivnost se smanjuje zbog smanjenja sadržaja antioksidanata koji se utroše na reakcije sa slobodnim radikalima prisutnim u pivu. Dobijeni rezultati pokazuju da se endogena antioksidativna aktivnost smanjuje tokom proizvodnje piva. Međutim, pivo poseduje znatnu antioksidativnu aktivnost što su potvrdili i dobijeni rezultati.

Hemija proizvodnje piva je vrlo složena i ukupni antioksidativni potencijal tokom proizvodnje piva tokom različitih faza zavisi od brojnih promenljivih. Uticaj upotrebljenog slada za proizvodnju sladovine je izuzetno značajan. Doprinos slada antioksidativnoj aktivnosti sladovine zavisi od količine ekstrahovanih antioksidativnih jedinjenja tokom kopljenja. Antioksidativni profil sladovina nije konstantan tokom procesa proizvodnje (Chandra i sar., 2000). Kaukovirt-Norja i saradnici (2005) i Dostálek i Karabín (2007) su takođe utvrdili porast antioksidativne aktivnosti nakon hmeljenja i smanjenje antioksidativne aktivnosti tokom glavne i naknadne fermentacije piva. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prikazanim na Slikama 4.35 i 4.37. Hmelj sadrži mnoge u vodi rastvorljive polifenole koji tokom kuvanja sladovine sa hmeljom prelaze u sladovinu i povećavaju antioksidativnu aktivnost ohmeljene sladovine. Opšti doprinos polifenola hmelja zavisi od momenta dodavanja u ključalu sladovinu. Poznato je da polifenoli hmelja „preživljavaju“ proces proizvodnje piva i doprinose antioksidativnoj aktivnosti piva (Chandra, 2002).

U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 sa najvišim sadržajem ukupnih fenola i najvišim ukupnim sadržajem fenolnih kiselina (Tabela 4.21) određena je najviša antiradikalska aktivnost na DPPH i hidroksil radikale (Slike 4.35 i 4.37). Tokom proizvodnje piva sadržaj ukupnih fenola se blago smanjio, što ukazuje da je proces proizvodnje imao uticaja na njihov sadržaj. Interesantno je da je smanjenje antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale slično smanjenju sadržaja ukupnih fenola i ukupnih fenolnih kiselina tokom procesa proizvodnje piva.

Sadržaji ukupnih fenola u sladovinama su iznosili 0,32 za NS 525, 0,31 za NS 565 i 0,30 mg GAE/100 ml za NS 583. Pivo proizvedeno od sorte ječma NS 525 imalo je najviši sadržaj ukupnih fenola (0,31 mg GAE/100 ml piva), dok su piva proizvedena iz sorti NS 565 i NS 583 imala neznatno niži sadržaj ukupnih fenola (0,29 i 0,28 mg GAE/100 ml piva). Najviši ukupni sadržaj svih fenolnih kiselina je određen u ohmeljenim sladovinama (NS 525-461,41, NS 565-426,22 i NS 583-423,56  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ), dok je u pivima iznosio za NS 525-383,85, NS 565-379,22 i NS 583-321,05  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ . U proizvedenim pivima uočena je razlika između piva proizvedenih od slada NS 525, NS 565 i NS 583 u antiradikalskoj aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale iznosila je u pivu proizvedenom od slada NS 525-0,606; NS 565-0,806 i NS 583-1,000 mg/ml. Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale iznosila je u pivo proizvedenom od slada NS 525-0,386; NS 565-0,658 i NS 583-0,763 mg/ml. Iako nisu uočene značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola, sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u pivu proizvedenom od slada NS 583 je bio niži u odnosu na piva proizvedena od slada NS 525 i NS 565, što može biti uzrok nižih antiradikalskih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale piva proizvedenog od slada NS 583.

Razlika u sadržaju ukupnih fenolnih kiselina u ispitivanim sladovima nije bila značajna, jer se u proizvodnji slada promene odigravaju u zrnju ječma koje ostaje netaknuto. Proizvodnja piva započinje ekstrakcijom rastvorljivih jedinjenja iz samlevenog zrna slada. Proizvedena sladovina sadrži oko 8% suve materije. Nakon toga sledi hmeljenje sladovine na temperaturi ključanja u trajanju od jednog sata. U oba procesa kiseonik iz vazduha je dostupan. Nakon hlađenja ohmeljene sladovine sledi aeracija. Uchida i Ono (2000a) su utvrdili da se endogena antioksidativna aktivnost piva smanjuje sa porastom sadržaja rastvorenog kiseonika. Posle aeracije sledi inokulacija ohmeljene sladovine kvascem i fermentacija. Smatra se da su među najjačim antioksidantima u fermentaciji piva ćelije kvasca. Pored toga što ćelije kvasca stvaraju  $\text{SO}_2$ , redukuju i karbonilna jedinjenja (osim onih „adukata“ koji nastaju sa  $\text{SO}_2$ ) do

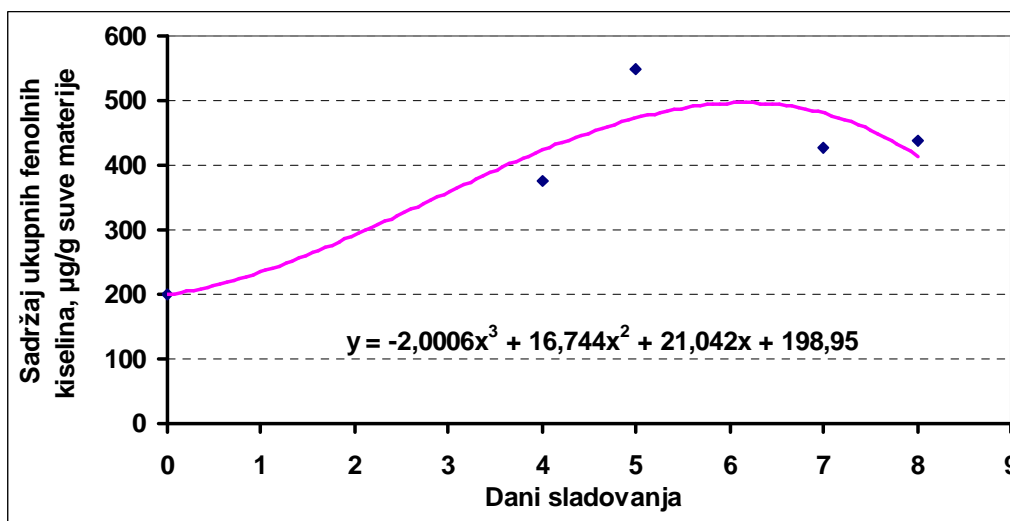
njihovih ekvivalentnih alkohola. Nekoliko enzima kvasca učestvuje u redukciji karbonilnih jedinjenja, uključujući alkohol dehidrogenazu koja učestvuje u proizvodnji etanola (Bamforth, 2006). Sumpor-dioksid nastao kao proizvod metabolizma kvasca ima značajnu antioksidativnu aktivnost u pivu (Andersen i sar., 2000; Bamforth, 2006). Uzimajući navedeno u obzir može se zaključiti da je proces fermentacije mnogo složeniji od procesa sladovanja. U toku proizvodnje piva brojni faktori, pored fenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz slada i hmelja, utiču na antioksidativnu aktivnost piva (proizvodi metabolizma kvasca).



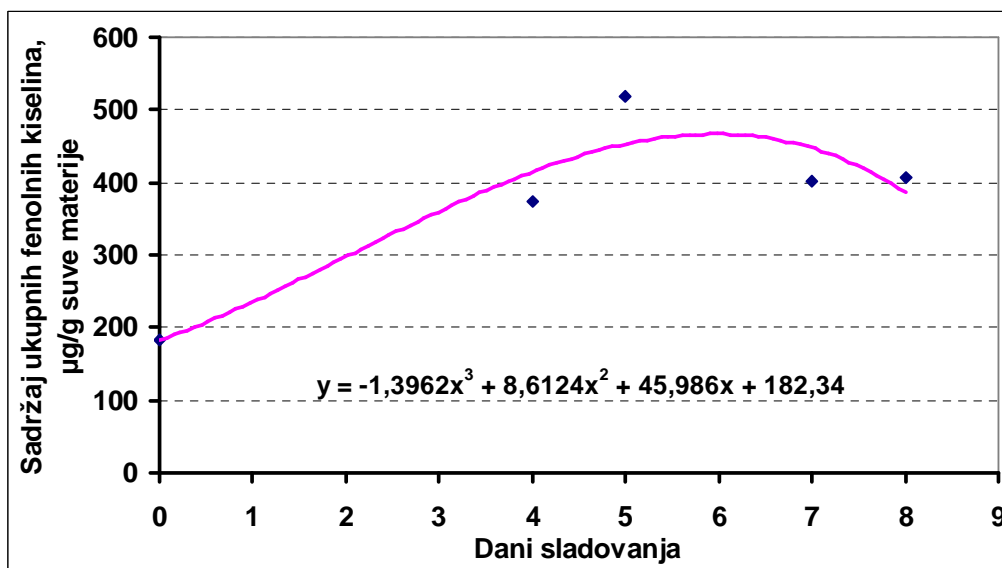
## 5. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA

### 5.1. Modelovanje sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje slada i piva

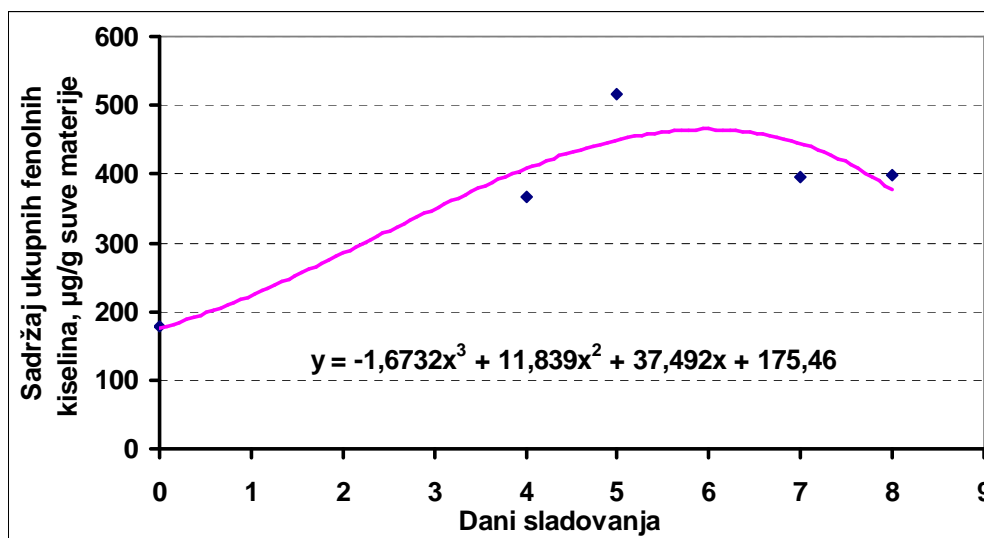
Na Slikama 5.1-5.3 date su promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom sladovanja ispitivanih sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583 opisane funkcijom trećeg stepena.



Slika 5.1. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte NS 525



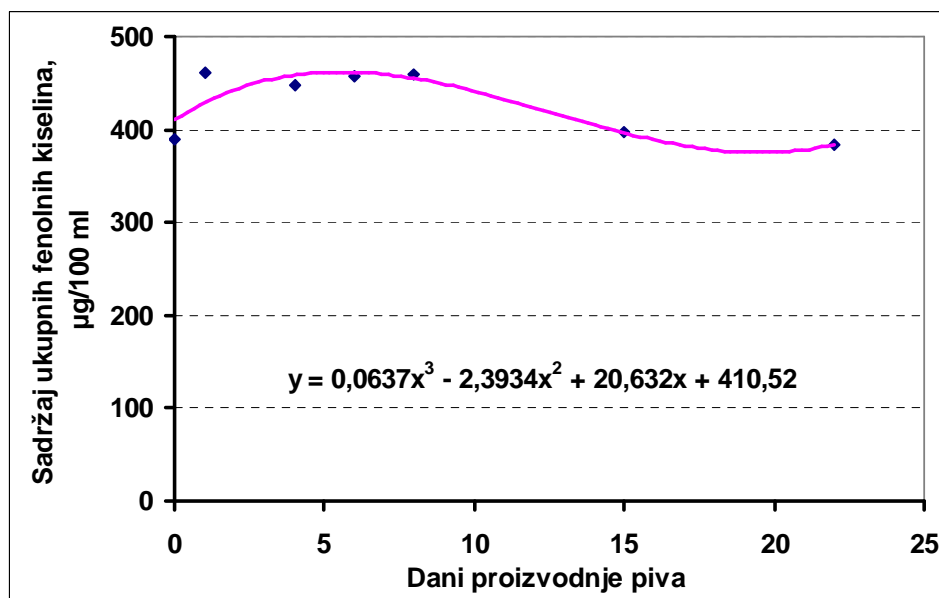
Slika 5.2. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte NS 565



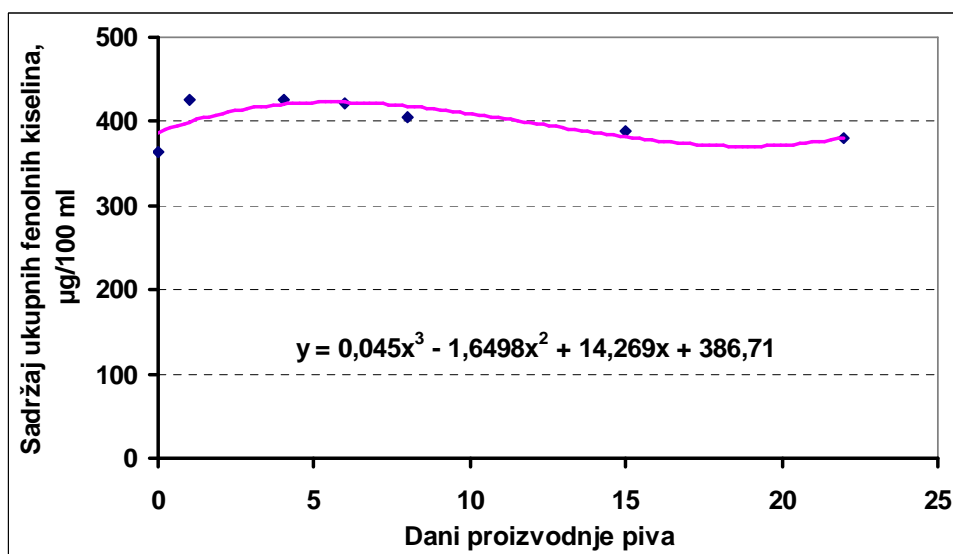
**Slika 5.3. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorte NS 583**

Na osnovu funkcija koje opisuju promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom sladovanja sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583 može se zaključiti da funkcije imaju sličan tok i približno iste koeficijente determinacije (za NS 525  $R^2=0,8221$ ; za NS 565  $R^2=0,8536$  i za NS 583  $R^2=0,8492$ ). Svi koeficijenti determinacije su visoki i pokazuju dobro slaganje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina sa funkcijama koje opisuju promenu.

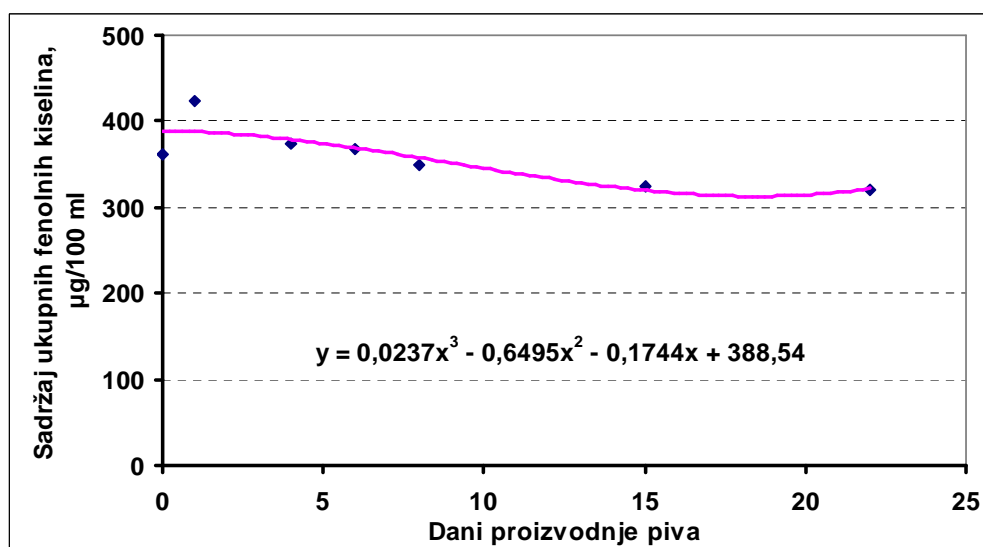
Na Slikama 5.4-5.6 date su promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583 opisane funkcijom trećeg stepena.



**Slika 5.4. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva od slada NS 525**



**Slika 5.5. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva od slada NS 565**



**Slika 5.6. Modelovanje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva od slada NS 583**

Na osnovu funkcija koje opisuju promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina tokom proizvodnje piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583 može se zaključiti da funkcije imaju sličan tok i približno iste koeficijente determinacije (za NS 525  $R^2=0,7818$ ; za NS 565  $R^2=0,5857$  i za NS 583  $R^2=0,6766$ ). Svi koeficijenti determinacije su visoki i pokazuju dobro slaganje promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina sa funkcijama koje opisuju promenu.

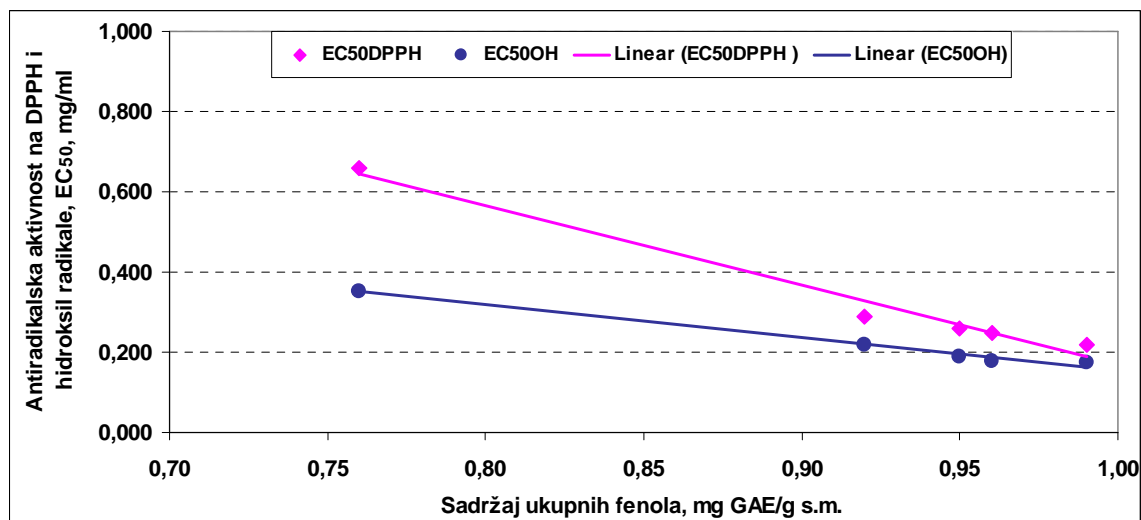
Analizom sadržaja ferulne i *p*-kumarinske kiseline u toku sladovanja (Tabele 4.8-4.10) utvrđeno je da njihov zbir čini preko 70% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Prema tome, analiza promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u toku sladovanja

predstavlja najvećim delom promenu sadržaja ove dve kiseline. U cilju određivanja zavisnosti sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale urađena je korelaciona analiza sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalskih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku sladovanja.

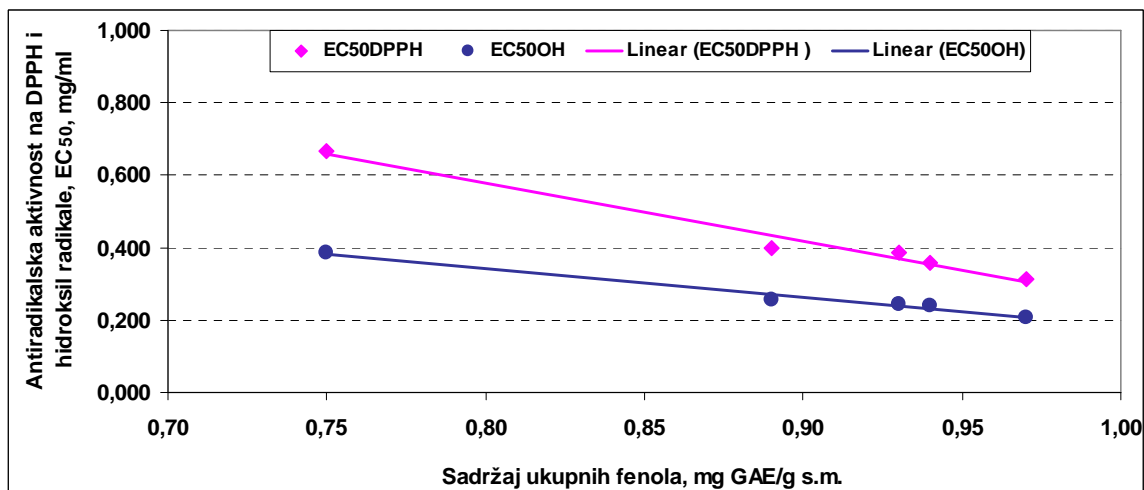
Analizom sadržaja ferulne, *p*-kumarinske i vanilinske kiseline u toku proizvodnje piva (Tabele 4.21-4.23) utvrđeno je da njihov zbir čini preko 80% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Prema tome, analiza promene sadržaja ukupnih fenolnih kiselina u toku proizvodnje piva predstavlja najvećim delom promenu sadržaja ove tri kiseline. U cilju određivanja zavisnosti sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale urađena je korelaciona analiza sadržaja pojedinačnih fenolnih kiselina i antiradikalskih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku proizvodnje piva.

## 5.2. Korelaciona analiza sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku procesa sladovanja i proizvodnje piva

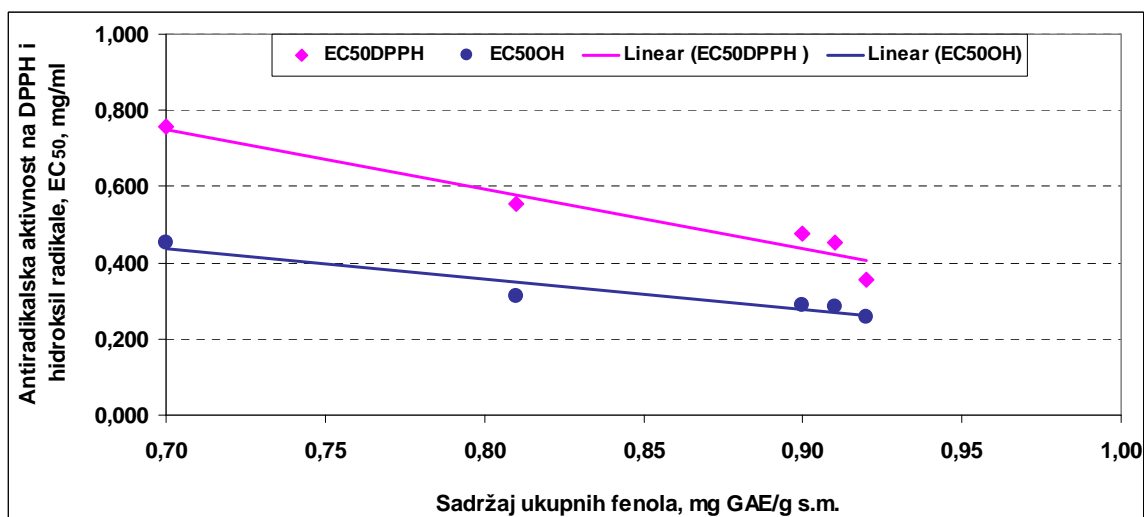
U cilju utvrđivanja zavisnosti između sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku procesa sladovanja i proizvodnje piva urađena je korelaciona analiza. Na Slikama 5.7-5.9 date su korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorti NS 525 (Slika 5.7), NS 565 (Slika 5.8) i NS 583 (Slika 5.9). Za određivanje korelacija korišćeni su podaci dati na Slikama 4.2, 4.29 i 4.31.



Slika 5.7. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525



Slika 5.8. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565



Slika 5.9. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583

U Tabeli 5.1 dati su koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ) (Vukadinović, 1986) sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale određeni za proces sladovanja sorti NS 525, NS 565 i NS 583.

Dobijeni rezultati antiradikalske sposobnosti na DPPH i hidroksil radikale su izraženi kao  $EC_{50}$  vrednosti.  $EC_{50}$  vrednost se definiše kao koncentracija ekstrakta potrebna za uklanjanje 50% DPPH ili hidroksil radikala pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Manja  $EC_{50}$  vrednost odgovara višoj antiradikalnoj aktivnosti. Tokom procesa sladovanja antiradikalna aktivnost na DPPH i hidroksil radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Takođe, sadržaj ukupnih fenola se tokom procesa sladovanja povećavao. Može se zaključiti da što je viši sadržaj ukupnih fenola to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50%

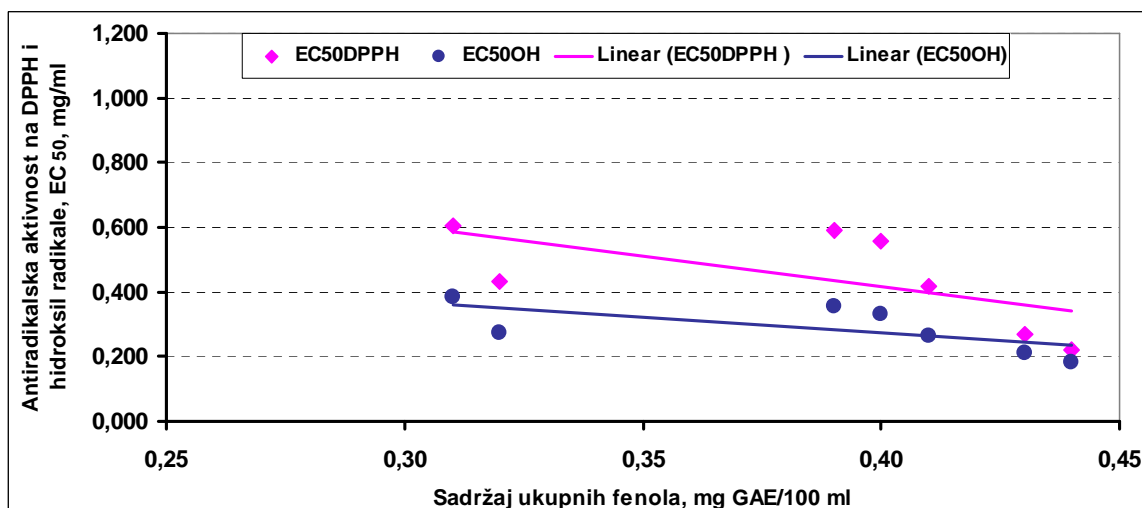
DPPH ili hidroksil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan.

**Tabela 5.1. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ) sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale određeni za proces sladovanja sorti NS 525, NS 565 i NS 583**

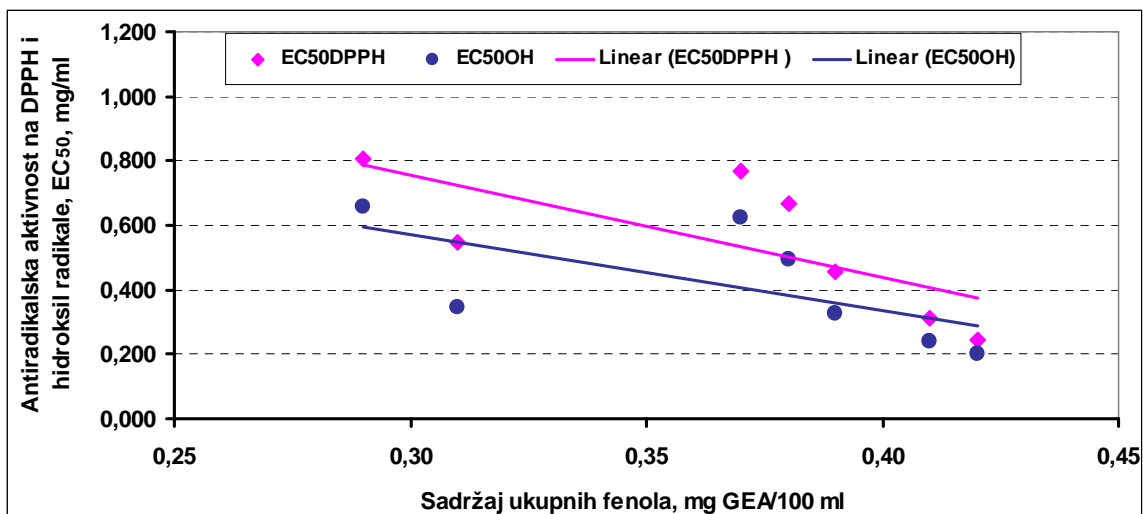
Sorta ječma	Antiradikalna aktivnost	a	b	$R^2$
NS 525	DPPH	-1,9916	2,1588	0,9799
	Hidroksil	-0,8203	0,9735	0,9906
NS 565	DPPH	-1,5982	1,8561	0,9808
	Hidroksil	-0,7857	0,9702	0,9848
NS 583	DPPH	-1,5557	1,8394	0,9388
	Hidroksil	-0,7990	0,9969	0,9163

Na osnovu rezultata koeficijenata determinacije ( $R^2$ ) datih u Tabeli 5.1 može se zaključiti da postoji visoka korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja. Koeficijenti determinacije su kod sva tri uzorka bili visoki tj. iznad 0,9. Kod sorte NS 583 određeni su najniži koeficijenti determinacije i to: za DPPH radikale  $R^2=0,9388$  i za hidroksil radikale  $R^2=0,9163$ .

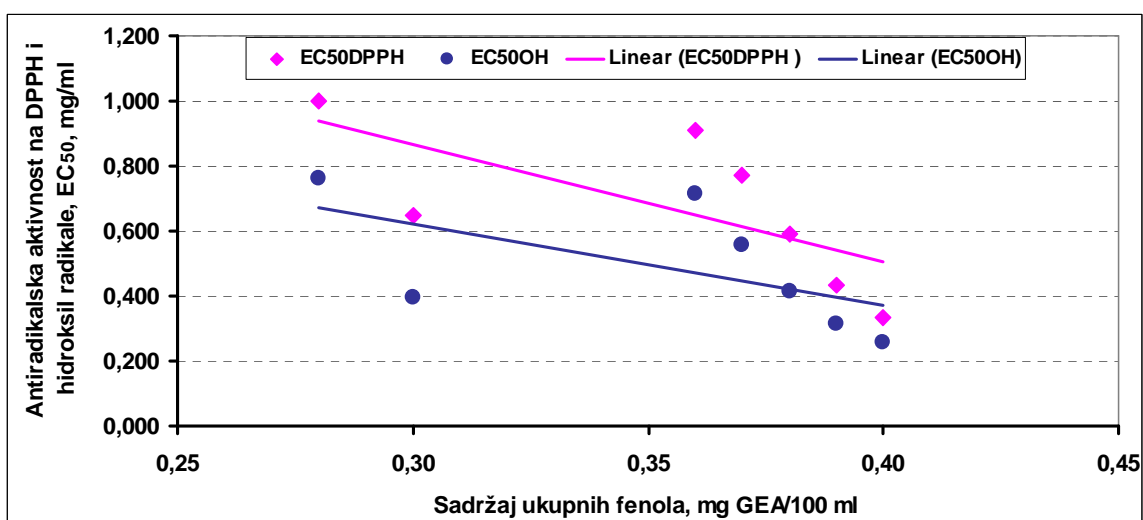
Na slikama 5.10-5.12 date su korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva NS 525 (Slika 5.10), NS 565 (Slika 5.11) i NS 583 (Slika 5.12). Za određivanje korelacija korišćeni su podaci dati na Slikama 4.32, 4.35 i 4.37.



**Slika 5.10. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525**



Slika 5.11. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565



Slika 5.12. Korelacije sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583

U Tabeli 5.2 dati su koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ) sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale određeni za proizvodnju piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583.

**Tabela 5.2. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ) sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale određeni za proizvodnju piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583.**

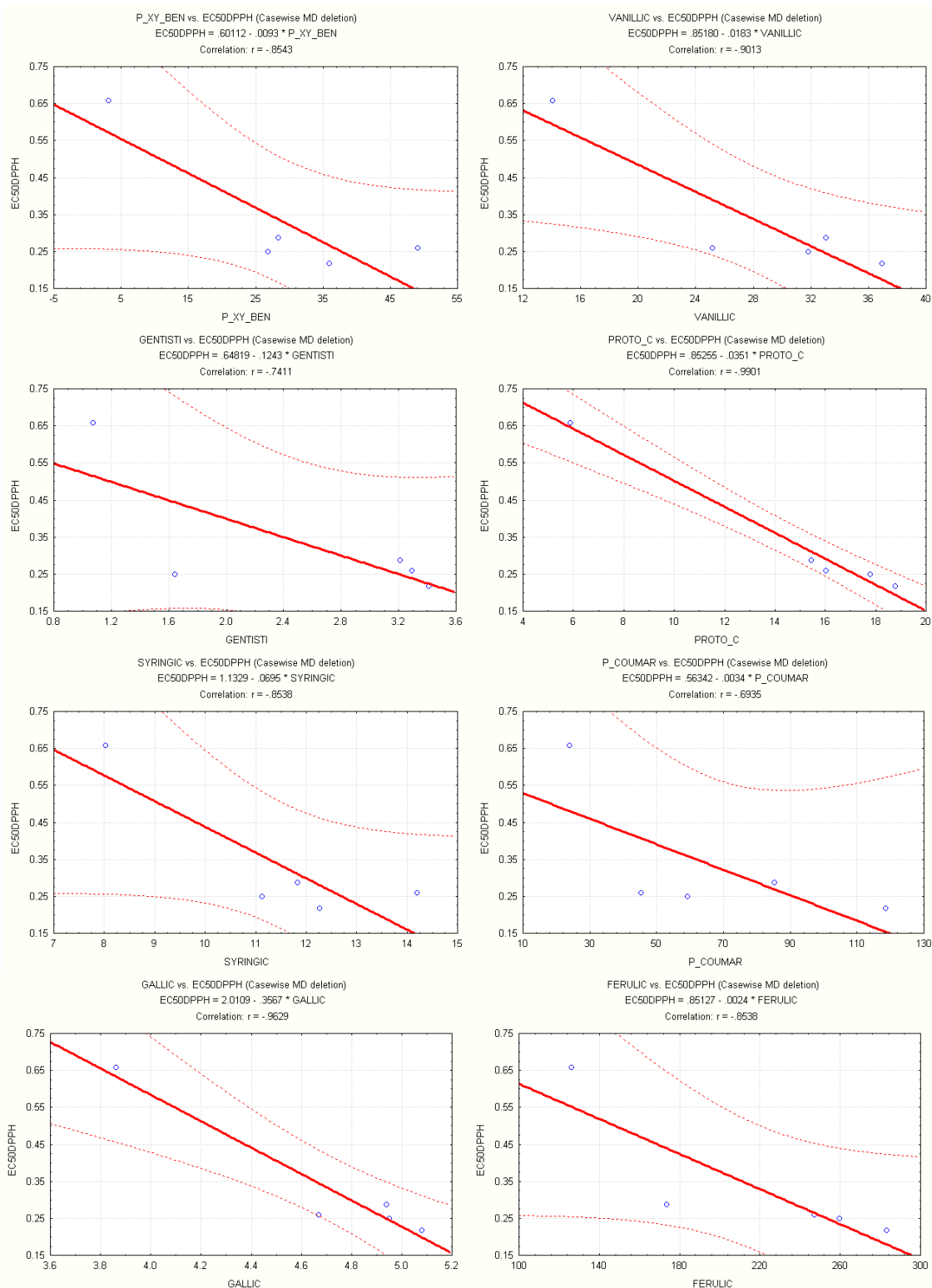
Slad	Antiradikalska aktivnost	a	b	$R^2$
NS 525	DPPH	-1,8831	1,1681	0,4009
	Hidroksil	-0,9696	0,6615	0,4357
NS 565	DPPH	-3,1517	1,7004	0,5077
	Hidroksil	-2,3447	1,2728	0,4011
NS 583	DPPH	-3,6301	1,9552	0,4785
	Hidroksil	-2,4954	1,3719	0,3462

Na osnovu rezultata koeficijenata determinacije ( $R^2$ ) datih u Tabeli 5.2 može se zaključiti da postoji značajna korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva. Kod piva proizvedenog od slada NS 525 određen je najniži koeficijent determinacije za DPPH radikale ( $R^2=0,4009$ ), dok je za najniži koeficijent determinacije za hidroksil radikale ( $R^2=0,3463$ ) određen kod uzorka NS 583. Svi koeficijenti determinacije određeni na osnovu rezultata dobijenih tokom proizvodnje piva su niži u poređenju sa koeficijentima determinacije određenim za proces sladovanja. Na osnovu rezultata datih u Tabeli 4.19 zaključeno je da je samo oko 4% ukupnih fenola ekstrahovano u sladovinama. Niži koeficijenti determinacije tokom proizvodnje piva mogu sa objasniti značajnim smanjenjem sadržaja ukupnih fenola u sladovini koja je polazna sirovina za proizvodnju piva. Pored toga, u toku fermentacije značajne su aktivnosti ćelija kvasca koje menjaju sastav sladovine i talože se. Tokom fermentacije, snižava se i pH i dostižu se pH vrednosti koje su u oblasti izoelektričnih tačaka velikog broja rastvorenih jedinjenja, među kojima su i tanini, pri čemu se talože na mehurićima  $CO_2$  ili se adsorbuju na ćelijama kvasca (Kunze, 1998).

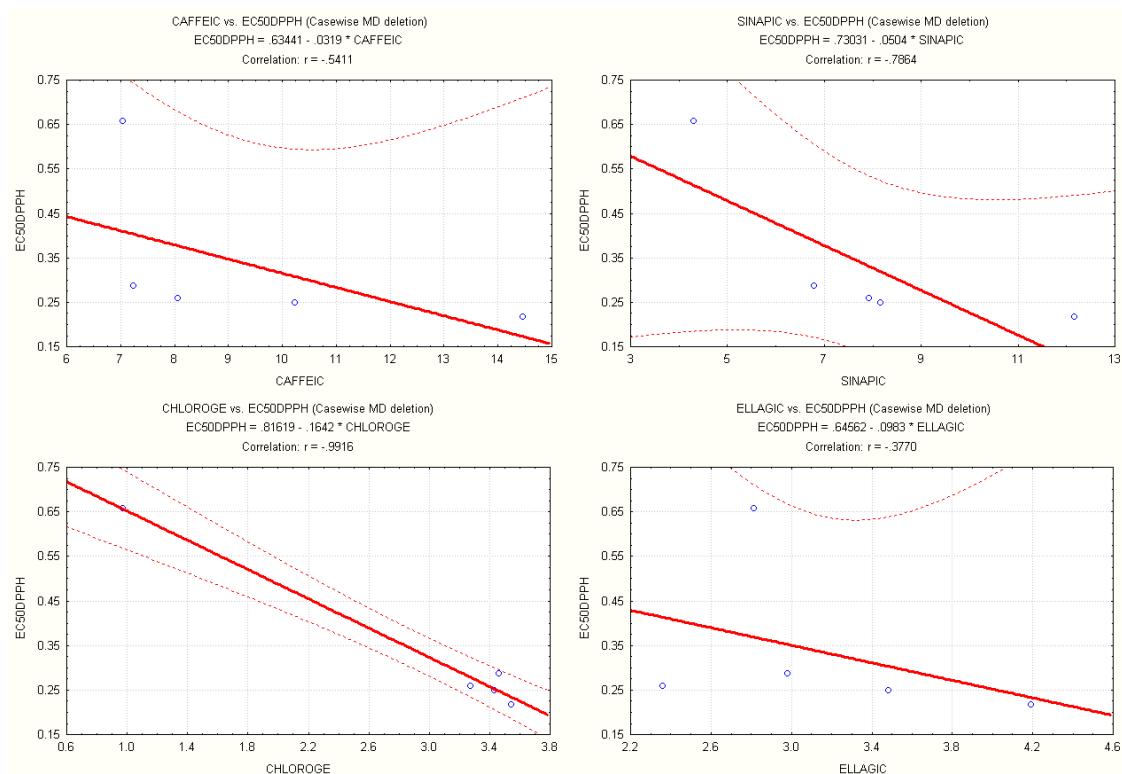
### **5.3. Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalskih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja i proizvodnje piva**

U cilju utvrđivanja zavisnosti između sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja i proizvodnje piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583, urađena je korelaciona analiza odnosa sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalskih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. Na Slikama 5.13-5.36 date su korelacije sadržaja ispitivanih fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u toku procesa sladovanja i proizvodnje piva. U Tabelama 5.3-5.14 dati su koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale u toku procesa sladovanja i proizvodnje piva.





**Slika 5.13. Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525**



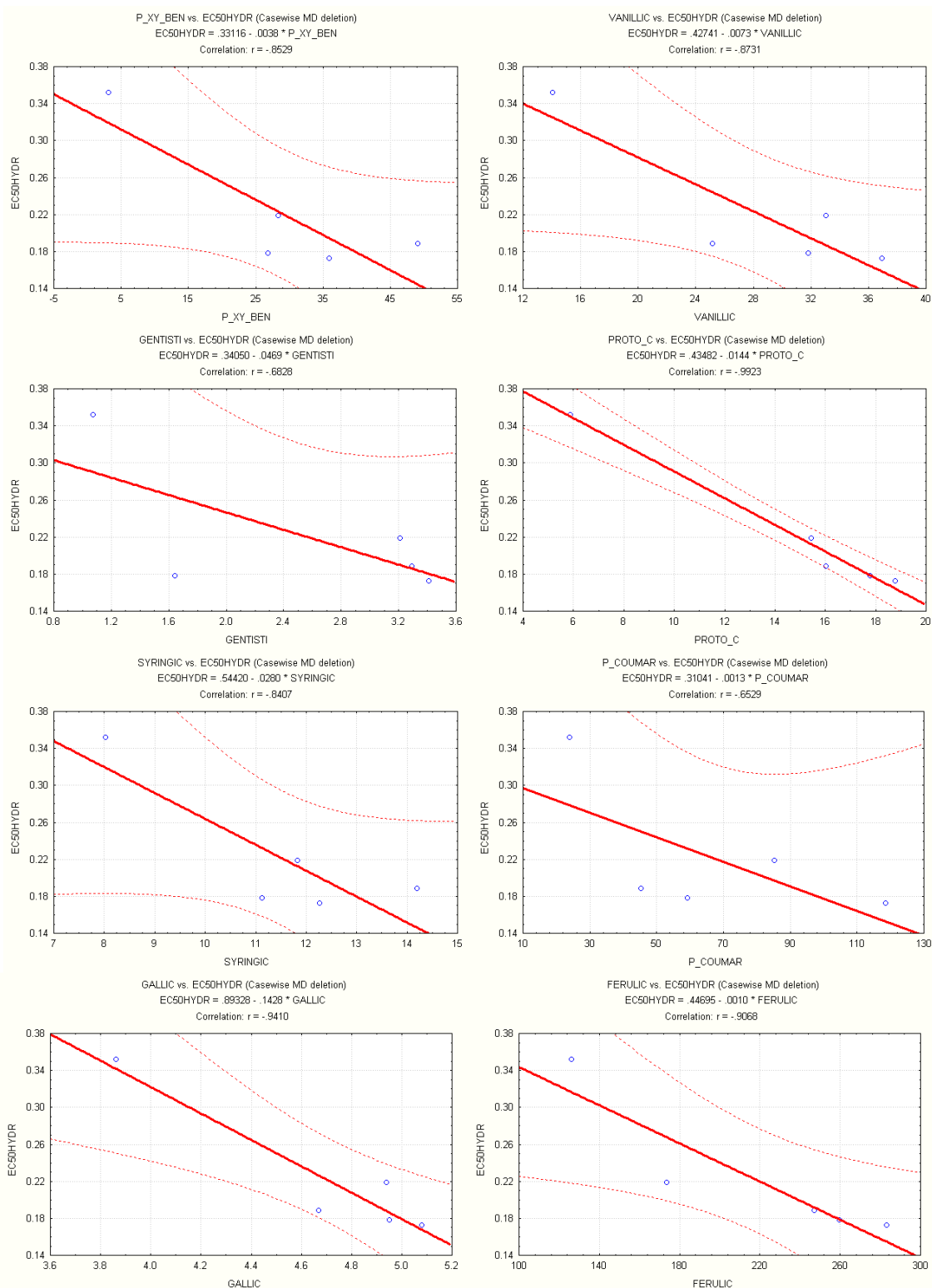
**Slika 5.14.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525

**Tabela 5.3.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja uzorka NS 525

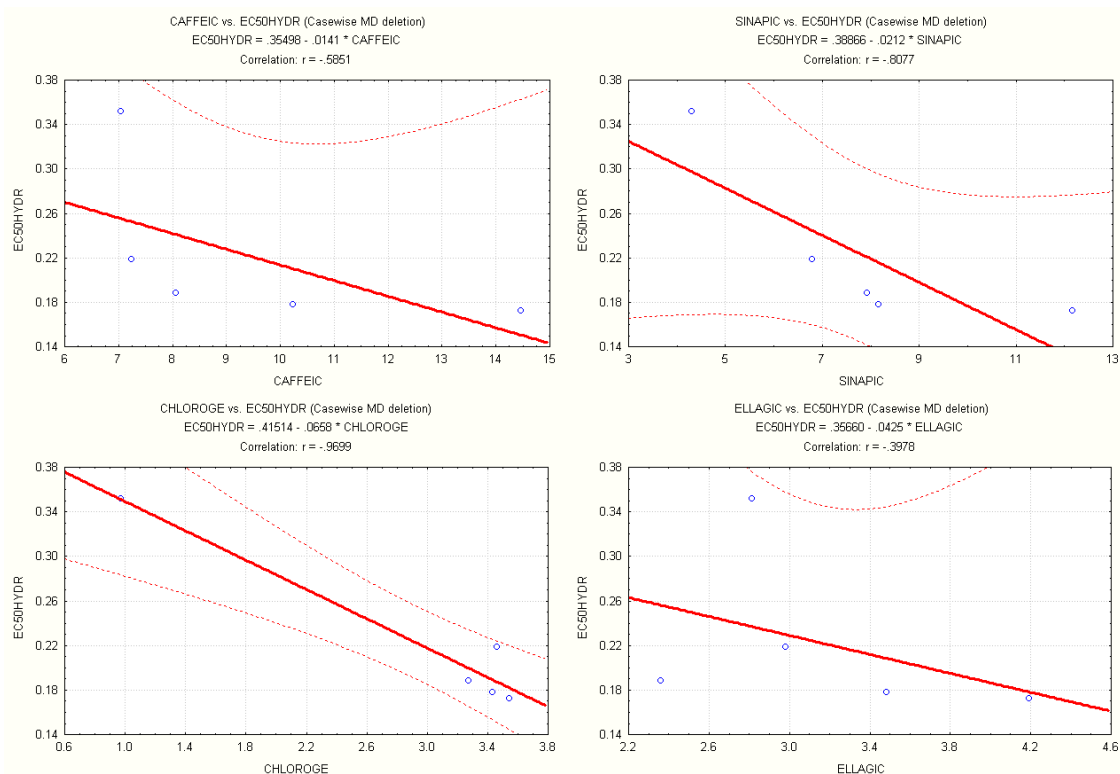
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0093	0,6011	<b>0,7298</b>
Vanilinska	-0,0283	0,8518	<b>0,8123</b>
Gentistinska	-0,1243	0,6418	0,5492
Protokatehinska	-0,0351	0,8522	<b>0,9803</b>
Siringinska	-0,0695	1,1329	<b>0,7290</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0034	0,5634	0,4809
Galna	-0,3567	2,0109	<b>0,9272</b>
Ferulna	-0,0024	0,8512	<b>0,7290</b>
Kafena	-0,0319	0,6344	0,2928
Sinapinska	-0,0504	0,7303	<b>0,6184</b>
Hlorogenska	-0,1542	0,8161	<b>0,9833</b>
Elaginska	-0,0983	0,6456	0,1421

Tokom procesa sladovanja sorte NS 525 antiradikalna aktivnost na DPPH radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiselina to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidroksil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 525 imale su: hlorogenska (0,9833), protokatehinska

(0,9803), galna (0,9272), vanilinska (0,8123), *p*-hidroksibenzoeva (0,7298), ferulna (0,7290), siringinska (0,7290) i sinapinska kiselina (0,6184).



**Slika 5.15.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske kiseline, galne i ferulne i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525



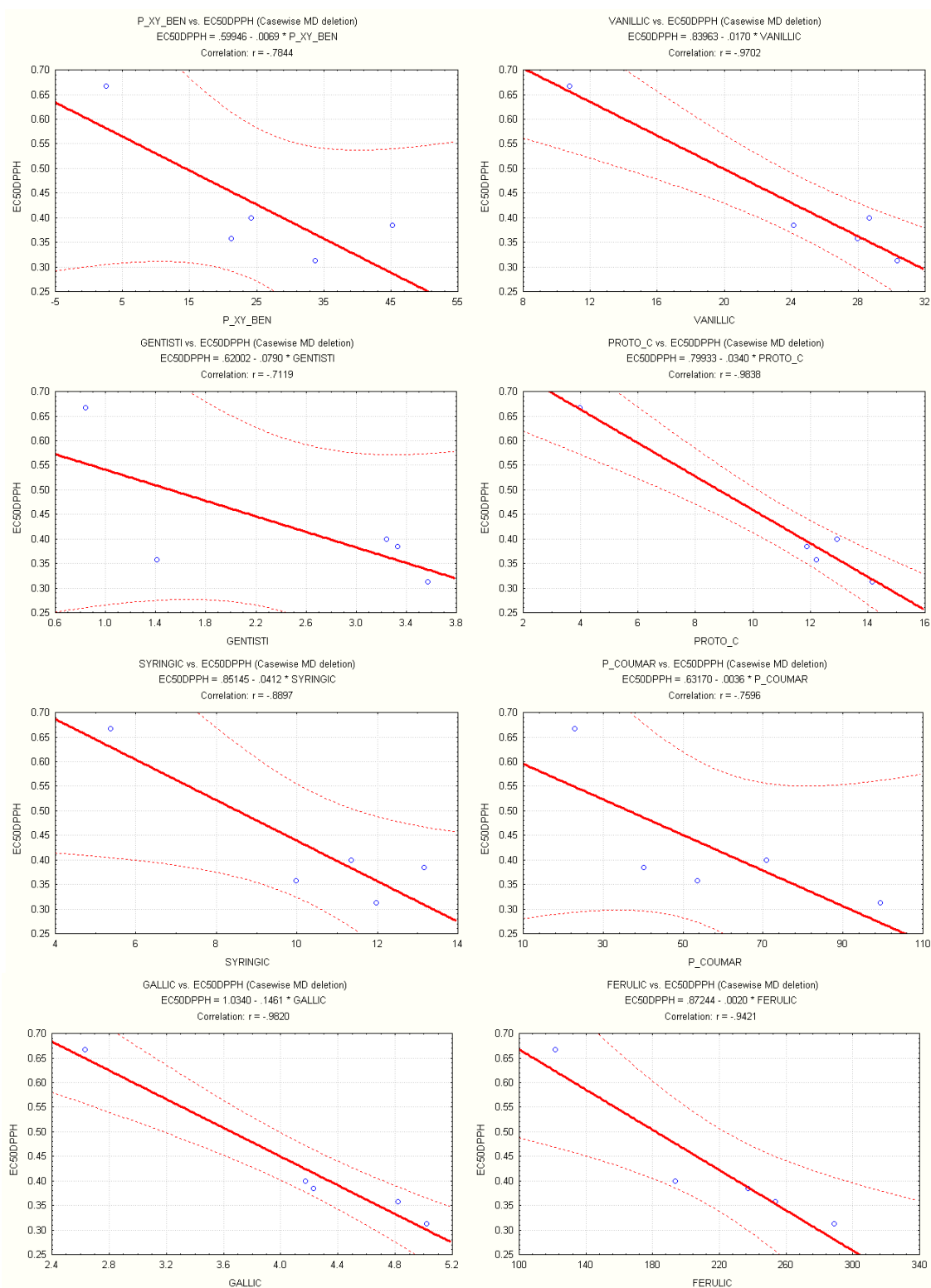
**Slika 5.16.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525

**Tabela 5.4.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 525

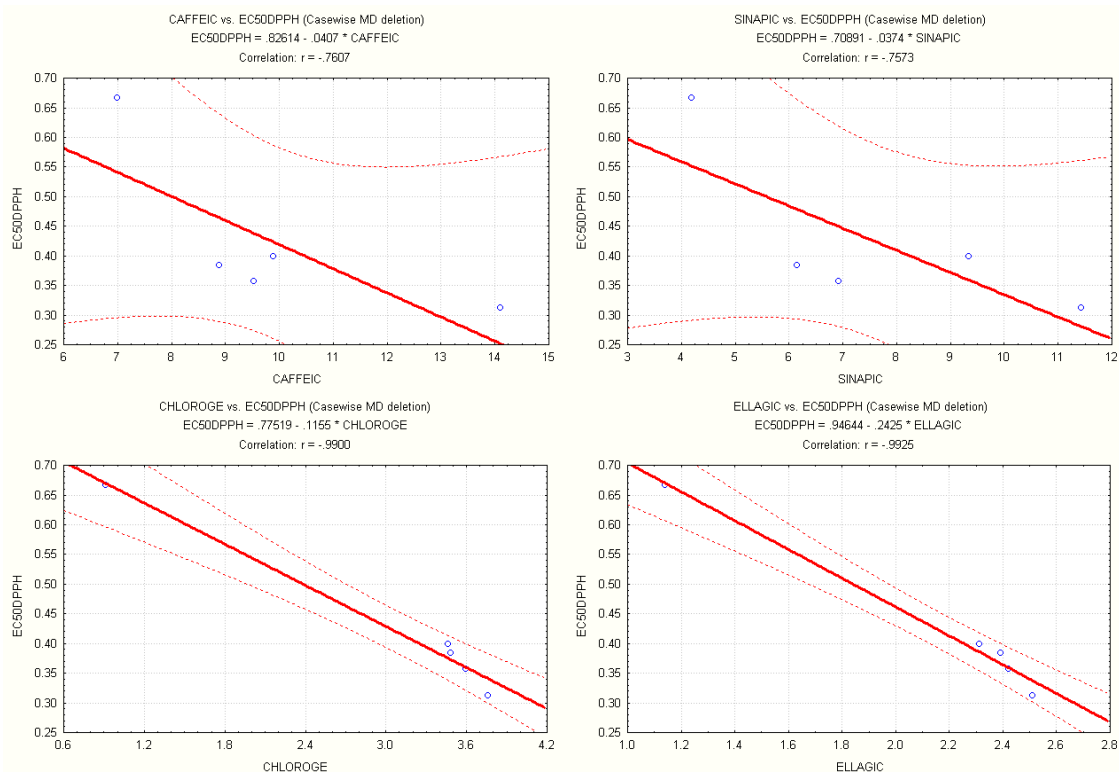
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0038	0,3311	<b>0,7274</b>
Vanilinska	-0,0073	0,4274	<b>0,7623</b>
Gentistinska	-0,0469	0,3405	0,4662
Protokatehinska	-0,0144	0,4348	<b>0,9847</b>
Siringinska	-0,0280	0,5442	<b>0,7068</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0013	0,3104	0,4263
Galna	-0,1428	0,8932	<b>0,8855</b>
Ferulna	-0,0010	0,4469	<b>0,8223</b>
Kafena	-0,0141	0,3549	0,3423
Sinapinska	-0,0212	0,3886	<b>0,6524</b>
Hlorogenska	-0,0658	0,4151	<b>0,9407</b>
Elaginska	-0,0425	0,3566	0,1582

Tokom procesa sladovanja sorte NS 525 antiradikalna aktivnost na hidrosil radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiselina to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidrosil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 525 imale su: protokatehinska (0,9847),

hlorogenska (0,9407), galna (0,8855), ferulna (0,8223), vanilinska (0,7623), *p*-hidroksibenzoeva (0,7274), siringinska (0,7068) i sinapinska kiselina (0,6524).



**Slika 5.17.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565



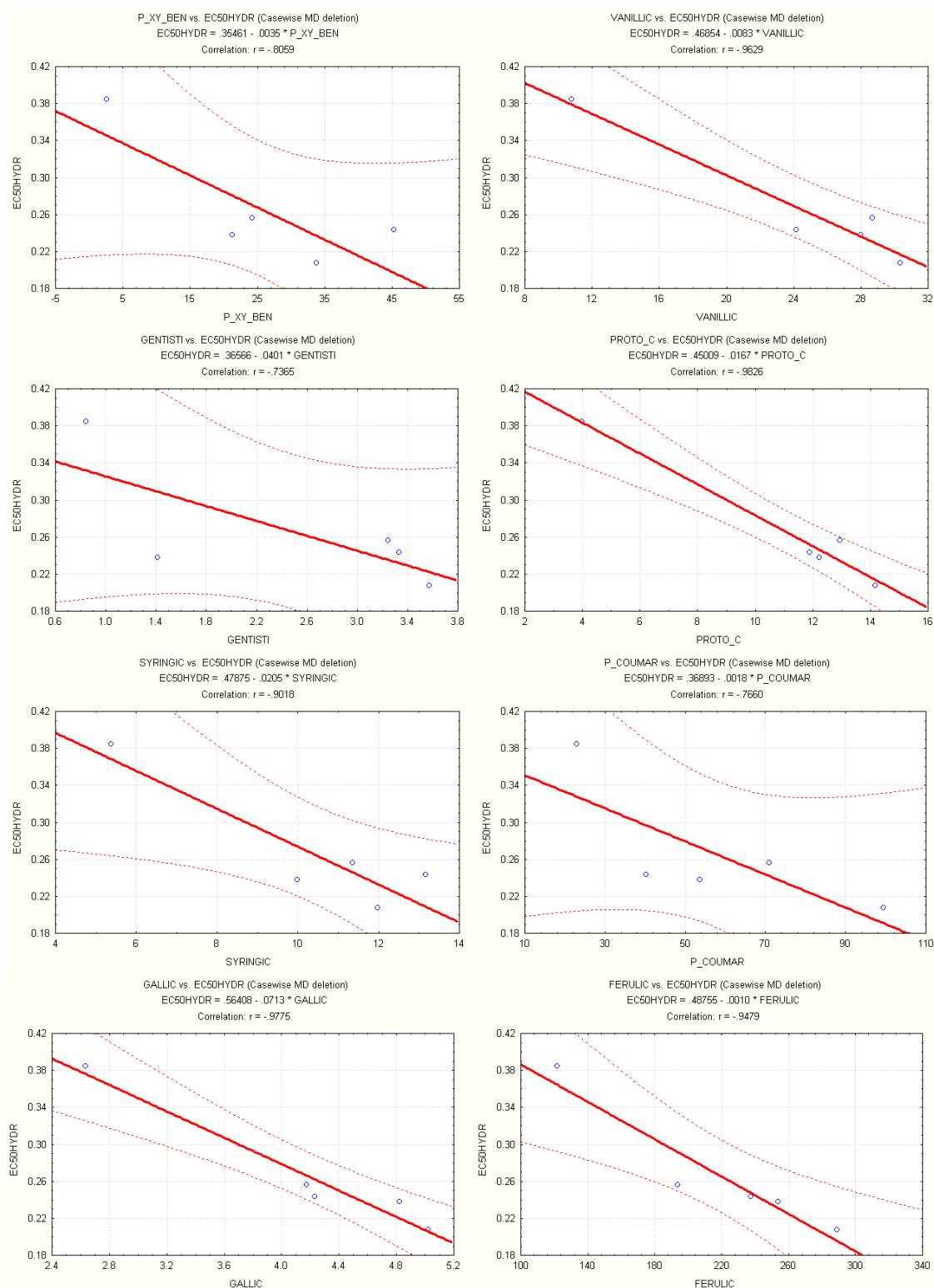
**Slika 5.18.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565

**Tabela 5.5.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565

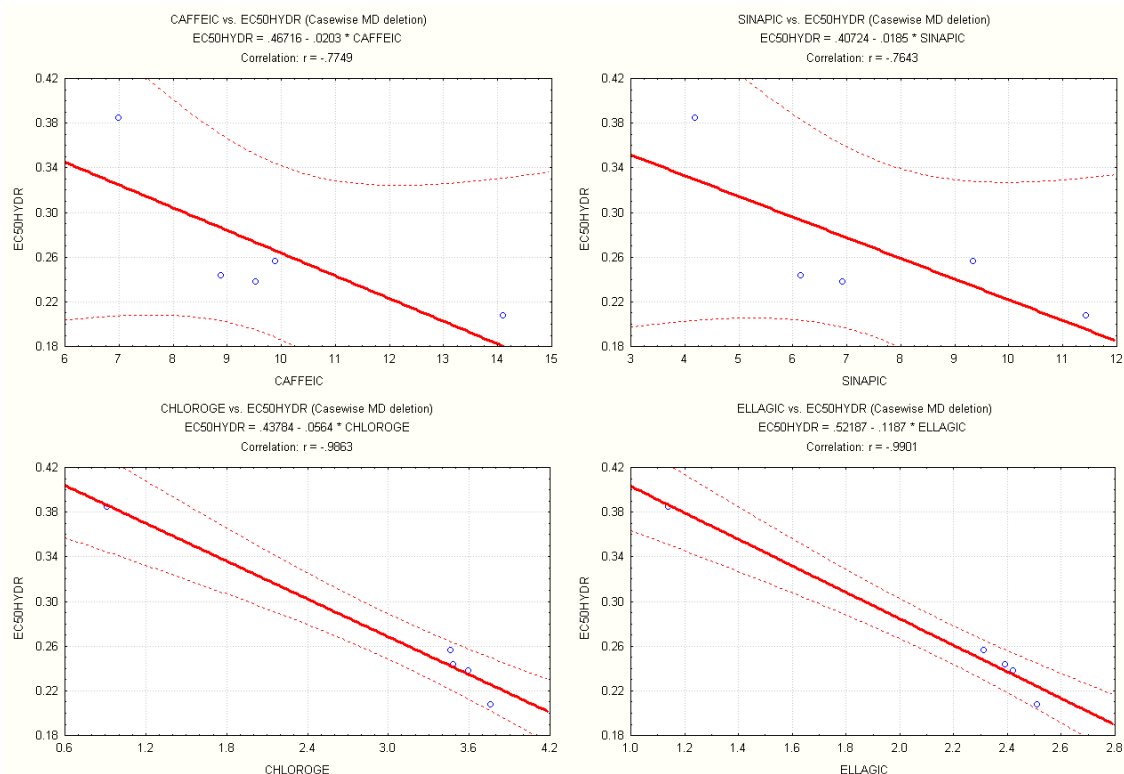
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0069	0,5995	<b>0,6153</b>
Vanilinska	-0,0170	0,8396	<b>0,9413</b>
Gentistinska	-0,0790	0,6200	0,5068
Protokatehinska	-0,0340	0,7993	<b>0,9679</b>
Siringinska	-0,0412	0,8514	<b>0,7916</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0036	0,6317	0,5770
Galna	-0,1461	1,0340	<b>0,9643</b>
Ferulna	-0,0020	0,8724	<b>0,8876</b>
Kafena	-0,0407	0,8261	0,5787
Sinapinska	-0,0374	0,7089	0,5735
Hlorogenska	-0,1155	0,7752	<b>0,9803</b>
Elaginska	-0,2425	0,9464	<b>0,9851</b>

Tokom procesa sladovanja sorte NS 565 antiradikalna aktivnost na DPPH radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiselina to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidroksil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 565 imale su: elaginska (0,9851), hlorogenska

(0,9803), protokatehinska (0,9679), galna (0,9643), vanilinska (0,9413), ferulna (0,8876), siringinska (0,7916) i *p*-hidroksibenzoeva kiselina (0,6153).



**Slika 5.19.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565



**Slika 5.20.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565

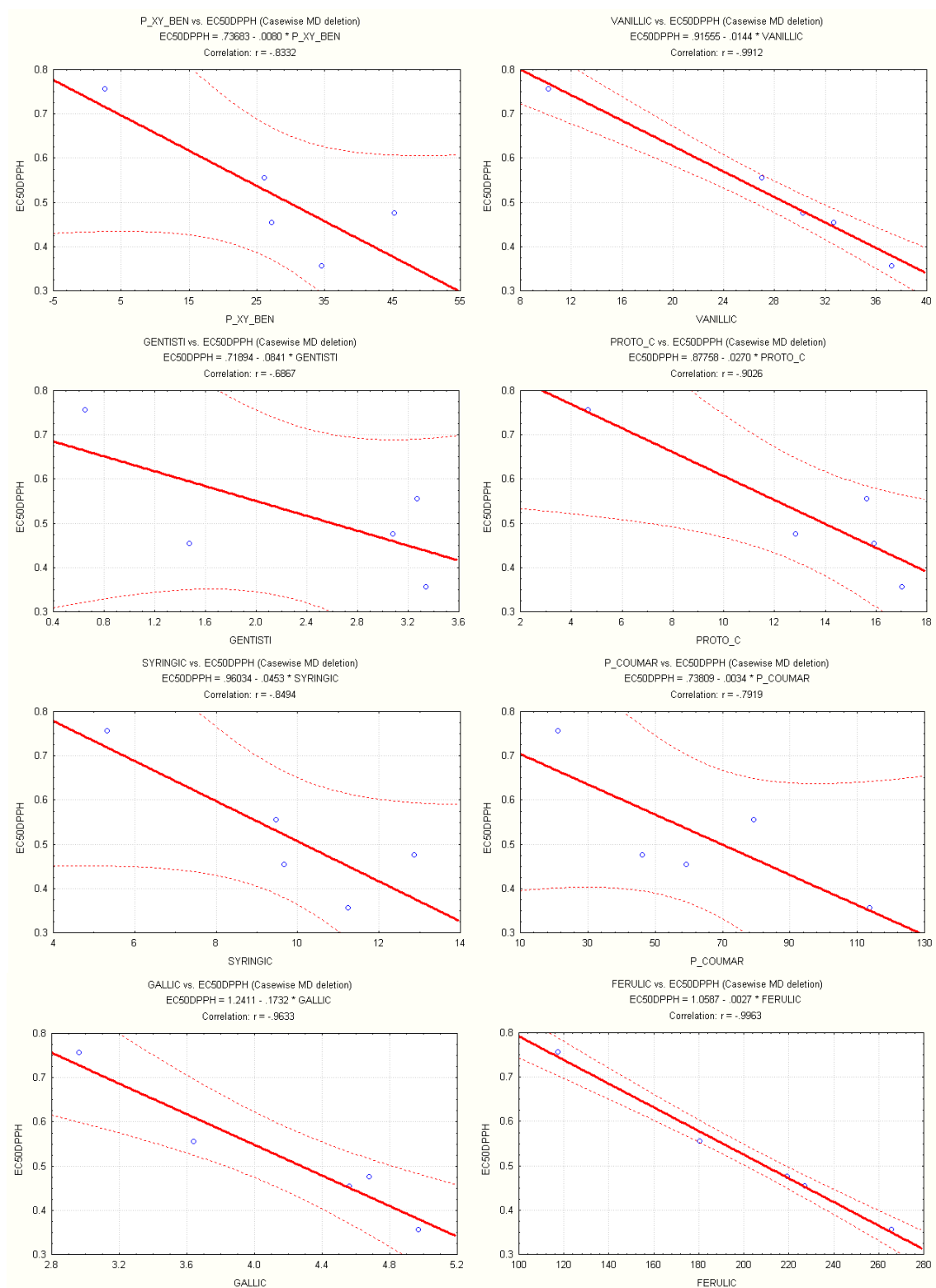
**Tabela 5.6.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 565

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0035	0,3546	<b>0,6495</b>
Vanilinska	-0,0083	0,4685	<b>0,9272</b>
Gentistinska	-0,0401	0,3657	0,5424
Protokatehinska	-0,0167	0,4501	<b>0,9655</b>
Siringinska	-0,0205	0,4788	<b>0,8132</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0018	0,3689	0,5868
Galna	-0,0713	0,5641	<b>0,9555</b>
Ferulna	-0,0010	0,4876	<b>0,8985</b>
Kafena	-0,0203	0,4672	0,6005
Sinapinska	-0,0185	0,4072	0,5842
Hlorogenska	-0,0564	0,4378	<b>0,9728</b>
Elaginska	-0,1187	0,5219	<b>0,9803</b>

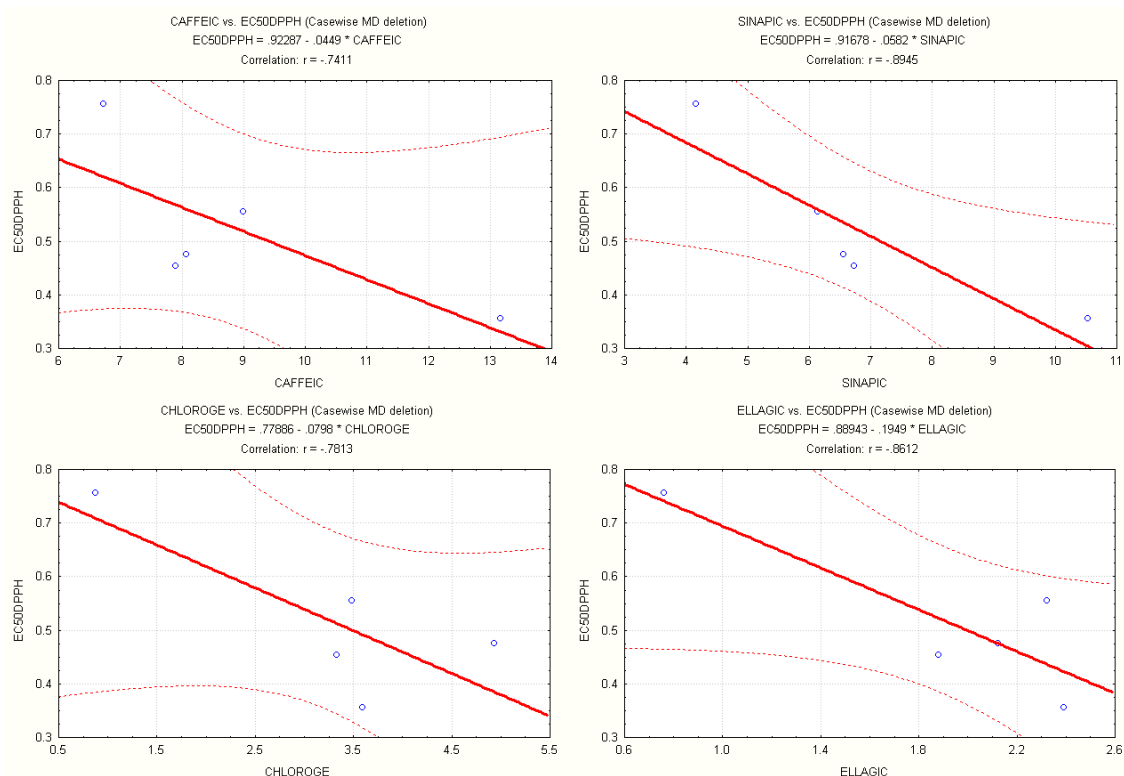
Tokom procesa sladovanja sorte NS 565 antiradikalna aktivnost na hidrosil radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiselina to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidrosil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 565 imale su: elaginska (0,9803),



hlorogenska (0,9728), protokatehinska (0,9655), galna (0,9555), vanilinska (0,9272), ferulna (0,8985), siringinska (0,8132) i *p*-hidroksibenzoeva kiselina (0,6495).



**Slika 5.21.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583



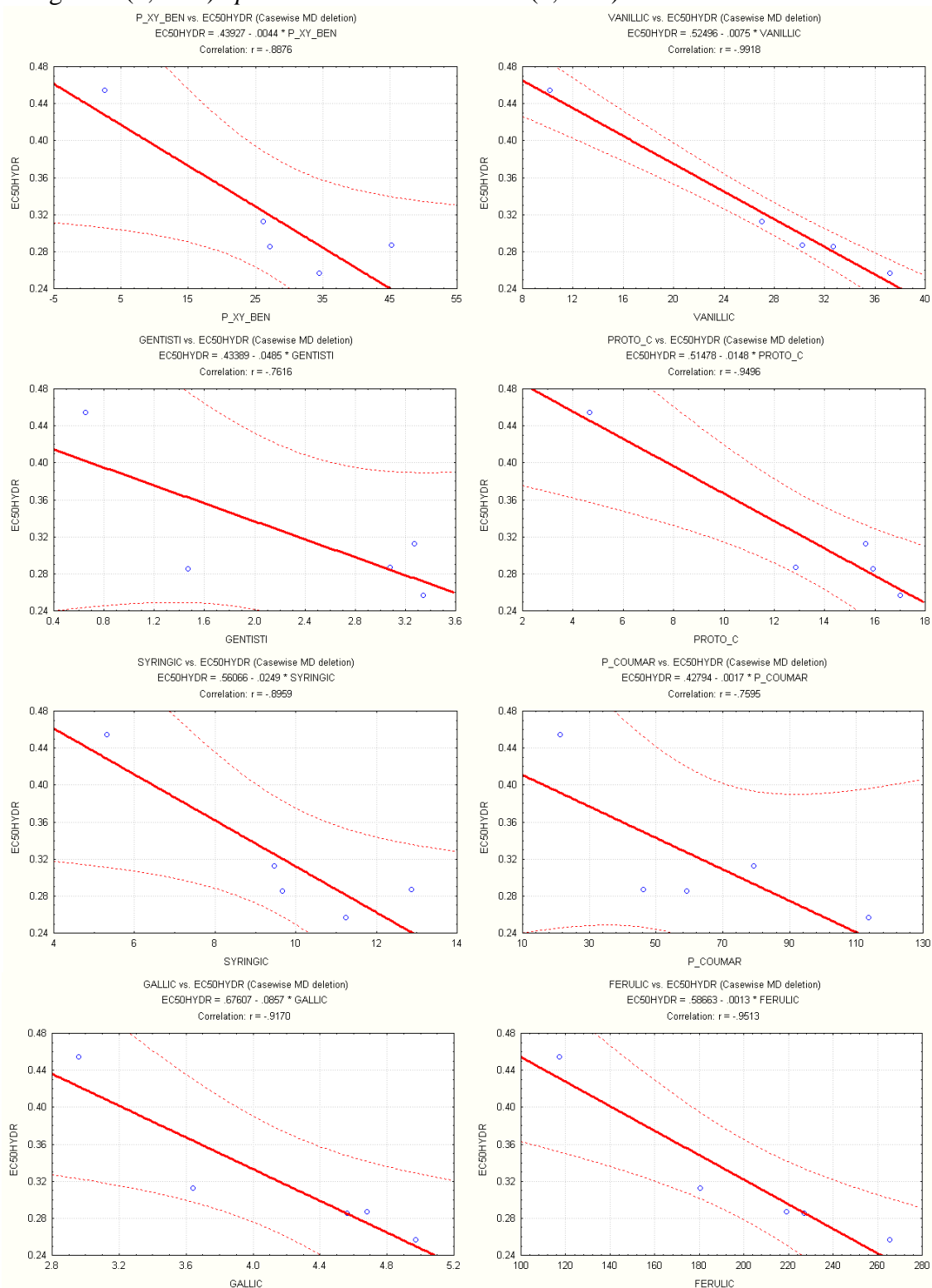
**Slika 5.22.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583

**Tabela 5.7.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583

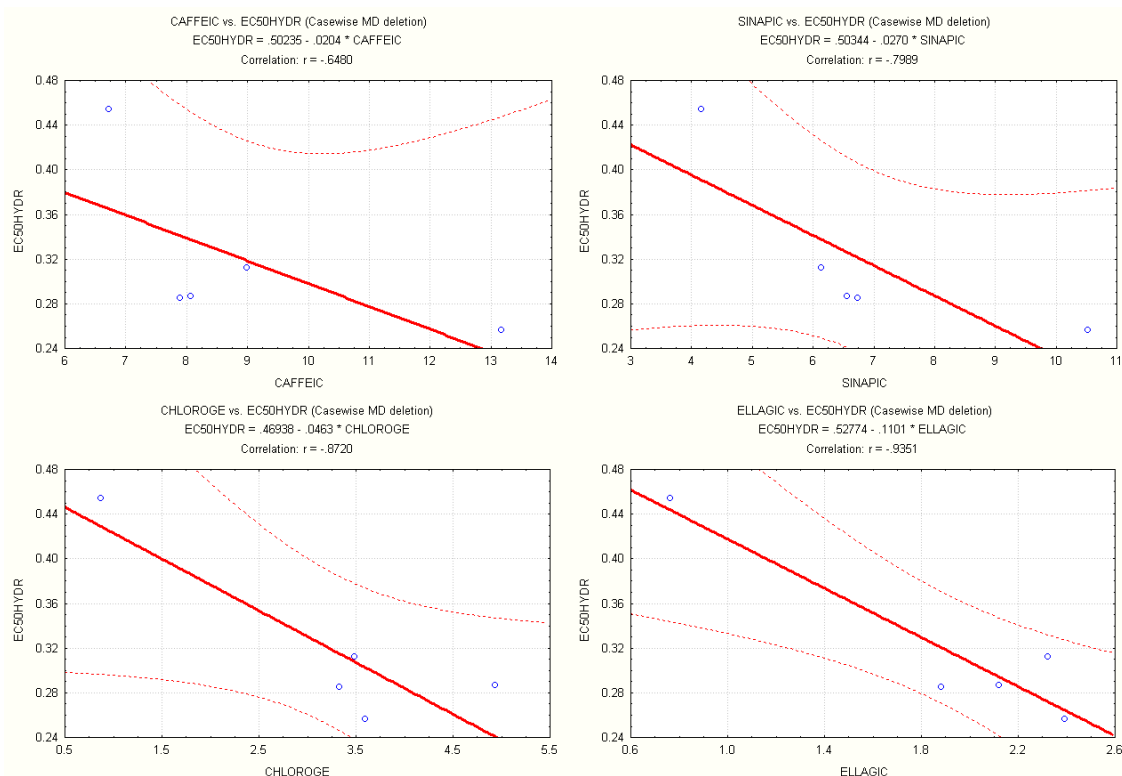
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0080	0,7368	<b>0,6942</b>
Vanilinska	-0,0144	0,9156	<b>0,9825</b>
Gentistinska	-0,0841	0,7189	0,4716
Protokatehinska	-0,0270	0,8776	<b>0,8147</b>
Siringinska	-0,0453	0,9603	<b>0,7215</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0034	0,7381	0,6271
Galna	-0,1732	1,2411	<b>0,9279</b>
Ferulna	-0,0027	1,0587	<b>0,9926</b>
Kafena	-0,0449	0,9223	0,5492
Sinapinska	-0,0582	0,9168	<b>0,8001</b>
Hlorogenska	-0,0798	0,7789	<b>0,6104</b>
Elaginska	-0,1949	0,8894	<b>0,7417</b>

Tokom procesa sladovanja sorte NS 583 antiradikalna aktivnost na DPPH radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiselina to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidroksil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 583 imale su: ferulna (0,9926), vanilinska (0,9825),

galna (0,9279), protokatehinska (0,8147), sinapinska (0,8001), elaginska (0,7417), siringinska (0,7215) i *p*-hidroksibenzoza (0,6942).



**Slika 5.23.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoze, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583



**Slika 5.24.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske i elaginske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583

**Tabela 5.8.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale tokom procesa sladovanja sorte NS 583

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0044	0,4393	<b>0,7878</b>
Vanilinska	-0,0075	0,5250	<b>0,9837</b>
Gentistinska	-0,0485	0,4339	0,5800
Protokatehinska	-0,0148	0,5148	<b>0,9017</b>
Siringinska	-0,0249	0,5607	<b>0,8026</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0017	0,4279	0,5768
Galna	-0,0857	0,6761	<b>0,8409</b>
Ferulna	-0,0013	0,5866	<b>0,9050</b>
Kafena	-0,0204	0,5024	0,4199
Sinapinska	-0,0270	0,5034	<b>0,6382</b>
Hlorogenska	-0,0463	0,4694	<b>0,7604</b>
Elaginska	-0,1101	0,5277	<b>0,8744</b>

Tokom procesa sladovanja sorte NS 583 antiradikalna aktivnost na hidrosil radikale se povećavala pri čemu se  $EC_{50}$  vrednost smanjivala. Što je viši sadržaj fenolnih kiseline to je  $EC_{50}$  vrednost niža tj. potrebno je manje ekstrakta za uklanjanje 50% DPPH ili hidrosil radikala. Zbog toga je koeficijent pravca linearne regresije (a) negativan.

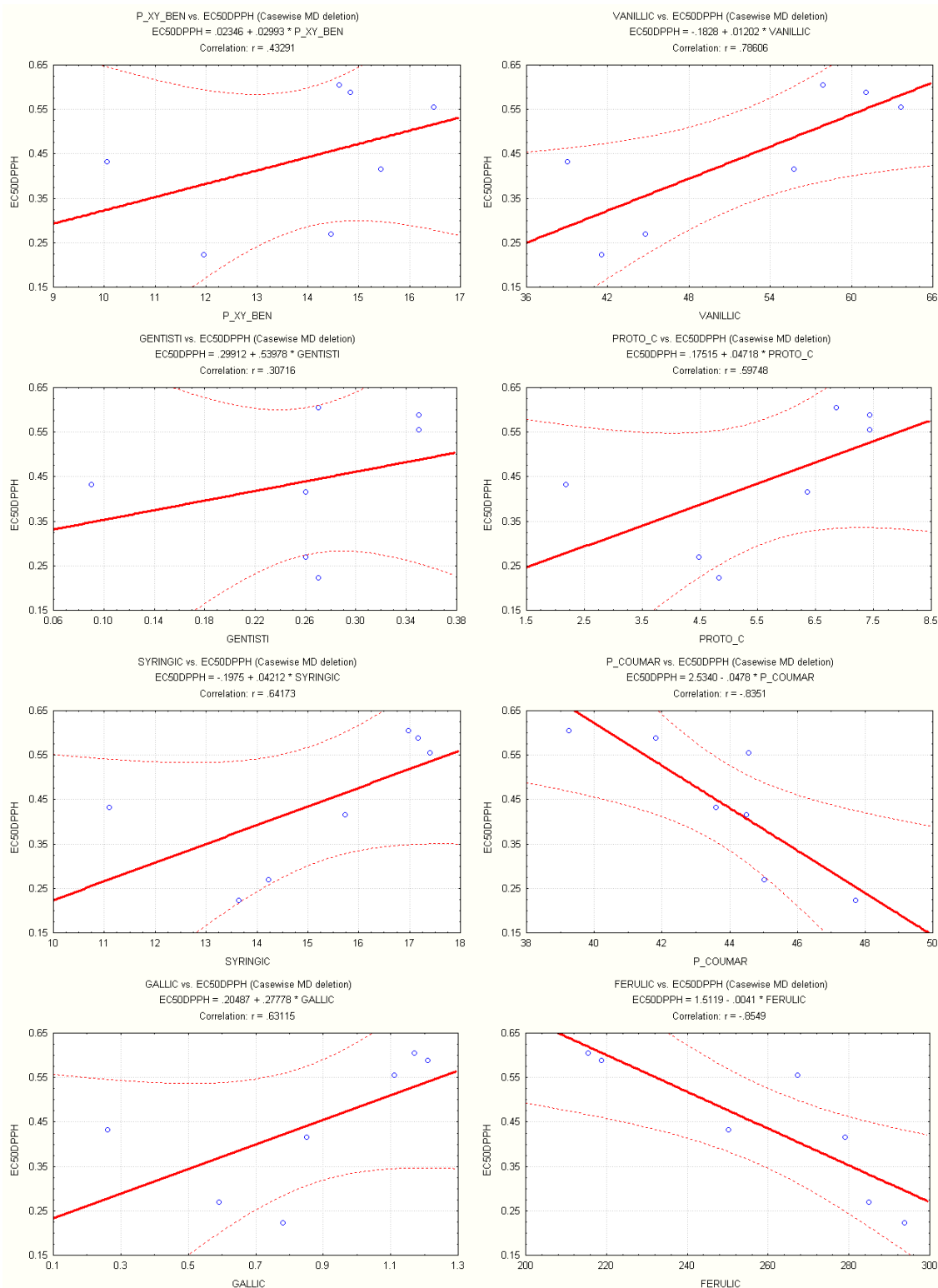
Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalske aktivnosti na hidrosil radikale u toku procesa sladovanja sorte NS 583 imale su: vanilinska (0,9837), ferulna (0,9050), protokatehinska (0,9017), elaginska (0,8744), galna (0,8409), siringinska (0,8026), *p*-hidroksibenzoeva (0,7878) i hlorogenska kiselina (0,7604).

Na osnovu dobijenih rezultata za koeficijente determinacije između sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale tokom procesa sladovanja može se zapaziti da sve ispitivane fenolne kiseline imaju značajnu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale što se može zaključiti na osnovu visokih koeficijenata determinacije dobijenih za sve sorte ječma.

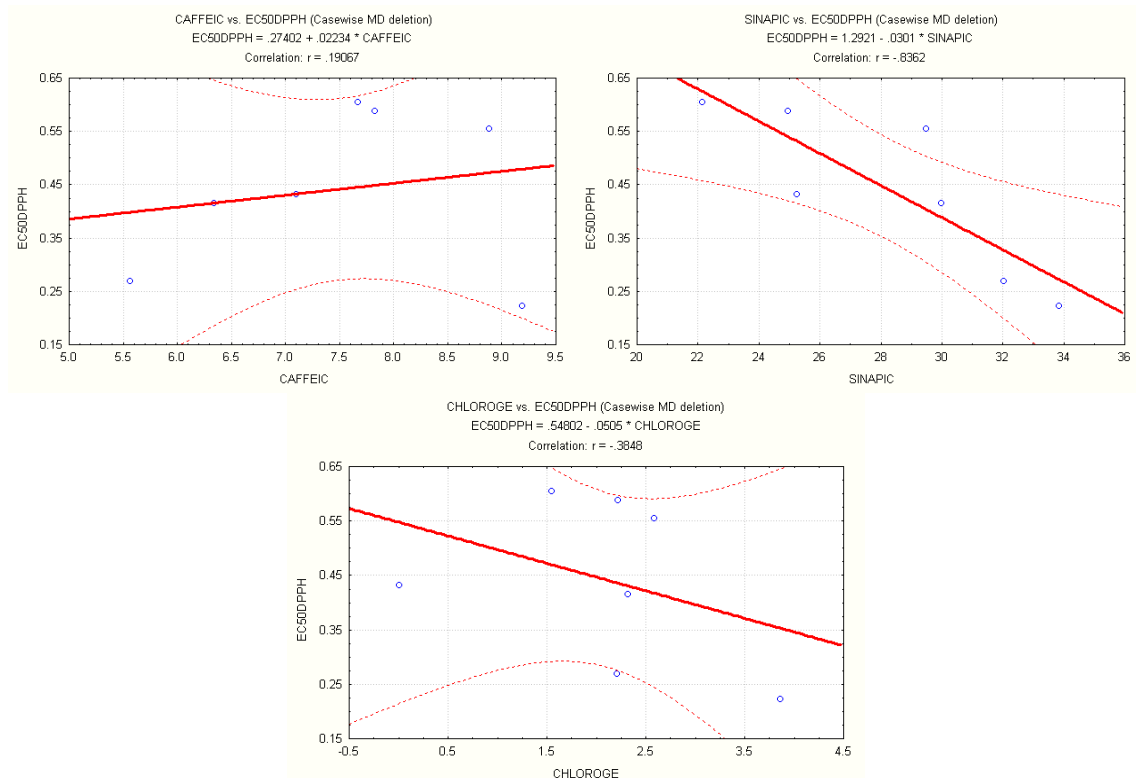
Kod svih ispitivanih sorti ječma najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale tokom sladovanja imale su sledeće fenolne kiseline: hlorogenska, protokatehinska, galna, vanilnska, *p*-hidroksibenzoeva, ferulna, siringinska i sinapinska kiselina. Vrednosti koeficijenata determinacije navedenih kiselina nisu bile identične za sve sorte, ali nije bilo izrazitih varijacija. Elaginska kiselina je u sorti NS 525 imala najniži koeficijent determinacije (0,1421) dok je u sorti NS 565 imala najviši koeficijent determinacije (0,9851). U sorti NS 583 koeficijent determinacije za elaginsku kiselinu iznosio je 0,7417. Različiti rezultati koeficijenta determinacije za elaginsku kiselinu upućuju da sorta ječma ima uticaja na antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale.

Kod svih ispitivanih sorti ječma najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalske aktivnosti na hidrosil radikale tokom sladovanja imale su sledeće fenolne kiseline: hlorogenska, protokatehinska, galna, vanilnska, *p*-hidroksibenzoeva, ferulna, siringinska i sinapinska. Vrednosti koeficijenata determinacije navedenih kiselina nisu bile identične za sve sorte, ali nije bilo značajnih odstupanja. Elaginska kiselina je u sorti NS 525 imala najniži koeficijent determinacije (0,1582), dok je u sorti NS 565 imala najviši koeficijent determinacije (0,9803). U sorti NS 583 koeficijent determinacije za elaginsku kiselinu iznosio je 0,8744. Različiti rezultati koeficijenta determinacije za elaginsku kiselinu upućuju da sorta ječma ima uticaja na antiradikalnu aktivnost na hidrosil radikale.

U sorti NS 565 elaginska kiselina ima najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale na osnovu dobijenih koeficijenata determinacije, dok kod sorte NS 525 elaginska kiselina ima nižu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale.



**Slika 5.25.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525

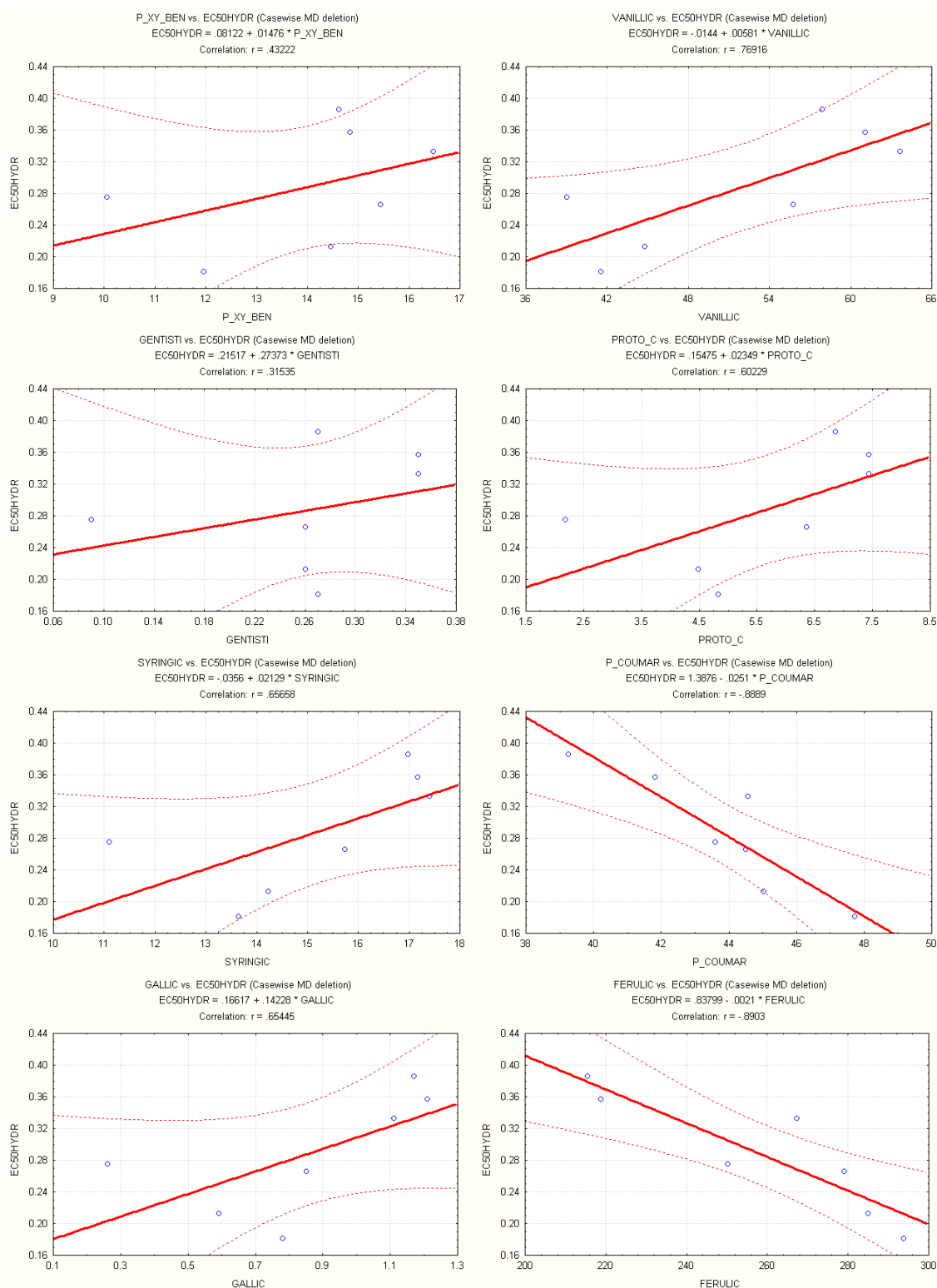


**Slika 5.26.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525

**Tabela 5.9.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525

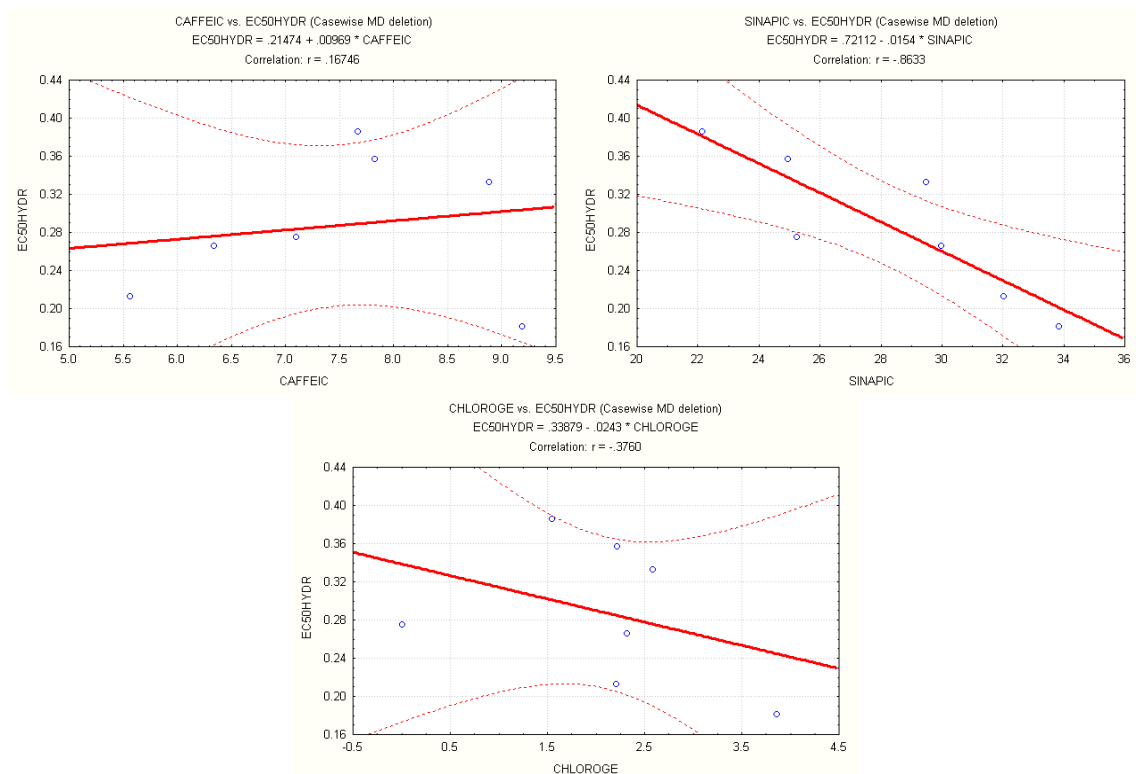
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,0299	0,0234	0,1874
Vanilinska	0,0120	-0,1828	0,6180
Gentistinska	0,5397	0,2992	0,0944
Protokatehinska	0,0472	0,1751	0,3570
Siringinska	0,4212	-0,1975	0,4118
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0478	2,5340	<b>0,6974</b>
Galna	0,2777	0,2047	0,3984
Ferulna	-0,0041	1,5119	<b>0,7309</b>
Kafena	0,0223	0,2740	0,0364
Sinapinska	-0,0301	1,2921	<b>0,6992</b>
Hlorogenska	-0,0505	0,5480	<b>0,1481</b>

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije (a) su tokom proizvodnje piva od slada NS 525 pokazale antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 525 imale su: ferulna (0,7309), sinapinska (0,6992) i *p*-kumarinska kiselina (0,6974).



**Slika 5.27.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na hidrosil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525



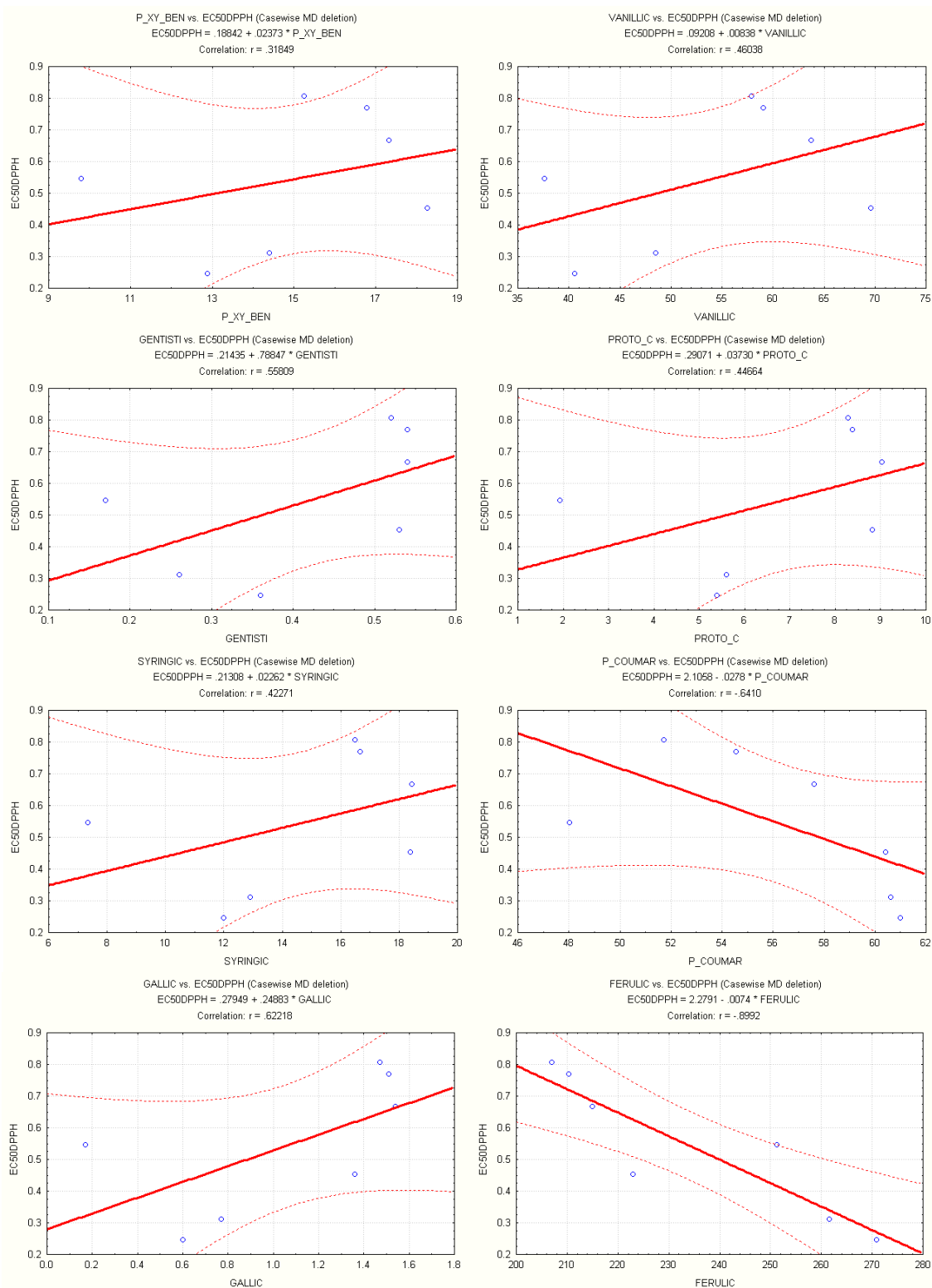


**Slika 5.28.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525

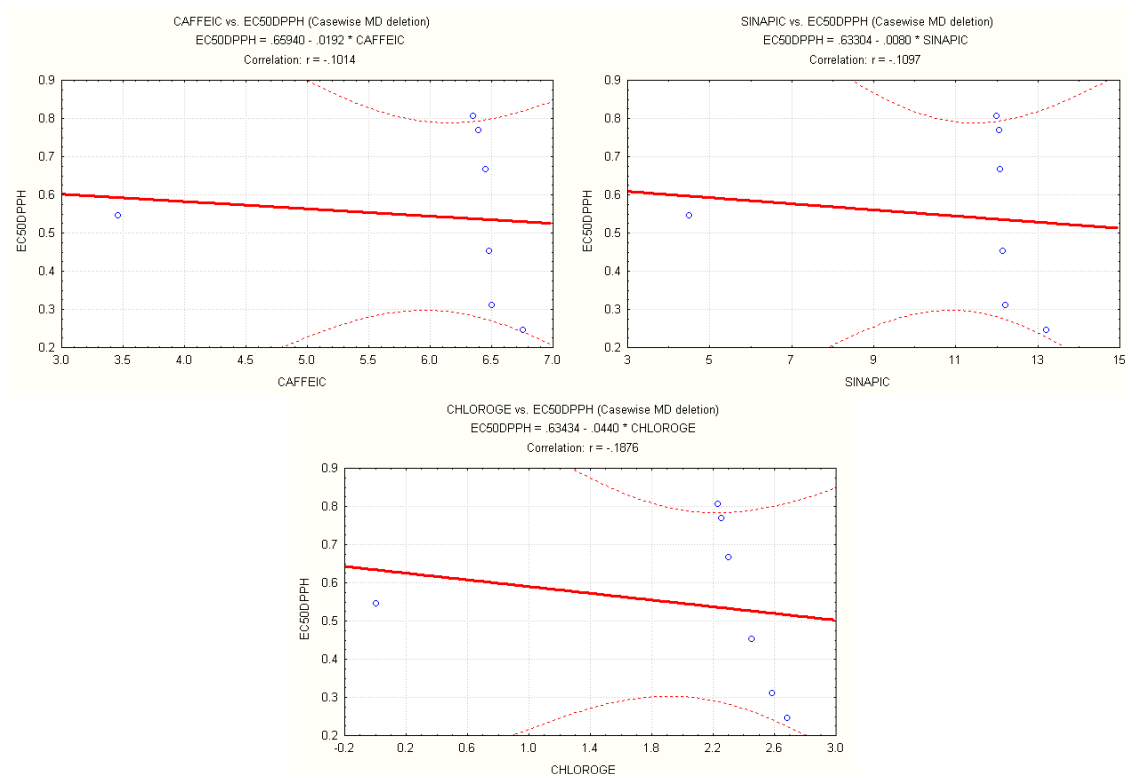
**Tabela 5.10.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,1476	0,0812	0,1868
Vanilinska	0,0058	-0,0144	0,5917
Gentistinska	0,2737	0,2151	0,0995
Protokatehinska	0,0234	0,1547	0,3628
Siringinska	0,0212	-0,0356	0,4311
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0251	1,3876	<b>0,7901</b>
Galna	0,1422	0,1661	0,4284
Ferulna	-0,0021	0,8379	<b>0,7926</b>
Kafena	0,0096	0,2147	0,0281
Sinapinska	-0,0154	0,7211	<b>0,7453</b>
Hlorogenska	-0,0243	0,3387	<b>0,1414</b>

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije (a) su tokom proizvodnje piva od slada NS 525 pokazale antiradikalску aktivnost na hidroksil radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 525 imale su: ferulna (0,7926), *p*-kumarinska (0,7901) i sinapinska kiselina (0,7453).



**Slika 5.29.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565

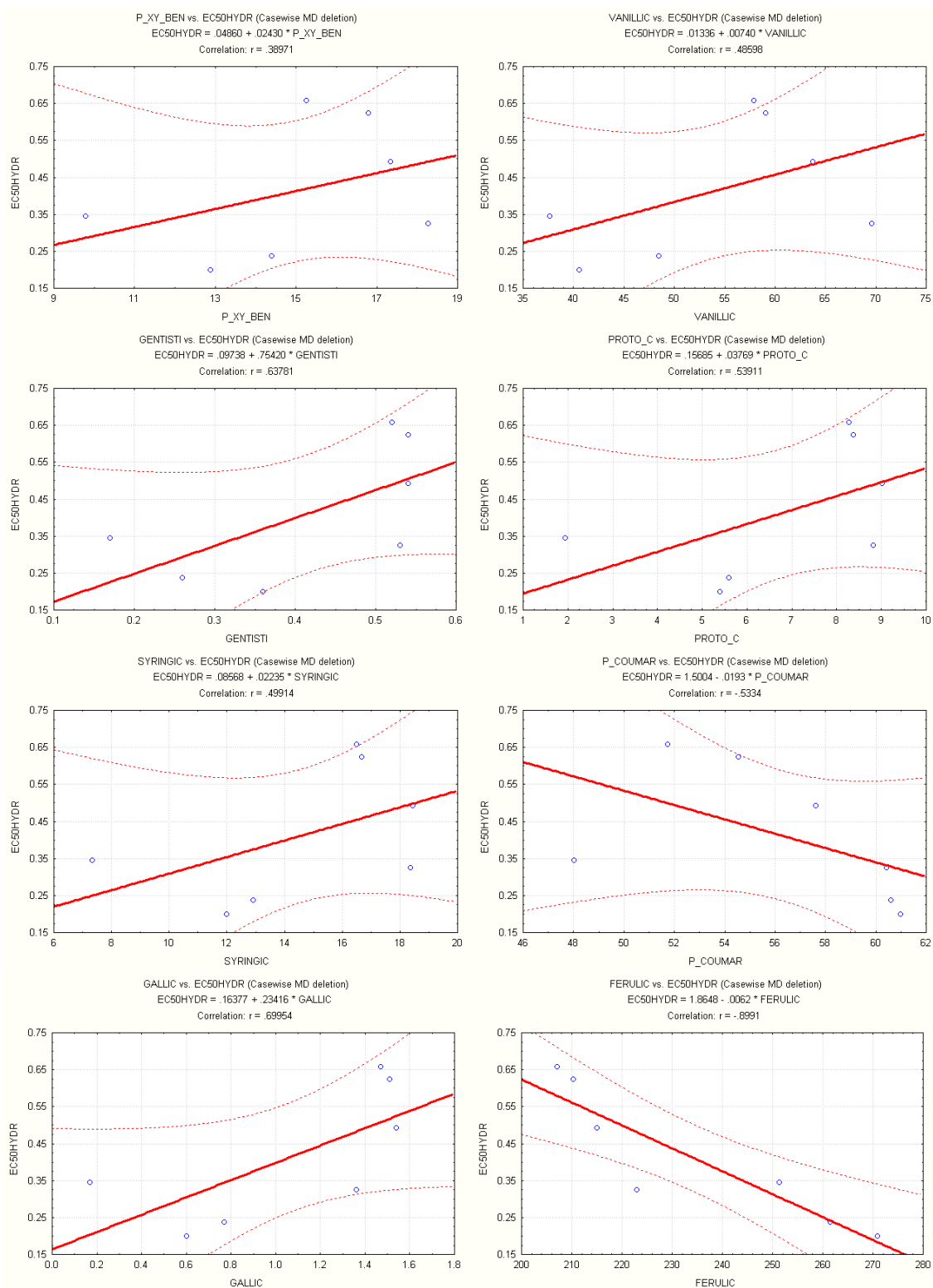


**Slika 5.30.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565

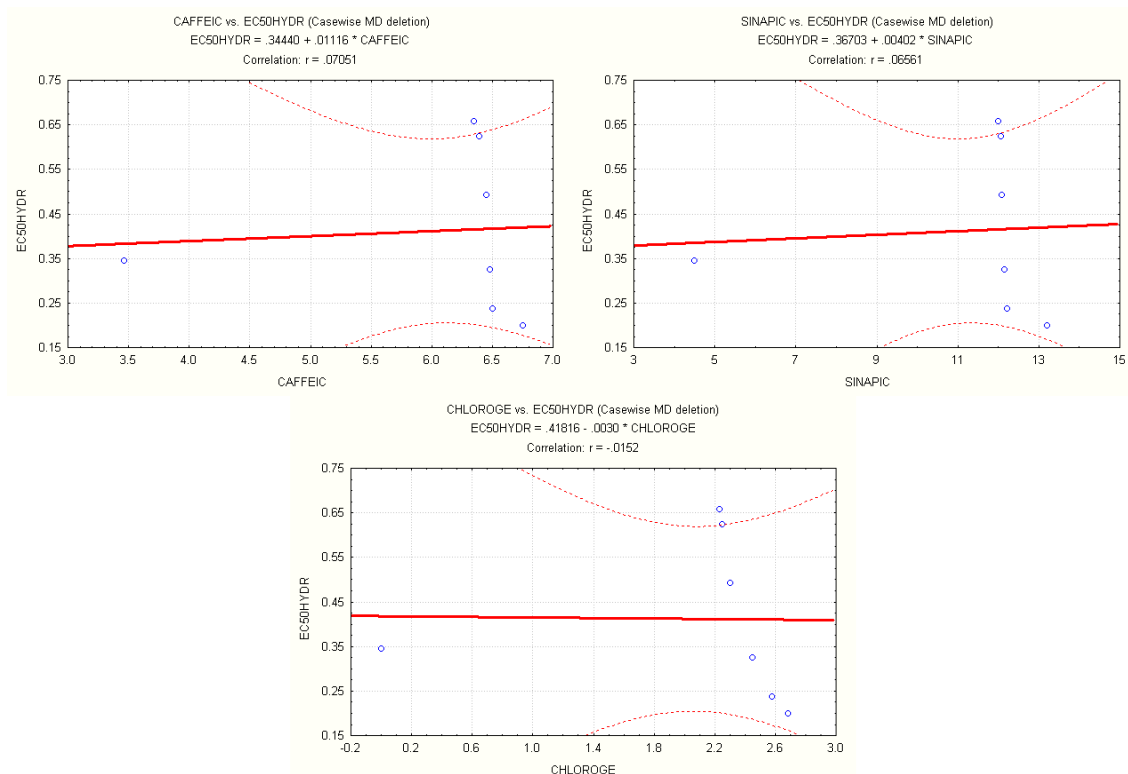
**Tabela 5.11.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,0237	0,1884	0,1014
Vanilinska	0,0083	0,0921	0,2119
Gentistinska	0,7884	0,2143	0,3115
Protokatehinska	0,0373	0,2907	0,1995
Siringinska	0,0226	0,2131	0,1787
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0278	2,1058	<b>0,4109</b>
Galna	0,2488	0,2794	0,3871
Ferulna	-0,0074	2,2791	<b>0,8086</b>
Kafena	-0,0192	0,6594	<b>0,0103</b>
Sinapinska	-0,0080	0,6331	<b>0,0120</b>
Hlorogenska	-0,0440	0,6343	<b>0,0352</b>

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije (a) su tokom proizvodnje piva od slada NS 565 pokazale antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 565 imale su: ferulna (0,8086) i *p*-kumarinska kiselina (0,4109).



**Slika 5.31. Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565**

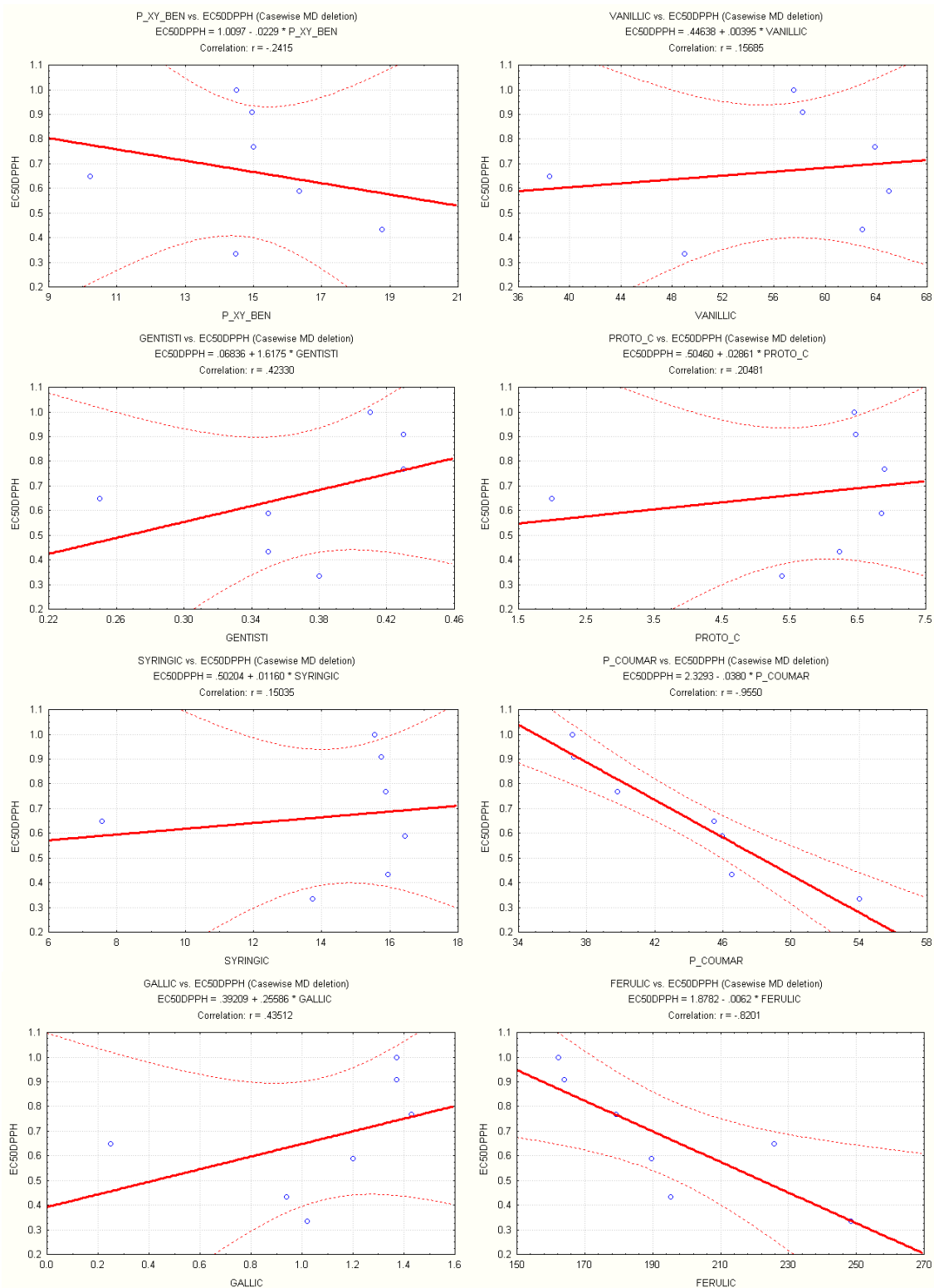


**Slika 5.32.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565

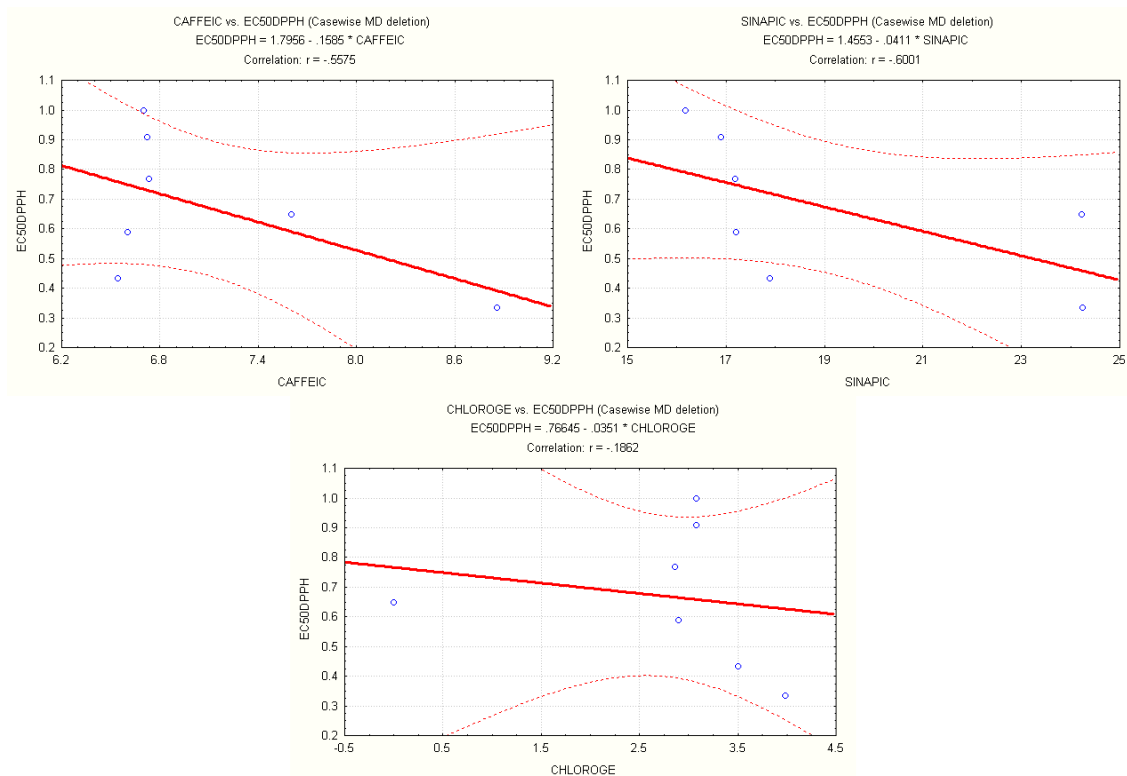
**Tabela 5.12.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	0,0243	0,0486	0,1519
Vanilinska	0,0074	0,0133	0,2361
Gentistinska	0,7542	0,0973	0,4068
Protokatehinska	0,0376	0,1568	0,2906
Siringinska	0,0223	0,0856	0,2491
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0193	1,5004	<b>0,2845</b>
Galna	0,2341	0,1637	0,4893
Ferulna	-0,0062	1,8648	<b>0,8084</b>
Kafena	0,0111	0,3444	0,0050
Sinapinska	0,0040	0,3670	0,0043
Hlorogenska	-0,0030	0,4181	<b>0,0002</b>

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije (a) su tokom proizvodnje piva od slada NS 565 pokazale antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 565 imale su: ferulna (0,8084) i *p*-kumarinska kiselina (0,2845).



**Slika 5.33. Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583**

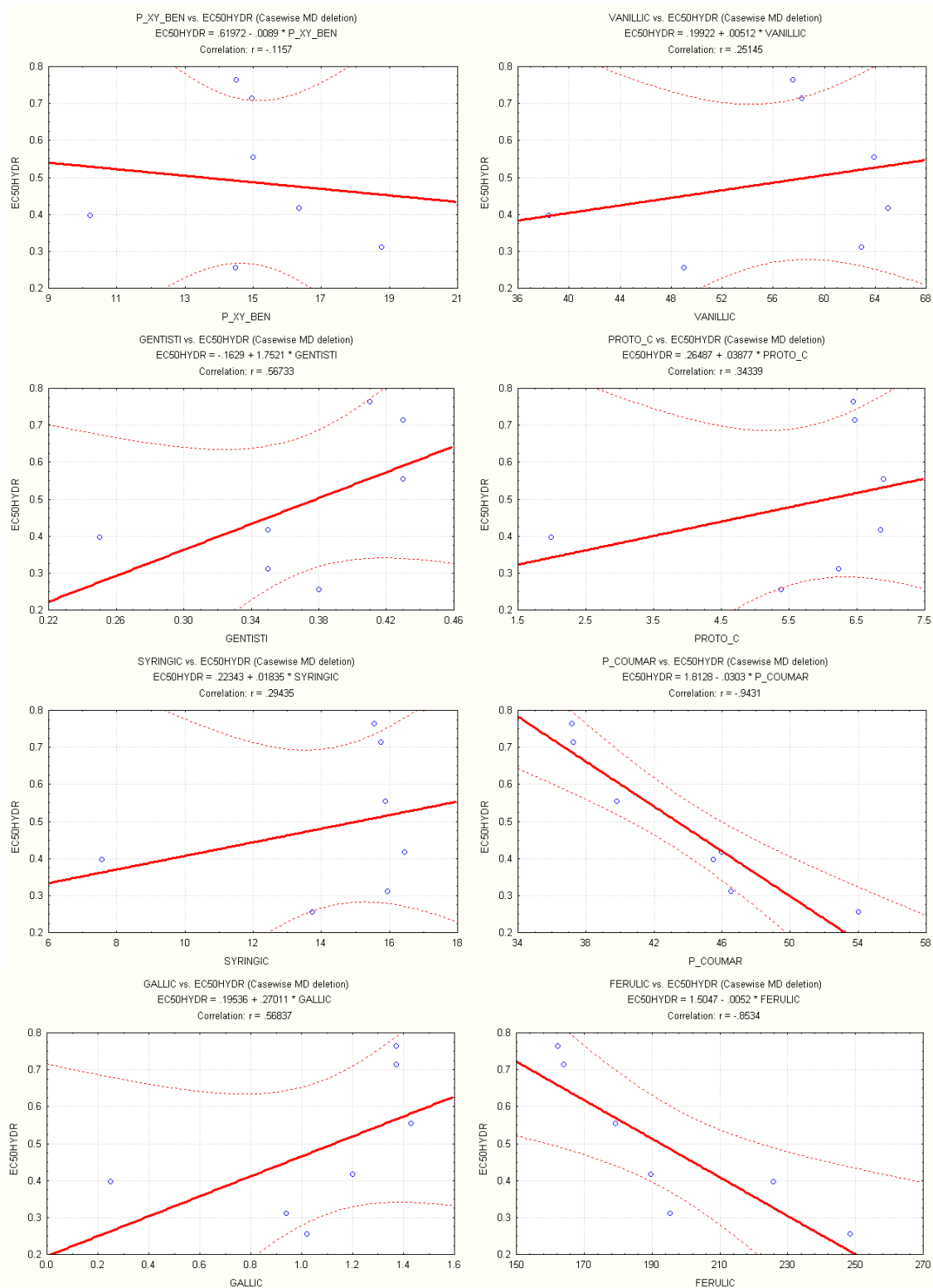


**Slika 5.34.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583

**Tabela 5.13.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583

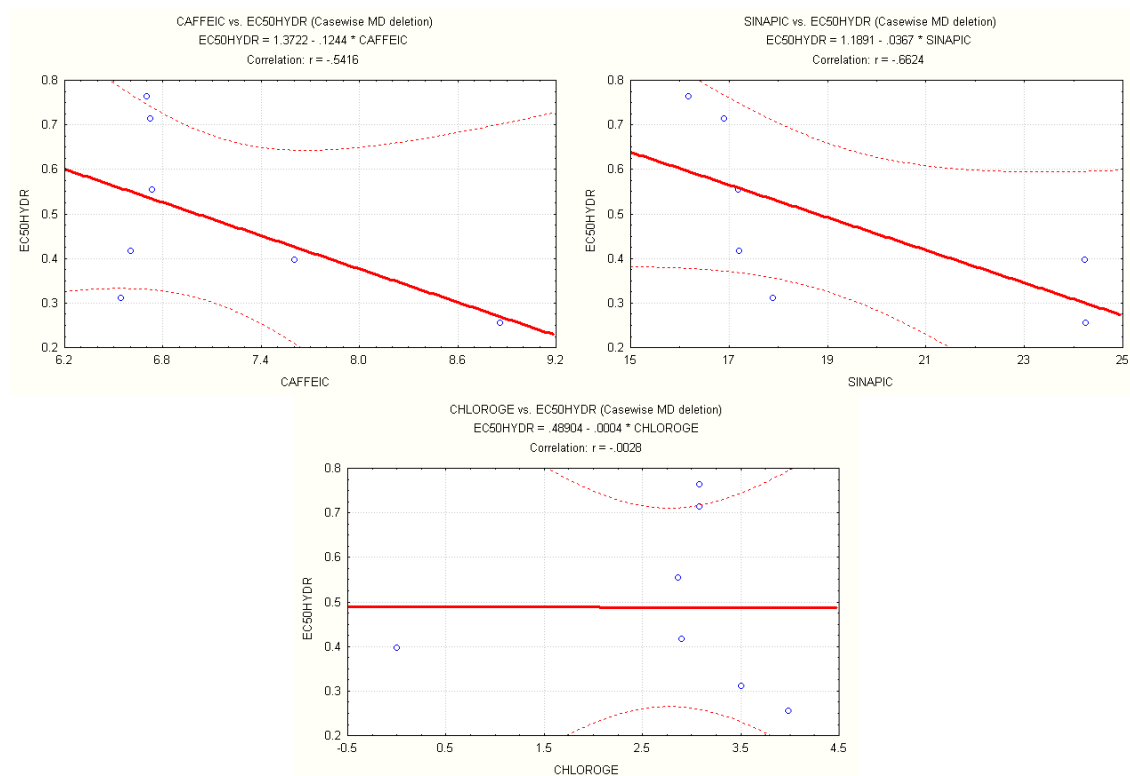
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0229	1,0097	<b>0,0583</b>
Vanilinska	0,0040	0,4463	0,0246
Gentistinska	1,6175	0,0684	0,1792
Protokatehinska	0,0286	0,5046	0,0419
Siringinska	0,0116	0,5020	0,0226
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0380	2,3293	<b>0,9120</b>
Galna	0,2559	0,3920	0,1893
Ferulna	-0,0062	1,8782	<b>0,6726</b>
Kafena	-0,1585	1,7956	<b>0,3108</b>
Sinapinska	-0,0411	1,4553	<b>0,3601</b>
Hlorogenska	-0,0351	0,7664	<b>0,0347</b>

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije su tokom proizvodnje piva od slada NS 583 pokazale antiradikalску aktivnost na DPPH radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 583 imale su: *p*-kumarinska (0,9120), ferulna (0,6726), sinapinska (0,3601) i kafena kiselina (0,3108).



**Slika 5.35. Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583**





**Slika 5.36.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583

**Tabela 5.14.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0089	0,6197	<b>0,0134</b>
Vanilinska	0,0051	0,1992	0,0633
Gentistinska	1,7521	0,1629	0,3218
Protokatehinska	0,0388	0,2648	0,1179
Siringinska	0,0184	0,2234	0,0867
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0303	1,8128	<b>0,8894</b>
Galna	0,2701	0,1953	0,3231
Ferulna	-0,0052	1,5047	<b>0,7283</b>
Kafena	-0,1244	1,3722	<b>0,2933</b>
Sinapinska	-0,0367	1,1891	<b>0,4388</b>
Hlorogenska	-0,0004	0,4890	0,0000

Fenolne kiseline sa negativnim predznakom koeficijenta pravca linearne regresije su tokom proizvodnje piva od slada NS 583 pokazale antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u toku proizvodnje piva od slada NS 583 imale su: *p*-kumarinska (0,8894), ferulna (0,7283), sinapinska (0,4388) i kafena kiselina (0,2933).

Ferulna, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina u toku proizvodnje piva od slada NS 525 imaju najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Navedne kiseline imaju znatno viši sadržaj od ostalih ispitivanih fenolnih kiselina. Sadržaj ovih kiselina je najviši u ohmeljenoj sladovini nakon čega se konstantno smanjuje. Paralelno sa smanjenjem sadržaja ovih kiselina, snižava se i antiradikalna aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Upravo zbog toga su i koeficijenti determinacije ovih kiselina najviši. Sadržaj vanilinske kiseline je takođe visok u toku proizvodnje piva. Međutim, sadržaj vanilinske kiseline se ne smanjuje tokom fermentacije već raste do petog dana fermentacije nakon čega blago opada što navodi na pretpostavku da ima neznatan uticaj na antiradikalnu aktivnost. Pored ferulne, *p*-kumarinske i sinapinske kiseline i hlorogenska kiselina je imala antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale, ali su koeficijenti determinacije bili znatno niži.

Ferulna i *p*-kumarinska kiselina u toku proizvodnje piva od slada NS 565 imaju najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Pored njih kafena, sinapinska i hlorogenska kiselina pokazale su antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Na hidroksil radikale je pored ferulne i *p*-kumarinske kiseline i hlorogenska kiselina imala antiradikalnu aktivnost.

U toku proizvodnje piva od slada NS 583 najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale imale su *p*-kumarinska, ferulna, sinapinska i kafena kiselina. Pored njih *p*-hidroksibenzoeva i hlorogenska kiselina pokazale su antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale.

Dobijeni rezultati pokazuju da sorta ječma ima značajan uticaj na antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale fenolnih kiselina. Pored toga, sadržaji ferulne i *p*-kumarinske kiseline u svim ispitivanim uzorcima su najviši tokom proizvodnje piva i čine više od 70% sadržaja ukupnih fenolnih kiselina. Ostale ispitivane fenolne kiseline imaju znatno niže sadržaje tokom proizvodnje piva. U proizvodnji sladovine iz slada je ekstrahovano samo oko 10% ukupnih fenolnih kiselina (Tabela 4.24-4.26) i oko 4% ukupnih fenola (Tabela 4.19), što znači da u proizvodnji piva ima znatno manje ovih jedinjenja u odnosu na proizvodnju slada. U proizvodnji slada se promene odigravaju u zrnju ječma koje ostaje netaknuto. Proizvodnja piva je izuzetno složen proces u toku kog brojni faktori, pored fenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz slada i hmelja, utiču na antioksidativnu aktivnost piva (proizvodi metabolizma kvasca).

Postavlja se pitanje da li fenolne kiseline nižeg sadržaja imaju iste mogućnosti reagovanja sa slobodnim radikalima kao ferulna, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina. Isto tako, dilema je da li je u takvim uslovima koeficijent determinacije pravo merilo antiradikalne aktivnosti. Zbog toga se pristupa diferencijalnom analitičkom korelacionom modelu, kod kojeg se umesto određenih vrednosti za  $EC_{50}^{DPPH}$  i  $EC_{50}^{OH}$ , izvodi korelacija sadržaja fenolnih kiselina i razlika (diferencija) antiradikalnih aktivnosti u fazama proizvodnje piva.

#### **5.4. Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva**

Određene su promene antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva i rezultati su dati u Tabelama 5.15-5.17.

**Tabela 5.15. Antiradikalska aktivnost i promena antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525 (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5, i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Faze proizvodnje piva	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14
$EC_{50}^{DPPH}$	0,4329	0,2227	0,2703	0,4167	0,5556	0,5882	0,6061
$EC_{50}^{OH}$	0,2755	0,1818	0,2128	0,2660	0,3333	0,3571	0,3861
Promena $EC_{50}^{DPPH}$	0,4329	-0,2102	0,0476	0,1464	0,1389	0,0327	0,0178
Promena $EC_{50}^{OH}$	0,2755	-0,0937	0,0309	0,0532	0,0674	0,0238	0,0290

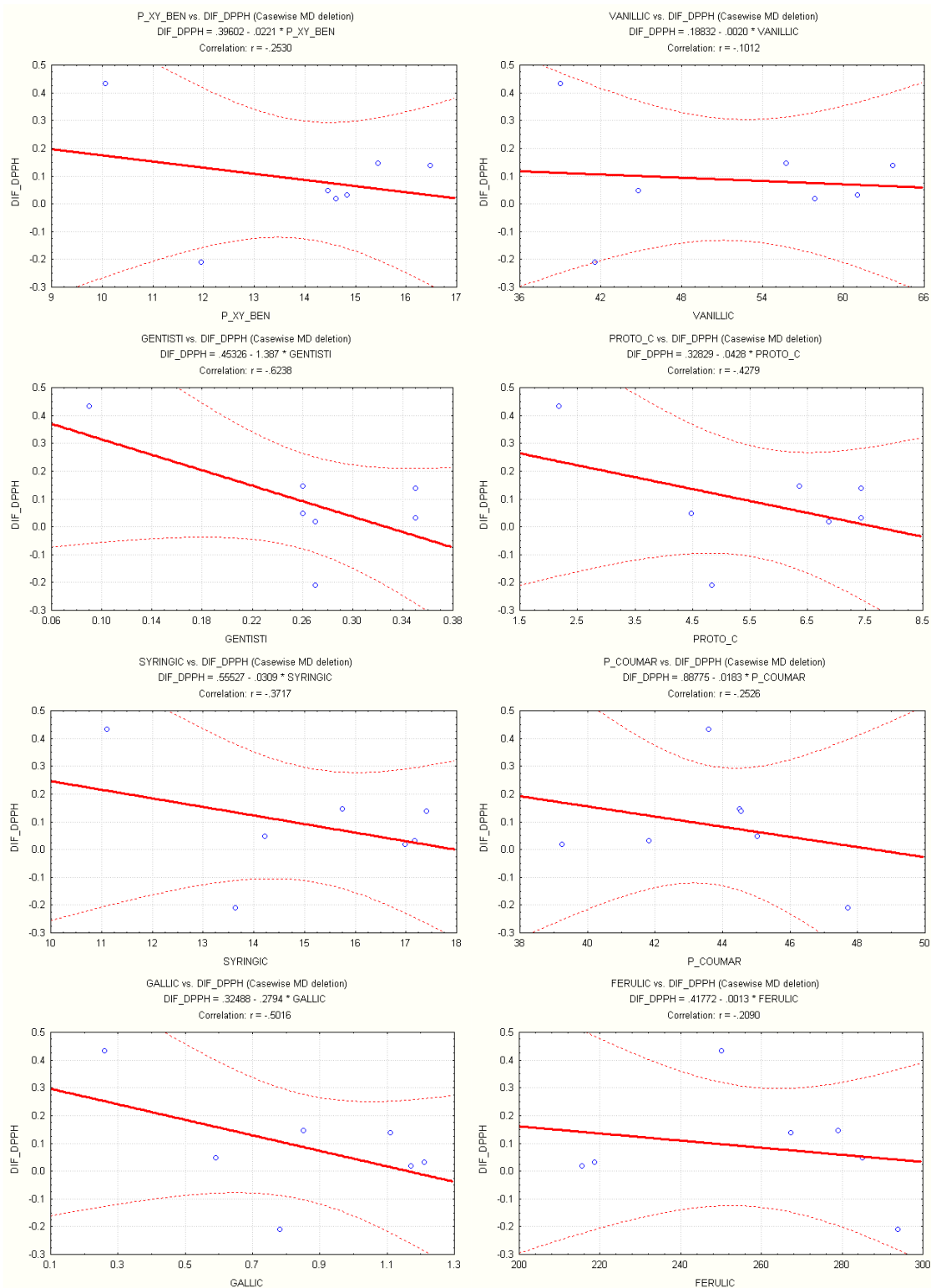
**Tabela 5.16. Antiradikalska aktivnost i promena antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565 (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5, i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Faze proizvodnje piva	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14
$EC_{50}^{DPPH}$	0,5464	0,2469	0,3125	0,4545	0,6667	0,7692	0,8065
$EC_{50}^{OH}$	0,3448	0,2008	0,2381	0,3247	0,4926	0,6250	0,6579
Promena $EC_{50}^{DPPH}$	0,5464	-0,2995	0,0656	0,1420	0,2121	0,1026	0,0372
Promena $EC_{50}^{OH}$	0,3448	-0,1440	0,0373	0,0866	0,1679	0,1324	0,0329

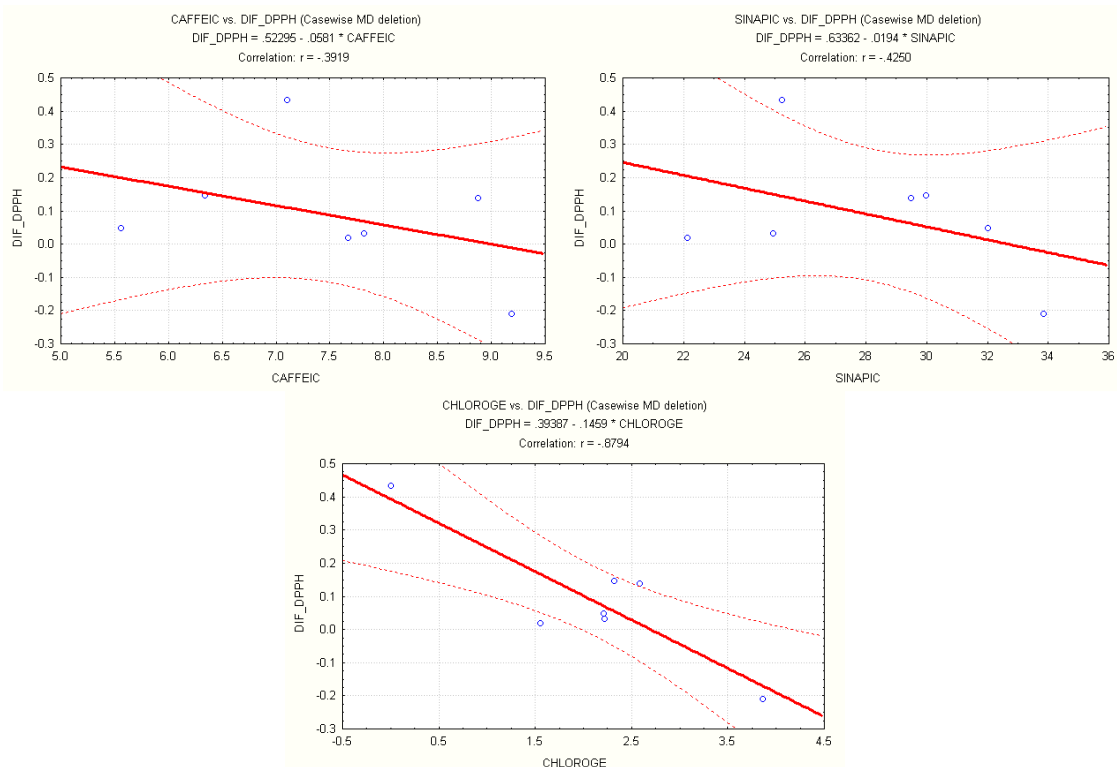
**Tabela 5.17. Antiradikalska aktivnost i promena antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583 (S-sladovina, OS-ohmeljena sladovina, F3, F5, i F7-treći, peti i sedmi dan fermentacije; NF7 i NF14-sedmi i četrnaesti dan naknadne fermentacije piva)**

Faze proizvodnje piva	S	OS	F3	F5	F7	NF7	NF14
$EC_{50}^{DPPH}$	0,6494	0,3333	0,4348	0,5882	0,7692	0,9091	1,0000
$EC_{50}^{OH}$	0,3968	0,2558	0,3125	0,4167	0,5556	0,7143	0,7634
Promena $EC_{50}^{DPPH}$	0,6494	-0,3160	0,1014	0,1535	0,1810	0,1399	0,0909
Promena $EC_{50}^{OH}$	0,3968	-0,1411	0,0567	0,1042	0,1389	0,1587	0,0491

Na osnovu podataka datih u Tabelama 5.15-5.17 i sadržaja fenolnih kiselina (Tabele 4.21-4.23) urađena je korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalnih aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583. Rezultati korelacionih analiza dati su na Slikama 5.37-5.48 i Tabelama 5.18-5.23.



**Slika 5.37.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

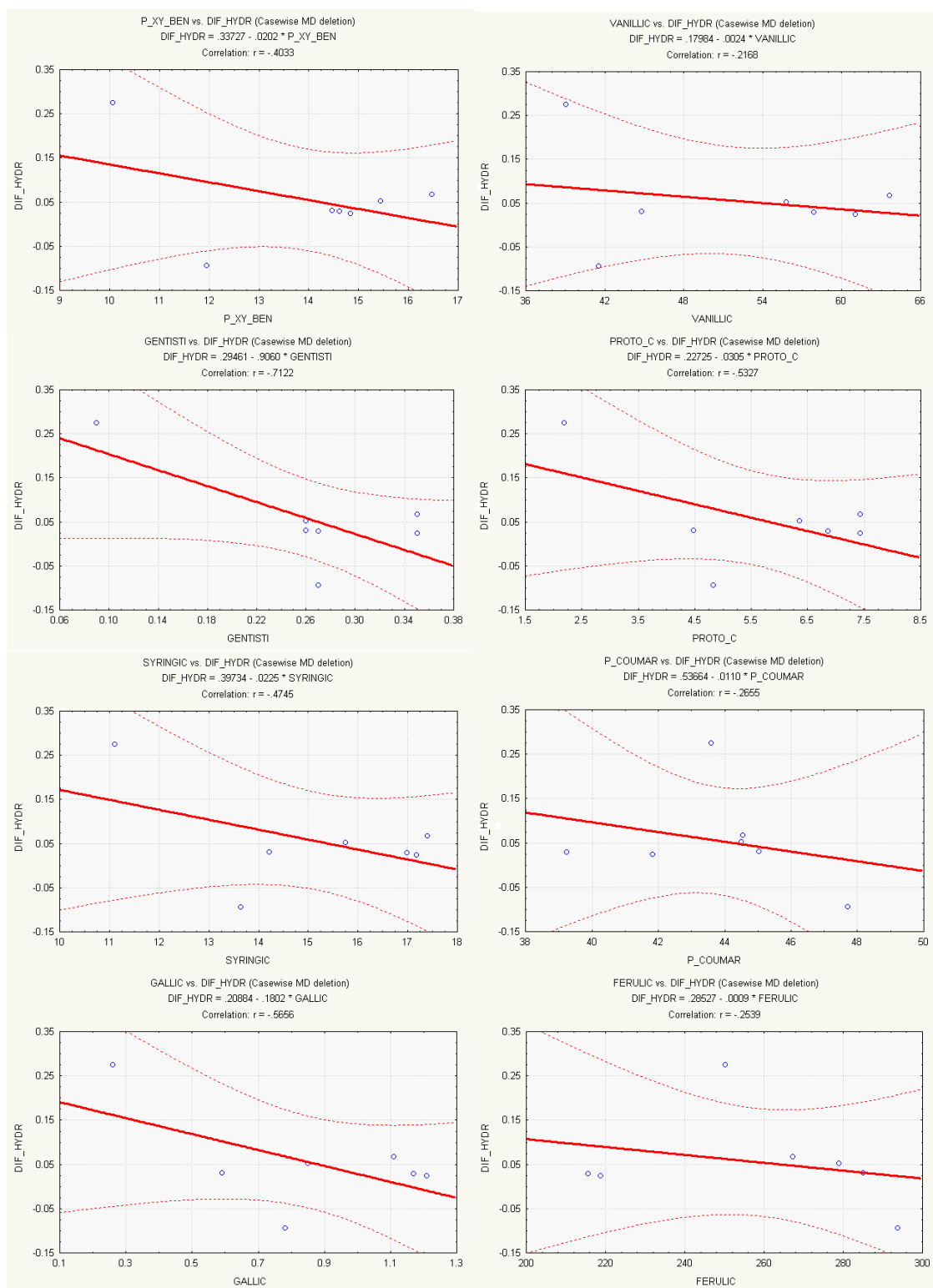


Slika 5.38. Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

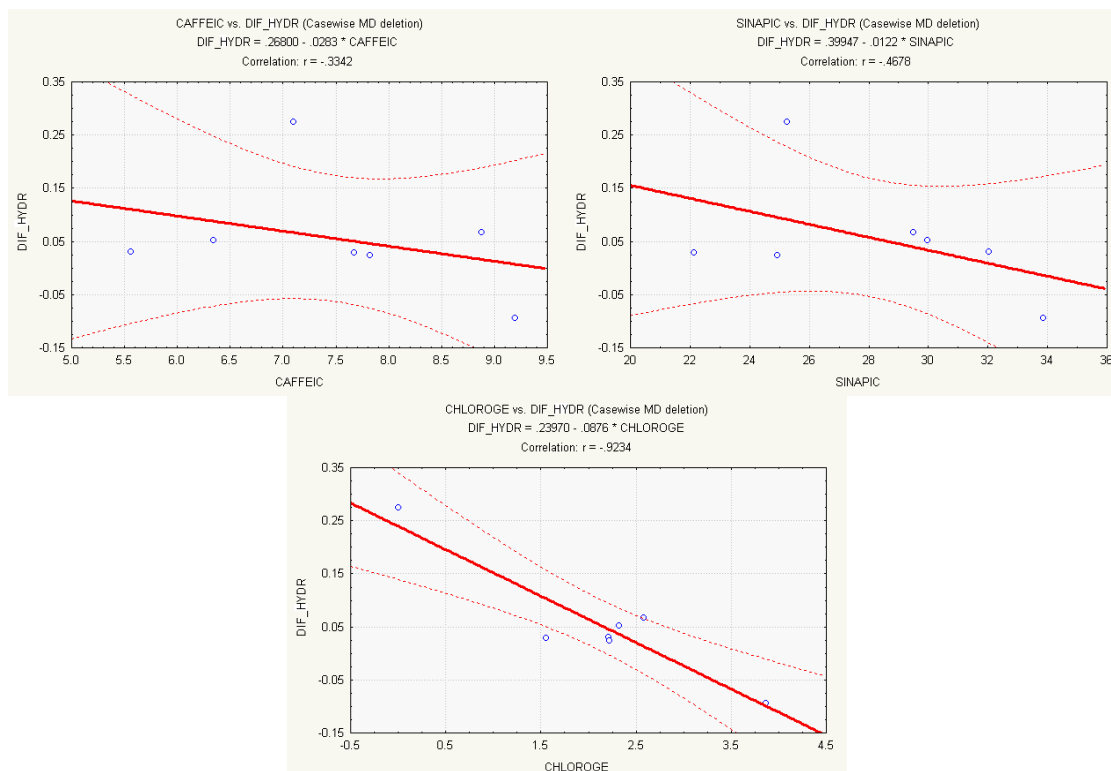
Tabela 5.18. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0221	0,3960	0,0640
Vanilinska	-0,0020	0,1884	0,0102
Gentistinska	-1,3870	0,4532	<b>0,3891</b>
Protokatehinska	-0,0428	0,3282	0,1831
Siringinska	-0,0309	0,5552	0,1382
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0183	0,8877	0,0638
Galna	-0,2784	0,3248	<b>0,2516</b>
Ferulna	-0,0013	0,4177	0,0437
Kafena	-0,0581	0,5229	0,1536
Sinapinska	-0,0194	0,6336	0,1806
Hlorogenska	-0,1459	0,3938	<b>0,7733</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.18 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih fenolnih kiselina negativni što pokazuje da su sve imale antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale tokom proizvodnje piva iz slada NS 525. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525 imale su: hlorogenska (0,7733), gentistinska (0,3891), i galna kiselina (0,2516).



**Slika 5.39.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

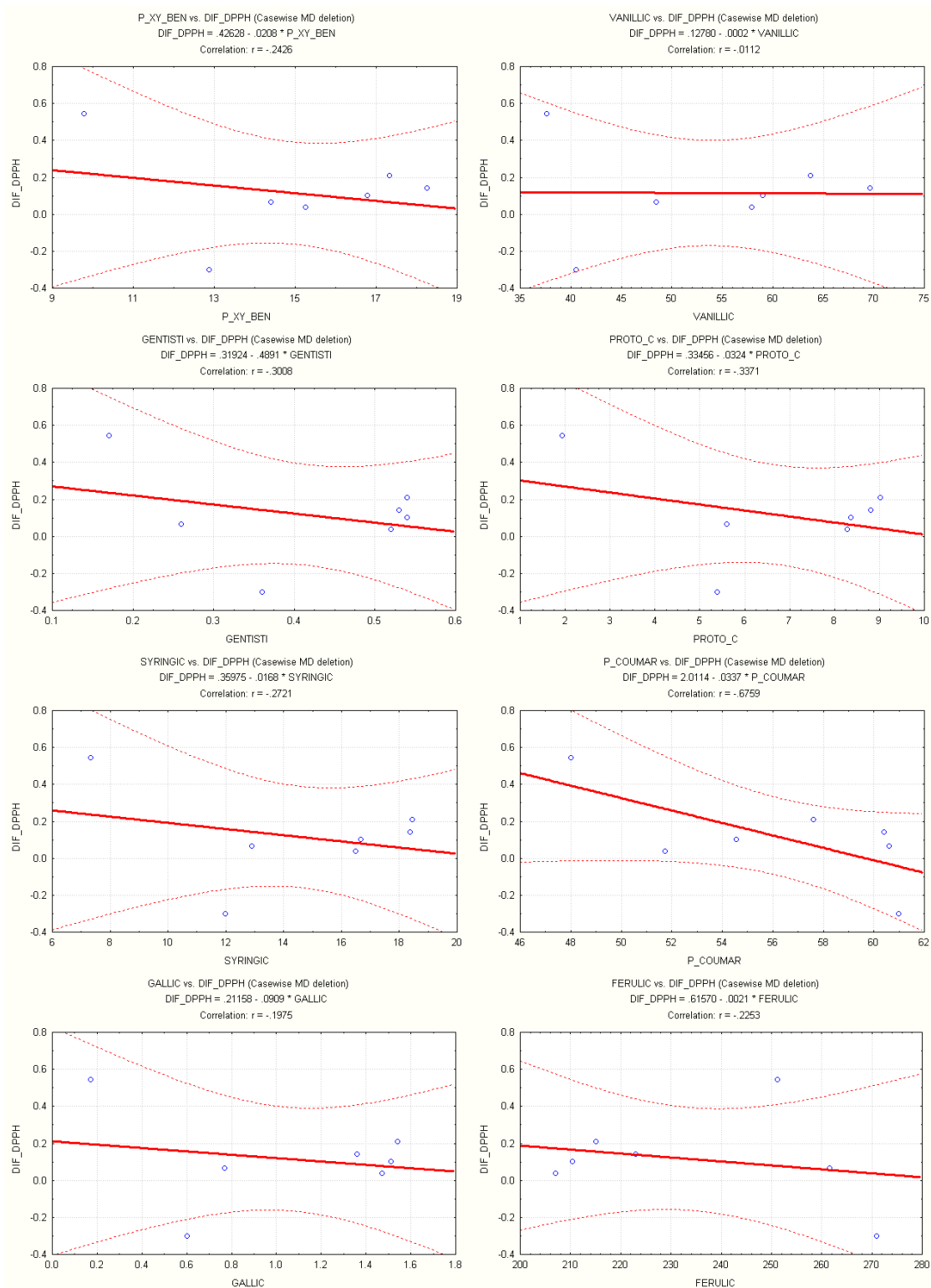


Slika 5.40. Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

Tabela 5.19. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525

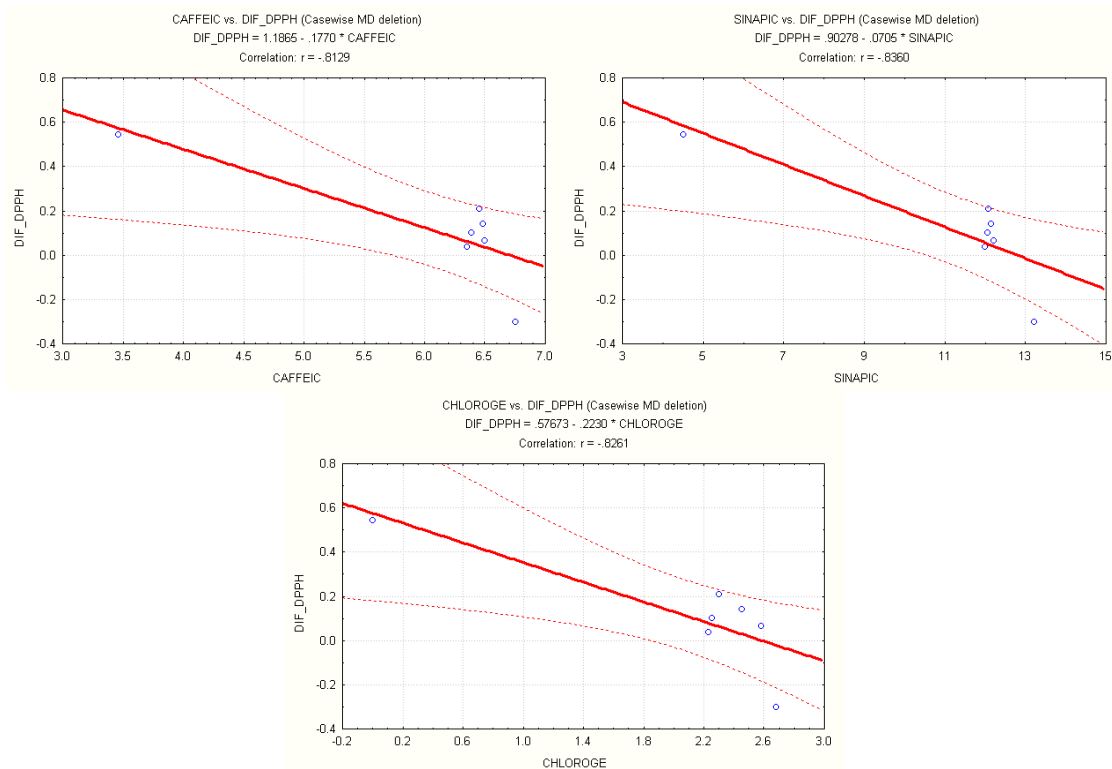
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0202	0,3372	0,1627
Vanilinska	-0,0024	0,1798	0,0470
Gentistinska	-0,9060	0,2946	<b>0,5072</b>
Protokatehinska	-0,0305	0,2272	0,2838
Siringinska	-0,0225	0,3973	0,2252
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0110	0,5366	0,0705
Galna	-0,1802	0,2088	<b>0,3199</b>
Ferulna	-0,0009	0,2852	0,0645
Kafena	-0,0283	0,2680	0,1117
Sinapinska	-0,0122	0,3994	0,2188
Hlorogenska	-0,0876	0,2397	<b>0,8527</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.19 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih kiselina negativni što pokazuje da su sve imale antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 525. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 525 imale su: hlorogenska (0,8527), gentistinska (0,5072), i galna kiselina (0,3199).



**Slika 5.41. Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565**





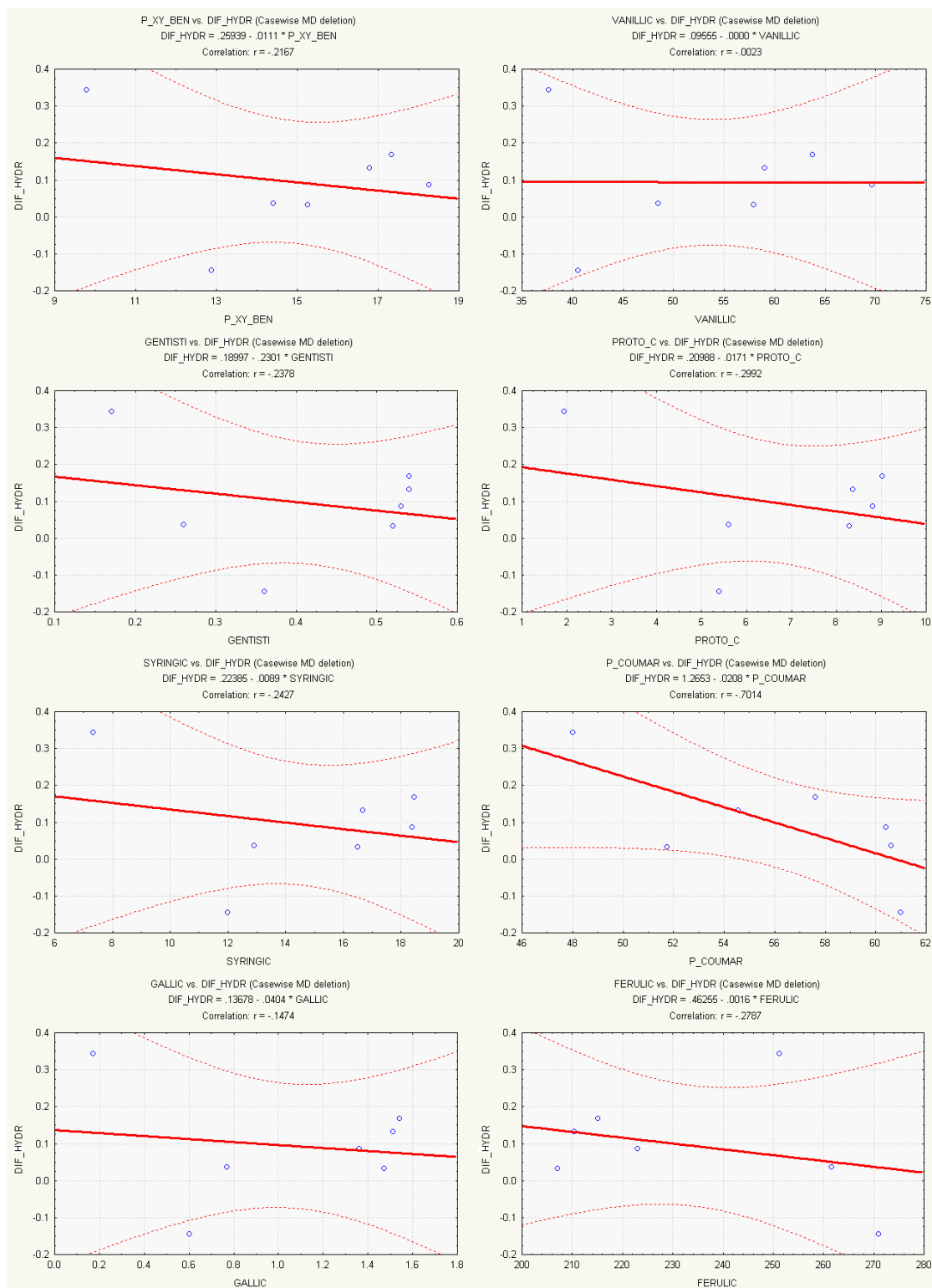
**Slika 5.42.** Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565

**Tabela 5.20.** Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565

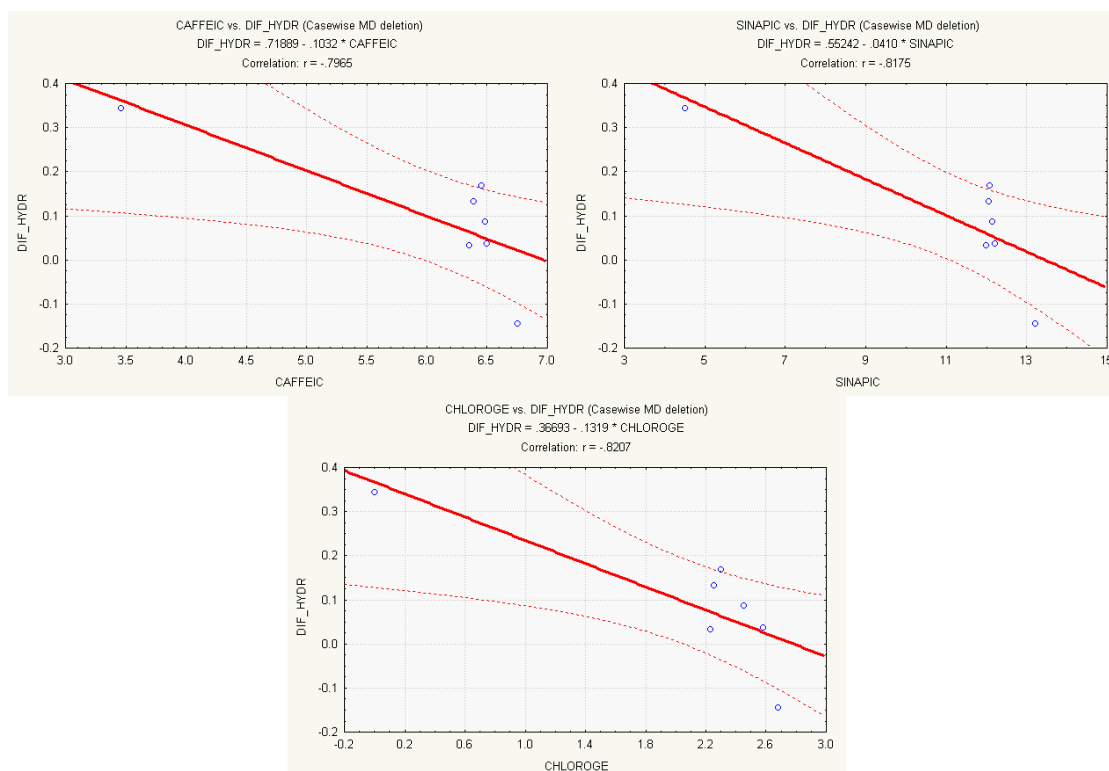
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0208	0,4262	0,0589
Vanilinska	-0,0002	0,1278	0,0001
Gentistinska	-0,4891	0,3192	0,0905
Protokatehinska	-0,0324	0,3345	0,1136
Siringinska	-0,0168	0,3597	0,0740
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0337	2,0114	<b>0,4568</b>
Galna	-0,0909	0,2115	0,0390
Ferulna	-0,0021	0,6157	0,0508
Kafena	-0,1770	1,1865	<b>0,6608</b>
Sinapinska	-0,0705	0,9028	<b>0,6989</b>
Hlorogenska	-0,2230	0,5767	<b>0,6824</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.20 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih fenolnih kiselina negativni što pokazuje da su sve imale antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalne aktivnosti

na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565 imale su: sinapinska (0,6989), hlorogenska (0,6824), kafena (0,6608), i *p*-kumarinska (0,4568).



**Slika 5.43.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565



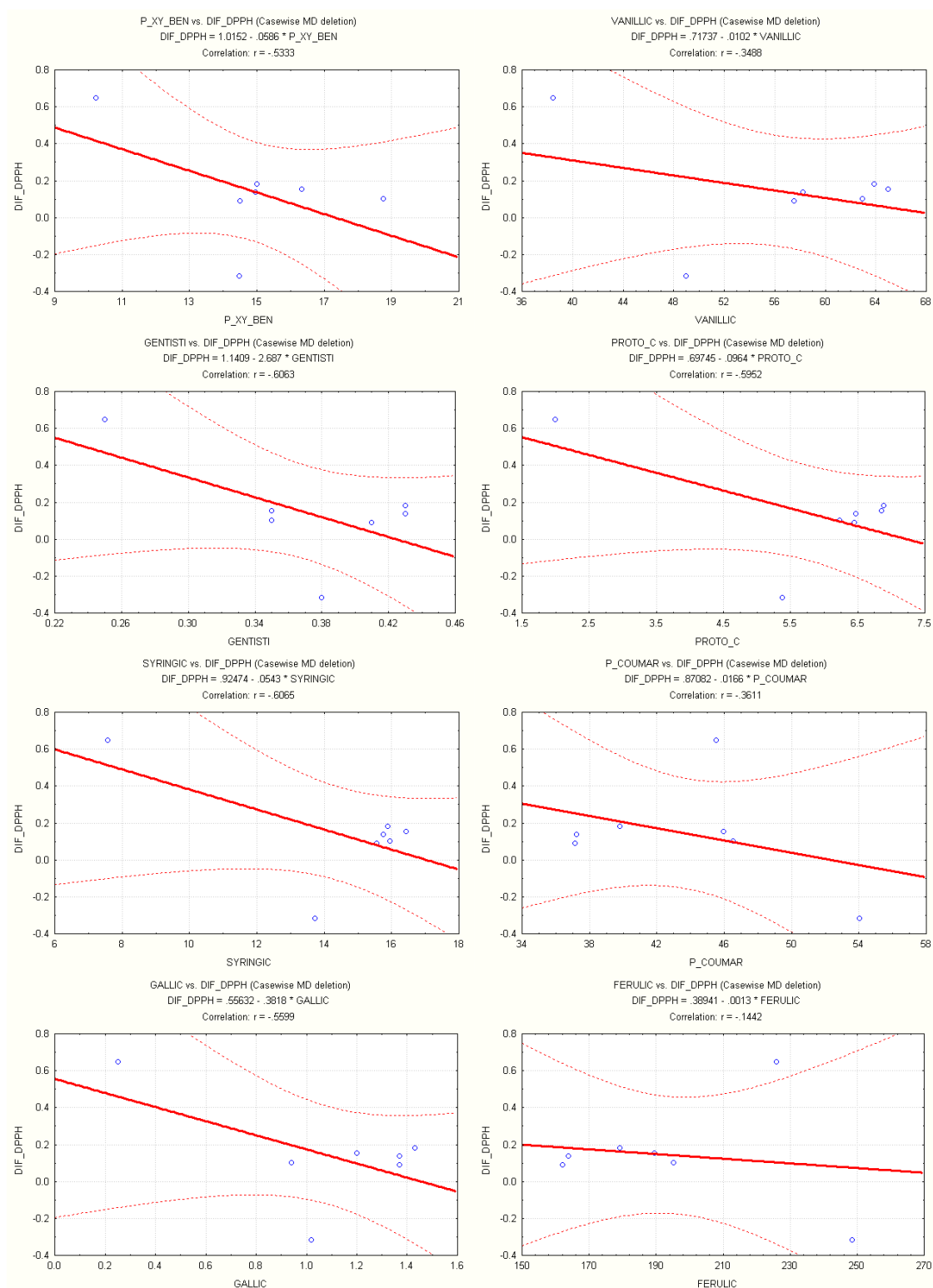
**Slika 5.44. Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565**

**Tabela 5.21. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565**

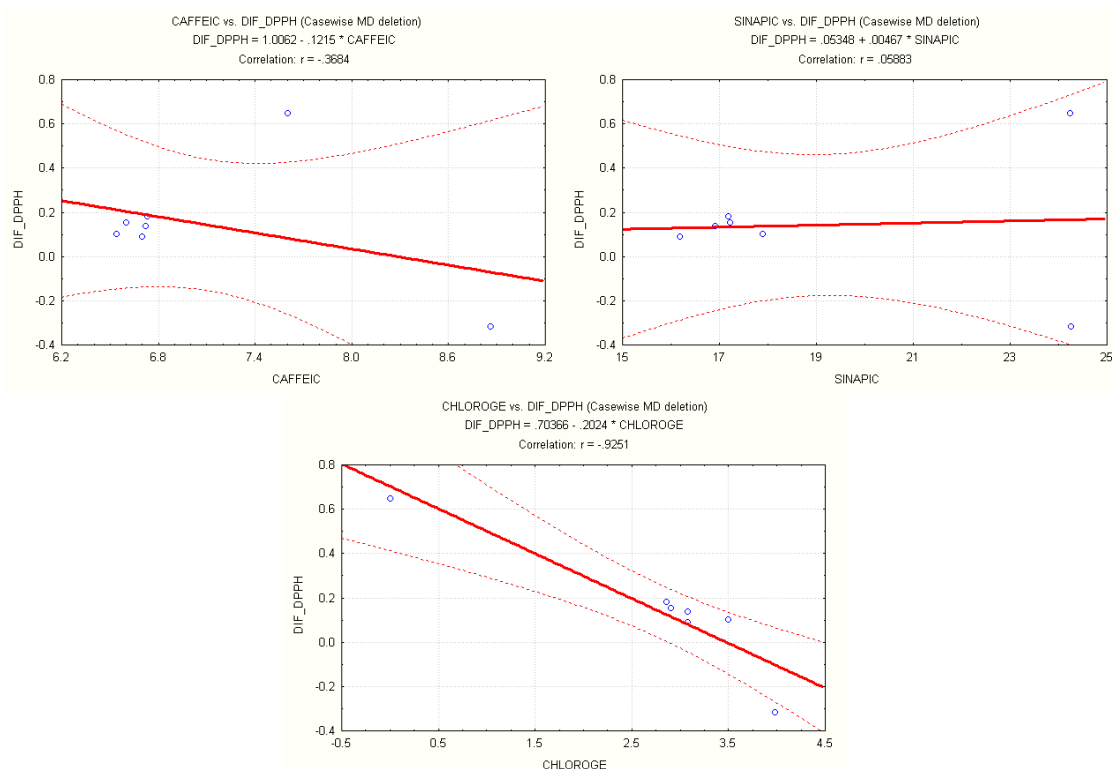
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0111	0,2593	0,0470
Vanilinska	-0,0000	0,0955	0,0000
Gentistinska	-0,2301	0,1899	0,0565
Protokatehinska	-0,0171	0,2098	0,0895
Siringinska	-0,0089	0,2238	0,0589
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0208	1,2653	<b>0,4920</b>
Galna	-0,0404	0,1367	0,0217
Ferulna	-0,0016	0,4625	0,0777
Kafena	-0,1032	0,7188	<b>0,6344</b>
Sinapinska	-0,0410	0,5524	<b>0,6683</b>
Hlorogenska	-0,1319	0,3669	<b>0,6735</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.21 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih fenolnih kiselina negativni što pokazuje da su sve imale antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 565. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 565 imale su:

hlorogenska (0,6735), sinapinska (0,6683), kafena (0,6344) i *p*-kumarinska kiselina (0,4920).



**Slika 5.45.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringinske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalске aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583



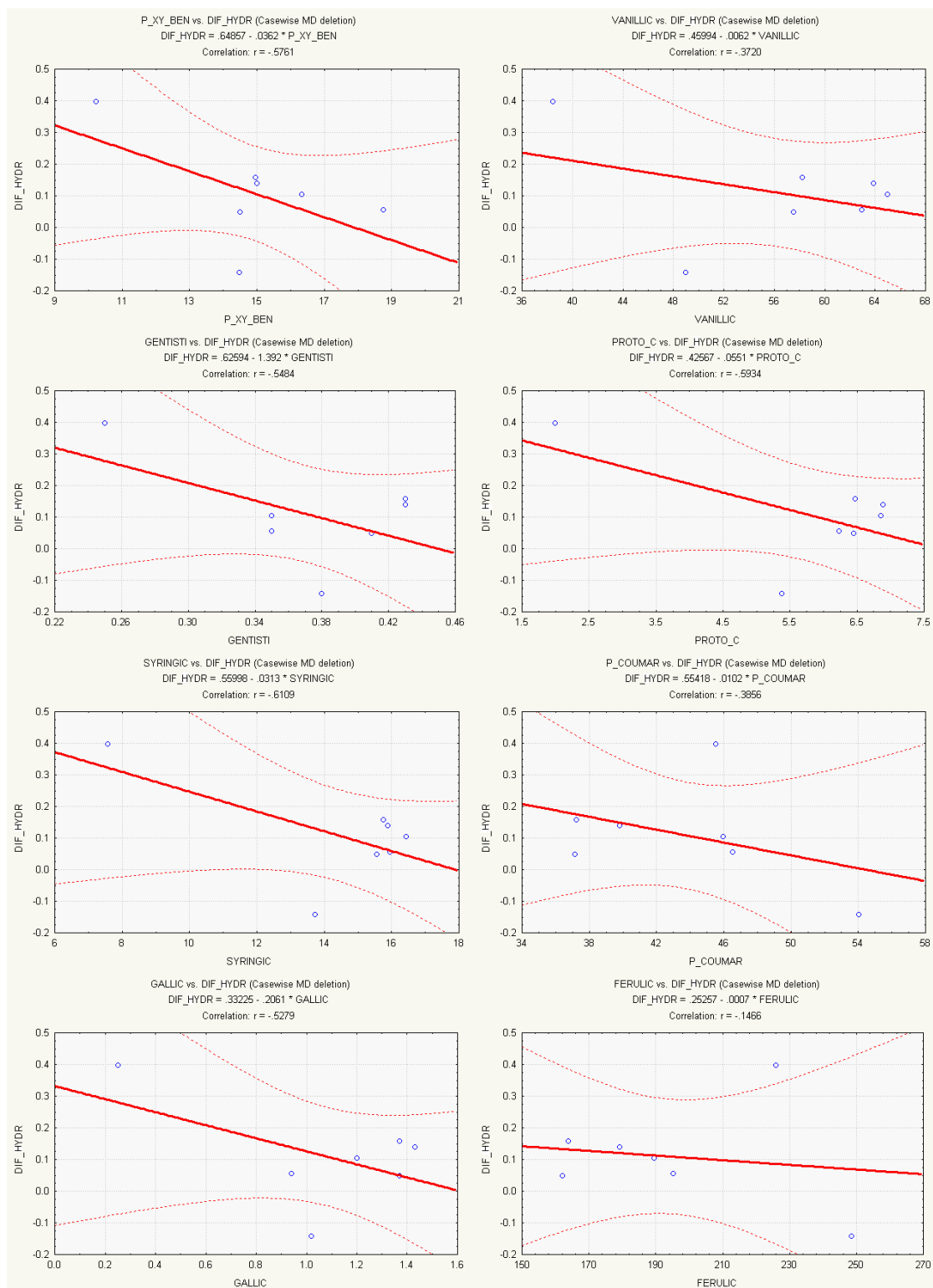
**Slika 5.46. Korelacije sadržaja kafene, sinapinske i hlorigenske kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583**

**Tabela 5.22. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promena antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583**

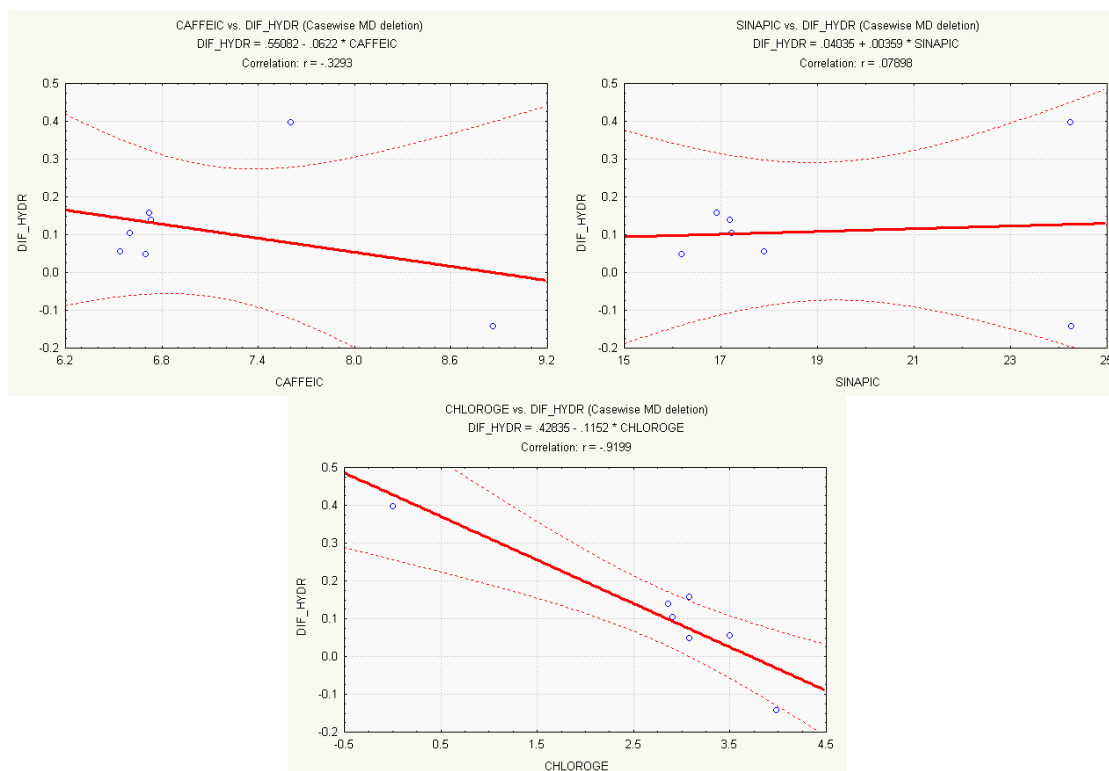
Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0586	1,0152	0,2844
Vanilinska	-0,0102	0,7173	0,1217
Gentistinska	-2,6870	1,1409	<b>0,3676</b>
Protokatehinska	-0,0964	0,6974	<b>0,3543</b>
Siringinska	-0,0543	0,9247	<b>0,3678</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0166	0,8708	0,1304
Galna	-0,3818	0,5563	<b>0,3135</b>
Ferulna	-0,0013	0,3894	0,0208
Kafena	-0,1215	1,0062	0,1357
Sinapinska	0,0046	0,0534	0,0035
Hlorogenska	-0,2024	0,7036	<b>0,8558</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.22 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih fenolnih kiselina, osim sinapinske kiseline, negativni što pokazuje da su sve imale antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583

imale su: hlorogenska (0,8558), siringska (0,3678), gentistinska (0,3676), i protokatehinska kiselina (0,3543).



**Slika 5.47.** Korelacije sadržaja *p*-hidroksibenzoeve, vanilinske, gentistinske, protokatehinske, siringske, *p*-kumarinske, galne i ferulne kiseline i promena antiradikalne aktivnosti na hidrosil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583



Slika 5.48. Korelacije sadržaja kafene, sinapinske, hlorogenske kiseline i promena antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583

Tabela 5.23. Koeficijenti linearne regresije (a i b) i determinacije ( $R^2$ ), sadržaja fenolnih kiselina i promene antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od slada NS 583

Fenolna kiselina	a	b	$R^2$
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva	-0,0362	0,6485	<b>0,3319</b>
Vanilinska	-0,0062	0,4599	0,1384
Gentistinska	-1,3920	0,6259	<b>0,3007</b>
Protokatehinska	-0,0551	0,4356	<b>0,3521</b>
Siringinska	-0,0313	0,5599	<b>0,3732</b>
<i>p</i> -Kumarinska	-0,0102	0,5541	0,1487
Galna	-0,2061	0,3322	0,2787
Ferulna	-0,0007	0,2525	0,0215
Kafena	-0,0622	0,5508	0,1084
Sinapinska	0,0036	0,0403	0,0062
Hlorogenska	-0,1152	0,4283	<b>0,8462</b>

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.23 može se zaključiti da su koeficijenti pravca linearne regresije (a) svih ispitivanih fenolnih kiselina negativni, osim sinapinske kiseline, što pokazuje da su sve imale antiradikalску aktivnost na hidroksil radikale tokom proizvodnje piva od slada NS 583. Najviše koeficijente determinacije sadržaja i promene antiradikalске aktivnosti na hidroksil radikale u fazama proizvodnje piva od

slada NS 583 imale su: hlorogenska (0,8462), siringinska (0,3732), protokatehinska (0,3521), *p*-hidroksibenzoeva (0,3319) i gentistinska kiselina (0,3007).

U proizvodnji piva je primenom korelacione analize sadržaja fenolnih kiselina i promene antiradikalne aktivnosti u fazama proizvodnje piva ustanovljen obrnuto proporcionalan odnos sadržaja svih fenolnih kiselina i promene antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale (svi koeficijenti pravca linearne regresije  $a$  u svim uzorcima imaju negativan preznak), što naglašava da sve ispitivane kiseline tokom proizvodnje piva, imaju izraženu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale.

Hlorogenska, galna i gentistinska kiselina u uzorku NS 525 imaju najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale tokom proizvodnje piva. U uzorku NS 565 najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale tokom proizvodnje piva imaju hlorogenska, sinapinska i *p*-kumarinska kiselina. U uzorku NS 583 najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale imale su hlorogenska, gentistinska, siringinska i protokatehinska kiselina. Značajnu antiradikalnu aktivnost na hidrosil radikale imala je i *p*-hidroksibenzoeva kiselina.

Franz i Back (2001), Back i saradnici (2002), Chaillou i Nazareno (2006) i Čanadanović-Brunet i saradnici (2009) su ispitivali antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale pojedinačnih fenolnih kiselina. Franz i Back (2001) su utvrdili da galna, kafena i hlorogenska imaju najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Nakon toga slede gentistinska, protokatehinska, ferulna, siringinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva i vanilinska kiselina. Back i saradnici (2002) su odredili antiradikalni potencijal na DPPH radikale po sledećem opadajućem redosledu: sinapinska, galna, kafena, hlorogenska, gentistinska, ferulna, siringinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva i vanilinska kiselina. Chaillou i Nazareno (2006) su odredili antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale po sledećem opadajućem redosledu: elaginska, hlorogenska, galna, kafena, ferulna, sinapinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva. Čanadanović-Brunet i saradnici (2009) su odredili antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale po sledećem opadajućem redosledu: kafena, protokatehinska, siringinska, ferulna, vanilinska i *p*-kumarinska kiselina.

U proizvodnji slada iz sorti ječma NS 525, NS 565 i NS 583 najviše antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale imale su sledeće fenolne kiseline: hlorogenska, elaginska, ferulna, protokatehinska, galna, vanilinska, sinapinska, *p*-hidroksibenzoeva i siringinska kiselina. Antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale zavisile su od sorte ječma upotrebljenog u proizvodnji slada.

U proizvodnji piva od slada NS 525, NS 565 i NS 583 najviše antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale imale su sledeće fenolne kiseline: hlorogenska, galna, gentistinska, kafena, sinapinska, siringinska, *p*-kumarinska, protokatehinska i *p*-hidroksibenzoeva. Antiradikalne aktivnosti na DPPH i hidrosil radikale zavisile su od sorte ječma upotrebljenog u proizvodnji slada i piva. Primenom diferencijalnog korelacionog modela sve kiseline su imale antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidrosil radikale. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje do dobili Franz i Back (2001), Back i saradnici (2002), Chaillou i Nazareno (2006) i Čanadanović-Brunet i saradnici (2009).



## 6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobijenih u ovom radu može se zaključiti:

- ❖ Ispitivane sorte ječma NS 525, NS 565 i NS 583 su prema senzornoj oceni, mehaničkoj, fiziološkoj i hemijskoj analizi ocenjene kao dobre pivarske sorte ječma.
- ❖ Sve ispitivane sorte su tokom močenja primile dovoljno vlage tj. stepen namočenosti je bio iznad 44,5% nakon trećeg močenja. Ukupni gubici tokom sladovanja ispitivanih sorti ječma su bili niski, odnosno ispod 10,5%.
- ❖ Na osnovu rezultata ispitivanih parametara može se zaključiti da su proizvedeni sladovi dobro razgrađeni (vreme ošecerenja, razlika ekstrakta, viskoznost, Kolbach-ov broj).
- ❖ Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ječma je bio: NS 525 - 0,76; NS 565 - 0,75 i NS 583 - 0,70 mg GAE/g suve materije. Tokom močenja sadržaj ukupnih fenola se povećao za 21,05%, 18,67% i 18,57% za NS 525, NS 565 i NS 583. U prvom danu klijanja sadržaj ukupnih fenola se povisio za 7,61%, 8,99% i 13,58% za NS 525, NS 565 i NS 583. Tokom klijanja, sadržaj ukupnih fenola se blago snizio u svim uzorcima ječma. Sadržaj ukupnih fenola se povisio tokom sušenja svih ispitivanih sorti ječma za: 1,05%, 1,07% i 1,11% za NS 525, NS 565 i NS 583. Sadržaj ukupnih fenola u svim proizvednim sladovima (0,96; 0,94 i 0,91 mg GAE/g suve materije za NS 525; NS 565 i NS 583) je bio viši od sadržaja u ječmu. Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola tokom svih faza sladovanja, dok su sorte NS 565 i NS 583 imale niže sadržaje ukupnih fenola. Najniži sadržaj ukupnih fenola imala je sorta NS 583.
- ❖ U svim ispitivanim sortama ječma ferulna, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina su bile dominantne u uzorcima ječma, tokom sladovanja i u proizvedenom sladu.
- ❖ Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ječmu je iznosio za sortu NS 525 - 200,98; NS 565 - 184,10 i za NS 583 - 177,27  $\mu\text{g/g}$  suve materije. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je rastao kod svih ispitivanih sorti tokom močenja i dostigao maksimum u toku prvog dana klijanja za NS 525 - 548,31; NS 565 - 518,65 i NS 583 - 517,17  $\mu\text{g/g}$  suve materije što znači da je sadržaj povećan za 2,72 puta za sortu NS 525, 2,81 puta za sortu NS 565 i 2,92 puta za sortu NS 583. U narednim danima klijanja sadržaj ukupnih fenolnih kiselina se smanjivao. U toku sušenja se sadržaj ukupnih fenolnih kiselina neznatno povećao.
- ❖ Dobijeni rezultati su pokazali da je proces sladovanja imao značajan uticaj na sadržaj pojedinačnih i ukupnih fenolnih kiselina. Povišeni sadržaji fenolnih kiselina mogu se objasniti razgradnjom složenih jedinjenja za koje su fenolne kiseline vezane (usled delovanja amilaza, proteaza i  $\beta$ -glukanaza) i boljom ekstrakcijom.
- ❖ Sorta NS 525 je imala najvišu antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale ( $\text{EC}_{50}$  za NS 525 - 0,658; NS 565 - 0,667 i NS 583 - 0,758 mg/ml) što pokazuje da sorta ječma ima uticaja na antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale. Za ispitivane sorte ječma, antiradikalna aktivnost na DPPH radikale se povisila značajno tokom močenja i to za sortu NS 525 - 56,32%, NS 565 - 40,00% i NS 583 - 26,67%. Prvog dana klijanja, antiradikalna aktivnost na DPPH radikale imala je dalji porast. Antiradikalna aktivnost na DPPH radikale je smanjenja na kraju klijanja, a u toku sušenja zelenog slada antiradikalna aktivnost na DPPH radikale

se povećala. U proizvedenim sladovima antiradikalska aktivnost na DPPH radikale bila je viša nego u ječmu i to: za 62,00% za NS 525, 46,43% za NS 565 i 40,00% za NS 583. Trend porasta i smanjenja antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale tokom sladovanja je bio isti za sve ispitivane sorte ječma.

- ❖ Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale, izražena kao  $EC_{50}$  vrednost, u ispitivanim sortama ječma je iznosila: NS 525 – 0,352; NS 565 – 0,385 i NS 583 – 0,455 mg/ml. Može se zaključiti da je sorta NS 525 imala najvišu antiradikalsku aktivnost na hidroksil radikale. Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se znatno povisila tokom močenja za 37,84% za NS 525, 33,33% za NS 565 i 31,25% za NS 583. Prvog dana klijanja antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale je povišena u odnosu na kraj močenja. Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se na kraju klijanja smanjila, a tokom sušenja zelenog slada povećala. U proizvedenom sladu je antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale bila viša nego u ječmu: 49,27% za NS 525, 38,10% za NS 565 i 37,14% za NS 583. Trend porasta i smanjenja antiradikalske aktivnosti na hidroksil radikale tokom sladovanja je bio isti za sve ispitivane sorte ječma.
- ❖ Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola kao i najvišu antioksidativnu aktivnost tj. antiradikalsku aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Ovi rezultati pokazuju da sorta ječma može da utiče na antiradikalske osobine slada. Sorta NS 525 je imala najviši sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenolnih kiselina i najvišu antiradikalsku aktivnost na DPPH i hidroksil radikale u toku sladovanja.
- ❖ Hmelj je sadržao više ukupnih fenolnih kiselina, oko 3 puta više protokatehinske i galne kiseline i oko 50 puta više hlorogenske kiseline u poređenju sa sadržajima navedenih fenolnih kiselina u sladovima. Sadržaj ferulne kiseline u hmelju je bio niži za oko 3,4-3,9 puta u odnosu na ispitivane sladove.
- ❖ Procenat ekstrahovanih ukupnih fenola bio je ujednačen kod ispitivanih sorti slada i iznosio je 3,96% za sortu NS 525, 3,91% za sortu NS 565 i 4,01% za sortu NS 583. Na osnovu navedenog može se zaključiti da se samo oko 4% ukupnih fenola slada ekstrahuje u sladovinu, a da ostatak ukupnih fenola zaostaje u tropu.
- ❖ Procenat ekstrahovanih fenolnih kiselina iz sladova u sladovine iznosio je oko 10% za sve ispitivane uzorke slada.
- ❖ U svim proizvedenim sladovinama, ohmeljenim sladovinama i pivima, ferulna, *p*-kumarinska, vanilinska i sinapinska kiselina su imale najviše sadržaje. Sadržaj svih ispitivanih fenolnih kiselina je povišen nakon hmeljenja. Najviši ukupni sadržaj fenolnih kiselina je određen u ohmeljenim sladovinama (NS 525 - 461,41, NS 565 - 426,22 i NS 583 - 423,56  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ). Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je u svim proizvedenim pivima bio niži u odnosu na odgovarajuće ohmeljene sladovine. Tokom svih fermentacija sadržaji *p*-kumarinske, ferulne, kafene, sinapinske i hlorogenske kiseline su se snižavali.
- ❖ U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 je određena najviša antiradikalska aktivnost na DPPH radikale, obzirom da niža  $EC_{50}$  vrednost pokazuje višu antiradikalsku aktivnost ( $EC_{50}$  za NS 525 - 0,433; NS 565 - 0,546 i NS 583 - 0,649 mg/ml), što ukazuje da antiradikalska aktivnost komponenti slada ima uticaja na antiradikalsku aktivnost proizvedene sladovine. U ispitivanim sladovinama, nakon hmeljenja se znatno povisila antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ( $EC_{50}$  za ohmeljenu sladovinu NS 525 - 0,223; NS 565 - 0,247 i NS 583 - 0,333 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale se tokom hmeljenja povećala kod NS 525 za 48,55%, NS 565 za 54,81% i NS 583 za

- 48,67%. Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale se smanjila tokom glavne i naknadne fermentacije.
- ❖ U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 je određena najviša antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale ( $EC_{50}$  za sladovinu NS 525 - 0,275; NS 565 - 0,345 i NS 583 - 0,397 mg/ml). U ispitivanim sladovinama, nakon hmeljenja se znatno povisila antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale ( $EC_{50}$  za ohmeljenu sladovinu NS 525 - 0,182; NS 565 - 0,201 i NS 583 - 0,256 mg/ml). Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se tokom hmeljenja povećala kod NS 525 za 34,00%, kod NS 565 za 41,77% i kod NS 583 za 35,55%. Antiradikalska aktivnost na hidroksil radikale se smanjila tokom glavne i naknadne fermentacije.
  - ❖ U sladovini proizvedenoj od slada NS 525 sa najvišim sadržajem ukupnih fenola i najvišim ukupnim sadržajem fenolnih kiselina određene su najviše antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale. Tokom proizvodnje piva sadržaj ukupnih fenola se blago smanjio, što ukazuje da je proces proizvodnje imao uticaja na njihov sadržaj. Trend smanjenja antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale odgovara smanjenju sadržaja ukupnih fenola i ukupnih fenolnih kiselina tokom procesa proizvodnje piva.
  - ❖ Primenjena GC-MS metoda za određivanje sadržaja fenolnih kiselina tokom procesa proizvodnje slada i piva se pokazala kao osetljiva, specifična i dobre ponovljivosti. Može se primeniti za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u ječmu, namočenom ječmu, zelenom sladu, sladu, sladovini, ohmeljenoj sladovini, tokom fermentacije i u pivu. Određeni sadržaji fenolnih kiselina GC-MS metodom su u saglasnosti sa rezultatima koji se dobijaju primenom HPLC metoda.
  - ❖ Na osnovu dobijenih rezultata za koeficijente determinacije između sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom procesa sladovanja može se zapaziti da sve ispitivane fenolne kiseline imaju značajnu antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale.
  - ❖ Kod svih ispitivanih sorti ječma najviše koeficijente determinacije sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom sladovanja imale su sledeće fenolne kiseline: hlorogenska, protokatehinska, galna, vanilnska, *p*-hidroksibenzoeva, ferulna, siringinska i sinapinska kiselina.
  - ❖ Primenom diferencijalnog korelacionog modela sve kiseline su imale antiradikalnu aktivnost na DPPH i hidroksil radikale. Hlorogenska, kafena i sinapinska kiselina su imale najviše koeficijente determinacije sadržaja i antiradikalske aktivnosti na DPPH i hidroksil radikale tokom proizvodnje piva kod svih ispitivanih uzoraka.
  - ❖ Sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost sirovina koje se koriste za proizvodnju piva, imaju značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost piva. Poznavanje promena sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti tokom proizvodnje slada i piva može omogućiti zaštitu endogenih antioksidanata u proizvodnji piva. Na taj način mogu se proizvoditi piva sa višom antioksidativnom aktivnošću i prema tome i povišenom otpornošću prema lipidnoj oksidaciji i starenju piva.

## 7. LITERATURA

1. Adom, K.-K., Liu, R.-H. (2002) Antioxidant activity of grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
2. Amorati, R., Pedulli, G.-F., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L. (2006) Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2932-2937.
3. Analitika EBC III i Mikrobiološka analitika EBC (1985), Izdavač Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 209-212.
4. Andersen, M., Skibsted, L. (1998) Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1272-1275.
5. Andersen, M., Outtrup, H., Skibsted, L. (2000) Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3106-3111.
6. Andersson, A., Lampi, A.-M., Nyström, L., Pürönen, V., Li, L., Ward, J., Gebruers, K., Courtin, C., Delcour, J., Boros, D., Frás, A., Dykowska, V., Rakszegi, M., Bedő, Z., Shewry, P., Åman, P. (2008) Phytochemical and dietary fiber components in barley varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9767-9776.
7. Andreasen, M., Christensen, L., Meyer, A., Hansen, Å. (1999) Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 411-413.
8. Andreasen, M., Christensen, L., Meyer, A., Hansen, Å. (2000) Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2837-2842.
9. Andreasen, F., Landbo, K., Christensen, L., Hansen, Å., Meyer, A. (2001) Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts monomeric hydroxycinnamates and ferulic acid dehydrodimers on human low density lipoproteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4090-4096.
10. Back, W. i saradnici (2002) Systematische Untersuchungen zur endogenen antioxidativen Aktivität von Bier unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole und ihrer Veränderung beim Brauprozess, Schlussbericht für den Zeitraum: 01.10.2000-30.09.2000, TU Munchen-Weihenstephan und Universität Bonn, AiF-Vorhaben-Nr./GAG: 12605/N.
11. Bamforth, C., Clarkson, S., Large, P. (1991) The relative importance of polyphenoloxidase, lipoxigenase, and peroxidase during wort oxidation, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 23:617-624.
12. Bamforth, C., Muller, R., Walker, M. (1993) Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: A review, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53, 79-88.
13. Bamforth, C. (2001) Oxido-reduction processes and active forms of oxygen in aqueous systems, *Cerevisia*, 26, 149-154.
14. Bamforth, C. (2003) Beer: An ancient yet modern biotechnology, *The Chemical Educator*, 5, 102-112.

15. Bamforth, C. (2003) Beer: Tap into the art and science of brewing, 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford University Press, Oxford, UK.
16. Bamforth, C. (2004) Beer: Health and Nutrition, 1<sup>st</sup> Edition, Blackwell Science Ltd., Blackwell Publishing Company, 114.
17. Bamforth, C. (2006) Scientific Principles of Malting and Brewing, American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, USA.
18. Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (1999) Barley spent grain: Release of hydroxycinnamic acids (ferulic and *p*-coumaric acids) by commercial enzyme preparations, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 435-439.
19. Bartolomé, B., Peña-Neira, A., Gómez-Cordovés, C. (2000) Phenolics and related substances in alcohol-free beers, *European Food Research and Technology*, 210, 419-423.
20. Bastin, P., Van Nedervele, L., Dillemans, M., Boivin, P., Debourg, A. (2001) Evaluation of antioxidant properties of *Saccharomyces cerevisiae*, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 28:46.
21. Baxter, E., Walker, C. (2001) Beer and health research, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, CD-ROM, 28:9.
22. Bellmer, H.-G. (1981) Hopfenpolyphenole im Brauprozess, *Brauwelt*, 121, 240-245.
23. Boivin, P., Malanda, M., Clamagirand, V. (1995) Evaluation of the organoleptic quality of malt. Evolution during malting and varietal influence, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 25:159-168.
24. Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, F. (2004) Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours. Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry, *Journal of Chromatography A*, 1057, 1-12.
25. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, F. (2004a) Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5195-5200.
26. Briggs, D., Boulton, C., Brookes P., Stevens R. (2004) Brewing-Science and practice, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
27. Cahill, G., Murray, D., Walsh, P., Donnelly, D. (2000) Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58, 14-20.
28. Callemien, D., Counet, C., Cawet, Q., Collin, S. (2003) Hop as a determinant nutrition key for health, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 29:137.
29. Callemien, D., Dasnoy, S., Collin, S. (2006) Identification of a stale-beer-like odorant in extracts of naturally aged beers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1409-1413.
30. Chaillou, L., Nazareno, M. (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8397-8402.
31. Chandra, C. S., Buggey, L. A., Peters, S., Cann, C., Liegeois, C. (2000) Factors affecting the development of antioxidant properties of malts during the malting and the roasting process, Project report No. 242, Home-Grown Cereals Authority (Project No. 1184).

32. Chandra, S. (2002) Antioxidant activity during beer production, Proceedings of COST Action 919-Melanoidins in food and health, ed. Fogliano, V. And Henle, T., European Commission, 137-142.
33. Clarkson, S., Large, P., Hegarty, P., Bamforth, C. (1989) Oxygen radicals-their influence on process performance and product quality, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 22:267-274.
34. Clarkson, S. (1990) Oxygen free-radical scavenging enzymes in malt yeast and soya beans, PhD Thesis, University of Hull, UK.
35. Četković, G., Djilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas, V. (2004) Antioxidant properties of marigold extracts, *Food Research International* 37:643-650.
36. Četković, G. (2008) Hemija prirodnih proizvoda, Udžbenik, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
37. Čanadanović-Brunet, J. (1997) Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
38. Čanadanović-Brunet, J., Đilas, S., Četković, G., Tumbas, V. (2005) Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) extracts, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 265-273.
39. Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Đilas, S., Tumbas, V., Savatović, S., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D. (2009) Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts, *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 269-278.
40. Dadić, M., Belleau, G. (1980) Beer Hazes 1. Isolation and preliminary analysis of phenolic and carbohydrate components, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38, 154-158.
41. Debyser, W., Schooneveld-Bergmans, M., Derdelinckx, G., Grobet, P., Delcour, J. (1997) Nuclear magnetic resonance and methylation analysis-derived structural features of water extractable arabinoxylans from barley (*Hordeum vulgare* L.) malts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2914-2918.
42. Debyser, W., Delvaux, F., Delcour, J. (1998) Activity of arabinoxylans hydrolyzing enzymes during mashing with barley malt or barley malt and unmalted wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4836-4841.
43. deMan, J. (1999) Principles of Food Chemistry, 3rd edition, Springer Science-Business Media Inc., USA.
44. Depraetere, S., Delvaux, F., De Schutter, D., Williams, I., Winderickx, J., Delvaux, F. (2008) The influence of wort aeration on yeast preoxygenation of beer staling processes, *Food Chemistry*, 107, 242-249.
45. Dorfner, R., Ferge, T., Kettrup, A., Zimmermann, R., Yeretzyan, C. (2003) Real-time monitoring of 4-vinylguaicol, and phenol during coffee roasting by resonant laser ionization time-off-flight mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5768-5773.
46. Dostálek, P., Karabín, M. (2007) Impact of hop polyphenols and antioxidant properties of wort on formation of carbonyl compounds during boiling process and storage of beer, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 31:102.
47. Duh, P.-D., Yen, G.-C., Yen, W.-J., Chang, L.-W. (2001) Antioxidant effects of water extracts from barley (*Hordeum vulgare* L.) prepared under different roasting temperatures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1455-1463.
48. Dvořáková, M., Guido, L., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M., Barros, A. (2008) Antioxidant properties of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic

- compounds in different barley varieties and corresponding malts, *Journal of the Institute of Brewing*, 114, 27-33.
49. Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G. (2000) Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu.
  50. European Brewery Convention - EBC, Manual for Good Practice, *Hops and Hop products* (1997) Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Germany.
  51. European Brewery Convention - EBC, *Analytica-EBC* (1998) Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Germany.
  52. Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition*, 18, 872-879.
  53. Fantozzi, P., Montanari, L., Mancini, F., Gasbarrini, A., Addolorato, G., Simoncini, M., Nardini, M., Ghiselli, A., Scaccini, C. (1998) *In vitro* antioxidant capacity from wort to beer, *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 31, 221-227.
  54. Fiamegos, Y., Nanos, C., Vervoort, J., Stalikas, C. (2004) Analytical procedure for the in vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection, *Journal of Chromatography A*, 1041, 11-18.
  55. Floridi, S., Montanari, L., Marconi, O., Fantozzi P. (2003) Determination of free phenolic acids in beer by coulometric array detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1548-1554.
  56. Forster, A., Beck, B., Schmidt, R., (1995) Untersuchungen zu Hopfenpolyphenolen, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 25:143-150.
  57. Forster, C., Schwieger, J., Narziss, L., Back, W., Uchida, M., Ono, N., Yanagi, K. (1999) Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometer freier Radikale, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 5/6, 86-93.
  58. Forster, C., Back, W. (2000) Pitching and filling procedures of cylindro-conical fermentation tanks and its influence on the anti-oxidant activity of beer, *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 37, 59-64.
  59. Forster, A., Simon, K., Schmidt, R., Kaltner, D. (2001) What is it about antioxidative characteristics of hops? CD-ROM, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 28:16.
  60. Frank, J. (2004) Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability model studies in rats and humans, Doctoral thesis, Department of Food Science Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
  61. Franz, O., Back, W. (2001) DPPH-scavenging activity of beer and polyphenols measured by ESR, CD-ROM, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 28:66.
  62. Franz, O., Back, W. (2002) Erfahrungen zur Messung von freien Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometer in Brauerei, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 7/8, 156-162.
  63. Frederiksen, A., Festersen, R., Andersen, M. (2008) Oxidative reactions during early stages of beer brewing studied by electron spin resonance and spin trapping, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8514-8520.
  64. Friedrich, W., Eberhardt, A., Galensa, R. (2000) Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry, *European Food Research and Technology*, 211, 56-64.

65. Fry, S. (1979) Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth, *Planta*, 146, 343-351.
66. García, A., Grande, C., Gándara S. (2004) Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054, 175-180.
67. Geiger, E., Wagner, D., Zepf, M. (1999) Notwendigkeit einer Optimierung der Hefeherführung unter aeroben Bedingungen, *Brauwelt*, 139, 1554-1555.
68. Gerhäuser, C. (2005) Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41, 1941-1954.
69. Goiris, K., Syryn, E., Jaskula, B., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., De Cooman, L. (2005) Hop polyphenols: potential for beer flavour and flavour stability, CD-ROM, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 30:87.
70. Goupy, P., Hugues, M., Boivin P., Amiot M. J. (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Horedum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 625-1634.
71. Goupy, P., Hugues, M., Boivin P., Amiot M.-J. (1999) Antioxidant compounds of barley (*Horedum vulgare*) and malt extracts, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 27:445-451.
72. Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2003) Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 615-622.
73. Gromus, J., Lustig, S. (1999) Einfluss von Polyphenolen und reduzieren den Verbindungen auf die Bierqualität und ihr Verhalten im Brauprozess, *Brauwelt*, 44, 2029-2035.
74. Grujić, O., Gaćeša, S. (1999) Application of hydrothermally treated barley in beer production, *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 45-48.
75. Grujić, O., Gaćeša, S., Leskošek-Čukalović, I. (2000) Savremeni pravci razvoja u tehnologiji slada i piva u svetu i kod nas, *Pivarstvo*, 31, 1-2, 10-25.
76. Grujić, O., Gaćeša, S., Pejin, J. (2001) Korišćenje komercijalnih enzima sa amilolitičkom aktivnošću u proizvodnji sladovine iz usipaka sa povećanim sadržajem kukuruza, *Pivarstvo*, 34, 1-2, 29-40.
77. Grujić, O. (2002) Savremeni trendovi u tehnologiji piva, Zbornik radova naučnog skupa "Savetovanje o biotehnologiji u Vojvodini", Novi Sad, 12-13. Septembar 2002, Srpska Akademija nauka i umetnosti, Ogranak u Novom Sadu, 203-229.
78. Guido, L., Rodrigues, F., Rodrigues, P., Gonçalves, C., Barros, A. (2004) The impact of the physiological condition of the pitching yeast of beer flavour stability: an industrial approach, *Food Chemistry*, 87, 187-193.
79. Guido, L., Boivin, P., Benismail, N., Gonçalves, C., Barros, A. (2005) An early development of the nonenal potential in the malting process, *European Food Research and Technology*, 220, 200-206.
80. Guido, L., Curto, A., Boivin, P., Benismail, N., Gonçalves, C., Barros, A. (2007) Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: Multivariate Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 728-733.
81. Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.



82. Halliwell, B., Gutteridge, J. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed; Oxford University Press Inc., New York.
83. Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107-112.
84. Hardwick, W. (1995) The properties of Beer in Handbook of Brewing (Food Science and Technology), Ed. Hardwick, W., Publisher: Marcel Dekker, New York, USA, 551-587.
85. Hayes, P., Smyth M., McMurrugh, I. (1987) Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquid chromatography for the determination of phenolic compounds commonly found in beers, *Analyst*, 112, 1205-1207.
86. Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A., Faulds, G., Williamson, G., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2001) Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4884-4888.
87. Herrmann, K. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.
88. Ho, C., Li, C., Huang, M. (1992) Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence, and Chemistry, Ed. American Chemical Society, Washington, DC.
89. Holtekjølen, A., Kinitz, C., Knutsen S. (2006) Flavanol and bound phenolic acids contents in different barley varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2253-2260.
90. Hudson, J. (1981) Physical stability of beer, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 18:421-433.
91. Humberstone F., Briggs, D. (2000) Extraction and assay of ferulic acid esterase from malted barley, *Journal of the Institute of Brewing*, 106, 21-29.
92. Inns, E., Chandra, S., Nursten, H., Ames, J. (2003) Effect of a simulated kilning regime on free phenolics from green malt, Proceedings of COST Action 919- Melanoidins in food and health, ed. Vegarud, G. and Morales, F., European Commission, 131-134.
93. Inns, E., Buggey, L., Nursten, H., Ames, J. (2005) Effect of a simulated kilning regime on the profile and antioxidant activity of the free phenolic acids extracted from green malt, *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 42, 204-208.
94. Irwin, A., Barker, R., Pipasts, P. (1991) The role of copper, oxygen and polyphenols in beer flavor instability, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49, 140-149.
95. Jandera, P., Škeřiková V., Řehová L., Hájek T., Baladriánova L., Škopová G., Kellner V., Horna A. (2005) RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector, *Journal of Separation Science*, 28, 1005-1022.
96. Jugoslovenski standard - Slad, ječmeni - JUS E.M2.010 (1997), Savezni zavod za standardizaciju, Beograd.

97. Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Ramarathnam, N., Kawakishi, S., Kamada, K. (1988) Detection of free radicals in beer oxidation, *Journal of Food Science*, 53, 885-888.
98. Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., Koshino, S. (1991) The role of active oxygens on deterioration of beer flavor, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 23:433-440.
99. Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., Koshino, S. (1994) Free radical reactions in beer during pasteurization, *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 195-200.
100. Kaneda, H., Kobayashi, N., Takashio, M., Tamaki, T., Shinotsuka, K. (1999) Beer staling mechanism, *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 36, 41-47.
101. Kaukovirt-Norja, A., Virtanen, H., Pöyri, S., Lehtinen, P., Nurmi, T., Hartwall, P., Reinikainen, P., Siirilä, J., Home, S. (2005) The increase of antioxidativity during mashing-does it improve beer flavour stability, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 30:79.
102. Kaur, C., Kapoor, H. (2001) Antioxidant in fruits and vegetables – the millennium's health, *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
103. Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihjala, K., Kujala, T. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
104. Kellner, V., Čulík, J., Čejka P., Horák, T., Jurková, M., Grynová, L., Jandera, P. (2003) New up-to-date method for the determination of some phenolic compounds, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 29:99.
105. Kellner, V., Mikyška, A., Prokeš, J., Hašková, D., Čejka P., Čulík, J. (2005) The influence of malt polyphenols and individual phenol substances on beer quality and colloidal and sensory stability, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 30:61.
106. Keukeleire, D. (2000) Fundamentals of beer and hop chemistry, *Química Nova*, 23, 108-112.
107. Kim, K.-H., Tsao, R., Jang, R., Cui, S. (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chemistry*, 95, 466-473.
108. Kim, M.-J., Hyun, J.-N., Kim, J.-A., Park, J.-C., Kim, M.-Y., Kim, J.-G., Lee, S.-J., Chun, S.-C., Chung, I.-M. (2007) Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4802-4809.
109. Kirby, W., Williams, P., Wheeler, R., Jones, M. (1977) The importance of polyphenols of barleys and malts in beer sediment and haze formation, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 16:415-427.
110. Krofta, K., Mikyška, A., Haškova, D. (2008) Antioxidant characteristics of hops and hop products, *Journal of the Institute of Brewing*, 114, 160-166.
111. Krygier, K., Sosulski, F., Hogge L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 330-334.

112. Kunze, W. (1998) Technologie Brauer und Mälzer, 8. aufgabe, VLB Berlin, Germany.
113. Kvasnička, F., Čopiková, J., Ševčík, R., Krátká, J., Sytytsia, A., Voldřich, M. (2008) Determination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC, *Central European Journal of Chemistry*, 6, 410-418.
114. Lafay, S., Gli-Izquierdo, A. (2008) Bioavailability of phenolic acids, *Phytochemistry Reviews*, 7, 301-311.
115. Lee, J., Koo, N., Min, D. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
116. Lermusieasu, G., Liégeois, C., Collin, S. (2001) Reducing power of hop cultivars and beer ageing, *Food Chemistry*, 72, 413-418.
117. Liégeois, C., Lermusieasu, G., Collin, S. (2000) Measuring antioxidant efficiency of wort, malt and hops against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of aqueous dispersion of linoleic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1129-1134.
118. Liégeois, C., Chandra, S., Booer, C., Collin, S. (2002) Impact of kilning process on the total antioxidant activity of malt, Proceedings of COST Action 919-Melanoidins in food and health, ed. Fogliano, V. and Henle, T., European Commission, 182-187.
119. Liégeois, C., Meurens, N., Badot, C., Collin, S. (2002a) Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7634-7638.
120. Linko, M., Hajkara, A., Ritala, A., Penttilä M. (1998) Recent advances in the malting and brewing industry, *Journal of Biotechnology*, 65, 85-98.
121. Lu, J., Zhao, H., Chen, J., Fan, W., Dong, J. Kong, W., Sun, J., Cao, Y., Cai, G. (2007) Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity during malting, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10994-11001.
122. Lugasi, A. Hóvári, J. (2003) Antioxidant properties of commercial alcohol and nonalcohol beverage, *Nahrung/Food*, 47, 79-86.
123. Madhujith, T., Shahidi, F. (2006) Optimization of the extraction and antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidative properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8048-8057.
124. Madhujith, T., Izydorczyk, M., Shahidi, F. (2006) Antioxidant properties of pearled barley fractions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3283-3289.
125. Madigan, D., McMurrough, I., Smyth, M. (1994) Rapid determination of 4-vinyl guaiacol and ferulic acid in beers and worts by high-performance liquid chromatography, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 152-155.
126. Maillard, M.-N., Berset, C. (1995) Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1789-1793.
127. Maillard, M.-N., Soum, M.-H., Bolvin, P., Berset, C. (1996) Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content, *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 29, 238-244.
128. Manger, H., Annemüller, G. (2000) Die Geschwindigkeit der Hefevermehrung in der Brauerei, *Brauwelt*, 140, 520-525.

129. Martin, V., Quain D., Smart, K. (1999) The oxidative stress response of ale and lager yeast strains, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 27:679-686.
130. Martin, V., Quain D., Smart, K. (2003) Brewing yeast oxidative stress responses: Impact of brewery handling In *Brewing yeast fermentation performance*, Ed. Smart K., 2<sup>nd</sup> Edition, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
131. Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R. (2006) Phenolic acids in berries, fruits, and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7193-7199.
132. McMurrugh, I., Roche, G., Cleary, K. (1984) Phenolic acids in beers and worts. *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 181-187.
133. McMurrugh, I., Madigan, D., Smyth, M. (1995) Adsorption by polyvinylpolypyrrolidone of catechins and proanthocyanidins from beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2687-2691.
134. McMurrugh, I. (1996) Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1731-1735.
135. McMurrugh, I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A., Hennigan, G., McNulty, N., Smyth, M. (1996) Control of ferulic acid and 4-vinylguaiacol in brewing, *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 327-332.
136. MEBAK–Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (1993) Band II, 3. Auflage, Neubearbeitet und ergänzt, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freising-Weihenstephan.
137. MEBAK–Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (1997) Band I, 3. Auflage, Neubearbeitet und ergänzt, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freising-Weihenstephan.
138. Methner, F.-J., Kunz, T., Schön, T. (2007) Application of optimized methods to determine the endogenous anti-oxidative potential of beer and other beverages, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 31:81.
139. Methner, F.-J., Kunz, T., Kobayashi, N. (2008) Investigation on the behavior of organic radicals in barley and malt during the malting and mashing process by electron-spin-resonance-spectroscopy, (CD-ROM) *Proceedings of World Brewing Congress*, O-12.
140. Mikyška, A., Hašková, D., Hrabák, M., Štrogl, J., Horák, T. (2001) The role of polyphenols and oxidation processes in brewhouse on beer quality, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 28:59.
141. Mikyška, A., Hrabák, M., Hašková, D., Štrogl, J. (2002) The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability, *Journal of the Institute of Brewing*, 108, 78-85.
142. Mikyška, A., Hašková, D., Prokeš, J. (2005) Antiradical properties of malt assessed by EPR methods, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 30:85.
143. Milić B., Đilas, S., Čanadanović-Brunet J., Sakač M. (2000) Biljni polifenoli, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
144. Montanari, L., Perretti G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzi, P. (1999) Organic and phenolic acids in beer, *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 32, 535-539.
145. Mpofo, A., Sapirstein, H., Beta, T. (2006) Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity

- of hard spring wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1265-1270.
146. Namiki, M. (1990) Antioxidants/antimutagens in food, *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 29, 273-300.
147. Nardini, M., Ghiselli, A. (2004) Determination of free and bound phenolic acids in beer, *Food Chemistry*, 54, 137-143.
148. Narziss, L., Sekin, Y. (1974) Über das Verhalten der Katalase während des Mälzungs- und Maischprozesses, *Brauwissenschaft*, 27, 121-129.
149. Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1453-1459.
150. Nordkvist, E., Salomonsson, A., Aman, P. (1984) Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 657-661.
151. Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Quaglia, M., Gregotti, C., Gazzini, G. (2006) Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1209-1216.
152. Papp, A., Winnewisser, W., Geiger, E., Briem, F. (2001) Influence of (+)-catalin and ferulic acid on formation of beer haze and their removal through different polyvinylpyrrolidone-types, *Journal of the Institute of Brewing*, 107, 55-60.
153. Parkes, S., Kiesbye, A. (2006) Brewhouses operations: Ale and Lager Brewing In: *Raw materials and Brewhouse Operations*, Edited by Ockert, K., MBAA Practical Handbook for the Specialty Brewer, Vol. 1, The Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, MN, USA.
154. Pascoe, H., Ames, J., Chandra, S. (2003) Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in ale, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61, 203-209.
155. Pejin, J., Grujić, O., Markov, S., Kocić-Tanackov, S., Tanackov, I., Cvetković, D., Djurendić, M. (2006) Application of GC/MS method using SPE columns for quantitative determination of diacetyl and 2,3-pentanedione during beer fermentation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 52-60.
156. Percival, M. (1998) Antioxidants, *Clinical Nutrition Insights*, 10, 1-4.
157. Pietta, P.-G. (2000) Flavonoids as antioxidant, *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
158. Piletić, M., Milić, B., Đilas, S. (1992) *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad.
159. Pöschl, M., Geiger, E. (2005) Effects of variations in the choice of hop products on the colloidal beer stability, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 30:117.
160. Pöschl, M., Geiger, E. (2007) The effect of using polyphenolic extracts during mashing on the colloidal stability of beer, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 31:8.
161. Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4303.

162. Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. (2006) Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chemistry*, 95, 44-52.
163. Ragaee, S., El-Syed, Abdel-Aal, El-S., Noaman, M. (2006) Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, *Food Chemistry*, 98, 32-38.
164. Rao, M.V.S.S.T.S., Muralikrishna, G. (2002) Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millets, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 889-892.
165. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
166. Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M.-L., Valls-Belles, V., Codoñer, P., Muñiz, P. (2005) Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3637-3642.
167. Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.
168. Robards, K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, 1000, 657-691.
169. Robbins, R. (2003) Phenolic Acids in Food: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
170. Roginsky, V., Lissi, E. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92, 235-254.
171. Sadosky, P., Schwarz, P., Horsley, R. (2002) Effect of arabinoxylans,  $\beta$ -glucans, and dextrans on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60, 4, 153-162.
172. Saitta, M., Lo Curto, S., Salvo, F., Di Bella, G., Dugo, G. (2002) Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils, *Analytica Chimica Acta*, 466, 335-344.
173. Samaras, T., Gordon, M., Ames, J. (2005) Antioxidant properties of malt model systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4983-4945.
174. Samaras, T., Camburn, P., Chandra, S., Gordon, M., Ames, J. (2005a) Antioxidant properties of kilined and roasted malts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8068-8074.
175. Sancho, A., Faulds, C., Bartolomé, B., Williamson, G. (1999) Characterisation of feruloyl esterase activity in barley, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 447-449.
176. Savatović, S. (2006) Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa jabuka, Magistarski rad, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
177. Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *The Journal of Nutrition*, 130, 20735-20855.
178. Schuster, K., Weinfurtner, F., Narziss, L. (1990) Tehnologija proizvodnje slada, Prevod: Die Technologie der Malzbereitung, Prof. dr Slobodan Gaćeša i Prof. dr Olgica Grujić, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd.

179. Schuster, K., Weinfurtner, F., Narziss, L. (1999) Die Bierbrauerei, Band I, Die Technologie der Malzbereitung, Ferdinand Enke Verlag, Germany.
180. Schuster, K., Weinfurtner, F., Narziss, L. (1988) Tehnologija proizvodnje sladovine, Prevod: Die Technologie der Würzebereitung, Prof. dr Slobodan Gaćeša i Prof. dr Olgica Grujić, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.
181. Shahidi, F., Nazck, M. (2004) Cereals, legumes, and nuts In: *Phenolics in food and nutraceuticals*, Ed. CRC Press LLC, USA, 25-26.
182. Sidor, L (2006) Hops and preparation of hops In: *Raw materials and Brewhouse Operations*, Edited by Ockert, K., MBAA Practical Handbook for the Specialty Brewer, Vol. 1, The Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, MN, USA.
183. Siebert, K., Troukhanova, N., Lynn, P. (1996) Nature of polphenol-protein interaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80-85.
184. Siebert, K., Carrasco, A., Lynn, P. (1996a) Formation of protein-polyphenol haze in beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1997-2005.
185. Siebert, K. (1999) Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization and analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353-362.
186. Siebert, K., Lynn, P. (2001) The effect of pH on protein-polyphenol particle size, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, CD-ROM, 28:86.
187. Siebert, K., Lynn, P. (2006) Comparison of methods for measuring polyphenols in beer, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 127-134.
188. Singleton, V., Orthofer, R, Lamuela-Raventos, R. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology, Oxidant and Antioxidant (Part A)*. L. Packer, ed. Academic Press, San Diego. 29, 152-178.
189. Sorvano, S., Buiatti, S., Anese, M. (2006) Influence of malt browning degree on lipoxygenase activity, *Food Chemistry*, 99, 711-717.
190. Stephen, D., Jamieson D. (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207-212.
191. Stephenson, W., Baiwa, J., Miracle, R., Bamforth, C. (2003) Laboratory-scale studies of the impact of oxygen on mashing, *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 273-283.
192. Strogl, J., Kosar, K., Mikyška, A., Bousova, P. (1997) Changes occurring in polyphenol substances content during wort production, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 26:275-282.
193. Surai, P. (2002) Antioxidant protection in the intestine: a good beginning is half the battle, *Proceedings of Alltech's Eighteenth Annual Symposium*, Nottingham University Press, Nottingham, UK, 301-321.
194. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J. (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured in various tests, *Food Chemistry*, 113, 1226-1233.

195. Takaoka, S., Kondo, H., Uchida, M., Kawasaki, Y. (1998) Improvement of beer flavor stability by applying ESR method to industrial plant, *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 35, 157-161.
196. The Merck Index (1996) An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, Twelfth Edition, Ed. Budavari S., Merck Research Laboratories Division of Merck&CO., Inc., Whitehouse Station, NJ.
197. Thurston, P., Tubb, R. (1981) Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavors: a simple method for determining phenols in wort and beer, *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 177-179.
198. Ting, P., Lusk, L., Refling, J., Kay, S., Ryder, D. (2008) Identification of antiradical hop compounds, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66, 116-126.
199. Tubaro, F., Fontana, M., Biuatti, S. (2007) Evaluation of the influence of steeping conditions on the antioxidant activity from barley to malt, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 31:11.
200. Uchida, M., Ono, M. (1996) Improvement of oxidative flavor stability of beer-role of OH-radical in beer oxidation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54, 198-204.
201. Uchida, M., Ono, M. (1999) Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57, 145-150.
202. Uchida, M., Ono, M. (2000) Technological approach to improve beer flavor stability: analysis of the effect of brewing processes on beer flavor stability by electron spin resonance method, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58, 8-13.
203. Uchida, M., Ono, M. (2000a) Technological approach to improve beer flavor stability: adjustments of wort aeration in modern fermentation systems using the electron spin method, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58, 30-37.
204. Vaja, J., Aviram, M. (2001) Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications, *Current Medicinal Chemistry – Immunology, Endocrine and Metabolic Agents*, 1, 99-107.
205. Valenzuela, A. (2002) Natural antioxidants: from food safety to health benefits, Proceedings of Alltech's Eighteenth Annual Symposium, Nottingham University Press, Nottingham, UK, 323-332.
206. Vanbeneden, N., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2006) Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 1136, 237-242.
207. Vanbeneden, N., Gills, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2007) Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during wort production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 11002-11010.
208. Vanbeneden, N., Gills, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2008) Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts, *Food Chemistry*, 107, 221-230.



209. Vanbeneden, N., Gils, F., T., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2008a) Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts, *Food Chemistry*, 107, 221-230.
210. Vanbeneden, N., Van Roy, T., Willems, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2008b) Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing, *Food Chemistry*, 111, 83-91.
211. Vanbeneden, N., Saison, D., Delvaux, F., Delvaux, F.R. (2008c) Decrease of 4-vinylguaiacol during beer aging and formation of apocinol and vanillin in beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11983-11988.
212. Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2006) The chemistry of beer aging - a critical review, *Food Chemistry*, 95, 357-381.
213. Varmuza, K., Steiner, I., Glinsner, T., Klein, H. (2002) Chemometric evaluation of concentration profiles from compounds relevant in beer ageing, *European Food Research and Technology*, 215, 235-239.
214. Verardo, V., Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M.-F. (2008) Distribution of bound hydroxycinnamic acids and their glycosyl esters in barley (*Hordeum vulgare* L.) Air classified flour: Comparative study between reversed phase-high performance chromatography-mass spectrometry (RP-HPLC/MS) and spectrophotometric analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11900-11905.
215. Villarreal, R., Sierra, J., Cárdenas, L. (1986) A rapid and sensitive method for the determination of 4-vinyl guaiacol in beer by electron-capture gas-liquid chromatography, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 44, 114-117.
216. Vrbaški, Lj., Markov, S. (1992) Praktikum iz mikrobiologije, Izdavač "Prometj", Novi Sad.
217. Vrbaški, Lj., Markov, S., Jokić, Lj. (1992) Ispitivanje pivskih kvasaca. V. Prilog poznavanju nekih tehnoloških parametara dobijenih u laboratorijskim uslovima sa kvascima iz tekuće proizvodnje, Zbornik radova, Br. 23, Tehnološki fakultet Novi Sad, 65-71.
218. Von Narzib, L., Reincheneder, E., Weihenstephan, R. (1979) Über der Einfluss der Abläuter-bedingungen auf den Polyphenol Gehalt der Würzen und Biere, *Brauwelt*, 119, 1009-1014.
219. Vukadinović, S. (1986) Elementi teorije verovatnoće i matamatičke statistike, Privredni pregled, Beograd.
220. Wackerbauer, K., Anger, H. (1984) Bierstabilisierung unter besonderer Berücksichtigung der Polyphenole, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 4, 153-161.
221. Wackerbauer, K., Hardt, R. (1997) Radical reactions and flavour stability of beer, *Brauwelt International*, IV, 320-327.
222. Waksmondzka-Hajons, M. (1998) Chromatographic separation of aromatic carboxylic acids, *Journal of Chromatography B*, 717, 93-118.
223. Walker, G. (1998) Yeast physiology and biotechnology, John Wiley and sons, Chichester, England.
224. Walker, C., Bolshaw L., Chandra, S. (2001) Healthy drinks?- beer and cider antioxidants, (CD-ROM) *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 28:8.

225. Walters, M., Heasman, A., Hughes, P. (1997) Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 1: Forced ageing, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55, 83-89.
226. Winter, M., Herrmann, K. (1986) Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 616-620.
227. Whittle, N., Eldrige, H., Bartley, J. (1999) Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection, *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 89-99.
228. Woffenden, H., Ames, J., Chandra, S., Anese, M., Nicoli, M. (2002) Effect of kilning on the antioxidant and pro-oxidant activities of pale malts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4925-4933.
229. Wong, S., Leong, L., Koh, J. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants, *Food Chemistry*, 99, 775-783.
230. Woffenden, H., Ames, J., Chandra, S., Anese, M., Nicoli, C. (2002) Antioxidant activity during beer production, Proceedings of COST Action 919-Melanoidins in food and health, ed. Fogliano, V. And Henle, T., European Commission, 100-106.
231. Wu, H., Haig, T., Prately, J., Lemerle, D. An, M. (1999) Simultaneous determination of phenolic acids and 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in wheat (*Triticum aestivum* L.) by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 864, 315-321.
232. Wu, H., Haig, T., Prately, J., Lemerle, D. An, M. (2000) Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in root tissues, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5321-5325.
233. Wu, D., Cederbaum, A. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Research Health*, 27, 277-284.
234. Yu, J., Thava, V., Temelli, F. (2001) Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4352-4358.
235. Yu, L., Haley, S., Parret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) Free radical scavenging properties of wheat extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1619-1624.
236. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Lin, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G. (2006) Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7277-7286.
237. Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W. (2008) Evolution of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties, *Food Chemistry*, 107, 296-304.
238. Zhou, K., Yu, L. (2004) Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation, *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 37, 717-721.
239. Zhou, K., Yin, J.-J., Yu, L. (2006) ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals, *Food Chemistry*, 95, 446-457.

240. Zuo, Y., Wang, C., Zhan, J. (2002) Separation, characterization, and quantation of benzoic and phenolic antioxidants in american cranberry fruit by GC-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3789-3794.
241. Zupfer, J., Churchill, K., Rasmusson, D., Fulcher, R. (1998) Variation in ferulic concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1350-1354.