

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Миле С. Вељовић

**Хемијска, функционална и сензорна  
својства пива обогаћеног биолошки  
активним састојцима грозђа**

Докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Mile S. Veljović

**Chemical, functional and sensory  
properties of beer enriched with  
biologically active compounds of grape**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Ментор:**

**др Ида Лескошек-Чукаловић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**Чланови комисије:**

**др Виктор Недовић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**др Предраг Вукосављевић, ванредни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**др Малиша Антић, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**др Александар Петровић, доцент**  
Универзитет у Београду  
Пољопривредни факултет

**др Љиљана Гојковић-Букарица, редовни професор**  
Универзитет у Београду  
Медицински факултет

**Датум одбране :**

*Дисертацију посвећујем Јани,  
татином сунцу*

## **ЗАХВАЛНИЦА**

*Најискреније се захваљујем свима који су дали свој допринос и на било који начин помогли у изради ове докторске дисертације.*

*Посебно се захваљујем свом ментору др Иди Лескошек-Чукаловић, на несебичној подршци и значајном доприносу у реализацији и писању ове дисертације.*

*Велику захвалност дугујем Снежани Бабарогић, која ми је пружила неизмерну помоћ у извођењу експерименталног дела доктората.*

*Захваљујем се др Љиљани Гојковић-Букарица и њеној сарадници Милени на срдачном гостопримству на Медицинском факултету, огромној помоћи, издвојеном времену и корисним саветима.*

*Захваљујем се и осталим члановима комисије на свесрдној сарадњи и стручној помоћи.*

*Захваљујем се и свим колегама и пријатељима који су ме подржавали на овом дугом путу кроз докторске студије.*

*Највећу захвалност дугујем мојој породици која ми је пружала безрезервну подршку и љубав свих ових предугих година.*

# Хемијска, функционална и сензорна својства пива обогаћеног биолошки активним састојцима грозђа

## РЕЗИМЕ

Многе студије су се бавиле истраживањем утицаја алкохолних пића на здравље људи, а као општи закључак може се констатовати да умерено конзумирање алкохолних пића (пива, вина и јаких алкохолних пића) може имати протективно деловање на појаву кардиоваскуларних болести, као најчешћих узрочника смртности савременог човека. Крајем XX века почела су систематска истраживања здравствено промотивног ефекта конзумирања вина, а резултати су показали да његова позитивна активност у великој мери зависи од садржаја и усвојивости полифенолних једињења. Истраживања која укључују преко 3700 публикованих радова показују да је и пиво исто тако значајан извор фенолних и других биоактивних једињења са профилактичким деловањем и позитивним ефектом на здравље. Полифенолна једињења пива и вина се и квантитативно и квалитативно разликују, при чему црвена вина садрже далеко већу концентрацију ових једињења у поређењу са пивом.

Основни циљ истраживања ове дисертације је било испитивање могућности удруживања позитивних ефеката ова два пића кроз допринос развоју и оптимизацији технолошког процеса производње специјалног типа пива од сладовине и кљука грозђа. Главна претпоставка је била да ће добијени производи имати већу биолошку вредност и повећану функционалност у односу на комерцијална лагер пива, али и допадљиве сензорне карактеристике и прихватљиву цену на тржишту.

У експерименталној производњи специјалних типова пива са грозђем коришћене су три сорте грозђа: прокупац, *cabernet sauvignon* и *pinot noir*. Испитивани су следећи параметри производње: оптимални удео грозђа у медијуму за ферментацију, могућност употребе различитих врста квасца у производњи, динамика ферментације, утицај аутохотне микрофлоре грозђа на квалитет производа и динамика екстракције фенолних једињења. Произведено је 12 различитих узорака пива са додатком грозђа (четири пива од сваке сорте

грожђа) и два контролна пива без додатка грожђа. Такође, од сваке сорте грожђа произведено је вино по поступку за производњу црвених вина. Добијени производи су физичко-хемијски, хемијски и сензорно окарактерисани. Потенцијална функционалност добијених пива анализирана је на бази њиховог утицаја на кардиоваскуларни систем пацова, а техноекономска анализа је имала за циљ да утврди њихову конкурентност на тржишту.

Резултати испитивања су показали да је због веће концентрације простих шећера, брзина ферментације пива са додатком грожђа већа у поређењу са контролним пивима. Сва пива произведена са додатком грожђа имала су већи садржај алкохола (5,72-7,33 % v/v) у поређењу са контролним узорцима (3,65-4,91 % v/v). рН вредности пива са грожђем су биле у опсегу 3,65-4,35, што је у интервалу између уобичајених рН вредности за вина и пива. Већа киселост пива са грожђем није утицала негативно на њихов сензорни квалитет, и представља карактеристично својство овог типа пива.

Пива са грожђем имала су већу концентрацију фенолних једињења у поређењу са контролним пивима, а најбогатије овим једињењима било је пиво са *cabernet sauvignon*-ом, *CS30v* (754,40 mg/L). Изражено у процентима, повећање садржаја фенолних једињења код пива са грожђем у односу на контролна пива се кретало у опсегу од 37 до 636 % према ЕВС методи, односно од 9,7 до 77,4 % према *Folin-Ciocalteu* методи. Код пива са прокупцем и *pinot noir*-ом, максимална концентрација фенолних једињења је постигана након 60-70 часова, док је код пива са *cabernet sauvignon*-ом максимум постиган након 50-60 часова. Од анализираних фенолних једињења у пивима са грожђем, ванилинска киселина је била у највећој концентрацији (1,69-4,73 mg/l), након које су следиле сиригинска киселина и катехин.

Пива са грожђем су имала антиоксидативни капацитет у следећем распону: 0,86-2,33 mM ТЕ (DPPH), 2,07-4,73 mM ТЕ (FRAP) и 4,18-8,68 mM ТЕ (TEAC). То су вредности које су веће у поређењу са светлим пивима и белим винима, и реда величине карактеристичним за тамна пива и розе вина.

У пивима са грожђем, најзаступљенији естри били су етил ацетат (11,26-44,09 mg/l) и изоамил ацетат (2,47-3,59 mg/l). Концентрација диацетила у њима је била изразито висока (28,17-1226,41 µg/l), а разлог за ову појаву је активност

еписитне микрорлоре грорђја. Међутим, овако висок садржај диацетила није негативно утицао на сензорне карактеристике ових пива, вероватно због специфичног и сложеног ароматског комплекса, који се умногоме разликовао од типичних лагер пива. Може се закључити да је повишена концентрација диацетила одлика ових пива.

Сензорна анализа је показала да су код већине учесника панела, пива са грорђјем имала боље сензорне оцене од контролних пива. Међутим, није постојала статистички значајна разлика између узорака, што указује на то да су и контролна пива и пива са грорђјем имала сличну сензорну прихватљивост од стране потрошача.

Фармаколошка *in vivo* испитивања су показала да пива обобаћена грорђјем имају различито деловање на кардиоваскуларни систем у поређењу са светлим лагер пивом типа пилснер. Наиме, контролно пиво после 40 минута деловања значајно је утицало на пад крвног притиска, док пиво са грорђјем није значајно утицало на промену овог параметра. Овакав резултат указује на чињеницу да биоактивна једињења из грорђја највероватније делују антагонистички са биоактивним једињењима пива, па долази до међусобног поништавања њиховог утицаја на кардиоваскуларни систем. Ово испитивање је показало да се, за разлику од контролног пива, конзумацијом оваквог специјалног типа пива са грорђјем не ремети нормалан рад срца.

У поређењу са стандардним пивима овог типа, трошкови сировина за производњу пива са грорђјем су значајно већи. Без обзира на то, малопродајна цена боце пива са грорђјем од 0,5 литара не би требало да пређе 1 €, што је конкурентна цена с обзиром да се ради о специјалној врсти пива са специфичним сензорним и функционалним карактеристикама.

**Кључне речи:** пиво са грорђјем, прокупац, *cabernet sauvignon*, *pinot noir*, ферментација, полифеноли, антиоксидативни капацитет, сензорна анализа

**Научна област:** Биотехнологија

**Ужа научна област:** Технологија конзервисања и врења

**УДК:** 663.41(043.3)



# **Chemical, functional and sensory properties of beer enriched with biologically active compounds of grape**

## **ABSTRACT**

Many studies have dealt with the investigation of the impact of alcoholic beverages on human health, and a general conclusion is that moderate consumption of alcoholic beverages (beer, wine and spirits) may have a protective effects on the occurrence of cardiovascular disease, the most common causes of death in modern society. At the end of the XX century, systematic investigations of health promotion effects of wine were began. The obtained results showed that positive activity of wine directly depends on the content and bioavailability of phenolic compounds. Researches, involving more than 3,700 published papers, indicate that beer is also a significant source of phenolic and other bioactive compounds with prophylactic action and positive effects on human health. The phenolic compounds in beer and wine are quantitatively and qualitatively different, but red wines contain a much higher concentration of these compounds compared with beer.

The main objective of this dissertation was to investigate the possibility of unite of positive effects of these two beverages through the contribution to the development and optimization of technological production process of special type of beer from wort and grape mash. The basic hypotesis was that the resulting grape beers will have higher biological value and increased functionality compared to commercial lager beer, but also pleasant sensory characteristics and an acceptable price in the market.

In the experimental production of special grape beers three grape varieties were used: prokupac, *cabernet sauvignon* and *pinot noir*. The following parameters of production were examined: the optimal proportion of grapes in the fermentation medium, the possibility of using different yeast strains in the production, dynamic of fermentations, the impact of autochthonous grape microflora on the products quality, and dynamics of phenolic compounds extraction. Twelve different grape beers (four beers from each grape variety) and two control beers without the addition of grape were produced. Also, wines from each grape variety were produced according to the procedure for the production of red wines. The obtained products were

physicochemical, chemical and sensory characterized. The potential functionality of obtained beers was examined on the basis of their impact on the cardiovascular system of rats. The production costs of grape beer were calculated, in order to examine its competitiveness in the market.

Due to the higher concentration of simple sugars in grapes, the fermentation rate of grape beers was higher compared to the control beers. All grape beer samples had higher content of alcohol (5.72 to 7.33 % v/v) in comparison with control samples (3.65 to 4.91 % v/v). pH values of grape beers were in the range of 3.65 to 4.35, which is in the range between characteristic pH values for the wines and beers. Higher acidity of grape beers did not affect negatively on their sensory quality, and represents feature of this type of beer.

The grape beers had higher concentration of phenolic compounds compared with control beers. The highest concentration of phenolics had a beer with cabernet sauvignon grape, CS30v (754.40 mg/L). Expressed in percentages, the increase in the content of phenolic compounds in grape beers compared to control beers was ranged from 37 to 636 % by EBC method, or 9.7 to 77.4 % by the Folin-Ciocalteu method. In grape beers with prokupac and *pinot noir*, a maximum concentration of phenolic compounds was achieved after 60-70 hours, while in the beer with *cabernet sauvignon* a maximum was reached after 50-60 hours. Out of the analyzed phenolic compounds in grape beers, vanillic acid had the highest concentration (1.69 to 4.73 mg/L), after which followed syringic acid and catechin.

Grape beers had the antioxidant capacity in the following range: 0.86 to 2.33 mM TE (DPPH). 2.07 to 4.73 mM TE (FRAP) and 4.18 to 8.68 mM TE (TEAC). Antioxidant capacity of grape beers was higher compared with lager beers and white wines, while it was in the range with dark beers and rose wines.

In the grape beers, the most abundant esters were ethyl acetate (11.26 to 44.09 mg/L) and isoamyl acetate (2.47 to 3.59 mg/L). The concentration of diacetyl in grape beers was very high (28.17 to 1226.41 mg/L), and the reason for that is the activity of epiphytic microflora originated from grapes. However, such a high content of diacetyl did not adversely affect the sensory characteristics of these beers, probably due to their specific and complex aromatic profile, which is very much different compared with

typical lager beer. It can be concluded that the high concentration of diacetyl is specific characteristic of these grape beers.

Sensory analysis showed that the grape beers had a better sensory marks than control beers. However, there was no statistically significant difference between samples, which indicates that the grape beers had the similar sensory acceptability for consumers as a control beers.

Pharmacological *in vivo* studies indicate that grape beers have different action on cardiovascular system compared with lager beer (pilsner type). In fact, the control beer after 40 minutes of ingestion significantly influenced decrease in blood pressure, while grape beers did not significantly affect the change in this parameter. Such result indicates that bioactive compounds from grapes probably act antagonistically with bioactive compounds from beer, which leads to a mutual cancellation of their impact on the cardiovascular system. This investigation showed that, in contrast to the control beer, the consumption of this special type of beer with grapes does not disturb the normal functioning of the heart.

Compared with lager beer, costs of raw materials for the grape beer production are significantly higher. However, the retail price of grape beer bottle of 0.5 L should not exceed 1 €, which is a competitive price considering that it is a special type of beer with a specific sensory and functional characteristics.

**Key words:** grape beer, prokupac, *cabernet sauvignon*, *pinot noir*, fermentation, polyphenols, antioxidant capacity, sensory analysis.

**Academic Expertise:** Biotechnology

**Field of Academic Expertise:** Preservation and fermentaion technology

**UDK:** 663.41(043.3)

# САДРЖАЈ

	Стр.
1. УВОД .....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО.....	4
2.1 Производња пива.....	4
2.2 Пива са грожђем .....	9
2.2.1 <i>Dogfish Head Craft Brewery</i> .....	11
2.2.2 <i>Cantillon Brewery</i> .....	13
2.2.3 <i>Allagash Brewing Company</i> .....	14
2.2.4 <i>Blue Moon Brewing Company</i> .....	16
2.2.5 Остали произвођачи пива са грожђем .....	17
2.3 Прооксиданти и антиоксиданти .....	20
2.3.1 Оксидативни стрес .....	22
2.3.2 Системи антиоксидативне заштите .....	28
2.3.2.1 Ензимски систем антиоксидативне заштите .....	29
2.3.2.2 Неензимски систем антиоксидативне заштите .....	33
2.4 Фенолна једињења .....	40
2.4.1 Биосинтеза фенолних једињења .....	41
2.4.2 Класификација и карактеристике фенолних једињења .....	43
2.4.2.1 Флавоноиди .....	44
2.4.2.2 Нефлавоноиди .....	54
2.4.3 Биолошки значај фенолних једињења .....	57
2.4.3.1 Механизми биолошке активности фенолних једињења ...	57
2.4.3.2 Фенолна једињења и превенција болести .....	62
2.5 Грожђе .....	67
2.5.1 Прокупац .....	67
2.5.2 <i>Pinot noir</i> .....	69
2.5.3 <i>Cabernet sauvignon</i> .....	70
3. НАУЧНИ ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....	72
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ РАДА .....	73
4.1 Материјали .....	73
4.1.1 Хемикалије .....	73
4.1.2 Сировине за производњу пива .....	74

4.2 Методе рада .....	74
4.2.1 Анализа сладовине, грозђа и медијума за ферментацију .....	74
4.2.2 Производња пива .....	74
4.2.2.1 Производња пива са претходном стерилизацијом кљука грозђа .....	76
4.2.3 Одређивање концентрације ћелија квасца .....	77
4.2.4 Одређивање физичко-хемијских параметара пива .....	77
4.2.5 Одређивање садржаја укупних фенолних једињења .....	78
4.2.5.1 Одређивање укупних полифенолних једињења спектрофотометријском методом по Analytica-EBC .....	78
4.2.5.2 Одређивање укупних фенолних једињења методом по Folin-Ciocalteu-у .....	79
4.2.6 Одређивање антиоксидативног капацитета .....	81
4.2.6.1 DPPH метода .....	81
4.2.6.2 FRAP метода .....	83
4.2.6.3 TEAC метода .....	84
4.2.7 Одређивање садржаја флавоноида .....	86
4.2.7.1 Одређивање флавоноида методом по Analytica-EBC .....	86
4.2.7.2 Одређивање флавоноида методом са AlCl <sub>3</sub> .....	87
4.2.8 Одређивање садржаја укупних мономерних антоцијана .....	88
4.2.9 Одређивање садржаја фенолних једињења HPLC методом .....	89
4.2.10 Одређивање садржаја испарљивих једињења гасном хроматографијом .....	90
4.2.11 Сензорна анализа .....	92
4.2.11.1 Метод рангирања .....	92
4.2.11.2 Хедонска скала .....	93
4.2.12 Фармаколошко <i>in vivo</i> испитивање .....	94
4.2.13 Статистичка обрада података .....	95
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	96
5.1 Анализа сладовине, грозђа и медијума за ферментацију .....	97
5.2 Динамика ферментација .....	99
5.3 Концентрација ћелија квасца током ферментације .....	105
5.4 Физичко-хемијске карактеристике пива .....	109
5.5 Садржај укупних фенолних једињења .....	118
5.6 Антиоксидативни капацитет .....	128
5.7 Укупан садржај флавоноида .....	134

5.8 Садржај укупних мономерних антоцијана .....	138
5.9 Појединачна фенолна једињења одређена HPLC методом .....	141
5.10 Испарљива једињења одређена гасном хроматографијом .....	148
5.11 Сензорна анализа .....	155
5.12 Резултати фармаколошког <i>in vivo</i> испитивања .....	158
5.13 Трошкови производње .....	161
6. ЗАКЉУЧАК .....	163
ЛИТЕРАТУРА .....	171

## 1. УВОД

Пиво представља сложен колоидни систем састављен од органских и неорганских једињења у воденом раствору са ниском концентрацијом алкохола. Традиционално се производи процесом алкохолног врења из слада, несладованих житарица, хмеља и воде уз помоћ одабраних сојева чисте културе пивског квасца. То је природан производ који садржи бројне биотике и има дефинисано функционално деловање. На тржишту се данас налази велики број различитих типова пива и производа на бази пива, специфичних сензорних својстава, хемијског састава и садржаја алкохола. Њихова заступљеност и регионална позиционираност условљена је традицијом и навикама потрошача, али и све присутнијом орјентацијом и потрошача и произвођача ка "безбедним" производима познате биолошке вредности.

Многе студије бавиле су се истраживањем утицаја алкохолних пића на здравље људи и на ризик од појаве појединих обољења. О позитивном деловању алкохола на кардиоваскуларни систем говори се још од 18. века, али су тек пре двадесетак година почела интензивна проучавања његовог утицаја на здравље. Највећи број студија констатовао је да се у случају умереног конзумирања алкохолних пића (пива, вина и јаких алкохолних пића) може говорити о њиховом протективном деловању на појаву кардиоваскуларних болести, као најчешћих узрочника смртности савременог човека (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2000; Hines и Rimm, 2001). Прва систематска истраживања здравствено промотивног ефекта конзумирања вина спроведена су 1989. године у оквиру *MONICA* пројекта, светског мониторинг система за кардиоваскуларне болести организованог од стране Светске здравствене организације. Резултати истраживања су показали да умерено конзумирање вина смањује ризик од појаве кардиоваскуларних обољења (WHO, 1989). Након ових резултата, интензивирани су истраживања и публикован је велики број радова на тему утицаја вина на здравствено стање људи. Општи закључак већине студија је да његова позитивна активност директно зависи од садржаја и усвојивости полифенолних једињења (Scalbert et al., 2005).

Истраживања која укључују преко 3700 публикованих радова показују да и пиво исто тако садржи одређена једињења са профилактичким деловањем и позитивним ефектом на здравље, и да у умереним количинама такође може бити препоручено као део здраве дијете (Kondo, 2004; Gerhauser, 2005; Iacomino et al., 2009, Leskošek-Čukalović, 2015). Састојци пива највише одговорни за његово функционално деловање су витамини, микро и макро елементи, растворљива влакна и полифенолни антиоксиданти (Bamfort, 2002). У односу на вино, пиво садржи веће количине протеина, витамина, растворљивих дијеталних влакана и минералних материја (Romeo et al., 2006; Diaz-Rubio и Saura-Calixto, 2006). Укупан садржај антиоксиданаса у пиву зависи од типа пива, употребљених сировина и технолошког поступка производње, и обично је за око два или више пута мањи у односу на црвена вина (Suter, 2001). Међутим, полифенолна једињења пива и вина се не само квантитативно, него и квалитативно разликују. У односу на пиво, црвена вина садрже далеко веће концентрације деривата бензоеве киселине, катехина и епикатехина, проантоцијанидина и стилбена, од којих сви показују хемопревентивну активност (Iacomino et al., 2009). Бројна истраживања указују и на потенцијално антиканцерогено деловање проантоцијанидина из семенке грожђа, флаван-3-ола и ресвератрола, чији је природни извор црвено вино (Ulrich et al., 2005). Са друге стране, међу полифенолним једињењима пива која највећим делом потичу из слада (70-80 %), док је 20-30 % пореклом из хмеља (Callemien et al., 2005), најзаступљенији су једноставни феноли, деривати бензоеве и циметне киселине, кумарини, катехини, олигомерни проантоцијанидини, прениловани халкони, флавоноиди (флаванони, флаволи, флавоноли), алфа- и изо-алфа киселине (Gerhauser et al., 2002). Полифеноли присутни у пиву су због своје хемијске природе и мање молекулске масе далеко биодоступнији у односу на оне пореклом из вина (Ghiselli et al., 2000). Једињења пореклом из хмеља, као што су пренилфлавоноиди (укључујући ксантохумол, изоксантохумол и горке хмељне киселине) показују мерљиве биоактивне ефекте, а такође и потенцијалну антиканцерогену активност (Stevens и Page, 2004).

Из свега наведеног може се закључити да су и пиво и вино извори значајних биоактивних једињења која позитивно утичу на здравље човека и да у умереним дозама имају кардиопротективни ефекат. Ова дисертација представља



покушај удруживања позитивних ефеката ова два пића кроз допринос развоју и оптимизацији технолошког процеса производње специјалног типа пива од сладовине и кљука грозђа и физичкохемијској, хемијској, сензорној и функционалној карактеризацији нових производа.

У теоријском делу дисертације дат је кратак опис технолошког процеса производње пива, приказан је историјат производње пива од сладовине и грозђа, као и преглед производа овог типа који се могу наћи на тржишту, дат је механизам деловања антиоксиданаса и њихов значај за очување здравља, описана је подела, основне карактеристике и значај фенолних једињења, приказани су здравствени аспекти конзумирања хране и пића богатих фенолним једињењима, и описане су сорте грозђа прокупац, *cabernet sauvignon* и *pinot noir* које су коришћене у експерименталном делу дисертације,.

У експерименталном делу дисертације најпре је приказан поступак производње специјалног типа пива од сладовине и кљука грозђа и дат преглед добијених узорака, описане су физичко-хемијске карактеристике коришћене сладовине, грозђа и медијума за ферментацију добијеног њиховим међусобним мешањем. Детаљно је анализиран утицај сорте грозђа, удела грозђа и врсте квасца на динамику ферментација и на промену концентрације ћелија квасца током главног врења. Приказани су резултати физичко-хемијских анализа добијених узорака пива, као и садржај укупних фенолних једињења, флавоноида и антоцијана. Посебна пажња обрађена је на динамику екстракције фенолних једињења током ферментације у циљу одређивања оптималног момента за одвајање чврстих делова кљука грозђа од течног дела медијума за ферментацију. Дати су резултати одређивања антиоксидативног капацитета узорака и преглед појединачних фенолних једињења одређен течном хроматографијом. Анализирана су испарљива ароматска једињења која имају значајан утицај на сензорне карактеристике пива, а приказани су и резултати сензорне анализе добијених пива. У последњем делу вршена су и *in vivo* фармаколошка истраживања у којима је испитиван утицај акутног дејства одабраних произведених узорака пива на крвни притисак и срчану фреквенцу експерименталних пацова. Извршен је и прорачун трошкова производње пива са грозђем и поређење са трошковима производње стандардног лагер типа пива.

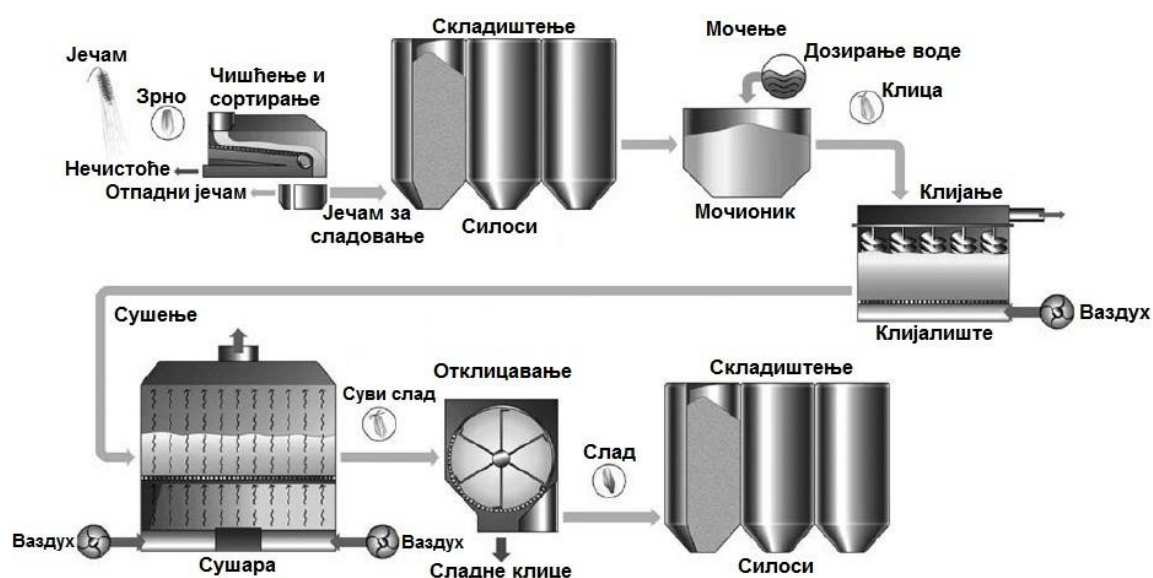
## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

### 2.1 ПРОИЗВОДЊА ПИВА

Пиво је ферментисано благо алкохолно пиће које се производи од јечменог слада, воде, хмеља и пивског квасца. У Немачкој, према „Закону о чистоћи производње“ (*Reinheitsgebot*) усвојеном у Баварској 1516. године, пиво је дозвољено производити само од наведене четири сировине. Међутим, у остатку света где се овај закон не примењује дозвољена је замена дела слада јефтинијим сировинама (сурогатима) као што су несладоване житарице (кукуруз, јечам, пшеница, пиринач...) или њихове прерађевине, али и шећерни и скробни сирупи и други извори ферментабилних шећера, чиме се произвођачима пива даје много већа флексибилност у раду. Такође, дозвољена је употреба и других сировина, које могу бити извор шећера или ароме (или и једно и друго), па је на тај начин омогућено стварање великог броја специјалних врста пива и производа на бази пива, као што су: воћна ламбик пива, *ale* и лагер воћна пива, пива са медом, пива са грожђем, пива са клеком, пива са ђумбиром, пива са лековитим биљем, медицинским гљивама итд. Генерално, процес добијања пива се може поделити на два дела: производња слада и производња пива.

Производња слада (сладовање) подразумева клијање јечма у контролисаним условима са циљем синтезе довољне количине ензима унутар зрна и одигравања дефинисаних физичких и хемијских трансформација зрна прилагођених типу пива које се производи (слика 1). Процес сладовања се условно може поделити на следеће технолошке фазе: мочење, клијање, сушење зеленог слада и дорада и складиштење слада. Основни циљ мочења је да се зрну јечма обезбеди оптимална количина влаге, кисеоника и топлоте како би се омогућило активирање клице и отпочињање клијања. Мочење се обавља водом температуре 10-18°C док се садржај влаге зрна не подигне до 42-46 %, а сам процес траје око 40-48 сати (Leskošek-Čukalović, 2002). Током ове фазе врши се интензивна аерација јечма како би се за потребе дисања зрна обезбедила довољна количина кисеоника. Када се на врху зрна појави први бели траг клице корена, јечам се пребацује у клијалиште где се одвија наредна фаза клијања. Клијање је најважнија фаза сладовања у којој долази до активације постојећих и синтезе

нових ензима и током које се врши ограничена разградња зрна. Од многих ензима који су заступљени у јечму и сладу најзначајнији су: амилолитички ензими ( $\alpha$  и  $\beta$ -амилаза), цитолитички ензими ( $\beta$ -глюканаза, цитаза), протеолитички ензими (протеазе) и ензими за разградњу естара фосфорне киселине (фосфатазе) (Kunze, 2004). Производ добијен након клијања назива се *зелени слад*. Сушење је завршна фаза сладовања у којој се садржај влаге зрна смањује на 3-5 %, чиме се прекида раст клице и зауставља даља модификација зрна. Након сушења уклањају се коренчићи (отклицавање) који сушењем постају крти и лако се одвајају. Охлађен откликан слад се складишти у силосима, где се уз одговарајуће услове може чувати једну до две године.



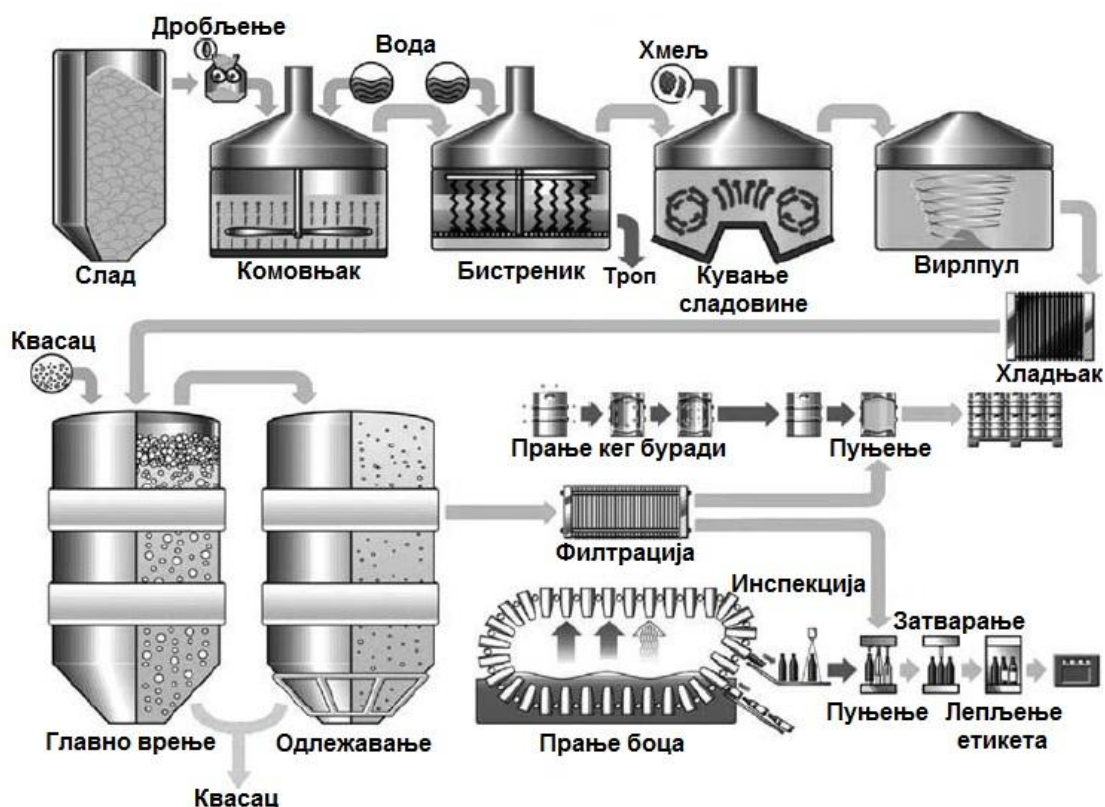
Слика 1. Шематски приказ процеса сладовања (Wunderlich и Back, 2009)

Производња пива обухвата следеће технолошке процесе (слика 2):

1) *Дробљење*. Слад и несладоване житарице се уситњавају како би се остварила могућност за деловање ензима слада на макромолекуларне састојке слада. Приликом дробљења мора се водити рачуна да се сачува плевица, јер је она неопходна као филтрациони материјал током цеђења комине.

2) *Комљење*. Процес у коме се врши контролисана ензимска разградња нерастворних компонената сировина (пре свега скроба и протеина), при чему се добија ошећерена комина која садржи водени раствор екстрахованих састојака и неразграђене делове зрна. Сви састојци који пређу у раствор називају се екстрактом. Само комљење се састоји у мешању прекрупне и воде одговарајуће

температуре (укомљавање), након чега се температура комине сукцесивно повишава уз прављење температурних пауза на температурама оптималним за активност појединих ензима. Температурне паузе су: 50°C – пауза за разградњу протеина, 62-65°C – пауза за настајање малтозе, 70-75°C – пауза за ошећерење и 78° - температура завршетка комљења. Према начину повишавања температуре разликују се две групе поступака комљења: инфузиони поступци и декокциони поступци. Приликом рада по инфузионом поступку читаву комину се уз држање одговарајућих температурних пауза загрева до температуре завршетка комљења. У случају декокције температура комине се повишава тако што се један део комине одваја (одварак) од главне комине и загрева до температуре изнад температуре желирања датог скроба. Враћањем одварка након кувања у остатак комине повишава се температура целокупне масе комине до температуре наредне паузе (Kunze, 2004).



Слика 2. Шематски приказ производње пива (Wunderlich и Back, 2009)

3) *Цеђење комине.* Основни задатак цеђења комине је одвајање воденог раствора екстрактивних састојака (сладовине) од нерастворног остатка (тропа).

Приликом цеђења троп има улогу филтрационог материјала, а сам процес се одвија у две фазе: цеђење првенца (главни налив) и испирање тропа (наливи). Сладовина која се цеди из тропа је првенац. Међутим, након што се оцеди првенац, у тропу још увек заостаје велика количина екстракта. Да би се екстракт што потпуније излужио, троп се испира врућом водом (наливи), чиме се повећава степен искоришћења.

4) *Кување сладовине*. Ово је фаза у којој се врши додавање хмеља (хмелјење) у сладовину и у којој се одиграва читав низ промена: растварање и трансформација састојака хмеља при чему настају карактеристична горка једињења (изо- $\alpha$ -киселине), отпаривање вишка воде и нормирање садржаја екстракта, стерилизација сладовине, инактивација ензима, коагулација протеина и издвајање нерстворних талоба са танинима, пораст боје сладовине, закишељавање сладовине, настајање редукујућих састојака (меланоидини и редуктони), уклањање непожељних испарљивих једињења (диметилсулфид). По завршетку кувања добија се врућа охмелена сладовина.

5) *Уклањање топлог талоба*. Топли или груби талог представља лом беланчевина (коагулисане протеине) који настаје током кувања сладовине, а мора се уклонити из неколико разлога: омета избистравање сладовине, лепи се за квасац, изазива повећање садржаја талоба у пиву чиме се повећава растур и отежава филтрацију пива. Најчешће се уклања употребом вртложних таложника - вирлпула.

6) *Хлађење и аерација сладовине*. Након уклањања топлог талоба сладовину је потребно охладити до почетне температуре врења (6-8°C за лагер пива и 15-18°C за пива горњег врења). Током хлађења, када температура падне испод 60°C, сладовина почиње да се мути због издвајања хладног (финог) талоба кога чине честице пречника око 0,5  $\mu\text{m}$ . Због мале величине честица хладни талог се тешко таложити, а уколико се не уклони може да се веже за ћелије квасца чиме се смањује брзина врења. За уклањање хладног талоба примењују се два поступка: филтрација са перлитом или флотација сладовине. Уколико се квасац користи једном до два пута, хладни талог није ни неопходно уклањати, већ се он најчешће уклања само у случајевима када се квасац користи више пута. Хладну сладовину је потребно аерисати како би се омогућило размножавање квасца и брзо

отпочињање врења. Аерација се постиже интензивним удувавањем и распршивањем стерилног ваздуха док се не постигне концентрација кисеоника у сладовини од 8-9 mg/l (Kunze, 2004).

7) *Врење и одлеживање.* У охлађену аерисану сладовину дозира се чиста култура квасца чиме отпочиње врење. Чим се дода квасац, сладовина добија назив младо пиво. Најважније збивање током процеса врења је конверзија шећера из сладовине у алкохол и угљендиоксид под дејством ензима квасца. При томе настају споредни производи врења који битно утичу на укус, мирис и друге особине пива, а чије је настајање и касније разградња уско повезано са метаболизмом квасца. Ферментација сладовине се обавља у анаеробним условима а састоји се из две фазе: главног и накнадног врења. У току главног врења долази до превирања највећег дела ферментабилног екстракта при чему настају етанол, угљендиоксид, органске киселине, естри, виши алкохоли итд. Ова фаза се изводи на температури од 6-16°C у случају квасца доњег врења (*Saccharomyces pastorianus*), односно на температури од 16-24°C у случају квасаца горњег врења (*Saccharomyces cerevisiae*). Када се постигне жељени степен преврелости, младо пиво се хлади на температуру од 0-1°C, чиме почиње накнадно врење. Током ове фазе највећи део суспендованих ћелија квасца се таложи, док се преостали део екстракта полако превире ћелијама квасца које су остале у суспензији. Такође, долази до промене сензорних карактеристика пива, бистрења, колоидне стабилизације и карбонизације. Непријатни мирис и укус младог пива се губи, горчина постаје пријатнија, а квасац разграђује једињења типа диацетила која је синтетисао током главног врења (Leskošek-Čukalović, 2002).

8) *Филтрација пива.* Филтрација је поступак сепарације којим се из пива уклањају још увек присутне ћелије квасца и друге честице мутноће. Циљ филтрације је да се добије кристално бистро и стабилно пиво у коме до датума минималног рока употребе неће доћи до промене сензорних својстава.

9) *Отакање пива у боце, лименке или бурад.*

## 2.2 ПИВА СА ГРОЖЋЕМ

„Постоји тренд раста популарности, на први поглед, мало чудноват. Наиме, бројне пиваре широм земље додају грожђе – целе гроздове, сок или кљук (смеша грожђаног сока, покожице, семенки и шепурине) – у њихова пива, стварајући нешто што ћемо неспретно назвати пиво-вино хибриди. Чудна ствар је да ови хибриди заправо евоцирају успомену на то како су људи некада пили у старом Египту и Кини, што се закључује на основу остатака које су пронашли археолози.“, овако је 2013. године лист *Chicago Tribune* писао о новом тренду у производњи пива (Stambog, 2013). Највећи допринос развоју и популаризацији „античких пива“, међу којима су и специјална пива са додатком грожђа, свакако је дао проф. др Patrick McGovern, биомолекуларни археолог са Универзитета Пенсилванија. Испитивањем органских остатака на бронзаним судовима за пиће пронађеним у гробници фригијског краља Миде (владао у 8. веку п.н.е) у централној Турској, откривени су трагови винске киселине и њених соли (природно се у великој количини налазе у грожђу и производима од грожђа), калцијум оксалата (главни кристални талог који се појављује у јечменом пиву) и воска (група маркер једињења пореклом из меда). Резултати истраживања указивали су на то да је на погребној гозби служено веома необично мешано ферментисано пиће које се састојало од вина, пива и меда или медовине (McGovern et al., 1999).

Изненађен открићем, др McGovern је изјавио да му се стомак грчи и на саму помисао пијења једног таквог пића. Међутим, потакнут знатижељом, успоставио је сарадњу са малом пиваром *Dogfish Head* у циљу креирања пића које би личило на оно служено на Мидином погребу, а на основу резултата добијених хемијским испитивањем археолошких остатака. Као плод сарадње настало је пиво *Midas Touch*, које је било произведено са додатком мускатног грожђа, меда и шафрана (више о његовој производњи у поглављу 2.2.1).

Сигурно је да идеја о производњи пива са грожђем није новијег датума, нити је пивара *Dogfish Head* први произвођач оваквог пива у модерној историји. У неким од првих писаних докумената помиње се производња пива, али и употреба вина, грожђа и меда у његовој производњи. Један од таквих докумената је и „Химна богињи Нинкаши“ (сумерска богиња пива), писана око 1800. године

п.н.е., која садржи можда и најстарији рецепт за производњу пива. У молитви се каже: „...ти си она која са обадве руке држи дивну слатку сладовину, ферментишући је са медом и вином...“ (Mark, 2011). Из текста се може закључити улога меда, вина, грожђа или неког другог воћа у производњи античких пива: покретање ферментације, односно отпочињање врења. С обзиром да квасци као вршиоци врења нису природно присутни на житарицама, мед, воће или ферментисани воћни напитци су служили као основни извор квасца. Такође, с обзиром на пријатан мирис и укус ових сировина, оне су сигурно имале и велики значај за арому древног пива.

Данас се значајан број, углавном малих пивара, бави производњом пива са грожђем. Иако су се прва оваква пива појавила средином друге половине XX века, популарност су стекла тек након пласирања на тржиште пива *Midas Touch* од стране *Dogfish Head* пиваре (слика 3). Најзначајнији произвођачи пива са грожђем су: *Cantillon Brewery*, *Dogfish Head Craft Brewery*, *Allagash Brewing Company*, *Paeleman Brewery*, *Blue Moon Brewing Company*, *5 Rabbit Cervecería*, *Captain Lawrence Brewing Company*, *Birra del Borgo* итд.



Слика 3. *Midas Touch* (<http://drinkallthebeers.com>)



### 2.2.1 Dogfish Head Craft Brewery

*Dogfish Head* је мала пивара основана 1995. године, чија је основна мисија од самог почетка била производња атипичних специјалних врста пива. Већ је поменуто да су у сарадњи са др McGovern-ом радили на реконструкцији античког пива које се служило на погребу краља Миде, и да је као резултат настало пиво *Midas Touch*. Реконструкција је захтевала много рада и креативности, јер је о самом начину производње и састојцима било мало података. Наиме, иако су имали информације о неким састојцима који су коришћени у производњи, нису знали њихов међусобни однос, као ни садржај алкохола ни степен газираниости древног пића. Свакако највећи изазов било је пронаћи сировину која би била носилац горчине и која би покривала слат пореклом из грожђа и меда, јер се у то време на подручју Мале Азије хмељ није ни гајио ни користио. Као алтернатива хмељу одабран је шафран, као један од зачина који се у то време широко употребљавао (McGovern, 2009). Након око годину дана рада, створено је специјално пиво названо *Midas Touch*, а основне сировине за његову производњу биле су светли слад, концентрат мускатног грожђа, мед од тиммијана пореклом из Италије и шафран из Турске. Основу пива чинила је сладовина која је укупном екстракту доприносила са 60 %. Након кувања, у још врућу сладовину додаван је мед, а после хлађења и концентрат белог мускатног грожђа. Мед и грожђе су доприносили укупном екстракту са по 20 %, при чему је укупан екстракт био између 18 и 19°P (Parks, 2007). *Midas Touch* је први пут послужен 2000. године у *Penn* музеју (Музеј археологије и антропологије универзитета Пенсилванија), на реконструкцији погребне гозбе краља Миде коју је организовао др McGovern. То је уједно била и прва реконструкција историјских јела и пића на основу хемијских анализа античких органских остатака. Sam Calagione, власник *Dogfish Head* пиваре, сећајући се тог догађаја изјавио је: „Као што можете замислити, пиво са белим мускатним грожђем из Калифорније, шафраном из Турске и тиммијановим медом из Италије, било је екстремно скупо направити. Због тога нисмо планирали да га икад више након те вечере поново произведемо. Међутим, оно је заиста освојило људе. Томе су допринели и магазин *People* и *The Today Show*.“ (Popp, 2010). Наравно, након такве реакције и подстицаја, пивара је наставила са производњом пива *Midas Touch*, и оно је тренутно њихово најнаграђиваније пиво,

са три златне и пет бронзаних медаља освојених на најзначајнијим дегустационим такмичарским оцењивањима (McGovern, 2010).

Убрзо после успеха који су постигли са овим пивом, прихватили су нови задатак од др McGovern-а: реконструкција још једног „археопива“ на основу остатака старих око 9000 година, пронађених у неолитском налазишту *Jiahu* у провинцији Хенан у северној Кини. Хемијском анализом остатака на керамичким посудама, утврђено је да је у њима било ферментисано пиће које се вероватно производило од пиринча, меда, грозђа и бобица глога (McGovern et al., 2004). Држећи се историјских података, произвели су специјално пиво под називом *Chateau Jiahu* од пиринча, јечменог слада, меда од цвета поморанце, мускатног грозђа и бобица глога. Ферментација је обављена са *shoji sake* квасцем, а трајала је око месец дана. Садржај алкохола у овом пиву је 10 % v/v, а на тржишту се налази у боцама од 0,75 литара (Dogfish Head Craft Brewery, 2015). Иако је цена *Chateau Jiahu* око 13 долара по боци, што је неколико пута више у односу на цене осталих комерцијалних пива, његова продаја се током година рецесије повећала. Овај феномен Sam Calagione објашњава на следећи начин: „Оно што можемо видети у овој економији је да људи вероватно не могу себи приуштити нови спортски аутомобил или нову викендицу, али зато сигурно могу себи дозволити да купе пиво светске класе“ (Horn, 2012).

Поред поменутих два пива, *Midas Touch* и *Chateau Jiahu*, ова пивара производи још три врсте пива у којима као сировину користи грозђе: *Sixty-One*, *Noble Rot* и *Red & White* (слика 4). *Sixty-One* је настао на бази једног од њихових најпродаванијих пива, *60 Minute IPA (India pale ale)*, уз додаток шире грозђа сорте шираз (*syrah*). Ово пиво се производи од марта 2013. године, а на тржишту је доступно четири пута годишње. Садржи 6,50 % v/v алкохола.

*Red & White* је белгијски тип „белог“ пшеничног *ale* пива (*witbier*), произведеног са коријандером и кором поморанце и са додатком шире грозђа *pinot noir*. Након ферментације, пиво сазрева у храстовом бурету запремине 10000 галона (37854,1 литара). Ово пиво веома успешно обједињује цитрусну свежину белгијског белог пива и робусну комплексност црвеног вина. Садржи 10 % v/v алкохола а на тржишту се налази од 2007. године.

*Noble Rot* се производи од комбинације два типа слада, јечменог *pils* слада и пшеничног слада, са додатком шире две сорте грожђа: *viognier* (у Хрватској позната под називом вугава бијела), инфицираног племенитом плесни *Votrytis cinerea*, и *pinot gris* (бургундац сиви). Ово пиво се производи од 2011. године, а у боцама од 0,75 литара је доступно од јануара 2012. године. Садржи 9 % v/v алкохола (Dogfish Head Craft Brewery, 2015).



Слика 4. *Sixty-One* (<http://allthesamebeer.com>), *Chateau Jiahu* (<http://www.chinabeergeek.com>), *Noble Rot* (<http://literatureandlibation.com>) и *Red & White* (<http://allthesamebeer.com>)

## 2.2.2 Cantillon Brewery

*Cantillon Brewery* је мала породична пивара основана 1900. године, која се бави производњом *lambic*, *gueuze*, *faro* и *kriek* пива. Ради се о врло специфичним белгијским пивима карактеристичним по јединственим условима ферментације,

дугом одлежавању и ароматизовању различитим воћем. Производњу пива са грожђем започео је Jean-Pierre Van Roy још 1973. године, додајући бело мускатно грожђе у *lambic*, тако да је ово вероватно пивара са најдужом традицијом производње пива са грожђем. Добијено пиво је испунило очекивања, како по сензорним карактеристикама тако и по успеху на тржишту, а од 1987. године се производи под називом *Vigneronne Cantillon*. Упркос успеху и израженој потражњи, *Vigneronne* чини тек око 5 % производње пиваре, највише због сезонског приспећа грожђа и ограничених капацитета. Секундрна ферментација се обавља у дрвеним бурадима уз додавање шећерног сирупа. Пиво је на тржишту доступно у боцама од 0,75 литара, са садржем алкохола 5 % v/v (слика 5).



Слика 5. *Vigneronne* (<http://cervejaparadois.blogspot.rs>) и *Saint-Lamvinus* (<http://www.beerbirrabier.com>)

Након успешне производње *Vigneronne*-а, пивара *Cantillon* је 1995. године на тржиште избацила још једно пиво са грожђем: *Saint-Lamvinus Cantillon*. Ово пиво је настало додавањем грожђа *merlot* и *cabernet franc* у две до три године стари *lambic*, након чега се врши секундарна ферментација у *Bordeaux* дрвеним бурадима. Ово пиво се такође пакује у боце од 0,75 литара, и има садржај алкохола 5 % v/v (слика 5).

### 2.2.3 Allagash Brewing Company

*Allagash Brewing Company* такође припада групи малих пивара, а основана је 1995. године са циљем производње белгијских типова *ale* пива. На тржишту је

могуће наћи два њихова пива произведена са додатком грозђа: *Victoria Ale* и *Victor Ale*.

*Victoria Ale* се производи од *pilsner* слада и кљука грозђа сорте *chardonnay*, који се директно додаје у комину. Током кувања врши се благо хмељење са сортама хмеља *Fuggles* и *Hallertau*, а ферментација се обавља са винским сојем квасца. Укупно трајање ферментације и одлежавања пива је седам месеци. Ово пиво се одликује златном бојом, воћним мирисом, аромом која подсећа на зелене банане, црни бибер и свеже убрану нану, и дугом комплексном завршницом. Садржи 9 % v/v алкохола, а од 2006. године је доступно у боцама од 0,75 литара.

*Victor Ale* је настао годину дана након претходника - *Victoria Ale*. Поступак производње је сличан као и код *Victoria Ale*, са том разликом што се у производњи *Victor Ale*-а користи црвена сорта грозђа *cabernet franc*. Ово пиво има 8,3 % v/v алкохола, светлу бакарну боју и наглашен вински карактер са зачинском, опором завршницом. Ферментација и одлежавање у танковима трају 3 месеца, са још додатна четири месеца одлежавања у боцама. На тржишту се налази у боцама од 0,75 литара (Allagash Brewing Company, 2015) (слика 6).



Слика 6. *Victoria Ale* и *Victor Ale* (<https://vimeo.com>)



### 2.2.4 Blue Moon Brewing Company

*Blue Moon Brewing Company* је основао др Keith Villa 1995. године, убрзо након што је стекао звање доктора из области пиварства на Универзитету у Бриселу. Инспириран белгијским пивима, основни циљ му је био производња белгијских типова пшеничних пива, али уз одређене специфичне додатке који ће их чинити посебним и јединственим. Један од тих нарочитих додатака пиву је и грожђе, па се у производњи ове пиваре појавило неколико пива са грожђем: *Vintage Blonde Ale (Golden Knot)*, *Proximity*, *Impulse*, *Crimson Crossing* и *Grape Scott* (слика 7).



Слика 7. *Crimson Crossing*, *Vintage Blonde Ale* (<http://www.beerfm.com>), *Proximity* и *Impulse* (<http://www.scoopnest.com>)

*Vintage Blonde Ale* је прво пиво са грожђем које је произведено у овој пивари, још на самом почетку њеног рада 1995. године. Основни састојци

коришћени у његовој производњи су пшенични слад који је доносио 51 % екстракта, шира грожђа сорте *chardonnay* која је била извор преосталих 49 % екстракта и хмељ сорте *Nelson Sauvin*. Ово пиво се одликује светло златном бојом и изузетном бистрином, воћном аромом која подсећа на јабуке и киви, глаткоћом укуса која потиче од белог пшеничног слада, благом опорашћу и чистом пријатном завршницом. Садржи 9 % v/v алкохола и пакује се у боце од 0,75 литара. На Великом америчком фестивалу пива (Great American Beer Festival®) освојило је сребрну медаљу 2006. године и златну медаљу 2010. године, затим сребрну медаљу на Светском купу пива (World Beer Cup®) 2008. године и златну медаљу на Интернационалном пивском такмичењу (International Beer Competition®) 2012. године. Данас је ово пиво познато под називом *Golden Knot*.

*Proximity* се производи од пшеничног слада, шире грожђа *sauvignon blanc* и хмеља сорте *Nelson Sauvin* са Новог Зеланда. Садржи 8,5 % v/v алкохола, а одликује се златном бојом и цветним мирисом са примесама арома цитрусног воћа.

*Impulse* је пиво тамно љубичасте боје, произведено од пшеничног слада, шире грожђа *cabernet sauvignon* и хмеља *French Strisselspalt*. Садржи 8,5 % v/v алкохола, а карактерише га раскошна арома која подсећа на црне рибизле и зрело бобичасто воће и благи танински укус.

*Crimson Crossing* је пиво чији су основни састојци пшенични слад, шира грожђа сорте *merlot* и хмељ *French Strisselspalt*. Има изразито црвену боју и арому која подсећа на вишње и малине, са благим примесама ароме џема. Садржи 9,5 % v/v алкохола.

*Grape Scott* је пиво које се производи од истих сировина као и *Vintage Blonde Ale* и веома му је слично, са разликом у ароми која код овог пива подсећа на зреле црвене јабуке. Садржи 9 % v/v алкохола (Blue Moon Brewing Company, 2015).

### 2.2.5 Остали произвођачи пива са грожђем

*5 Rabbit Cervecería* је такође мала занатска пивара која у свом производном програму има и пиво са грожђем: *Gran Missionario*. То је специјално пшенично пиво произведено са широм мускатног грожђа *alexandria*, коме додатну воћну

арому даје и хмељ *Hallertau Blanc*. Садржи 8,3 % v/v алкохола, док је полазни екстракт 19,5°P (5 Rabbit Cerveceria, 2015) (слика 8).



Слика 8. *Gran Missionario* (<http://articles.chicagotribune.com>) и *Equilibrista* (<http://www.eataly.net>)

*Captain Lawrence Brewing Company* производи два пива са грожђем: *Cuvee de Castleton* и *Rosso e Marrone* (слика 9). *Cuvee de Castleton* је *ale* пиво чији су основни састојци јечмени слад и мускатно грожђе, при чему се ферментација обавља дивљим сојевима квасаца, а након главног врења пиво одлежава у храствим винским бурадима. Садржи 7 % v/v алкохола.



Слика 9. *Cuvee de Castleton* (<https://untappd.com>), *Rosso e Marrone* (<http://www.instagram24.com>),



*Rosso e Marrone* настаје мешањем црвених сорти грожђа, *merlot* и *zinfandel*, са киселим браон *ale* пивом, након чега се врши секундарна ферментација у храстовим бурадима са квасцима из рода *Brettanomyces*. Садржај алкохола у овом пиву је 10 % v/v (Captain Lawrence Brewing Company, 2015).

***Birra del Borgo*** је мала италијанска пивара која производи специјално пиво под називом *Equilibrista* са широм грожђа *sangiovese* (слика 8). Учешће шире у медијуму за ферментацију је 50 %, док преосталих 50 % чини њихово *saison* пиво (светло *ale* пиво са воћном и зачинском аромом) *Duchessa*. Садржи 10,5 % v/v алкохола (Birra del Borgo, 2015).

***St. Somewhere Brewery*** је мала пивара која производи традиционална белгијска *ale* пива. *Cynthiana* је њихово мутно пиво у чијој се производњи користи шира грожђа сорте *cynthiana*, које је вероватно најстарије култивисано америчко грожђе. Садржи 8 % v/v алкохола, а карактерише га комплексна арома која подсећа на анис, цвеће, траву, лимун, коријандер и бели бибер (St. Somewhere Brewery, 2015) (слика 10).



Слика 10. *Cynthiana* (<https://untappd.com>)

## 2.3 ПРООКСИДАнти И АНТИОКСИДАнти

Коришћењем молекулског кисеоника од стране аеробних организама долази до неизбежног формирања реактивних кисеоникових (ROS) и азотових (RNS) врста. Ове и друге реактивне врсте могу да узрокују оксидативно оштећење биолошки важних молекула попут ДНК, протеина и липида (Li, 2011). Различите хемијске врсте које у биолошким или хемијским системима узрокују или убрзавају реакције оксидације називају се прооксиданси. Прооксиданси могу бити слободнорадикалске и нерадикалске природе (оксидациона средства која лако прелазе у слободне радикале). Слободни радикали су атоми, јони или молекули који су способни да независно постоје и који поседују један или више неспарених електрона који узрокују њихову високу реактивност и нестабилност (Halliwell и Gutteridge, 2007). Са друге стране, опозит прооксидантима су антиоксиданти, који представљају супстанце, које када су присутне у малим концентрацијама у односу на супстрат који се оксидише, значајно умањују или спречавају оксидацију тог супстрата (Halliwell и Gutteridge, 1990).

Област антиоксиданаса и слободних радикала се често схвата као фокусирање на употребу антиоксидативних додатака исхрани у циљу превенције обољења. У ствари, антиоксиданти/слободни радикали прожимају цео аеробни живот на Земљи, стварајући област оксидо-редукционе биологије. Нису сви слободни радикали лоши нити су сви антиоксиданти добри. Аеробни живот представља баланс између њих: антиоксиданти служе да регулишу ниво слободних радикала, омогућавајући им да обављају корисне биолошке функције без изазивања великих оштећења важних молекула (Halliwell, 2006). Током одржавања ћелијског дисања и неких других есенцијалних животних процеса одређена оштећења изазвана слободним радикалима су неизбежна, због чега постоје репарациони системи који одржавају вијабилност ћелија. Поред слободних радикала који настају током одвијања нормалних метаболичких процеса, њихов значајан извор представља и околна средина. Из тих разлога, извори слободних радикала се могу поделити на ендogene и екзогене (Li, 2011). Најважнији ендогени извори су: NAD(P)H оксидазе, митохондрије (електрон транспортни ланац), ксантин оксидоредуктазе, цитохром P450 и b5 ензими, азот-моноксид синтазе, мијелопероксидазе, липоксигеназе, прелазни метали (гвожђе и

бакар), фагоцитоза, простагландин синтазе, метаболизам ксенобиотика и ензимске реакције које катализују оксидазе и оксигеназе (Kehrer, 1993; Li, 2011). Егзогени извори слободних радикала су: јонизујуће зрачење, ултравиолетна радијација, ултразвук, хемикалије, пушење дувана, биолошки агенси (бактерије и вируси), итд. Најважније слободнорадикалске и нерадикалске реактивне врсте приказане су у табели 1.

Табела 1. Најважније реактивне слободнорадикалске и нерадикалске врсте

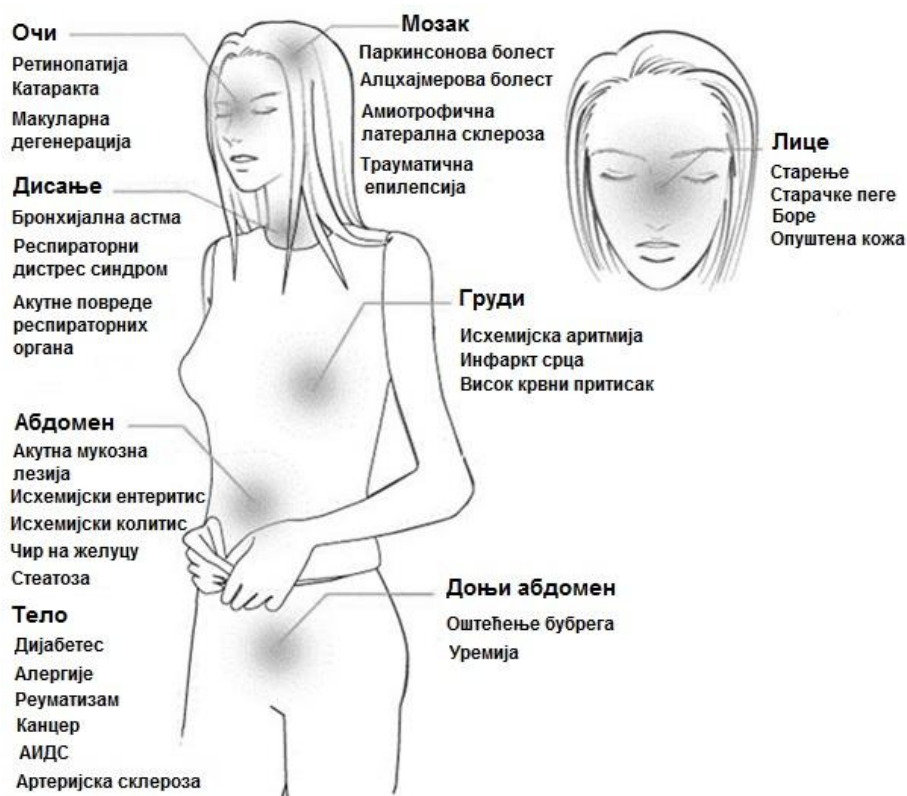
СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ	НЕРАДИКАЛСКИ ОБЛИЦИ
<b>Реактивне кисеоникове врсте (ROS)</b>	
Супероксид анјон радикал, $O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид, $H_2O_2$
Хидроксил радикал, $HO^{\cdot}$	Хипобромна киселина, $HOBr$
Хидропероксил радикал, $HO_2^{\cdot}$	Хипхлорна киселина, $HOCl$
Пероксил радикал, $RO_2^{\cdot}$	Озон, $O_3$
Алкоксил радикал, $RO^{\cdot}$	Синглетни кисеоник, $O_2^1\Delta g$
Карбонатни радикал, $CO_3^{\cdot-}$	Органски пероксиди, $ROOH$
Угљендиоксидни радикал, $CO_2^{\cdot-}$	Пероксинитрит, $ONOO^{\cdot}$
Синглетни $O_2^1\Sigma g^+$	Пероксинитритна киселина, $ONOOH$
	Пероксинитрат, $O_2NOO^{\cdot}$
	Пероксомонокарбонат, $HOOCO_2^{\cdot}$
<b>Реактивне азотове врсте (RNS)</b>	
Азотмоноксидни радикал, $NO^{\cdot}$	Азотаства киселина, $HNO_2$
Азотдиоксидни радикал, $NO_2^{\cdot}$	Нитроксил катјон, $NO^+$
Нитрат радикал, $NO_3^{\cdot}$	Нитроксил анјон, $NO^{\cdot-}$
	Динитроген тетроксид, $N_2O_4$
	Динитроген триоксид, $N_2O_3$
	Пероксинитрит, $ONOO^{\cdot}$
	Пероксинитритна киселина, $ONOOH$
	Нитронијум (нитрил) катјон, $NO_2^+$
	Алکیلпероксинитрити, $ROONO$
	Нитрил (нитронијум) хлорид, $NO_2Cl$
	Алکیلпероксинитрати, $RO_2ONO$
	Пероксиацетилнитрат, $CH_3C(O)OONO_2$
<b>Реактивне хлорне врсте (RCS)</b>	
Атомски хлор, $Cl^{\cdot}$	Хипхлорна киселина, $HOCl$
	Нитрил (нитронијум) хлорид, $NO_2Cl$
	Хлорамини
	Гасовити хлор ( $Cl_2$ )
	Бром хлорид ( $BrCl$ )
	Хлор диоксид ( $ClO_2$ )
<b>Реактивне бромне врсте (RBS)</b>	
Атомски бром, $Br^{\cdot}$	Хипобромна киселина, ( $HOBr$ )
	Гасовити бром ( $Br_2$ )
	Бром хлорид ( $BrCl$ )

У ниским или умереним концентрацијама ROS и RNS имају значајне физиолошке функције: неопходни су за процес старења ћелијских структура и учествују у одбрани организма од инфекција, убијањем или инактивирањем микроорганизама и неживих агресора (Pham-Huy et al., 2008). Слободни радикали чине део одбрамбеног механизма организма, при чему их током фагоцитозе, фагоцити (неутрофили, макрофаги, моноцити) ослобађају и користе као средство за уништавање инвазивних патогених микроба (Young и Woodside, 2001; Droge, 2002). Значај производње ROS од стране имуног система се јасно може уочити на примеру пацијената са грануломатозним болестима. Ови пацијенти имају дефект мембрански везаног NADPH оксидаза система који му онемогућава продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), што води ка вишеструкој и упорној инфекцији (Valko et al., 2007). Други позитивни утицаји рективних кисеоникових и азотових врста укључују њихове физиолошке улоге у функционисању бројних ћелијских сигналних система (Pacher et al., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007). Њихова производња од стране нефагоцитних изоформи NADPH оксидазе игра кључну улогу у регулацији интрацелуларних сигналних каскада у различитим типовима нефагоцитних ћелија, укључујући фибробласти, ендотелске ћелије, ћелије васкуларних глатких мишића, срчане миоците и тироидно ткиво. На пример, азот моноксид (NO) је интерцелуларни сигнални молекул за модулацију крвног протока, тромбозу и неуронске активности (Pacher et al., 2007). Такође, NO је веома важан за неспецифични имуни одговор и за убијање интрацелуларних патогена и тумора. Одређен физиолошки ниво ROS је од великог значаја и за регулацију других ћелијских функција, попут активације транскрипције, ћелијске пролиферације и апоптозе (Herrera et al., 2001). Једном речју, ROS/RNS у ниској и умереној концентрацији су витални за здравље човека.

### 2.3.1 Оксидативни стрес

Под нормалним условима продукција прооксидативних врста, нарочито ROS, у здравом људском телу је у равнотежи са антиоксидативном заштитом организма. Концентрација ROS је динамички параметар и нормално равнотежно стање у ћелији подразумева да је количина продукованих ROS практично једнака количини елиминисаних. Међутим, излагањем неповољним спољашњим

факторима или патолошким агенсима као што су атмосферска загађења, дувански дим, UV зрачење, радијација, токсичне хемикалије, унос превелике количине хране (гојазност) и повећана количина крајњих производа реакције неензимског гликозиловања протеина (AGEs) боловањем од дијабетеса, може бити нарушена равнотежа прооксиданти/антиоксиданти у корист прооксиданата. Овакво стање назива се оксидативни стрес, и узрочник је или пратећи фактор више од 100 обољења (Devasagayam et al., 2004) (слика 11).



Слика 11. Болести повезане са оксидативним стресом (<http://www.inforbarrel.com/What is Oxidative Stress>)

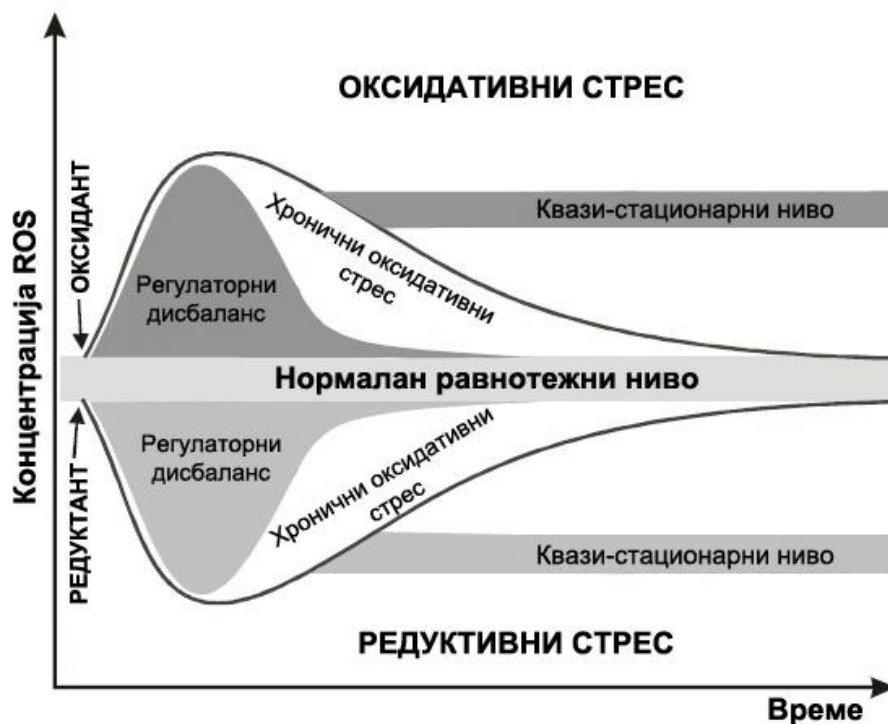
Термин „оксидативни стрес“ први је дефинисао Helmut Sies 1985. године, као поремећај равнотеже прооксиданти-антиоксиданти у корист прооксиданата. Halliwell и Gutteridge (2007) су оксидативни стрес дефинисали као „у суштини веома озбиљан дисбаланс између продукције ROS/RNS и антиоксидативне заштите“. Међутим, ова дефиниција не обухвата веома важну чињеницу: динамику производње и елиминације ROS, односно нормалан равнотежни ниво ROS који се одржава у ћелији током метаболизма. С обзиром да ROS има и веома важне физиолошке функције, нпр. као преносници сигнала, то се свакако мора

узети у обзир код дефинисања појаве оксидативног стреса. Lushchak (2011) је предложио дефиницију према којој је оксидативни стрес ситуација када је нормална равнотежна концентрација ROS привремено или хронично повећана, услед чега долази до поремећаја ћелијског метаболизма и његове регулације, као и оштећења ћелијских конституената. Нешто касније, Lushchak и Semchyshyn (2012) су проширили претходну дефиницију и описали оксидативни стрес као привремено или хронично повећање нормалне равнотежне концентрације ROS, због чега долази до поремећаја рада ћелијског једра и сигналних процеса, укључујући и сигналне процесе обезбеђене помоћу ROS, и оксидативне модификације ћелијских конституената чиме настају коначни штетни ефекти.

У нормалним условима, равнотежна концентрација ROS се одржава у одређеном опсегу као резултат баланса између продукције и елиминације ових реактивних врста (слика 12). Међутим, под одређеним условима који узрокују повећање производње ROS или услед промене у ефикасности катаболичког система, концентрација ROS се може повећати и изаћи из уобичајеног равнотежног опсега, чиме настаје стање оксидативног стреса. Уколико је антиоксидативни потенцијал довољно јак, концентрација ROS ће се вратити у равнотежни ниво без озбиљних последица по ћелију. У случају да антиоксидативни потенцијал није довољно снажан или је концентрација ROS сувише велика, ћелија мора да обезбеди повећање антиоксидативног потенцијала како би се концентрација ROS вратила у равнотежни ниво. Резултат повећања концентрације слободних радикала и последичног деловања антиоксидативне заштите може бити двојак: а) лагано смањивање концентрације ROS до достизања почетног нормалног равнотежног нивоа (хронични оксидативни стрес) или концентрације блиске нормалном равнотежном стању, или б) успостављање новог равнотежног нивоа: квази-стационарног нивоа, који представља ново „нормално“ равнотежно стање. Стварање квази-стационарног равнотежног нивоа не мора нужно узроковати озбиљне негативне последице по ћелију, али може довести до развоја одређених патолошких стања (Lushchak и Semchyshyn, 2012).

Генерално, узрок оксидативног стреса може бити: а) повећање продукције слободних радикала и нерадикалских реактивних врста, б) недовољан антиоксидативни потенцијал и ц) комбинација прва два фактора. Иако је веома

тешко доказати да оксидативни стрес може директно изазвати развој неког патолошког стања, велики број истраживања је потврдио снажну позитивну корелацију између оксидативног стреса и појаве различитих обољења (Valko et al., 2007).



Слика 12. Шематски приказ модерне идеје метаболизма ROS у биолошким системима (Lushchak и Semchyshyn, 2012)

Процењује се да код просечног човека свака телесна ћелија сваког дана буде нападнута од стране слободних радикала око 10 000-20 000 пута (Valko et al., 2004). Главне „мете“ напада су нуклеинске киселине (ДНК и РНК), протеини, липиди и шећери (Lü et al., 2010; Craft et al., 2012). ДНК и РНК су веома осетљиве на оксидативна оштећења, при чему могу настати неке од следећих хемијских и структурних модификација: прекидање ланца, делеције, интеракције азотних база унутар једне спирале или између две спирале, оштећења на протеинским везама и модификације база, инсертовање или губљење једног или два базна пара у молекулу ДНК („*frame shift*“, настајање нефункционалних протеина) (Carocho и Ferreira, 2013). Оксидативне модификације ДНК су најизраженије у присуству метала са променљивом валенцом, јер тада као продукт реакције оксидације

настаје веома реактивни хидроксил радикал ( $\text{OH}^\bullet$ ). Овај радикал може да реагује са свим компонентама ДНК молекула, а његовом адицијом на гуанин настаје 8-хидрокси-2-деоксигуанозин који се сматра индикатором оксидативног оштећења ДНК (Hattori et al., 1997). Систем који служи за репарацију ДНК је веома ефикасан, али када дође до појаве повећаног генерисања слободних радикала капацитети овог система могу бити премашени. У том случају оксидативна оштећења на ДНК молекулама могу да резултирају мутацијама које су главни узрок малигнитета и старења ћелија (Wallace, 2002).

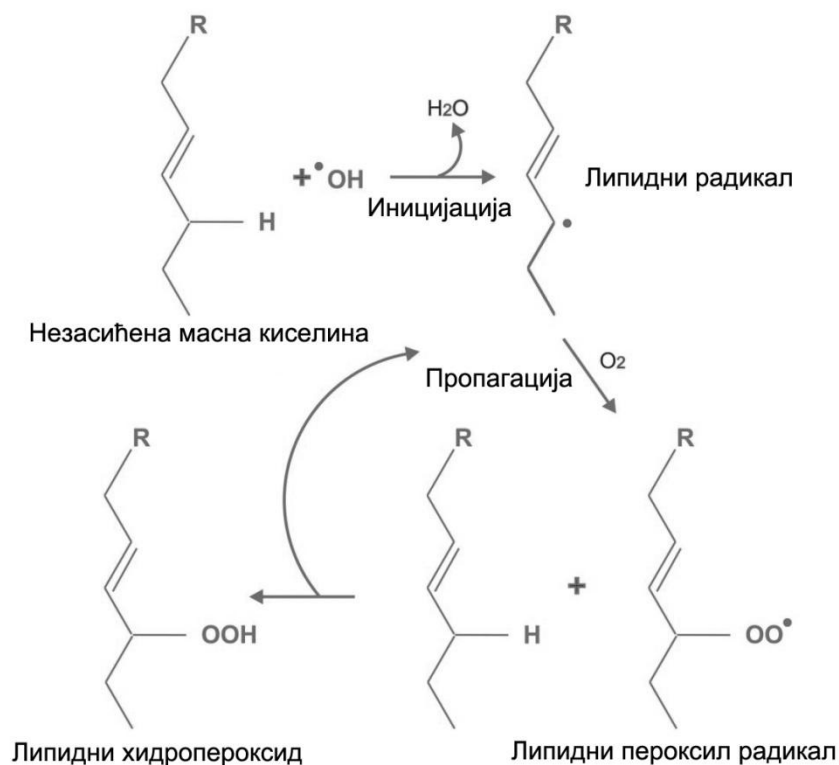
Слободни радикали имају потенцијал да оксидују структурне протеине као и протеине плазме, услед чега утичу на активност ензима, рецептора и мембранског транспорта (Radák et al., 1999). Током оксидације протеини могу да претрпе значајне структурне и функционалне промене, при чему се оксидативна модификација одвија на следећа три начина: 1) оксидативна модификација специфичних аминокиселина, 2) фрагментација полипептидних ланаца и 3) унакрсно повезивање протеина услед реакција са производима липидне пероксидације (Lobo et al., 2010). Најподложнији оксидацији су протеини који садрже аминокиселине метионин, цистеин, аргинин и хистидин (Freeman и Старо, 1982). С обзиром да највећи број механизма оксидације протеина доводи до стварања карбонил деривата, ова се група најчешће и користи као маркер оксидативног оштећења протеина (Stadtman и Berlett, 1997).

Липидна пероксидација (ЛПО) је процес оксидативног оштећења липида. Услед високе заступљености липида, мембране ћелија и субћелијских органела представљају место где отпочиње оксидативно оштећење липида, тј. липидна пероксидација. Као последица оштећења липида ћелијске мембране долази до смањења флуидитета и пермеабилности ћелијске мембране што резултира поремећајем у транспорту електролита, садржају протеина и промењеном функционисању органела (Ђukić, 2008). Пероксидација полинезасићених масних киселина (ПНМК) се одвија кроз три фазе: 1) иницијалну, 2) пропациону и 3) терминалну фазу (слика 13).

Процес иницијације представља покретање ланчаних реакција одузимањем протона уз истовремени трансфер електрона са метиленске ( $-\text{CH}_2-$ ) групе ПНМК-а, деловањем хидроксил радикала ( $\text{HO}^\bullet$ ) или директним деловањем прелазних



метала комплексно везаних за хемопротеине ( $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{4+}$ ), при чему настају липидни радикали ( $\text{R}^\bullet$ ).



Слика 13. Липидна пероксидација (Ђукић, 2008)

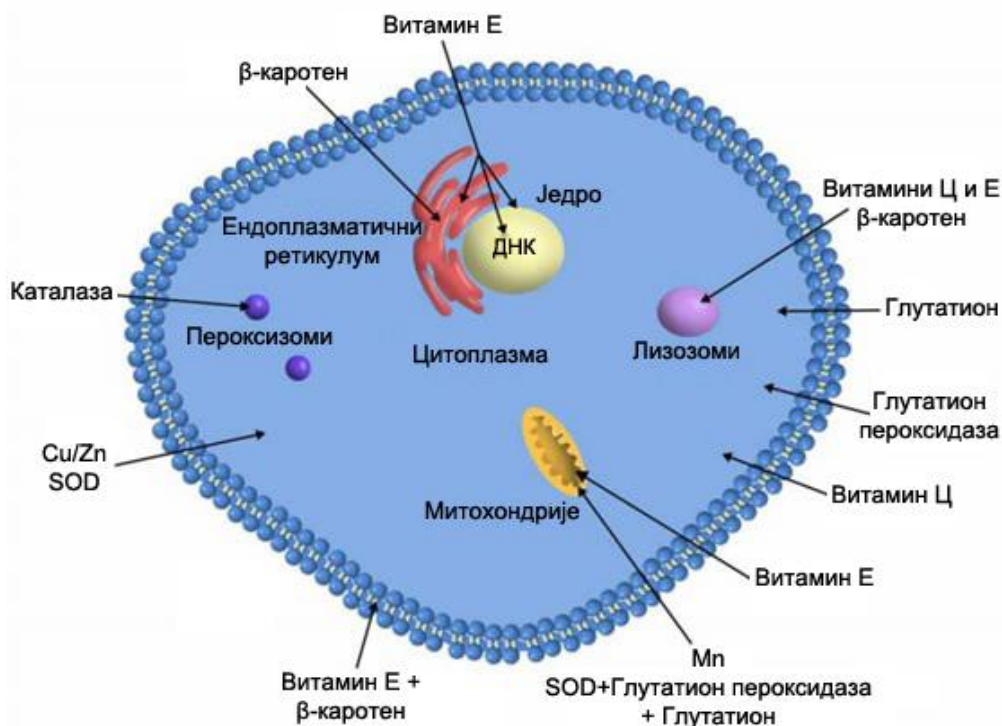
На фазу иницијације надовезује се пропагациона фаза у којој липидни радикали реагују са молекулским кисеоником ( $\text{O}_2$ ) при чему настаје пероксил радикал ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Пероксил радикал је носилац даље пропагације, изузетно је реактиван и као такав реагује са најближим, суседним липидним молекулом, при чему суседни молекул постаје радикал а пероксирадикал се преводи у липидни хидропероксид. ЛПО се завршава конверзијом липидних хидропероксида у секундарне нерадикалне молекуле: угљоводонике, алдехиде и кетоне, алкоhole или полимере. Један од терминалних продуката оксидативног оштећења ПНМК је и малондиалдехид (МДА), који се унакрсно везује за протеине и фосфолипиде ћелијске мембране, чиме се продубљује оксидативно оштећење биомолекула. Мерење МДА као продукта липидне пероксидације најчешће се користи као показатељ интензитета овог процеса тј. мере оксидативног стреса уопште (Frankel, 1984).

Што се тиче улоге шећера у оксидативном стресу, процес гликације је веома значајан извор слободних радикала, нарочито код људи оболелих од дијабетеса. Гликација представља неензимску реакцију редукујућих шећера (глукозе или фруктозе) са аминокиселина бочних ланаца аминокиселина у протеинима (обично са лизином) механизмом нуклеофилне адиције (Lyons, 1993; Vrdnić et al., 2010). Наиме, током овог процеса долази до редукције молекулског кисеоника до високо реактивних врста (супероксидни радикал, водоник пероксид и хидроксилни радикал), а као производи реакције настају: алдимини (Шифове базе, рани нестабилни продукти подложни дисоцијацији), фруктозилезини (рани стабилни продукти, изузетно подложни деградацији дејством слободних кисеоничних радикала) и узнапредовали крајњи продукти процеса гликозилације (иреверзибилни и стабилни). Продукти узнапредовалог процеса гликозилације могу да повећавају ткивну продукцију слободних радикала и до 50 пута, што за последицу има интензивније нарушавање структуре протеинских молекула процесом оксидације (Schwarze et al., 1995; Pavlović et al., 2002).

### 2.3.2 Системи антиоксидативне заштите

Током еволуције, код свих аеробних организама развили су се системи заштите од оксидационих оштећења како би се одржавала равнотежа између продукције и елиминације слободних радикала. Основни задатак антиоксидативне заштите је спречавање и ограничавање настајања оштећења ћелија и ћелијских структура, али и репарација већ насталих оштећења деловањем слободних радикала. Антиоксидативна одбрамбена активност се остварује на различите начине: а) инхибицијом слободнорадикалских оксидационих реакција спречавањем формирања липидних радикала (превентивни антиоксиданти), б) прекидањем пропагације аутооксидационих ланчаних реакција, в) „хватањем“ синглетног кисеоника и његовим превођењем у стабилно стање, г) конверзијом хидропероксида у стабилна једињења помоћу редукујућих супстанци, д) превођењем металних прооксиданаса (деривата гвожђа и бакра) у стабилне продукте деловањем хелирајућих агенаса, љ) инхибицијом прооксидативних ензима (липооксигеназе) и е) међусобним синергизмом различитих антиоксиданата (Darmany et al., 1998; Heim et al., 2002; Min и Boff, 2002;

Pokorný, 2007; Kancheva, 2009). Систем антиоксидативне одбране код човека се може поделити на две целине: ензимски и неензимски антиоксидативни систем (Birben et al., 2012) (слика 14).



Слика 14. Интрацелуларна организација антиоксидативне заштите (<http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>)

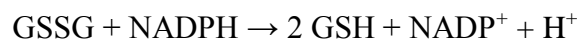
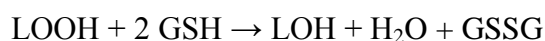
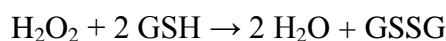
### 2.3.2.1 Ензимски систем антиоксидативне заштите

Антиоксидативни ензими представљају еволутивну адаптацију организма на живот у аеробним условима и стварање слободних радикала током метаболичких процеса. Ензимска антиоксидативна заштита је углавном лоцирна у митохондријама, месту на коме настаје највише слободних радикала, али је заступљена и у цитоплазми и екстрацелуларном простору (Ђukić, 2008). Ензимски антиоксиданти се могу поделити на:

1) Примарне антиоксидативне ензиме - реагују директно са прооксидативним врстама спречавајући формирање слободних радикала или уклањају већ створене слободне радикале. У ову групу ензима спадају: глутатион пероксидаза (GSH-Px), каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион-S-трансфераза (GSH-St).

2) Секундарне антиоксидативне ензиме – ови ензими не врше директну неутрализацију слободних радикала већ регенеришу молекуле антиоксиданата малих молекулских маса. Овој групи припадају глутатион редуктаза (GSH-Rd) и глукоза-6-фосфат дехидрогеназа (G-6-PD).

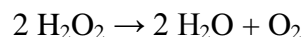
**Глутатион-пероксидазе** спадају међу најважније антиоксидативне ензимиме, а овој групи припадају: селен-зависна глутатион-пероксидаза, селен-независна глутатион-пероксидаза и фосфолипид хидропероксид глутатион-пероксидаза (Kutlu и Susuz, 2004; Steiling et al., 1999). Ови ензими катализују редукцију  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  и органских хидропероксида (ROOH) до одговарајућих алкохола (ROH) купловањем ових реакција са оксидацијом глутатиона (GSH):



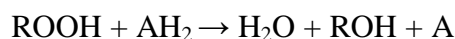
Селен-зависна глутатион-пероксидаза је активна и према органским хидропероксидима и према  $\text{H}_2\text{O}_2$ , док се селен-независна глутатион-пероксидаза састоји од протеина који не захтева селен као кофактор, при чему је активна према органским хидропероксидима али има занемарљиву активност према  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mannervik, 1985). Фосфолипид хидропероксид глутатион-пероксидаза је мономерни селенопротеин и способна је да редукује хидропероксиде масних киселина и холестерола који су естерификовани и налазе се у оквиру мембрана и липопротеина, без претходног одвајања оксидованих масних киселина фосфолипазом (Andreyev et al., 2005).

Глутатион пероксидазе су локализоване у цитоплазми, митохондријама, пероксизомима и интермембранским просторима, а основа улога им је заштита фосфолипида и сфинголипида мембрана од оксидативног оштећења. Током реакција катализованих ових ензимима троше се резерве глутатиона у ћелији. Глутатион редуктаза обезбеђује одржавање резерви редукованог глутатиона у ћелији, користећи NADPH из пентоза-фосфатног пута. Овај ензим је веома ефикасан у одржавању ћелијских резерви глутатиона, чак и у случајевима када су присутне велике количине пероксида (Jenkins, R.R. и Goldfarb, 1993; Powers и Lennon, 1999).

**Каталаза** је веома реактиван ензим који разграђује  $\text{H}_2\text{O}_2$  настао приликом дисмутације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  или у реакцијама које катализује ксантин оксидаза, а као производи разградње настају вода и молекулски кисеоник („каталазна реакција“):

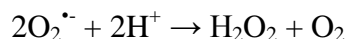


Такође, каталаза има и пероксидазну активност и уз помоћ различитих донора водоника (алкохоли, аскорбинска киселина или фенолна једињења) редукује пероксиде („пероксидазна реакција“):



Засићење каталазе супстратом је практично немогуће због велике брзине реакције која се линеарно повећава са повишењем концентрације супстрата, при чему један молекул каталазе може да разгради чак 6 милијарди молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  током једног минута (Matés et al., 1999). Каталаза је интерцелуларни ензим који се налази искључиво у пероксизомима у којима и настаје водоник-пероксид, осим код еритроцита где се налази у цитоплазми (Jenkins и Goldfarb, 1993).

**Супероксид дисмутаза** је металопротеински ензим који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) до водоник пероксида и молекуларног кисеоника:

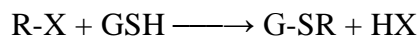


SOD неутралише супероксид анјон тако што се циклично узастопно врши оксидација и редукција јона прелазног метала на активном месту овог ензима (Chaudière и Ferrari-Iliou, 1999). То је једини ензим који реагује директно са слободним радикалом и представља прву линију одбране против слободних радикала. Даљу трансформацију насталог  $\text{H}_2\text{O}_2$  врше глутатион пероксидаза или каталаза.

Постоји неколико изоформи SOD које се међусобно разликују према металу који садрже у активном центру и аминокиселинском саставу, од којих се у људском организму налазе следеће три: 1) цитоплазматична Cu/Zn-SOD, митохондријална Mn-SOD и екстрацелуларна EC-SOD (Landis и Tower, 2005). У соматским ћелијама, приликом мировања, највећу количину супероксидног анјона насталог у процесу ћелијског дисања неутралише митохондријална SOD, док само незнатна количина  $\text{O}_2^{\cdot-}$  дифундује у цитоплазму (Arosio и Levi, 2002). У

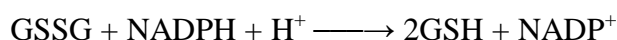
мишићним ћелијама највећи део (65-85 %) супероксидног анјона неутралише се у цитоплазми (Das et al., 1997).

**Глутатион-S-трансфераза** представља мултигенску фамилију протеина која катализује нуклеофилни напад атома сумпора из глутатиона на електрофилне групе супстрата:



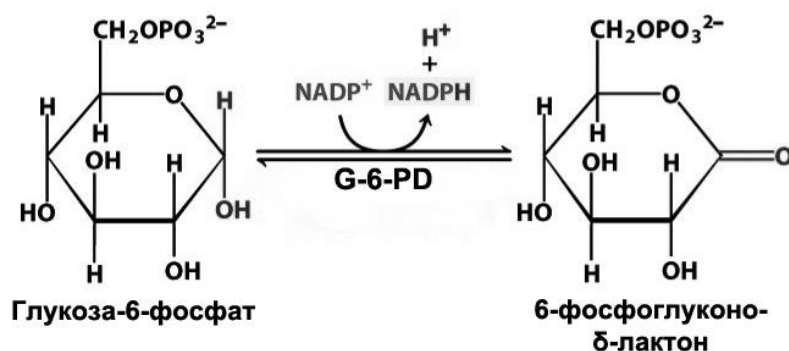
Основна улога GSH-St је детоксификација великог броја једињења: ксенобиотика, хепатичких токсина, канцерогена, епоксида и других потенцијално токсичних супстанци. Поред ензиматске, GSH-St има још и транспортну и синтетичку функцију. Нековалентним везивањем једињења као што су стероиди, хормони, лекови и др. омогућен је транспорт и олакшана елиминација ових супстанци из организма (Mannervik et al., 1988; Hayes и Pulford, 1995).

**Глутатион редуктаза** катализује реакцију редукције глутатиона из оксидованог (GSSG) у редуковани (GSH) облик, при чему је донор протона никотин аденин динуклеотид фосфат (NADPH) пореклом из пентозофосфатног циклуса:



Основна улога GSH-Rd је обнављање залиха редукованог глутатиона неопходног за неутрализацију слободних радикала, односно, одржавање редокс хомеостазе у ћелији. GSH-Rd се налази у цитоплазми и митохондријама (Chaudière и Ferrari-Pioui, 1999).

**Глукоза-6-фосфат дехидрогеназа** је свеprisутни ензим, јер се налази у свим организмима и у свим ткивима.



Основна метаболичка улога G-6-PD је катализација оксидације глукозе-6-фосфата у 6-фосфоглуконолактон чиме започиње пентоза фосфатни пут, у коме настају

пентозе које су прекурсорни нуклеинских киселина и свих нуклеотидних коензима. Оксидацијом глукозе-6-фосфата регенерише се NADPH неопходан за различите реакције биосинтезе и детоксификације (Luzzatto и Battistuzzi, 1985; Jeffery et al., 1993).

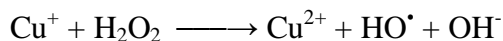
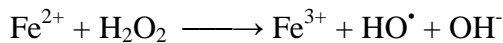
### 2.3.2.2 Неензимски систем антиоксидативне заштите

Неензимски антиоксиданти се условно могу поделити на две групе: 1) металопротеине или високомолекуларне антиоксиданте и 2) нискомолекуларне антиоксиданте. Према пореклу они могу бити ендогени и егзогени. Ендогени антиоксиданти имају кључну улогу у одржавању нормалних ћелијских функција и општег здравља организма. Међутим, због изложености неповољним условима спољашње средине, веома често ендогени извори антиоксиданата нису довољни, па су дијетални антиоксиданти неопходни за нормално функционисање организма. Једном речју, људски антиоксидативни одбрамбени систем је некомплетан без дијеталних антиоксиданата. Процењује се да би више од две трећине случајева канцера код људи, насталих услед мутације гена, могло бити спречено променом начина живљења, што подразумева повећани унос хране богате природним антиоксидантима (Ratnam et al., 2006).

#### *Металопротеини*

Металопротеини су високомолекуларни антиоксиданти који имају способност да спрече стварање слободних радикала тако што везују слободне јоне метала (углавном гвожђа и бабра) у форме које им онемогућавају каталитичко деловање (Halliwell и Gutteridge, 2007). Углавном се налазе екстрацелуларно, у плазми, и чине веома значајан део антиоксидантне заштите, будући да су антиоксидативни ензими углавном смештени у ћелијама (Ђukić, 2008). Гвожђе и бакар су есенцијални нутријенти, налазе се у свим ћелијама и улазе у структуру многих ензима и протеина. Као прелазни елементи, имају способност промене оксидационог стања и подложни су оксидо-редукционим реакцијама у којима долази до трансфера једног електрона. Ова особина им омогућава да служе као простетичне групе у ензимима који катализују редокс реакције. Међутим, због исте особине ови метали могу имати и прооксидативни ефекат, утичући на

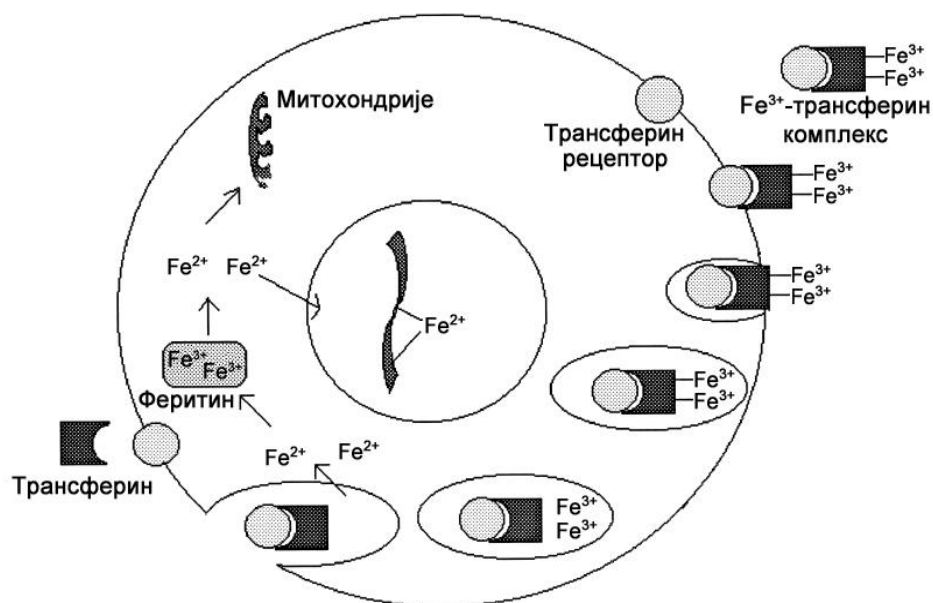
стварање слободних радикала (Meneghini, 1997). На пример, бакар и гвожђе учествују у Фентоновој реакцији у којој настаје веома реактивни хидроксил радикал (HO<sup>•</sup>):



Константа брзине Фентонове реакције је већа у случају бакра него у случају гвожђа, али је гвожђе значајнији извор хидроксил радикала због много веће заступљености у биолошким системима (Mello-Filho и Meneghini, 1991; Sandström et al., 1994). Комбинација доступности гвожђа и повећане продукције интермедијера редукције кисеоника, као што су водоник пероксид и супероксид радикал, утиче на повећање стварања прооксидативних врста у ћелији. Спречавање прооксидативног дејства гвожђа и бакра постиже се њиховим везивањем у редокс-неактивне комплексе помоћу протеина и непротеинских хелирајућих агенаса. Најважнији антиоксидативни протеини који регулишу ниво гвожђа и бакра у ћелији су трансферин, феритин и церулоплазмин (Arosio и Levi, 2002; Chauhan et al., 2004).

**Трансферин** се највећим делом синтетише у јетри, а његову синтезу стимулише ниска концентрација серумског гвожђа, естрогени и кортикостероиди (Ђukić, 2008). Углавном се налази у серуму, док се у малим концентрацијама налази и у другим телесним течностима. Трансферин је мономерни гликопротеин чија је основна функција транспорт гвожђа кроз циркулацију до циљних ћелија у облику дифери-трансферин комплекса (Loeffler et al., 1995) (слика 15). При нормалним физиолошким условима, трансферин се налази у великом вишку у односу на гвожђе, тако да је концентрација „слободног“ гвожђа у плазми практично нула. Трансферин у транспорту гвожђа има двојаку функцију: а) преводи у води веома нерастворни Fe<sup>3+</sup> у растворни дифери-трансферин комплекс и б) омогућава насталом комплексу да буде препознат од стране трансферин рецептора (мембранског протеина који омогућава улазак дифери-трансферин комплекса у ћелију). Fe(III)-трансферин-трансферин рецептор макрокомплекс се енкапулише у ендозом у коме се Fe<sup>3+</sup> ослобађа и редукује у много растворљивији облик Fe<sup>2+</sup> (слика 7) (Watkins et al., 1992). Регулишући ниво слободног феро јона у ћелији трансферин делује као веома важан антиоксидативни протеин.





Слика 15. Транспорт гвожђа у ћелију преко трансферина (Meneghini, 1997)

**Феритин** има кључну улогу у метаболизму гвожђа и представља његов главни депо у организму. Састоји се од 24 субјединице које су распоређене на тај начин да граде шупљу сферу, у чију унутрашњост двовалентно гвожђе доспева кроз поре на површини молекула. У унутрашњости молекула Fe<sup>2+</sup> се оксидује у фери-оксихидроксид који образује кристално језгро које може да садржи до 4500 атома гвожђа. С обзиром да је гвожђе смештено у унутрашњости макромолекула, онемогућена је његова интеракција са другим молекулима (Arosio и Levi, 2002). Способност феритина да везује гвожђе даје му двојаку функцију: а) чување резерви гвожђа и б) детоксификација ћелија уклањем вишка гвожђа (Harrison и Arosio, 1996). Због важности функција које обавља заступљен је у свим ћелијама, и у зависности од потреба организма, може брзо да веже или ослободи гвожђе захваљујући брзим реакцијама оксидације или редукције.

**Церулоплазмин** је α<sub>2</sub>-серум гликопротеин који има главну улогу у метаболизму бакра и служи за транспорт око 95 % бакра у крви. Овај протеин представља стабилан резервоар бакра у нетоксичном облику, а његова антиоксидативна активност се огледа у спречавању липидне пероксидације и стварања слободних радикала (Chauhan et al., 2004). Такође, показује и ензимску активност фероксидазе (катализује оксидацију Fe<sup>2+</sup> у Fe<sup>3+</sup>), чиме омогућава

везивање гвожђа за трансферин. Из тог разлога, недостатак бакра је у интеракцији са анемијом због смањеног искоришћења гвожђа (Stalović et al., 2013).

### ***Нискомолекуларни антиоксиданти***

Нискомолекуларни антиоксиданти су хетерогена група супстанци у коју се убрајају глутатион, витамин Е, витамин Ц,  $\beta$ -каротен, коензим Q10, витамин К, пиролохинолин хинон (PQQ), мокраћна киселина, билирубин,  $\alpha$ -липоинска киселина и дихидролипоинска киселина и њихови аналози, биогени амини, естрогени, деривати хистидина, индоли и једињења слична индолу, меланини,  $\alpha$ -кетокиселине, мелатонин и фенолна једињења. Наведена једињења реагују са слободним радикалима и оксидантима инактивишући их, чиме штите виталне молекуле од оксидативних оштећења. Према растворљивости могу се поделити на растворне у води и растворне у липидима (Grune et al., 2005).

**Глутатион** је трипептид ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин - GSH) који се налази у цитоплазми, једру и митохондријама и претставља главни ендогени антиоксиданас у ћелијама. Најраспрострањенији је непротеински тиол у ћелијама, а главно место његове синтезе у организму је јетра. GSH има неколико веома важних физиолошких функција које проистичу из две његове структурне специфичности: 1) има слободну тиолну групу и 2) садржи неспецифичну  $\gamma$ -глутамил пептидну везу између глутамата и цистеина. Слободна тиолна група чини глутатион једним од најбољих редокс пуфера у ћелији, док присуство  $\gamma$ -пептидне везе штити GSH од деградације помоћу уобичајених целуларних аминопептидаза и омогућава му учествовање у транспорту аминокиселина.  $\gamma$ -пептидна веза се искључиво хидролизује дејством  $\gamma$ -глутамил транспептидазе (Sastre et al., 2005). Најважније функције глутатиона у ћелији су: а) делује као коензим и учествује у транспорту аминокиселина, б) учествује у метаболизму и одржавању тиолних група протеина и нискомолекуларних једињења као што су цистеин и коензим А, в) регенерише аскорбинску киселину и одржава је у редукованом облику, г) учествује у формирању дезоксирибонуклеотида, д) врши детоксификацију регулишући ензиматски (GSH-S-трансферазе) или неензиматски са токсичним једињењима при чему настају GSH конјугати, њ) штити организам од оксидативних оштећења, при чему неензиматски реагује са реактивним

кисеоничним врстама или учествује у разградњи пероксида као супстрат глутатион пероксидазе (Anderson, 1998) (слика 16).



Слика 16. Метаболизам и основне функције глутатиона

**Мокраћна киселина** је крајњи продукт метаболизма пуринских нуклеотида и представља важан физиолошки антиоксидант, доприносећи око 60 % укупном антиоксидативном капацитету плазме здравих људи. Током еволуције њена концентрација је у сталном порасту и сматра се да је заменила аскорбинску киселину као главног антиоксиданта у метаболизму људског организма. Након проласка кроз филтрацију у бубрезима, тело реасорбује око 90 % мокраћне киселине, што довољно говори о важности функција које обавља у организму (Carocho и Ferreira, 2013). Антиоксидативна активност мокраћне киселине се огледа у следећем: штити еритроците од оштећења синглетним кисеоником или *t*-бутилхидропероксидом, инхибира липидну пероксидацију, смањује оксидацију хемоглобина нитритима, инхибира оксидативну деградацију хијалуронске киселине, штити ДНК од слободнорадикалских оштећења, инхибира оштећења база нуклеинских киселина изазваних озоном и везује јоне прелазних метала у слабо реактивне комплексе. Мокраћна киселина може да дифундује и у ћелије, тако да своје деловање може да испољи и интрацелуларно (Kaur и Halliwell, 1990).

**Коензим Q10** је једињење из групе убихинона, а његова фенолна структура омогућава му антиоксидативно деловање. Синтезише се у организму

али се уноси и путем хране. Есенцијални је део митохондријалног електрон-транспортног ланца у коме служи као носач електрона и протона, због чега је лоциран у унутрашњој мембрани митохондрија, али се такође налази и у другим ћелијским мембранама и у липопротеинима (Grune et al., 2005). Налази се у три биолошки релевантна облика: потпуно оксидовани хинон, делимично редукован семихинон радикал (убисемихинон) и потпуно редуковани убихинол. Коензим Q10 врши превенцију формирања липидних пероксил радикала, али такође може и да неутралише већ формиране пероксил радикале. Друга важна функција коензима Q10 је регенерација витамина Е и Ц (Turunen et al., 2004).

**Витамин К** је липосолубилни витамин који се у организму складишти у масним ткивима и јетри. Може се наћи у три молекулска облика за које је заједничко присуство 2-метил-1,4-нафтохинонског прстена, али се међусобно разликују по структури бочног ланца: 1) витамин К1 (филохинон), 2) витамин К2 (менахинон) и 3) витамин К3 (менафтон или менадион, синтетски облик који се алкилацијом преводи у менахинон) (Shearer, 1995). Поред основних биолошких функција (активација протромбина и коагулација крви и учествовање у синтези коштаног протеина остеокалцина) витамин К има и значајну антиоксидативну активност делујући као инхибитор липидне пероксидације. Витамин К-хидрохинон је око 10 пута активнији од  $\alpha$ -токоферола у реакцији са феноксирадикалима и око 100 пута ефикаснији од убихинола у регенерацији витамина Е (Mukai et al., 1992; Mukai et al., 1993).

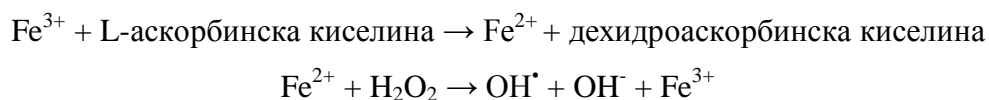
**$\alpha$ -Липоинска киселина** је ендогени тиол и представља есенцијални део декарбоксилативних ензима  $\alpha$ -кетокиселина. Не припада групи есенцијалних нутријената јер могу да је синтетишу и животиње и људи. У организму се налази и у оксидованом и у редукованом облику, при чему и један и други имају антиоксидативна својства (Grune et al., 2005). Липоинска и дихидролипоинска киселина учествују у редукцији оксидованог глутатиона (GSSG), дехидроаскорбинске киселине, токофероксил радикала и убихинона, врше неутрализацију ROS и RNS, и имају способност хелирања јона прелазних метала (Packer et al., 1995).

**Билирубин** је жути распадни продукт катаболизма хема, а његово антиоксидативно дејство се заснива на способности да отпусти два водоникова

атома. У физиолошким условима, билирубин је способан да редукује токофероле, успорава липидну пероксидацију, регује са супероксид ањон радикалом и RNS и битно доприноси укупном антиоксидативном капацитету плазме новорођенчади. Међутим, у вишим концентрацијама билурибин има токсично дејство (Yeşilkaaya et al., 1998; Nakagami et al., 1993).

**Витамин Е** је веома важан есенцијални липосолубилни антиоксидант, налази се у липопротеинским честицама а акумулира се у јетри и у масним ћелијама. Под витамином Е обично се подразумева његова најзаступљенија форма -  $\alpha$ -токоферол. Међутим, он представља групу од осам природних токоферола ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\sigma$ -токоферол) и токотриенола ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\sigma$ -токотриенол). Липосолубилност и молекуларна структура витамина Е омогућавају му да као антиоксидант делује у ћелијским и митохондријалним мембранама, штитећи их од липидне пероксидације и дејства слободних радикала. Антиоксидативна активност токоферола заснива се на могућности да отпусте два протона при чему прелазе у слободнорадикалски облик - токоферил радикал. Токоферил радикал се стабилизује делокализацијом неспареног електрона и као такав не реагује са другим молекулима и не изазива даља оштећења. Регенерација витамина Е се обавља редуктантима као што су убихинол, аскорбинска киселина, глутатион и дихидролипоинска киселина (Kagan et al., 1990; Coombes et al., 2001).

**Витамин Ц** (аскорбинска киселина) је најјачи хидросолубилни антиоксидант и представља есенцијални нутријент за људски организам. Два најважнија антиоксидативна дејства витамина Ц су: спречавање пероксидације липида коју изазивају хидроксилни радикали и неутралисање инфламаторних фактора оксидативног стреса (Packer, 1997). Поред тога, аскорбинска киселина има способност да регенерише оксидоване форме глутатиона, витамина Е и  $\beta$ -каротена. Међутим, уколико је присутан у великој количини и у условима повећане концентрације метала, витамин Ц може деловати и прооксидативно, редукујући  $\text{Fe}^{3+}$  у  $\text{Fe}^{2+}$  и условљавајући Фентонову реакцију и настајање хидроксил радикала:



**Фенолна једињења** престављају веома бројну и хетерогену групу молекула, при чему се у биљкама синтетише више од 10000 различитих фенола. Због значаја фенолних једињења за тему ове дисертације, ова група антиоксиданата ће бити обрађена у посебном поглављу.

## 2.4 ФЕНОЛНА ЈЕДИЊЕЊА

Феноли су једна од најпознатијих група природних антиоксиданата у научној литератури. То су хемијска једињења која садрже бар један ароматични прстен ( $C_6$ ) са једном или више директно везаних хидроксилних група. Најједноставнији из ове класе једињења су монофеноли који садрже само једну хидроксилну групу. Бифеноли имају две хидроксилне групе директно везане за ароматични прстен, док се под појмом полифеноли подразумевају фенолна једињења са више од две овакве хидроксилне групе. Постојање великог броја познатих структура фенола (више од 10000 различитих једињења) објашњава се њиховом могућношћу да стварају различите комплексне гликозиде, променљивом стехиометријом молекула и њиховом способношћу да формирају полимере. Огромна већина фенола је растворљива у води и у гликозидном облику се налази смештена у вакуолама, док је мањи део липофилан (флавоноли, флавонол метил естри) и растворљив у восковима и налази се у епидермису биљака (Saltveit, 2010).

Фенолна једињења настају као продукти секундарног метаболизма биљака, а њихово присуство у анималним ткивима је последица конзумирања биљне хране (Shahidi и Naczk, 2003). У биљкама имају бројне физиолошке и еколошке функције, а неке од најважнијих су:

1) утичу на раст и развој биљака учествовањем у регулацији транспорта ауксина (биљни хормон задужен за раст и развој на свим нивоима, од целуларног, преко органа до целе биљке);

2) омогућавају адаптацију биљака на промене биотичког и абиотичког окружења;

3) феноли присутни у кутикули и епидермалним ћелијама штите осетљиве састојке биљних ћелија (ДНК, РНК, итд.) од штетног UV зрачења и могуће светлосне деструкције; двоструке везе ароматичног прстена ефикасно апсорбују

UV зрачење, а флавоноиди представљају главне компоненте овог хемијског штита; повећање интензитета зрачења из UV области стимулише синтезу и акумулацију флавоноида у вакуолама епидермалних ћелија, а такође интензивира и синтезу флавонола са већим бројем хидроксилних група који се одликују повећаним антиоксидативним капацитетом;

4) обојени полифеноли, нарочито антоцијани, имају веома важну улогу у привлачењу опрашивача (служе као атраканти за полинаторе);

5) акумулација танина има за циљ одбијање хербивора (биљоједа); наиме, танинске материје доприносе стварању трпког укуса и интерагују са протеинима инхибирајући дејство одређених дигестивних ензима чиме се смањује сварљивост;

6) одређени полифеноли (кумарини, фитоалексини, лигнин) штите биљке од патогена, инсеката и других биљних компетитора;

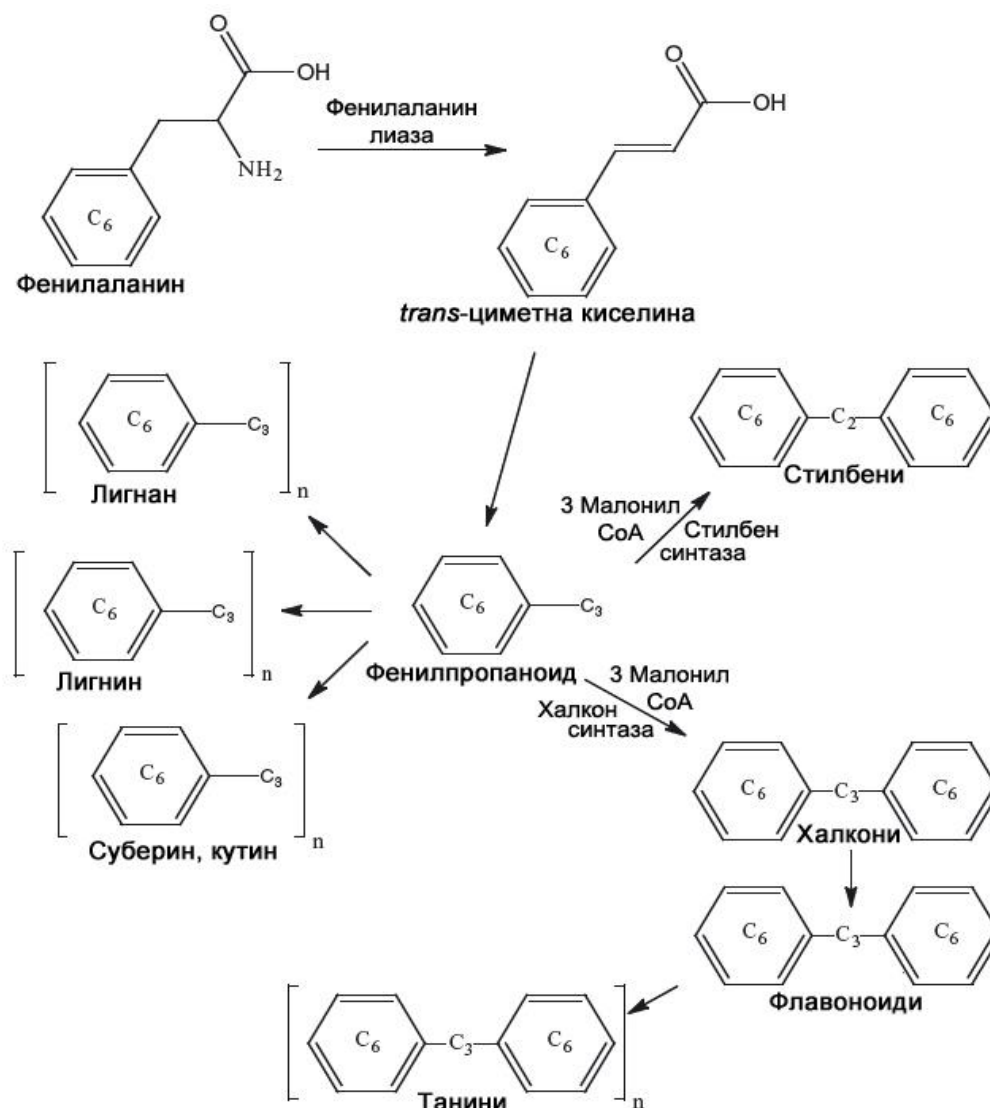
7) лигнин обезбеђује механичку стабилност биљака, и заједно са кутином и суберином спречава прекомерно исушивање; такође, он доприноси чврстоћи плодова, штитећи их од механичких повреда и напада инсеката и патогена;

8) полифеноли поседују јаке антиоксидативне карактеристике и имају улогу у ублажавању оксидативног стреса (нарочито после бербе, за време складиштења), продужавајући рок употребе плодова (Lattanzio et al., 2008).

### 2.4.1 Биосинтеза фенолних једињења

Биосинтеза фенолних једињења одвија се преко два метаболичка пута: а) метаболичког пута шикиминске киселине и б) метаболичког пута малонске киселине (ацетогенински пут). Метаболички пут шикимске киселине представља главни хемизам биосинтезе фенолних једињења у биљкама, док је ацетогенински пут значајан извор фенола код гљива и бактерија, а мање је значајан код виших биљака (Saltveit, 2010). Циклус шикиминске киселине почиње реакцијом еритроза-4-фосфата (насталог у пентоза фосфатном путу) и фосфоенолпирувата (насталог у процесу гликолизе), а након низа сложених биохемијских реакција настаје шикиминска киселина из које даље настају аминокиселине фенилаланин и тирозин. Фенилаланин и тирозин су прекурсори највећег броја фенолних

једињења, а њиховом деаминацијом настају једињења са  $C_6-C_3$  структуром, која се заједнички називају фенолпропаноиди (слика 17).

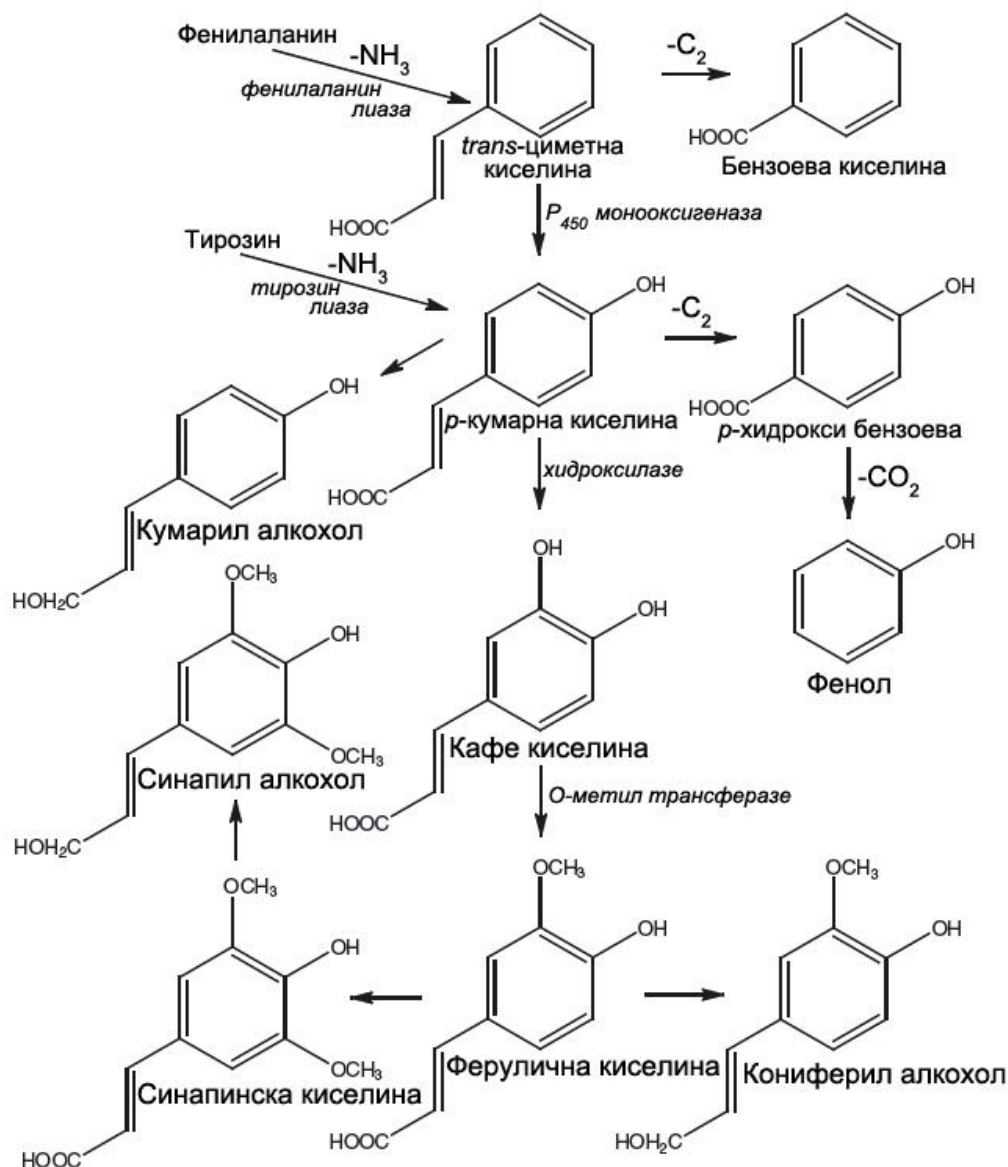


Слика 17. Синтеза фенолпропаноида од фенилаланина (Craft et al., 2012)

Фенилаланин је примарни супстрат за синтезу фенолпропаноида код већине биљака, док деаминацију тирозина могу да врше само биљке из породице трава (*Poaceae*) (Dewick, 2002). Ензим фенилаланин амонијум лиаза катализује реакцију деаминације фенилаланина при чему настаје циметна киселина, која се даље трансформише до осталих  $C_6-C_3$  фенолпропаноида, кумаринске, кафеинске, феруличне и синапинске киселине и њихових деривата. Кумарини настају из циметне киселине преко *trans*-2-кумаринске киселине, циклизацијом која обухвата неензимску трансформацију природног *trans*-облика у *cis*-изомер.



Редукцијом феруличне киселине настаје кониферил алкохол, важан прекурсор лигнина (слика 18) (Patt и Volwell, 2000).

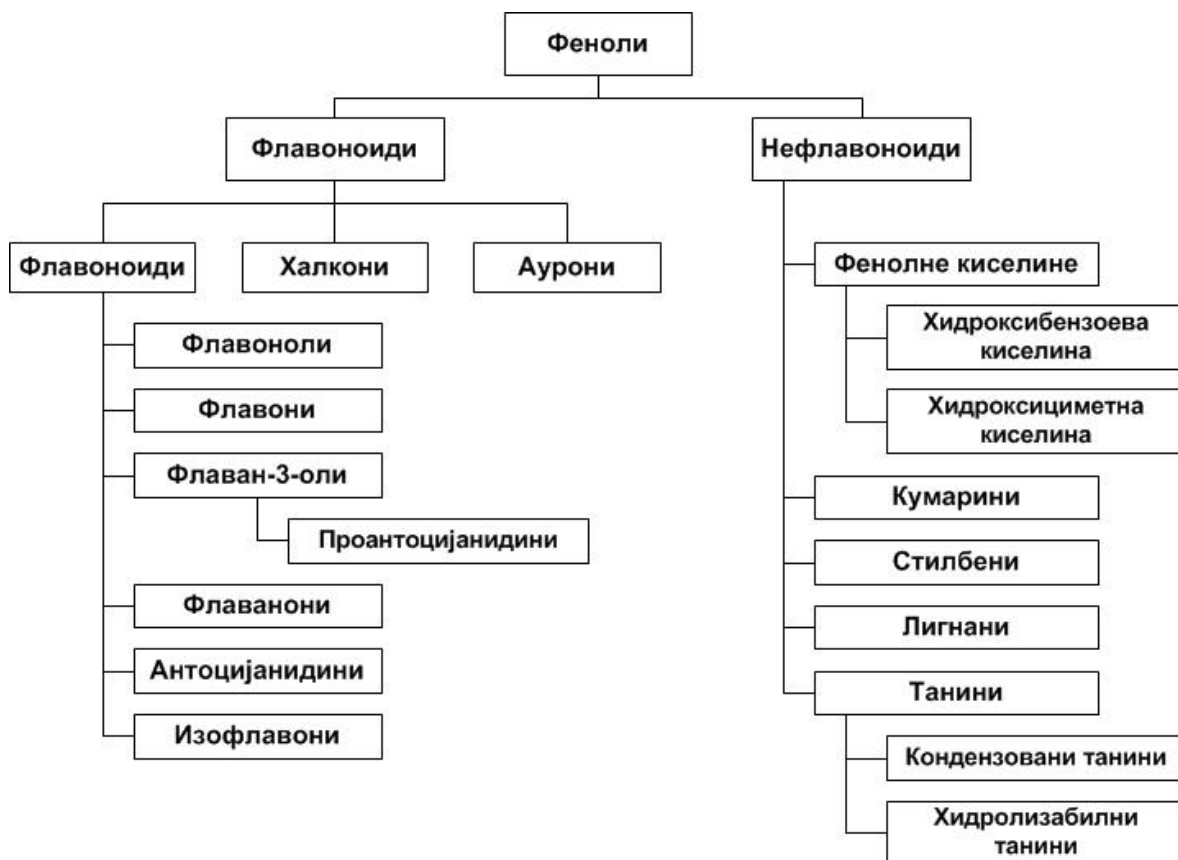


Слика 18. Синтеза неких фенолних киселина (Craft et al., 2012)

## 2.4.2 Класификација и карактеристике фенолних једињења

Традиционално, фенолна једињења се деле на две главне групе: **флавоноиде** и **нефлавоноиде** (слика 19). Флавоноиди су полифенолна једињења са 15 угљеникових атома и са C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> структуром, код којих су два ароматична прстена међусобно повезана трикарбонским мостом. На основу опште структуре могу се поделити на три групе: праве флавоноиде, халконе и ауроне. Прави

флавоноиди (у даљем тексту само флавоноиди) се на основу модификација централног С-прстена деле на: флавоноле, флавоне, флаван-3-оле, флаваноне, изофлаване и антоцијанидине (слика 20). Најважнија фенолна једињења од дијеталног значаја из групе нефлавоноида су: деривати хидроксibenзоеве киселине (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), деривати хидроксициметне киселине (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) и стилбени (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Поред поменутих једињења, овој групи припадају и кумарини, лигнани и лигнини, танини и нека друга мање распрострањена једињења (Andrés-Lacueva et al., 2010; Jaganath и Crozier, 2010).

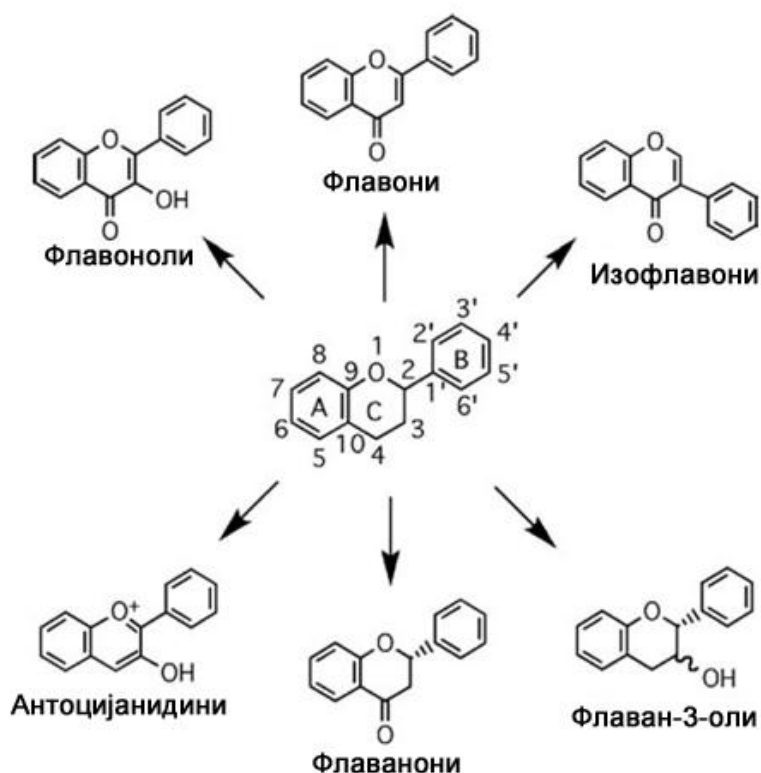


Слика 19. Класификација фенолних једињења (Vermerris и Nicholson, 2007; Jaganath и Crozier, 2010)

### 2.4.2.1 Флавоноиди

Флавоноиди имају скелетон дифенилпропана, код кога су два бензенова прстена (А и В, слика 20) повезана трикарбонским мостом, који у случају правих флавоноида са прстеном А гради затворен пирански прстен. Код аурона трикарбонски мост са прстеном А гради фурански прстен, док је код халкона

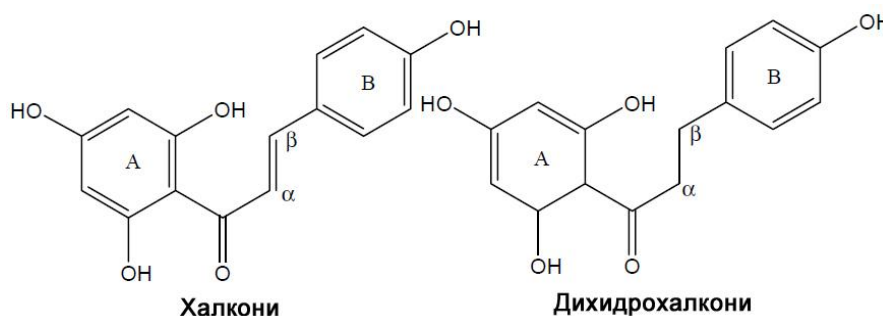
трикарбонски мост линеаран. Прави флавоноиди се обично налазе у облику гликозида, углавном са глукозом и рамнозом, али се такође везују и са галактозом, арабинозом, ксилозом, глукуронском киселином итд. Број гликозидних јединица се обично креће од једне до три, мада су идентификовани и флавоноиди са четири и пет гликозидних јединица (Vallejo et al., 2004). Структурне карактеристике прстена В и могућност хидроксилације и гликозилације на А, В и С прстену, чине флавоноиде највећом и најразноврснијом групом фитохемикалија. Тачан број флавоноида није утврђен, а сматра се да се он креће у распону од 2000 до 6500 (Tsao и McCallum, 2010).



Слика 20. Структуре главних подгрупа флавоноида (Jaganath и Crozier, 2010)

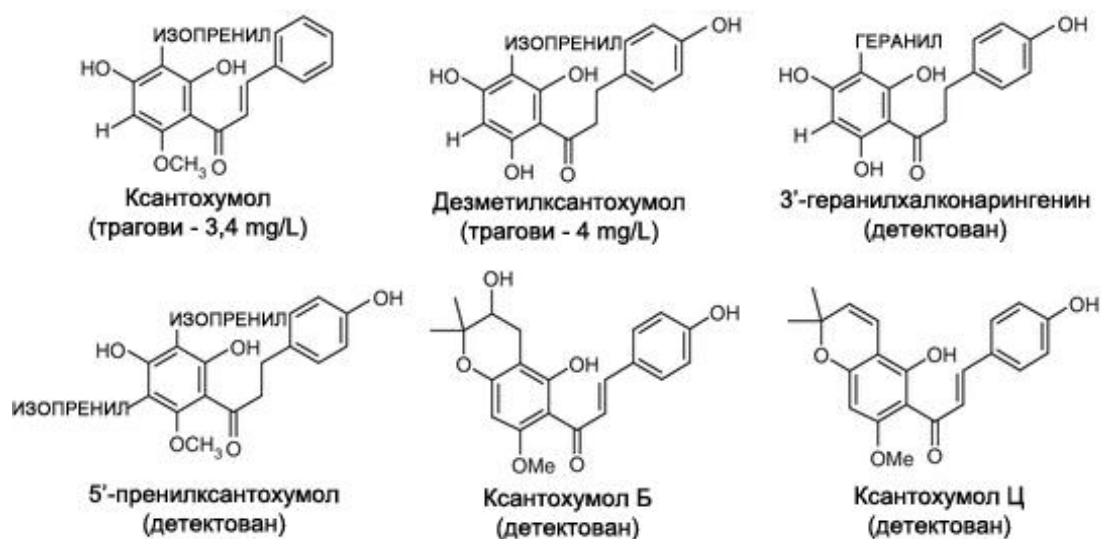
### Халкони

Халкони и дихидрохалкони имају линеаран  $C_3$  ланац који повезује два ароматична прстена, при чему је код халкона  $C_3$  ланац незасићен а код дихидрохалкона засићен (слика 21). Халкони су прекурсори у синтези флавоноида и изофлавоноида (слика 17) и широко су распрострањени у биљном свету.



Слика 21. Структуре халкона и дихидрохалкона

Због веома широког спектра биолошких активности (антиоксидативна, антимикробна, антилајшманска, антиканцерогена, антиангиогена, антиинфективна и антиинфламаторна) и могућности синтезе халкон аналога у медицинске сврхе, ова једињења су последњих деценија предмет великог интересовања (Detsi et al., 2009). Најпознатији природни биоактивни халкон је ксантохумол, који се једино налази у цвастима женских биљака хмеља (шишарицама хмеља), због чега је пиво главни дијетални извор овог једињења (слика 22). С обзиром да је хмељ једини извор ових једињења у пиву, највећи



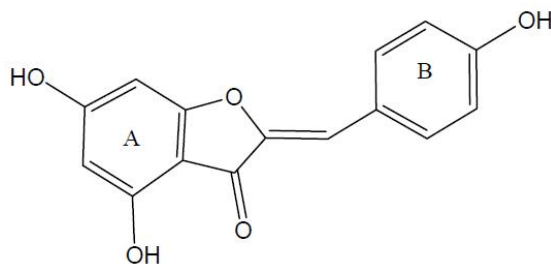
Слика 22. Халкони идентификовани у пиву (Collin et al., 2013)

утицај на њихов садржај у пиву имају сорта хмеља, величина дозирања и начин хмељења. Ксантохумол је једноставни прениловани халкон, а највећу пажњу је привукао због своје веома изражене антиканцерогене активности (Stevens и Page, 2004). Повећањем садржаја  $\alpha$ -киселина у хмељу повећава се и концентрација ксантохумола (De Keukeleire et al., 2003). Ксантохумол током процеса кувања

сладовине веома лако изомеризује у изоксантохумол (припада групи флаванона), тако да само 15 до 50 % од садржаја ксантохумола у хмељу остаје у финалном пиву (Biendl et al., 2002; Biendl et al., 2004). *Stout* и *Porter* типови пива имају нешто већи садржај ксантохумола јер тамни сладови садрже једињења која инхибирају његову изомеризацију (Walker et al., 2003). Употребом хмељних производа обогаћених ксантохумолом у комбинацији са каснијим хмељењем могуће је значајно повећати садржај ксантохумола у пиву.

### Аурони

Аурони, (*Z*)-2-бензилиден-бензофуран-3-(2H)-они, настају циклизацијом халкона где *meta*-хидроксил група реагује са  $\alpha$ -угљеником при чему настаје петочлани хетероциклични прстен (слика 23) (Vermerris и Nicholson, 2007). Ово је једна од најмање проучаваних група флавоноида и веома је ретка у природи. Заступљени су углавном у биљкама цветницама, неким папратима, маховинама и мрким морским алгама, а до сада је описано око 100 природних аурана (Huang et al., 2008). Одговорни су за светло жуту боју неких украсних цвећа, а најпознатији представници ове групе једињења су ауреусидин, сулфуретин и маритиметин (Detsi et al., 2009).

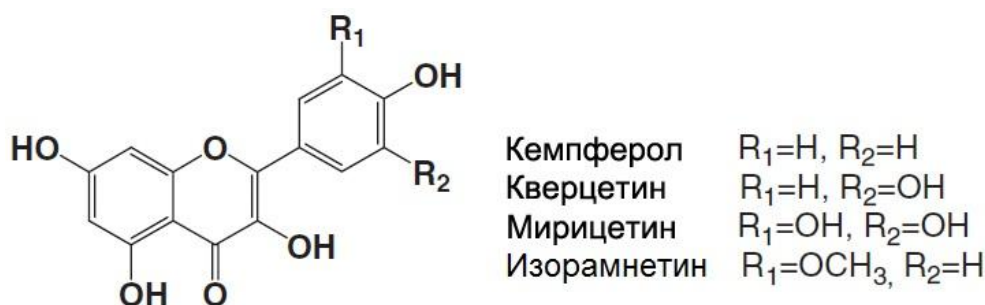


Слика 23. Структура аурана

### Флавоноли

Флавоноли су најраспрострањенији флавоноиди у биљној храни. На С прстену имају двогубу везу између другог и трећег угљениковог атома и кето групу на позицији 4 (слика 24). Њихова синтеза стимулисана је сунчевом светлошћу, па се углавном акумулирају у спољашњим ткивима воћа и поврћа. Valant-Vetschera и Wallenweber (2006) су описали 393 флавонол агликона, који су веома разноврсни у погледу начина хидроксилације и метилације. Флавоноли се

скоро увек налазе у форми гликозида, а од присутне шећерне јединице зависи њихова биодоступност. Боја им варира од беле до жуте, а најпознатији флавонол агликони су кверцетин, мирицетин, кемпферол и метиловани дериват изорамнетин. Од свих флавонола, најзаступљенији су гликозиди кверцетина и кемпферола, којих има најмање 279 и 347, респективно (Williams, 2006).

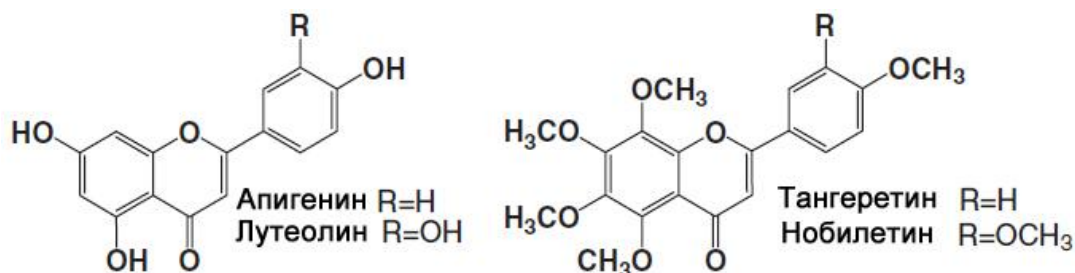


Слика 24. Најзначајнији флавоноли (Tsao и McCallum, 2010)

Грожђе (*Vitis vinifera*) и производи од грожђа садрже велики број различитих флавонола, а у највећој количини су присутни кверцетин, мирицетин, кемпферол, изорамнетин, кверцетин-3-*O*-глукозид, кверцетин-3-*O*-глукуронид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кемпферол-3-*O*-глукозид и кемпферол-3-*O*-галактозид (Makris et al., 2006). Флавоноли присутни у пиву највећим делом потичу из хмеља, и налазе се у облику гликозида (Boulton, 2013). У хемљу је детектовано 16 флавонол гликозида, углавном моно, ди и тригликозида кверцетина и кемпферола, док је мирицетин пронађен само у траговима. Иако се током кувања сладовине из хмеља екстрахује око 91 % кемпферол и 88 % кверцетин гликозида, концентрација ових једињења у финалном пиву је само неколико ppm (Callemien и Collin, 2009).

### Флавони

Флавони су структурно веома слични флавонолима, а разликују се једино по одсутности хидроксилне групе на C<sub>3</sub> атому C-прстена (слика 25). За разлику од флавонола, нису широко распрострањени, а њихови најважнији представници су апигенин и лутеолин са својим гликозидима. У највећим концентрацијама су присутни у першуну, целеру и артичокама. Полиметокси флавоноли, као што су нобилетин, skutelarein, синенсетин и тангеретин налазе се искључиво у citrusима (Jaganath и Crozier, 2010).



Слика 25. Најважнији представници флавана (Tsao и McCallum, 2010)

### Флаванони

Флаванони имају сличну структуру као флаволи, са том разликом што флаванони немају двогубу везу између позиција 2 и 3. Такође се називају и дихидрофлаволи, и представљају релативно малу подгрупу флавоноида.

Структура флаванона је изузетно реактивна и подлеже реакцијама хидроксилације, гликозилације и о-метилације. Неки флаванони могу бити супституисани на јединствен начин, као што су прениловани флаванони, фуранофлаванони, пиранофлаванони и бензиловани флаванони, чиме настаје велики број супституисаних деривата (Grayer и Veitch, 2006). Хмељ је главни извор флаванона у пиву, а најзаступљенији су пренил флаванони, изоксантохумол, 6-пренилнарингенин и 8-пренилнарингенин (хопеин) (слика 26).



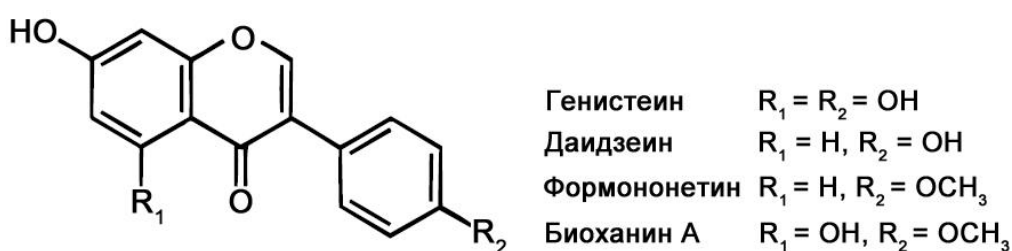
Слика 26. Неки од флаванона идентификованих у пиву (Collin et al., 2013)

Нарингенин и 6-геранилнарингенин су у пиву детектовани само у траговима. 8-пренилнарингенин настаје изомеризацијом дезметилксантохумола, а последњих

година је привукао велику пажњу као један од најјачих фитоестрогена са потенцијално великом биомедицинском применом (Stevens и Page, 2004). Што се тиче присуства флаванона у воћу, они се углавном налазе у цитрусима у облику гликозида, а најраспрострањенији су гликозиди нарингенина, хесперетина и ериодиктиола (Jaganath и Crozier, 2010).

### Изофлавоноиди

За разлику од других флавоноида, изофлавоноиди имају В прстен везан на позицији 3 за С прстен. Веома су ограничено распрострањени у биљном свету и у значајним количинама се налазе једино у легуминозама (махунаркама): соји и производима од соје, и у мањим количинама у пасуљу и бобу (Graham, 1991). Поседују естрогенску активност, а већу пажњу су привукли након открића да имају превентивно дејство код канцера дојке и остеопорозе (Barnes, 2003). Изофлавоноиди генистеин и даидзеин су први пут детектовани у пиву 1992. године (Rosenblum et al., 1992), а нешто касније њихово присуство је потврђено у 26 узорака пива заједно са њиховим прекурсорима формонетин и биоханином А (Larčík et al., 1998) (слика 27). Концентрација формонетина је била око четири пута већа од концентрације даидзеина, док су генистеин и биоханин А имали сличне концентрације. Порекло ових фитоестрогена у пиву још увек није потпуно разјашњено, али се претпоставља да њихов извор могу бити и слад и хмељ (Larčík et al., 1998; Tekel' et al., 1999).



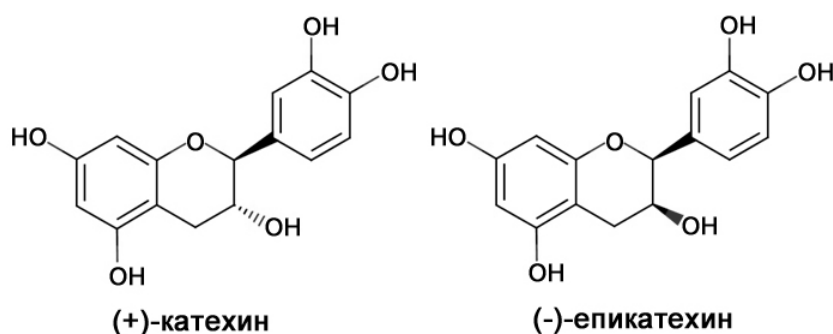
Слика 27. Изофлавоноиди идентификовани у пиву (Tsao и McCallum, 2010)

### Флаван-3-оли

Флаван-3-оли су структурно најкомплекснија подкласа флавоноида, а обухватају једињења од једноставних мономера, (+)-катехина и његовог епимера (-)-епикатехина, до олигомерних и полимерних проантоцијанидина, који су познати и као кондензовани танини (слика 28). Називају се још и флаваноли или



катехини, а зависно од стерео конфигурација везе између В прстена и угљеника на позицији 2 и хидроксилне групе на позицији 3, могу имати два епимерна облика: (+)-катехин и (-)-епикатехин са њиховим одговарајућим дериватима. Флаван-3-оли подлежу реакцијама хидроксилације при чему настају (+)-галокатехин и (-)-епигалокатехин. Такође, могу да се естерификују са галном киселином градећи катехин галате, од којих су најраспрострањенији (-)-епикатехин галат и (-)-епигалокатехин галат. Веома важна карактеристика флаван-3-ола је да граде полимере који се називају проантоцијанидини или кондензовани танини. Проантоцијанидини обично садрже од 2 до 60 мономерних јединица, које су углавном повезане C<sub>8</sub>-C<sub>4</sub> угљеничном везом. Уколико се број мономерних јединица креће од 2-7, називају се олигопроантоцијанидини (Tsao и McCallum, 2010; Jaganath и Crozier, 2010). Флаван-3-оли се у највећој мери акумулирају у покожици воћа, поврћа и других биљака, а у великој количини се налазе и у семенкама грожђа. То су најчешће конзумирани флавоноиди и сматрају се као функционални састојци различитих пића, непрерађеног и прерађеног воћа и поврћа, биљних лекова и разних суплемената. Њихово присуство утиче на формирање параметара квалитета хране, као што су трпкост, горчина, киселост, слат, вискозитет, арома и боја (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Aron и Kennedy, 2007).



Слика 28. Флаван-3-оли: катехин и епикатехин (Tsao и McCallum, 2010)

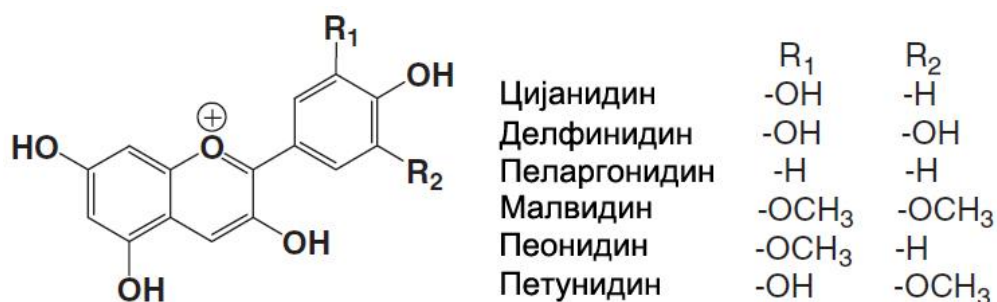
Грожђе је веома добар извор флаван-3-ола, који се налазе у покожици и семенкама, при чему је њихова концентрација у семнкама знатно већа. Покожица садржи катехине и галокатехине и њихове одговарајуће проантоцијанидине (процијанидине и проделфинидине), док се у семенкама налазе само катехини и

процијанидини. Катехин је најзаступљенији флаван-3-ол и у покожици и у семенкама, мада је код неких сорти грожђа садржај катехина и епикатехина веома сличан. Процијанидин В1 је најприсутнији олигомер у покожици, док је то у семенкама процијанидин В2 (González-Manzano et al., 2004).

Чак и у поређењу са грожђем, хмељ је изузетан извор катехина и проантоцијанидина. У сувим шишарицама хмеља и у хмељним пелетама концентрација (+)-катехина и (-)-епикатехина може бити и до 2821 и 1483 mg/kg, респективно. За разлику од хмеља, слад садржи само 10-100 mg/kg (+)-катехина, док (-)-епикатехин није детектован. Најзаступљенији флаван-3-ол у пиву је (+)-катехин (0,5-6,9 mg/l), а присутни су и (-)-епикатехин, галокатехин, галоепикатехин, (-)-катехин галат, (-)-епикатехин галат, и гликозиди катехин-7-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозид и катехин-7-*O*- $\beta$ (6"-*O*-никотиноил)- $\beta$ -D-глюкопиранозид. Хмељ је такође одличан извор и проантоцијанидина, а најприсутнији су процијанидини В3 и В4 (Callemien и Collin, 2009).

### Антоцијанидини

Антоцијанидини су агликони у води растворљивих биљних пигмената антоцијана, који су главни носиоци црвене, плаве и љубичасте боје присутне у биљном свету (слика 29).

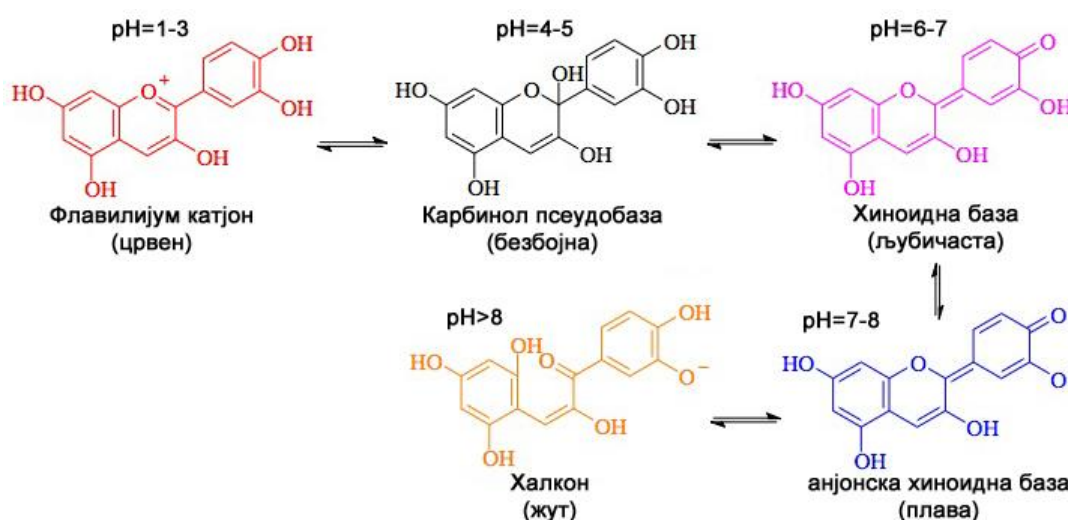


Слика 29. Структура најпознатијих антоцијанидина (Tsaο и McCallum, 2010)

Хемијски, антоцијанидини су флавилијум катјони, а у природи се углавном јављају као моно и ди гликозиди антоцијани (антоцијанидин + шећерна компонента), са шећерном компонентом везаном у положају 3 C-прстена или у положају 5 A-прстена. Антоцијани од шећера најчешће садрже глукозу, галактозу, арабинозу, ксилозу и рамнозу. За разлику од осталих флавоноида са C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>

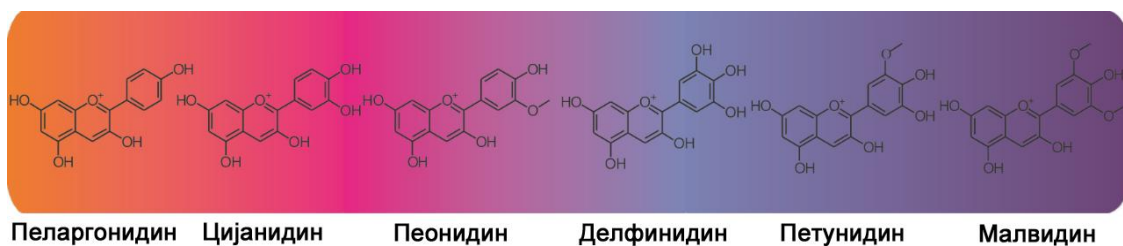
структуром, антоцијани у киселој средини имају позитивно наелектрисање. Иако је идентификовано више од 500 антоцијана, сви они потичу од 31 антоцијанидина, међу којима су само следећих шест широко распрострањени и чине основу више од 90 % антоцијана: цијанидин, делфинидин, пеларгонидин, малвидин, пеонидин и петунидин (Anderson и Jordheim, 2006).

Боја антоцијана веома зависи од рН вредности: у киселој средини (рН=1-3) налазе се у облику црвеног флавилијум катјона, при вредностима рН=4-5 прелазе у безбојну карбинол базу, а на рН=6-7 су у облику љубичастог хинона, који у алкалној средини (рН=7-8) дисосује у тамно плави анјонски облик. Са повећањем алкалности средине (рН>8) антоцијани прелазе у жуто-зелене халконе (слика 30).



Слика 30. Структурне промене антоцијана у воденом раствору у зависности од рН вредности (<http://mylespower.co.uk/2012/04/06/homemade-ph-indicator/>)

Такође, на боју антоцијана утиче и број хидроксилних група у бочном В-прстену: са повећањем броја хидроксилних група боја се помера од наранџасте до љубичасте (слика 31). Тако нпр. делфинидин са три -ОН групе има плаву боју, док је цијанидин (две -ОН групе) црвен, а пеларгонидин (једна -ОН група) светло црвене до наранџасте боје (Ananga et al., 2013). Присуство алифатичних или ароматичних ацикличких група не утиче на промену боје или благо утиче на померање ка плавој боји, али зато значајно утиче на стабилност и растворљивост антоцијана (Tanaka et al., 2008).



Слика 31. Боје уобичајених антоцијанидина ([http://chimorg-sun.blogspot.rs/2014\\_01\\_01\\_archive.html](http://chimorg-sun.blogspot.rs/2014_01_01_archive.html))

Малвидин је најзаступљенији антоцијанидин у највећем броју сорти грожђа врсте *V. vinifera* L., изузев неких мускатних култивара где је доминантни агликон цијанидин. Поред малвидин и цијанидин гликозида, у мањој мери присутни су и делфинидин и петунидин гликозиди, док је пеларгонидин-3-О-гликозид детектован само у траговима (Mazza и Miniati, 1993; He et al., 2010).

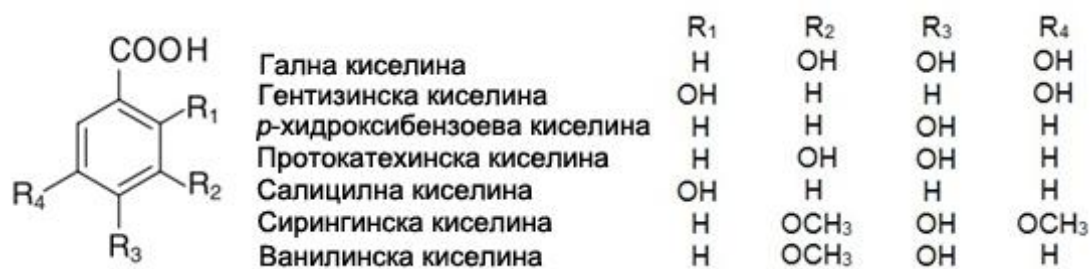
Боја прехранбених производа која потиче од антоцијана прилично је непостојана, а њена промена је углавном резултат оксидације антоцијана, њихове хидролизе или стварања соли са металима. Оксидативне промене поспешује већа количина кисеоника и повишена температура, а интензитет оксидације зависи и од врсте антоцијанидина (најосетљивији је пеларгонидин).

#### 2.4.2.2 Нефлавоноиди

Најважнија фенолна једињења од дијеталног значаја из групе нефлавоноида су фенолне киселине (деривати хидроксибензојеве киселине (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) и деривати хидроксициметне киселине (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)) и стилбени (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>).

##### Фенолне киселине

Хидроксибензојеве киселине се одликују присуством карбоксилне групе супституисане на фенол. Главни представници хидроксибензоата су гална, *p*-хидроксибензојева, гентизинска, протокатехинска, салицилна, ванилинска и сиригинска киселина (слика 32). Обично се налазе у везаном облику и типичне су компоненте комплексних структура као што су лигнин и хидролизабилни танини. Гална киселина је основна јединица галотанина, и једна од субјединица елагитанина, који се заједно означавају као хидролизабилни танини (Jaganath и Crozier, 2010).

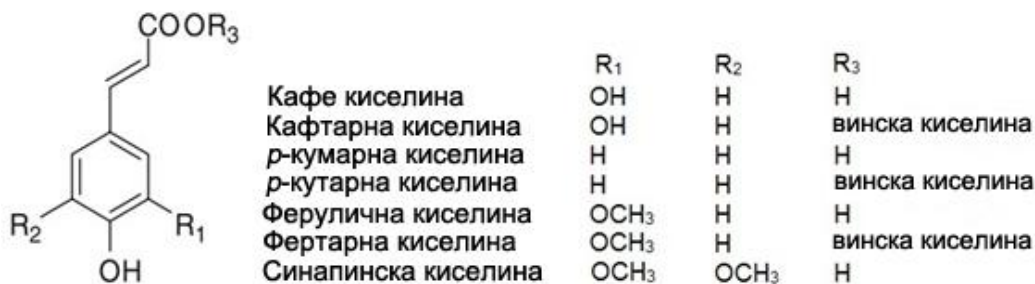


Слика 32. Деривати хидроксибензоеве киселине (Vermerris и Nicholson, 2007)

Свих седам поменутих хидроксибензоевих киселина је идентификовано у грожђу и вину, мада су салицилна и гентизинска киселина детектоване само у траговима. У грожђу се обично налазе везане у облику гликозида или естара, док су у вину претежно у слободној форми услед хидролизе комплексних молекула (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Гална киселина је једна од најзаступљенијих фенолних киселина у вину, а њен значајан извор је и хидролиза хидролизабилних и кондензованих танина (Rentsch et al., 2009).

Укупан садржај хидроксибензоевих киселина у пиву, углавном *p*-хидроксибензоеве, ванилинске и галне киселине, је обично неколико ppm-а. За разлику од пива, у сладу је најзаступљенија гентизинска киселина, док су у хмељу најдоминантније ванилинска и сирингинска киселина (Callemien и Collin, 2009).

Деривати хидроксициметне киселине садрже C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> скелетон и формално припадају групи фенилпропаноида. Могу бити присутни у *cis*- и *trans*- облику, при чему је *trans*- конфигурација много стабилнија и из тог разлога присутнија у биљном свету. Најраспрострањенији представници деривата хидроксициметне киселине су *p*-кумарна, кафеинска и ферулична киселина, које се често акумулирају у облику одговарајућих естара са винском киселином: *p*-кутарне, кафтарне и фертарне киселине (слика 33). Такође, граде и једноставне естре и са хином киселином и са глукозом.

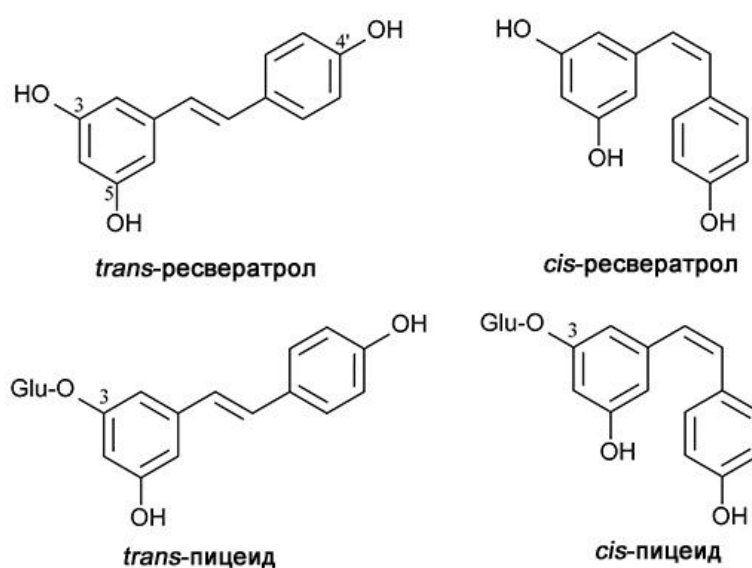


Слика 33. Деривати хидроксициметне киселине (Vermerris и Nicholson, 2007)

## Стилбени

Стилбени имају  $C_6-C_2-C_6$  структуру и представљају фитоалексине које биљке синтетишу као одговор на микробне инфекције, болести, повреде, UV зрачење и стрес. Најпознатији представници ове групе једињења су ресвератрол и његов глукозид пицеид, а оба се могу наћи у *cis*- и *trans*- облику (слика 34). Главни дијетални извор стилбена је грожђе и производи од грожђа, мада се у мањим количинама могу наћи и у другим биљкама као што су бобичасто воће, кикирики, црвени купус и спанаћ (Kolouchová et al., 1997; Jaganath и Crozier, 2010). Концентрација стилбена у грожђу и вину зависи од сорте, степена зрелости, присуства фунгалне инфекције, климе и технологије производње вина. Велику светску пажњу привукао је *trans*-ресвератрол због своје способности да инхибира или успорава велики број обољења, међу којима и кардиоваскуларна обољења и канцер.

Недавно је присуство три стилбена откривено и у шишарицама хмеља: *trans*-ресвератрола, *trans*-пицеида и *cis*-пицеида. Америчке ароматичне сорте хмеља *Willamette* и *Cascade* су се показале као најбољи извор ових једињења. Међутим, с обзиром да је ресвератрол веома осетљив на високе температуре и светлост, долази до његове деградације у процесу пелетизације хмеља, а нарочито у току кувања сладовине, тако да се само у траговима може детектовати у одређеним типовима пива (Collin et al., 2013).



Слика 34. Структуре представника стилбена (Temsamani et al., 2015)

### 2.4.3 Биолошки значај фенолних једињења

Дијетална фенолна једињења имају многе веома значајне биолошке функције, као што су заштита од оксидативног стреса и превенција у развоју бројних дегенеративних обољења (кардиоваскуларна обољења, канцер, дијабетес, остеопороза, неуродегенеративна обољења итд.). Експериментални подаци великог броја студија указују да је биолошка активност фенолних једињења непосредно повезана са њиховом веома израженом антиоксидативном активношћу. Такође, дијетални полифеноли омогућавају и индиректну заштиту организма кроз активирање ендогеног одбрамбеног система и модулацију ћелијских сигналних процеса (Han et al., 2007; Pandey и Rizvi, 2009). У поређењу са другим антиоксидантима (нпр. витамин Ц,  $\beta$ -каротен, витамин Е, итд.), истраживање утицаја фенолних једињења на здравље је почело релативно скоро, што се углавном објашњава комплексношћу њихових хемијских структура (Scalbert et al., 2005).

#### 2.4.3.1 Механизми биолошке активности фенолних једињења

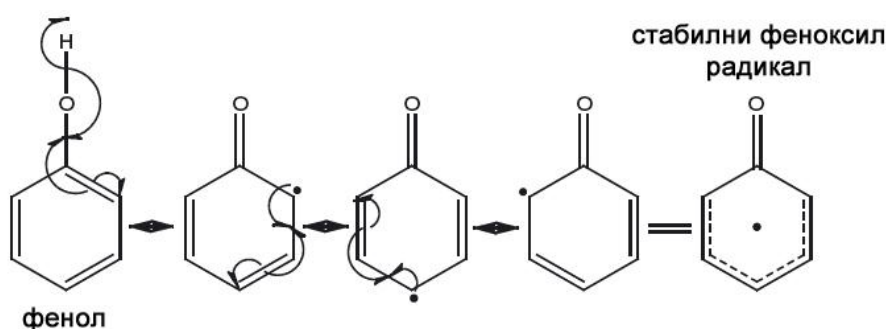
Механизми који објашњавају биолошку активност биљних фенолних једињења у анималним и хуманим ћелијама могу се поделити у две главне групе: 1) општи или неспецифични механизми, који се базирају на присуству фенолних група и 2) специфични механизми, који зависе од хемијских и структурних карактеристика активних фенола (Fraga et al., 2010).

**Неспецифични механизми** обухватају: а) деловање фенола као антиоксиданата и б) интеракције полифенола са мембранама које доводе до промена пропустљивости и електричних особина мембрана.

#### **Фенолна једињења као антиоксиданти**

Фенолна једињења су веома ефикасни антиоксиданти *in vitro* и имају могућност неутрализације великог броја различитих реактивних врста, као што су хидроксил, пероксил, супероксид радикали итд. Флавоноиди могу да инхибирају оштећење биомолекула пероксинитритом *in vitro*, мада су мање ефикасни у присуству физиолошке концентрације  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ . Наиме, пероксинитрити реагују веома брзо са  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  градећи реактивне продукте, које флавоноиди

теже успевају да неутралишу (Halliwell, 2007). Феноли и полифеноли (РОН) су веома успешни и у заустављању слободнорадикалских ланчаних реакција, од којих је свакако најважнија ланчана реакција пероксидације липида ( $\text{LOO}^\bullet + \text{РОН} \rightarrow \text{LOOH} + \text{РО}^\bullet$ ). Своју антиоксидативну ефикасност већина фенола дугује двома хемијским карактеристикама: а) постојању фенолне  $-\text{ОН}$  групе која има способност редукције слободних радикала донирањем протона (атома водоника) или трансфером једног електрона и б) ароматичној структури која омогућава резонантну стабилизацију насталог феноксил радикала ( $\text{РО}^\bullet$ ) (слика 35) (Bors et al., 1990).



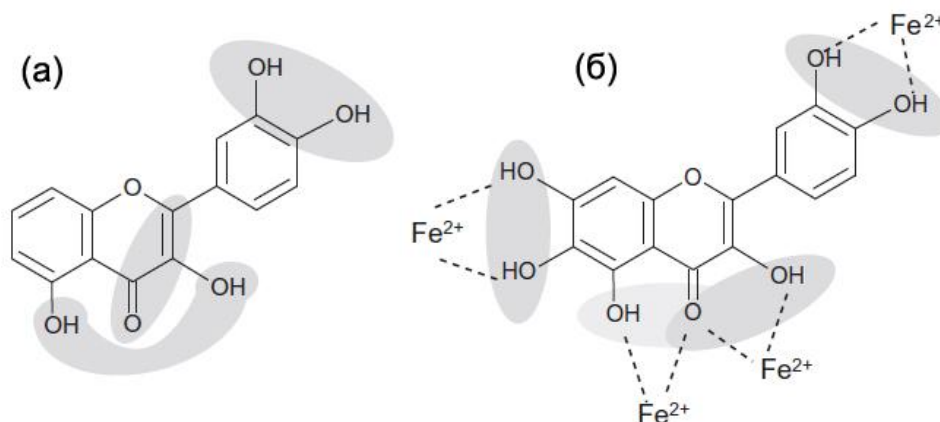
Слика 35. Резонантна стабилизација феноксил радикала (Craft et al., 2012)

Стабилност формираног  $\text{РО}^\bullet$  радикала одређује снагу „родитељског“ фенола у заустављању ланчаних реакција. Уколико је настали феноксил радикал релативно нереактиван, „родитељски“ фенол има велику моћ инхибиције или смањења липидне оксидације, док се у случају настанка високо реактивног  $\text{РО}^\bullet$  радикала „родитељски“ фенол понаша прооксидативно. На основу овога дефинисане су структурне карактеристике молекула флаваноида неопходне за максималну антиоксидативну активност: а) присуство катехол групе на прстену В (хидроксилне групе на позицијама 3' и 4'), б) двострука веза између С атома на позицијама 2 и 3 у конјугацији са кето групом на положају 4 на прстену С и ц) присуство хидроксилних група на позицијама 3 и 5 на прстеновима С и А (слика 36а).

Поред директних реакција са слободним радикалима, фенолна једињења имају способност инхибиције прооксидативног деловања редокс активних метала (најчешће гвожђа и бакра), тако што их хелирањем везују у слабо реактивне комплексе (Mira et al., 2002). На тај начин феноли делују као секундарни или



превентивни антиоксиданти: спречавају оксидацију без директне интеракције са оксидационим врстама.



Слика 36. Структурне карактеристике које дефинишу антиоксидативну активност флавоноида (Fraga et al., 2010)

Катехол групе и комбинација хидроксилних и карбонилних група су центри са највећим афинитетом према металним јонима, при чему прво место по афинитету свакако заузима 3-хидроксил-4-карбонил група, након чега следе 4-карбонил-5-хидроксил група, катехол групе на В прстену и 6-7 хидроксил групе (слика 286) (Ren et al., 2008; Perron и Brumaghim, 2009; Fraga et al., 2010). Хидроксилне групе у конјугацији са метил групама или угљенохидратним јединицама немају способност везивања јона метала (Andjelković et al., 2006). Склоност јона прелазних метала да буду хелирани је највећа код  $\text{Cu}^{2+}$ , након кога следе  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ , што је и очекивано у складу са њиховим релативним енергијама стабилизације (Mira et al., 2002).

Главна ограничење антиоксидативне активности фенолних једињења у анималним и хуманим ћелијама је њихова релативно ниска биодоступност, па чак и у случајевима конзумирања хране богате овим једињењима (Fraga, 2007). Највеће концентрације фенола које могу бити постигнуте у крви људи након конзумирања „реалне“ хране богате фенолима су у наномоларном опсегу, при чему се пик јавља 2-4 сата после конзумације (Rein et al., 2000; Holt et al., 2002; Schroeter et al., 2006). Из тог разлога, потенцијално деловање полифенола као антиоксиданата је вероватно релевантно само у органима у којима се налазе у

великој концентрацији, као што су гастроинтестинални тракт и крвни судови (Fraga, 2007; Galleano et al., 2010a).

### **Интеракције полифенола са мембранама**

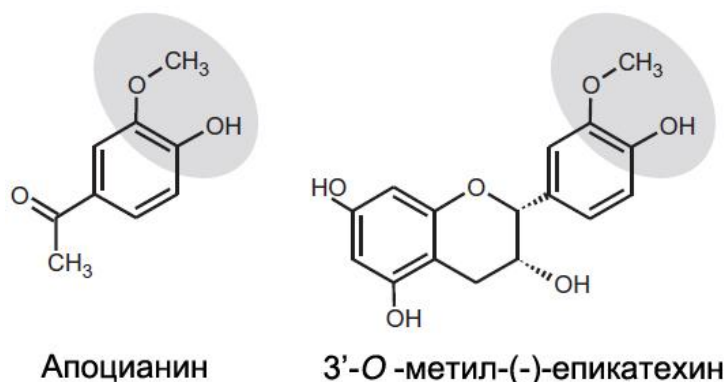
Присуство и хидрофилних и хидрофобних група код већине полифенола омогућава им везивање за протеинске и липидне компоненте ћелијских мембрана. Интеракција полифенола и мембрана може бити двојака: а) адсорбција полифенола на површину мембране и њихово везивање за хидрофилне главе молекула фосфолипида путем водоничних веза и б) улазак полифенола у двоструки слој мембрана и њихова интеракција са хидрофобним ланцима липида (Hendrich et al., 2002; Yoshioka et al., 2006; Sirk et al., 2009). Овако везани феноли могу да утичу на функције ћелије модификујући структуру мембране и њене физичке карактеристике, попут пропустљивости и наелектрисања. Настале модификације мембране могу да утичу на неколико битних функција: активност мембранских ензима, лиганд-рецептор интеракције, проток јона и/или метаболита и модулацију сигналне трансдукције. С обзиром да су фенолна једињења ефикасни антиоксиданти, адсорбцијом на мембрану могу да створе физичку баријеру за хидросолубилне антиоксиданте. Феноли који се налазе у липидном бислоју играју важну улогу у неутралисању липидних радикала ( $L^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$ ) и других липосолубилних реактивних врста (Verstraeten et al., 2003; Verstraeten et al., 2005).

**Специфични механизми** су за разлику од неспецифичних засновани на посебној хемијској структури одређених молекула полифенола. Овој групи механизма припадају интеракције полифенола са ензимима, транскрипционим факторима и рецепторима (Fraga et al., 2010).

### **Интеракција полифенола са ензимима**

Различити полифеноли су ефикасни инхибитори великог броја ензима, при чему су предмет њиховог деловања углавном две групе ензима: 1) ензими којима су супстрат пурины (нпр. АТП) (киназе, АТП-азе, цикличне нуклеотидне фосфодиестеразе, аденилат циклазе, реверзне транскриптазе, ксантин оксидазе, РНК и ДНК полимеразе, рибонуклеазе, хумане ДНК лигазе) и 2) ензими којима је

NADPH кофактор (алдоза редуктазе, малат дехидрогеназе, лактат дехидрогеназе, глутатион редуктазе, 11- $\beta$ -хидроксистероид дехидрогеназе, азот моноксид синтазе) (Middleton et al., 2000). Претпоставља се да одређени полифеноли инхибирају АТФ-зависне ензиме компетитивним везивањем за њихове активне центре. Ова конкуренција је највероватније повезана са присуством две хидроксилне групе на позицијама 5 и 7 прстена А флавоноида, као и незасићене везе између другог и трећег угљениковог атома и 4-кето групе на прстену С (Lotito и Frei, 2006). Специфична интеракција протеина и одређених флавоноида запажена је између ензима NADPH-оксидазе (NOX) и флаван-3-ола (-)-епикатехина (ЕК). Инхибиција NOX од стране *O*-метилованог метаболита ЕК резултира у смањењу продукције супероксид анјона, што је веома важно за регулацију васкуларних функција и последично крвног притиска. Овај метаболит ЕК има веома сличну структуру са апоцианином, типичним инхибитором NOX, што свакако објашњава механизам ове инхибиције (слика 37) (Steffen et al., 2007; Galleano et al., 20106).



Слика 37. Структуре апоцианина и 3'-*O*-метил(-)-епикатехина (Fraga et al., 2010)

### Интеракција полифенола са транскрипционим факторима

Одређени флаван-3-оли (епикатехин, (+)-катехин и неки процијанидини) имају способност модулације експресије бројних NF- $\kappa$ B регулаторних гена (нуклеарни фактор- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) представља фамилију транскрипционих фактора који имају веома важну улогу у процесима инфламације, ћелијске пролиферације, диференцијације и преживљавања) укључених у процесе инфламације и карциногенезе (Fraga et al., 2010; ). Епикатехин и димерни процијанидини В2 инхибирају активацију NF- $\kappa$ B на више нивоа у Јуркат Т и Хоџкиновим лимфома

ћелијама. Механизам инактивације се вероватно заснива на везивању поменутих фенола са NF-κB протеинима чиме се онемогућава везивање NF-κB на одговарајућа ДНК κB специфична места (Mackenzie et al., 2004; Mackenzie et al., 2008; Mackenzie et al., 2009).

### **Интеракција полифенола са рецепторима**

Естрогени су стероидна једињења која своју физиолошку функцију остварују посредством интеракције са естроген рецепторима (ER): ERα и ERβ. Изофлавоноиди поседују естрогену активност у концентрацијама мањим од 0,1μМ при чему директно реагују са ER. Поред изофлавоноида, и неки други флавоноиди (нпр. делфинидин) могу да се везују са ER. Такође, овакву способност имају и ресвератрол и други стилбени (Kuiper et al., 1998; Lippano et al., 2009; Chalopin et al., 2010).

#### **2.4.3.2 Фенолна једињења и превенција болести**

Бројне епидемиолошке студије утврдиле су директну повезаност између исхране богате фенолним једињењима и смањења ризика од многих хроничних обољења, у првом реду кардиоваскуларних, неуродегенеративних и канцерогених обољења (Scalbert et al., 2005; Arts и Hollman, 2005). Конзумирање хране и пића са високим садржајем полифенола повећава антиоксидативни капацитет плазме, што за последицу има смањење ризика од различитих дегенеративних болести изазваних оксидативним стресом.

### **Кардиоваскуларна обољења**

Велики број истраживања указује на чињеницу да уношење веће количине фенолних једињења путем исхране има превентивно дејство на развој коронарних болести срца (Renaud и Legeril, 1992; Dubick и Omaye, 2001; Nardini et al., 2007). Узрок ових болести су у 95 % случајева атеросклерозе коронарних артерија. Атеросклероза је обољење крвних судова у коме се мења унутрашњи слој, односно зид артерија, тако што се на одређеним местима накупљају масноће, запаљенске ћелије, ствара чврсто везивно ткиво и настаје атеросклеротски плак (атером). Временом, долази до сужења артерија и смањења протока крви кроз њих, услед чега срчани мишић не добија довољно кисеоника, те настају симптоми

тзв. исхемијске болести срца. Полифеноли су веома ефикасни инхибитори оксидације LDL холестерола, процеса који се сматра кључним у развоју атеросклерозе (Aviram et al., 2000). Други механизми који су заслужни за протективно деловање фенола укључују антиоксидативну, антитромбоцитну и антиинфламаторну активност, као и повећање нивоа HDL холестерола и побољшање функција ендотела (García-Lafuente et al., 2009).

Кверцетин има способност инхибирања експресије металопротеиназе 1 и разарања атеросклеротског плака, чиме утиче на смањење смртности од коронарних болести срца (García-Lafuente et al., 2009). Флаван-3-оли инхибирају инвазију и пролиферацију глатких мишићних ћелија из средишњег мишићног слоја артерија (*tunica media*) у субендотелијални регион, чиме успоравају формирање атероматозних лезија (Maeda et al., 2003). Полифеноли имају и антитромбоцитни ефекат, спречавајући агрегацију тромбоцита. Конзумација црвеног вина или сока од грожђа, али не и белог вина, утиче на смањење времена крварења и агрегације тромбоцита, а такође делује превентивно и на појаву тромбозе узроковане сужењем (стенозом) коронарних артерија (Demgow et al., 1995). Агрегација тромбоцита индукована колагеном *ex vivo* спречена је употребом сока од грожђа у периоду од седам дана, док исти резултат није постигнут са соком од поморанце или грејпфрута (Osman et al., 1998).

Фенолна једињења имају позитивно деловање и код ендотелијалне дисфункције, која представља почетак развоја атеросклерозе. Ендотелијална дисфункција је повезана са различитим факторима ризика за појаву атеросклерозе пре стварања плака, и користи се као прогностичко средство за коронарне болести срца (Schächinger et al., 2000). Изоловани полифеноли као што су антоцијани из вина, изофлавоноиди соје, ресвератрол, кверцетин и проантоцијанидини из какаоа, су показали ендотел-зависну вазорелаксациону активност на изолованој аорти пацова, зечева и макаки мајмуна (Chen и Pace-Asciak, 1996; Honoré et al., 1997; Andriambelason et al., 1998; Karim et al., 2000). Ови ефекти могу бити последица заштите вазорелаксантног фактора азот монооксида од оксидације. Код људи, ендотелијална дисфункција се процењује мерењем показатеља дилатације посредством протока код брахијалне артерије. Конзумирањем 240 ml/дан црвеног

вина у периоду од 30 дана неутралисана је ендотелијална дисфункција индукована уношењем хране богате мастима (Cuevas et al., 2000).

Ресвератрол, чији су главни дијетални извори грожђе и производи од грожђа, има изражену кардиопротективну активност, због чега је био предмет многих истраживања последњих двадесетак година. Експерименталне студије на анималним моделима показале су да ресвератрол делује на кардиоваскуларни систем путем различитих механизма: а) инхибира липидну пероксидацију и побољшава профил липида серума, б) редукује агрегацију тромбоцита, в) има вазодилататорни ефекат и снижава крвни притисак, г) делује антиатеросклеротски инхибирајући синтезу проатерогених еикозаноида, д) заштита ендотелних ћелија од апоптозе и индукција неоваскуларизације миокарда након инфаркта, њ) умањује пролиферацију глатких мишићних ћелија и е) индукује фибринолизу и смањује оштећења органа код хипертензивних животиња (Bradamante et al., 2004; Borriello et al., 2010).

### **Канцерогена обољења**

Антикарциногена активност полифенола испитивана је у бројним студијама на животињама, у којима је показано њихово протективно дејство које се огледало у смањењу броја тумора и/или њиховог раста (Yang et al., 2001). Антитуморно дејство фенола је примећено код различитих органа: уста, стомака, дванаестопалачног црева, дебелог црева, јетре, плућа, дојки и коже. Тестирани су бројни феноли, као што су кверцетин, катехини, изофлавоноли, лигнани, флаванони, елагинска киселина, полифеноли црвеног вина, ресвератрол, куркумин итд., при чему је сваки од њих показао антиканцерогено дејство у неком од анималних модела. Њихово антитуморно дејство може бити двојако: блокирајуће или супримирајуће (Johnson et al., 1994).

Полифеноли као блокирајући агенси блокирају иницијациону фазу туморигенезе, односно спречавају карциногене да стигну до циљног места, инхибирају њихову активацију, или онемогућавају њихову интеракцију са ДНК, РНК или протеинима. Супримирајуће деловање фенола подразумева инхибицију раста и преживљавања малигно трансформисаних ћелија, односно супримирање фазе промоције и прогресије тумора; они инхибирају ћелијску пролиферацију *in vitro* (Kuntz et al., 1999; Surh, 2003).

Међутим, дозе полифенола које су коришћене у експериментима са животињама или ћелијским линијама су обично значајно веће у односу на дозе које се могу унети регуларном исхраном. На пример, ресвератрол има изражено антикарциногено дејство, али је његова концентрација у црвеном вину као најзначајнијем дијеталном извору веома мала (0,3-4,85 mg/L), што доводи у питање здравствене ефекте који се могу остварити уношењем овог једињења путем исхране (Scalbert et al., 2005; Atanacković et al., 2012).

### **Неуродегенеративна обољења**

Неуродегенеративна обољења представљају све већи проблем друштва, а јављају се углавном код старије популације. Око 47,5 милиона људи на свету пати од неког облика деменције, а годишње се овај број повећава за око 7,7 милиона нових регистрованих случајева. Алцхајмерова болест је најзаступљенији облик деменције и обухвата око 60-70 % од укупног броја оболелих (WHO, 2015). Развоју ових болести значајно доприноси изложеност оксидативном стресу, који нарочито утиче на ткива мозга. Из тог разлога антиоксиданти имају важну улогу у превенцији ових болести.

Исхраном старих пацова са храном обogaћеном полифенолима побољшане су њихове когнитивне функције и сигнална трансдукција (Joseph et al., 1999). Интравенозна ињекција епикатехина или катехина побољшава меморију нарушену церебралном исхемијом код мишева (Matsuoka et al., 1995). Суплементација хране полифенолима грозђа редукује неуродегенеративне промене индуковане хроничном конзумацијом алкохола и побољшава синаптичке функције мерене на изолованим синаптозомима (Sun et al., 1999).

Неколико епидемиолошких студија се бавило испитивањем повезаности између конзумирања вина и ризика од појаве деменције. Показало се да је умерено конзумирање вина у негативној корелацији са појавом деменције у узорцима популације у Канади, Француској и Данској. Резултати ових истраживања потврђују чињеницу да фенолна једињења имају значајну улогу у превенцији деменције (Scalbert et al., 2005).

## Дијабетес

Многе биљке се традиционално користе у лечењу дијабетеса, а нека њихова терапеутска деловања се свакако могу објаснити високим садржајем полифенола (Marles и Farnsworth, 1995). Хипогликемијска активност полифенола се углавном заснива на редукцији интестиналне апсорпције угљених хидрата, модулацији ензима укључених у метаболизам глукозе, побољшању функције  $\beta$ -ћелија и активности инсулина, стимулисању секреције инсулина, као и на антиоксидативним и антиинфламаторним карактеристикама које поседују (Bahadoran et al., 2013). С обзиром на механизме деловања, фенолна једињења имају значајно позитивно дејство код дијабетеса типа 2 (инсулин независног дијабетеса), који представља комплексан метаболички поремећај повезан са развојем инсулинске резистенције и појавом аномалија у метаболизму угљених хидрата (измењена апсорпција и дигестија, исцрпљивање залиха гликогена, повећање глуконеогенезе и стварања глукозе у јетри, дисфункција  $\beta$ -ћелија).

Један од најпознатијих утицаја полифенола, нарочито флавоноида, фенолних киселина и танина, на метаболизам угљених хидрата јесте инхибиција  $\alpha$ -глукозидазе и  $\alpha$ -амилазе, кључних ензима за разградњу дијеталних полисахарида до глукозе (Tadera et al., 2006). Неки феноли (флаван-3-оли, фенолне киселине, кверцетин и нарингенин) имају способност да утичу на интестиналну апсорпцију глукозе инхибирајући  $\text{Na}^+$ -зависне транспортере за глукозу SGLT1 и SGLT2 (Johnston et al., 2005). Такође, одређена фенолна једињења могу да регулишу кључне метаболичке путеве угљених хидрата, као и хомеостазу хепатичне глукозе (глукоза која се ствара у јетри) укључујући гликолизу, гликогенезу и глуконеогенезу. Ферулична киселина и деривати хидроксициметне киселине веома ефикасно снижавају концентрацију глукозе у крви повећавајући активност глукокиназе, продукцију гликогена у јетри и ниво инсулина у плазми код пацова оболелих од дијабетеса (Jung et al., 2007). Дијетални феноли утичу и на повећање искоришћења глукозе у периферним инсулин-сензитивним и инсулин-несензитивним ткивима. Једна студија чак показује да фенолне киселине стимулишу искоришћење глукозе са сличном ефикасношћу као и метформин и тиазолидиндиони, најчешће примењивани орални хипогликемијски лекови (Prabhakar и Doble, 2009).



Хипергликемија индукована оксидативним стресом у  $\beta$ -ћелијама панкреаса има кључну улогу у развоју дијабетеса. Као ефикасни антиоксиданти, фенолна једињења штите  $\beta$ -ћелије од оксидативних оштећења. Ресвератрол побољшава толеранцију на глукозу, смањује губитак  $\beta$ -ћелија и редукује оксидативне стрес у Лангерхансовим острвцима (груписане  $\beta$ -ћелије у панкреасу). Одређени протективни ефекти полифенола на  $\beta$ -ћелије су повезани са могућношћу модулације кључних целуларних сигналних путева и инхибиције њихове апоптозе (Bahadoran et al., 2013).

## 2.5 ГРОЖЂЕ

Добро је познато да су црне сорте грожђа и производи добијени њиховом прерадом изузетан дијетални извор фенолних једињења. У последњих тридесетак година интензивно су проучавана биоактивна једињења вина и грожђа и њихов потенцијално позитиван утицај на здравље људи. Општи је закључак да умерено конзумирање црвеног вина или унос хране богате полифенолима има превентивно или терапеутско деловање против многих болести. У експерименталном раду, као извор биолошки активних једињења (првенствено полифенола) за обогаћивање пива коришћене су три сорте грожђа: прокупац, *pinot noir* (бургундац црни) и *cabernet sauvignon*. Такође, грожђе је богат извор и ароматских једињења и угљених хидрата. Прокупац је одабран јер представља најраспрострањенију аутохтону сорту Србије, док бургундац црни и *cabernet sauvignon* спадају у једне од најприсутнијих, најпознатијих и најцењенијих винских сорти на свету.

### 2.5.1 Прокупац

Прокупац је домаћа аутохтона сорта која се највише гаји у ужем подручју Србије, на Косову и Метохији и местимично у Војводини (слика 38). Такође, гаји се и у Македонији и у суседним земљама, нарочито у Бугарској, док се спорадично јавља у Руској федерацији. Важнији синоними за ову сорту су: зарчин (Бугарска), мајски чорнии (Русија, Молдавија), скопско црно (Македонија), каменичарка, рековачка црнка, никодимка, рскавац, прокупка и нишевка. Према еколошко-географској припадности спада у групу *Proles pontica* (*Convarietas pontica*).

Прокупац има морфолошки и функционално хермафродитан цвет и веома се добро оплођава. Грозд је средње величине, ређе велики, цилиндрично конусан, средње збијен, ретко рехуљав, масе од 130 до 300 грама. Бобице су средње величине, округле, мало пљоснате или сфероидне. Покожица је дебела, плаво црне боје са многим тачкицама, посута обилним пепељком. Веома је позна сорта и сазрева између III и IV епохе. Успешно се гаји уз колац или на шпалиру, при чему резидба мора да буде кратка, јер у супротном прероди и даје грожђе слабијег квалитета. Обично се гаји на јужним експозицијама и на сувим, растреситим, каменито-шљунковитим земљиштима. Припада веома приносним сортама и даје 15 до 20 тона грожђа по хектару. Прокупац је јако осетљив на пламењачу, средње осетљив према пепелници и релативно отпоран на сиву трулеж. Отпоран је на зимске мразеве, а у фази зимског мировања окца измрзавају на  $-14$  до  $-18^{\circ}\text{C}$ .



Слика 38. Прокупац

Грожђани сок је безбојан и неутралног мириса, а при одговарајућим агроеколошким условима садржи 18-22 % шећера и 5-7 g/l укупних киселина. При јачем цеђењу грожђа шира је розикасте боје, а рандман сока се обично креће око 65-70 %. Прокупац се користи за производњу стоних и квалитетних ружичастих и црвених вина, за купажирање са другим сортама и за производњу лозоваче и винског дестилата. Вина углавном садрже 11-13 % алкохола и 5-6 g/l укупних киселина, а одликују се црвеном или рубин црвеном бојом (Милосављевић и Јовић, 1999; Аврамов и Жунић, 2001).

### 2.5.2 Pinot noir

Бургундац црни је веома стара и позната француска сорта, распрострањена широм света. Гаји се у свим виногорјима Србије, а према еколошко-географској припадности спада у групу *Proles occidentalis* (*Convarietas occidentalis*) (слика 39).

Цвет је морфолошки и функционално хермафродитан, а оплодња добра и редовна. Грозд је мали, кратак, ваљкастог је облика, а маса му се креће од 70 до 135 грама. Бобице су мале, сочне, чврсте и округле, осим код збијених гроздова где су мало дугуљасте. Покожица је средње дебљине, плавкасто црне боје, посута обилним пепељком, без тачкица. По времену сазревања грожђа, ова сорта је рана до средње позна и обично сазрева крајем I епохе. Може се орезивати различито, кратко и дугачко, али јој највише одговара мешовита резидба на кратке лукове (6-10 окаца). Највише јој одговара шпалирски систем гајења са средње високим и високим стаблом, али се може гајити и с обликом ниског стабла. Успева на различитим типовима земљишта, али најбоље резултате даје на умерено кречним средње плодним и топлијим земљиштима. Приноси грожђа варирају од 6 до 12 t/ha. Према пламењачи и пепелници је средње осетљива сорта, док је на сиву плесан у фази сазревања веома осетљива. На зимске мразеве је веома отпорна, а окца измрзавају на -20 до -26°C.



Слика 39. Бургундац црни (*Pinot noir*)

Шира је безбојна, веома пријатног укуса и мириса, а обично садржи 20-24 % шећера и 5,5-8,0 g/l укупних киселина. Рандман при цеђењу је око 60 %. Грожђе се користи за производњу врхунских и квалитетних црвених вина, која су

изузетно питка, хармонична и освежавајућа, са специфичним сортним мирисом и укусом који подсећа на мирис и укус добро сазреле купине или вишње. Вина су обично недовољно обојена, светлоцрвене боје. У Француској се често користи и за производњу белих и црвених пенушавих вина – шампањаца (Милосављевић и Јовић, 1999; Аврамов и Жунић, 2001).

### 2.5.3 *Cabernet sauvignon*

*Cabernet sauvignon* је веома позната сорта пореклом из Француске где се највише и гаји, посебно у региону Бордоа (слика 40). Поред Француске, широко је распрострањена и у многим другим винарским земљама са умереном климом, као што су Италија, Шпанија, Русија, Украјина, Мађарска, Румунија, Бугарска, САД, Чиле, Аргентина итд. Такође, ова сорта заузима значајно место и у виногорјима Србије, а због њених изузетних особина ареал њеног гајења се стално проширује. Иако се доскора сматрало да је *cabernet sauvignon* јако стара сорта, генетским испитивањем је доказано да је настала спонтаним укрштањем *cabernet franc*-а и *sauvignon blanc*-а, вероватно почетком 17. века (Bowers и Meredith, 1997). *Cabernet sauvignon* је познат и под називима *petit cabernet*, *bordeaux* и *vauclose*, а према еколошко-географској припадности спада у групу *Proles occidentalis* (*Convarietas occidentalis*).



Слика 40. *Cabernet sauvignon*

Цвет је морфолошки и функционално хермафродитан, а оплодна добра. Грозд је средње величине или мали, цилиндрично купаст, средње збијен или збијен, са масом од 60 до 130 g. Бобице су ситне, округле, са покожицом тамноплаве боје, посуте обилним пепељком. Припада групи позних сорти, а сазрева крајем III епохе. Обавезно се орезује мешовито, на лукове с 10-12 окаца, а највише јој одговара шпалирски систем гајења. Најбољи квалитет грозђа даје када се гаји на растреситим, топлим и умерено влажним земљиштима. Принос грозђа се обично креће од 6 до 12 t/ha. Према пламењачи и пепелници је средње отпорна сорта, док је према сивој плесни изразито отпорна. На зимске мразеве је изузетно отпорна, а окца измрзавају тек на температури од -26 до -28°C.

Шира је безбојна, са укусом зелене траве, а рандман при цеђењу је око 60 %. Садржај шећера у шири је 20-24 %, а укупних киселина има 5,5-9 g/l. Грозђе се користи за производњу реномираних врхунских и квалитетних вина. Вина су јака, са 12-14 % алкохола и 6-7 g/l укупних киселина, хармонична, освежавајућа, тамноружичасте боје и са мирисом који подсећа на мирис шумских љубичица. Неподељено је стручно мишљење да се од ове сорте могу произвести најквалитетнија црвена вина (Милосављевић и Јовић, 1999; Аврамов и Жунјић, 2001).

### 3. НАУЧНИ ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања ове дисертације био је развој специјалног типа пива обogaћеног биолошки активним састојцима грозђа са намером да се добије производ веће биолошке вредности и повећане функционалности у односу на комерцијална лагер пива. Додатни циљеви били су:

- одабир адекватне сорте грозђа која ће дати најбоље физичко-хемијске, функционалне и сензорне карактеристике пива, као и утврђивање оптималног удела грозђа у медијуму за ферментацију;
- утврђивање оптималног типа квасца за производњу специјалног пива са грозђем;
- испитивање кинетике раста ћелија квасца и динамике ферментације;
- испитивање утицаја аутохотне микрофлоре грозђа на квалитет добијеног пива;
- утврђивање оптималних услова производње у циљу добијања производа са што већим садржајем фенолних једињења и што већим антиоксидативним капацитетом;
- физичко-хемијска, хемијска и сензорна карактеризација добијених производа;
- утврђивање постигнутих функционалних својстава добијених пива *in vivo* анализом утицаја на кардиоваскуларни систем пацова: крвни притисак, ЕКГ и срчану фреквенцу;
- утврђивање цене коштања производа, као и економске исплативости производње.

## 4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ РАДА

### 4.1 МАТЕРИЈАЛИ

#### 4.1.1 Хемикалије

Све хемикалије употребљене у експерименталном раду биле су аналитичке чистоће. Амонијум-хидроксид, сирћетна киселина, хлороводонична киселина концентрована, метанол су набављени од „Зорка“ (Шабац, Србија). Гвожђе-(III)-хлорид-6-хидрат, натријум-ацетат, натријум-карбонат, натријум-дихидрогенфосфат, ди-натријум-хидрогенфосфат, алуминијум-хлорид, натријум-нитрит су набављени од Центрохем (Београд, Србија). Етанол је набављен од Врење-шпиритана д.о.о (Београд, Србија).

2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), 1М раствор хлороводоничне киселине, ( $\pm$ )-6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Trolox), 2,4,6-три-2-пиридил-*s*-триазин (TPTZ), 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) ди-амонијумова со, калијум-персулфат, 1М натријум-хидроксид, кверцетин, *p*-ди-метиламиноцинамалдехид, натријум-карбоксиметил-целулоза, ди-натријум-етилендиаминотетрасирћетна киселина, амонијум-гвожђе-цитрат, рутин, нарингенин, хлорогенска киселина, транс-циметна киселина, *p*-кумарна киселина, кафе киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, сиригинска киселина, ванилинска киселина, ресвератрол, кемферол, хесперетин, катехин, 2,3-хександион, *n*-бутанол, *n*-хексан, ацеталдехид, ацетон, изо-амилацетат, етил-формијат, етил-ацетат, етил-пропионат, етил-капронат, *n*-пропанол, изо-бутанол, диметил-сулфид, 2,3-бутандион, 2,3-пентандион су набављени од Sigma-Aldrich (Steinheim, Немачка).

Бензоева киселина је набављена од Lachnema (Nerastovice, Чешка). Диметилсулфоксид (ДМСО) и ацетонитрил HPLC степена чистоће су набављени од J.T. Baker (New Jersey, USA). Глацијална сирћетна киселина HPLC степена чистоће је набављена од POCH (Gliwice, Пољска). Folin-Ciocalteu реагенс, гална киселина су набављени од Merck (Darmstadt, Немачка).

### 4.1.2 Сировине за производњу пива

За производњу експерименталних пива коришћена је индустријска охмељена сладовина намењена за производњу светлог лагер пива добијена од „БИП а.д у реструктурирању“, Београд. Квасац доњег врења *S. pastorianus* добијен је из колекције исте пиваре. Вински квасац Lalvin ICV-K1-V1116 (*S. cerevisiae cerevisiae*) набављен је од Lallemand (Montreal, Канада). Грожђе сорти прокупац, *cabernet sauvignon* и *pinot noir* је набављено са огледног добра Пољопривредног факултета „Радмиловац“, берба 2011. године.

## 4.2 МЕТОДЕ РАДА

### 4.2.1 Анализа сладовине, грожђа и медијума за ферментацију

Садржај екстракта у основној сладовини и у медијуму за ферментацију (смеша сладовине и кљука од грожђа) је одређен употребом *Alcolyzer Beer ME Analyzing System*-а (Anton Paar GmbH - AUSTRIA). Растворна сува материја грожђа одређена је стоним рефрактометром по Abbe-у, тип Г (Carl Zeiss, Jena, Немачка). Боја сладовине је одређена спектрофотометријском методом по Analytica-EBC (2008) употребом UV/Vis спектрофотометра Halo DB-20, Dynamica GmbH (Dietikon, Швајцарска). рН вредност сладовине и медијума за ферментацију утврђена је потенциометријски са рН метром WTW Inolab (Weilheim, Немачка).

### 4.2.2 Производња пива

За производњу специјалног типа пива са додатком грожђа коришћене су три сорте грожђа: прокупац, *cabernet sauvignon* и *pinot noir*. Бобице грожђа су ручно одвојене од шепурине, а затим су такође ручно, дезинтегрисане. Добијени кљук је мешан са сладовином, при чему су од сваке сорте грожђа направљена по два медијума за ферментацију: један са уделом кљука од 20 % м/м и други са уделом кљука од 30% м/м. Раствором амонијум-хидроксида киселост медијума је подешена на рН 5,20, што је оптимална почетна вредност за активност пиварског квасца *S. pastorianus*.

Са циљем да се испита утицај типа квасца на динамику ферментације, физичко-хемијске и сензорне карактеристике пива, за обављање ферментације



коришћене су две врсте квасца: пиварски квасац *S. pastorianus* и вински квасац Lalvin ICV-K1-V1116 (*S. cerevisiae cerevisiae*). Овај тип винског квасца је одабран јер има способност ферментације на ниским температурама (температурни опсег 10-35°C) и веома је прилагодљив на различите услове ферментације. Такође, Lalvin ICV-K1-V1116 припада групи квасца „убица“ („killer yeast“) и један је од првих сојева код којег је откривена способност уништавања компететивне микрофлоре. С обзиром да употребљени кљук због очувања биолошки вредних једињења није претходно третиран у циљу смањења или инхибирања аутохтоне микрофлоре (нпр. пастеризација, примена сумпор-диоксида), ова особина квасца је са аспекта захтева у производњи пива, била јако пожељна.

Засејавање квасцем *S. pastorianus* је обављено додавањем квасног млека тако да број ћелија по милилитру полазног медијума буде око  $15-20 \times 10^6$ . Квасац Lalvin ICV-K1-V1116 је дозиран у количини од 40 g/hl, при чему је према препоруци произвођача пре додавања претходно рехидрисан у малој количини шире температуре 40°C.

Вреће је обављано у лабораторијским цилиндро-конусним ферменторима од инокса запремине 5 литара (слика 41). Ради одржавања задате температуре ферментори су били смештени у лабораторијском инкубатору. Додавање квасца и главно вреће је обављано на температури од 10°C. Чврсти делови медијума за ферментацију (комина) су одвајани филтрацијом кроз памучну газу у тренутку када је садржај правог екстракта опао на 6 % м/м. Течни део је пребациван у ферментор за накнадно вреће, који је био опремљен вентилом за одржавање константног надпритиска од 1 бар. Након одвајања комине, температура ферментације је снижена на 4°C брзином хлађења од 1°C/час и тако је одржавана наредних 12 часова. Након тога температура је снижена на 0°C са истом брзином хлађења, при чему је накнадно вреће трајало 14 дана. Добијено пиво је отакано у претходно опране и стерилисане стаклене боце које су након пуњења затваране крунским затварачима.

Контролно пиво је произведено по истом поступку ферментацијом сладовине без додатка грожђа.

Током главног врења, на сваких 24 часа су узимани узорци за анализу. Пре анализа, квасац је одвајан центрифугирањем на 8000 о/мин. У току ферментације

праћени су следећи параметри: садржај алкохола, садржај правог и привидног екстракта, боја, укупан садржај фенолних једињења, антиоксидативни капацитет и број ћелија квасца.



Слика 41. Ферментор у инкубатору

#### 4.2.2.1 Производња пива са претходном стерилизацијом кљука грозђа

Стерилизацијом кљука пре мешања са сладовином вршена је инактивација аутохтоне микрофлоре грозђа, чиме је испитиван њен утицај на ток ферментације и квалитет пива. У овом експерименту коришћено је грозђе сорте прокупац, а стерилизација кљука је обављана у аутоклаву на температури од 105°C у трајању од 8 минута. Стерилисани кљук је у асептичним условима помешан са стерилном сладовином у односу 30:70, након чега је под истим условима извршена и инокулација. Ферментација је обављена на идентичан начин као у претходном случају.

### 4.2.3 Одређивање концентрације ћелија квасца

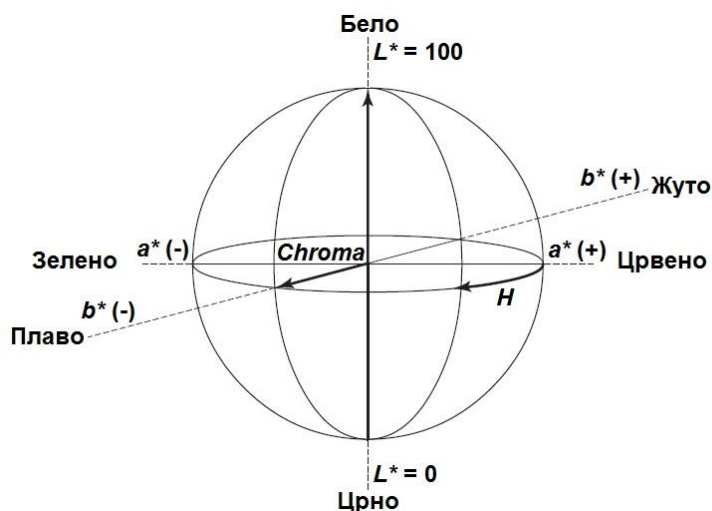
Концентрација ћелија квасца током главне ферментације одређивана је употребом две методе:

1. Директне метода за одређивање концентрације квасца у суспензији помоћу *Thoma* коморе за бројање;
2. Индиректне методе разређивања и засејавања на хранљивој подлози и бројањем колонија (Delfini и Formica, 2001; Kennedy, 2001).

Узорци за анализу узимани су на сваких дванаест часова током главне ферментације.

### 4.2.4 Одређивање физичко-хемијских параметара пива

Садржај алкохола, правог и привидног екстракта, степен праве и привидне преврелости и енергетска вредност су одређени употребом *Alcolyzer Beer ME Analyzing System*-а (Anton Paar GmbH - AUSTRIA). Боја, горчина, рН вредност и садржај  $\text{CO}_2$  су одређени методама по Analytica-EBC (2008): 9.6, 9.8, 9.35 и 9.28.5, респективно.



Слика 42. *CIElab* просторне координате

Према ЕВС методи боја пива се одређује мерењем апсорбанце на таласној дужини од 430 nm. Међутим, мерење апсорбанце на само једној таласној дужини даје ограничену информацију о боји пива, па је из тог ралога боја узорака мерена

и ручним хромаметром CR-410 (Minolta, Ramsey, NJ), са извором светлости D<sub>65</sub> (најчешће се користи и представља дневну светлост са корекцијом UV зрака). Резултати су изражени преко просторних координата које је дефинисала *Commission Internationale de l' Eclairage* (CIElab параметри) (слика 42):  $L^*$  (осветљеност: 0 = црно, 100 = бело),  $a^*$  (од црвене до зелене),  $b^*$  (од плаве до жуте),  $C^*$  (*chroma*, засићеност) и  $H$  (*hue angle*, нијанса, мери угаону ротацију).

## 4.2.5 Одређивање садржаја укупних фенолних једињења

Укупан садржај фенолних једињења одређиван је употребом две методе: методом препорученом за одређивање полифенолних једињења у пиву (Analytica-EBC, 2008) и методом по *Folin-Ciocalteu*-у, која се веома често користи за одређивање фенолних једињења у различитим прехранбеним производима (Singleton и Rossi, 1965).

### 4.2.5.1 Одређивање укупних полифенолних једињења спектрофотометријском методом по Analytica-EBC

Одређивање полифенола овом методом заснива се на њиховој реакцији са јонима гвожђа ( $Fe^{3+}$ ) у алкалној средини, при чему настаје црвено обојени комплекс са апсорпционим максимумом на таласној дужини од 600 nm.

#### Реагенси:

1. Карбоксиметил целулоза/етилендиаминотетрасирћетна киселина (СМС/EDTA): 10 грама натријум карбоксиметил целулозе и 2 грама ди-натријум EDTA је полако додавано у 500 ml воде уз стално мешање на магнетној мешалици. Након 1-3 часа, када су се једињења у потпуности растворила, садржај је пребачен у нормални суд од један литар, који је затим допуњен дестилованом водом до маркер линије.

2.  $Fe^{3+}$  реагенс (5,6 g/l  $Fe^{3+}$ ): 3,5 g зеленог амонијум гвожђе цитрата (16 % гвожђа) растворено је у 100 ml дестиловане воде. Након растварања, раствор мора бити у потпуности бистар и мора се складиштити на тамном месту.

3. Амонијачни реагенс: 100 ml концентрованог амонијака ( $d = 0,92$  g/ml) је растворено до 300 ml са дестилованом водом.

**Одређивање:**

Пре одређивања пиво је мешањем и центрифугирањем ослобођено угљен диоксида, а затим је темперирано на 20°C. Од овако припремљеног пива одмерено је 10 ml и помешано са 8 ml СМС/EDТА реагенса у нормалном суду од 25 ml. Након мешања додато је 0,5 ml Fe<sup>3+</sup> реагенса и опет је цео садржај добро промешан. Затим је додато 0,5 ml амонијачног реагенса, а након мешања нормални суд је допуњен до 25 ml са дестилованом водом. Садржај нормалног суда је добро промешан. После 10 минута стајања апсорбанца је мерена на 600 nm. Прилоком мерења раствор мора бити потпуно бистар.

Одређивање је вршено према слепој проби која је припремана по идентичној процедури као узорак, само без додатка Fe<sup>3+</sup> реагенса.

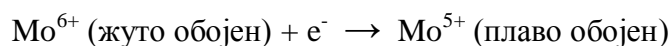
Садржај полифенола у узорку је рачунат према формули:

$$\text{Садржај полифенола} = A \times 820 \times F \text{ [mg/l]},$$

где је: А – апсорбанца на 600 nm, F – фактор разблажења.

**4.2.5.2 Одређивање укупних фенолних једињења методом по *Folin-Ciocalteu*-у**

Тачна хемијска природа *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса није позната, али је прихваћено да садржи комплекс фосфоволфрамове/фосфомолибденске киселине. Метода се заснива на трансферу електрона у алкалној средини са фенолних и других редукујућих једињења на молибден, при чему се формира плави комплекс, чија се апсорбанца мери спектрофотометријски на 760 nm. Првобитно је била осмишљена за анализу протеина и базирала се на реакцији реагенса са остацима тирозина (који садржи фенолну групу) у протеинским ланцима (*Folin* и *Ciocalteu*, 1927). Много година касније, *Singleton* и сар. су прилагодили методу за одређивање укупних фенола у вину, након чега се почела широко примењивати и за анализу у другим производима (пиво, сокови, чај, јака алкохолна пића итд.) (*Singleton et al.*, 1999).



*Folin-Ciocalteu* реагенс не реагује само са фенолним једињењима, већ може бити редукован и од стране других редукујућих нефенолних једињења, као што су

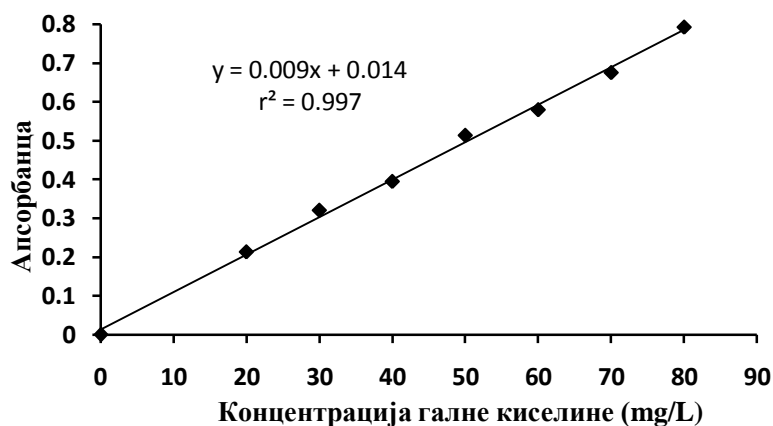
аскорбинска киселина, редукујући шећери итд. Из тих разлога, ова метода се не препоручује за узорке који садрже велику количину витамина Ц или неких других нефенолних антиоксиданата (Huang et al., 2005).

### Реагенси:

1. Раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 75 g/l: 75 g натријум-карбоната је растворено у 800 ml дестиловане воде уз константно мешање. Након temperирања на  $20^\circ\text{C}$  садржај у нормалном суду је допуњен дестилованом водом до запремине од 1 литар.
2. Раствор галне киселине (0,1 g/l).
3. Реагенс по *Folin-Ciocalteu*: раствор *Folin-Ciocalteu* разблажен је десет пута дестилованом водом. Радни раствор је неопходно чувати на тамном месту.

### Одређивање:

Пре одређивања пиво је ослобођено угљен-диоксида мешањем и центрифугирањем. У 0,5 ml разблаженог узорка (у зависности од садржаја фенолних једињења узорци су по потреби разблаживани дестилованом водом) додато је 2,5 ml реагенса по *Folin-Ciocalteu*. Реакциона смеша је добро промешана и остављена на тамном месту 5 минута. Након тога, смеси је додато 2 ml раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , а после хомогенизације добијена реакциона смеша је остављена на инкубацију 2 часа на собној температури и на тамном месту. Апсорбанца је мерена на 760 nm. Упоредо је припремана и слепа проба, код које је узорак пива био замењен дестилованом водом. Концентрација фенолних једињења је очитавана са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине (слика 43), а резултати су изражени у еквивалентима галне киселине (mg/l GAE).



Слика 43. Калибрациона крива раствора галне киселине

## 4.2.6 Одређивање антиоксидативног капацитета

Антиоксидативна активност узорака је одређивана помоћу три методе које се базирају на реакцијама у којима долази до трансфера електрона:

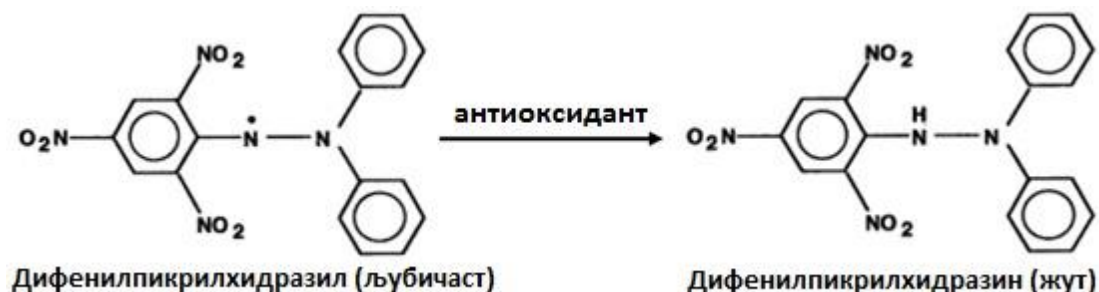
1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) метода
2. FRAP (*Ferris reducing ability of plasma*) метода
3. TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) метода.

### 4.2.6.1 DPPH метода

Молекул 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH) је љубичасто обојени стабилни слободни радикал са делокализованим слободним електроном и са максимумом апсорпције на 515 nm. Реакцијом са антиоксидантима (редукујућим једињењима), тамно љубичасти слободни радикал прелази у бледо жути хидразин (слика 44). Редукујућа способност антиоксиданаса према DPPH радикалу се мери електрон спин резонанцом или спектрофотометријски, праћењем смањења апсорбанце до постизања стабилне вредности на таласној дужини од 515-528 nm (Huang et al., 2005).

#### Реагенси:

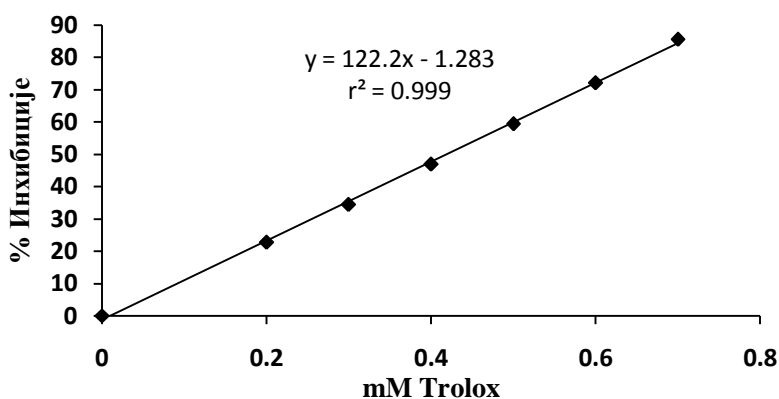
1. 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
2. Етанол (96 % v/v)
3. 0,1 М ацетатни пуфер (pH 4,3)
4. Trolox



Слика 44. Редуција DPPH радикала

**Поступак:**

У раду је коришћена метода коју су описали Brand-Williams и сарадници (1995), а коју су за анализу пива прилагодили Kaneda и сар. (1995). Радни DPPH раствор направљен је мешањем раствора DPPH у етанолу концентрације  $1,86 \times 10^{-4}$  mol/l са 0,1 М раствором ацетатног пуфера у односу 2:1 (v/v). Пре анализе пиво је дегазирано и центрифугирано на 9000 о/мин у трајању од 10 минута. У 0,2 ml дегазираног пива додато је 2,8 ml радног раствора DPPH, након чега је реакциона мешавина добро промешана и остављена у мраку један час. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 525 nm на собној температури. За слепу пробу коришћен је етанол.



Слика 45. Калибрациона крива раствора Trolox-а: DPPH метода

Као стандард за мерење антирадикалске активности коришћен је раствор Trolox-а, концентрације од 0,1 до 1 mM. Конструисан је дијаграм зависности процента инхибиције DPPH радикала у функцији концентрације раствора Trolox-а, чиме је добијена линеарна стандардна крива са које су читавани резултати (слика 44).

$$I (\%) = \frac{A_{sp} - A_a}{A_{sp}} \times 100$$

$I$  – проценат инхибиције DPPH радикала

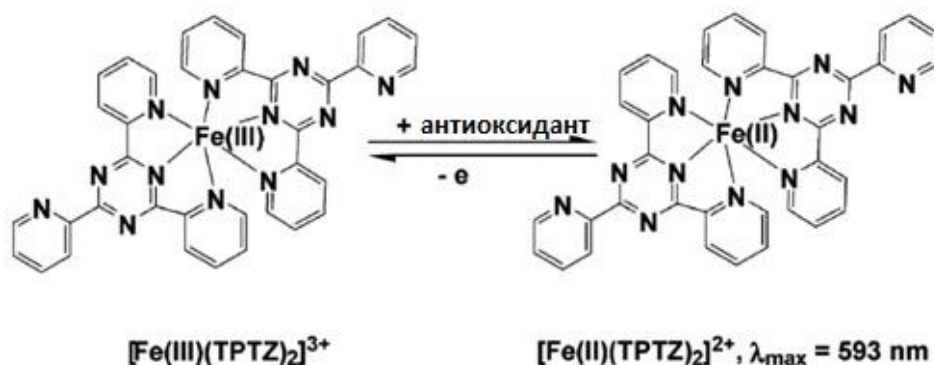
$A_{sp}$  – апсорбанца слепе пробе

$A_a$  – апсорбанца анализе



## 4.2.6.2 FRAP метода

FRAP метода се заснива на редукцији жутог фери-трипиридилтриазин комплекса (Fe(III)-TPTZ) при ниској рН вредности (рН 3,6) и под утицајем електрон-донирајућих антиоксиданаса у интензивно плаво обојени феро комплекс (Fe(II)-TPTZ), са апсорпционим максимумом на 593 nm (слика 46). Вредност апсорбанце је линеарно пропорционална концентрацији антиоксиданаса у раствору, а за конструкцију стандардне криве најчешће се употребљавају раствори аскорбинске киселине, Trolox-а и FeSO<sub>4</sub>. Реакција између фенолних једињења и Fe(III)-TPTZ није специфична, и свака полуреакција која при датим реакционим условима има мање позитиван редокс потенцијал од Fe(III)/Fe(II)-TPTZ полуреакције ( $E_0 < 0,70 \text{ V}$ ) може изазвати редукцију Fe(III)-TPTZ комплекса (Benzie и Strain, 1996).



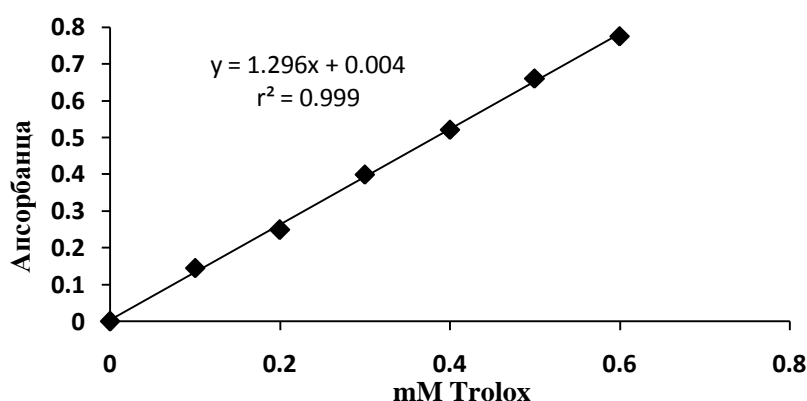
Слика 46. Редукција фери-трипиридилтриазин комплекса

**Реагенси:**

1. 40 mM раствор HCl
2. 10 mM раствор 2,4,6-трипиридил-*s*-триазина (TPTZ) (3,1230 g/l) у 40 mM HCl
3. 20 mM FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O (5,4060 g/l) у дестилованој води
4. 300 mM ацетатни пуфер, рН 3,60: 3,1 g CH<sub>3</sub>COONa × 3 H<sub>2</sub>O додато је у 16 ml глацијалне сирћетне киселине и допуњено је до 1000 ml са дестилованом водом.
5. FRAP реагенс: помешан је ацетатни пуфер, TPTZ и FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O раствор у запреминском односу 10:1:1, респективно.
6. Trolox

**Поступак:**

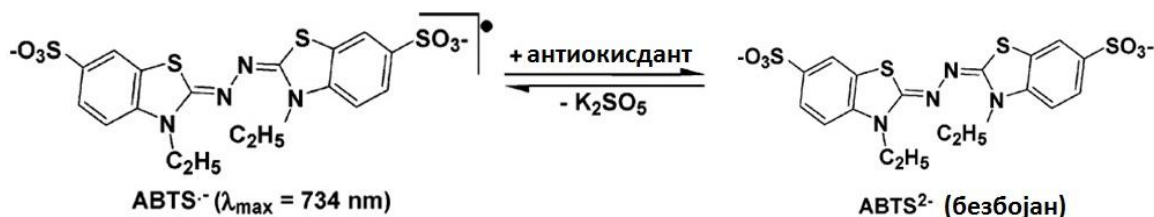
Пре анализе пиво је дегазирано и центрифугирано на 9000 о/мин у трајању од 10 минута, а сви реагенси су инкубирани на 37°C. У 0,1 ml дегазираног узорка пива додато је 0,3 ml дестиловане воде и 3 ml FRAP реагенса, након чега су кивете инкубиране на 37°C. Апсорбанца је очитавана након 40 минута на 593 nm. За слепу пробу коришћена је вода. Као стандард коришћен је раствор Trolox-а концентрације од 0,2 до 0,8 mM. Антиоксидативна активност је очитавана са калибрационе криве стандардног раствора Trolox-а (слика 47), а резултати су изражени у mM Trolox еквивалента (mM TE).



Слика 47. Калибрациона крива раствора Trolox-а: FRAP метода

**4.2.6.3 TEAC метода**

TEAC метода је заснована на способности молекула антиоксиданаса да редукују стабилни  $ABTS^{*\cdot}$  (2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) радикал. Плаво-зелени катјонски  $ABTS^{*\cdot}$  радикал се добија реакцијом између ABTS и калијум-персулфата ( $K_2S_2O_8$ ) и показује апсорпционе максимуме на 645 nm, 734nm и 815 nm. Додатком антиоксиданаса, радикал се редукује, при чему долази до деколоризације, која је пропорционална концентрацији антиоксиданаса и трајању реакције (слика 48) (Re et al., 1999).

Слика 48. Редукација  $ABTS^{*\cdot}$  радикала

**Реагенси:**

1. 5 mM фосфатни пуфер (pH 7,4): помешане су једнаке запремине 1,12 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1343 g/l) и 3,88 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,5509 g/l) и додато је 9 g/l  $\text{NaCl}$ .

2. 14 mM раствор ABTS (7,6816 g/l) у 5 mM фосфатном пуферу.

3. 4,9 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (1,3246 g/l) у 5 mM фосфатном пуферу.

4. Основни ABTS<sup>\*+</sup> раствор: помешане су једнаке запремине 14 mM ABTS и 4,9 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  да би се добио стабилни основни ABTS<sup>\*+</sup> раствор. Добијени плаво-зелени раствор остављен је на тамном месту на собној температури 12-16 часова пре употребе. Основни раствор је стабилан 2 дана уколико се складишти на тамном месту на собној температури.

5. Радни ABTS<sup>\*+</sup> раствор: основни ABTS<sup>\*+</sup> раствор је разблажен (приближно 1/80) 5 mM фосфатним пуфером, док се на таласној дужини од 734 nm при температури од 30°C није добила апсорбанца од  $0,70 \pm 0,02$  AU.

6. Trolox

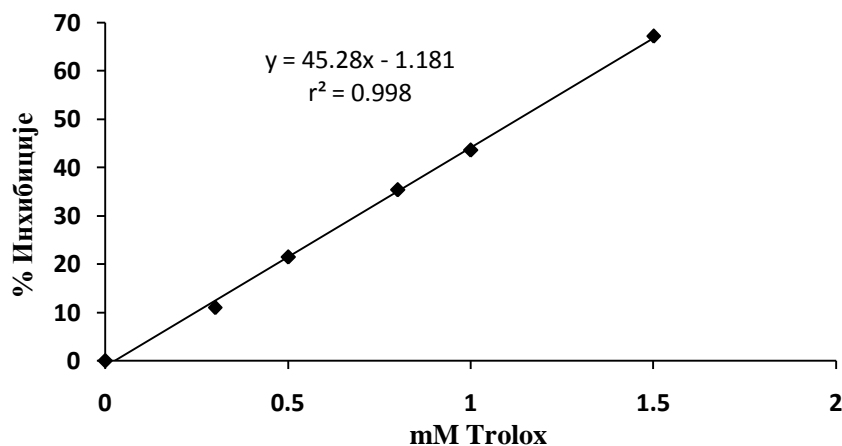
**Поступак:**

Пре анализе пиво је дегазирано и центрифугирано на 9000 о/мин у трајању од 10 минута, а сви реагенси су инкубирани на 30°C. У епрувету са 0,03 ml узорка додато је 3 ml радног ABTS<sup>\*+</sup> раствора, након чега је инкубирана 40 минута на 30°C. Апсорбанца је мерена на 734 nm. За слепу пробу је коришћен 5 mM фосфатни пуфер. Инхибиција ABTS<sup>\*+</sup> радикала након 40 минута је израчуната употребом формуле:

$$I(\%) = \frac{A_{\text{слепа проба}} - A_{\text{анализе}}}{A_{\text{слепа проба}}} \times 100$$

Као стандард је коришћен раствор Trolox-а у 5 mM фосфатном пуферу (слика 49). Конструисани су дијаграми зависности инхибиције ABTS<sup>\*+</sup> радикала од концентрације узорка и концентрације Trolox-а помоћу којих је израчуната TEAC вредност:

$$TEAC (mM) = \frac{\text{коэффициент правца криве узорка}}{\text{коэффициент праве криве стандарда}}$$



Слика 49. Калибрациона крива раствора Trolox-а: ТЕАС метода

### 4.2.7 Одређивање садржаја флавоноида

Садржај флавоноида у узорцима пива одређиван је помоћу две спектрофотометријске методе:

1. Метода по Analytica-EBC
2. Метода са алуминијум-хлоридом.

#### 4.2.7.1 Одређивање флавоноида методом по Analytica-EBC

Одређивање флавоноида овом методом се заснива на реакцији хромогена р-диметиламиноцинамалдехида са флавоноидима у киселој средини при чему настају обојени производи реакције чија се апсорбанца мери на таласној дужини од 640 nm. Ова метода омогућава квантитативно одређивање флаван-3-ола и проантоцијанидина, али не и флавонола и флавонол гликозида. Концентрација флавоноида се изражава у еквивалентима (+)-катехина (Analytica-EBC, 2008).

#### Реагенси:

1. Хлороводонична киселина, концентрована,  $d = 1,19$ .
2. Метанол
3. р-диметиламиноцинамалдехид, 98 %: р-диметиламиноцинамалдехид (500 mg) је растворен у претходно охлађеној смеси која се састојала од 125 ml концентроване HCl и 350 ml метанола. Добијени раствор је разређен до 500 ml са метанолом.

**Поступак:**

Пре саме анализе узорци пива којима је уклоњен угљен-диоксид су темперирани на 20°C. Разређеним узорцима пива (1 ml) додато је 5 ml хромогеног реагенса и смеша је добро промешана. Након 10 минута апсорбанца раствора је мерена на таласној дужини од 640 nm. За слепу пробу уместо узорка пива коришћена је дестилована вода. Концентрација флавоноида је израчуната помоћу регресионе једначине:

$$\text{Флавоноиди} = 335 \times A_{640} \text{ [(+)-катехин еквиваленти, mg/L]}$$

**4.2.7.2 Одређивање флавоноида методом са AlCl<sub>3</sub>**

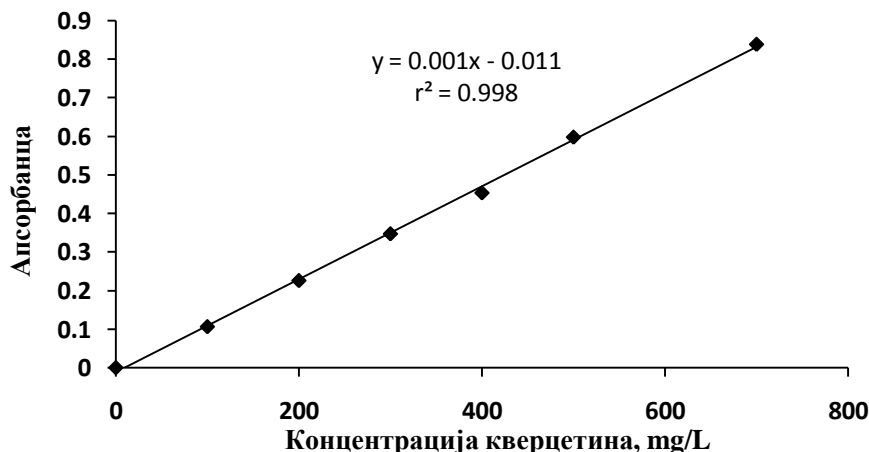
Укупан садржај флавоноида одређиван је модификованом методом коју су развили Zhishen и сарадници (1999). Принцип ове колориметријске методе се заснива на формирању кисело-стабилног комплекса алуминијум-хлорида са С-4 кето групом или С-3 или С-5 хидроксилним групама флавона и флавонола. Такође, алуминијум-хлорид гради и кисело-лабилне комплексе са ортодихидроксилним групама А- или В-прстена флавоноида (Chang et al., 2002).

**Реагенси:**

1. NaNO<sub>2</sub>, 5 % водени раствор.
2. AlCl<sub>3</sub>, 10 % водени раствор.
3. NaOH, 1M.

**Поступак:**

У епрувету од 10 ml додато је 0,5 ml дегазираног пива и 2 ml дестиловане воде, а затим је добијени раствор добро хомогенизован. Након хомогенизације додато је 0,15 ml 5 % NaNO<sub>2</sub>. После 5 минута додато је 0,15 ml 10 % AlCl<sub>3</sub>, а након још 6 минута и 1 ml 1M NaOH, после чега је запремина раствора допуњена до 5 ml са дестилованом водом. Апсорбанца раствора је одређивана на таласној дужини од 510 nm у односу на одговарајућу слепу пробу (уместо узорка пива или стандарда коришћена је дестилована вода). Као стандард коришћен је раствор кверцетина у етанолу, а резултати су изражени у mg еквивалената кверцетина по литру пива (слика 50).



Слика 50. Калибрациона крива раствора кверцетина

#### 4.2.8 Одређивање садржаја укупних мономерних антоцијана

Садржај укупних мономерних антоцијана одређиван је рН диференцијалном методом која се заснива на структурној трансформацији антоцијана при промени рН вредности средине (Lee et al., 2005). Наиме, мономерни антоцијани подлежу реверзибилној структурној трансформацији у функцији рН, при чему се при рН=1 налазе у облику интензивно обојеног флавилијум катјона, а при рН=4,5 прелазе у безбојни хемикетални облик. Садржај антоцијана се одређује мерењем промене у апсорбанци при две различите рН вредности (рН=1 и рН=4,5), при чему је разлика у апсорбанци пигмента на таласној дужини од 520 nm пропорционална концентрацији пигмента. Антоцијани у полимерном облику не подлежу промени боје при промени рН вредности, тако да се њихов садржај овом методом не може одредити.

##### Реагенси:

1. Пуфер рН=1,0 (калијум-хлорид, 0,025M): одмерено је 1,86 g KCl и додато је око 980 ml дестиловане воде. Измерена је рН вредност и помоћу хлороводоничне киселине је подешена на 1,0 ( $\pm 0,05$ ). Раствор је пребачен у нормални суд од 1 l који је затим допуњен дестилованом водом до ознаке.

2. Пуфер рН=4,5 (натријум-ацетат, 0,4M): одмерено је 54,43 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$  и додато је око 960 ml дестиловане воде. Измерена је рН вредност и

помоћу хлороводоничне киселине је подешена на 4,5 ( $\pm 0,05$ ). Раствор је пребачен у нормални суд од 1 l који је затим допуњен дестилованом водом до ознаке.

### Поступак:

Сви узорци су припремљени у нормалним судовима од 50 ml. Одговарајући фактор разблажења одређен је разблаживањем узорка са пуфером рН=1 и мерењем његове апсорбанце на таласној дужини од 520 nm. Узорак је разблаживан све док његова апсорбанца није била у линеарном опсегу спектрофотометра (0,2-1,0 AU). Користећи добијени фактор разблажења за сваки узорак су припремљена два раствора: један са пуфером рН=1 и други са пуфером рН=4,5. Запремина узорка у укупној запремини раствора од 50 ml не сме прећи 10 ml како се не би превазишао капацитет пуфера. Апсорбанца добијених раствора са пуферима рН=1 и рН=4,5 мерена је на две таласне дужине: 520 и 700 nm. Апсорбанца на 700 nm је мерена ради корекције грешке која се јавља због пене. Концентрација мономерних антоцијана је изражена у цијанидин-3-глукозид еквивалентима према следећој формули:

$$\text{Антоцијани} \left( \text{цијанидин} - 3 - \text{глукозид еквиваленти}, \frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times M \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l},$$

при чему је:  $A = (A_{520} - A_{700})_{pH=1} - (A_{520} - A_{700})_{pH=4,5}$ ;  $M$  – моларна маса (за цијанидин-3-глукозид је 449,2 g/mol);  $DF$  – фактор разблажења;  $l$  – дужина кивете;  $\epsilon$  – моларни екстинкциони коефицијент ( за цијанидин-3-глукозид је 26900  $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ ).

### 4.2.9 Одређивање садржаја фенолних једињења HPLC методом

Квантификација фенолних једињења је обављена течном хроматографијом високе резолуције (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) методом са применом екстерних стандарда. Као стандарди коришћена су следећа једињења: рутин, нарингенин, хлорогенска киселина, транс-циметна киселина, кверцетин, р-кумарна киселина, кафеинска киселина, р-хидроксибензоева киселина, сиригинска киселина, ванилинска киселина, транс-ресвератрол, кемпферол, хесперетин, катехин, бензоева киселина и гална киселина. Раствори стандарда

припремани су са диметилсулфоксидом (ДМСО) у следећим концентрацијама: 1, 2,5, 5, 10, 15 и 25 mg/l. Калибрационе криве свих стандарда су имале висок степен линеарности ( $r^2 > 0,99$ ). Сви узорци и раствори стандарда су филтрирани кроз филтер са величинама пора од 0,45  $\mu\text{m}$  пре директног ињектовања на колону.

#### **Услови хроматографисања:**

Фенолна једињења су одређивана употребом течног хроматографа Agilent 1100 Series (USA) опремљеног са UV/DAD детектором, а раздвајање једињења је вршено са колоном Poroshell 120 EC-C18 (4,6 $\times$ 100 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ). Систем растварача је имао константан проток од 1,0 ml/min. Мобилна фаза је била дестилована вода са 0,1 % глацијалне сирћетне киселине (растварач А) и ацетонитрил са 0,1 % глацијалне сирћетне киселине (растварач Б). Коришћен је следећи градијент: 0-3,25 min, 8-10 % Б; 3,25-8 min, 10-12% Б; 8-15 min, 12-25 % Б; 15-15,8 min, 25-30 % Б; 15,8-25 min, 30-90 % Б; 25-25,4 min, 90-100 % Б; 25,4-30 min, 100 % Б. Ињекциона запремина је била 5 ml а температура је одржавана константном на 25°C. Таласна дужина детекције је бира на основу апсорпционог максимума анализираних фенолних једињења: 225 nm за ванилинску и бензоєву киселину, 280 nm за галну киселину, 4-хидроксибензоєву киселину, катехин, сиригинску киселину, транс-циметну киселину, хесперетин и нарингенин, 305 nm за кумарну киселину и ресвератрол, 330 nm за хлорогенску и кафеинску киселину и 360 nm за рутин, кверцетин и кемферол.

#### **4.2.10 Одређивање садржаја испарљивих једињења гасном хроматографијом**

Методом гасне хроматографије у узорцима су квантификована следећа испарљива једињења: вицинални дикетони (диацетил и 2,3-пентандион), ацеталдехид, ацетон, диметил сулфид, етил-ацетат, етил-пропионат, етил-метаноат, етил-капронат, изо-амилацетат, метанол, n-пропанол, изо-бутанол и амилалкохол. Анализа је вршена са гасним хроматографом Perkin Elmer тип Clarus 500 са уређајем за аутоматско узимање узорака Turbomatrix 40 (слика 51).

Раздвајање једињења је обављано употребом две колоне: Elite-5 и Elite-WAX (Perkin Elmer). Elite-5 (60 $\times$ 0,53 mm, 1,5  $\mu\text{m}$ ) је капиларна неполарна колона са стационарном фазом 5 % дифенил/95 % диметилполисилоксан, а коришћена је



за раздвајање вициналних дикетона. Elite-WAX (30×0,53 mm, 1,0 μm) је поларна капиларна колона код које је стационарна фаза полиетилен гликол и веома је погодна за раздвајање поларних једињења као што су аминокиселине, алкохоли, карбоксилне киселине, амини, масне киселине, естри, ароматична испарљива једињења итд. Гасни хроматограф је био опремљен са два детектора: детектор са захватом електрона (ECD – *electron capture detector*) и пламено-јонизациони детектор (FID – *flame ionization detector*). Вицинални дикетони су детектовани са ECD детектором, при чему је носећи гас био азот. За детекцију осталих испитиваних једињења коришћен је FID детектор а носећи гасови су били водоник и кисеоник. Добијени хроматограми су анализирани помоћу софтвера *Total Chrome*.



Слика 51. Гасни хроматограф *Perkin Elmer* тип *Clarus 500* са уређајем за аутоматско узимање узорка *Turbomatrix 40*

Као интерни стандарди коришћени су 2,3-хександион, *n*-бутанол и *n*-хексан. Узорци за хроматографисање су припремани на следећи начин: у 250 ml хладног пива (не сме да пени) додавани су интерни стандарди и то 2 ml 2,3-хександиона и 2 ml смеше *n*-бутанола и *n*-хексана. Од овако добијеног раствора 5 ml је узето за анализу и пребачено у специјалну посуду за узорке која је затим смештена у уређај за аутоматско узимање узорка. У овом уређају узорци су темперирани на температури од 40°C у трајању од 20 минута, након чега је гасна фаза изнад узорка носећим гасом ињектована на колоне.

### 4.2.11 Сензорна анализа

Сензорна анализа узорака обављена је коришћењем две методе:

- метод рангирања и
- хедонска скала или скала преференције.

У оцењивању је учествовало осамнаест оцењивача лаика, који пре самог оцењивања нису имали било какав тренинг нити искуство везано за сензорно оцењивање пива. Свих осамнаест оцењивача били су редовни конзументи пива (два-три пута недељно конзумирају бар по 500 ml пива). Узорци су били припремљени у складу са препорукама Analytica-EBC. Температура узорака током сензорне евалуације је била 8°C, а сервирано је по 50 ml узорка у непровидним чашама запремине 250 ml. Непровидне чаше су изабране како би се маскирала боја узорака, јер се боја пива са додатком грозђа видно разликовала од боје стандардног пива. Сви узорци су шифрирани случајно изабраним троцифреним бројевима (Analytica-EBC, 2008).

#### 4.2.11.1 Метод рангирања

Метод рангирања се веома често користи у поступцима сензорне анализе прехранбених производа и то у ситуацијама када се захтева да се, у оквиру анализираних серије, узорци распореде према нивоу изражености једног или више својстава или према укупном квалитету (Радовановић и Попов-Раљић, 2001). Тест рангирања омогућава мерење вероватноће да се узорак или више њих разликује од неког другог узорка, али не даје могућност квантитативног мерења степена различитости. Овај метод се често користи у процесу развоја и пројектовања новог производа, али и када је циљ испитивање утицаја измена у процесу производње на квалитет производа.

На почетку оцењивања, сви узорци су достављени на потпуно идентичан начин. Предмет оцењивања биле су серије од по три узорка, које су се састојале од стандардног пива произведеног без додатка грозђа и два пива произведена са додатком 20 и 30 % грозђа исте сорте. Задатак оцењивача је био да достављене узорке рангирају према добијеном упутству, односно да их распореде од узорка најбољег до узорка најгорег општег квалитета (слика 52). Основни циљ овог теста

било је утврђивање на који начин се са повећањем удела грозђа мења квалитет добијеног производа (повећава се, смањује или остаје исти).

МЕТОД РАНГИРАЊА			
Име и презиме			
Датум оцењивања			
Достављено Вам је три узорка. Пробајте сваки узорак и рангирајте их према утиску о општем квалитету од најбољег до најгорег (испод шифре најбољег узорка упишите број 1, а испод шифре најгорег број 3).			
Шифра узорка			
Ранг општег квалитета			
Коментар			

Слика 52. Пример оцењивачког листића за метод рангирања

Статистичка обрада резултата утврђених применом методе рангирања обављена је помоћу Фридмановог теста (*Friedman's test*) (Analytica-EBC, 2008).

#### 4.2.11.2 Хедонска скала

Хедонска скала са девет нивоа је једна од најраширенијих метода за утврђивање сензорне прихватљивости прехранбених производа од стране потрошача. Ову скалу су осмислили Peryam и Pilgrim (1957) за потребе војске САД на институту *Quartermaster Food and Container Institute of the U.S. Armed Forces*, у оквиру које почетна вредност (1) означава максимално непријатан, док крајња вредност (9) означава максимално пријатан утисак (слика 53).

Приликом оцењивања шифрирани узорци су сервирани један по један по случајном распореду. Основни циљ овог оцењивања било је утврђивање сензорне прихватљивости добијених пива са додатком грозђа и међусобно поређење узорака.

С обзиром да је хедонска скала са девет нивоа веома блиска интервалној скали, за статистичку обраду добијених података коришћена је ANOVA и Tuckey-ев тест.

ХЕДОНСКА СКАЛА																								
Име и презиме																								
Датум оцењивања																								
Заокружите број испред термина који у највећој мери одговара Вашем суду о квалитету производа.																								
Шифра узорка																								
<div style="text-align: center;"> <table style="margin: auto;"> <tr><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">9</td><td style="padding: 2px;"><b><i>Izuzetno mi se dopada</i></b></td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">8</td><td style="padding: 2px;"><b><i>Veoma mi se dopada</i></b></td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">7</td><td style="padding: 2px;"><b><i>Umereno mi se dopada</i></b></td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">6</td><td style="padding: 2px;"><b><i>Malo mi se dopada</i></b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b><i>Niti mi se dopada</i></b></td><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">5</td><td style="padding: 2px;"><b><i>Niti mi se ne dopada</i></b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b><i>Malo mi se ne dopada</i></b></td><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">4</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b><i>Umereno mi se ne dopada</i></b></td><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">3</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b><i>Veoma mi se ne dopada</i></b></td><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">2</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b><i>Izuzetno mi se ne dopada</i></b></td><td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</td><td></td></tr> </table> </div>		9	<b><i>Izuzetno mi se dopada</i></b>	8	<b><i>Veoma mi se dopada</i></b>	7	<b><i>Umereno mi se dopada</i></b>	6	<b><i>Malo mi se dopada</i></b>	<b><i>Niti mi se dopada</i></b>	5	<b><i>Niti mi se ne dopada</i></b>	<b><i>Malo mi se ne dopada</i></b>	4		<b><i>Umereno mi se ne dopada</i></b>	3		<b><i>Veoma mi se ne dopada</i></b>	2		<b><i>Izuzetno mi se ne dopada</i></b>	1	
9	<b><i>Izuzetno mi se dopada</i></b>																							
8	<b><i>Veoma mi se dopada</i></b>																							
7	<b><i>Umereno mi se dopada</i></b>																							
6	<b><i>Malo mi se dopada</i></b>																							
<b><i>Niti mi se dopada</i></b>	5	<b><i>Niti mi se ne dopada</i></b>																						
<b><i>Malo mi se ne dopada</i></b>	4																							
<b><i>Umereno mi se ne dopada</i></b>	3																							
<b><i>Veoma mi se ne dopada</i></b>	2																							
<b><i>Izuzetno mi se ne dopada</i></b>	1																							

Слика 53. Образац оцењивачког листића са хедонском скалом

#### 4.2.12 Фармаколошко *in vivo* испитивање

У фармаколошком *in vivo* испитивању коришћени су лабораторијски пацови женског пола *Wistar* соја. Сва испитивања су била обављена у складу са захтевима Етичког комитета за животиње Медицинског факултета у Београду. Основни циљ овог експеримента било је утврђивање дејства конзумације специјалног пива произведеног са додатком грозђа на кардиоваскуларне функције пацова и поређење дејства са контролним пивом. За потребе овог испитивања одабран је узорак произведен са 30 % грозђа сорте *cabernet sauvignon* ферментисан пивским квасцем. Овај узорак је одабран из разлога што је у претходним анализама показао највећи антиоксидативни потенцијал. Као слепа проба коришћена је вода и 5 % v/v етанол.

Узорак (7,125 ml/kg пацова узорка, контролног пива, воде или 5 % v/v етанола) је пероралним путем, употребом назогастричне сонде, унет у желудац пацова, након чега је вршен континуални мониторинг крвног притиска, фреквенције и ЕКГ у трајању од два часа (слика 54). Запремина унетог узорка је одређена на бази препоручене дневне конзумације пива (пиво са 5 % v/v

алкохола) од 500 ml, рачунајући да је просечна маса човека 70 килограма, па је доза екстраполирана на пацова просечне тежине 250 g.



Слика 54. Експериментални пацов *Wistar* соја током испитивања

#### 4.2.13 Статистичка обрада података

Статистичка обрада резултата обављена је применом статистичког програма *STATISTICA 12*. Резултати су приказани као аритметичка средина три понављања  $\pm$  стандардна девијација, уколико није назначено другачије. Статистичка значајност разлика између аритметичких средина утврђена је на нивоу статистичке значајности од  $p < 0,05$ .

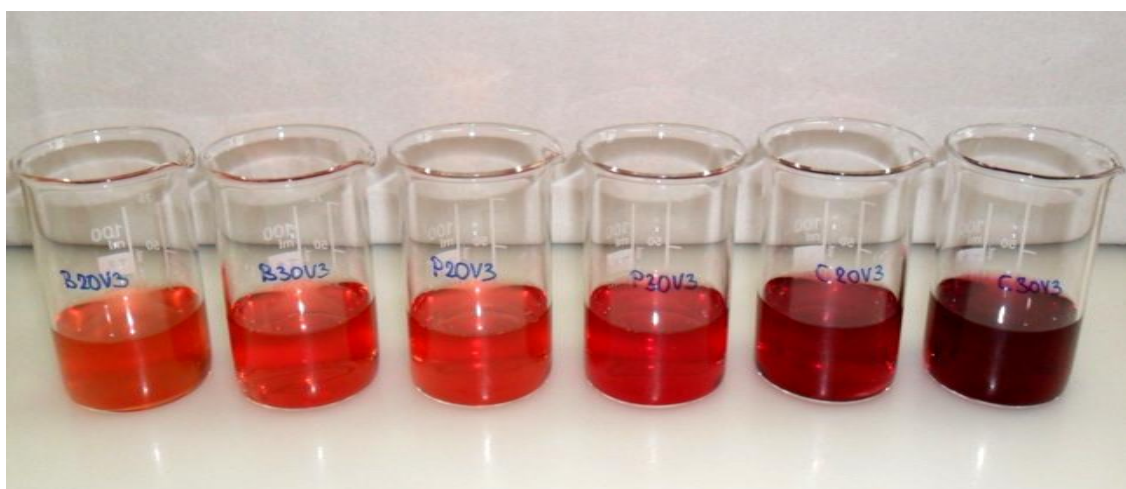
## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Експериментална пива са додатком грозђа произведена су од три различите сорте грозђа, при чему је врење обављено са две врсте квасца.

Табела 2. Произведена експериментална пива и вина

Сорта грозђа	Удео грозђа, %	Врста квасца	Ознака пива
/	/	<i>S. pastorianus</i>	<i>Pp</i>
/	/	ICV-K1-V1116	<i>Pv</i>
Прокупац	20	<i>S. pastorianus</i>	<i>P20p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>P20v</i>
	30	<i>S. pastorianus</i>	<i>P30p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>P30v</i>
<i>Cabernet sauvignon</i>	20	<i>S. pastorianus</i>	<i>CS20p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>CS20v</i>
	30	<i>S. pastorianus</i>	<i>CS30p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>CS30v</i>
<i>Pinot noir</i>	20	<i>S. pastorianus</i>	<i>PN20p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>PN20v</i>
	30	<i>S. pastorianus</i>	<i>PN30p</i>
		ICV-K1-V1116	<i>PN30v</i>
Прокупац (стерилизован кљук)	30	<i>S. pastorianus</i>	<i>P30ps</i>
Стерилизована сладовина	/	<i>S. pastorianus</i>	<i>Pps</i>
Прокупац	100	ICV-K1-V1116	<i>P</i>
<i>Cabernet sauvignon</i>	100	ICV-K1-V1116	<i>CS</i>
<i>Pinot noir</i>	100	ICV-K1-V1116	<i>PN</i>

Произведено је 19 различитих узорака пива и вина: 13 пива са додатком грозђа, три контролна узорка без додатка грозђа и три вина (табела 2, слика 55). Пиво са додатком стерилисаног кљука грозђа сорте прокупац (*P30ps*) произведено је ради испитивања утицаја инактивације аутохтоне микрофлоре грозђа на ток ферментације и квалитет пива. Од сваке сорте грозђа произведено је вино по поступку за производњу црвених вина у циљу поређења ефикасности екстракције фенолних једињења.



Слика 55. Пива са додатком грозђа: *PN20v*, *PN30v*, *P20v*, *P30v*, *CS20v*, *CS30v*

## 5.1 Анализа сладовине, грозђа и медијума за ферментацију

Садржај екстракта, рН вредност и боја сладовине и добијених медијума за ферментацију (смеше сладовине и кљука грозђа) приказани су у табели 3. Оптимална рН вредност за активност употребљеног квасца *S. pastorianus* је у распону 5,10-5,30, па је из тог разлога рН вредност свих добијених медијума за ферментацију подешена на 5,20. рН вредност сладовине се обично креће у распону од 5,0-5,4, зависно од односа слада и несладовиних сировина, поступка комљења, карактеристика воде итд. (Мунгое, 2006). Међутим, рН вредност кљука грозђа је знатно нижа и код црвених сорти је обично у опсегу 3,3-3,6 (Jackson, 2008). Из тог разлога је и рН вредност мешавине сладовине и кљука грозђа знатно испод оптимума за активност пивског квасца, па је извршена корекција овог параметра.

Пре почетка ферментације, боја медијума са различитим сортама грозђа се није много разликовала, али је била значајно тамнија у поређењу са чистом сладовином. Сорта грозђа није значајно утицала на боју пре ферментације, али су мешавине са 30 % грозђа биле статистички значајно тамније од мешавина са 20% грозђа. Разлика у садржају бојених материја се показала тек током ферментације, када је и дошло до њихове максималне екстракције из покожице грозђа.

Табела 3. Садржај екстракта, рН вредност и боја медијума за ферментацију<sup>а</sup>

Медијуми за ферментацију	Екстракт (°Plato)	рН	Боја (ЕВС јединице)
Сладовина	11,08±0,48 <sup>а</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	5,6±0,1 <sup>а</sup>
Сладовина+20 % Прокупац	13,38±0,75 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	9,3±0,9 <sup>б</sup>
Сладовина+30 % Прокупац	14,47±1,30 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	11,9±1,1 <sup>ц</sup>
Сладовина+20 % <i>C. sauvignon</i>	13,81±0,27 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	10,4±0,8 <sup>б</sup>
Сладовина+30 % <i>C. sauvignon</i>	14,98±0,44 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	11,1±0,7 <sup>ц</sup>
Сладовина+20 % <i>Pinot noir</i>	14,27±0,84 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	9,1±1,1 <sup>б</sup>
Сладовина+30 % <i>Pinot noir</i>	14,89±0,56 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	11,3±0,7 <sup>ц</sup>
Сладовина+30 % Прокупац (стерилизован кљук)	13,76±0,92 <sup>б</sup>	5,20±0,05 <sup>а</sup>	12,01±1,2 <sup>ц</sup>

<sup>а</sup>Различита слова у истим колонама означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

При производњи типичног лагер пива садржај екстракта у основној сладовини је обично око 10-13°P (Hough et al., 1982). Екстракт сладовине коришћене у експерименту био је око 11°P (11,08±0,48°P). Садржај растворне суве материје у коришћеном грозђу, мерено рефрактометром, био је следећи:

Прокупац	22,0±0,2°Bx
<i>Cabernet sauvignon</i>	26,1±0,3°Bx
<i>Pinot noir</i>	26,4±0,2°Bx

Количина екстракта у смешама сладовине и кљука грозђа директно је зависна од садржаја суве материје у грозђу, па су очекивано смеше сладовине и кљука *pinot noir*-а и *cabernet sauvignon*-а имале и највећи садржај екстракта. Међутим, садржај



екстракта смеша са различитим сортама грозђа се није статистички значајно разликовао.

## 5.2 Динамика ферментација

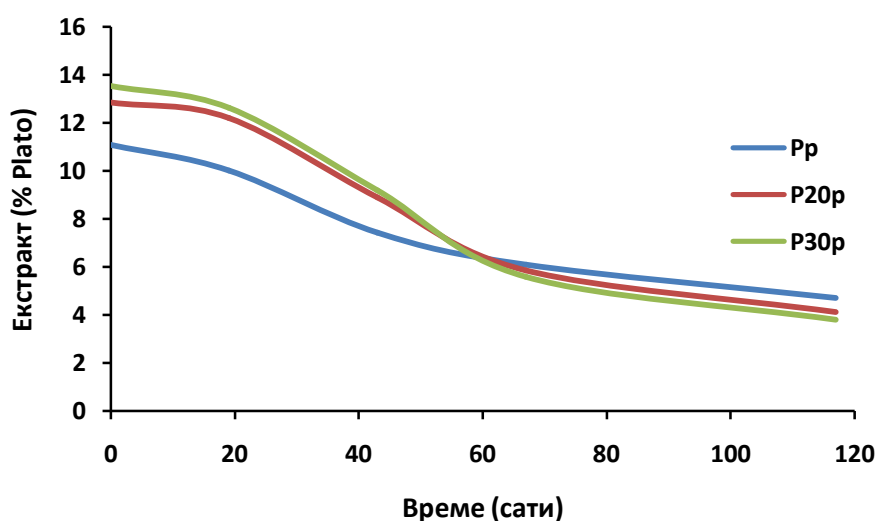
Најважније збивање током процеса врења је ферментација шећера из сладовине (медијума за ферментацију) под утицајем квасца у етанол и угљен-диоксид. На сликама 56-62 приказани су дијаграми смањења садржаја екстракта током главног врења у експерименталним пивима. Усвојивост и брзина ферментације шећера од стране квасца су од великог значаја у производњи пива и директно утичу на време трајања врења. Сви ферментабилни шећери који се налазе у сладовини превире одређеним редоследом. Пошто квасац сложене шећере најпре мора да разгради, он прво асимилије хексозе. Из тог разлога су ферментабилни шећери и подељени на три групе:

- шећери за почетак врења (хексозе),
- шећери за главно врење (малтоза),
- шећери за накнадно врење (малтотриоза).

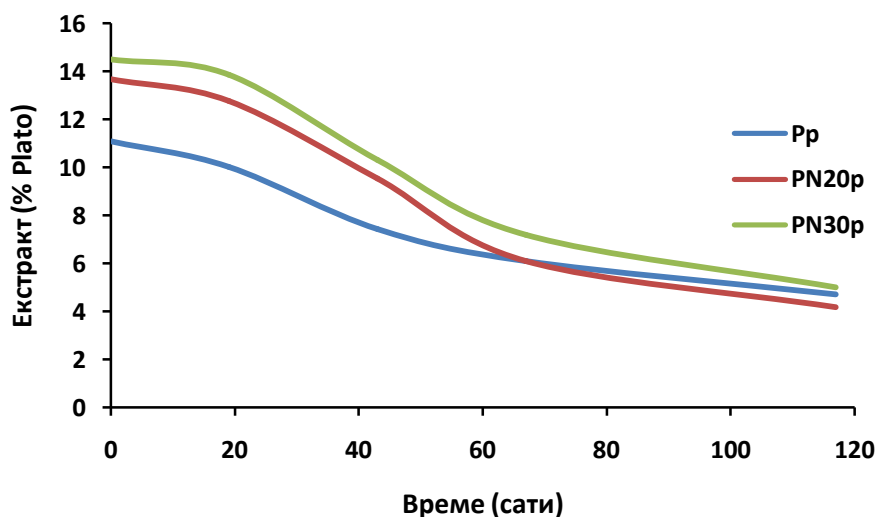
Квасац веома лако превире и сахарозу пошто се ензим за њену разградњу (инвертаза) налази у ћелијском зиду, па сама сахароза за квасац предстаља шећер за почетак врења (Kunze, 2004). У индустријским сладовинама за стандардне типове пива, малтоза је најдоминантнији шећер и чини око 40-60 % ферментабилних шећера. Концентрација различитих угљених хидрата у сладовини и њихов међусобни однос зависи у првом реду од типа пива, односно употребљених сировина (врсте и удела слада и несладованих сировина) и поступка комљења. Сладовина произведена у потпуности од слада садржи у просеку 9 % хексоза (глукозе и фруктозе), 6 % сахарозе, 41 % малтозе, 14 % малтотриозе, 6 % малтотетрозе и 22 % декстрина (Briggs et al., 2004).

У поређењу са сладовином, угљенохидратни профил медијума за ферментацију који представља мешавину сладовине и кљука грозђа се значајно разликује. Присутна је већа концентрација простих шећера, углавном глукозе и фруктозе пореклом из грозђа (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Као последица веће концентрације шећера које квасац веома брзо и лако усваја, нагиб ферментационих кривих пива са додатком грозђа је био значајно већи у поређењу

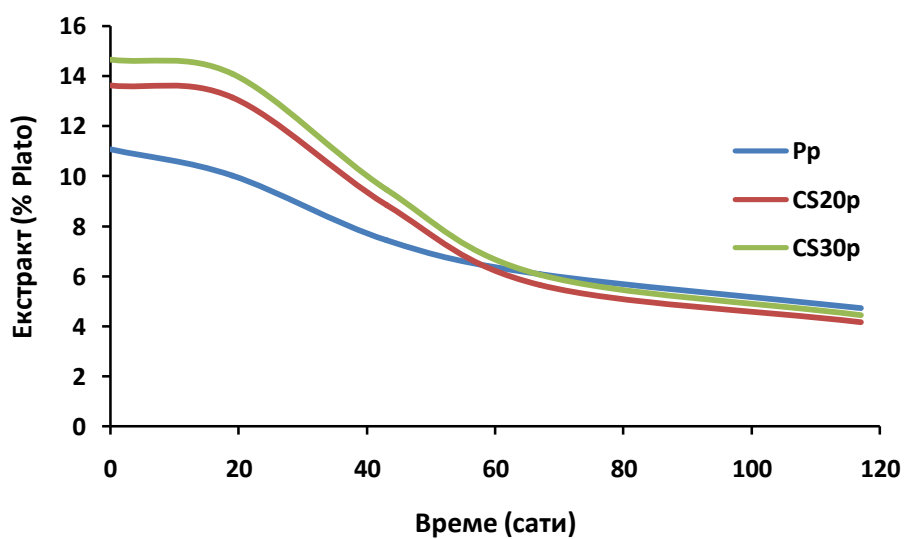
са контролним пивом, што указује на већу брзину ферментације (процент утрошеног екстракта по часу [ $^{\circ}\text{P}/\text{h}$ ]). Након 60-80 часова, брзина ферментације пива са додатком грозђа је била слична брзини ферментације контролног пива. Познато је да се током врења прво ферментисхе глюкоза, па затим фруктоза и након тога малтоза (D'Amore et al., 1989). Ово је основни разлог зашто је пад екстракта током врења пива са додатком грозђа био значајно бржи у поређењу са контролним пивом.



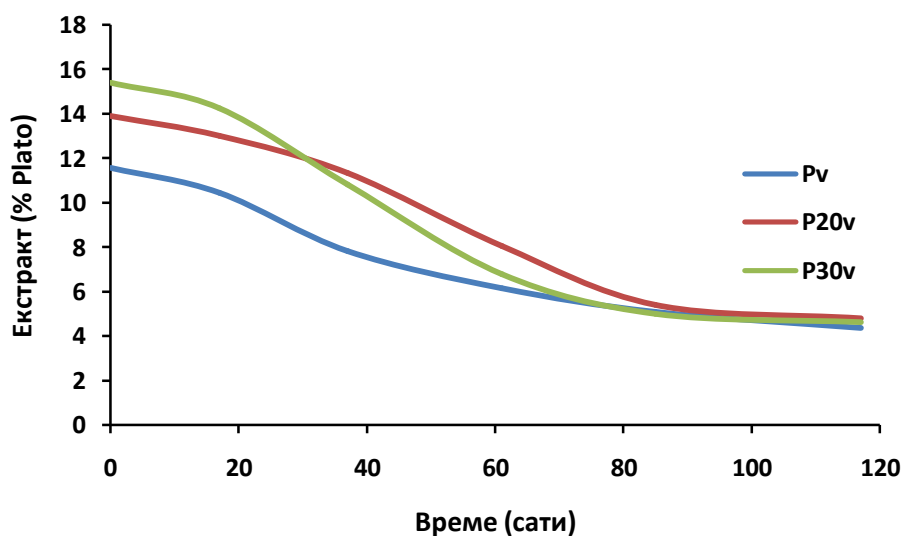
Слика 56. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са пивским квасцем код узорака са 20 и 30 % прокупца (*P20p* и *P30p*, респективно)



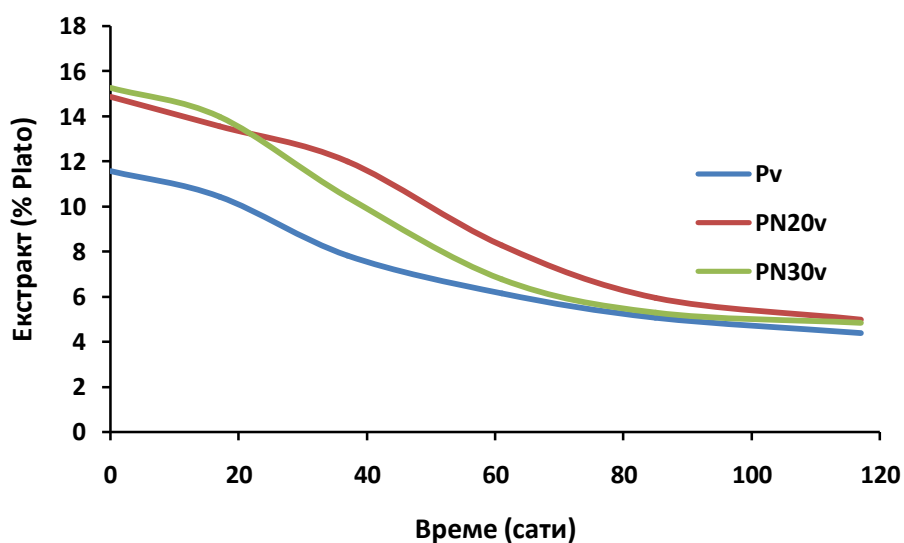
Слика 57. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са пивским квасцем код узорака са 20 и 30 % *pinot noir*-а (*PN20p* и *PN30p*, респективно)



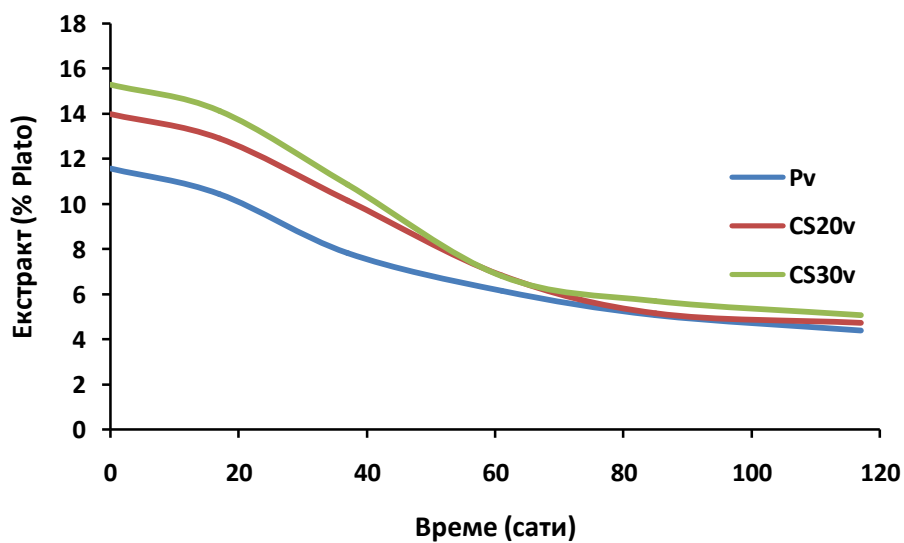
Слика 58. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са пивским квасцем код узорака са 20 и 30 % *cabernet sauvignon*-а (*CS20p* и *CS30p*, респективно)



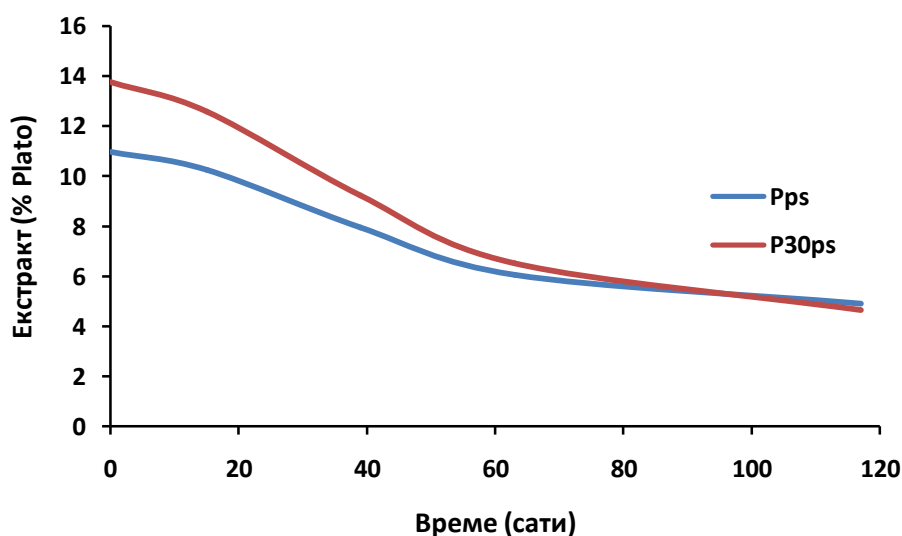
Слика 59. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са винским квасцем код узорака са 20 и 30 % прокупца (*P20v* и *P30v*)



Слика 60. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са винским квасцем код узорака са 20 и 30 % *pinot noir*-а (PN20v и PN30v, респективно)



Слика 61. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са винским квасцем код узорака са 20 и 30 % *cabernet sauvignon*-а (CS20v и CS30v, респективно)



Слика 62. Промена садржаја екстракта током главне ферментације са пивским квасцем код узорка са 30 % прокупца (*P30ps*)

У табели 4 приказане су брзине ферментација експерименталних пива током фазе бурног врења. Статистичка анализа је показала да су брзине ферментација између контролних узорака пива ферментисаних пивским и винским квасцем ( $Pp$  и  $Pv$ , респективно) биле статистички значајно различите ( $p=0,03$ ). Међутим, значајна разлика није установљена између узорака  $Pp$  и  $Pps$  ( $p=0,47$ ), као ни између узорака  $Pps$  и  $Pv$  ( $p=0,14$ ). На основу добијених резултата може се извести закључак да врста квасца значајно утиче на брзину ферментације стандардног пива, али не и додатна стерилизација сладовине. Овакви резултати су били и очекивани, јер је за потребе експеримената коршћена индустријска охмељена основна сладовина која је већ била термички третирана па стога додатни термички третман није значајно утицао на ток врења.

У табели 5 приказана је значајност утицаја различитих фактора (сорта грожђа, удео грожђа у медијуму и врста квасца) на брзину ферментације пива са додатком грожђа. Сорта грожђа и удео грожђа су имали статистички веома значајан утицај на брзину ферментације, док се показало да врста квасца није значајно утицала на овај параметар. Такође, значајан допринос разликама у брзини ферментације дала је међусобна интеракција фактора: сорта грожђа\*удео грожђа, сорта грожђа\*квасац, удео грожђа\*квасац.

Табела 4. Брзина ферментација експерименталних пива током фазе бурног врења

Узорак	Брзина ферментације [°P/h]	Врста пива	Брзина ферментације [°P/h]
<i>Pp</i>	0,082±0,005	<i>Pv</i>	0,096±0,004
<i>P20p</i>	0,132±0,005	<i>P20v</i>	0,114±0,005
<i>P30p</i>	0,146±0,005	<i>P30v</i>	0,169±0,008
<i>PN20p</i>	0,138±0,006	<i>PN20v</i>	0,126±0,007
<i>PN30p</i>	0,139±0,005	<i>PN30v</i>	0,163±0,005
<i>CS20p</i>	0,155±0,007	<i>CS20v</i>	0,138±0,009
<i>CS30p</i>	0,167±0,004	<i>CS30v</i>	0,167±0,010
<i>Pps</i>	0,087±0,005	<i>P30ps</i>	0,126±0,004

Табела 5. Утицај различитих фактора на брзину ферментације пива са додатком грозђа током бурног врења<sup>а</sup>

Фактори	F	p
Сорта грозђа	23,28	<b>0,00</b>
Удео грозђа	125,89	<b>0,00</b>
Квасац	0,00	1,00
Сорта грозђа*удео грозђа	5,04	<b>0,02</b>
Сорта грозђа*квасац	3,95	<b>0,03</b>
Удео грозђа*квасац	50,78	<b>0,00</b>
Сорта грозђа*удео грозђа*квасац	2,76	0,08

<sup>а</sup> F – узорачка вредност за примењени тест; p - ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

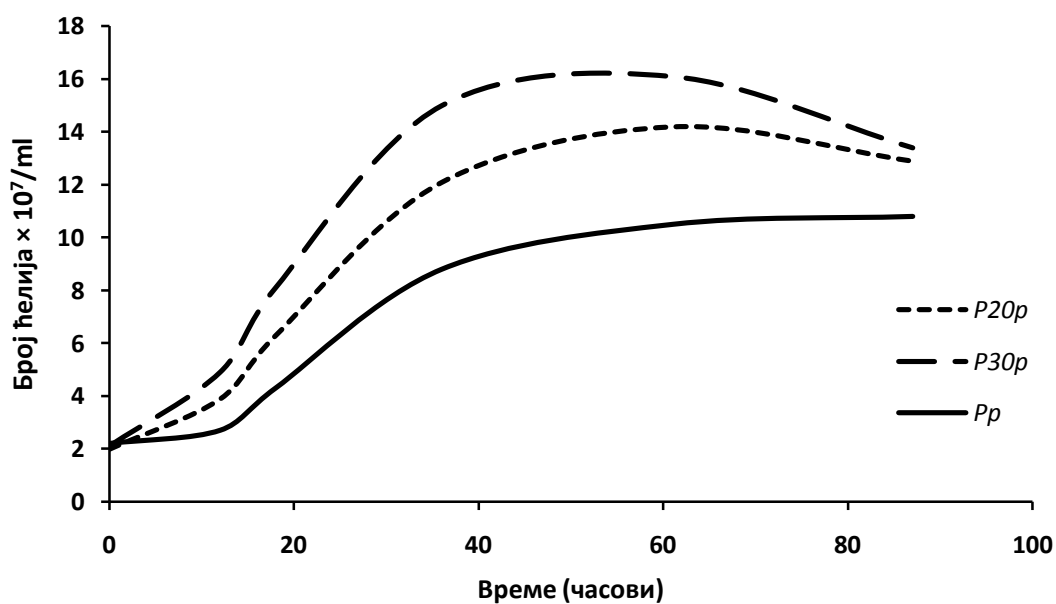
Брзина ферментације сва три пива произведена без додатка грозђа била је статистички значајно мања у поређењу са пивима са додатком грозђа. Већа брзина ферментације уочена је код пива са уделом грозђа од 30 % у односу на пива од исте сорте грозђа код којих је тај удео био 20 % (табела 6). Овај резултат је лако објашњив имајући у виду да се са већим уделом грозђа повећава и количина простих шећера у медијуму за ферментацију.

Табела 6. Резултати Тускеу-јевог теста за брзину ферментације експерименталних пива током бурног врења (потамњеним бројевима су означене статистички значајне разлике између узорака на нивоу значајности  $p < 0,05$ ).

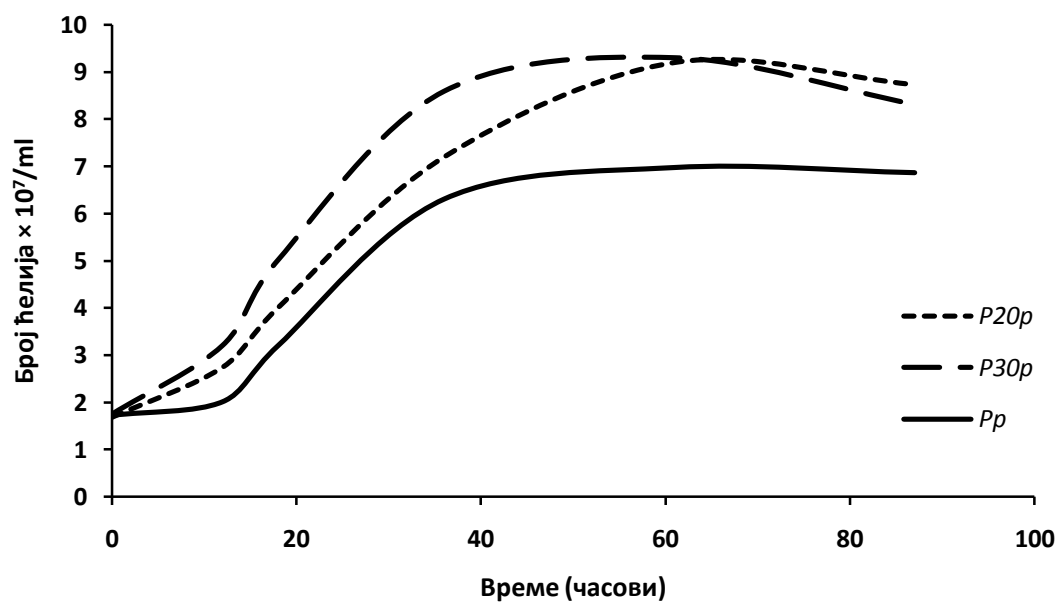
Пиво	P20v	P30p	P30v	PN20p	PN20v	PN30p	PN30v	CS20p	CS20v	CS30p	CS30v
P20p	0,09	0,33	<b>0,00</b>	0,99	0,99	0,97	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	0,99	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
P20v		<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	0,55	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
P30p			<b>0,01</b>	0,93	<b>0,04</b>	0,97	0,13	0,86	0,93	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
P30v				<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,99	0,33	<b>0,00</b>	1,00	1,00
PN20p					0,55	1,00	<b>0,00</b>	0,13	1,00	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
PN20v						0,43	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,55	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
PN30p							<b>0,01</b>	0,18	1,00	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
PN30v								0,93	<b>0,00</b>	1,00	1,00
CS20p									0,13	0,55	0,55
CS20v										<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
CS30p											1,00

### 5.3 Концентрација ћелија квасца током ферментације

Мерење концентрације ћелија квасца током ферментације је један од директних начина за праћење тока и перформанси врења. У пиварама није уобичајено да се одређује стварни број ћелија квасца, јер су подаци који се добијају непоуздани због хетерогености садржаја у великим индустријским ферменторима. Међутим, пракса је да се након завршене ферментације процењује количина и квалитет (вијабилност) квашчеве биомасе, на основу чега се може донети закључак о размножавању квасца током врења и о могућности његове даље употребе (Boulton и Quain, 2001). За разлику од комерцијалне индустријске производње, у лабораторијским ферментацијама је могуће прилично прецизно пратити раст биомасе квасца. У експерименталном раду одређиван је број ћелија квасца током лабораторијске производње пива са додатком грозђа сорте прокупац употребом *Thoma* коморе и методе засејавања. Резултати су приказани на сликама б3-б6, где је извршено и поређење са растом квасца током ферментације контролних пива.

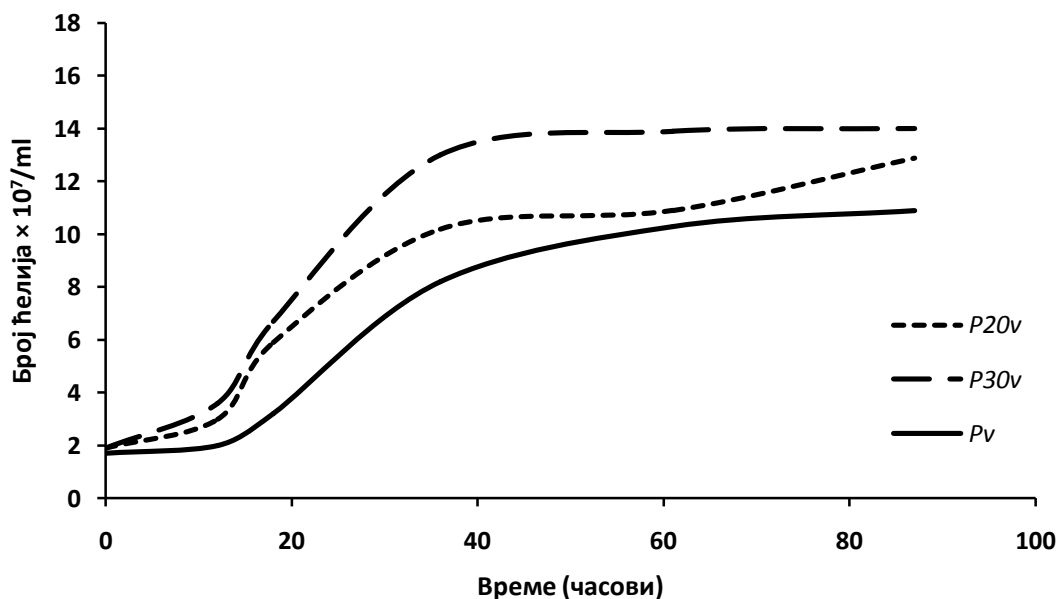


Слика 63. Број ћелија квасца *S. pastorianus* током главног врења код узорака са 20 и 30 % прокупца и контролног пива (*P20p*, *P30p* и *Pp*, респективно) (*Thoma* комора)

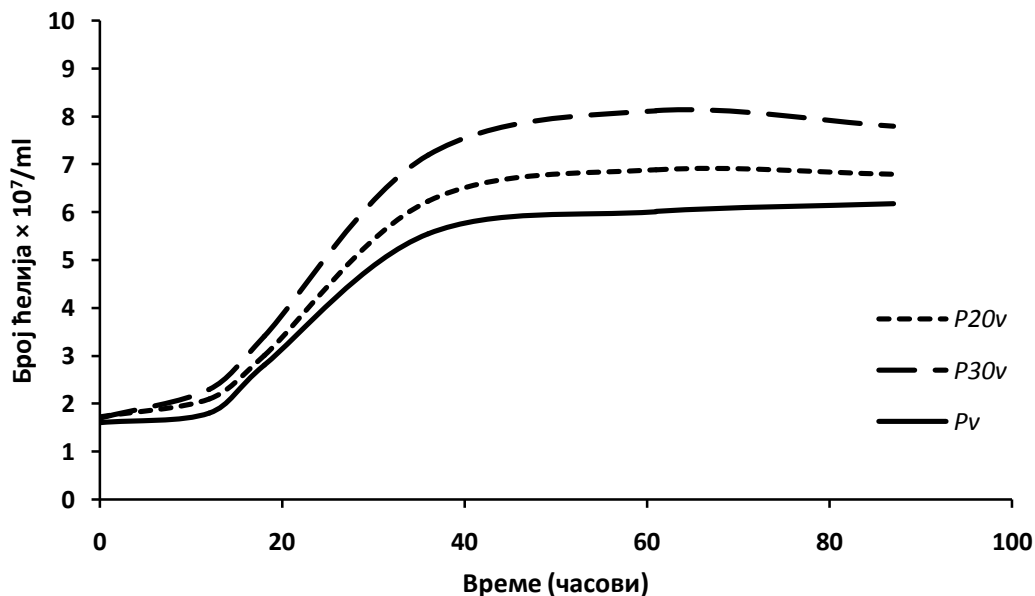


Слика 64. Број ћелија квасца *S. pastorianus* током главног врења код узорака са 20 и 30 % прокупца и контролног пива (*P20p*, *P30p* и *Pp*, респективно) (метода засејавања)





Слика 65. Број ћелија квасца *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 током главног врења код узорака са 20 и 30 % прокупца и контролног пива (*P20v*, *P30v* и *Pv*, респективно) (*Thoma* комора)



Слика 66. Број ћелија квасца *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 током главног врења код узорака са 20 и 30 % прокупца и контролног пива (*P20v*, *P30v* и *Pv*, респективно) (метода засејавања)

Број ћелија квасца на почетку ферментација се кретао у распону  $16,0-17,5 \times 10^6$  ћелија/ml према методи засејавања, док је према *Thoma* комори тај број био нешто већи:  $17,0-22,0 \times 10^6$  ћелија/ml. Разлика у вредностима између ове две

методе се углавном јавља из разлога што се са *Thoma* комором одређује укупан број ћелија у суспензији без могућности разликовања живих и мртвих ћелија, док је са методом засејавања могуће одредити само број живих ћелија. У зависности од аутора, оптимална количина квасца за засејавање се креће од 10 до 30 милиона ћелија по милилитру (Briggs et al., 2004; Kunze, 2004). Прецизно дозирање квасца у пракси није једноставно. Користе се аутоматски уређаји (количина квасца који се дозира најчешће се регулише помоћу система за мерење замућења), а уобичајено одступање које се толерише износи  $\pm 20\%$  (Kunze, 2004).

На сликама се јасно уочава да је *lag* фаза код ферментација контролних пива (*Pp* и *Pv*) била значајно дужа у поређењу са ферментацијама пива са додатком грозђа (*P20p*, *P30p*, *P20v* и *P30v*), при чему је разлика била још уочљивија у случају пивског квасца. Код пива са грозђем, нарочито код узорака ферментисаних пивским квасцем (*P20p* и *P30p*), интензиван раст квасца је примећен готово одмах након засејавања, а разлог за то је вероватно добра прилагођеност квасца на услове ферментације (температура, рН), адекватна аерација и повећана количина простих шећера. Раст квасца је био најинтензивнији код пива са уделом грозђа од 30 %, при чему је разлика у поређењу са другим узорцима била статистички значајна. Овакав резултат указује да је мешавина сладовине и кљука грозђа нутритивно богатији медијум у односу на чисту сладовину. Максимална количина биомасе је код свих узорака постизана након 40-50 часова, при чему је пораст квасца *S. pastorianus* био већи у поређењу са квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116. Током ферментације узорака *P20p* и *P30p* максимална количина квасца је била скоро идентична, док је код пива *P20v* и *P30v* разлика била веома значајна. У табели 7 приказане су максималне количине биомасе квасца у испитиваним узорцима. Током индустријске производње пива, у фази најизраженијег раста концентрација ћелија је  $30 - 40 \times 10^6$  ћелија/ml, док у неким процесима достиже и до  $100 \times 10^6$  ћелија/ml (Kunze, 2004). Поредице добијене вредности са литературним, може се закључити да је количина биомасе квасца при производњи експерименталних пива са грозђем била у опсегу карактеристичном за ферментације лагер пива.

Табела 7. Максималан број ћелија квасца/ml ( $\times 10^7$ ) у испитиваним узорцима

Узорак	Метода засејавања	Thoma комора
<i>Pp</i>	6,98±0,85	10,80±1,36
<i>Pv</i>	6,18±0,68	10,90±1,69
<i>P20p</i>	9,20±1,01	14,20±1,45
<i>P20v</i>	6,88±0,95	12,90±1,88
<i>P30p</i>	9,31±0,99	16,10±2,05
<i>P30v</i>	8,12±0,89	14,00±1,28

#### 5.4 Физичко-хемијске карактеристике пива

Најважније физичко-хемијске особине произведених експерименталних пива приказане су у табелама 8 и 10. Ови параметри имају велики утицај на сензорни квалитет и микробиолошку стабилност пива: виши садржај алкохола и нижа рН вредност повећавају микробиолошку стабилност, док пуноћа укуса углавном зависи од садржаја екстракта. Такође, добар однос садржаја алкохола и заосталог екстракта је веома битан за укус и осећај његове пуноће.

Алкохол је један од битних састојака пива и његов садржај се обично креће око 5 % v/v (садржај алкохола у највећем броју пива која су присутна на светском тржишту је 3-6 % v/v) (Vamforth, 2002). Етанол у количинама у којима је присутан у стандардним пивима, не утиче на укус, али има знатан утицај на арому пива, дајући му алкохолни и загревајући карактер. Он такође утиче и на сензорну перцепцију осталих ароматских компоненти, утицањем на њихову расподелу између течне фазе, пене и гасовите фазе изнад течности. Управо из тог разлога, производња безалкохолног пива не представља једноставно уклањање или превенцију стварања етанола, већ такође и проналажења начина да се његов недостатак надомести (Hughes и Baxter, 2001).

Сва пива произведена са додатком грозђа имала су већи садржај алкохола у поређењу са контролним узорцима, што је и очекивано узимајући у обзир да је екстракт у полазним медијумима код узорака са грозђем такође био значајно

већи. Садржај алкохола пива са грожђем се кретао у распону од 5,72-7,33 % v/v, док је код контролних узорака садржај алкохола био нешто испод 5 % v/v.

Табела 8. Садржај алкохола, степен преврелости и енергетска вредност испитиваних узорака

Узорак	Алкохол % v/v	Ег % m/m	Еа % m/m	RDF % m/m	ADF % m/m	Kalorije (kJ/100 ml)
<i>Pp</i>	4,91±0,10	4,09±0,12	2,31±0,09	66,02±0,37	80,03±0,45	174,05±0,47
<i>Pv</i>	3,65±0,12	4,14±0,13	2,80±0,10	58,68±0,22	71,20±0,25	146,20±0,86
<i>P20p</i>	6,33±0,11	3,67±0,09	1,40±0,02	73,74±0,55	89,47±0,63	200,17±0,39
<i>P20v</i>	5,72±0,16	4,43±0,06	2,38±0,12	67,61±0,33	81,77±0,27	197,9±0,31
<i>P30p</i>	6,87±0,13	3,46±0,10	1,01±0,01	76,36±0,42	92,70±0,62	209,19±0,36
<i>P30v</i>	6,35±0,12	4,52±0,09	2,06±0,08	70,85±0,38	85,72±0,47	209,55±0,22
<i>CS20p</i>	6,65±0,15	3,70±0,15	1,32±0,05	74,52±0,35	90,39±0,48	207,97±0,95
<i>CS20v</i>	5,97±0,11	4,25±0,10	2,11±0,11	69,48±0,49	84,08±0,63	200,83±0,37
<i>CS30p</i>	7,27±0,14	4,03±0,09	1,46±0,08	74,55±0,30	90,23±0,42	227,26±0,82
<i>CS30v</i>	6,51±0,15	4,29±0,07	1,98±0,10	71,08±0,47	85,97±0,49	213,83±0,60
<i>PN20p</i>	6,63±0,20	4,03±0,11	1,67±0,15	72,74±0,91	88,08±0,99	212,82±0,37
<i>PN20v</i>	6,32±0,15	4,55±0,11	2,30±0,13	69,22±0,30	83,62±0,35	213,44±0,30
<i>PN30p</i>	7,33±0,14	4,29±0,04	1,70±0,09	73,51±0,11	88,86±0,22	232,49±0,35
<i>PN30v</i>	6,98±0,16	4,37±0,08	1,9±0,14	72,15±0,20	87,20±0,27	225,76±0,47
<i>P30ps</i>	7,00±0,18	3,13±0,07	0,63±0,05	78,50±0,33	95,45±0,41	207,25±0,37

Од узорака пива са грожђем, најнижи садржај алкохола имала су пива са додатком прокупча, док се пива са додатком *cabernet sauvignon* и *pinot noir* нису статистички значајно разликовала. Сва пива која су ферментисана са квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала су мањи садржај алкохола и мањи степен преврелости у поређењу са одговарајућим пивима ферментисаним са квасцем *S. pastorianus*. Узрок за ову појаву је највероватније боља прилагођеност квасца *S. pastorianus* на медијум за ферментацију, а превасходно боља адаптираност на температурни режим ферментације. Наиме, главно вреће је вођено на

температури од 10°C, што је минимална препоручена температура за активност квасца *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116. Такође, током накнадног врења температура је снижавана све до 0°C, на којој је ферментација и завршена. Из ових разлога, разумљиво је што је степен преврелости, а последично и садржај алкохола, нижи у пивима ферментисаним винским квасцем. Прави степен преврелости код лагер типа пива се обично креће у распону од 60-70 % (Munroe, 2006). Код експерименталних пива ферментисаних винским квасцем прави степен преврелости је био у границама од 58,68-72,15 %, тако да се може закључити да је и са овим типом квасца постигнут задовољавајући ефекат. Најнижи степен преврелости постигнут је код контролног пива ферментисаног винским квасцем (*Pv*), где је најбоље уочена слабија адаптираност квасца *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 на примењене услове ферментације. Наиме, узорак *Pv* добијен је ферментацијом чисте сладовине, тако да је услед недостатка простих шећера из грозђа нижи степен преврелости био још уочљивији.

Комерцијално доступна пива произведена са додатком кљука или шире грозђа имају садржај алкохола у распону од 4,9 до 10,5 % v/v, при чему је код највећег броја удео алкохола 8-10 % v/v. Према садржају алкохола, добијена експериментална пива су упоредива са поменутиим комерцијалним, а такође не одступају много ни од стандардних светлих лагер пива. Ова чињеница је важна са аспекта потрошача који су већ навикнути на одређену алкохолну јачину постојећих пива.

Садржај екстракта у пиву је веома значајан параметар који утиче на многе аспекте квалитета пива, а нарочито на његова сензорна својства. Екстракт у пиву код кога је екстракт у основној сладовини око 12°P садржи приближно:

- 75-85% угљених хидрата, посебно декстрина (малтотетраоза, малтопентаоза и малу количину малтотриозе),
- 4,5-9,0 % протеина,
- 3,5-5,0 % глицерина,
- 3-4 % минерала,
- 2-3 % танина, горких једињења и бојених материја,
- 0,7-1,0 % органских киселина,
- и релативно малу количину витамина (Kunze, 2004; Gresser, 2009).

Беланчевински састојци екстракта битно утичу на стабилност пене, пуноћу укуса и колоидну стабилност пива, док глицерин доприноси пуноћи и хармоничности укуса пива (Kunze, 2004). Због свега претходно наведеног, веома је битно водити процес производње на тај начин да након завршене ферментације у пиву остане довољан садржај екстракта који ће пиву дати карактеристичну пуноћу укуса. Такође, веома је битан баланс између садржаја алкохола и заосталог екстракта, тако да код производње пива са већим уделом алкохола треба водити рачуна да и садржај заосталог екстракта буде већи.

Табела 9. Просечан садржај екстракта у различитим комерцијалним типовима пива (Kunze, 2004)

Врста пива	Привидни екстракт, %		Прави екстракт, %	
	просек	од-до	просек	од-до
Светло стандард	2,4	1,5-3,4	4,2	4,2-5,0
Светло експорт	2,7	2,0-3,9	4,6	2,7-6,0
Мартовско	3,3	2,5-4,3	5,2	4,6-6,1
Плзенско	2,3	1,5-3,7	4,1	2,9-5,6
Бок (Bock)	4,1	3,4-6,8	6,5	5,8-8,7
Дијетално	-0,1	-1,2-0,3	1,9	1,6-2,1
Безалкохолно	5,3	2,0-7,6	5,5	2,9-7,6
Стандардно пшенично	2,4	1,8-3,7	4,3	3,7-5,3

Ради поређења са добијеним експерименталним пивима, у табели 9 је приказан садржај екстракта неких врста пива. Прави екстракт у експерименталним пивима, укључујући и контролна пива, се кретао у распону 3,13-4,55 %. Уколико се ове вредности упореде са вредностима у табели, може се закључити да су према садржају екстракта пива са додатком грозђа веома блиска стандардном, експорт и плзенском типу пива. Са друге стране, према садржају алкохола пива са грозђем много су ближа бок типу пива, па се могло очекивати да се одликују мањом пуноћом укуса са израженом алкохолном нотом. Међутим, богат ароматски комплекс и повећана газираност пива са грозђем резултирали су да током сензорне анализе није била детектована мања пуноћа укуса нити нехармоничност узрокована повишеним садржајем алкохола. С обзиром да су

пива ферментисана квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала нижи степен преврелости, очекивано је и садржај екстракта у њима био виши. У пивима која су се међусобно разликовала само по уделу кљука грозђа садржај екстракта се није статистички значајно разликовао.

Табела 10. Боја, горчина, рН и садржај CO<sub>2</sub> у испитавиним узорцима

Узорак	Боја (ЕБЦ јединице)	Горчина (ЕБЦ јединице)	рН	CO <sub>2</sub> (g/L)
<i>Pp</i>	7,58±0,11	27±1	4,60±0,11	5,05±0,09
<i>Pv</i>	7,20±0,08	27±1	4,77±0,12	5,01±0,10
<i>P20p</i>	9,30±0,21	22±1	4,26±0,10	5,75±0,12
<i>P20v</i>	7,88±0,09	23±1	4,35±0,08	5,80±0,15
<i>P30p</i>	10,63±0,35	21±1	4,03±0,09	5,82±0,13
<i>P30v</i>	10,21±0,24	21±1	4,15±0,05	5,81±0,11
<i>CS20p</i>	19,45±0,42	22±1	3,97±0,04	5,89±0,16
<i>CS20v</i>	14,58±0,31	22±1	4,11±0,05	5,90±0,11
<i>CS30p</i>	24,75±0,39	21±1	3,96±0,04	6,00±0,09
<i>CS30v</i>	22,4±0,36	22±1	4,09±0,07	5,93±0,13
<i>PN20p</i>	11,00±0,09	23±1	4,03±0,04	5,95±0,14
<i>PN20v</i>	7,88±0,06	22±1	4,18±0,07	6,02±0,14
<i>PN30p</i>	12,65±0,11	23±1	3,65±0,02	6,05±0,12
<i>PN30v</i>	10,30±0,14	23±1	4,01±0,03	6,10±0,17
<i>P30ps</i>	10,75±0,26	21±1	4,09±0,06	5,88±0,08

рН вредност пива је обично 4,5 до 4,7, док је код пшеничних пива нешто нижа: 4,3 до 4,5 (Kunze, 2004). Добијена експериментална пива са грозђем су имала рН вредност у опсегу 3,65-4,35, што је значајно ниже од уобичајених рН вредности за пива. Међутим, рН вредности вина се крећу у распону од 2,8 до 4,0 (најчешће 3,2-3,8) (Ribéreau-Gayon et al., 2006a), тако да су рН вредности пива са

грожђем, које су у интервалу између уобичајених рН вредности за вина и пива, у складу са очекиваним.

Нешто већа киселост пива са грожђем није утицала негативно на њихов сензорни квалитет, и представља карактеристично својство овог типа пива. Са повећањем удела грожђа киселост пива се повећава, при чему су сви узорци ферментисани винским квасцем имали вишу рН вредност у поређењу са одговарајућим узорцима ферментисаним пивским квасцем. рН вредност контролних пива је била у опсегу уобичајеном за стандардна светла лагер пива, при чему разлика између узорака  $Pp$  и  $Pv$  није била статистички значајна.

Садржај угљен-диоксида у пивима је обично 4-6 g/L (Gresser, 2009). Према овом параметру сва екпериментална пива су се уклапала у овај опсег (табела 10), с тиме да су пива са грожђем имала значајно виши садржај угљен-диоксида у поређењу са контролним узорцима. Није постојала статистички значајна разлика између пива произведених од исте сорте грожђа. Нешто већа газираност пива са грожђем позитивно је утицала на њихов сензорни квалитет, дајући им додатну свежину и рескост.

Горчина пива са грожђем је била од 21 до 23 ЕВС јединице, при чему није постојала статистички значајна разлика између узорака. Контролна пива су имала већу горчину (27 ЕВС) из разлога што је код пива са грожђем 20-30 % охмељене сладовине замењено са кљуком грожђа, услед чега је процентуални удео горких састојака у сладовини био мањи.

Према ЕВС методи, боја екперименталних пива са грожђем је била у опсегу од 7,88 до 24,75 ЕВС. Контролна пива су имала боју 7,58 ( $Pp$ ) и 7,20 ( $Pv$ ), што су вредности типичне за стандардна светла пива. Сва пива ферментисана квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала су незнатно светлију боју у поређењу са пивима ферментисаним са пивским квасцем, вероватно услед појаве веће оксидације фенолних једињења током ферментације са квасцем *S. pastorianus*. У прилог овој тврдњи иде и чињеница да су пива ферментисана винским квасцем имала већи садржај фенолних једињења и антиоксидативни капацитет (видети наредно поглавље). Пива са прокупцем и бургундцем црним су имала веома сличну светлоцрвену боју, док су пива са *cabernet sauvignon*-ом била значајно тамнија и по боји јако слична црвеним винима (табела 11).



Табела 11. *CIElab* хроматски параметри експерименталних пива

Узорак	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)	Доминантна таласна дужина (D65)
<i>Pp</i>	52,89±0,01	-0,06±0,01	23,52±0,01	23,52±0,01	90,15±0,01	576,15±0,01
<i>Pv</i>	54,66±0,01	1,64±0,03	29,26±0,02	29,31±0,02	86,80±0,07	577,25±0,03
<i>P20p</i>	46,52±0,06	8,12±0,03	22,83±0,04	24,24±0,03	70,43±0,09	582,54±0,03
<i>P20v</i>	48,06±0,00	10,20±0,02	19,52±0,01	22,02±0,01	62,43±0,05	584,95±0,02
<i>P30p</i>	42,19±0,01	13,74±0,02	20,37±0,01	24,57±0,02	56,00±0,04	587,87±0,02
<i>P30v</i>	47,75±0,01	13,37±0,02	22,62±0,01	26,28±0,01	59,40±0,03	586,50±0,01
<i>CS20p</i>	29,45±0,02	26,03±0,04	14,96±0,04	30,02±0,02	29,89±0,10	605,80±0,12
<i>CS20v</i>	34,07±0,02	27,74±0,08	16,45±0,03	32,25±0,06	30,67±0,11	604,72±0,11
<i>CS30p</i>	25,17±0,01	25,25±0,02	11,07±0,01	27,57±0,02	23,68±0,02	614,72±0,03
<i>CS30v</i>	26,08±0,01	29,43±0,03	12,64±0,02	32,03±0,03	23,25±0,05	617,80±0,12
<i>PN20p</i>	46,91±0,02	8,69±0,04	24,29±0,01	25,80±0,01	70,31±0,10	582,67±0,03
<i>PN20v</i>	49,45±0,01	7,41±0,01	20,08±0,01	21,41±0,00	69,74±0,03	582,53±0,01
<i>PN30p</i>	42,20±0,02	12,57±0,05	23,36±0,02	26,53±0,01	61,73±0,10	585,88±0,04
<i>PN30v</i>	43,20±0,00	15,57±0,02	21,10±0,02	26,22±0,01	53,57±0,05	588,94±0,02
<i>P30ps</i>	39,65±0,01	19,33±0,00	23,73±0,01	30,60±0,01	50,83±0,02	590,94±0,00

Међутим, треба имати у виду да карактеризација боје ЕВС методом даје ограничену информацију, говорећи само о интензитету апсорпције на једној таласној дужини (430 nm). На овај начин се може утврдити само интензитет једне боје, од јако светле до потпуно тамне. У случају стандардних светлих и тамних типова пива, ЕВС метод је задовољавајући, јер се боје пива углавном разликују само у нијанси, док је основна боја иста. Са друге стране, за боју пива произведених са додатком грозђа одговорна су сасвим друга једињења (антоцијани), чији је апсорпциони максимум на другој таласној дужини (око 520 nm). Из тог ралога боја узорака је мерена и ручним хромаметром са извором светлости  $D_{65}$ , при чему су резултати изражени преко просторних координата, односно *CIElab* параметара:  $L^*$  (осветљеност: 0 = црно, 100 = бело),  $a^*$  (од црвене до зелене),  $b^*$  (од плаве до жуте),  $C^*$  (*chroma*, засићеност) и  $H$  (*hue angle*, нијанса, мери угаону ротацију).

Табела 12. *CIElab* хроматски параметри експерименталних вина

Узорак	$L^*(D65)$	$a^*(D65)$	$b^*(D65)$	$C^*(D65)$	$h(D65)$	Доминантна таласна дужина (D65)
Прокупац	19,30±0,01	14,24±0,04	2,85±0,02	14,52±0,03	11,32±0,11	493,92±0,03
<i>Pinot noir</i>	19,20±0,02	14,43±0,09	2,83±0,06	14,70±0,08	11,09±0,28	493,97±0,07
<i>C. sauvignon</i>	18,38±0,01	9,00±0,04	1,48±0,04	9,12±0,03	9,31±0,29	494,29±0,08

У табелама 11 и 12 и на сликама 66 и 67 приказани су резултати мерења *CIElab* хроматских параметара експерименталних пива и вина. На основу параметра  $L^*$  који дефинише осветљеност узорка, може се закључити да су узорци пива ферментисани винским квасцем и у овом случају имали нешто светлију боју у поређењу са одговарајућим узорцима који су добијени ферментацијом са пивским квасцем. Овај резултат је у складу са ЕВС методом за одређивање боје. Са повећањем удела грозђа у ферментационом медијуму повећавао се и интензитет црвене боје пива, али и укупна обојеност узорака (интензитет осветљења се смањивао). На сликама 67 и 68 може се уочити да су сви узорци груписани у четири кластера:

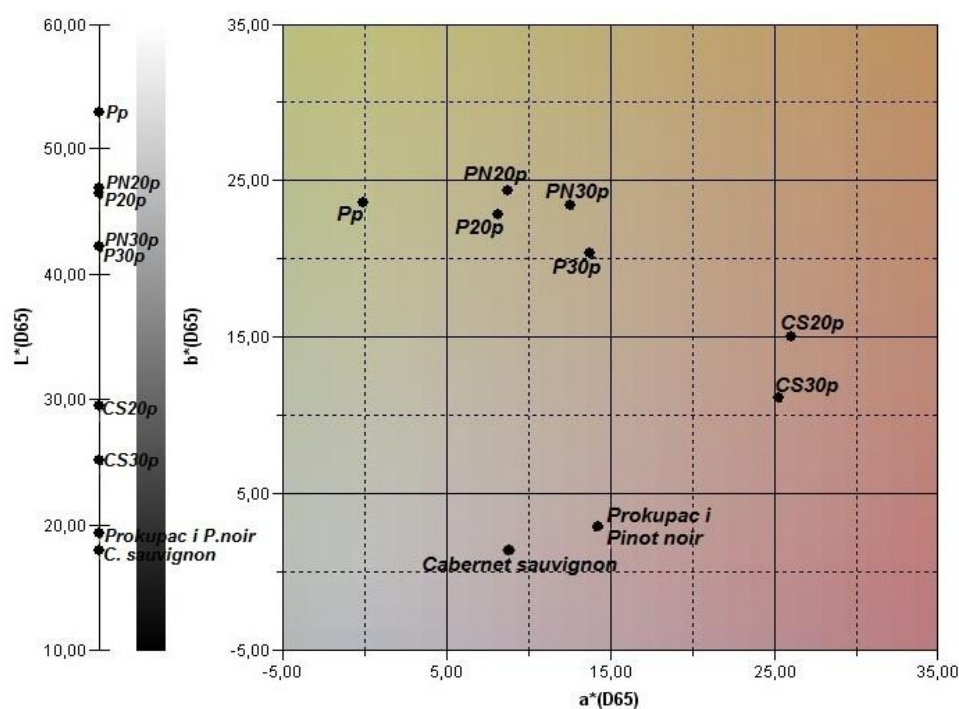
1) Контролна пива: одликују се чистом жутом бојом, са веома малим уделом црвене боје код пива *Pv*.

2) Пива са грозђем сорти прокупац и *pinot noir*: пива од ових сорти су имала веома сличну боју, са вредностима параметара  $a^*$  и  $b^*$  у опсегу 5 до 15 и 15 до 25, респективно. Према овим вредностима боја пива са ове две сорте грозђа је била жуто-црвена, са незнатно већим уделом жуте боје у односу на црвену.

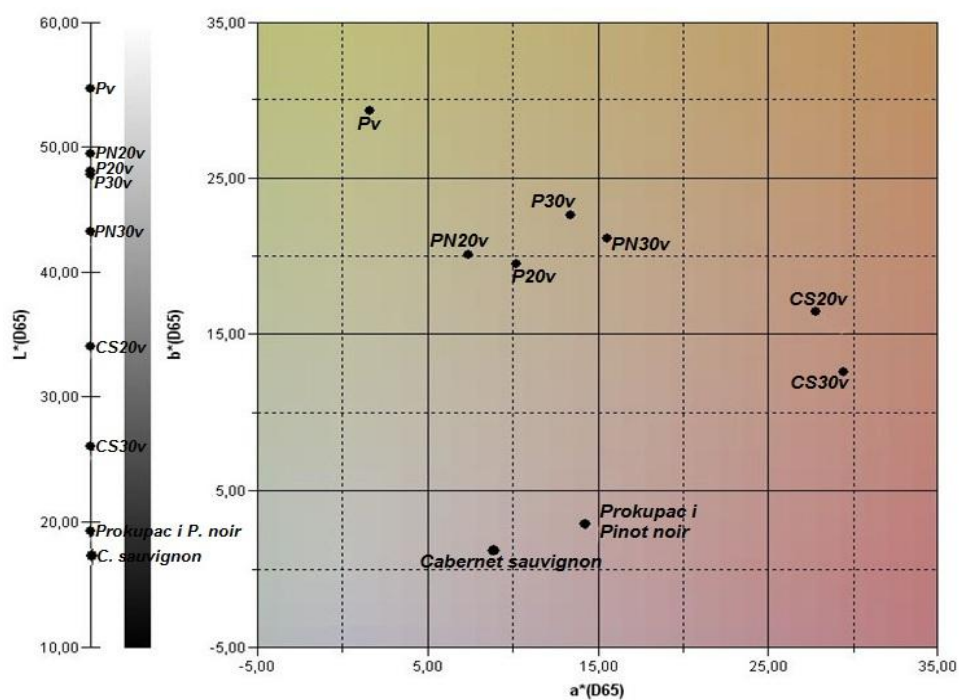
3) Пива са грозђем сорте *cabernet sauvignon*: боја ових пива је била црвено-жута, са значајно већим уделом црвене боје у односу на жуту. Могло се и очекивати да пива са овом сортом грозђа буду најтамнија и по боји најсличнија винима, јер је ова сорта грозђа изузетан извор фенолних и бојених једињења.

4) Вина добијена од истог грозђа које је коришћено и за производњу пива: боја вина је била црвена и изразито тамна, са  $L^*$  вредношћу мањом од 20. Такође, боја вина прокупац и *pinot noir* је била скоро идентична, док је боја *cabernet sauvignon*-а била тамнија и са мањим уделом црвене боје. Добијени

резултат објашњава због чега је боја пива са прокупцем и *pinot noir*-ом била слична, док су пива са *cabernet sauvignon*-ом била значајно тамнија.



Слика 67. CIElab хроматски параметри пива ферментисаних пивским квасцем и одговарајућих вина



Слика 68. CIElab хроматски параметри пива ферментисаних винским квасцем и одговарајућих вина

### 5.5 Садржај укупних фенолних једињења

У табели 13 приказан је садржај фенолних једињења експерименталних узорак пива, пива произведених са додатком грозђа и вина, одређених методама по ЕВС аналитици и по *Folin-Ciocalteu*-у.

Табела 13. Садржај укупних полифенолних једињења експерименталних пива и вина<sup>а</sup>

Узорак	Метода	
	ЕВС (mg/L)	Folin-Ciocalteu (mg/l GAE)
<i>Pp</i>	95,94±0,79*	470,74±7,40 <sup>а</sup>
<i>Pv</i>	102,50±0,16	467,78±6,19 <sup>а</sup>
<i>P20p</i>	151,70±0,28	550,00±4,44 <sup>б,д</sup>
<i>P20v</i>	332,10±0,57	599,26±6,51 <sup>б,ђ</sup>
<i>P30p</i>	174,66±0,45	569,63±15,00 <sup>б,в</sup>
<i>P30v</i>	371,24±0,39	664,07±9,71 <sup>г</sup>
<i>CS20p</i>	257,48±0,59	752,78±13,89 <sup>е</sup>
<i>CS20v</i>	674,04±0,51	708,15±14,07 <sup>ж</sup>
<i>CS30p</i>	347,68±0,45	820,00±1,11 <sup>з</sup>
<i>CS30v</i>	754,40±0,40	829,63±21,50 <sup>з</sup>
<i>PN20p</i>	154,16±0,72	520,37±12,78 <sup>д</sup>
<i>PN20v</i>	347,68±0,33	605,56±6,94 <sup>ђ</sup>
<i>PN30p</i>	248,46±0,67	574,07±8,49 <sup>б,в,ђ</sup>
<i>PN30v</i>	380,48±0,58	645,93±19,57 <sup>г</sup>
<i>P30ps</i>	131,4±0,49	516,54±5,53
Прокупац	-	1551,11±63,75
<i>Pinot noir</i>	-	2093,33±30,55
<i>Cabernet sauvignon</i>	-	2547,65±33,40

<sup>а</sup>Различита слова у истим колонама означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

\*Код ЕВС методе сви узорци су се статистички значајно разликовали.

Према ЕВС методи, сви узорци су се међусобно статистички значајно разликовали по садржају укупних фенолних једињења, при чему су пива са грозђем имала значајно већу концентрацију ових једињења у поређењу са контролним пивима. Према овој методи, светла лагер пива са екстрактом у

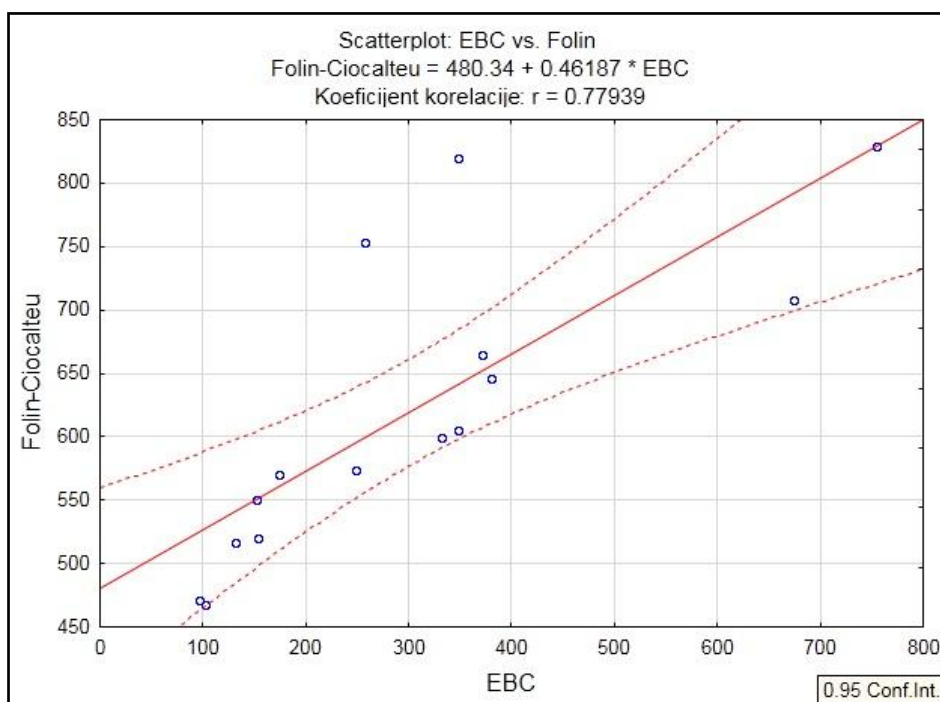
основној сладовини од око 12°P имају садржај фенолних једињења у распону од 96,4 до 234,1 mg/l (Polshin et al., 2010.; Malfliet et al., 2008; Kunze, 2004). Поредићи експерименталне вредности са литературним подацима, може се закључити да је концентрација фенолних једињења у контролним узорцима била на доњој граници карактеристичној за овај тип пива.

Сва пива ферментисана квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала су значајно већи садржај фенолних једињења у поређењу са пивима ферментисаним са пивским квасцем, при чему је разлика била већа од два пута. Уколико се узме у обзир и да је боја пива произведених са винским квасцем била светлија, може се закључити да је оксидација фенолних једињења код пива произведених са пивским квасцем била интензивнија. Наиме, вински квасац *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 има изражену потребу за великим количинама кисеоника које су му неопходне за синтезу фактора преживљавања, тако да највећи део раствореног кисеоника апсорбује, чиме се уједно смањује могућност оксидације фенола и других оксидабилних супстанци. Пива са грожђем сорти прокупац и *pinot noir* су имала сличан садржај фенолних једињења, док су пива са грожђем *cabernet sauvignon* била значајно богатији извор ових једињења. Највећа концентрација фенолних једињења пронађена је у пиву са 30 % *cabernet sauvignon*-а ферментисаном винским квасцем (*CS30v*) (754,40 mg/l), што је више од 7 пута већа концентрација у поређењу са контролним пивом.

Апсолутне вредности за садржај фенолних једињења добијене методом по *Folin-Ciocalteu*-у су се значајно разликовале у поређењу са резултатима добијеним ЕВС методом, што је потпуно разумљиво узимајући у обзир да ниједна од метода није строго селективна према фенолним једињењима и да је у методи по *Folin-Ciocalteu*-у гална киселина коришћена као стандард. У сваком случају, корелација између ове две коришћене методе је била јако велика и статистички веома значајна ( $r=0,779$ ;  $t=4,485$ ;  $p=0,001$ ) (слика 69). Висока корелација између метода је потврда да се обе методе могу успешно користити за одређивање укупних фенолних једињења у пиву, нарочито ако је битније поређење више различитих узорака од апсолутне вредности концентрације ових једињења.

Према методи по *Folin-Ciocalteu*-у, контролна пива се нису међусобно статистички значајно разликовала, при чему је концентрација полифенола у њима

била значајно мања у поређењу са пивима са грожђем. Међутим, за разлику од резултата ЕВС методе, контролна пива су према овој методи имала релативно висок садржај полифенола у поређењу са другим светлим лагер пивима са садржајем екстракта у основној сладовини од 10-12°P. Садржај фенолних једињења у контролним узорцима је био око 470 mg GAE/l, док се према литературним подацима укупна концентрација фенолних једињења у пивима овог типа креће од 152,01 до 521 mg GAE/l (Lugasi, 2005; Горјановић et al., 2010; Piazzon et al., 2010; Zhao et al., 2010). И према резултатима ове методе, укупан садржај фенолних једињења код пива са грожђем сорти прокупац и *pinot noir* је био сличан, док су пива са грожђем *cabernet sauvignon* имала највећи садржај ових једињења. Међутим, разлика између пива ферментисаних пивским и винским квасцем није била тако драстична, при чему између пива са 30 % *cabernet sauvignon*-а (*CS30p* и *CS30v*) није ни постојала статистички значајна разлика. Разлог за ову појаву може бити неселективност методе по *Folin-Ciocalteu*, где поред фенолних једињења, *Folin-Ciocalteu* реагенс реагује и са другим редукујућим нефенолним једињењима, као што су редукујући шећери, меланоидини, продукти мајардових реакција итд.



Слика 69. Корелација метода за одређивање укупних фенолних једињења

Пиво са 30 % прокупца код кога је током производње вршена стерилизација кљука (*P30ps*) је имало значајно мањи садржај фенолних једињења у поређењу са пивом са прокупцем где кљук није стерилисан (*P30p*), што указује да додатна стерилизација медијума за ферментацију битно утиче на интензивирање оксидације и деградације фенолних једињења.

На основу анализе варијансе (табела 14) може се закључити да су сви испитивани фактори (сорта грозђа, удео грозђа у медијуму за ферментацију и врста квасаца) имали статистички значајан утицај на садржај фенолних једињења експерименталних пива. Такође, испитивани фактори нису деловали независно, већ су и њихове међусобне интеракције биле веома значајне (сорта грозђа\*удео грозђа, сорта грозђа\*квасац, удео грозђа\*квасац, сорта грозђа\*удео грозђа\*квасац), што значи да је интензитет утицаја једног фактора зависио од нивоа других испитиваних фактора.

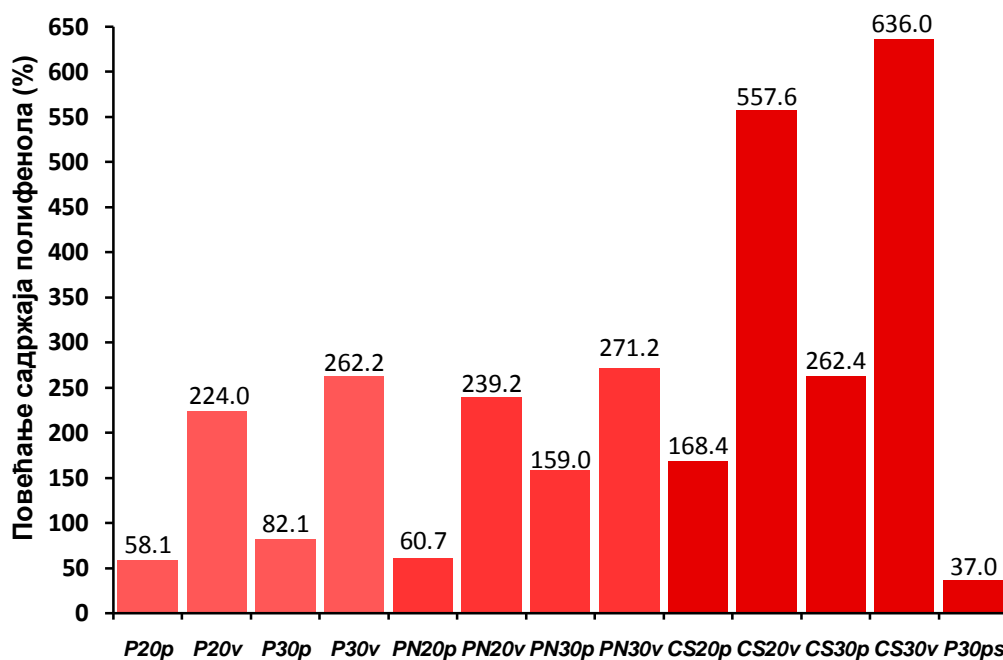
Табела 14. Резултати анализе варијансе за садржај укупних полифенола<sup>a</sup>

Фактори	ЕВС		Folin-Ciocalteu	
	F	p	F	p
Сорта грозђа	541487,7	0,00	156133,9	0,00
Удео грозђа	1389661,3	0,00	767,0	0,00
Квасац	1411092,0	0,00	1815,8	0,00
Сорта грозђа*удео грозђа	139332,5	0,00	90,7	0,00
Сорта грозђа*квасац	132800,8	0,00	202,0	0,00
Удео грозђа*квасац	327682,9	0,00	47,4	0,00
Сорта грозђа*удео грозђа*квасац	35278,3	0,00	35,3	0,00

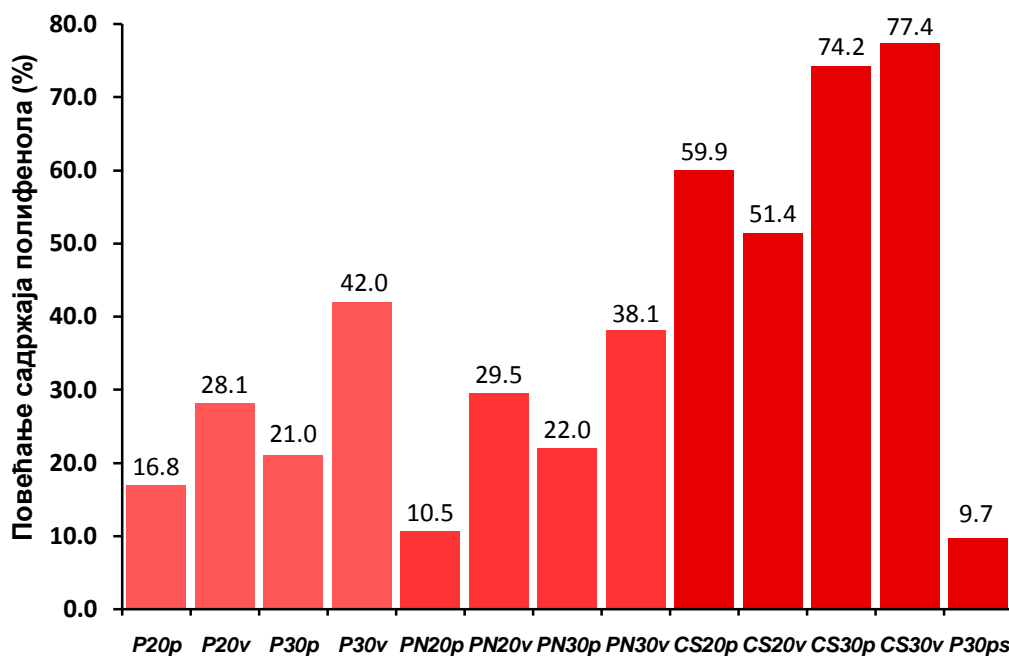
<sup>a</sup>F – узорачка вредност за примењени тест; p – ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

Изражено у процентима, повећање садржаја фенолних једињења код пива са грозђем у поређењу са контролним пивима се кретало у опсегу од 37 до 636 % према ЕВС методи, односно од 9,7 до 77,4 % према *Folin-Ciocalteu* методи (слике 70 и 71). Најмање повећање је било код пива са 30 % прокупца код кога је током производње вршена стерилизација кљука (*P30ps*), док је највеће повећање забележено код пива са 30 % *cabernet sauvignon*-а ферментисаног винским квасцем (*CS30v*). Са повећањем удела грозђа у медијуму за ферментацију

повећавао се и садржај фенолних једињења у пивима, а најбољи извор ових једињења било је грожђе *cabernet sauvignon*.



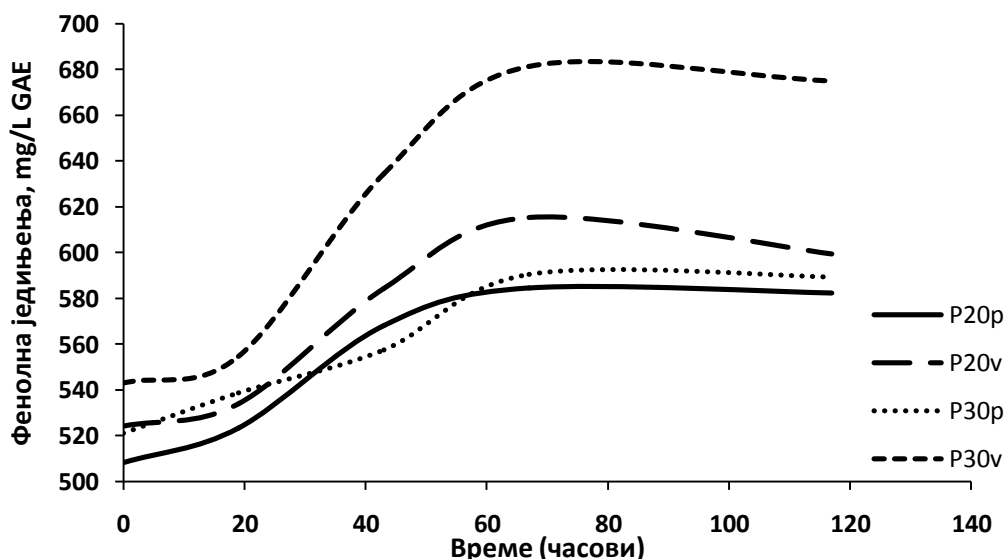
Слика 70. Повећање садржаја полифенола у односу на контролна пива према ЕВС методи



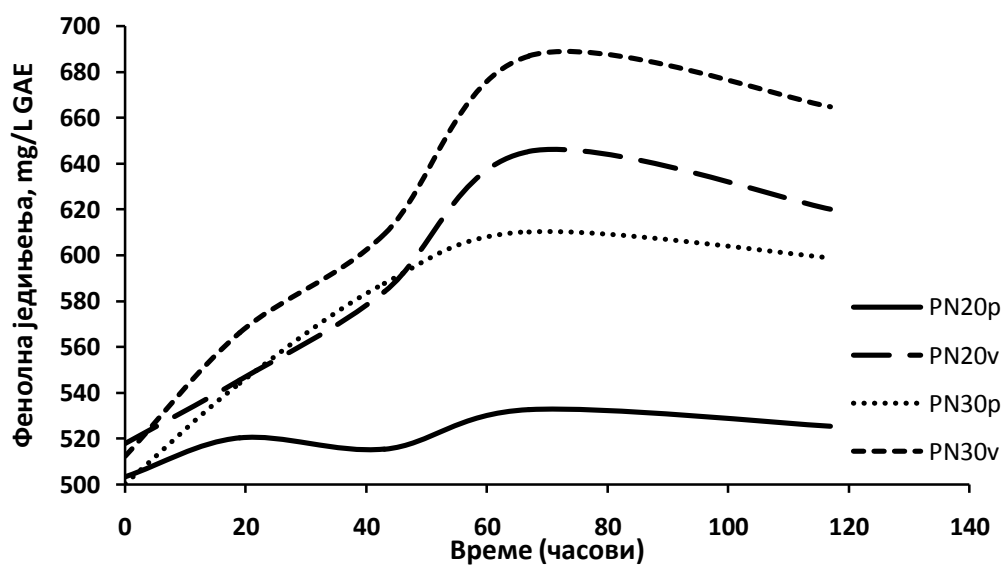
Слика 71. Повећање садржаја полифенола у односу на контролна пива према *Folin-Ciocalteu* методи



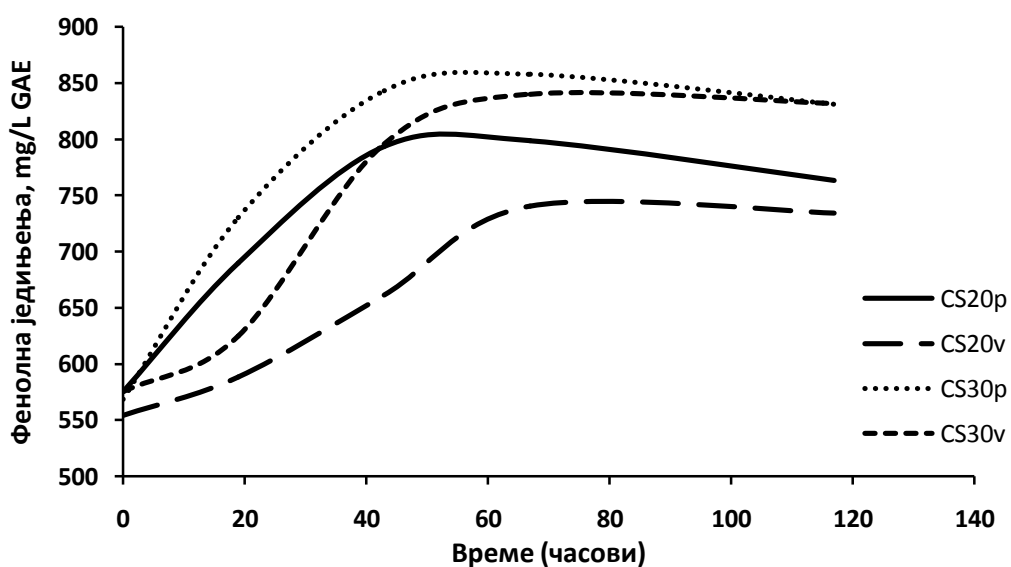
Током главног врења праћена је динамика екстракције фенолних једињења у циљу утврђивања оптималног тренутка за одвајање комине од течног дела ферментишућег медијума (слике 72-75). Код пива са прокупацем и *pinot noir*-ом максимална концентрација фенолних једињења је постизана након 60-70 часова, док је у случају пива са *cabernet sauvignon*-ом максимум постизан нешто раније, након 50-60 часова. Иако је *cabernet sauvignon* богатији извор фенолних једињења од прокупца и *pinot noir*-а, максимална екстракција је постизана у краћем временском интервалу. Разлози за ову појаву могу бити бурнија ферментација услед већег садржаја шећера и бржи пораст садржаја алкохола код пива са *cabernet sauvignon*-ом (са повећањем садржаја алкохола повећава се и екстракциона моћ). Такође, бржи пораст концентрације фенолних једињења запажен је при ферментацијама са винским квасцем, изузев узорака *CS20p* и *CS20v* код којих је била обрнута ситуација. Након достизања максимума, садржај фенолних једињења је у наставку ферментације благо опадао услед појаве оксидације и полимеризације или као последица таложења са ћелијама квасца. На основу добијених резултата може се закључити да је у циљу максималне екстракције и очувања фенолних једињења најбоље извршити одвајање комине око шездесетог часа ферментације.



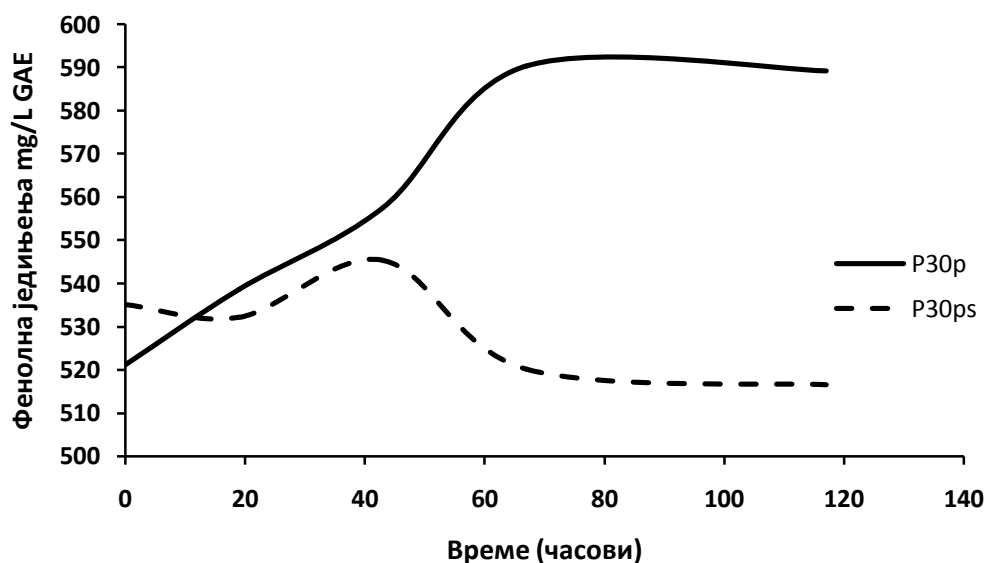
Слика 72. Динамика екстракције фенолних једињења током ферментације пива са додатком грозђа сорте прокупац



Слика 73. Динамика екстракције фенолних једињења током ферментације пива са додатком грозђа сорте *pinot noir*



Слика 74. Динамика екстракције фенолних једињења током ферментације пива са додатком грозђа сорте *cabernet sauvignon*



Слика 75. Динамика екстракције фенолних једињења током ферментације пива *P30p* и *P30ps*

У поређењу са другим пивима са грожђем, профил динамике екстракције код пива са 30 % прокупца код кога је кљук стерилисан (*P30ps*) је био у потпуности другачији. Код овог пива није било наглог пораста садржаја фенолних једињења, већ само благо повећање у периоду од 20.-ог до 30.-ог часа, након чега је забележен пад концентрације. Узрок овакве појаве је термички третман кљука пре ферментације, где је под утицајем температуре и кључања дошло до значајне екстракције фенола, па је касније током ферментације екстракција била знатно мања. Међутим, максимална концентрација фенола у узорку *P30ps* је била значајно нижа у поређењу са узорком код кога кљук није био стерилисан (*P30p*), што јасно указује да термички третман поспешује оксидацију и полимеризацију фенолних једињења. Стерилизаја кљука је обављана у стакленом балону у аутоклаву, где је било потребно дуже време загревања ради постизања одговарајуће температуре. Такође, због запремине течности и геометрије суда било је потребно и доста времена за хлађење кљука до температуре ферментације. Имајући све ово у виду, сигурно је да се губици фенолних једињења могу смањити употребом измењивача топлоте где би време загревања било знатно краће, а хлађење након тога много брже. Због природе материјала који се загрева (присуство чврстих делова грожђа, пулпе, покожице и семенки) једно од најбољих

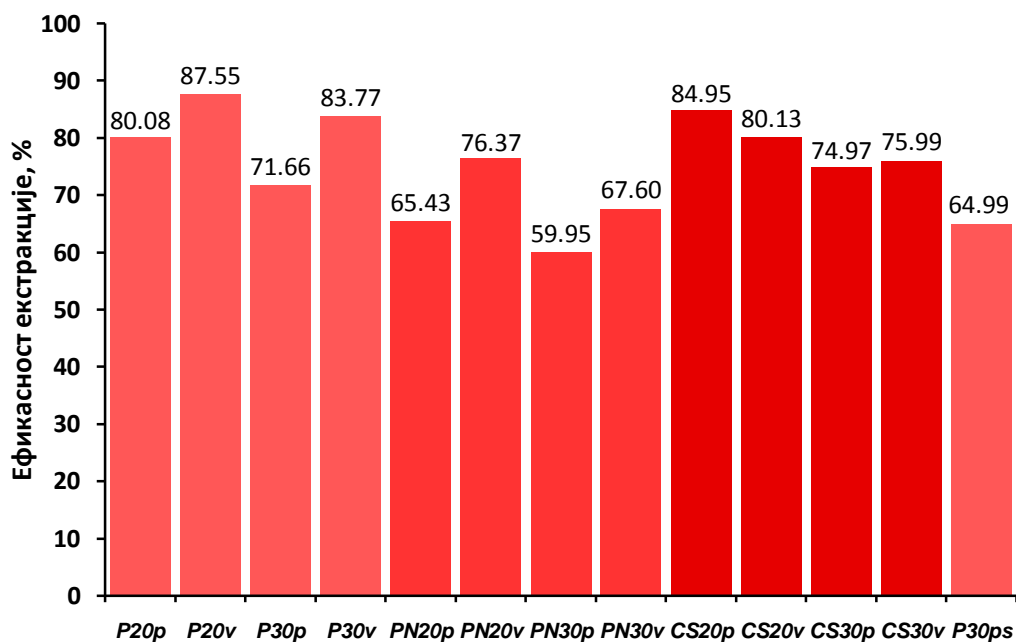
решења за термички третман кљука могли би бити цевасти пастеризатори са промотерима турбуленције.

Вина произведена од истог грожђа коришћеног у производњи експерименталних пива имала су неколико пута већи садржај фенолних једињења у поређењу са пивима. Као што је и очекивано, најбогатије овим једињењима било је вино *Cabernet sauvignon*, после кога су следили *Pinot noir* и Прокупац. Добијени резултати су у складу са литературним подацима, према којима се садржај укупних фенолних једињења у винима креће у следећем распону: *Cabernet sauvignon* 1580-3340 mg GAE/l, *Pinot noir* 731,06-3545 mg GAE/l и Прокупац 544,37-1159,37 mg GAE/l (Frankel et al., 1995; Sato et al., 1996; Landrault et al., 2001; Minussi et al., 2003; Li et al., 2009; Atanacković et al., 2012).

Иако је вино *Pinot noir* имало значајно већи садржај фенолних једињења у поређењу са Прокупцем, пива добијена са *pinot noir*-ом се према садржају ових једињења нису много разликовала од пива са прокупцем. То значи да је мацерација у случају пива са *pinot noir*-ом била непотпунија и мање ефикасна у поређењу са пивима са друге две сорте грожђа. Овај резултат није изненађујући ако се узме у обзир да је *pinot noir* сорта грожђа позната по слабијој екстракцији бојених и фенолних материја и по лошијој стабилности пигмената (Sacchi et al., 2005).

На слици 76 приказана је ефикасност екстракције фенолних једињења током производње пива са грожђем у поређењу са одговарајућим винима. За разлику од екстракције фенола из грожђа током производње вина, током производње експерименталних пива ефикасност екстракције је била значајно мања и кретала се од 59,95 до 87,55 % у односу на одговарајуће вино. Главни фактори који утичу на ефикасност мацерације су температура, дужина трајања, рН, садржај алкохола у медијуму и потапање, односно мешање комине. Температура ферментације код производње вина је доста већа у поређењу са ферментацијом лагер пива и за већину црвених вина ферментација се изводи на температури од 20-30°C (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Киселост кљука је значајно већа у односу на сладовину, а познато је да ниже вредности рН доприносе ефикаснијој екстракцији фенолних једињења (Vatai et al., 2009). Такође, садржај алкохола код вина је често више од два пута већи у поређењу са пивом, тако да је

то још један битан разлог што је ефикасност екстракције фенола код вина већа. Садржај алкохола у медијуму и дужина трајања мацерације директно зависе од полазног садржаја екстракта, односно ферментабилних шећера, тако да на те факторе није могуће много утицати. Такође, додатно подизање температуре врења је ограничено због квалитета пива и веома се прецизно мора пазити да се не прекорачи одређена максимална температура. Наиме, ако се врење води на нижој температури, по правилу се добија пиво бољег сензорног квалитета, јер настаје мање споредних производа ферментације, у првом реду виших алкохола и естара, а пиво има бољу пену и израженију пуноћу укуса (Kunze, 2004). Међутим, један од начина за побољшање екстракције фенолних једињења је примена ензимских препарата. У производњи црвених вина, препарати који садрже пектиназе, најчешће у комбинацији са хемицелулазама и целулазама, се често користе у циљу повећања екстракције бојених једињења и прекурсора ароме из покожице грозђа (Ugliano, 2009). У експерименталном раду нису коришћени ензимски препарати јер се тежило добијању новог производа коришћењем традиционалног начина производње. Свакако, утицај додатака ензимских препарата на принос фенолних једињења у производњи специјалних типова пива са грозђем може бити предмет неког наредног истраживања.



Слика 76. Ефикасност екстракције фенолних једињења у поређењу са одговарајућим винима

## 5.6 Антиоксидативни капацитет

У табели 15 приказан је антиоксидативни капацитет експерименталних пива и вина, одређен помоћу три различите методе.

Табела 15. Антиоксидативни капацитет експерименталних пива и вина<sup>a</sup>

Узорак	Метода		
	DPPH (mM TE)	FRAP (mM TE)	TEAC (mM TE)
<i>Pp</i>	0,81±0,01 <sup>a</sup>	1,56±0,08 <sup>a</sup>	2,58±0,02 <sup>a</sup>
<i>Pv</i>	0,73±0,03 <sup>b</sup>	1,28±0,07 <sup>b</sup>	2,77±0,02 <sup>b</sup>
<i>P20p</i>	1,02±0,00 <sup>c</sup>	2,59±0,09 <sup>c,g</sup>	4,61±0,03 <sup>B</sup>
<i>P20v</i>	1,14±0,02 <sup>d</sup>	2,66±0,02 <sup>c,d,g</sup>	4,85±0,07 <sup>r</sup>
<i>P30p</i>	1,05±0,01 <sup>c</sup>	2,80±0,07 <sup>d</sup>	5,22±0,03 <sup>d</sup>
<i>P30v</i>	1,18±0,01 <sup>d</sup>	3,07±0,03 <sup>e</sup>	6,46±0,06 <sup>h</sup>
<i>CS20p</i>	1,80±0,03 <sup>e</sup>	3,54±0,08 <sup>h</sup>	6,09±0,06 <sup>e</sup>
<i>CS20v</i>	1,99±0,01 <sup>f</sup>	3,75±0,06 <sup>i</sup>	7,25±0,05 <sup>ж</sup>
<i>CS30p</i>	2,03±0,02 <sup>f</sup>	4,04±0,05 <sup>j</sup>	6,61±0,08 <sup>h</sup>
<i>CS30v</i>	2,33±0,04 <sup>g</sup>	4,73±0,03 <sup>k</sup>	8,68±0,08 <sup>з</sup>
<i>PN20p</i>	0,86±0,01 <sup>a</sup>	2,07±0,06 <sup>f</sup>	4,18±0,03 <sup>и</sup>
<i>PN20v</i>	1,13±0,01 <sup>d</sup>	2,77±0,02 <sup>c,d</sup>	5,47±0,11 <sup>j</sup>
<i>PN30p</i>	1,07±0,01 <sup>c</sup>	2,51±0,03 <sup>g</sup>	4,37±0,05 <sup>к</sup>
<i>PN30v</i>	1,18±0,02 <sup>d</sup>	3,10±0,05 <sup>e</sup>	6,78±0,06 <sup>л</sup>
<i>P30ps</i>	0,93±0,02	2,38±0,08	4,48±0,07
Прокупац	4,39±0,02	12,31±0,14	18,16±0,17
<i>Pinot noir</i>	7,35±0,19	15,44±0,31	19,71±0,23
<i>Cabernet sauvignon</i>	7,55±0,01	16,29±0,24	20,65±0,12

<sup>a</sup>Различита слова у истим колонама означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

До сада је развијено неколико метода за одређивање антиоксидативног капацитета, али не постоји консензус око методе која би се узела као стандардна. Разлог за ово су разна ограничења и недостаци метода, као што су: ограничење код одређивања хидрофилних или хидрофобних антиоксиданата (једном методом се обично могу одредити само хидрофилни или само хидрофобни антиоксиданти),

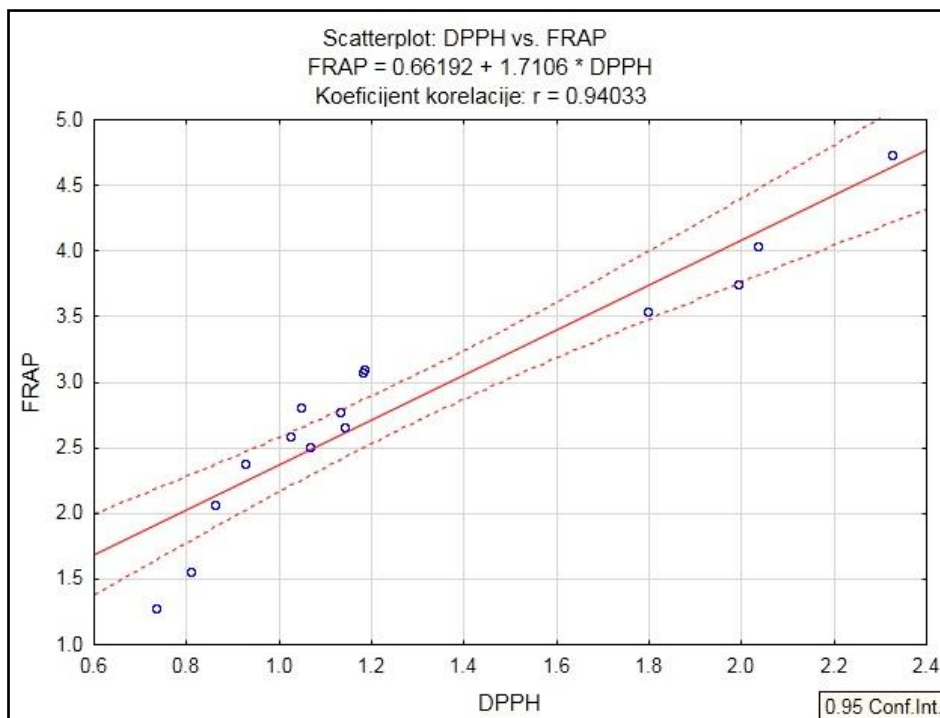
тешкоће код одређивања завршне тачке реакције, осетљивост на светлост многих реагенса, извођење анализе при рН вредности средине која је физиолошки ирелевантна, могућа интеракција са другим компонентама хране, употреба различитих стандарда за изражавање резултата итд. (Karadag et al., 2009). Због свега наведеног, за утврђивање антиоксидативног капацитета експерименталних пива и вина изабране су три најчешће употребљаване методе, како би се добијени резултати могли поредити са литературним подацима.

Антиоксидативни капацитет експерименталних узорака је био у статистички веома значајној корелацији са укупним садржајем фенолних једињења (слике 77-82 и табела 16). Овакви резултати су у складу са студијама које су доказале високу корелацију између укупног садржаја фенолних једињења одређеног методом по *Folin-Ciocalteu* и антиоксидативног капацитета код намирница код којих су фенолна једињења доминантни антиоксиданти (Huang et al., 2005; Paixão et al., 2007). Висока корелација са садржајем фенолних једињења је потврда да код добијених пива и вина фенолна једињења дају највећи допринос антиоксидативном капацитету. Такође, корелација између резултата добијених помоћу метода DPPH, FRAP и TEAC је била веома висока и статистички значајна.

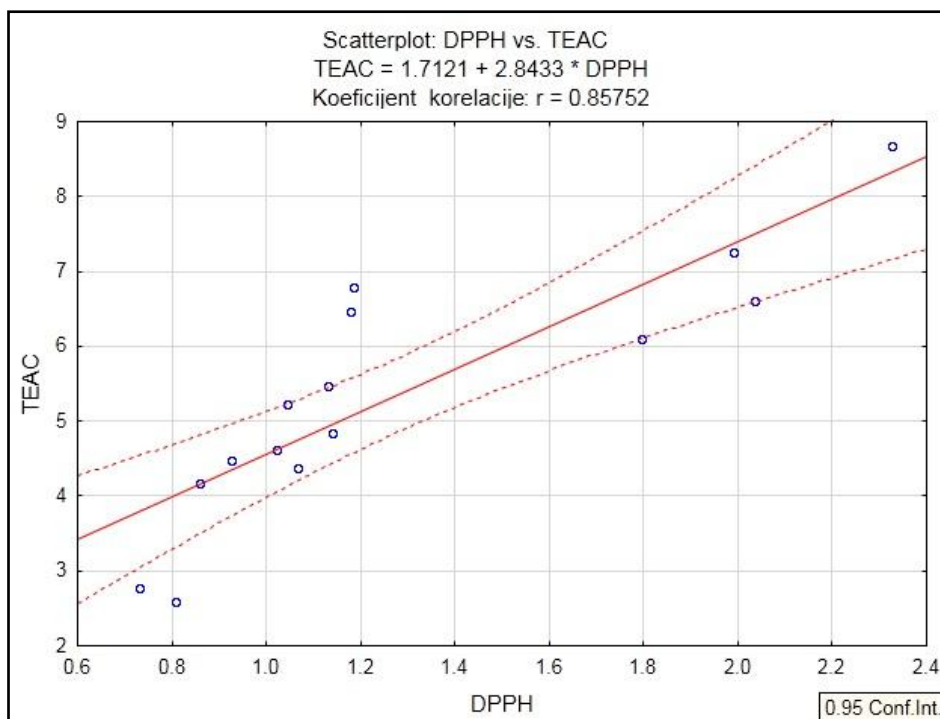
Табела 16. Корелација између антиоксидативног капацитета одређеног различитим методама и антиоксидативног капацитета и укупног садржаја фенола

Методе	r	r <sup>2</sup>	t	p
DPPH-FRAP	0,940	0,884	9,964	0,00
DPPH-TEAC	0,857	0,735	6,009	0,00
FRAP-TEAC	0,958	0,918	12,048	0,00
Folin-DPPH	0,952	0,906	11,225	0,00
Folin-FRAP	0,963	0,927	12,831	0,00
Folin-TEAC	0,903	0,816	7,582	0,00

r- коефицијент корелације; r<sup>2</sup>-коефицијент детерминације, t-вредност примењеног теста, p-ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

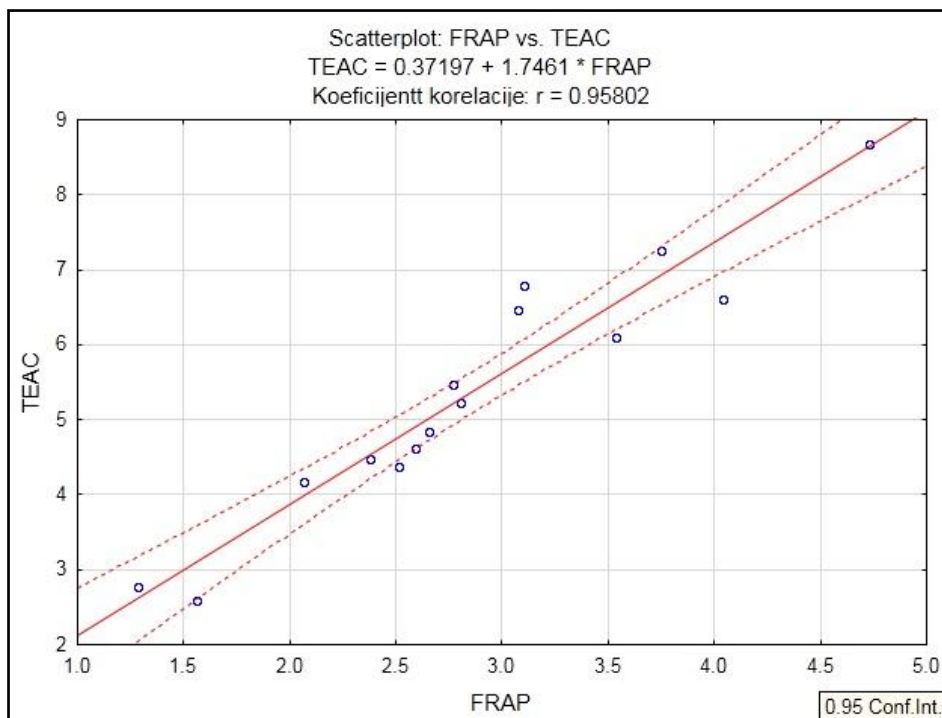


Слика 77. Корелација DPPH и FRAP методе

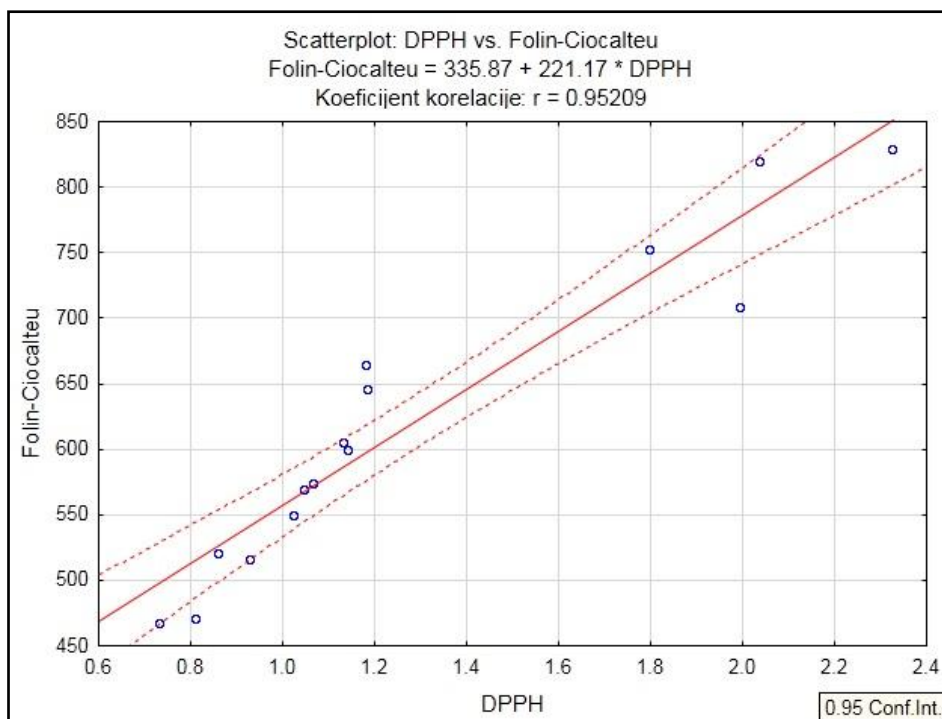


Слика 78. Корелација DPPH и TEAC методе

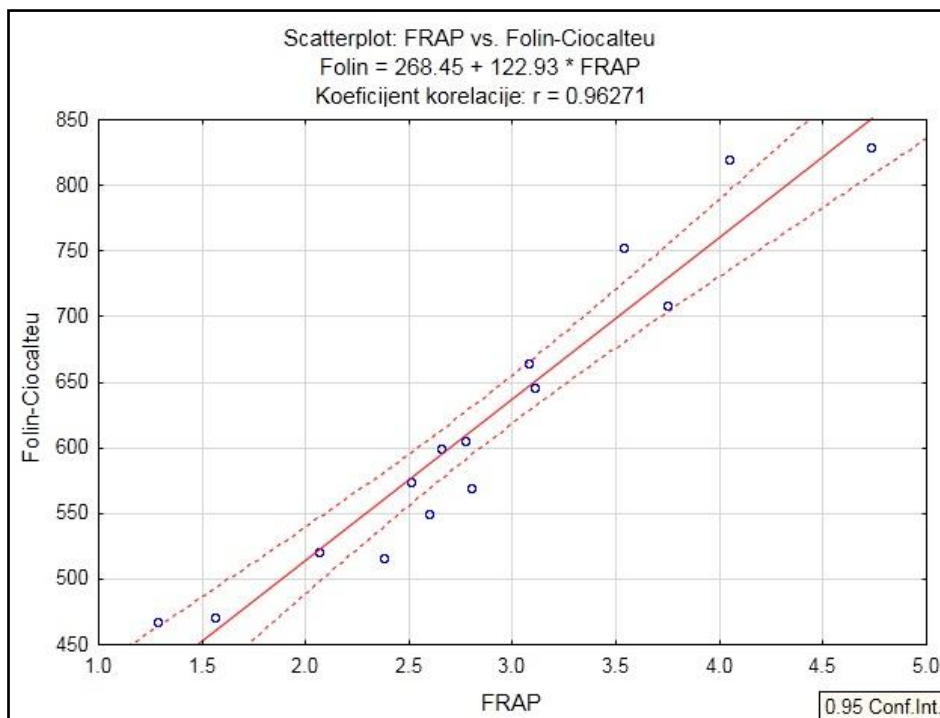




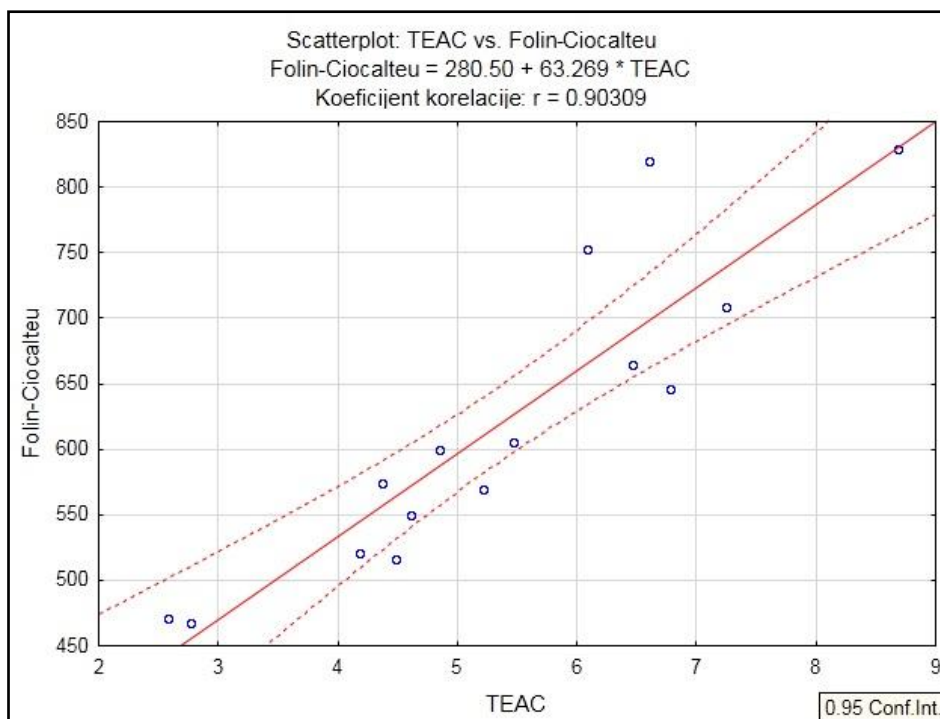
Слика 79. Корелација FRAP и TEAC методе



Слика 80. Корелација DPPH и Folin-Ciocalteu методе



Слика 81. Корелација FRAP и *Folin-Ciocalteu* методе



Слика 82. Корелација TEAC и *Folin-Ciocalteu* методе

Као што је и очекивано, пива произведена са додатком грозђа и вина су имали значајно већи антиоксидативни капацитет у поређењу са контролним пивима. Пива ферментисана винским квасцем имала су већи антиоксидативни капацитет у поређењу са одговарајућим пивима ферментисаним пивским квасцем, што је у складу са њиховим садржајем фенолних једињења. Пива произведена са додатком прокупча нису се много разликовала од пива са *pinot noir*-ом, нарочито према DPPH и FRAP методи. Највећи антиоксидативни капацитет имала су пива са *cabernet sauvignon*-ом, при чему је према све три методе пиво *CS30v* имало највећу вредност за овај параметар. Поредиши пива *P30p* и *P30ps* може се закључити да се додатном пастеризацијом кљука пре ферментације антиоксидативни капацитет смањује за око 10-15 %. Конкретно, смањење према примењеним трима методама је било следеће: 11,43 % (DPPH), 15 % (FRAP) и 14,18 % (TEAC). У табели 17 приказани су опсеги за антиоксидативни капацитет пива и вина за употребљене три методе.

Табела 17. Антиоксидативни капацитет пива и вина (mM TE)<sup>a</sup>

Тип пића	TEAC	FRAP	DPPH
Светло пиво	0,55-3,10	0,12-1,50	0,24-1,90
Тамно пиво	2,60-5,40	0,28-2,10	0,55-2,05
Бело вино	0,80-2,67	0,44-14,56	0,53-1,12
Розе	8,84-14,31	7,17-19,82	1,40-3,41
Црвено вино	9,10-30,51	12,14-31,93	4,10-21,36

<sup>a</sup>Извор: Saura-Calixto и Goni, 2006; Zhao et al., 2010; Lugasi и Hovari, 2003; Gasowski et al., 2004; De Beer et al., 2003; Paixão et al., 2007; Piljac et al., 2005; Sanchez-Moreno et al., 1999; Tafulo et al., 2010; Li et al., 2009.

Као што се може видети, распони вредности за сваки тип пића су доста велики, јер антиоксидативни капацитет може у великој мери да варира у зависности од употребљених сировина и примењеног технолошког поступка производње. Још један битан разлог овако широких опсега је и чињеница да су одређени антиоксиданти јако лабилне супстанце које веома лако оксидују под утицајем ваздуха или светлости, па и мале промене технолошког процеса производње могу довести до губитка истих. Антиоксидативни капацитети експерименталних пива са грозђем су се кретали у следећем распону: 0,86-2,33 mM TE (DPPH), 2,07-4,73 mM TE (FRAP) и 4,18-8,68 mM TE (TEAC). Поредиши

добијене вредности са литературним подацима за пива и вина, може се закључити да је антиоксидативни капацитет пива са грожђем значајно већи у поређењу са светлим пивима и белим винима, а да је доста сличан са тамним пивима и розеима. Ипак, црвена вина имају вишеструко већи антиоксидативни капацитет у поређењу са пивима и белим и розе винима.

Резултати анализе варијансе (табела 18) указују да су сва три испитивана фактора (сорта грожђа, удео грожђа и врста квасаца) имала статистички значајан утицај на антиоксидативни капацитет пива. Одабрани фактори нису независно утицали на овај параметар, јер је и њихова међусобна интеракција била статистички веома значајна, тако да је степен утицаја једног фактора зависио од нивоа друга два фактора.

Табела 18. Резултати анализе варијансе за антиоксидативни капацитет<sup>а</sup>

Фактори	DPPH		FRAP		TEAC	
	F	p	F	p	F	p
Сорта грожђа	6117,0	0,00	1268,16	0,00	3627,3	0,00
Удео грожђа	6141,3	0,00	5064,20	0,00	24327,0	0,00
Квасац	335,6	0,00	130,63	0,00	4977,8	0,00
Сорта грожђа*удео грожђа	1590,9	0,00	338,45	0,00	925,2	0,00
Сорта грожђа*квасац	17,3	0,00	31,68	0,00	253,5	0,00
Удео грожђа*квасац	260,8	0,00	208,24	0,00	1240,7	0,00
Сорта грожђа*удео грожђа*квасац	19,3	0,00	16,62	0,00	64,9	0,00

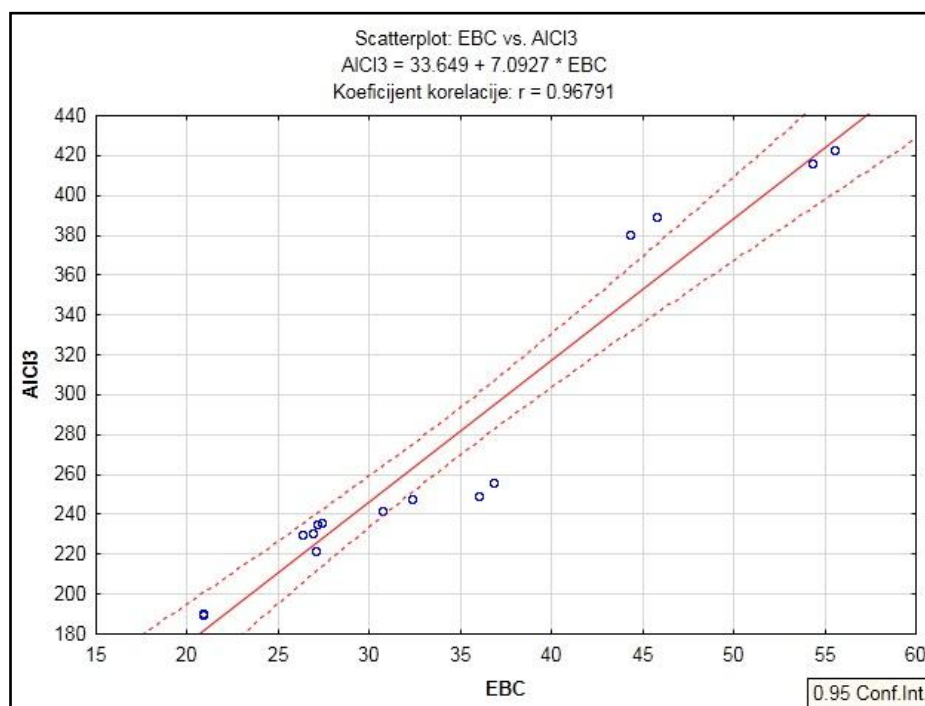
<sup>а</sup>F – узораčka вредност за примењени тест; p - ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

## 5.7 Укупан садржај флавоноида

Флавоноиди представљају веома бројну и разноврсну групу фенолних једињења, а такође највећи број фенола присутних у пиву припада овој групи. Одређивање садржаја флавоноида у пиву је јако значајно због њиховог великог утицаја на физичко-хемијску стабилност, физиолошку вредност и сензорни квалитет пива. Наиме, флавоноиди побољшавају стабилност пене (нарочито они са већом молекулском масом), имају изразито редуковани карактер па успоравају или спречавају процес оксидације, а доприносе и горчини и трпкости пива. Они побољшавају ресорпцију гвожђа и магнезијума у организму, имају бактерицидно

деловање, изазивају појачање рада срца и ублажавање грчева у стомаку, а неки од њих имају и антиканцерогено дејство итд. (Kunze, 2004; Saura-Calixto et al., 2009; Aron и Shellhammer, 2010).

За одређивање укупног садржаја флавоноида примењене су две методе: метода прописана од стране ЕВС и метода са  $\text{AlCl}_3$  која се широко употребљава за одређивање флавоноида у разним производима, као што су чајеви, лековито биље, воће и поврће, мед, прополис итд. Корелација између ове две методе је била статистички веома значајна, при чему је коефицијент корелације износио  $r = 0,968$  (слика 83). Иако ниједна од ове две методе није строго селективна према свим флавоноидима, на основу њих се ипак може стећи добар увид у укупан садржај ових једињења у пиву, из разлога што је помоћу њих могуће детектовати најзаступљеније флавоноиде пива: проантоцијанидине и флаван-3-оле.



Слика 83. Корелација ЕВС и методе са  $\text{AlCl}_3$

С обзиром да флавоноиди чине највећи део фенолних једињења у пиву и да представљају веома јаке антиоксиданте, очекивано је било да садржај флавоноида буде у јако великој корелацији са укупним садржајем фенолних једињења и са антиоксидативним капацитетом експерименталних пива. На основу добијених резултата може се закључити да је овакво очекивање било оправдано и да је

корелација између садржаја флавоноида, укупних фенола и антиоксидативног капацитета била статистички веома значајна, без обзира којом методом су добијени резултати (табела 19). Ово говори у прилог да су флавоноиди најзаступљенија фенолна једињења у пиву, али и да управо они највише доприносе његовом антиоксидативном капацитету. Највећи степен корелације је забележен између садржаја флавоноида одређеног методом са  $AlCl_3$  и антиоксидативног капацитета одређеног DPPH методом, где је коефицијент корелације био чак  $r = 0,985$ .

Табела 19. Корелација између садржаја флавоноида одређеног различитим методама и садржаја флавоноида и антиоксидативног капацитета и укупног садржаја фенола

Методe	r	r <sup>2</sup>	t	p
ЕВС (флавоноиди)- $AlCl_3$	0,968	0,937	13,887	<b>0,000</b>
ЕВС (флавоноиди)-ЕВС (феноли)	0,760	0,577	4,212	<b>0,001</b>
ЕВС (флавоноиди)-Folin	0,951	0,905	11,135	<b>0,000</b>
ЕВС (флавоноиди)-DPPH	0,957	0,915	11,860	<b>0,000</b>
ЕВС (флавоноиди)-FRAP	0,934	0,873	9,443	<b>0,000</b>
ЕВС (флавоноиди)-ТЕАС	0,854	0,730	5,924	<b>0,000</b>
$AlCl_3$ -ЕВС (феноли)	0,749	0,560	4,071	<b>0,001</b>
$AlCl_3$ -Folin	0,940	0,884	9,959	<b>0,000</b>
$AlCl_3$ -DPPH	0,985	0,971	20,888	<b>0,000</b>
$AlCl_3$ -FRAP	0,912	0,832	8,011	<b>0,000</b>
$AlCl_3$ -ТЕАС	0,813	0,661	5,040	<b>0,000</b>

r- коефицијент корелације; r<sup>2</sup>-коефицијент детерминације, t-вредност примењеног теста, p-ниво статистичке значајности (ако је  $p < 0,05$  онда је разлика значајна).

У табели 20 приказан је укупан садржај флавоноида у експерименталним пивима и винима. Слично као и код укупног садржаја фенола и антиоксидативног капацитета, опадајући редослед узорака је био следећи: вина (*Cabernet sauvignon* > *Pinot noir* > Прокупац) > пива са грожђем (пива са *cabernet sauvignon* > пива са *pinot noir* ≈ пива са прокупцем) > контролна пива. Међутим, није постојала статистички значајна разлика између узорака ферментисаних са пивским и винским квасцем, вероватно из разлога што методе детектују и оксидоване облике флавоноида. Према ЕВС методи, није било значајне разлике између пива са 20 % прокупца и *pinot noir*-а, док су пива са 30 % *pinot noir*-а имала значајно већи садржај флавоноида у поређењу са пивима са 30 % прокупца. За разлику од

резултата ЕВС методе, према методи са  $\text{AlCl}_3$  није било статистички значајне разлике између узорака са прокупецом и *pinot noir*-ом. Такође, према овој методи није постојала значајна разлика ни између узорака са 20 и 30 % прокупца. Пива са *cabernet sauvignon*-ом су према обе методе имала убедљиво највећи садржај флавоноида, а у поређењу са контролним пивом чак и два пута већи. Пиво *P30ps* је имало 11,73 % и 8,23 % нижи садржај флавоноида у поређењу са пивом *P30p* према ЕВС и  $\text{AlCl}_3$  методи, респективно. Ово смањење садржаја флавоноида као резултат стерилизације кљука пре ферментације је нешто ниже у поређењу са смањењем садржаја укупних фенолних једињења.

Табела 20. Садржај флавоноида експерименталних пива и вина<sup>a</sup>

Узорак	Метода	
	ЕВС (mg/l, (+)-катехин еквиваленти)	Метода са $\text{AlCl}_3$ (mg/l, кверцетин еквиваленти)
<i>Pp</i>	20,9±0,4 <sup>a</sup>	190,0±3,5 <sup>a</sup>
<i>Pv</i>	20,9±1,4 <sup>a</sup>	190,3±6,7 <sup>a</sup>
<i>P20p</i>	26,4±0,2 <sup>b</sup>	229,7±6,7 <sup>b</sup>
<i>P20v</i>	27,3±0,1 <sup>b</sup>	236,1±1,7 <sup>b,B</sup>
<i>P30p</i>	30,7±0,5 <sup>c</sup>	241,7±3,5 <sup>b,B</sup>
<i>P30v</i>	32,3±0,2 <sup>c</sup>	247,8±3,5 <sup>b,B</sup>
<i>CS20p</i>	44,3±1,3 <sup>d</sup>	380,7±28,9 <sup>Г</sup>
<i>CS20v</i>	45,7±0,5 <sup>d</sup>	389,3±2,0 <sup>Г</sup>
<i>CS30p</i>	54,3±0,9 <sup>e</sup>	416,0±5,3 <sup>Г</sup>
<i>CS30v</i>	55,5±0,4 <sup>e</sup>	423,2±0,5 <sup>e</sup>
<i>PN20p</i>	26,9±0,2 <sup>b</sup>	230,6±2,9 <sup>b</sup>
<i>PN20v</i>	27,1±0,1 <sup>b</sup>	235,2±3,9 <sup>b,B</sup>
<i>PN30p</i>	35,9±0,8 <sup>f</sup>	249,3±3,2 <sup>b,B</sup>
<i>PN30v</i>	36,8±0,3 <sup>f</sup>	255,7±2,2 <sup>b</sup>
<i>P30ps</i>	27,1±0,1	221,8±1,3
Прокупац	-	1550,0±47,7
<i>Pinot noir</i>	-	1826,7±44,8
<i>Cabernet sauvignon</i>	-	2225,0±99,6

<sup>a</sup>Различита слова у истим колонама означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

Delcour и de Varebeke су одређивали садржај флавоноида у 19 белгијских пилснер пива и утврдили су да се њихов садржај кретао од 4,8 до 39,5 mg/l, са просечном вредношћу од 26,3 mg/l. Поредићи ове податке са добијеним експерименталним резултатима може се закључити да су контролна пива била у опсегу карактеристичном за пилснер пива, док су једино пива са *cabernet sauvignon*-ом била изнад овог опсега вредности. Свакако, садржај флавоноида, као и укупних фенолних једињења пива са грожђем умногоме зависи од полазне основне сладовине и примењеног технолошког поступка производње.

Резултати анализе варијансе за садржај флавоноида приказани су у табели 21. На садржај флавоноида значајно су утицала сва три испитивана фактора. Међутим, међусобна интеракција фактора била је значајна једино у случају сорте и удела грожђа, док интеракција врсте квасца са друга два фактора није била значајна. Овакав резултат указује да је утицај врсте квасца био независан од друга два фактора, док је утицај сорте и удела грожђа био међусобно условљен.

Табела 21. Резултати анализе варијансе за садржај флавоноида<sup>а</sup>

Фактори	ЕВС		Метода са AlCl <sub>3</sub>	
	F	p	F	p
Сорта грожђа	1801,13	<b>0,00</b>	1090,23	<b>0,00</b>
Удео грожђа	3206,62	<b>0,00</b>	1059,28	<b>0,00</b>
Квасац	11,66	<b>0,00</b>	4,27	<b>0,05</b>
Сорта грожђа*удео грожђа	471,92	<b>0,00</b>	275,71	<b>0,00</b>
Сорта грожђа*квасац	0,76	0,47	0,05	0,95
Удео грожђа*квасац	3,22	0,05	0,91	0,41
Сорта грожђа*удео грожђа*квасац	0,33	0,86	0,03	1,00

<sup>а</sup>F – узорачка вредност за примењени тест; p - ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

## 5.8 Садржај укупних мономерних антоцијана

Антоцијани су у води растворљиви биљни пигменти који су главни носиоци боје црвеног, плавог и љубичастог воћа, поврћа и житарица. Боја производа која потиче од антоцијана прилично је непостојана, а њена промена је углавном резултат оксидације антоцијана, њихове хидролизе или стварања соли са металима. Оксидативне промене поспешује већа количина кисеоника и



повишена температура, а интензитет оксидације зависи и од врсте антоцијанидина (најосетљивији је пеларгонидин) (Mateus и de Freitas, 2009). С обзиром да боја има одлучујући утицај на изглед и атрактивност производа, веома је важно да се боја антоцијана очува и да се њихова оксидација сведе на најмању могућу меру. У табели 22 приказан је садржај антоцијана пива и вина произведених у експерименталном раду.

Табела 22. Садржај мономерних антоцијана експерименталних пива и вина<sup>а</sup>

Узорак	Антоцијани (mg/l, цијанидин-3-глукозид еквиваленти)	Узорак	Антоцијани (mg/l, цијанидин-3-глукозид еквиваленти)
<i>Pp</i>	0,00±0,00 <sup>а</sup>	<i>Pv</i>	0,00±0,00 <sup>а</sup>
<i>P20p</i>	17,23±0,17 <sup>б</sup>	<i>P20v</i>	22,04±0,22 <sup>в,г,ђ</sup>
<i>P30p</i>	22,85±0,41 <sup>г,е</sup>	<i>P30v</i>	26,31±0,14 <sup>д</sup>
<i>PN20p</i>	18,18±0,18 <sup>б</sup>	<i>PN20v</i>	20,90±0,22 <sup>ђ</sup>
<i>PN30p</i>	24,12±0,43 <sup>е</sup>	<i>PN30v</i>	27,72±0,22 <sup>д</sup>
<i>CS20p</i>	61,73±0,26 <sup>ж</sup>	<i>CS20v</i>	62,29±0,44 <sup>ж</sup>
<i>CS30p</i>	83,44±2,07 <sup>з</sup>	<i>CS30v</i>	88,84±0,29 <sup>и</sup>
<i>P30ps</i>	17,85±0,11	<i>Прокупац</i>	219,50±1,02
<i>P. noir</i>	221,17±0,99	<i>C. sauvignon</i>	283,33±2,92

<sup>а</sup>Различита слова у колонама означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

Једини извор антоцијана у производњи било је грожђе, тако да је било сасвим очекивано да их у контролним узорцима пива не буде. Пива са додатком грожђа ферментисана винским квасцем имала су већи садржај антоцијана у поређењу са одговарајућим узорцима ферментисаним пивским квасцем, изузев у случају пива са 20 % *cabernet sauvignon*-а. Пива произведена са истим уделом прокупаца и *pinot noir*-а се нису статистички разликовала по садржају антоцијана, а такође није било разлике ни између вина од поменутих сорти. Садржај антоцијана у пивима са грожђем се кретао у веома широком опсегу, од 17,23 до 88,84 mg/l, при чему је највећа вредност забележена код пива *CS30v*. Узорак *P30ps* је имао 21,88 % мањи садржај антоцијана у поређењу са узорком *P30p*, што указује да је деградација антоцијана током пастеризације била значајно већа у поређењу са губитком укупних фенолних једињења. Садржај антоцијана у винима

се кретао од 219,50 mg/l код Прокупца до 283,33 mg/l код *Cabernet sauvignon*-а. Ове вредности су у складу са литературним подацима где се наводи да је концентрација антоцијана у црвеним винима у опсегу од 210-350 mg/l (Clifford, 2000; Lee et al., 2005).

Резултати анализе варијансе (табела 23) указују да је утицај сва три испитивана фактора на садржај антоцијана био статистички веома значајан. Такође, и међусобне интеракције фактора су биле значајне, изузев у случају фактора сорта грозђа\*квасац, што указује да су ова два фактора деловала независно један од другог.

Табела 23. Резултати анализе варијансе за садржај мономерних антоцијана<sup>а</sup>

Фактори	F	p
Сорта грозђа	24461,55	<b>0,00</b>
Удео грозђа	34562,64	<b>0,00</b>
Квасац	241,85	<b>0,00</b>
Сорта грозђа*удео грозђа	6704,33	<b>0,00</b>
Сорта грозђа*квасац	2,67	0,08
Удео грозђа*квасац	68,68	<b>0,00</b>
Сорта грозђа*удео грозђа*квасац	13,37	<b>0,00</b>

<sup>а</sup>F – узорачка вредност за примењени тест; p - ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

Табела 24. Корелација између садржаја мономерних антоцијана и укупног садржаја фенола, антиоксидативног капацитета и садржаја флавоноида

Методe	r	r <sup>2</sup>	t	p
Антоцијани-ЕВС (феноли)	0,761	0,579	4,225	<b>0,001</b>
Антоцијани -Folin	0,960	0,922	12,393	<b>0,000</b>
Антоцијани -DPPH	0,983	0,966	19,089	<b>0,000</b>
Антоцијани -FRAP	0,943	0,890	10,248	<b>0,000</b>
Антоцијани -TEAC	0,848	0,719	5,766	<b>0,000</b>
Антоцијани -ЕВС (флавоноиди)	0,979	0,959	17,529	<b>0,000</b>
Антоцијани-AlCl <sub>3</sub>	0,989	0,978	24,098	<b>0,000</b>

r- коефицијент корелације; r<sup>2</sup>-коефицијент детерминације, t-вредност примењеног теста, p-ниво статистичке значајности (ако је p<0,05 онда је разлика значајна).

Корелација између садржаја мономерних антоцијана и укупног садржаја фенола, антиоксидативног капацитета и садржаја флавоноида приказана је у

табели 24. Резултати показују да је корелација у свим наведеним случајевима била веома висока и статистички значајна, при чему је највећа корелација уочена између садржаја антоцијана и флавоноида. Овакав резултат је разумљив због чињенице да антоцијани припадају групи флавоноида. Најмања корелација је била са укупним садржајем фенолних једињења одређеног ЕВС методом.

## 5.9 Појединачна фенолна једињења одређена HPLC методом

У произведеним експерименталним узорцима пива и вина одређивано је 16 појединачних фенолних једињења методом течне хроматографије високих перформанси, а резултати су приказани у табели 25. Од анализираних 16 једињења, у контролним пивима је идентификовано само два, у пивима са грождјем 10 (слика 84), а у винима 13 једињења. Хлорогенска киселина, кемпферол и хесперетин нису били детектовани ни у једном узорку, иако постоје литературни подаци о њиховом присуству у пиву и вину. Према доступној литератури, садржај хлорогенске киселине у пиву се креће од 0,00 до 2,50 mg/l (Montanari et al., 1999; Floridi et al., 2003; Rehova et al., 2004; Jandera et al., 2005), кемпферола од 0,60 до 16,40 mg/l (McMurrrough et al., 1982; Vancraenenbroeck, 1983; Callemien и Collin, 2010), док хесперетин није детектован. Овакви подаци свакако објашњавају чињеницу да у узорцима нису детектована ова једињења, нарочито ако се има у виду да у црвеним винима хлорогенска киселина није детектована, док је садржај кемпферола (0,00 - 3,60 mg/l) и хесперетина (0,50 - 0,60 mg/l) такође јако мали (Burns et al., 2000; Rodriguez-Delgado et al., 2002; Tsanova-Savova и Ribarova, 2002; Rossouw и Marais, 2004; Jandera et al., 2005; La Torre et al., 2006).

Нарингенин и кверцетин су пронађени једино у узорку вина *Cabernet sauvignon* у концентрацији од 0,16 mg/l и 0,55 mg/l респективно, док је ресвератрол детектован и код вина *Pinot noir* (0,31 mg/l) и *Cabernet sauvignon* (0,29 mg/l). Gerhauser и сар. су саопштили да су детектовали нарингенин, а Jerkovic и сар. ресвератрол у лагер пиву, али у тако малој концентрацији да тачна квантификација није била могућа (Gerhauser et al., 2002; Jerkovic et al., 2008). Са друге стране, концентрација нарингенина и ресвератрола у црвеним винима је у

опсегу 0,4 до 0,7 mg/l и 0,0 до 7,7 mg/l, респективно (Jandera et al., 2005; Shishodia и Aggarwal, 2006). Садржај кверцетина у пивима се обично креће у распону 0,00-0,95 mg/l, док се код вина налази у концентрацијама од 0,00 до 31,60 mg/l (Jandera et al., 2005; Callemien и Collin, 2010). С обзиром да је концентрација нарингенина, кверцетина и ресвератрола у пивима и винима генерално мала, а зависи и од географског порекла грозђа и примењених агротехничких мера, није било неочекивано то што ова једињења нису детектована у произведеним узорцима пива са грозђем.

Гална киселина је идентификована у свим узорцима пива са грозђем и то у концентрацији од 0,39 до 1,15 mg/l, а највећи садржај је забележен у узорку *CS30p*. Иначе, према литературним подацима садржај галне киселине у стандардним лагер пивима је до 0,2 mg/l (Gerhauser, 2005), тако да је у пивима са грозђем дошло до значајног повећања овог једињења. Такође, гална киселина је детектована и у узорцима експерименталних вина у концентрацији од 20,06 до 22,88 mg/l. Као што се види, разлика у садржају галне киселине између узорка вина није била велика, а изненађујуће је било што је најмања концентрација забележена код узорка вина *Cabernet sauvignon*. Концентрација галне киселине у винима се иначе креће у јако широком опсегу, од 0,00 до 126,00 mg/l, при чему је највећи садржај пронађен управо у вину од грозђа *Cabernet sauvignon* (Frankel et al., 1995; Minussi et al., 2003; Gambelli и Santaroni, 2004; Jandera et al., 2005).

Од свих испитиваних једињења, у контролним пивима су пронађени једино бензоева и транс-циметна киселина, и то у већој концентрацији у поређењу са пивима са грозђем. Према садржају ове две фенолне киселине контролни узорци се нису статистички значајно разликовали, при чему је концентрација бензоеве киселине била око 10 пута већа у поређењу са транс-циметном (бензоева киселина: око 0,6 mg/l, транс-циметна киселина: око 0,06 mg/l). Садржај бензоеве киселине у пивима са грозђем се кретао од 0,33 до 0,39 mg/l, при чему у узорцима *P30v*, *PN30v* и *CS30p* ова киселина није ни детектована. Међутим, у узорку *P30ps* концентрација бензоеве киселине је била 1,19 mg/l, што је за око два пута више у поређењу са контролним пивима и више од три пута у односу на остала пива са грозђем. Овакав резултат указује да се термичким третманом грозђа садржај ове киселине значајно повећава.

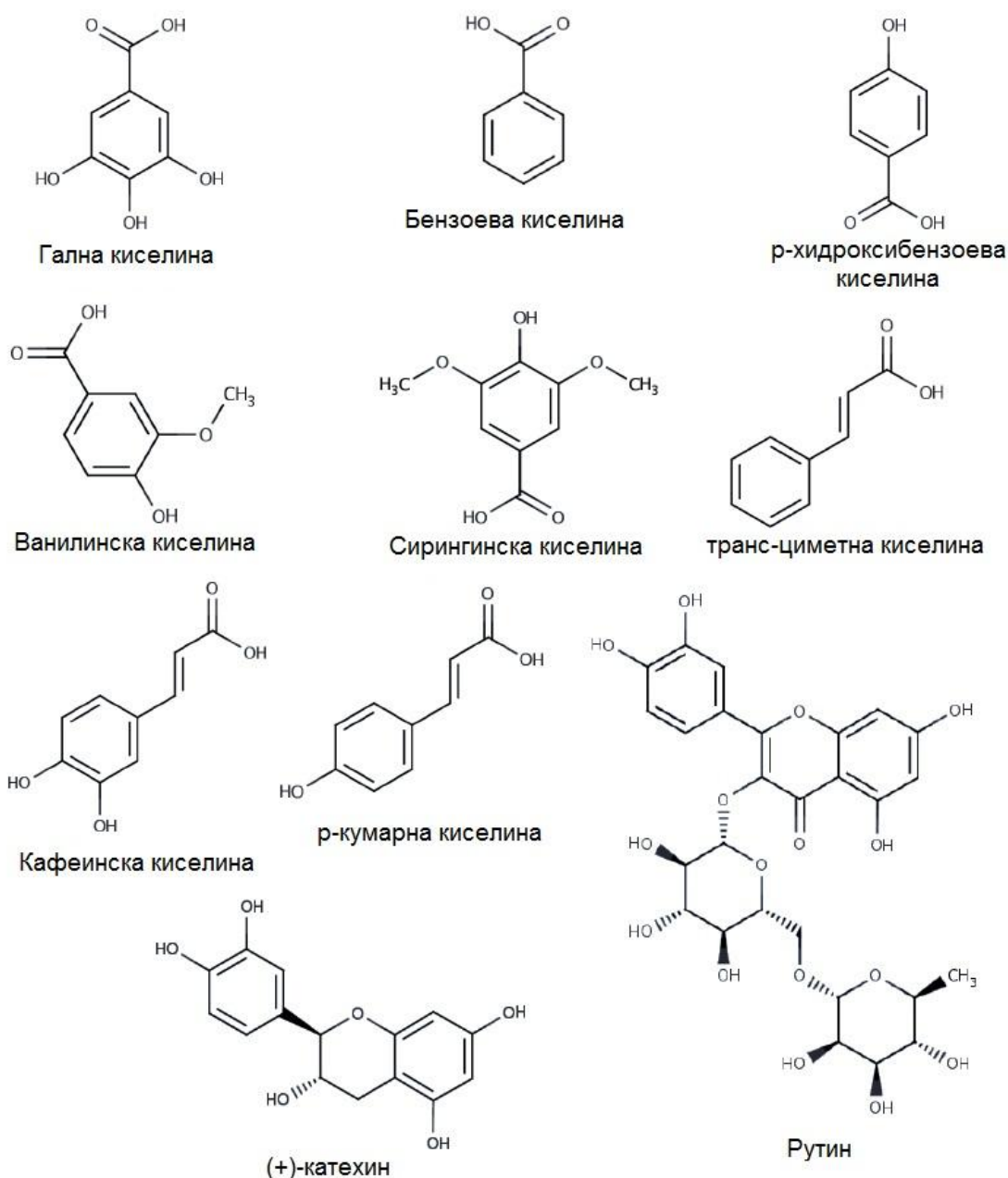
Табела 25. Садржај појединачних фенолних једињења експерименталних пива и вина, mg/L

Једињење	<i>Pp</i>	<i>Pv</i>	<i>P30p</i>	<i>P30v</i>	<i>PN30p</i>	<i>PN30v</i>	<i>CS30p</i>	<i>CS30v</i>	<i>P30ps</i>	<i>PR</i>	<i>PN</i>	<i>CS</i>
Гална киселина	-	-	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>б</sup>	0,39±0,00 <sup>б</sup>	0,46±0,01 <sup>B</sup>	1,15±0,01 <sup>Г</sup>	1,11±0,01 <sup>б</sup>	0,40±0,02	20,25±0,01	22,88±0,03	20,06±0,02
Хлорогенска киселина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бензоева киселина	0,63±0,10 <sup>a</sup>	0,59±0,04 <sup>a,б</sup>	0,38±0,02 <sup>B</sup>	-	0,39±0,10 <sup>б,Б</sup>	-	-	0,33±0,02 <sup>B</sup>	1,19±0,04	-	1,70±0,09	0,95±0,04
p-хидроксибензоева киселина	-	-	0,59±0,00 <sup>a</sup>	0,67±0,11 <sup>a</sup>	-	-	0,73±0,02 <sup>a</sup>	-	0,83±0,09	2,13±0,04	0,77±0,03	-
Транс-циметна киселина	0,05±0,00 <sup>a</sup>	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>б</sup>	0,03±0,01 <sup>б</sup>	0,02±0,00 <sup>б</sup>	0,03±0,00 <sup>б</sup>	0,02±0,00 <sup>б</sup>	0,02±0,00 <sup>б</sup>	0,02±0,00	0,31±0,00	0,07±0,00	0,13±0,00
Ванилинска киселина	-	-	2,90±0,55 <sup>a</sup>	2,21±0,13 <sup>a,б</sup>	4,73±0,06 <sup>B</sup>	2,96±0,37 <sup>a</sup>	1,69±0,17 <sup>б</sup>	2,35±0,06 <sup>a,б</sup>	2,24±0,05	1,05±0,06	-	-
Сирингинска киселина	-	-	1,75±0,00 <sup>a</sup>	0,66±0,03 <sup>б</sup>	2,25±0,00 <sup>B</sup>	1,49±0,02 <sup>Г</sup>	1,94±0,01 <sup>Д</sup>	1,04±0,04 <sup>б</sup>	1,49±0,02	3,14±0,09	5,93±0,05	5,27±0,16
Кафеинска киселина	-	-	-	0,61±0,02 <sup>a</sup>	-	0,75±0,01 <sup>б</sup>	0,43±0,01 <sup>B</sup>	0,71±0,01 <sup>Г</sup>	-	-	0,38±0,02	-
p-кумарна киселина	-	-	-	0,33±0,03 <sup>a</sup>	-	-	0,19±0,02 <sup>б</sup>	0,46±0,05 <sup>B</sup>	-	1,56±0,09	1,18±0,00	1,41±0,07
Катехин	-	-	-	1,56±0,02 <sup>a</sup>	1,68±0,07 <sup>a</sup>	5,30±0,14 <sup>б</sup>	1,63±0,17 <sup>a</sup>	5,51±0,53 <sup>б</sup>	2,42±0,05	20,13±0,08	108,49±0,02	32,95±0,14
Кверцетин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55±0,04
Рутин	-	-	1,00±0,03 <sup>a,Г</sup>	0,83±0,07 <sup>a,б</sup>	0,73±0,02 <sup>б,Б</sup>	1,10±0,14 <sup>Г</sup>	0,82±0,03 <sup>a,Б</sup>	0,75±0,02 <sup>б</sup>	1,59±0,01	2,62±0,03	-	1,27±0,04
Кемпферол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хесперетин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нарингенин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16±0,00
Ресвератрол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31±0,00	0,29±0,00

Различита слова у редовима означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ .

*PR*-Прокупац, *PN*-Pinot noir, *CS*-Cabernet sauvignon

У случају транс-циметне киселине, сви узорци пива са грожђем, укључујући и пиво *P30ps*, су имали исти садржај ове киселине. Присуство бензоеве и транс-циметне киселине у пивима и винима до сада у литератури није помињано. Код узорака вина, бензоева киселина није детектована једино код Прокупца, док је код *Pinot noir*-а и *Cabernet sauvignon*-а била у концентрацији од 1,70 и 0,95 mg/l респективно. У винима је садржај транс-циметне киселине био нешто већи у поређењу са пивима и кретао се у распону од 0,07 до 0,31 mg/l.



Слика 84. Фенолна једињења идентификована у испитиваним пивима са грожђем

p-хидроксибензојева киселина је детектована у узорцима *P30p*, *P30v*, *CS30p* и *P30ps* у концентрацији од 0,59 до 0,83 mg/l, а највећи садржај је забележен у пиву *P30ps*. Ово једињење је у експерименталним винима било у концентрацији од 2,13 и 0,77 mg/l код Прокупаца и *Pinot noir*-а респективно, док код *Cabernet sauvignon*-а није детектовано. Имајући у виду да код контролних пива и вина *Cabernet sauvignon* p-хидроксибензојева киселина није детектована, садржај ове киселине у пивима са грожђем је био сасвим задовољавајући. Добијени резултати указују да је грожђе сорте прокупац било најбогатије овим једињењем, и да се термичким третманом грожђа садржај ове киселине у пивима повећава. Литературни подаци показују да концентрација p-хидроксибензојеве киселине у пивима и винима варира у веома широким границама, у зависности од сировина и технолошких поступака који се користе у производњи. Уобичајени садржај овог једињења у пиву и вину је 0,00 до 16,84 mg/l (Wackerbauer и Kramer, 1982; Floridi et al., 2003; Jandera et al., 2005) и 0,00-21,8 mg/l (Kilinc и Kalkan, 2003; Robbins и Bean, 2004), респективно. Поредићи са подацима из литературе, може се закључити да су добијени експериментални резултати за садржај p-хидроксибензојеве киселине у складу са до сада објављиваним подацима.

Ванилинска киселина је била у највећој концентрацији од свих анализираних фенолних једињења у пивима са грожђем. Детектована је у свим узорцима пива са грожђем у доста великој концентрацији, али је изненађујуће да није пронађена у контролним пивима, као ни у винима *Pinot noir* и *Cabernet sauvignon*. Према литературним подацима, садржај ванилинске киселине у пиву је 0,0 до 2,2 mg/l (McMurrrough et al., 1984; Nardini и Ghiselli, 2004; Jandera et al., 2005), док је њена концентрација у вину нешто виша и креће се од 0,0 до 7,5 mg/l (Kilinc и Kalkan, 2003; Robbins и Bean, 2004; La Torre et al., 2006). Концентрација ванилинске киселине у пивима са грожђем је била виша у односу на уобичајене вредности за лагер пива и кретала се од 1,69 mg/l код узорка *CS30p* до 4,73 mg/l код узорка *PN30p*. Као што се може видети, пиво са 30 % грожђа *pinot noir* је имало највећи садржај ванилинске киселине, иако у вину од истог грожђа ово једињење није детектовано. С обзиром да ванилинска киселина настаје оксидацијом ванилина, али и као интермедијер у настајању ванилина неоксидативном декарбоксилацијом феруличне киселине (Lesage-Meessen et al.,

1996), једино објашњење за добијене резултате је да је током ферментација пива са грожђем дошло до конверзије ванилина или феруличне киселине у ванилинску киселину, а да се слична промена није догодила током производње контролних пива и вина *Pinot noir* и *Cabernet sauvignon*. Разлог за то може бити инактивација природне микрофлоре грожђа која има способност конверзије феруличне киселине до ванилинске сумпор-диоксидом током производње вина. Узорак *P30ps* је имао за 22,76 % мањи садржај ванилинске киселине у поређењу са пивом *P30p*, што указује да се термичким третманом кљука концентрација овог једињења смањује.

Сирингинска киселина се налази у многим биљним врстама, а у великим концентрацијама се налази у житарицама као што су јечам, кукуруз, просо, зоб, пиринач, раж, сирак и пшеница (Karthik et al., 2014). Међутим, јако је ретко присутна у воћу и у значајнијим концентрацијама се налази једино у грожђу (Macheix et al., 1990). У стандардним лагер пивима концентрација ове киселине се обично креће у границама од 0,0 до 0,9 mg/l (McMurrrough et al., 1984; Jandera et al., 2005), а код вина је присутна у количини од 0,0 до 23,3 mg/l (Kilinc и Kalkan, 2003; Minussi et al., 2003; Robbins и Bean, 2004; Hernandez-Borges et al., 2005). Изузев у контролним пивима, сирингинска киселина је детектована у свим осталим испитиваним узорцима пива и вина. Концентрација овог једињења у пивима са грожђем је била у распону од 0,66 до 2,25 mg/l, што је значајно више у поређењу са уобичајеним вредностима за лагер пива. Као и у случају ванилинске киселине, највећа количина сирингинске киселине је пронађена у узорку *PN30p*, што је и разумљиво имајући у виду да је вино *Pinot noir* имало највећи садржај овог фенолног једињења у односу на друга два испитивана вина. Такође, термичким третманом кљука дошло је до смањења садржаја сирингинске киселине, па је њена концентрација у узорку *P30ps* била за 14,86 % мања у поређењу са узорком *P30p*.

Кафеинска киселина је једино била детектована у пивима са грожђем *P30v*, *PN30v*, *CS30p*, и *CS30v* и у вину *Pinot noir*. Њена концентрација у узорцима пива са грожђем је била од 0,43 mg/l код пива *CS30p* до 0,75 mg/l код пива *PN30v*, што је више од вредности објављених у литератури према којима је садржај кафеинске киселине у лагер пивима у распону од 0,0 до 0,5 mg/l (Floridi et al., 2003; Jandera et



al., 2005). Пива са грожђем су имала већи садржај кафеинске киселине и од вина *Pinot noir*, где је њена концентрација била 0,38 mg/l. Иначе, према доступној литератури садржај ове киселине у црвеним винима се креће у распону од 0,0 до 77,0 mg/l (Tintunen и Lehtonen, 2001; Pavia et al., 2001; Schwarz et al., 2004; Gambelli и Santaroni, 2004).

р-кумарна киселина је у малим количинама детектована у узорцима *P30v*, *CS30p*, и *CS30v* и у експерименталним винима. Њена концентрација у пивима са грожђем је била у распону од 0,19 до 0,46 mg/l, док су вина имала значајно већи садржај који је био и опсегу 1,18 до 1,56 mg/l. С обзиром да је према до сада објављиваним подацима садржај р-кумарне киселине у пивима 0,0 до 2,2 mg/l, са просечном вредношћу од око 1,0 mg/l (Nardini и Ghiselli, 2004; Jandera et al., 2005; Vanbeneden et al., 2006), може се рећи да је концентрација овог једињења у пивима са грожђем била мала. Узимајући у обзир да у контролним пивима р-кумарна киселина није ни детектована, а и да је њен садржај у винима био мали, може се извести закључак да би се одговарајућим одабиром сировина за производњу садржај овог једињења могао значајно повећати.

Од пива са грожђем, катехин није био детектован једино у узорку *P30p*. Иначе, катехин је уз ванилинску и сиригинску киселину било најзустпљеније фенолно једињење у пивима са грожђем, док је код узорака вина био убедљиво најприсутнији са концентрацијом у распону од 20,13 до 108,49 mg/l. Највећи садржај катехина забележен је код узорака *PN30v* (5,30 mg/l) и *CS30v* (5,51 mg/l), што је око горње границе карактеристичне за лагер пива, која се креће око 5,5 mg/l (Cortacero-Ramirez et al., 2004; Jandera et al., 2005). Иако у узорку *P30p* није забележено присуство катехина, узорак *P30ps* је имао значајну количину овог једињења (2,42 mg/l), што указује да се термичким третманом поспешује екстракција овог једињења из грожђа.

Рутин је једињење које је поред галне, транс-циметне, ванилинске и сиригинске киселине детектован у свим узорцима пива са грожђем. Од свих анализираних узорака, није детектован једино у контролним пивима и вину *Pinot noir*. Према подацима из литературе, концентрација рутина у лагер пивима се креће од 0,0 до 4,9 mg/l, са просечном вредношћу од око 0,9 mg/l (Rehova et al., 2004; Cortacero-Ramirez et al., 2004; Jandera et al., 2005). Поредићи са овим

подацима, може се рећи да је концентрација рутина у пивима са грожђем (0,73-1,10 mg/l) била око просечне вредности карактеристичне за лагер пива. Узорак *P30ps* је имао за 59 % већи садржај рутина у односу на узорак *P30p*, тако да је термички третман поред бензоеве, *p*-хидроксибензоеве киселине и катехина, утицао на повећање и овог једињења.

### 5.10 Испарљива једињења одређена гасном хроматографијом

У произведеним експерименталним узорцима пива и вина одређивано је четрнаест испарљивих једињења применом гасне хроматографије, а добијени резултати су приказани у табели 27. Испарљива једињења су зависно од своје природе и концентрације директно одговорна за арому пива и дају најзначајнији допринос његовом укупном сензорном квалитету. За било коју врсту хране или пића, сензорне карактеристике представљају витални параметар који утиче на опредељење потрошача приликом куповине. Нарочито су значајне у време масовне потрошње, где утичу на формирање укуса конзумента и на њихову лојалност одређеним брендовима. За разлику од неких других, потрошачи пива углавном показују велику оданост одговарајућем бренду или типу пива на који су навикли (Baxter и Hughes, 2001). У пиву је идентификован велики број испарљивих једињења, која се према пореклу могу класификовати у пет главних група: а) једињења пореклом из сировина, као што су слад и хмељ; б) једињења која настају током процеса као што су сушење и пржење слада и кување сладовине; в) производи метаболизма квасца; г) производи контаминирајуће микрофлоре; д) једињења која настају под утицајем кисеоника и сунчеве светлости током складиштења. Према хемијској структури ова једињења припадају групама: алкохола, естара, карбонилних једињења и једињења која садрже сумпор (Kobayashi et al., 2008).

С обзиром на хемијску комплексност, арома пива није одређена са једном или неколико компоненти, већ је резултат индивидуалног, синергистичког и антагонистичког деловања великог броја различитих једињења. Да би се дефинисао утицај појединачног једињења на укупна сензорна својства производа, уведен је појам ароматске јединице (*FU – flavour unit*), која представља однос концентрације датог једињења и његовог прага сензорне осетљивости ( $FU =$

[ароматична компонента]/праг сензорне осетљивости). Дакле, допринос одређене супстанце укупном сензорном профилу не зависи само од њене концентрације у производу, већ и од прага сензорне осетљивости у датом производу (Baxter и Hughes, 2001). У табели 26 приказан је уобичајени садржај 14 одређиваних испарљивих једињења у пивима и њихов праг сензорне осетљивости. С обзиром да само мале количине испарљивих једињења пореклом из слада и хмеља остају након процеса кувања сладовине, највећи део ових састојака пива настаје током ферментације (Briggs et al., 2004).

Табела 26. Уобичајени садржај одређених испарљивих једињења у пивима

Једињење	Концентрација (mg/L)	Праг осетљивости (mg/L)	Опис ароме
Ацеталдехид	2-20	25	Зелена јабука
Ацетон	0,3-1,7	200	Растварач
Изо-амилацетат	0,5-5,0	1,2	Банана
Етил-метаноат	0,02-2,20	150	Етерична, воћна, рум, виски
Етил-ацетат	10-60	30	Растварач, слатко
Етил-пропионат	0,08	0,1	Етерична, воћна, рум
Етил-капронат	0,1-0,5	0,2	Црвена јабука, воћна, семе аниса
Метанол	0,5-3,0	10000	Алкохолна
n-пропанол	3-16	700	Алкохолна
изо-бутанол	6-72	200	Растварач
Амилалкохоли:			
- 2-метил-1-бутанол	8-30	65	Алкохолна, винска, сладна, банана
- 3-метил-1-бутанол	30-70	70	Алкохолна, винска, банана, виски
Диметил сулфид	10-100	30	Кукуруз шећерац, кувано поврће
Диацетил	0,01-0,6	0,07-0,15	Маслац
2,3-пентандион	0,01-0,15	0,9	Маслац

Извори: Harrison, 1970; Nykänen и Suomalainen, 1983; Baxter и Hughes, 2001; Briggs et al., 2004; Tan и Siebert, 2004; Simpson и Mairs, 2005; Kobayashi et al., 2008.

Табела 27. Садржај испарљивих једињења експерименталних пива и вина

Једињење	<i>Pp</i>	<i>Pv</i>	<i>P30p</i>	<i>P30v</i>	<i>PN30p</i>	<i>PN30v</i>	<i>CS30p</i>	<i>CS30v</i>	<i>P30ps</i>	<i>PR</i>	<i>PN</i>	<i>CS</i>
Ацеталдехид (mg/L)	7,63	21,38	34,64	56,18	24,74	10,99	19,11	45,39	36,76	27,25	29,94	42,70
Ацетон (mg/L)	0,18	0,15	0,43	-	0,09	0,14	0,06	0,06	0,29	0,16	0,31	0,14
Изоамилацетат (mg/L)	1,13	0,48	2,76	2,47	2,81	2,68	2,54	3,59	3,36	3,80	3,59	3,88
Етил-метаноат (mg/L)	0,24	-	-	0,32	-	-	0,02	0,16	-	-	-	-
Етил-ацетат (mg/L)	12,78	11,26	44,09	17,98	26,40	31,48	24,52	21,80	41,45	37,49	39,25	40,55
Етил-пропионат (mg/L)	0,39	-	-	-	0,29	-	0,18	0,13	-	-	-	-
Етил-капронат (mg/L)	-	-	0,37	-	0,25	-	0,24	0,18	-	0,25	0,44	0,03
Метанол (mg/L)	2,04	-	15,62	7,25	12,21	7,67	12,80	10,29	17,30	5,25	6,75	9,74
n-пропанол (mg/L)	17,43	14,34	26,23	29,17	24,70	33,06	25,20	26,43	28,56	27,85	30,05	30,34
Изобутанол (mg/L)	15,18	17,45	30,95	30,95	19,33	36,98	22,53	54,39	36,23	30,75	35,53	36,39
Амилалкохоли (mg/L)	61,72	64,54	107,02	138,98	98,92	140,41	101,07	199,47	113,85	104,16	115,19	113,31
Диметил сулфид (mg/L)	24,10	31,45	24,50	22,37	18,83	29,18	13,08	37,15	-	-	-	28,27
Диацетил (µg/L)	49,01	87,67	297,65	456,93	548,20	28,17	735,47	1226,41	94,65	2153,42	1799,48	627,42
2,3-пентандион (µg/L)	33,90	24,89	24,59	90,19	347,98	7,94	417,83	247,15	25,69	105,73	159,15	162,80

*PR*-Прокупац, *PN*-Pinot noir, *CS*-Cabernet sauvignon

Свакако најзаступљенија група испарљивих једињења у пиву су алкохоли, од којих је етанол најдоминантнији. Поред етанола, о коме је било речи у поглављу 5.4, из ове групе једињења најзначајнији су виши алкохоли (вишим алкохолима се сматрају сви алкохоли са више од два угљеникова атома): пропанол, изобутанол и амил алкохоли. Они настају као секундарни производи у метаболизму аминокиселина, па на њихову концентрацију у великој мери утиче садржај слободног амино азота у сладовини. Ипак, најважнији фактор који утиче на њихово формирање јесте врста квасца (Вахтер и Hughes, 2001). Квантитативно најзначајнији виши алкохоли у пиву су 2-метил-1-бутанол (активни амил алкохол) и 3-метил-1-бутанол (изоамил алкохол). Веома често ова два алкохола се сматрају као један и заједничким именом се називају амил алкохол (Kobayashi et al., 2008). У складу са наведеним литературним подацима, и садржај амил алкохола у пивима и винима произведеним током експерименталног рада био је неколико пута већи од садржаја осталих виших алкохола (табела 27).

Концентрација амил алкохола у пивима са грожђем је била значајно већа у поређењу са контролним пивима, при чему су узорци ферментисани винским квасцем имали већи садржај ових једињења у поређењу са одговарајућим пивима ферментисаним пивским квасцем. Узорак *P30ps* је имао незнатно већи садржај виших алкохола у поређењу са узорком *P30p*, што значи да додатни термички третман медијума за ферментацију не утиче значајно на повећање ових једињења у пиву са грожђем.

Поред етанола и амил алкохола, пива са грожђем су имала већи садржај и других анализираних алкохола (изобутанол, n-пропанол и метанол) у поређењу са контролним пивима. Разлог за ову појаву је првенствено већи садржај екстракта у полазном медијуму за ферментацију код пива са грожђем, а као последица тога и већи садржај хранљивих једињења за раст квасца. Такође, и концентрација изобутанол и n-пропанол је била већа код узорака ферментисаних винским квасцем, што значи да вински квасац *Lalvin ICV-K1-V1116 (S. cerevisiae cerevisiae)* производи већу количину виших алкохола у поређењу са квасцем *S. pastorianus*. Изобутанол негативно утиче на квалитет пива уколико је његова концентрација већа од 20 % од укупне количине три алкохола: n-пропанол, изобутанола и амил алкохола (Kobayashi et al., 2008). Удео изобутанола у укупној

количини поменутих виших алкохола код контролних пива је био 16,09 % (*Pp*) и 18,11 % (*Pv*), док се код пива са грожђем кретао у распону од 13,52 до 19,40 %, са изузетком пива *P30ps* код кога је био 20,28 %. Добијени резултати показују да је садржај изобутанола у односу на остале више алкохоле био у границама које нису негативно утицале на сензорни квалитет произведених пива.

Метанол је јако токсичан алкохол који настаје разградњом пектинских материја и природни је састојак воћних ракија. У пиву се налази у концентрацији од 0,5-3,0 mg/l (Baxter и Hughes, 2001), тако да је пронађена количина метанола у контролним пивима од 2,04 (*Pp*) и 0,00 mg/l (*Pv*) у складу са литературним подацима. Међутим, пива са грожђем су имала значајно већи садржај метанола у поређењу са контролним пивима и винима, али је његова концентрација од 7,25-17,3 mg/l и даље била јако мала да би негативно утицао на квалитет пива. Ради поређења, према Правилнику о категоријама, квалитету и декларисању ракије и других алкохолних пића (Сл. гласник РС бр. 74/2010 и 70/2011) ракије од грожђа могу имати садржај метанола до 2000 mg/l апсолутног алкохола, док према Правилнику о квалитету пива (Сл. гласник РС бр. 145/2014) садржај метанола у пиву није дефинисан. Повишен садржај метанола у пивима са грожђем је био очекиван, с обзиром да је грожђе као воће извор пектина.

Испарљиви естри се у јако малим количинама налазе у ферментисаним пићима као што су пива и вина, али су и поред тога јако битни за формирање ароматског профила ових пића. Као што се може видети у табели 26, једино концентрација изоамил ацетата и понекад етил ацетата прелази праг осетљивости у пиву. Међутим, присуство различитих естара има синергистичко дејство тако да, иако се налазе у концентрацији испод прага осетљивости, они значајно утичу на арому пива (Verstrepen et al., 2003). Концентрација естара у пиву зависи од великог броја фактора, укључујући почетни садржај екстракта сладовине и садржај кисеоника. Као и у случају алкохола, одлучујући фактор од кога зависи коначна концентрација естара у пиву је врста квасца. До сада је у пивима идентификован велики број естара, од којих су најзаступљенији етил-ацетат и изоамил-ацетат (Baxter и Hughes, 2001). И у експерименталним пивима са грожђем од свих анализираних естара садржај етил ацетата је био највећи (11,26-44,09 mg/l), након чега је следио изоамил ацетат (2,47-3,59 mg/l). Иначе, садржај

ових естара је био значајно већи у пивима са грожђем у поређењу са контролним пивима. Повишен садржај етил ацетата негативно утиче на арому пива, али је његова концентрација у пивима са грожђем била у опсегу типичном за лагер пива, са вредношћу око прага осетљивости. Изоамил ацетат је естар који даје воћну арому која подсећа на банану па се назива и „банана естар“. Његова концентрација у пивима са грожђем је била од 2,47 до 3,59 mg/l, што је значајно изнад сензорног прага осетљивости (1,2 mg/l).

Од свих карбонилних једињења присутних у пиву, највећи утицај на сензорне карактеристике имају вицинални дикетони, који су за разлику од алкохола и естара непожељне компоненте ароме. Најзначајнији су 2,3- бутандион (диацетил), који се карактерише аромом по маслацу и 2,3-пентандион, кога одликује ослатка арома по меду. Диацетил је сензорно значајнији, јер је његов праг укуса око десет пута нижи од прага укуса 2,3-пентандиона, и креће се између 0,07-0,15 mg/l код лагер пива (зависно од типа). Код але типа пива горњег врења, њихов садржај и праг детекције је виши. Уколико се ова једињења нађу у пиву у концентрацијама које прелазе граничне вредности, пиво добија нечист, ослатак и понекад веома одбојан укус који прелази у арому по маслацу. То је разлог да се тежи да његова концентрација у пиву не прелази 0,05 mg/l. Диацетил и 2,3-пентандион настају током ферментације као споредни производи у биосинтези аминокиселина изолеуцина, леуцина и валина, спонтаном оксидативном декарбоксилацијом  $\alpha$ -ацетомлечне и  $\alpha$ -ацетохидроксибутерне киселине, респективно, а такође повећано присуство вициналних дикетона може да буде и резултат микробиолошке контаминације. Ћелије квасца поседују ензиме (редуктазе) неопходне за редукцију диацетила у ацетоин и даље у 2,3-бутандиол, и 2,3-пентандиона у 2,3-пентандиол. Ова редукована једињења имају много виши праг укуса и немају утицаја на арому пива. Реакција редукције зависи од соја квасца и одвија се крајем главне ферментације и за време накнадног врења. Такође, вицинални дикетони настају и као резултат микробиолошке контаминације (Willaert, 2007).

Садржај диацетила у контролним пивима је био у границама типичним за лагер пива. Међутим, у пивима са грожђем, изузев узорка *PN30v* (28,17  $\mu$ g/l), његова концентрација је била изразито висока (297,65-1226,41  $\mu$ g/l), при чему је

највећа вредност забележена код пива *CS30v*. Разлог за ову појаву је највероватније активност епифитне микрофлоре грозђа, а у прилог овој претпоставци говори и чињеница да је пиво *P30ps* (94,65 µg/l) имало више од три пута мањи садржај диацетила у поређењу са узорком *P30p* (297,65 µg/l). У сваком случају, диацетил није имао значајан негативан утицај на укупни ароматски профил пива са грозђем, што је потврдила сензорна анализа о којој ће бити речи у наредном поглављу. Добијени резултати говоре да је повећан садржај вициналних дикетона карактеристика специјалних пива са грозђем. Свакако, концентрација диацетила се може смањити одговарајућим технолошким поступцима као што су: термички третман кљука грозђа пре саме ферментације, продужење главног врења, обављање главног и накнадног врења на вишим температурама итд. Међутим, треба имати у виду да се овде ради о пивима са специфичном аромом, која је знатно богатија и у којима се диацетил може теже сензорно детектовати, па добијене вредности не представљају обавезно ману производа.

Поред вициналних дикетона, ацеталдехид је карбонилно једињење са највећом концентрацијом у пиву, која се код лагер типа креће у опсегу 2-20 mg/l (Вахтер и Hughes, 2001). Ово је важно ароматско једињење које у повећаној концентрацији може дати непожељан укус који се описује као укус на зелене јабуке или траву (Jonkova и Petkova, 2011). Пива са грозђем су имала већи садржај ацеталдехида у поређењу са контролним пивима, при чему је код узорака *P30p*, *P30v* и *CS30v* његова концентрација прелазила праг осетљивости. Узорци *P30p* и *P30ps* се нису значајно разликовали у погледу садржаја ацеталдехида, тако да се може закључити да термички третман није утицао на концентрацију овог једињења.

Најприсутније сумпорно једињење у лагер типу пива је диметил-сулфид (ДМС). У повећаној концентрацији ово једињење даје пиву непожељну арому на кукуруз шећерац или кувано поврће. Највећи део ДМС-а настаје деградацијом С-метилметионина (СММ) пореклом из слада. СММ је термолабилан и лако се разлаже дајући ДМС, тако да се већа количина СММ-а може наћи у благо сушеном сладу. Снажно кување сладовине утиче на конверзију СММ-а у ДМС, који се ослобађа са паром. Међутим, током сушења слада, један део СММ-а се



конвертује у диметил-сулфоксид (ДМСО), који није ни термолабилан ни испарљив, али је растворљив у води. Он може у значајној количини да пређе у сладовину, након чега га одређене врсте квасца могу редуковати до ДМС. Овако настали ДМС се тешко уклања. Такође, касније хмељење може допринети повећању садржаја ДМС-а до 15 µg/l (Вахтер и Hughes, 2001). С обзиром да ДМС потиче углавном из слада, није очекивано његово повећано присуство у пивима са грожђем. Концентрација ДМС-а у свим узорцима експерименталних пива је била у опсегу карактеристичном за лагер пива (20-100 mg/l), при чему је његов садржај у пивима са грожђем, изузев узорка *CS30v*, био мањи у поређењу са контролним пивима. Такође, већа концентрација овог једињења од прага сензорне осетљивости забележена је једино код пива *Pv* и *CS30v*.

### 5.11 Сензорна анализа

За било коју врсту хране или пића, сензорне карактеристике представљају витални параметар на основу кога потрошачи процењују квалитет производа. Нарочито су значајне у време масовне потрошње, где утичу на формирање укуса конзументата и на њихову лојалност одређеним произвођачима. Фактори који највише утичу на укупни сензорни квалитет пива су (Hough et al., 1982):

1. укус, мирис и арома;
2. садржај алкохола;
3. боја;
4. формирање, висина и трајност пене;
5. бистрина/мутноћа
6. одсуство неконтролисаног пењења.

Веома је тешко наведене параметре поредати према приоритету, јер сваки од њих у комбинацији са осталима значајно доприноси формирању карактеристичног сензорног профила пива. Потрошач ће своје пиво изабрати на основу мириса, укуса и садржаја алкохола, али уколико је било која од поменутих физичких особина (3-6) пића неприхватљива, он га може одбацити пре него што га конзумира. Егзактним мерењем, употребом хемијских и физичких метода анализе могуће је добити веома значајне податке о многим аспектима квалитета пива (особине 2-6). Међутим, чистоћа укуса пива, мирис пива, рецентност и

квалитет горчине пива су показатељи који се не могу измерити аналитички. За утврђивање ових показатеља који највише и занимају потрошаче, пиво се мора пробати. Ако је при томе потребно извући квантитативне закључке, мора се обављати сензорно оцењивање по унапред утврђеној процедури и уз помоћ посебно одабраних оцењивача. Уколико се врши испитивање како ће потрошачи прихватити нови производ, за сензорно оцењивање се бира панел састављен од потрошача. Пошто се при томе ради о особама које су лаици и које нису прошле кроз одговарајућу обуку, методе сензорне оцене треба да буду што је могуће једноставније (Kunze, 2004). С обзиром да су сензорно оцењивање пива са грожђем вршили потрошачи, у експерименталном раду су коришћене две најједноставније методе сензорне оцене: метод рангирања и хедонска скала.

У табели 28. приказани су резултати сензорног оцењивања добијени методом рангирања.

Табела 28. Резултати Фридмановог теста за метод рангирања

Узорци	Просечан ранг	СД	$\chi^2$	р
<i>Pp</i>	2,78 <sup>a</sup>	0,44		
<i>P20p</i>	1,22 <sup>b</sup>	0,44	10,889	<b>0,004</b>
<i>P30p</i>	2,00 <sup>a,b</sup>	0,71		
<i>Pv</i>	2,56 <sup>a</sup>	0,73		
<i>P20v</i>	1,44 <sup>a</sup>	0,53	5,556	0,062
<i>P30v</i>	2,00 <sup>a</sup>	0,87		
<i>Pp</i>	2,44 <sup>a</sup>	0,88		
<i>PN20p</i>	1,56 <sup>a</sup>	0,53	3,556	0,169
<i>PN30p</i>	2,00 <sup>a</sup>	0,87		
<i>Pv</i>	2,22 <sup>a</sup>	0,97		
<i>PN20v</i>	1,89 <sup>a</sup>	0,33	0,667	0,716
<i>PN30v</i>	1,89 <sup>a</sup>	1,05		
<i>Pp</i>	2,33 <sup>a</sup>	0,87		
<i>CS20p</i>	1,67 <sup>a</sup>	0,71	2,000	0,368
<i>CS30p</i>	2,00 <sup>a</sup>	0,87		
<i>Pv</i>	2,78 <sup>a</sup>	0,44		
<i>CS20v</i>	1,56 <sup>b</sup>	0,53	8,222	<b>0,016</b>
<i>CS30v</i>	1,67 <sup>b</sup>	0,87		

СД – стандардна девијација;  $\chi^2$  – вредност примењеног теста, р-ниво статистичке значајности (ако је  $p < 0,05$  онда је разлика значајна).

Различита слова у колонома означавају статистички значајну разлику на нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$  према Wilcoxon matched pair тесту.

На основу просечних рангова утврђиван је утицај количине додатог грожђа на сензору прихватљивост узорака, као и прихватљивост пива са грожђем у односу на контролно лагер пиво (што је мања вредност просечног ранга, сензорна прихватљивост је већа). У свакој оцењиваној серији од по три узорка, контролна пива су имала највиши просечни ранг, што указује да су пива са грожђем боље прихваћена од стране потрошача. Међутим, према резултатима Фридмановог теста, статистички значајна разлика у односу на контролно пиво је забележена само код узорака *P20p*, *CS20v* и *CS30v*. Остали узорци пива са грожђем, иако су имали ниже вредности просечних рангова, нису се статистички значајно разликовали од контролних пива. Пива са учешћем грожђа од 30 % су имала веће просечне рангове у поређењу са одговарајућим узорцима са 20 % грожђа, али та разлика ни у једном случају није била статистички значајна.

Пошто метода рангирања није била погодна за поређење свих добијених узорака, додатно сензорно оцењивање је обављено употребом хедонске скале са 9 нивоа, чиме је на основу просечне оцене омогућено поређење свих узорака. У табели 29 приказани су резултати сензорног оцењивања употребом хедонске скале.

Табела 29. Резултати сензорног оцењивања хедонском скалом

Узорак	Сензорна оцена	Узорак	Сензорна оцена
<i>Pp</i>	5,89±2,03	<i>Pv</i>	5,67±2,50
<i>P20p</i>	7,56±1,13	<i>P20v</i>	7,67±0,87
<i>P30p</i>	6,56±1,13	<i>P30v</i>	6,89±1,27
<i>PN20p</i>	7,78±1,09	<i>PN20v</i>	6,00±1,50
<i>PN30p</i>	7,22±1,64	<i>PN30v</i>	6,11±1,90
<i>CS20p</i>	6,56±1,01	<i>CS20v</i>	7,00±1,94
<i>CS30p</i>	6,11±1,36	<i>CS30v</i>	6,11±2,42

Добијени резултати су углавном били у складу са резултатима добијеним методом рангирања, при чему су контролна пива добила ниже оцене у поређењу са пивима са грожђем. Такође, пива са 30 % грожђа су имала ниже оцене од пива са 20% грожђа, изузев у случају узорака *PN20v* и *PN30v*. Најбољу сензорну оцену добило је пиво *PN20p* (7,78), а најнижу пиво *Pv* (5,67). Међутим, према АНОВА тесту, није постојала статистички значајна разлика између узорака, тако да се

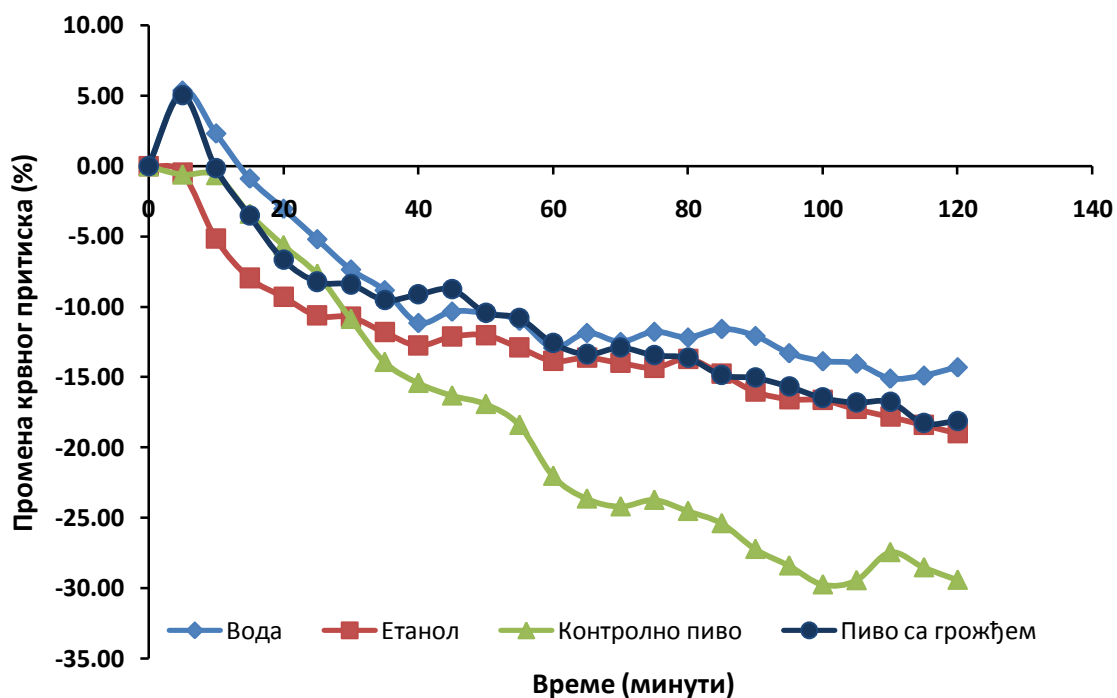
може закључити да су и контролна пива и сви узорци пива са грожђем имала једнаку сензорну прихватљивост од стране потрошача. Овакав резултат је јако охрабрујући имајући у виду чињеницу да је пиво пиће на које се човек навикава, и да ако увек троши једно те исто пиво, оно је за датог потрошача увек најбоље. Пиво са грожђем представља нови тип пива на нашем тржишту, тако да су просечне оцене преко 6 добијене од стране потрошача и више него афирмативне.

### 5.12 Резултати фармаколошког *in vivo* испитивања

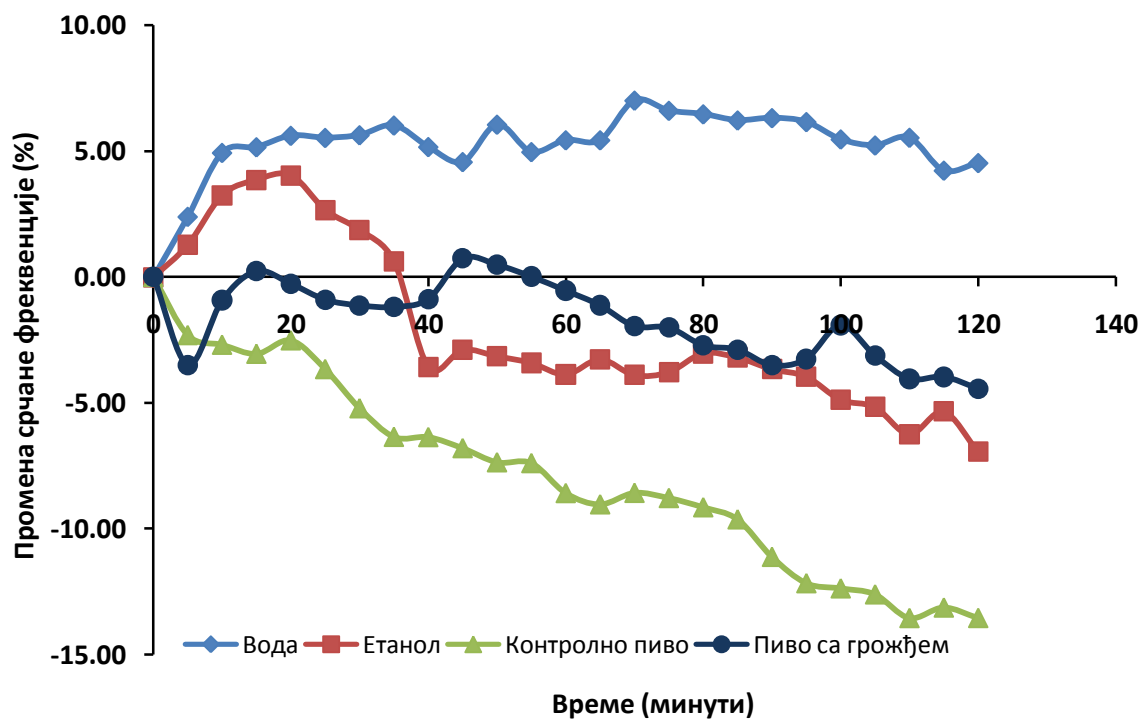
Бројне научне студије су се бавиле испитивањем утицаја умереног конзумирања алкохолних пића (пива, вина и јаких алкохолних пића) на кардиоваскуларни систем човека, при чему је општи закључак да умерени конзументи алкохолних пића имају мањи ризик од обољења срца и крвних судова (Coggao et al., 1999; Rehm et al., 2003). Многи научници заступају став да је овакво позитивно деловање алкохолних пића директно повезано са садржајем фенолних једињења у њима (Iacomino et al., 2009; Davalos и Lasuncion, 2009). Са друге стране, постоје мишљења да је за позитиван утицај умереног конзумирања алкохолних пића на здравље заслужан првенствено алкохол и да из тог разлога није битно које алкохолно пиће конзумирамо већ је битна само унета количина етанола (Rimm, 2000).

Због великог броја варијабила које је потребно узети у обзир када се ради о испитивању утицаја различитих алкохолних пића на организам човека, велики број медицинских истраживања утицаја алкохола на кардиоваскуларни систем врши се на моделу експерименталних животиња у коме се испитије хронични утицај алкохола у дужем временском периоду на здравствено стање животиња (Vinson и et al., 2003; Husain и et al., 2005; Tirapelli и et al., 2008; Tirapelli и et al., 2011). Међутим, ништа мање важан није ни акутни ефекат који алкохол има на организам. Током овог експерименталног рада управо је то рађено. Испитиван је утицај акутног дејства одабраних произведених узорака (*CS30p* и *Pp*) на крвни притисак и срчану фреквенцу пацова. У циљу изоловања утицаја алкохола и воде од утицаја других биоактивних једињења из пива, као контролни узорци коришћени су вода и 5 %-ни раствор етанола. Резултати промене крвног притиска

и срчане фреквенце пацова током 120 минута од тренутка уноса узорака у желуцак животиња приказани су на сликама 85 и 86.



Слика 85. Промена крвног притиска пацова током времена



Слика 86. Промена срчане фреквенце пацова током времена

На слици 85 може се уочити да у периоду од десетог до четрдесетог минута алкохол значајније утиче на пад притиска у поређењу са другим испитиваним растворима. Овакав резултат је очекиван имајући у виду фармакокинетику и метаболизам алкохола, који се већ после једног сата значајно, а после два сата скоро у потпуности метаболише. Након 40 минута, вода, алкохол и узорак *CS30p* не утичу значајно на крвни притисак, а његово даље смањивање представља спонтани пад притиска. Међутим, за разлику од воде, алкохола и пива са грожђем, контролно пиво *Pp* тек након 40 минута почиње значајније да обара притисак, што је очигледно последица дејства осталих биоактивних супстанци у пиву. С обзиром да се овај ефекат јавља тек после 40 минута, може се закључити или да је датим биоактивним супстанцама потребно више времена да делују или да се ради о њиховим активним метаболитима. Добијени резултати указују да се утицај контролног лагер пива на крвни притисак значајно разликује од утицаја пива са грожђем. Многи феноли пореклом из грожђа стимулативно делују на глатке мишиће срца поспешујући његов рад, тако да се код узорка *CS30p* поништава дејство активних материја из пива и спречава даљи пад притиска.

Када је у питању утицај испитиваних узорака на срчану фреквенцу, резултати се значајно разликују у односу на њихово дејство на крвни притисак (слика 86). Вода није имала утицај на срчану фреквенцу, а иницијални скок је последица уноса волумена течности. Етанол је утицао на пад фреквенце највероватније због деловања на спроводни систем срца у негативном смислу (почетни скок није последица деловања самог алкохола). Контролно пиво (*Pp*) је значајно обарало фреквенцу, што значи да потенцира деловање холинергичког система на срце (нервус вагус) и упркос паду притиска, фреквенца не расте, што указује да је вазомоторни рефлекс ослабљен. Узорак *CS30p* је на срчану фреквенцу деловао на сличан начин као и етанол, па се његов утицај може приписати деловању алкохола. По свему судећи, највероватније је да биоактивна једињења из грожђа делују антагонистички са биоактивним једињењима пива, па долази до међусобног поништавања њиховог утицаја.

Контролно лагер пиво делује негативно хронотропно (фреквенца) и негативно инотропно (снага срчане контракције). Како је артеријски притисак производ (ударни волумен срца  $\times$  фреквенца)  $\times$  периферни отпор у крвним

судовима, могуће је да у смислу вазодилатације доминирају ефекти пива на срце, а не на крвне судове.

Са друге стране, стиче се утисак да је деловање пива са грожђем на крвне судове након 40 минута безначајно. Биолошки активна једињења из грожђа која стимулативно делују на рад срчаног мишића успешно анулирају негативно хронотропно и инотропно дејство биоактивних једињења пива, тако да као резултат специјална пива са додатком грожђа не утичу значајно на промену крвног притиска и фреквенце. Имајући у виду да било каква промена нормалних кардиоваскуларних параметара код здравих особа није пожељна, овакав резултат је веома охрабрујући с обзиром на чињеницу да се конзумацијом оваквог специјалног типа пива са грожђем не ремети нормалан рад срца.

### 5.13 Трошкови производње

Трошкови производње представљају јако битан фактор у обезбеђивању успешног пословања и конкурентности на тржишту. Смањивањем цене производње оставља се више простора за повећање марже произвођача, чиме се стварају услови за веће улагање у маркетиншке активности и у даља истраживања, што је нарочито значајно ако се ради о новом производу на тржишту. У табели 30 приказани су трошкови производње лагер пива и пива са грожђем, при чему треба имати у виду да су трошкови рачунати за традиционални начин производње пива (без употребе *high-gravity* поступка производње сладовине који се данас примењује код већине великих произвођача на тржишту). Цена производње је израчуната на основу података добијених од три занатска и једног индустријског произвођача пива, као и од једне компаније која се бави производњом слада и филтрационих и помоћних средстава у производњи пива.

За разлику од лагер пива, трошкови сировина за производњу пива са грожђем су значајно већи, услед доста високе цене грожђа. Она у наведеном случају чини готово 50 % укупних трошкова. Уколико се на трошкове производње пива са грожђем додају трошкови за амбалажу, етикете, транспорт, амортизацију опреме и људски рад, и ако се обрачуна маржа произвођача од 50 %, фабричка цена боце овог пива запремине 0,5 литара би била око 0,5 €. Оваква цена, иако значајно већа од цене лагер пива, свакако би могла бити јако конкурентна на

тржишту, јер се ради о специјалној врсти пива са специфичним сензорним и функционалним карактеристикама. Чак и у случају да трговачка маржа буде и 100 %, малопродајна цена пива са грожђем не би прешла 1 €. С обзиром да се ради о новом производу на тржишту, у пословном плану би свакако значајна средства морала да се планирају за промоцију производа и марктеинг. Посматрајући тренутно стање на тржишту пива и производа на бази пива, пива са грожђем би могла да буду јако занимљива само мањим занатским произвођачима пива, али веома тешко и великим пиварама.

Табела 30. Трошкови производње пива у еурима по хектолитру производа

Елементи	Лагер пиво	Пиво са грожђем
	Цена, €/hl	Цена, €/hl
Вода	0,98	0,78
Угљен-диоксид	0,25	0,25
Слад	6,50	4,33
Грожђе	-	12
Хмељни препарати	1,99	1,40
Ензимски препарати	0,08	0,06
Минералне соли	0,01	0,01
Млечна киселина	0,05	-
Средства за филтрацију	0,18	0,18
Средства за стабилизацију	0,54	0,54
Антиоксиданти	0,01	0,01
Припрема техничке воде	0,15	0,15
Средства за прање и дезинфекцију	0,13	0,13
Енергенти	4,80	4,90
<b>Укупно</b>	<b>15,68</b>	<b>24,74</b>



## 6. ЗАКЉУЧАК

Основни циљ докторске дисертације био је развој специјалног типа пива обogaћеног биолошки активним састојцима грозђа са намером да се добије сензорно прихватљив производ веће биолошке вредности и повећане функционалности у односу на комерцијална лагер пива, али са ценом која би била конкурентна на постојећем тржишту. У склопу истраживања извршено је испитивање адекватне сорте грозђа која ће дати најбоље физичко-хемијске, функционалне и сензорне карактеристике овог специјалног типа пива, као и утврђивање оптималног удела грозђа у медијуму за ферментацију. Испитани су и остали битни параметри производње овог типа пива: могућност употребе различитих врста квасца у производњи, динамика ферментације, утицај аутохотне микрофлоре грозђа на квалитет производа, динамика екстракције фенолних једињења. Добијени производи су физичко-хемијски, хемијски и сензорно окарактерисани. У смислу испитивања постигнутих функционалних ефеката, анализиран је утицај добијених производа на кардиоваскуларни систем пацова. И коначно, урађена је и анализа цене коштања производа ради испитивања његове конкурентности на тржишту.

На основу добијених резултата и чињеница представљених у раду могу се извести следећи закључци:

1. Сорта грозђа не утиче значајно на боју медијума за ферментацију, али разлика у садржају бојених материја долази до изражаја тек током ферментације, када и долази до њихове максималне екстракције из покожице грозђа. Одабиром тренутка одвајања чврсте фазе медијума може се регулисати боја добијеног пива, као и садржај укупних фенолних једињења у њему.

2. Количина екстракта у смешама сладовине и кљука грозђа директно је зависна од садржаја суве материје у грозђу. У циљу стандардизације производа, потребно је почетни садржај екстракта регулисати подешавањем екстракта употребљене сладовине.

3. Брзина ферментације пива са додатком грозђа је значајно већа у поређењу са стандардним лагер пивом, због веће концентрације простих шећера у медијум за ферментацију који представља мешавину сладовине и кљука грозђа.

4. Сорта грозђа и удео грозђа су имали статистички веома значајан утицај на брзину ферментације, док се показало да врста квасца није значајно утицала на овај параметар. Такође, значајан допринос разликама у брзини ферментације дала је и међусобна интеракција фактора. Са повећањем удела грозђа повећавала се и брзина ферментације.

5. *Lag* фаза размножавања квасца код ферментација контролних пива без додатка грозђа (*Pp* и *Pv*) била је значајно дужа у поређењу са ферментацијама пива са додатком грозђа. Код пива са грозђем, интензиван раст квасца је примећен готово одмах након засејавања, што је такође последица веће концентрације простих шећера.

6. Сва пива произведена са додатком грозђа имала су значајно већи садржај алкохола (5,72-7,33 % v/v) у поређењу са контролним узорцима (3,65-4,91 % v/v), због већег садржаја екстракта у полазном медијуму. Пива која су ферментисана са квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала су мањи садржај алкохола и мањи степен преврелости у поређењу са одговарајућим пивима ферментисаним са квасцем *S. pastorianus*, што је највероватније последица боље прилагођености квасца *S. pastorianus* на медијум за ферментацију и на примењени температурни режим ферментације.

7. Према садржају заосталог екстракта, произведена експериментална пива са грозђем (3,13-4,55 %) су била веома блиска стандардним, експорт и плзенским типовима пивима, док су према садржају алкохола била много ближа бок типу пива.

8. Експериментална пива са грозђем су имала значајно нижу рН вредност (3,65-4,35) у поређењу са уобичајеним вредностима за пива. Нешто већа киселост пива са грозђем је последица присуства воћних киселина пореклом из грозђа (првенствено винске), при чему ова појава није утицала негативно на сензорни квалитет, и представља карактеристично својство овог типа пива.

9. Горчина пива са грозђем је била нижа у поређењу са контролним лагер пивом (21 до 23 ЕВС јединице), из разлога што је код пива са грозђем 20-30 % охмелене сладовине замењено са кљуком грозђа, па је у њима и садржај горких једињења пореклом из хмеља био мањи.

10. Према ЕВС методи, боја експерименталних пива са грожђем је била у опсегу од 7,88 до 24,75 ЕВС јединица . Пива са прокупцем и бургундцем црним су имала веома сличну светлоцрвену боју, док су пива са *cabernet sauvignon*-ом била значајно тамнија и по боји јако слична црвеним винима. С обзиром да карактеризација боје ЕВС методом даје ограничену информацију, и да су за боју пива произведених са додатком грожђа одговорна сасвим друга једињења (антоцијани), за дефинисање боје ових пива препоручује се одређивање *CIElab* параметара ручним хромаметром. Са повећањем удела грожђа у ферментационом медијуму повећавао се и интензитет црвене боје пива, али и укупна обојеност узорака.

11. Пива са грожђем су имала значајно већу концентрацију фенолних једињења у поређењу са контролним пивима. Сва пива ферментисана квасцем *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 имала су значајно већи садржај фенолних једињења у поређењу са пивима ферментисаним са пивским квасцем. Ово је вероватно последица изражене потребе квасца *S. cerevisiae* ICV-K1-V1116 за великим количинама кисеоника које су му неопходне за синтезу фактора преживљавања, тако да највећи део раствореног кисеоника апсорбује, чиме се уједно смањује могућност оксидације фенола и других оксидабилних супстанци.

12. Пива са грожђем сорти прокупац и *pinot noir* су имала сличан садржај фенолних једињења, док су пива са грожђем *cabernet sauvignon* била значајно богатији извор ових једињења. Највећа концентрација фенолних једињења пронађена је у пиву са 30 % *cabernet sauvignon*-а ферментисаном са винским квасцем (*CS30v*) (754,40 mg/l). Повећање садржаја фенолних једињења код пива са грожђем у поређењу са контролним пивима се кретало у опсегу од 37 до 636 % према ЕВС методи, односно од 9,7 до 77,4 % према *Folin-Ciocalteu* методи.

13. Корелација између ЕВС методе за одређивање полифенола и методе по *Folin-Ciocalteu* је била статистички веома значајна ( $r=0,779$ ;  $t=4,485$ ;  $p=0,001$ ), што је потврда да се обе методе могу успешно користити за одређивање укупних фенолних једињења у пиву, нарочито ако је битније поређење више различитих узорака од апсолутне вредности концентрације ових једињења.

14. Сви испитивани фактори (сорта грозђа, удео грозђа у медијуму за ферментацију и врста квасца) имали су статистички значајан утицај на садржај фенолних једињења експерименталних пива.

15. Пиво произведено са стерилисаним кљуком грозђа (*P30ps*) је имало значајно мањи садржај фенолних једињења у поређењу са пивом код кога кљук није био термички третиран (*P30p*), што указује да додатна стерилизација медијума за ферментацију битно утиче на интензивирање оксидације и деградације фенолних једињења. Ради смањења губитака фенолних једињења, једно од најбољих решења за термички третман кљука могли би бити цевасти пастеризатори са промотерима турбуленције.

16. Код пива са прокупцем и *pinot noir*-ом максимална концентрација фенолних једињења је постизана након 60-70 часова, док је у случају пива са *cabernet sauvignon*-ом максимум постизан након 50-60 часова. Након тога, садржај фенолних једињења је у наставку ферментације благо опадао услед појаве оксидације и полимеризације или као последица таложења са ћелијама квасца, тако да је у циљу максималне екстракције и очувања фенолних једињења најбоље извршити одвајање комине око шездесетог часа ферментације.

17. Динамика екстракције фенола код пива са стерилисаним кљуком прокупца (*P30ps*) је била у потпуности другачија у поређењу са другим пивима са грозђем. Узрок овакве појаве је термички третман кљука пре ферментације, где је под утицајем температуре и кључања дошло до значајне екстракције фенола, па је касније током ферментације екстракција била знатно мања.

18. Вино *Pinot noir* имало је значајно већи садржај фенолних једињења у поређењу са Прокупцем, док се пива са *pinot noir*-ом према садржају ових једињења нису много разликовала од пива са прокупцем. То значи да је мацерација у случају пива са *pinot noir*-ом била непотпунија и мање ефикасна, при чему је познато да је *pinot noir* сорта грозђа позната по слабијој екстракцији бојених и фенолних материја и по лошијој стабилности пигмената.

19. Ефикасност екстракције фенола из грозђа током производње експерименталних пива била је значајно мања у поређењу са њиховом екстракцијом током производње вина, и кретала се од 59,95 до 87,55 % у односу на

одговарајуће вино. Разлози за то су нижа температура врења, нижи садржај алкохола и виша рН вредност у случају производње пива.

20. Антиоксидативни капацитет експерименталних узорака је био у статистички веома значајној корелацији са укупним садржајем фенолних једињења. Висока корелација је потврда да код добијених пива и вина фенолна једињења дају највећи допринос антиоксидативном капацитету. Пива произведена са додатком грозђа су имала значајно већи антиоксидативни капацитет у поређењу са контролним пивима. Највећи антиоксидативни капацитет имала су пива са *cabernet sauvignon*-ом, при чему је пиво *CS30v* имало највећу вредност за овај параметар. Додатном стерилизацијом кљука пре ферментације антиоксидативни капацитет се смањује за око 10-15 %. Антиоксидативни капацитет пива са грозђем значајно је већи у поређењу са светлим пивима и белим винима, а у рангу је са тамним пивима и розе винима.

21. Корелација између садржаја флавоноида, укупних фенола и антиоксидативног капацитета била је статистички веома значајна, без обзира којом методом су добијени резултати. Према садржају флавоноида опадајући редослед узорака био је следећи: вина (*Cabernet sauvignon* > *Pinot noir* > Прокупац) > пива са грозђем (пива са *cabernet sauvignon* > пива са *pinot noir* ≈ пива са прокупцем) > контролна пива.

22. Пива произведена са истим уделом прокупца и *pinot noir*-а се нису статистички разликовала по садржају антоцијана, а такође није било разлике ни између вина од поменутих сорти. Највећи садржај антоцијана имало је пиво са 30 % *cabernet sauvignon*-а ферментисано винским квасцем (88,84 mg/l). Стерилизацијом кљука грозђа сорте прокупац садржај антоцијана се смањио за 21,88 % што значи да је деградација антоцијана током термичког третмана била значајно већа у поређењу са губитком укупних фенолних једињења.

23. Од анализираних 16 појединачних фенолних једињења, у контролним пивима је идентификовано само два, у пивима са грозђем 10, а у винима 13 једињења. Ванилинска киселина је била у највећој концентрацији од свих анализираних фенолних једињења у пивима са грозђем (1,69-4,73 mg/l). Поред ванилинске киселине, у овим пивима је забележена и значајна количина сиригинске киселине и катехина.

24. Концентрација амил алкохола, изобутанола, n-пропанола и метанола у пивима са грожђем је била значајно већа у поређењу са контролним пивима, при чему су узорци ферментисани винским квасцем имали већи садржај ових једињења у поређењу са одговарајућим пивима ферментисаним пивским квасцем. У пивима са грожђем, од свих анализираних естара садржај етил ацетат је био највећи (11,26-44,09 mg/l), након чега је следио изоамил ацетат (2,47-3,59 mg/l).

25. Концентрација диацетила у пивима са грожђем, изузев узорка *PN30v* (28,17 µg/l), је била изразито висока (297,65-1226,41 µg/l). Разлог за ову појаву је највероватније активност епифитне микрофлоре грожђа, а у прилог овој претпоставци говори и чињеница да је стерилизацијом кљука садржај диацетила смањен за више од три пута. Међутим, праг детекције диацетила код пива са грожђем је због пуноће и богатства укуса и ароме знатно виши у поређењу са лагер пивом, тако да повишена концентрација овог једињења није негативно утицала на сензорни квалитет.

26. У погледу сензорних својстава пива обогаћених грожђем добијени су врло повољни резултати. Током сензорног оцењивања употребом хедонске скале са 9 нивоа, пива са грожђем су добила више оцене у поређењу са контролним пивима, при чему је најбољу оцену добило пиво са 20 % *pinot noir*-а ферментисано пивским квасцем (*PN20p*). При томе су пива са 30 % грожђа имала ниже оцене од пива са 20% грожђа, изузев у случају узорака са *pinot noir*-ом ферментисаних винским квасцем (*PN20v* и *PN30v*). Међутим, није постојала статистички значајна разлика између узорака, тако да се може закључити да су и контролна пива и сви узорци пива са грожђем имала сличну сензорну прихватљивост од стране потрошача. Овакав резултат је јако охрабрујући с обзиром на чињеницу да је пиво пиће са изузетно дугом традицијом и препознатљивим органолептичким карактеристикама које су потрошачи усвојили и прихватили.

27. Подаци добијени фармаколошким *in vivo* испитивањима такође су дали веома интересантне резултате. Док контролно лагер пиво делује негативно хронотропно (срчана фреквенца) и негативно инотропно (снага срчане контракције), утицај пива са додатком грожђа на крвне судове је након 40 минута готово безначајан. Биолошки активна једињења из грожђа која стимулативно

делују на рад срчаног мишића успешно анулирају негативно хронотропно и инотропно дејство биоактивних једињења пива, тако да као резултат специјална пива са додатком грожђа не утичу значајно на промену крвног притиска и фреквенце. Имајући у виду да било каква промена нормалних кардиоваскуларних параметара код здравих особа није пожељна, овакав резултат је веома охрабрујући с обзиром на чињеницу да се конзумацијом оваквог специјалног типа пива са грожђем не ремети нормалан рад срца.

28. У погледу трошкова производње логично је да су трошкови сировина за производњу пива са грожђем значајно већи. Доста висока цена грожђа чини готово 50 % укупних трошкова. Уз све трошкове производње и манипулације, и уз маржу произвођача од 50 %, фабричка цена боце пива са грожђем запремине 0,5 литара би била око 0,5 €. Чак и у случају да маржа трговца буде и 100 %, малопродајна цена пива са грожђем не би требало да пређе 1 €. Имајући у виду својства производа и његове специфичне сензорне и функционалне карактеристике, оваква цена могла би да буде конкурентна на тржишту.

29. Посматрајући тренутно стање на тржишту пива и производа на бази пива, пива са грожђем би могла да буду јако занимљива углавном мањим занатским произвођачима пива, али веома тешко и великим пиварама.

На основу представљених резултата може се истаћи да се са додатком кљука грожђа сладовини може произвести специјални тип пива специфичних и допадљивих сензорних карактеристика и са повећаном биолошком вредношћу у поређењу са комерцијалним лагер пивима. Избором сорте грожђа и његовог удела у медијуму за ферментацију може се утицати на сензорни профил пива, а такође и на садржај биоактивних једињења. Ако бисмо истовремено посматрали најбитније факторе у производњи овог типа пива (сензорна прихватљивост, биолошка вредност и економичност), опште препоруке за потенцијалну комерцијалну производњу би биле следеће:

➤ **Учешће грожђа:** иако су пива са 30 % грожђа имала већи садржај фенолних једињења, пива са 20 % грожђа су добила боље сензорне оцене. Имајући у виду и да 50 % укупних трошкова производње отпада на цену грожђа, јасно је да је препорука да учешће грожђа буде 20 %.

➤ **Сорта грозђа:** на основу прелиминарних истраживања и истраживања обухваћених овом дисертацијом, најбоље су се показале сорте са великим садржајем бојених једињења и високом сувом материјом (*pinot noir* и *cabernet sauvignon*). Могу се бирати умерено или јако ароматичне сорте, зависно од жељеног сензорног карактера пива.

➤ **Квасац:** ферментација се може обављати пивским квасцем за лагер тип пива или винским квасцима који подносе ниске температуре.

➤ **Технолошки процес:** у циљу вођења контролисаног процеса, пре мешања са сладовином потребно је инактивисати епифитну микрофлору грозђа. Један од начина је пастеризација у цевастим измењивачима топлоте. Због поједностављења процеса и смањења трошкова грозђе је могуће и сумпорисати. Око 60.-ог часа ферментације, комину је потребно одвојити од течног дела, како би се спречио губитак фенолних једињења и могуће погоршање сензорних карактеристика.

С обзиром на широке могућности у избору сировина и начина вођења технолошког поступка производње, пиво са додатком грозђа оставља велики креативни простор за даљи рад и стварање великог броја различитих производа.



## ЛИТЕРАТУРА

1. 5 Rabbit Cervecería (2015): <http://www.5rabbitbrewery.com/gran-misionario/>. (07. децембар 2015).
2. Allagash Brewing Company (2015): <http://www.allagash.com/beer/>. (06. децембар 2015).
3. Analytica-EBC (2008): Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
4. Ananga, A., Phills, B., Ochieng, J., Georgiev, V., Tsolova, V. (2013): Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: Poljuha, D., Sladonja, B. (Eds.), *The mediterranean genetic code - grapevine and olive*. INTECH Open Access Publisher, Rijeka, pp. 247-287.
5. Andersen, Ø.M., Jordheim, M. (2006): The anthocyanins. In: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 472–551.
6. Anderson, M.E. (1998): Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111: 1-14.
7. Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventos, R.M. (2010): Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In: De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 53-80.
8. Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70: 200-214.
9. Andriambelison, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R. (1998): Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition* 128: 2324-2333.

10. Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R. (2006): Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* 98: 23-31.
11. Aron, P.M., Kennedy, J.A. (2007): Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5670-5680.
12. Aron, P., Shellhammer, T. (2010): A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing* 116: 369-380.
13. Arosio, P., Levi, S. (2002): Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 457-463.
14. Arts, I.C., Hollman, P.C. (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 317S-325S.
15. Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, L.J., Bursać, M., Cvejić, J. (2012): Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry* 131: 513-518.
16. Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B. (2000): Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1062-1076.
17. Avramov, L., Žunić, D. (2001): Posebno vinogradarstvo. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
18. Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013): Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12: 43.
19. Bamforth, C.W. (2002): Nutritional aspects of beer – a review. *Nutrition research* 22: 227-237.

20. Barnes, S. (2003): Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose?. *British Journal of Nutrition* 89: 101-108.
21. Baxter, E.D. and Hughes, P.S. (2001): Beer: quality, safety and nutritional aspects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
22. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
23. Biendl, M., Mitter, W., Peters, U., Methner, F.J. (2002): Use of a xanthohumol-rich hop product in beer production. *Brauwelt International* 1: 39-42.
24. Biendl, M., Methner, F.J., Stettner, G., Walker, C. (2004): Brewing trials with a xanthohumol-enriched hop product. *Brauwelt International* 3: 182-185.
25. Birra del Borgo (2015): <http://www.birradelborgo.it/en/birre/scheda/20/equilibrista>. (07. децембар 2015).
26. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5: 9-19.
27. Blue Moon Brewing Company (2015): <http://www.bluemoonbrewingcompany.com/OurBeers>. (07. децембар 2015).
28. Borriello, A., Cucciolla, V., Della Ragione, F., Galletti, P. (2010): Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20: 618-625.
29. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990): Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343-355.
30. Boulton, C., Quain, D. (2001): Brewing yeast and fermentation. Blackwell Science Ltd., Oxford.
31. Boulton, C. (2013): Encyclopaedia of brewing. John Wiley & Sons, Oxford.
32. Bowers, J.E., Meredith, C.P. (1997): The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16: 84-87.

33. Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A. (2004): Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews* 22: 169-188.
34. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
35. Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R. (2004): *Brewing: Science and Practise*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge.
36. Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M.R., Lean, M.E., Duthie, G.G., Crozier, A. (2000): Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 220-230.
37. Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., Collin, S. (2005): Hops an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 424-429.
38. Callemien, D., Collin, S. (2010): Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-a review. *Food Reviews International* 26: 1-84.
39. Captain Lawrence Brewing Company (2015): <http://www.captainlawrencebrewing.com/the-beers/>. (07. децембар 2015).
40. Carochi, M., Isabel, Ferreira, I. (2013): A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15-25.
41. Chalopin, M., Tesse, A., Martínez, M.C., Rognan, D., Arnal, J.F., Andriantsitohaina, R. (2010): Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS One* 5: e8554.
42. Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W.T., Cohen, I. (2004): Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin-the antioxidant proteins. *Life Sciences* 75: 2539-2549.

43. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
44. Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R. (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 37: 949-962.
45. Chen, C.K., Pace-Asciak, C.R. (1996): Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology: The Vascular System* 27: 363-366.
46. Clifford, M. (2000) Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1063-1072.
47. Collin, S., Jerkovic, V., Bröhan, M., Callemien, D. (2013): Polyphenols and beer quality. In: Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. (Eds.), *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer, Berlin, pp. 2333-2359.
48. Coombes, J.S., Powers, S.K., Rowell, B., Hamilton, K.L., Dodd, S.L., Shanely, R.A., Sen, C.K., Packer, L. (2001): Effects of vitamin E and  $\alpha$ -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *Journal of Applied Physiology* 90: 1424-1430.
49. Corrao, G., Bagnardi, V., Zambon, A., Arico, S. (1999): Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction* 94: 1551-1573.
50. Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Romero-Romero, M.L., Fernandez-Gutierrez, A. (2004): Simultaneous determination of multiple constituents in real beer samples of different origins by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380: 831-837.
51. Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. (2012): Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 148–173.
52. Cuevas, A.M., Guasch, V., Castillo, O., Iribarra, V., Mizon, C., San Martin, A., Strobel, P., Perez, D., Germain, A.M., Leighton, F. (2000): A high-fat diet induces

- and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* 35: 143-148.
53. D'Amore, T., Russell, I., Stewart, G.G. (1989): Sugar utilization by yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology* 4: 315-324.
54. Darmanyan, A.P., Gregory, D.D., Guo, Y., Jenks, W.S., Burel, L., Eloy, D., Jardon, P. (1998): Quenching of singlet oxygen by oxygen-and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society* 120: 396-403.
55. Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W. (1997): Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17: 713-726.
56. Davalos., A, Lasuncion., M.A. (2009): Health-promoting effects of wine phenolics. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 571-582.
57. De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W., Manley, M. (2003): Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 902-909.
58. De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., De Keukeleire, D. (2003): Formation and accumulation of  $\alpha$ -acids,  $\beta$ -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4436-4441.
59. Delcour, J.A., de Varebke, D.J. (1985): A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. *Journal of the Institute of Brewing* 91: 37-40.
60. Delfini, C., Formica, J. V. (2001): *Wine microbiology: science and technology*. CRC Press, New York.
61. Demrow, H.S., Slane, P.R., Folts, J.D. (1995): Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 91: 1182-1188.
62. Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C.A., Hadjipavlou-Litina, D., Kefalas, P. (2009): Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis,

- characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 8073-8085.
63. Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004): Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India* 52: 794-804.
64. Dewick, P. M. (2002): *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, New York.
65. Diaz-Rubio, M.E., Saura-Calixto, F. (2006): Dietary fiber in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 69-72.
66. Dogfish Head Craft Brewery (2015): <http://www.dogfish.com/brews-spirits/the-brews/index.htm>. (06. децембар 2015).
67. Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
68. Dubick, M.A., Omaye, S.T. (2001): Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods* 3: 67-93.
69. Đukić, M. (2008): *Oksidativni stres – kliničko-dijagnostički značaj*. Mono i Manjana, Beograd.
70. Floridi, S., Montanari, L., Marconi, O., Fantozzi, P. (2003): Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1548-1554.
71. Folin, O., Ciocalteu, V. (1927): Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *Journal of Biological Chemistry* 73: 627-650.
72. Fraga, C.G. (2007): Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life* 59: 308.
73. Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. (2010): Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* 31: 435-445.

74. Frankel, E.N. (1984): Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 1908-1917.
75. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L. (1995): Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 890-894.
76. Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1982): Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 47: 412-426.
77. Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. (2010a): Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501: 23-30.
78. Galleano, M., Pechanova, O., Fraga, C. (2010b): Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11: 837-848.
79. Gambelli, L., Santaroni, G.P. (2004): Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis* 17: 613-618.
80. García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A. (2009): Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* 58: 537-552.
81. Gasowski, B., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Katrich, E., Lojek, A., Číž, M., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S. (2004): The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15: 527 – 533.
82. Genestra, M. (2007): Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling* 19: 1807-1819.
83. Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H. (2002): Cancer



- chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 959–969.
84. Gerhauser, C. (2005): Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer* 41: 1941–1954.
85. González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (2004): Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513: 283-289.
86. Gorjanović, S.Ž., Novaković, M.M, Potkonjak, N.I., Leskošek-Čukalović, I., Sužnjević, D.Ž. (2010): Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 744-751.
87. Graham, T.L. (1991): Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology* 95: 594-603.
88. Grayer, R.J., Veitch, N.C. (2006): Flavanones and dihydroflavonols. In: Anderson, O.M., Markha, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group, New York, pp. 918-1002.
89. Gresser, A. (2009): Properties and quality. In: Eßlinger, H.M. (Eds.), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 359-397.
90. Grune, T., Schröder, P., Biesalski, H.K. (2005): Low molecular weight antioxidants. In: Grune, T. (Eds.), *The handbook of environmental chemistry, Volume II: Oxidants and antioxidant defense systems*. Springer, Berlin, pp. 77-90.
91. Halliwell B, Gutteridge J. (1990): The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1-8.
92. Halliwell B, Gutteridge J. (2007): *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
93. Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

94. Halliwell, B. (2007): Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular Research* 73: 341-347.
95. Halliwell, B. (2007): Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35: 1147-1150.
96. Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007): Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8: 950-988.
97. Harrison, G.A.F. (1970): The flavour of beer - a review. *Journal of the Institute of Brewing* 76: 486-495.
98. Harrison, P.M., Arosio, P. (1996): The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1275: 161-203.
99. Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Ushida, K., Nikaido, O., Osawa, T. (1996): 8 hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet b exposure. *Journal of Investigative Dermatology* 107: 733-737.
100. Hayes, J.D., Pulford, D.J. (1995): The glutathione-s-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance Part II. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30: 521-600.
101. He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q. (2010): Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15: 9057-9091.
102. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13: 572-584.
103. Hendrich, A.B., Malon, R., Pola, A., Shirataki, Y., Motohashi, N., Michalak, K. (2002): Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16: 201-208.

104. Hernandez-Borges, J., Borges-Miquel, T., Gonzalez-Hernandez, G., Rodriguez-Delgado, M.A. (2005): Rapid separation of antioxidants in food samples by coelectroosmotic CE. *Chromatographia* 62: 271-276.
105. Herrera, B., Alvarez, A.M., Sanchez, A., Fernández, M., Roncero, C., Benito, M., Fabregat, I. (2001): Reactive oxygen species (ROS) mediate the mitochondrial dependent apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  in fetal hepatocytes. *The FASEB Journal* 15: 741-751.
106. Hines, L.M., Rimm, E.B. (2001): Moderate alcohol consumption and coronary heart disease: a review. *Postgraduate Medical Journal* 77: 747-752.
107. Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M.C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2002): Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 798-804.
108. Honoré, E.K., Williams, J.K., Anthony, M.S., Clarkson, T.B. (1997): Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertility and Sterility* 67: 148-154.
109. Horn, B. (2012): Aged 9,000 years, ancient beer finally hits stores. <http://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=128587208>. (06. Децембар 2015).
110. Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R., Young, T.W. (1982): *Malting and brewing science: hopped wort and beer*. Springer Science & Business Media, London.
111. Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
112. Huang, H.Q., Li, H.L., Tang, J., Lv, Y.F., Zhang, W.D. (2008): A new aurone and other phenolic constituents from *Veratrum schindleri* Loes. f. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 590-592.
113. Hughes, P.S., Baxter, E.D. (2001): *Beer: quality, safety and nutritional aspects*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

114. Husain, K., Mejia, J., Lalla, J., Kazim, S. (2005): Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacological Research* 51: 337–343.
115. Iacomino, G., Tedesco, I., Russo, G.L. (2009): Biological properties of beer and its components compared to wine. In: Preedy, V.R. (Eds.), *Beer in health and disease prevention*. Elsevier, London, pp. 483-490.
116. Jackson, R.S. (2008): *Wine science: principles and application*. Elsevier, London.
117. Jaganath, I.B., Crozier, A. (2010): Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: Fraga, C.G. (Eds.), *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 1-49.
118. Jandera, P., Skerikova, V., Rehova, L., Hajek, T., Baldrianova, L., Skopova, 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.
119. Jeffery, J., Persson, B., Wood, I., Bergman, T., Jeffery, R., Jörnvall, H. (1993): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 212: 41-49.
120. Jenkins, R.R., Goldfarb, A. (1993): Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 25: 210-212.
121. Jerkovic, V., Nguyen, F., Timmermans, A., Collin, S. (2008): Comparison of procedures for resveratrol analysis in beer. Assessment of stilbene stability through wort fermentation and beer aging. *Journal of the Institute of Brewing* 114: 143–149.
122. Johnson, I.T., Williamson, G., Musk, S.R.R. (1994): Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients?. *Nutrition Research Reviews* 7: 175-204.
123. Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., Morgan, L. (2005): Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Febs Letters* 579: 1653-1657.

124. Jonkova, G., Petkova, N. (2011): Effect of some technological factors on the content of acetaldehyde in beer. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 46: 57-60.
125. Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. J., Bickford, P.C. (1999): Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience* 19: 8114-8121.
126. Jung, E.H., Ran Kim, S., Hwang, I.K., Youl Ha, T. (2007): Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9800-9804.
127. Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Koynova, G.M., Kitanova, S.A., Tyurin, V.A., Stoytchev, T.S., Quin, P.J., Packer, L. (1990): Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 117-126.
128. Kancheva, V.D. (2009): Phenolic antioxidants–radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 1072-1089.
129. Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H., Koshino, S. (1995): Reducing activity and flavor stability of beer. *MBAA Technical Quarterly* 32: 90-94.
130. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009): Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2: 41-60.
131. Karim, M., McCormick, K., Kappagoda, C.T. (2000): Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *The Journal of Nutrition* 130: 2105S-2108S.
132. Karthika, G., Angappanb, M., Kumar, A.V., Natarajapillai, S. (2014): Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 4: 203–208.
133. Kaur, H., Halliwell, B. (1990): Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chemico-Biological Interactions* 73: 235-247.

134. Kehler, J.P. (1993): Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* 23: 21-48.
135. Kennedy, A. (2001): *Analytica-Microbiologica-EBC*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
136. Kilinc, E., Kalkan, H. (2003): High-performance liquid chromatographic determination of some phenolic acids of Turkish commercial wines: an electrochemical approach. *Journal of Wine Research* 14: 17-23.
137. Kobayashi, M., Shimizu, H., Shioya, S. (2008): Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106: 317-323.
138. Kolouchova, I., Melzoch, K., Šmidrkal, J., Filip, V. (1997): The content of resveratrol in vegetables and fruit. *Feedback* 91: 492.
139. Kondo, K. (2004): Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors* 22: 303-310.
140. Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B.O., Corton, J.C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 139: 4252-4263.
141. Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H. (1999): Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 38: 133-142.
142. Kunze, W. (2004): *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin, Berlin.
143. Kutlu, M., Susuz, F. (2004): Biochemical properties of glutathione peroxidase in *Gammarus pulex*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 73: 432-436.
144. Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P. (2001): Antioxidant capacities and phenolics levels of french wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3341-3348.

145. La Torre, G.L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicano, T., Dugo, G. (2006): Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry* 94: 640-650.
146. Landis, G.N., Tower, J. (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of ageing and development* 126: 365-379.
147. Lappano, R., Rosano, C., Madeo, A., Albanito, L., Plastina, P., Gabriele, B., Forti, L., Stivala, L.A., Iacopetta, D., Dolce, V., Andò, S., Pezzi, V., Maggiolini, M. (2009): Structure–activity relationships of resveratrol and derivatives in breast cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 53: 845-858.
148. Lapčík, O., Hill, M., Hampl, R., Wähälä, K., Adlercreutz, H. (1998): Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 63: 14-20.
149. Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., Treutter, D. (2008): Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. In: Daayf, F., Lattanzio V. (Eds.), *Recent advances in polyphenol research*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 1-35.
150. Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E. (2005): Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International* 88: 1269-1278.
151. Lesage-Meessen, L., Delattrea, M., Haona, M., Thibault, J.F., Ceccaldi, B.C., Bruneriec, P., Asthera, M. (1996): A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology* 50: 107- 113.
152. Leskošek-Čukalović, I. (2002): Tehnologija piva – I deo: Slad i nesladovane sirovine. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
153. Leskošek-Čukalović, I. (2015): Beer as integral part of healthy diets: Current knowledge and perspective. In: Nedović, V., Raspor, P., Lević, J., Tumbas-Šaponjac, V., Barbosa-Canovas, G.V. (Eds.), *Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food*. Springer, Heidelberg, pp. 111-144.

- 154.Li, J. (2011): Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- 155.Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., Wang, H. (2009): Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry* 112: 454-460.
- 156.Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118-126.
- 157.Loeffler, D.A., Connor, J.R., Juneau, P.L., Snyder, B.S., Kanaley, L., DeMaggio, A.J., Nguyen, H., Brickman, C.M, LeWitt, P.A. (1995): Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. *Journal of Neurochemistry* 65: 710-716.
- 158.Lotito, S. B., Frei, B. (2006): Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281: 37102-37110.
- 159.Lugasi, A. (2005): Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Alimentaria* 32: 181-192.
- 160.Lugasi, A., Hovari, J., (2003): Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food* 47: 79-86.
- 161.Lushchak, V. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101: 13-30.
- 162.Lushchak, V., Semchyshyn, H. (2012): Introductory chapter. In: Lushchak, V., Semchyshyn, H. (Eds.), *Oxidative stress: molecular mechanisms and biological effects*. InTech, Rijeka, pp. 3-12.
- 163.Luzzatto, L., Battistuzzi, G. (1985): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Harris, H., Hirschhorn, K. (Eds.), *Advances in Human Genetics* 14. Plenum Press, New York, pp. 217-329.
- 164.Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. (2010): Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14: 840–860.



165. Lyons, T.J. (1993): Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology* 71: 26-31.
166. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990): *Fruit phenolics*. CRC Press, Inc., Boca Raton.
167. Mackenzie, G.G., Carrasquedo, F., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I. (2004): Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF- $\kappa$ B activation at multiple steps in Jurkat T cells. *The FASEB Journal* 18: 167-169.
168. Mackenzie, G.G., Adamo, A.M., Decker, N.P., Oteiza, P.I. (2008): Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF- $\kappa$ B in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of I $\kappa$ B mutations. *Biochemical Pharmacology* 75: 1461-1471.
169. Mackenzie, G.G., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P. I. (2009) Dimeric procyanidins are inhibitors of NF- $\kappa$ B–DNA binding. *Biochemical Pharmacology*, 78, 1252-1262.
170. Maeda, K., Kuzuya, M., Cheng, X.W., Asai, T., Kanda, S., Tamaya-Mori, N., Sasaki, T., Shibata, T., Iguchi, A. (2003): Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 166: 23-30.
171. Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas, P. (2006): Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 396-404.
172. Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Stryn, E., Goiris, K., De Cooman, L., Aerts, G. (2008): Flavor instability of pale lager beers: determination of analytical markers in relation to sensory aging. *Journal of the Institute of Brewing* 114: 180-192.
173. Mannervik, B. (1985): Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 113: 490-495.
174. Mannervik, B., Helena Danielson, U., Ketterer, B. (1988): Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23: 283-337.

175. Mark, J.J. (2011): The Hymn to Ninkasi, goddess of beer. <http://www.ancient.eu/article/222/>. (03. децембар 2015).
176. Marles, R.J., Farnsworth, N.R. (1995): Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137-189.
177. Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32: 595-603.
178. Mateus, N., de Freitas, V. (2009): Anthocyanins as food colorants. In: Gould, K., Davies, K., Winefield, K. (Eds.), *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 283-304.
179. Matsuoka, Y., Hasegawa, H., Okuda, S., Muraki, T., Uruno, T., Kubota, K. (1995): Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274: 602-608.
180. Mazza, G., Miniati, E. (1993): *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC press, Boca Raton.
181. McGovern, P.E., Glusker, D.L., Moreau, R.A., Nuñez, A., Beck, C.W., Simpson, E., Butrym, E.D., Exner, L.J., Stout, E.C. (1999): A funerary feast fit for King Midas. *Nature* 402: 863-864.
182. McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C. (2004): Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 17593-17598.
183. McGovern, P.E. (2009): *Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. University of California Press, Berkeley.
184. McGovern, P.E. (2015): MidasTouch [http://www.penn.museum/sites/biomoleculararchaeology/?page\\_id=143](http://www.penn.museum/sites/biomoleculararchaeology/?page_id=143). (03. децембар 2015).
185. McMurry, I., Henningan, G.P., Loughrey, M.L. (1982): Quantitative analysis of hop flavonols using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 1102-1106.

186. McMurrrough, I., Roche, G.G., Cleary, K.G. (1984): Phenolic acids in beers and worts. *Journal of the Institute of Brewing* 90: 181-187.
187. Mello-Filho, A.C., Meneghini, R. (1991): Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 251: 109-113.
188. Meneghini, R. (1997): Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 783-792.
189. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.
190. Milovanović, M., Jović, S. (1999): *Vinova loza, grožđe i vino*. Agena, Beograd.
191. Min, D.B., Boff, J.M. (2002): Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 1: 58-72.
192. Minussi, R.C., Rossic, M., Bolognac, L., Cordi, L., Rotilioc, D., Pastorea, G.M., Durán, N. (2003): Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* 82: 409-416.
193. Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., Jennings, K.R. (2002): Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* 36: 1199-1208.
194. Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzi, P. (1999): Organic and phenolic acids in beer. *LWT - Food Science and Technology* 32: 535-539.
195. Munroe, J.H. (2006): Fermentation. In: Priest, F.G., Stewart, G.G. (Eds.), *Handbook of Brewing*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 487-524.
196. Mukai, K., Itoh, S., Morimoto, H. (1992): Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K, and tocopherolquinone) in solution. *Journal of Biological Chemistry* 267: 22277-22281.
197. Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., Nagaoka, S.I. (1993): Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of

- ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1157: 313-317.
198. Nakagami, T., Toyomura, K., Kinoshita, T., Morisawa, S. (1993): A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1158: 189-193.
199. Nardini, M., Ghiselli, A. (2004): Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry* 84: 137-143.
200. Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2007): Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets* 18: 224-243.
201. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (2000): Health risks and benefits of alcohol consumption. *Alcohol Research and Health* 24: 5-11.
202. Nykänen, L., Suomalainen, H. (1983): Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Springer Science & Business Media, Berlin.
203. Osman, H.E., Maalej, N., Shanmuganayagam, D., Folts, J.D. (1998): Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). *The Journal of Nutrition* 128: 2307-2312.
204. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007): Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87: 315-424.
205. Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J. (1995): Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 19: 227-250.
206. Packer, L. (1997): Vitamin C and redox cycling antioxidants. In: Packer, L., Fuchs, J. (Eds.), *Vitamin C in health and disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 95-121.
207. Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2007): Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry* 105: 204-214.
208. Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2: 270-278.

- 209.Parks, B. (2007): Two Ancient Brews. <http://byo.com/mead/item/1537-two-ancient-brews>. (03. децембар 2015).
- 210.Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000): Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985-1012.
- 211.Pavia, C., Bufo, S.A., Scopa, A., Scranò, L., Guerrieri, A., Cataldi, T.R.I. (2001): Determination of phenolic compounds of biological interest in some Italian red wines by HPLC-DAD. *Advances in Food Sciences* 23: 100-107.
- 212.Pavlović, D., Dordević, V., Kocić, G. (2002): Ćelijska signalna transdukcija-modulacija slobodnim radikalima. *Journal of Medical Biochemistry* 21: 69-84.
- 213.Perron, N.R., Brumaghim, J.L. (2009): A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics* 53: 75-100.
- 214.Peryam, D.R., Pilgrim, F.J. (1957): Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 11: 9-14.
- 215.Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4: 89-96.
- 216.Piazzon, A., Forte, M., Nardini, M. (2010): Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10677-10683.
- 217.Piljac, J., Martinez, S., Valek, L., Stipčević, T., Kovačević-Ganić, K. (2005): A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. *Food Technology and Biotechnology* 43: 271-276.
- 218.Pokorný, J. (2007): Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* 109: 629-642.
- 219.Polshin, E., Rudnitskaya, A., Kirsanov, D., Legin, A., Saison, D., Delvaux, F., Delvaux, F.R., Nicolai, B.M., Lammertin, M.M. (2010): Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer. *Talanta* 81: 88-94.

- 220.Popp, T. (2010): Man, the drinker. [http://www.upenn.edu/gazette/0110/PennGaz0110\\_feature1.pdf](http://www.upenn.edu/gazette/0110/PennGaz0110_feature1.pdf). (03. децембар 2015).
- 221.Powers, S.K., Lennon, S.L. (1999): Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 1025-1033.
- 222.Prabhakar, P.K., Doble, M. (2009): Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine* 16: 1119-1126.
- 223.Правилнику о категоријама, квалитету и декларисању ракије и других алкохолних пића, Сл. гласник РС бр. 74/2010 и 70/2011.
- 224.Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvári, M., Nyakas, C., Goto, S. (1999): The effect of exercise training on oxidativedamage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficialoutcomes. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 69-74.
- 225.Радовановић, Р., Попов-Раљић, Ј. (2001): Сензорна анализа прехранбених производа. Пољопривредни факултет, Београд-Земун и Технолошки факултет, Нови Сад.
- 226.Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.R. (2006): Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113: 189-207.
- 227.Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- 228.Rehm, J., Gmel, G., Sempos, C.T., Trevisan, M. (2003): Alcohol-related morbidity and mortality. *Alcohol Research and Helath* 27: 39-51.
- 229.Rehova, L., Skerikova, V., Jandera, P. (2004): Optimisation of gradient HPLC analysis of phenolic compounds and favonoids in beer using a CoulArray detector. *Journal of Separation Science* 27: 1345-1359.

- 230.Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G. (2000): Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of Nutrition* 130: 2109S-2114S.
- 231.Ren, J., Meng, S., Lekka, C.E., Kaxiras, E. (2008): Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *The Journal of Physical Chemistry B* 112: 1845-1850.
- 232.Renaud, S.D., de Lorgeril, M. (1992): Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339: 1523-1526.
- 233.Rentzsch, M., Wilkens, A., Winterhalter, P. (2009): Non-flavonoid phenolic compounds. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 509-527.
- 234.Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006a): *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- 235.Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006b): *Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- 236.Rimm, E. (2000): Alcohol and cardiovascular disease. *Nutrition* 2: 529-535.
- 237.Robbins, R.J., Bean, S.R. (2004): Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A* 1038: 97-105.
- 238.Rodriguez-Delgado, M.A., Gonzalez-Hernandez, G., Conde-Gonzalez, J.E., Perez-Trujillo, J.P. (2002): Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* 78: 523-532.
- 239.Romeo, J., Diaz, L., Gonzales-Gross, M., Warnberg, J., Marcos, A. (2006): Contribution to the intake of macro and micro nutrients exerted by moderate beer consumption. *Nutricion Hospitalaria* 21: 84-91.

240. Rosenblum, E.R., Campbell, I.M., Thiel, D.H., Gavalier, J.S. (1992): Isolation and identification of phytoestrogens from beer. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 16: 843-845.
241. Rossouw, M., Marais, J. (2004): The phenolic composition of South African Pinotage, Shiraz and Cabernet Sauvignon wines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 25: 94-104.
242. Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O. (2005): A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 197-206.
243. Saltveit, M.E. (2010): Synthesis and metabolism of phenolic compounds. In: De la Rosa, L., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, Ames, 89-100.
244. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1999): Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1301-1304.
245. Sandström, B.E., Granström, M., Marklund, S.L. (1994): New roles for quin2: powerful transition-metal ion chelator that inhibits copper-, but potentiates iron-driven, Fenton-type reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 177-185.
246. Sastre, J., Pallardo, F.V., Viña, J. (2005): Glutathione. In: Grune, T. (Eds.), *The handbook of environmental chemistry, Volume II: Oxidants and antioxidant defense systems*. Springer, Berlin, pp. 91-108.
247. Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T. (1996): Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 37-41.
248. Saura-Calixto, F., Goni, I. (2006): Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* 94: 42-447.
249. Saura-Calixto, F., Serrano, J., Pérez-Jiménez, J. (2009): What contribution is beer to the intake of antioxidants in the diet. In: Preedy, V.R. (Eds.), *Beer in health and disease prevention*. Elsevier, London, pp. 441-448.



250. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 287-306.
251. Schächinger, V., Britten, M.B., Zeiher, A.M. (2000): Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899-1906.
252. Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm, M. (2006): (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1024-1029.
253. Schwarze, S.R., Lee, C.M., Chung, S.S., Roecker, E.B., Weindruch, R., Aiken, J.M. (1995): High levels of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of old rhesus monkeys. *Mechanisms of ageing and development* 83: 91-101.
254. Schwarz, M., Hofmann, G., Winterhalter, P. (2004): Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. *Pinotage*: factors influencing the formation of pinotin A and its correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 498-504.
255. Shahidi, F., Naczki, M. (2003): *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton.
256. Shearer, M.J. (1995): Vitamin K. *The Lancet* 345: 229-234.
257. Shishodia, S., Aggarwal, B.B. (2006): Resveratrol: a polyphenol for all seasons. In: Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (Eds.), *Resveratrol in health and disease*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 1-16.
258. Sies, H. (1985): Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. (Eds.), *Oxidative stress*. Academic Press, London, pp. 1-8.
259. Simpson, B., Mairs, J. (2005): *The beer flavour handbook, Version 2.1*. FlavorActiV Limited, Chinnor.

260. Singleton, V., Rossi, J. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
261. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventó, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
262. Sirk, T.W., Brown, E.F., Friedman, M., Sum, A.K. (2009): Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6720-6728.
263. St. Somewhere Brewery (2015): <http://saintsomewherebrewing.com/cynthiana/>. (07. децембар 2015).
264. Stadtman, E.R., Berlett, S.B. (1997): Free radical mediated modification of proteins. In: Wallace, K.B. (Eds.), *Free radical toxicology*. Taylor & Francis Group, New York, pp. 71-87.
265. Stalović, B., Đorđević, S., Brčerević, I. (2013): Značaj određivanja bakra u jetri kod obolelih od Wilsonove bolesti - prikaz slučaja. *Medicinska Revija/ Medical Review* 5: 307-311.
266. Stambor, Z. (2013): The grapes of beer. [http://articles.chicagotribune.com/2013-10-06/features/sc-food-1004-drink-wine-beer-hybrid-20131006\\_1\\_grapes-minute-ipa-fruit-beers](http://articles.chicagotribune.com/2013-10-06/features/sc-food-1004-drink-wine-beer-hybrid-20131006_1_grapes-minute-ipa-fruit-beers). (01. децембар 2015).
267. Steffen, Y., Schewe, T., Sies, H. (2007): (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359: 828-833.
268. Steiling, H., Munz, B., Werner, S., Brauchle, M. (1999): Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Experimental cell research* 247: 484-494.
269. Stevens, J.F., Page, J.E. (2004): Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65: 1317-1330.

- 270.Sun, G.Y., Xia, J., Draczynska-Lusiak, B., Simonyi, A., Sun, A.Y. (1999): Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport* 10: 93-96.
- 271.Surh, Y.J. (2003): Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3: 768-780.
- 272.Suter, P.M. (2001): Alcohol and mortality: if you drink, do not forget fruits and vegetables. *Nutrition Reviews* 59: 293–297.
- 273.Tafulo, P.A.R., Queiros, R.B., Delerue-Matos, C.M. (2010): Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International* 43: 1702-1709.
- 274.Tan, Y., Siebert, K.J. (2004): Quantitative structure-activity relationship modeling of alcohol, ester, aldehyde, and ketone flavor thresholds in beer from molecular features. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3057-3064.
- 275.Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733-749.
- 276.Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006): Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52: 149-153.
- 277.Temsamani, H., Krisa, S., Mérillon, J. M., Richard, T. (2015): Promising neuroprotective effects of oligostilbenes. *Nutrition and Aging* 3: 49-54.
- 278.Tekel', J., De Keukeleire, D., Rong, H., Daeseleire, E., Van Peteghem, C. (1999): Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 5059-5063.
- 279.Tintunen, S., Lehtonen, P. (2001): Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *European Food Research and Technology* 212: 390-394.
- 280.Tirapelli, C.R., Legros, E., Brochu, I., Honoré, J.C., Lanchote, V.L., Uyemura, S.A., de Oliveira, A.M., D'Orléans-Juste, P. (2008): Chronic ethanol intake

- modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. *British Journal of Pharmacology* 154: 971–981.
281. Tirapelli, L.F., Batalhãob, M.E., Jacob-Ferreiraa, A.L., Tirapelli, D.P., Carniob, E.C., Tanus-Santosa, J.E., Queiroz, R.H., Uyemurac, S.A., Padovand, C.M., Tirapelli, C.R. (2011): Chronic ethanol consumption induces histopathological changes and increases nitric oxide generation in the rat liver. *Tissue and Cell* 43: 384–391.
282. Tsao, R., McCallum, J. (2010): Chemistry of flavonoids. In: De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, Ames, 131-153.
283. Tsanova-Savova, S., Ribarova, F. (2002): Free and conjugated myricetin, quercetin, and kaempferol in Bulgarian red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 639-645.
284. Ugliano, M. (2009): Enzymes in Winemaking. In: Moreno-Arribas, V., Polo, C. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 103-126.
285. Ulrich, S., Wolter, F., Stein, J.M. (2005): Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Molecular Nutrition and Food Research* 49: 452-461.
286. Valant-Vetschera, K.M., Wallenweber, E. (2006): Flavones and flavonols. In: Anderson, O.M., Markha, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group, New York, pp. 618-748.
287. Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F. (2004): Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1054: 181-193.

288. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266: 37–56.
289. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39: 44–84.
290. 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.
291. Vancraenenbroeck, R., De Brackeleire, C., Willems, Y., Devreux, A. (1983): Quantitative determination of flavonols in beer. *Cerevisia* 8: 13–19.
292. Vatai, T., Škerget, M., Knez, Ž. (2009): Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90: 246-254.
293. Vermerris, W., Nicholson, R. (2007): *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
294. Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., Oteiza, P.I. (2003): Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology and Medicine* 34: 84-92.
295. Verstraeten, S.V., Mackenzie, G.G., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. (2008): (-)-Epicatechin and related procyanidins modulate intracellular calcium and prevent oxidation in Jurkat T cells. *Free Radical Research* 42: 864-872.
296. Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. (2003): Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96: 110-118.
297. Vinson, J.A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J.R., Bose, P. (2003): Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5528-5533.

298. Vrndić, O., Kostić, I., Jeftić, I., Stanojević, M., Živančević-Simonović, S. (2010): Patofiziološki mehanizmi procesa starenja. *Medicinski časopis* 3: 30-36.
299. Wackerbauer, K., Kramer, P. (1982): Bavarian wheat beer - an alternative. Production and composition. *Brauwelt* 122: 758-760.
300. Wallace, S.S. (2002): Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 1-14.
301. Walker, C.J., Lence, C.F., Biendl, M. (2003): Studies on xanthohumol levels in stout/porter beer. *Brauwelt International* 143: 1709-1712.
302. Watkins, J.A., Altazan, J.D., Elder, P., Li, C.Y., Nunez, M.T., Cui, X.X., Glass, J. (1992): Kinetic characterization of reductant dependent processes of iron mobilization from endocytic vesicles. *Biochemistry* 31: 5820-5830.
303. Willaert, R. (2007): The beer brewing process: wort production and beer fermentation. In: Huie, Z.H. (Eds.), *Handbook of food products manufacturing*. John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 442-504.
304. Williams, C.A. (2006): Flavone and flavonol O-glycosides. In: Anderson, O.M., Markha, K.R. (Eds.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group, New York, pp. 749-856.
305. World Health Organisation (1989): World health statistics annual. *World Health Organisation*, Geneva.
306. World Health Organization (2015): <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>. (24. новембар 2015).
307. Wunderlich, S., Back, W. (2009): Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In: Preedy, V.R. (Eds.), *Beer in health and disease prevention*. Elsevier, London, pp. 3-16.
308. Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. (2001): Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* 21: 381-406.
309. Yeşilkaya, A., Yeğin, A., Özdem, S., Aksu, T.A. (1998): The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroperoxide-treated

- erythrocytes. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 28: 230-234.
310. Yoshioka, H., Haga, H., Kubota, M., Sakai, Y., Yoshioka, H. (2006): Interaction of (+)-catechin with a lipid bilayer studied by the spin probe method. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70: 395-400.
311. Young, I., Woodside, J. (2001): Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54: 176-186.
312. Zhao, H., Chen, W., Lu, J., Zhao, M. (2010): Phenolics profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* 119: 1150-1158.
313. Zhishen, J., Mengcheng, M., Jianming, W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
314. [http://www.infobarrel.com/What is Oxidative Stress](http://www.infobarrel.com/What_is_Oxidative_Stress), (24. новембар 2015).
315. <http://www.news-medical.net/health/Antioxidant-Enzyme-Systems.aspx>, (25. новембар 2015).
316. <http://mylespower.co.uk/2012/04/06/homemade-ph-indicator/>, (12. новембар 2015).
317. [http://chimorg-sun.blogspot.rs/2014\\_01\\_01\\_archive.html](http://chimorg-sun.blogspot.rs/2014_01_01_archive.html), (27. новембар 2015).
318. <http://drinkallthebeers.com>, (27. новембар 2015).
319. <http://cervejaparois.blogspot.rs>, (27. новембар 2015).
320. <http://www.beerbirrabier.com>, (26. новембар 2015).
321. <http://allthesamebeer.com>, (27. новембар 2015).
322. <http://www.chinabeergeek.com>, (27. новембар 2015).
323. <http://literatureandlibation.com>, (27. новембар 2015).
324. <https://vimeo.com>, (28. новембар 2015).
325. <http://www.beerfm.com>, (28. новембар 2015).
326. <http://www.scoopnest.com>, (25. новембар 2015).

327. <https://untappd.com>, (25. новембар 2015).

328. <http://www.instagram24.com>, (26. новембар 2015).

329. <http://www.eataly.net>, (26. новембар 2015).

330. <http://articles.chicagotribune.com>, (25. новембар 2015).



## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Миле Вељовић је рођен 24.02.1984. године у Прибоју, Република Србија. Основну и средњу школу (Гимназија, природно-математички смер) завршио је у Прибоју. Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, Одсек за прехранбenu технологију биљних производа, завршио је 2008. године, са просечном оценом током студирања 9,44. Дипломски рад под насловом: „Могућност коришћења алтернативних жита (*Amaranthus cruentus*) у савременој исхрани“ одбранио је са оценом 10 (десет). Докторске студије на Пољопривредном факултету у Земуну уписао је школске 2008/09. године.

Стипендију Фонда за развој научног и уметничког подмлатка добио је 2008. године, а 2009. године је добио и стипендију Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије. У периоду 2009-2010. био је ангажован на пројекту „Развој нових прехранбених и дијететских производа са медицинским гљивама и лековитим биљем“, а у пројектном циклусу у периоду од 2011-2015. ангажован је на пројектима „Развој и примена нових и традиционалних технологија у производњи конкурентних прехранбених производа са додатом вредношћу за домаће и страно тржиште – СТВОРИМО БОГАТСТВО ИЗ БОГАТСТВА СРБИЈЕ“ и „Развој технологије производње црвеног вина и дијететских производа из вина богатих биолошки активним полифенолима са кардиопротективним дејствима“, који су финансирани од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Од 2011. године укључен је у наставу из предмета Технологија воћа и поврћа, Технологија воћних сокова и освежавајућих безалкохолних пића, и Конзервисање и прерада воћа и поврћа.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Миле Вељовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/28

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хемијска, функционална и сензорна својства пива обогаћеног биолошки активним  
састојцима грожђа

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21.12.2015.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Миле Вељовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/28

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов докторске дисертације Хемијска, функционална и сензорна својства пива  
обогаћеног биолошки активним састојцима грожђа

Ментор Проф. др Ида Лескошек Чукаловић

Потписани/а Миле Вељовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 21.12.2015.

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хемијска, функционална и сензорна својства пива обогаћеног биолошки активним састојцима грожђа

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 21.12.2015.

\_\_\_\_\_