Modeliranje promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži

Gagula, Goran

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:018965

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Goran Gagula

MODELIRANJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA PIVA TIJEKOM SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, srpanj 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za modeliranje, optimiranje i automatizaciju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK:663.4 : 66.011(043.3)
663.4 : 621.796(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana Inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na V. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 26. veljače 2016.
Voditelj: prof. dr. sc. *Damir Magdić*
Suvoditelj: dr. sc.*Daniela Horvat, znan. savj.*

MODELIRANJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA PIVA TIJEKOM SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI

Goran Gagula, 54/D

Sažetak: Fizikalno-kemijska i druga svojstva piva mogu biti izložena promjenama tijekom skladištenja, što pivo čini manje atraktivnim do tržišno neupotrebljivim. Cilj ovog istraživanja bio je statističkim analizama i metodama te matematičkim modelima opisati značajne promjene fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva uskladištenoga tijekom šest mjeseci u različitoj ambalaži [staklena ambalaža, PET (polietilen-tereftalat), limenke i bačve]. Značajnije promjene tijekom skladištenja su zabilježene za vrijednosti: boje (CL), stabilnosti pjene (FO), otopljenog kisika (DO) i bistroće/mutnoće (HZ) piva, te lako hlapljivih komponenti: acetaldehida (ACE), dimetil sulfida (DMS), diacetila (DIA) i pentanodiona (PEN). Dat je prikaz usporedbe sličnosti promjena ukupnih analiziranih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva (lako hlapljive komponente) u različitoj ambalaži preko koeficijenta korelacije (*r*) iz kojega je vidljivo da je najveća sličnost ukupnih promjena između piva u staklenoj ambalaži i bačvama. Najveće i najintenzivnije promjene zabilježene su kod piva u PET ambalaži. Promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva koje su pokazale najveće varijabilnosti vrijednosti tijekom skladištenja, a i najznačajniji su pokazatelji fizikalno-kemijskih svojstava, opisane su modelima polinomne regresije (PR) s koeficijentima determinacije $R^2 = 1$. Model je validiran (svijetlo lager pivo u PET ambalaži) pri čemu koeficijent korelacije (*r*) potvrđuje sličnost promjene za vrijednosti boje (CL), $r = 0{,}99$, stabilnosti pjene (FO), $r = 0{,}94$, bistroće (HZ), $r = 0{,}98$ i gorčine (BI), $r = 0{,}59$, između izmjerenih vrijednosti i vrijednosti dobivenih primjenom polinomnog modela.

Ključne riječi: modeliranje, fizikalno-kemijska svojstva, pivo, skladištenje, ambalaža
Rad sadrži: 186 stranica
77 slika
55 tablica
7 priloga
191 literaturnu referencu
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Vinko Krstanović*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*	član
3.	izv. prof. dr. sc.*Tonči Rezić*	član
4.	Izv. prof.dr. sc. *Natalija Velić*	zamjena člana

Datum obrane: 10. srpnja 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, te u **elektroničkom (pdf format) obliku u** Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek i Repozitoriju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
PostgraduateUniversity Study-Food Engineering
Department for Process Engineering
Subdepartment for Modeling, Optimization and Automation
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC:663.4 : 66.011(043.3)
663.4 : 621.796(043.3)
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. V. held on February 26, 2016.
Mentor: *Damir Magdić*, PhD, prof.
Co-mentor: *Daniela Horvat*, PhD, sci. adv.

MODELING OF CHANGES OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF BEER DURING STORAGE IN DIFFERENT PACKAGING

Goran Gagula, 54/D

Summary: General properties of beer are subject to change while in storage, which makes the beer less attractive and even unmarketable. The aim of this research was to describe any significant changes in lager stored in different packaging [glass bottles, PET (polyethylene terephtalate), cans, kegs] by using mathematical models and statistical analysis. The data were collected during a period of six months and it shows significant changes in color (CL), foam (FO), dissolved oxygen (DO), haze (HZ), and easily evaporating components: acetaldehyde (ACE), dimethyl sulphide (DMS), diacetyl (DIA), and pentanedione (PEN). This paper presents a similarity comparison of significant changes using the correlation coefficient (*r*) in overall analysis of physicochemical properties and structure of beer in different packaging. The most significant changes are recorded in beer stored in PET. The properties of beer, which show the highest level of variability during storage are described using polynomial regression (PR) models with a coefficient of determination, $R^2 = 1$. The model is validated (lager in PET packaging) while the correlation coefficient (*r*) confirms a similarity in changes for color (CL), $r = 0.99$, foam (FO), $r = 0.94$, haze (HZ), $r = 0.98$, and bitterness (BI), $r = 0.59$, between the measured values and the calculated polynomial values.

Key words: modeling, physicochemical properties, beer, storage, packaging
Thesis contains: 186 pages
77 figures
55 tables
7 supplements
191 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Vinko Krstanović*, PhD, prof.	chair person
2.	*Lidija Jakobek Barron*, PhD, assoc. prof.	member
3.	*Tonči Rezić*, PhD, assoc. prof.	member
4.	*Natalija Velić*, PhD, assoc. prof.	stand-in

Defense date: July 10, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek; University of Osijek, President's office and in National and University Library in Zagreb; and as **electronic (pdf format) version in** City and University Library of Osijek and Rapository of the Faculty of Food Technology Osijek

Zahvaljujem majci, obitelji, radnim i svim kolegama

Sadržaj

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 4

2.1. PIVO ... 5

2.1.1. Sirovine za proizvodnju piva ... 6

2.1.1.1 Voda ... 6

2.1.1.2 Slad ... 7

2.1.1.3 Kvasac ... 8

2.1.1.4 Hmelj ... 9

2.1.1.5 Neslađene sirovine ... 10

2.1.2. Proizvodnja piva ... 11

2.1.2.1 Nepoželjni mikroorganizmi u proizvodnji piva ... 15

2.1.3. Alkoholno vrenje i nusproizvodi vrenja (sladovine) piva ... 18

2.1.3.1 Nusproizvodi alkoholnog vrenja (sladovine) piva ... 19

2.1.4. Polifenoli piva ... 24

2.1.5. Proizvodnja i potrošnja (konzumacija) piva ... 27

2.2. AMBALAŽA I AMBALAŽIRANJE PIVA ... 31

2.2.1. Punjenje i pakiranje (ambalažiranje) piva ... 34

2.2.1.1 Punjenje piva u staklenu ambalažu ... 37

2.2.1.2 Punjenje piva u PET boce ... 42

2.2.1.3 Punjenje piva u limenke ... 47

2.2.1.3 Punjenje piva u (*keg*) bačve ... 50

2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I MODELIRANJE ... 53

2.3.1. Temeljni statistički pojmovi ... 53

2.3.2. Osnovne karakteristike numeričkih nizova ... 54

2.3.3. Metode multivarijatne analize (MVA) ... 56

2.3.3.1 Klaster analiza (CA) ... 56

2.3.3.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) ... 57

2.3.3.3 Regresijska analiza ... 58

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 69

3.1. ZADATAK ... 70

3.2. MATERIJALI ... 72

3.2.1. Otopine i kemikalije ... 73

3.2.2. Korišteni laboratorijski uređaji i mjerna oprema ... 74

3.3. METODE ... 75

3.3.1. Mjerenje parametara kakvoće i fizikalno-kemijskih svojstava piva ... 75

3.3.1.1 Ekstrakt osnovne sladovine, specifična težina, alkohol, prividni ekstrakt ... 75

3.3.1.2 pH ... 76

3.3.1.3 Boja ... 78

3.3.1.4 Gorčina ... 78
3.3.1.5 Ukupni polifenoli ... 78
3.3.1.6 Bistroća/mutnoća ... 79
3.3.1.7 Otopljeni kisik u ambalaži ... 80
3.3.1.8 CO_2/O_2 tlačni tank ... 80
3.3.1.9 Pjena ... 81
3.3.1.10 Sadržaj zraka u boci/limenci ... 81
3.3.1.11 Određivanje CO_2 u boci/limenci ... 82
3.3.1.12 Test trajnosti ... 83
3.3.1.13 Ukupni pakirani kisik ... 84
3.3.2. Određivanje lako hlapljivih komponenti ... 85
3.3.3. Mikrobiološka kontrola i analize ... 87
4. REZULTATI ... 89
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PIVA ... 90
4.2. LAKO HLAPLJIVE KOMPONENTE PIVA ... 97
4.3. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA I ANALIZE ... 103
4.4. STATISTIKA I MODELIRANJE ... 106
4.4.1. Statistika ... 106
4.4.1.1 Korelacijske analize ... 106
4.4.1.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) ... 117
4.4.1.3 Klaster analiza (CA) ... 119
4.4.2. Modeliranje ... 120
4.4.2.1 Validacija modela ... 126
5. RASPRAVA ... 128
5.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PIVA TIJEKOM PUNJENJA I SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI ... 129
5.2. LAKO HLAPLJIVE KOMPONENTE PIVA TIJEKOM PUNJENJA I SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI ... 132
5.3. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA I ANALIZE ... 133
5.4. STATISTIKA I MODELIRANJE ... 133
5.4.1. Statistika ... 133
5.4.1.1 Korelacijske analize ... 133
5.4.1.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) ... 137
5.4.1.3 Klaster analiza (CA) ... 138
5.4.2. Modeliranje ... 139
6. ZAKLJUČCI ... 141
7. LITERATURA ... 144
8. PRILOZI ... 157

Popis oznaka, kratica i simbola

AB	alkohol volumni (engl. *alcohol by volume*)
ACE	acetaldehid
AI	zrak u praznome prostoru boce/limenke (engl. *air in headspace)*
AISI	Američki insitut za željezo i čelik (engl. *American Iron and Steel Institute*)
AMP	adenozin monofosfat
ANOVA	analiza varijance (engl. *analysis of variance)*
Ap	prividni ekstrakt (engl. *apparent extract*)
ATP	adenozin trifosfat
BI	gorčina (engl. *bitterness*)
BU	jedinica gorčine (engl. *bitterness units*)
CA	klaster analiza (engl. *cluster analysis*)
CL	boja (engl. *colour*)
CO	ugljični dioksid
DIA	diacetil
DO	otopljeni kisik (engl. *dissolved oxygen*)
DMS	dimetil sulfid
EAC	etil acetat
EST	esteri
EBC	Europska pivarska konvencija (engl. *European Brewing Convention*)
EVOH	etilen/vinil-alkohol (engl. *ethylene/vinyl-alcohol)*
FA	faktorska analiza (engl. *factor analysis*)
FAN	slobodni amino dušik (engl. *free amino nitrogen*)
FO	pjena (engl. *foam*)
GC	plinski kromatograf (engl. *gas chromatograph*)
HF	test trajnosi (engl. *haze forcing test*)
HDPE	polietilen visoke gustoće (engl. *high density polyethylene*)
HZ	bistroća/mutnoća (engl. *haze*)
IAA	izoamil alkohol
IAC	izoamil acetat
IBU	izobutanol

LDPE	polietilen niske gustoće (engl. *low density polyethylene*)
LSR	regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *least squares regression*)
MEBAK	Srednjeeuropska komisija za analize u pivarstvu (njem. *Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision*)
MF	membranska filtracija
MLR	višestruka linearna regresija (engl. *multiple linear regression*)
MR	višestruka regresija (engl. *multiple regression*)
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe agar
NAD	nikotin adenine dinukleotid
NADP	nikotin adenine dinukleotid fosfat
NN	Narodne novine (službeno glasilo RH)
OE	ekstrakt u osnovnoj sladovini (engl. *original extract*)
PA	poliamid (najlon)
PCA	analiza glavnih komponenti (engl. *principal components analysis*)
PDH	piruvat dehidrogenaza
PET	poli(etilen-tereftalat) [engl. *poly(ethylene terephtalate*)]
PEN	poli(etilen-naftalat) [engl. *poly(ethylene naphtalate*)]
PEN	pentandion (analize)
PLSR	parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *partial least square*)
PR	polinomna regresija (engl. *polynomial regression*)
PRO	propanol
PVC	poli(vinil-klorid)[engl. *poly*(*vinyl-chloride*)]
PVDC	poliviniliden-klorid[engl. *poly*(*vinylidine-chloride*)]
PU	pasterizaciona jedinica (engl.*pasterization unit*)
PY	ukupni polifenoli (engl. *polyphenols*)
RSM	regresija metodom odzivnih površina (engl*. response surface methodology*)
SG	specifična težina (engl. *specific gravity*)
SMM	S-metilmetion
s.tv.	suha tvar
TCA	trikarbonska kiselina (engl. *tricarboxylic acids)*
TP	ukupni pakirani kisik (engl. *total packaging oxygen*)

UV	ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)
VAL	viši alkoholi
WA	sladovinski agar (engl. *wort agar)*
z.s.	zračno suhi
QSAR	matematički modeli (engl. *quantitative structure activity relationships*)

1. UVOD

Pivo je staro koliko i ljudska povijest.Tijekom povijesti proizvodni proces i kvaliteta piva prošli su i još uvijek prolaze kroz brojne promjene (Marić, 2009.). Proizvodnja piva bilježi konstantan rast, pivo je u svijetu najpopularnije alkoholno, osvježavajuće piće (Statista, 2016.; Brody, 2000.).

Ambalaža je uvjet opstojnosti proizvoda u sustavu suvremene potrošnje (Jurečić, 2004.), te prati robu od proizvodnje, tijekom transporta, skladištenja, prodaje do uporabe i informira potrošača o sadržanome proizvodu (Rujnić-Sokele, 2007.; Stipanelov-Vrandečić, 2013.). Ambalaža postaje emocionalno sučeljavanje potrošača s proizvodom i njegovim vrijednostima (Bamforth, 2006.). Problem ambalažiranja piva traje odavno, a aktualan je i danas, od trenutka kada je ono postalo trgovačka roba, dakle otkada se ono počelo konzumirati izvan ili daleko od mjesta proizvodnje. Pojavili su se i novi ambalažni materijali, te općenito novi tržišni uvjeti i potrošački aspekti (Marić, 2009.). Za punjenje piva u svijetu su u uporabi četiri glavne kategorije ambalaže: staklene boce, limenke od aluminija ili bijeloga lima, plastične boce izrađene od poli(etilen-tereftalata) PET i poli(etilen-naftalata), PEN, te pivske (*keg*) bačve (Eßlinger i sur., 2012.; Walle, 2015.; Eßlinger, 2009.).

Kao i kod većine prehrambenih proizvoda, fizička i kemijske svojstva piva mogu biti izložena promjenama tijekom skladištenja, što ga čini od manje atraktivnoga za potrošače do njegove neupotrebljivosti. Nakon punjenja, brojne su promjene svojstava, sastava i okusa piva gdje najveći utjecaj na ove pojave ima koncentracija kisika u pivu, način skladištenja (temperatura, premještanje i trajanje skladištenja) te vrsta piva odnosno njegov kemijski sastav (Ditrych i sur., 2015.; Pavlečić i sur., 2012.: Kunz i sur., 2014.). Ovom disertacijom se želi istražiti i nadopuniti spoznaje o utjecaju ambalaže tijekom skladištenja i samog procesa ambalažiranja (pasterizacije) na promjene fizikalno kemijskih svojstava i sastava (lako hlapljive komponente) piva.

Pivo sadrži spojeve s antioksidativnim svojstvima među kojima su značajni fenolni spojevi. Polifenoli imaju antioksidativna svojstava, zadržavaju ili sprečavaju oksidaciju supstrata tj. piva (Farcas i sur., 2013.; Siqueira i sur., 2011.). Polifenoli su skupina spojeva zanimljiva s aspekta okusa, fizikalno-kemijske stabilnosti i općenito postojanosti proizvoda (Iyuke i sur. 2008.; Opstaele i sur., 2010.; Keukeleire, 2000.). Suprotno tomu, smatra se kako polifenoli imaju zanemariv učinak na oksidacijsku stabilnost piva (Weistock i sur., 2010.; Mikyška i sur., 2011.). U radu će biti i provjeren pretpostavljeni antioksidacijski karakter polifenola piva i njegov antioksidacijski učinak na postojanostfizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva, uspoređujući dva ambalažirana proizvoda (piva) različitih koncentracija (udjela) polifenola.

U prirodnim situacijama postoji mnoštvo varijabli koje su međusobno povezane. Govorimo o multidimenzionalnosti pojava, tj. o pojavama (događajima ili stanjima) koje su opisane s

velikim brojem varijabli (Kujundžić-Tiljak, Ivanković, 2009.). Ustaljene metode univarijatne analize kojima se varijable analiziraju pojedinačno ne pružaju dovoljno pouzdanih mogućnosti za objedinjavanje višestrukih opažaja, a u konačnici niti za pravilno znanstveno zaključivanje u slučajevima kada su varijable međusobno toliko ovisne da jedna ili više njih ne mogu biti izdvojena od ostalih i razmatrana za sebe. Varijable se moraju razmatrati zajedno, općenito, gdje su podaci visoko korelirani i višedimenzionalni (Pecina, 2006.).

Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izrađen. Matematički model opisuje sustav pomoću skupova varijabli i jednadžbi, koje opisuju odnose među varijablama (Magdić, 2011.).

Istraživanja provedena u disertaciji imaju za cilj da se statističkim, multivarijantnim metodama i analizama odnosno postupkom modeliranja, opišu, predvide promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva i analiziraju promjene sastava piva tijekom vremena skladištenja u različitoj odnosno najzastupljenijoj pivskoj ambalaži: staklene boce, PET ambalaži, limenkama i *keg*, pivskim bačvama.

Današnji aspekti pivovarskog poslovanja imaju nove, dinamične dimenzije koje polaze od potrošača, prodaje i plasmana proizvoda na tržište te se za tehnologe i istraživače u procesu proizvodnje piva postavljaju drugačiji, veći izazovi i zadaci kako proizvod prilagoditi novim uvjetima dizajna, materijala, skladištenja i svim čimbenicima koje određuje tržište. Dakle, suvremena proizvodnja piva više ne polazi od samoga proizvoda nego je uvjetovana aktualnostima i zahtjevima tržišta, potrošnje i potrošača, te konačno, profitabilnosti kao uvjetom tržišnoga, a samim time i proizvodnog opstanka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PIVO

Pivo je najpopularnije alkoholno piće u svijetu, a treće uopće nakon vode i čaja. Svjetska godišnja proizvodnja piva iznosi oko 2 milijarde hektolitara. Nedavne studije tvrde kako su proizvodnja i potrošnja piva bili jedni od glavnih čimbenika u razvoju civiliziranoga društva (Statista, 2016.). Pivo je proizvod koji se sa strašću konzumira diljem svijeta. Pozitivni učinci umjerenog konzumiranja piva na zdravlje, tijelo i um ne mogu biti negirani i od najvećih kritičara. Na nutritivnu vrijednost piva već se ukazuje više od 50 godina (Eblinger, 2009.; Bamforth, 2004.). Potpuno je prirodan i biološki uravnotežen proizvod pa se s pravom naziva tekućom hranom (Marić i Nadvornik, 1995.). Pivo pored alkohola, sadrži određenu količinu biotika, ugljikohidrate, amino kiseline, minerale, vitamine, organske kiseline, ß-glukane, antioksidanse i balastne materije te se može tretirati kao „balansirana“ namirnica. Unatoč ustaljenom vjerovanju, ne stvara pretilost (Gorinstein i sur., 2007.; Leskošek-Čukalović, 2000.; He i sur., 2012.). Pivo je pjenušavo osvježavajuće piće uglavnom s malim udjelom alkohola i karakterističnom aromom hmelja, dobiveno alkoholnim vrenjem pivske sladovine uporabom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*i *Saccharomyces uvarum*a iznimno, spontanim vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura kvasaca i odabranih sojeva bakterija mliječno-kiselog vrenja. Najvažniji sastojci koji ga čine su voda, alkohol i neprevreli ekstrakt, odnosno anorganske i organske tvari otopljene u smjesi alkohola i vode (Beluhan, 2013.; Marić, 2009.; NN, 2011.). Alkoholno vrenje odnosno alkoholna fermentacija s druge strane predstavlja anaerobni metabolički proces razgradnje šećera u anaerobnim uvjetima, tj. bez prisutnosti kisika, koji se odigrava u živoj stanici kvasca, daje energiju u obliku ATP-a, a pri tome se nakupljaju ili izlučuju proizvodi vrenja, etanol i ugljični dioksid (Karlson, 1989.). Pivo je kompleksna mješavina više od 450 niskomolekulskih definiranih sastojaka, sadrži i makromolekule kao što su proteini, nukleinske kiseline, polisaharidi i lipidi (Steiner i sur., 2010.), odnosno sadrži 600 – 700 hlapljivih spojeva koji doprinose okusu i aromi piva (Miedl i sur., 2011.; Bamforth i sur., 2009.). Pivska sladovina je vodeni ekstrakt ječmenog slada, neslađenih žitarica i hmelja, odnosno usipka, tako što se sastojke usipka enzimski hidrolizira i ekstrahira vodom. Sladovina u stvari predstavlja hranjivu podlogu za proizvodnju piva koja sadrži široki spektar različitih kemijskih sastojaka i koji su u interakciji u svim fazama procesa proizvodnje piva (Blanco i sur., 2015.; Marić, 2000.; Marić i Nadvornik, 1995.). Dakle, tradicionalne sirovine za proizvodnju piva su voda, ječmeni slad, pivski kvasac, hmelj i ako se koriste, neslađene žitarice (neslađene sirovine) (Lewis i Young, 2002.; Brigs, 2004.; Bamforth, 2006.).

2.1.1. Sirovine za proizvodnju piva

Pojam i uloga sirovina u proizvodnji piva bili su predmetom istraživanja od samih početaka pivovarske djelatnosti, pogotovo od industrijske proizvodnje. Značaj doprinos tim spoznajama za razvoj naših stručnih i znanstvenih kadrova dala su svakako djela: Mohačeka (1948.), Veselov i Čukmasova (1966.), Malceva (1967.), Koše (1974.), Hougha i sur. (1976.), Gaćeše (1979.), Semiza (1979.).

2.1.1.1 Voda je sirovina koja je količinski najviše zastupljena u proizvodnji piva. Prema navodima Petersen (1996.), Goldammer (2008.), Palmer i Kaminski (2013.) potrošnja vode u pivovarama kreće se 4 – 10 hL/hL prodajnoga piva, u manjim pivovarama i više. Od ukupno utrošene vode samo se manji dio (1,2 – 1,8 hL/hL prodajnog piva) troši u procesu kao sirovina (Petersen,1996.). Pivo sadrži najviše vode i ovisno o vrsti piva kreće se 89 – 98% (Brigs i sur., 2004.), Bamforth (2004.) navodi da litra 12% piva sadrži 919 g vode. Nabava i priprema vode je u pivovarama od posebnoga značaja jer kvaliteta vode bitno utječe na kvalitetu gotovoga piva. Voda služi kao otapalo ekstraktivnih tvari slada, neslađenih žitarica i hmelja. Minimalni uvjeti za vodu korištenu u pivovari trebali bi biti u skladu sa standardima vode za piće (Bamforth, 2006.). Petersen (1996.), Klašnja (1998.), Palmer i Kaminski (2013.), Goldammer (2008.) ukazuju kako je voda je u pivovari istodobno sirovina, radni medij, pomoćno sredstvo, te navode da se pri proizvodnji piva prerađuje znatno više vode nego kod većine drugih procesa u biotehnologiji i daju sadržajan prikaz trendova u pripremi i obradi vode za pivovare. O kemijskom sastavu vode za ekstrakciju slada i ostalih sirovina ovisi kvaliteta i okus piva budući da sastojci vode utječu na tijek enzimskih i fizikalno-kemijskih reakcija kod ukomljavanja, ekstrakcije hmeljnih sastojaka i kuhanja sladovine, vrenja i odležavanja piva. Od prisutnih iona vode najznačajniji je prisustvo Ca^{2+} iona (kationa) koji reguliraju pH komine, a samim time utječu na enzimske aktivnosti i reakcije, smanjuju ekstrakciju tanina, te pomažu koagulaciji proteina. Prisustvo Mg^{2+} iona od 10 – 20 ppm je potrebno kvascima kao nutrijent, ali veće koncentracije daju neugodnu, oštru gorčinu piva. Prisustvo Na^{+} naglašava slatkoću na niskim razinama, ali pri višim koncentracijama daje slan okus. Najvažniji anioni su bikarbonat HCO_3^- i karbonati CO_3^{-2} jer utječu na alkalitet vode, povećavaju pH komine, potiču izlučivanje taninskih spojeva, utječu na umanjenu aktivnost enzima slada, iskorištenje ekstrakta, promjenu karakteristika sladovine uslijed ekstrakcije nepoželjnih sastojaka pljevice, ekstrakciju nepoželjnih sastojaka gorčine hmelja, te dobivanja piva slabijih svojstava pjene i lošije stabilnosti. Sulfat (SO_4^{-2}) ioni nemaju značajnu ulogu u procesu proizvodnje piva, ali u visokim koncentracijama naglašavaju hmeljnu gorčinu i suhoću. Drugi anion klorid (Cl^-), u nižim koncentracijama daje slatkast okus piva, ali u većim može negativno utjecati na flokulaciju kvasca (Wolfe i sur. 2015.; Goldammer, 2008.).

2.1.1.2 Slad i neslađene žitarice izvor su ekstrakta koji daje pivu jačinu i punoću okusa. Slad predstavlja zrnje žitarica, koje je tijekom tehnološkog procesa proklijalo i zatim osušeno. Svrha reguliranog postupka vođenja klijanja u proizvodnji slada je sinteza ili aktivacija čitavog niza enzima, i djelovanje tih enzima na različite grupe sastojaka zrna žitarica (Schuster i sur., 1988.). Ječam je osnovna sirovina za proizvodnju piva. Njegov kemijski sastav i tehnološka svojstva determiniraju kvalitetu piva te ekonomsku učinkovitost proizvodnje. Ječam je bogat proteinima, ugljikohidratima, prehrambenim vlaknima, mineralima i vitaminima (Gupta i sur., 2010.). Ječam spada u porodicu trava *Gramineae*, dok je ječam iz roda *Hordeum vulgareu i Hordium sativum* osnovna sirovina za dobivanje slada, najvažnije sirovine u proizvodnji piva. S obzirom na vrijeme žetve razlikujemo jari i ozimi ječam, a ovisno o rasporedu zrna u klasu: dvoredni, četveroredni ili šesteroredni ječam. Tradicionalno se smatra da sorte dvorednog jarog ječma najbolje udovoljavaju zahtjevima koje postavlja sladarska i pivovarska industrija, pa se zato najčešće i koriste. Vremenom se stav prema tome ublažio, danas se uzgajaju ozime sorte šesterorednog ječma s poboljšanim svojstvima. (Leskošek-Čukalović, 2002.; Schuster i sur., 1990.). Ječam sadrži 12 – 20% vode, ovisno o klimatskim uvjetima za vrijeme sazrijevanja, a da bi se mogao čuvati, vlaga mora biti ispod 15%. Preostala masa zrna naziva se suha tvar koja sadrži: 70 – 85% ukupnih ugljikohidrata, 10,5 – 11% proteina, 2 – 4% anorganske tvari, 1,5 – 2% masti te 1 – 2% ostalih sastojaka (Steiner i sur., 2010.; Kunze, 1998.). Tradicionalni proces proizvodnja slada sastoji se iz tri glavne faze: močenja, klijanja i sušenja. Sladovanje započinje močenjem očišćenog i sortiranog ječma u vodi na temperaturi 14 – 18°C u trajanju do stupnja namočenosti od 43 – 46%. Nakon močenja slijedi klijanje koje obično traje 3 – 6 dana na 16 – 20 °C. Zatim se sušenjem snižava sadržaj vlage u zelenom sladu i zaustavlja klijanje, osigurava mikrobiološka stabilnost proizvoda, zaustavlja i usporavaju biokemijske reakcije te formira aroma i okus. Sušenje počinje propuhavanjem zraka velikom brzinom pomoću ventilatora rastućom temperaturom, maksimalno 105 °C do vlažnosti 3 – 5% (< 6%) (Bamforth, 2006.; Kaukovirta-Norja i sur., 2004.). Povremeno se pojavljuje interes i preispituju mogućnosti za neke slične ili drugačije slađene sirovine kao npr. za golozrni ječam (*Hordeum vulgare nudum)* kao sirovinom za proizvodnju slada, odnosno piva (Evans i sur.,1999.; Edney i Rossnagel, 2011.; Swanston i sur., 2011.) ili za proizvodnjom i primjenom zobenog slada koji se koristi u proizvodnju ale piva (Klose i sur., 2011.; Klose i sur., 2009.; Munoz-Insa i sur., 2011.). Pšenični slad ima značajno mjesto u proizvodnji piva. Koristi se za proizvodnju čistih pšeničnih piva s 50% ili više u usipku ili u kombinaciji s ječmenim sladom sa najmanje 30%-tnim udjelom (m/m) (Eßlinger i sur., 2012.; Habschied, 2014.).

2.1.1.3 Kvasci su jednostanične mikroskopske nemicelijske gljive (*fungi*) promjera 5 – 8 µm. Fakultativni su anaerobi. Ako raspolažu dostatnom količinom kisika, u kvascima dolazi do procesa aerobne respiracije ugljikohidrata pa nastaje ugljični dioksid i voda. U pomanjkanju kisika oni fermentiraju ugljikohidrate i stvaraju etanol i ugljični dioksid. Na tome se vrenju zasniva proizvodnja piva. Vrste roda *Saccharomyces* proizvode etanol i CO_2 pa se koriste u proizvodnji piva (Duraković i Duraković, 2003.). Kvasac izaziva alkoholno vrenje pivske sladovine. Brzina vrenja, konačna prevrelost, priroda i količina supstancija o kojima ovisi okus i miris, sposobnost flokulacije, nastajanja pjene te etanol tolerancija su važna svojstva pojedinačnih sojeva (Stewart i Russell, 2009.).Karakteristike flokulacije kvasca su ovisne o i uglavnom definirane funkcionalnošću *FLO* gena a koji su specifikum svakoga soja. Osim genetičkoj pozadini nekoliko čimbenika okoliša utječu na flokulaciju. Prisustvo hranjivih tvari, raspoloživost kalcija, pH, temperature, prisustvo etanola, dostupnosti kisika, odgovarajući hidrodinamički uvjeti za formiranje velikih flokula (Vidgren i Londesborough, 2011.). Beluhan (2013.) prikazuje tipove i vrste piva prema korištenome kvascu: lager piva ili piva donjeg vrenja dobivaju se vrenjem pivske sladovine različitim sojevima čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). Donje ili hladno vrenje započinje pri 6 – 8 ^{o}C, a završava na 12 – 18 ^{o}C, kada se najveći dio kvasca istaloži na dno posude. Ale piva ili piva gornjeg vrenja dobivaju se vrenjem pivske sladovine različitim sojevima čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae.* Gornje ili toplo vrenje i doviranje započinje pri temperaturi od 15 – 20 ^{o}C, a završava pri 20 – 25 ^{o}C, kada najveći dio kvasca ispliva na površinu piva. Tako se proizvode tradicionalna engleska piva (*ale*) gornjeg vrenja te pšenična piva. Afričko pivo proizvodi se od prosenog slada s posebnom vrstom kvasca *Shizosacchamyces pombe*. To su spontano prevrela piva koja se proizvode pomoću divljih, neselekcioniranih sojeva kvasca, koji u sladovinu dospijevaju iz zraka ili sa zidova prostorija i stijenki posuda vrenja. Stewart i Russell (2009.) navode da kao skupina mikroorganizama, gljivice imaju sposobnost korištenja širokog spektra ugljikohidrata, šećera. *Saccharomyces cerevisiae* je u mogućnosti da previre širok raspon šećera, na primjer glukozu, fruktozu, manozu, galaktozu, saharozu, maltozu, maltotriozu i rafinozu. Međutim, *Saccharomyces cerevisiae* i srodne vrste ne mogu metabolizirati npr. pentoze (riboza, ksiloza i arabinoza), celobioze (proizvode hidrolize hemiceluloze i celuloze), laktozu (mliječni šećer), inulin i celuloze. Sojevi *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) (tipa lager) posjeduju *MEL* gene koji proizvode izvanstanične enzime α-galaktozidaze (melibiaze) i prema tome mogu koristiti melibiozu što sojevi *Saccharomyces cerevisiae* (tipa *ale*) ne mogu. Također, kvasci donjega vrenja u potpunosti previru rafinozu te se dijele i na pahuljaste i praškaste, dok kvasci gornjega vrenja previru samo trećinu od molekula tog trisaharida (Kunze, 1998.). Sojevi *ale* kvasaca mogu rasti na 37 °C, a lager sojevi ne i to se može koristiti kao test diferencijacije ta dva soja. Prema navodu Stewart (2009.)

Saccharomyces carlsbergensis je stari naziv za *Saccharomyces pastorianus* izoliran od Emil Christian Hansena u Carlsberg pivovari, (1883. godine).

2.1.1.4 Hmelj (*Humulus lupulus L.*) je višegodišnja dvodomna biljka puzavica iz grupe kopriva i porodica konoplje. U pivarstvu koriste se ženski neoplođeni cvjetovi. U njima se nalaze gorke smole i eterična ulja s kojima se u pivo unose gorki i aromatični sastojci te pripadajuća im ostala svojstva (Karabin i sur., 2016.). Hmelj daje pivu miris i gorak okus te ima konzervirajući učinak. Gorki sastojci hmelja inhibiraju razmnožavanje mikroorganizama u sladovini i pivu, imaju veliku površinsku aktivnost pa poboljšavaju stabilnost pjene (Almaguer i sur., 2014.). Tendencija je da se kultivari hmelja klasificiraju u dvije kategorije: aromatski i gorki hmelj (s obzirom na količinu α-kiselina, omjer α i ß frakcije, količinu kohumulona i eteričnih ulja). U stvarnosti oni su samo varijacije na isto, pružaju kako gorčinu tako i aromu (Bamforth, 2003.). Kemijski sastav šišarica hmelja čini: voda 10%, ukupne smole 15%, eterična ulja 0,5%, tanini (polifenoli) 4%, monosaharidi 2%, pektini 2%, proteini 15%, pepeo 8%, celuloza, lignin i ostalo 43% (Roberts i Wilson, 2006.). Za pivovarstvo hmeljne su smole najvažnija skupina kemijskih spojeva. Ukupne hmeljne smole topive su u metanolu i dietil eteru. One se dijele na meke i tvrde smole. Tvrde smole su netopljive u heksanu i nepotpuno su definirane kemijske tvari, dok su meke smole topljive. Meke smole se dijele na α-kiseline i ß-frakcije, nazivaju se gorki sastojci hmelja (Srečec 2006.; Robert i Wilson, 2006.). Do sada je više od 300 hlapljiv tvari identificirano u hmelju. Monoterpen mircen kvantitativno je najvažnija tvar sa 17 – 37% masenog udjela u ukupnim uljima hmelja. Oksidirani terpeni daju pivu grubu i neplemenitu nijansu arome (Eßlinger, 2009.). Najvažniji reakcija α-gorkih kiselina je njihova izomerizacije u izo-α-gorke kiseline, koja se javlja povoljnije na višim temperaturama (100 – 130 °C) što su potvrdila istraživanja Malowicki i Shellhammer (2005.), Huang i sur. (2013.). U pivovarskoj praksi i industriji, izomerizacija se odvija većinom pri uvjetima od 100 °C, pri atmosferskom tlaku, kroz 90 minuta, što je neefikasno (Karbin i sur. 2016.), jer kako navodi O'Rourke (2003.) tek 50% ukupnih α-gorkih kiseline se na taj način prevode u izo-α-kiselina. Hmeljne prerađevine koje se koriste u proizvodnji piva mogu se podijeliti u tri grupe: konvencionalni hmeljni proizvodi (hmeljne peleti, CO_2 hmeljni ekstrakt), izomerizirani hmeljni proizvodi i specijalni hmeljni proizvodi (hmeljna ulja) (Bamforth, 2006.). Pivovarska vrijednost hmelja ocjenjuje se na osnovi sadržaja gorkih tvari, sadržaja aromatičnih tvari, sadržaja tanina, sposobnosti očuvanja kakvoće tijekom skladištenja, kakvoće gorčine, iskorištenja gorkih tvari te kakvoće intenziteta arome po hmelju (Krstanović, 2000.). Mnogi autori ističu značaj piva kao važnoga prehrambenog proizvoda za zdravlje potrošača pri čemu najveću ulogu ima upravo hmelj i hmeljni pripravci Bamforth (2003.), Briggs i sur. (2004.), Heyerick i sur. (2009.), Srečec i sur. (2009.). Rađena istraživanja u vezi antiseptičkih svojstava hmelja i njegovih sekundarnih metabolita pokazala su kako gorčina i

antiseptička moć hmelja ovise prvenstveno o udjelu α-kiselina u prirodnim šišaricama hmelja i njihovim pripravcima (Srečec, 2006.). Potvrđen je antibakterijski učinak na mikroorganizme koji kontaminiraju hranu i mogu uzrokovati trovanje kao *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*., *Clostridium perifringens*, *Campylobacter spp*., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* i enteropatogena *Escherichia coli* (Maye i Nielson, 2005.). No, zamijećen je razvoj otpornosti kod nekih gram-pozitivnih bakterija (*Lactobacillus* i *Pediococcus)* (Lodolo i sur., 2008.). Karbin i sur. (2016.) daju pregled znanstvenih spoznaja o učincima sve tri glavne grupe sekundarnih metabolita hmelja: polifenola, eteričnih ulja i smola. Opći učinak na zdravlje, antioksidativna svojstva, antimikrobne aktivnosti, sedativni i protuupalni učinci.

2.1.1.5 Neslađene sirovine su nesladni izvor fermentabilnih ugljikohidrata za proizvodnju sladovine. Neslađene sirovine u prvom su redu različite žitarice i proizvodi na bazi žitarica, te šećeri i proizvodi na bazi šećera. Neslađene žitarice u kojima se škrob nalazi u svom nativnom obliku su ječam, kukuruz, pšenica, riža, proso, sirak, zob, raž. Neslađene sirovine na bazi šećera su: šećerni sirupi (hidrolizati škroba kukuruza i ječma, saharoza, invertni šećer, glukoza te karamelizirani proizvodi od šećera (Schuhuster i sur., 1988.; Krstanović, 2000.; Agu, 2002.; Poreda i sur., 2014.). Od početka dvadesetog stoljeća došlo je do povećanja proizvodnje lager piva korištenjem visokog omjere žitarica kao zamjenu za dio slada (Taylor i sur., 2013.). Mnoge europske zemlje zamjenjuju slad i do 40% neslađenim žitaricama. Veći dodatak ili nije zakonski dopušten ili nepraktičan. Zamjena ječmenog slada s neslađenim žitaricama ima potencijal smanjiti troškove i stvori drugačiji proizvod (Schnitzenbaumer i Arendt, 2014.).

Kukuruz (*Zea*) kod nas je najzastupljenija neslađena žitarica u proizvodnji piva. Koristi se kao krupica (granulacija pojedinih frakcija od 250 – 1000 µm, 90%) i u usipku 20 – 30%, (s mogućnošću i do 40% bez dodataka enzimskih pripravaka), tako da su specifikacije i zahtjevi kvalitete dobro poznati svim proizvođačima, u praksi ih pivovare svaka ponaosob propisuju. Gaćeša (1979.), Šakić i Blesić (2011.) daju osnovne podatke i načine korištenja kukuruza u proizvodnji piva. Kukuruz sadrži (% na s.tv.): celuloza 4,2%, škrob i drugi ugljikohodrati 70%, masti 5,8%, ostale bezdušične tvari 7,6%, proteini 11,6% i pepeo 2,2%. Zakomljavanjem daje 84 – 88% ekstrakta (na s.tv.). Preporuka je da se u pivovarstvu koristi samo krupica od otklicanog kukuruza (suho otklicavanje) u cilju smanjenja udjela masti na 0,5 – 1,5% (zbog negativnoga utjecaja na stabilnost pjene, što neki autori i proizvođači piva dovode u pitanje). Masti iz kukuruza su veoma reaktivne, lako se oksidiraju do proizvoda gorkog (užeglog) okusa ili se hidroliziraju do slobodnih masnih kiselina koje utječu na stabilnost pjene piva. Proteini kukuruza se ne otapaju, ne prelaze u sladovinu što kukuruz čini pogodnom sirovinom za pivovarstvo. Uobičajene vrijednosti kakvoće kukuruzne krupice za proizvodnju

piva: voda 13%, masti (s.tv.) 1%, ekstrakta (z.s.) 90%, proteina (s.tv.) 9%, mineralne tvari (s.tv.) 0,7% te parametri meljave: granulacije frakcija (Brigs i sur., 2004.).

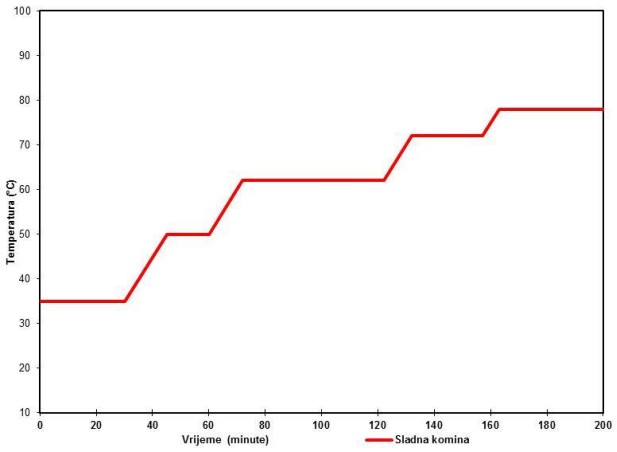
2.1.2. Proizvodnja piva

Proizvodnja piva (**Slika 4**) obuhvaća niz operacija kojima se iz pivovarskog slada dobiva gotovo pivo. To su proizvodnja sladovine, alkoholno vrenje sladovine (fermentacija), dozrijevanje (maturacija) mladog piva, hladna stabilizacija, filtracija i obrada, punjenje, pakiranje i skladištenje piva. Proizvodnjom sladovine dobivaju se glavni sastojci piva, ukomljavanjem ječmenoga slada, neslađenih sirovina, hmelja i vode te obradom sirovinskih materijala kako bi se proizvela hladna sladovine za fermentaciju. Performanse kuhanja obično se mjere količinom proizvedene hladne sladovine po uvarku (šarži kuhanja), broju uvaraka tjedno uključujući stanke za čišćenje i održavanje, iskorištenjem procesa, odnosno iskorištenjem ukupnoga ekstrakta od sirovina, a koji se mjeri kao postotak ekstrakta koji proizlazi iz standardnog laboratorijskog postupka, npr. EBC metodom (Bamforth, 2006.). Proizvodnja sladovine započinje u varionici i odvija se u nekoliko faza:

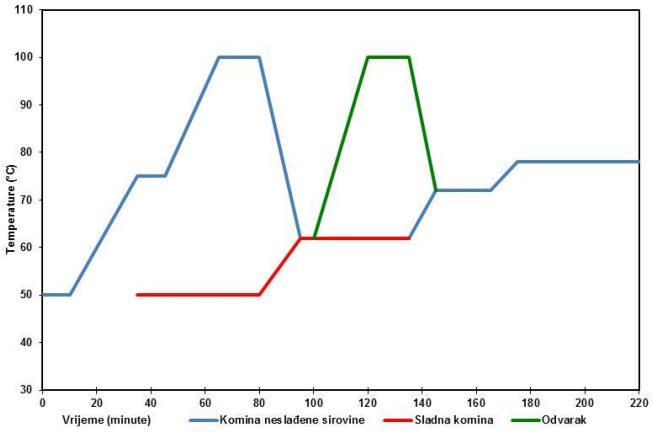
- drobljenje ili meljava slada i neslađenih žitarica,
- ukomljavanje sladne prekrupe i usitnjenih neslađenih žitarica,
- hidroliza (proteoliza i ošećerenje) usitnjenih sirovina i ekstrakcija proizvoda hidrolize,
- filtracija ili cijeđenje sladovine iz ošećerene komine,
- kuhanje i hmeljenje sladovine,
- bistrenje, hlađenje i aeriranje sladovine (Eßlinger, 2009.).

Ukomljavanje je postupak miješanja sladne prekrupe i usitnjenih neslađenih žitarica s toplom vodom i prevođenje netopljivih sastojaka slada i neslađenih žitarica u topljiv oblik enzimskom hidrolizom pomoću enzima sintetiziranih tijekom slađenja ječma. Aktivnost enzima ovisi o pH komine i temperaturi koja se korigira i kontrolira (Šakić i Blesić. 2011.). Početna temperatura ukomljavanja trebala bi biti bliska optimalnoj temperaturi za citolitičke i proteolitičke enzime ß-glukanaze i proteinaze, 45 – 50 °C, komina se zatim polagano zagrijava i zadržava na određenim temperaturama optimalnim za aktivnost proteolitičkih enzima, ß-amilaze i α-amilaze: na 45 – 55 °C, 62 – 65 °C, 70 – 75 °C, te se podiže na 78 °C čime je završeno ukomljavanja. Zatim se komina filtrira ili cijedi, filtrat predstavlja nehmeljenu sladovinu. Ukomljavanje se može izvoditi infuzijskim postupkom, dvojnim ukomljavanje i dekokcijskim (odvarnim ukomljavanjem), gdje dolazi do enzimske hidrolize (klajsterizacija, utečnjavanje i šećerenje) kojom nastaje sladovina, vodena otopina ekstraktivnih tvari. Ukomljavanje je vrlo

bitan postupak jer o razgrađenosti škroba, tj. o odnosu fermentabilnih šećera i dekstrina, ovisi prevrelost, trajnost i okus piva (Marić 2009.; Brigs 2004.).



Slika 1 Diagram ukomljavanja po infuzijskom postupku (ispitivano pivo)



Slika 2 Dekokcijsko ukomljavanje slada i neslađene žitarice s dvije komine i jednim odvarkom (ispitivano pivo)

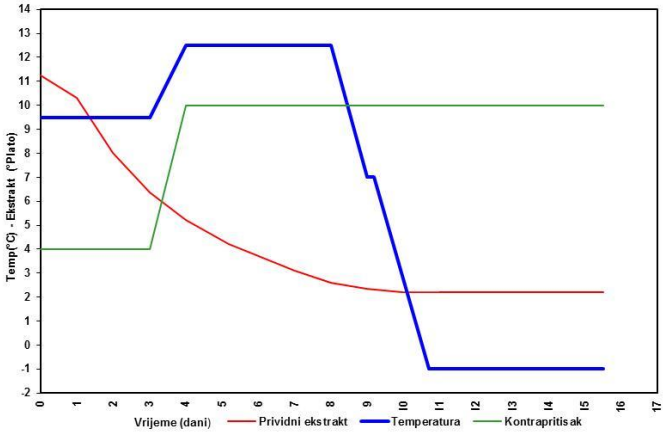
Škrob se sastoji od 98% kemijski čistoga škroba te ga čini od ukupnoga sadržaja škroba u ječmu 17 – 24% amiloze i 73 – 86% amilopektina (Schuster i sur., 1990.). Šećerenje je razgradnja otopljenoga škrobnog ljepila do gradbenih šećernih jedinica, a prethodi mu klajsterizacija, tj. zagrijavanje komine toplom vodom pri čemu škrobna zrnca bubre i pucaju, nastaje škrobno ljepilo zatim utočnjavanje tj. otapanje škrobnog ljepila u vodi i time je škrob dostupan za enzimsku razgradnju. Škrob se mora u potpunosti razgraditi do šećera i dekstrina koji ne daju bojenu reakciju s jodom, eventualno prisutni ostaci nerazgrađenoga škroba izazivaju pojavu tzv. klajsterizacijskog zamućenja piva (Kunze 1998.; Schuster i sur., 1988.). Temperatura klajsterizacije ovisi o veličini škrobnih zrnaca, pa tako za ječmeni škrob

iznosi 52 – 63 °C, kukuruzni 60 – 75 °C, rižin 65 – 80 °C i pšenični 52 – 54 °C (Leskošek-Čukalović, 2000.). Kako navodi Eßlinger i sur. (2012.) β-amilaza ima optimum pri 60 – 65 °C, optimalno pH područje djelovanja 5,4 – 5,6 (nastaje glukoza, maltoza maltotrioza), inaktivira se već na 70 °C, α-amilaza pri 70 – 75 °C, optimalno pH područje djelovanja 5,6 – 5,8 (nastaju dekstrini, oligosaharidi), brzo se inaktivira na 80° C, granična dekstrinaza 55 – 60 °C, pH (5,1) (nastaju dekstrini) i inaktivacija na 65 °C. Citolitički enzim endo-1-3-β-glukanaza optimalna temperatura 40 – 45 °C, pH (4,7 – 5,0) (nastaje niskomolekularni ß-glukan, celobioza), temperatura inaktivacije 55 °C. Proteini se enzimski razgrađuju proteolitičkim enzimima: endopeptidaza ima optimum na temperaturi 50 – 60 °C optimalno pH područje 5,0 – 5,2 (nastaju peptidi, aminokiseline), dipeptidaza temperatura 40 – 45 °C, pH područje djelovanja 7,2 – 8,2, inaktivacija na 55 °C, karboksipeptidaza 50 – 60 °C, pH (5,2) inaktivacija na 70 °C, aminopeptidaza 40 – 45 °C, pH (7,2), (nastaju aminokiseline), inaktivacija na 55 °C. Najveći dio ekstrakta nastaloga tijekom komljenja čine šećeri (maltoza 40 – 45%, maltotrioza 11 – 13%, glukoza 5 – 7%), kao i šećeri uneseni iz polaznoga ječma (saharoza, fruktoza). Udio fermentabilnih šećera u sladovini kreće se oko 72%, u normalnim uvjetima iznosi 64 – 67%. Ovo odgovara vrijednostima prividnoga graničnoga stupnja prevrelosti od 73 – 83% (Schuster i sur 1988.). Procentualni udio šećera koji kvasac može da prevrije u ukupnome ekstraktu sladovine predstavlja granični stupanj prevrelosti i od njega ovisi koliki će biti sadržaj alkohola u pivu i time ima odlučujući utjecaj na karakter piva (Kunze, 1998.). Pivska sladovina je vodeni ekstrakt ječmenog slada, neslađenih žitarica i hmelja. Sladovina se filtracijom odvaja od čvrste faze (tropa), odnosno cijedi iz ošećerene komine. Filtrirana sladovina se kuha s hmeljom u svrhu sterilizacije, kao i uparavanja do određene koncentracije, inaktivacije enzima i ekstrakcije gorkih i aromatičnih tvari hmelja. Proces obrade obuhvaća hlađenje vruće sladovine na temperaturu vrenja te izdvajanje toploga taloga (proteinske pahulje promjera 30 – 80 µm). Izbistrena i ohlađena sladovina se zatim aerira sterilnim zrakom (8 – 9 mg/L), „zasijava“ kvascem *Saccharomyces uvarum* (ili *Saccharomyces cerevisiae*, gornje vrenje) sa 6 – 10 x 10^6 aerobno umnoženih stanica /mL, (15 – 18 x 10^6 anaerobno umnoženih stanica /mL) time počinje alkoholno vrenje sladovine (Beluhan 2013.; Marić, 2009.).

Tablica 1 Sastav sladovine s 12% ekstrakta od ječmenoga slada za proizvodnju lager piva (Eβlinger, 2012.)

Sastav	Jedinica mjere	Vrijednost
heksoza	%	7 – 9
saharoza	%	3
maltoza	%	43 – 47
maltotrioza	%	11 – 13
niži dekstrinI	%	6 – 12
viši dekstrini	%	19 – 24
pentozani	%	3 – 4
gume	%	0,2
Spojevi s dušikom		
ukupni dušik	mg/L	950 – 1150
visoko molekularnI	mg/L	200 – 300
nisko molekularne	mg/L	550 – 700
slobodni amino dušik	mg/L	200 – 250
Gorke tvari	EBC	25 – 35
Polifenoli		
ukupni polifenoli	mg/L	180 – 250
antocijanidini	mg/L	70 – 110
Minerali (80% anorganski, 20% organski)	mg/L	15 – 20
Cink	mg/L	0,1 – 0,25
pH		5,0 – 5,7
Viskoznost (20 °C)	mPa Á s	1,7 – 2,0

Kvasac se skladišti prije uporabe na temperaturi od 0 – 4 °C, uz povremeno miješanje i aeraciju. Za tipična lager piva temperatura fermentacije kreće se između 6 i 14°C te je kontrolirana. Tradicionalan pristup preferira nižim, dok neki primjenjuju više temperature fermentacije. Tako da proces fermentacije traje 3 – 4 dana do gotovo dva tjedna (Bamforth, 2003.). Najčešće primjenjivan postupak je postupak hladnoga vrenje i toplog dozrijevanja koji se odvija na temperaturi od 8 – 9 °C dok se ne postigne prividan stupanj previranja od 50%, zatim se isključuje hlađenje i temperatura piva u vrenju dostigne 12 – 13 °C za nastavak vrenja i redukciju diacetila ispod praga osjetljivosti što traje oko 10 dana. Lodolo i sur. (2008) navode da su za fermentaciju lager piva najbolji izbor fermentori cilindrično-konusne izvedbe. Završetkom alkoholnoga vrenja i dozrijevanja, pivo se hladi na -1 °C, oko 7 dana (neki autori navode 2 do 3 dana) u cilju hladne stabilizacije. Po završetku hladne stabilizacije pivo se filtrira pri čemu se izdvaja preostali kvasac, proteini, hmeljne smole, korekcija CO_2, stabilizira i transportira u tlačne tankove (Bamforth 2006.; Marić 2009.). Kao takvo, pivo je spremno za proces punjenja i pakiranja.



Slika 3 Diagram hladnoga vrenja i toplog dozrijevanja (ispitivano pivo)

2.1.2.1 Nepoželjni mikroorganizmi u proizvodnji piva

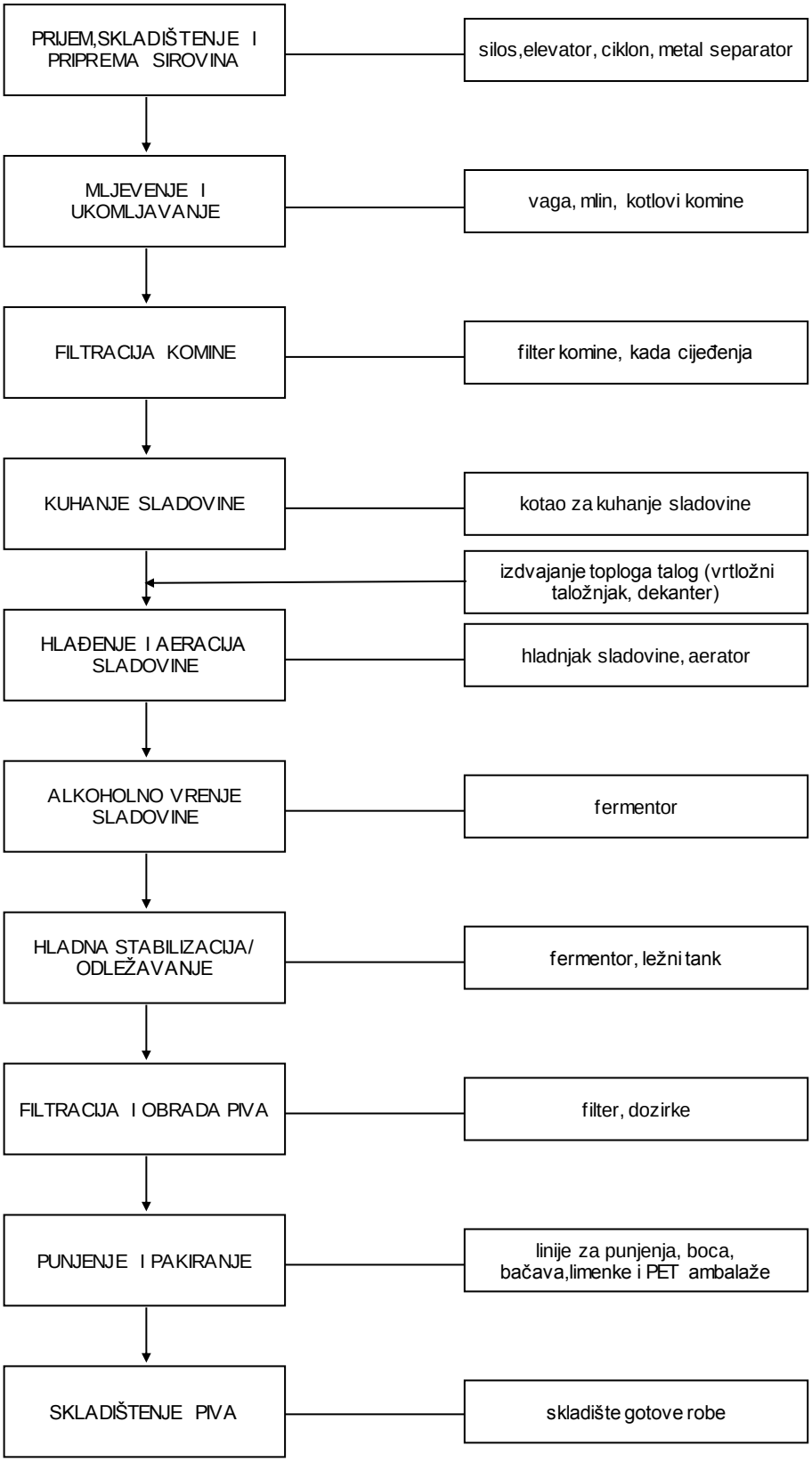
Posebnu pozornost treba usmjeriti prema mogućoj mikrobiološkoj kontaminaciji koja može potjecati iz različitih izvora u procesu proizvodnje piva. Sirovine, zrak, voda, aditivi, pa čak i uklanjanje kvasaca može djelovati kao stalni izvor kontaminacije. Ostaci kuhanja, tankovi, cjevovodi, ventili, izmjenjivača topline i oprema za pakiranje česti su izvori kontaminacije. Neki od učinaka onečišćenja kreću se od relativno male promjene u okusu piva i performansi fermentacije do gruboga narušavanja okusa, mirisa, bistrine, filtrabilnosti pa do povećanja proizvodnih troškova (Goldammer 2008.). Mikroorganizmi koji se susreću u pivovari mogu se podijeliti na one koje utječu na kvalitetu piva i na one koji nemaju potencijal kvarenja proizvoda. Međutim, to postaje sve više dvojbena kategorizacija i mnoge bakterije koje su klasificirani kao nekvarive uočeno je kako imaju nuspojave bilo kroz formiranje sumpornih arome ili preko promjene očekivanih performansi kvasca tijekom fermentacije. Tradicionalne metode detekcije specifične su i osjetljive, ali spore i dugotrajne i rezultati su općenito dostupni za tri do sedam dana. Zbog navedenog raste potreba za bržim otkrivanjem i detekcijom mikroorganizama u procesu i finalnome proizvodu. Najčešće usvojen test za praćenje higijenske efikasnost je praćenje ATP bioluminiscencije. Taj brzi test omogućuje da „na licu mjesta" imamo uvid u rezultate te se mogu prepoznati hrana i bakterijski ostaci u tekućinama za ispiranje i na površinama. Iako ne može zamijeniti tradicionalnu mikrobiologiju, to je brzi pokazatelj uspjeha režima čišćenja (Livens, 2008.). Nepoželjni mikroorganizmi osim što mogu prouzrokavati zamućenje piva, stvaranje taloga ili otežanu filtraciju, mogu i proizvesti svojim metaboličkim aktivnostima i spojeve koji narušavaju željeni okus i aromu piva. Stoga kontaminaciju i nusproizvode kontaminacije treba diferencirati od nusproizvoda alkoholnog vrenja, tj. nusproizvoda nastalih mikrobnom aktivnošću „kulturnih kvasaca".

Tablica 2 Kontaminanti u proizvodnji piva (Bokulicha i sur., 2015.; Storgard, 2000.; Beluhan, 2013.)

Proces	Kontaminanti	Proizvodi metabolizma	Učinak
Ukomljavanje	*Lactobacillus, Pseudomonas,*	Acetaldehid, etanol, mliječna kiselina	Promjene okusa, smanjenje pH
Hlađenje, taloženje i ohlađena sladovina	*Enterobacteriaceaie, Pediococcus sp, Gluconobacter sp., Obesum bacerium proteus, Saccharomyces*	Acetaldehid, fenolni spojevi, mliječna kiselina, octena kis., etanol, H_2S, amonijak, acetoin, 2,3-butandiol, diacetil, glicerol, octena kiselina, glukonska kiselina, DMS	Promjena arome i okusa, slatkast, miris na kuhani kupus, celer, fenolni miris, kiselost, zamućenost, miris po medu ili maslacu, smanjenje pH
Vrenje	*Acetobacter sp., Gluconobacter sp., Lactobacillus sp., Zymomonas anaerobia, Enterobacteriaceaie, Saccharomyces*	Acetaldehid, fenolni spojevi, octena kiselina, glukonska kiselina, CO_2, voda, mliječna kiselina, glicerol, diacetil, etanol, H_2S	Promjena PH, povećanje hlapljivih kiselina,kiselost, mutnoća miris po medu ili maslacu, pokvarenim jajima, po gnjilim jabukama
Odležavanje , punjenje i pakiranje, skladištenje piva	*Lactobacillus sp., Pediococcus, Pectinatus, Zymomonas anaerobia, Megasphaera, Acetobacter sp., Gluconobacter sp., Saccharomyces, Hansenula, Pichia*	Octena , glukonska, maslačnai valerijanska kiselina, CO_2, voda, mliječna kiselina, glicerol, diacetil, acetoin, etanol, acetaldehid, H_2S	Pojava, zamućenja, pojava taloga, promjena PH, povećanje hlapivih kiselina,kiselost, mutnoća miris po medu ili maslacu, pokvarenim jajima, po gnjilim jabukama

U skladu s navedenim, cijela infrastruktura pivovara mora ispunjavati određene zahtjeve kako bi se realizirao kvalitetan proces i proizvod. Cjevovodi, tankovi i spremnici pivovare trebaju biti sljedeće izvedbe i svojstava:

- ne dolaze do interakcije i reakcije s proizvodom,
- ne dolaze do opasnosti biološke prirode,
- osiguravaju potpunu hermetičnost,
- osiguravaju pravilan transport, čuvanje i manipulaciju u svim segmentima procesa,
- ne reagiraju sa sredstvima za pranje i sanitaciju,
- imaju postojanost: mehaničku, na vibracije, tlakove, temperature te na mikro i makroklimu pripadajuće lokacije (Petersen, 1996.).



Slika 4 Shema tehnološkoga procesa proizvodnje piva s pripadajućim strojevima i opremom

2.1.3. Alkoholno vrenje i nusproizvodi vrenja (sladovine) piva

Louis Pasteur (1822. – 1895.) prvi je upozorio da su procesi vrenja i truljenja povezani s rastom i razvojem mikroorganizama i ustvrdio „fermentacija je život bez kisika" (1861.). Alkoholno vrenje odvija se pri anaerobnoj razgradnji ugljikohidrata do piruvata, a u stanici kvasca provode se iste reakcije kao kod glikolize. Piruvat se djelovanjem piruvat-dekarboksilaze dekarboksilira u acetil aldehid, reakcijom koja odgovara u prvom stupnju oksidativnoj dekarboksilaciji. Alkohol-dehidrogenaza uz NADH reducira acetaldehid u etanol. Tom reakcijom ponovno se oksidira NADH u NAD^+. Energetska bilanca alkoholnoga vrenja vrlo je slična bilanci glikolize, pa se u ovome procesu dobivaju 2 mola ATP po molu glukoze (Karlson, 1989.). Formiranje etanola javlja se preko Embden-Meyerhofovog-Parnas puta, gdje teorijski 1 g glukoze daje 0,51 g etanola i 0,49 g CO_2. Međutim, budući da se jedan dio glukoze koristi se za rast stanica kvasca (proizvodnju biomase), realnije je da iz 1 g glukoze nastaje 0,46 g etanola i 0,44 g CO_2 (Stewart i Russell, 2009.).

Prema Bamfoth (2003.) i Lea i Piggott (2003.) jednadžba koja opisuje alkoholno vrenje piva bila bi:

maltoza + amino kiselina ⟶ kvasac + etanol + CO_2 + energija

100 g 0,5 g 5 g 48,8 g 46,8 g 50 kcal (209 kJ)

Glikolitički put pretvorbe glukoze u pirogrožđanu kiselinu i energiju te redukcija nikotinamid adenin dinukleotida (NADH - H^+) može se sumarno prikazati:

glukoza + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD + = 2 piruvat + 2 ATP + 2 NADH + $2H^+$

Toplina nastaje tijekom reakcije, ali dio energije oslobođene iz biokemijskih koraka pohranjen je u obliku adenozin trifosfata (ATP) za potrebe daljnjih biosintetski reakcija. Nastajanje alkohola iz piruvata može se prikazati:

$$CH_3COCOOH \xrightarrow{\text{piruvat dekarboksilaza}} CO_2 + CH_3CHO \xrightarrow[\text{alkohol dehidrogenaza}]{NADH\ ^+\ H^+} CH_3CH_2OH$$

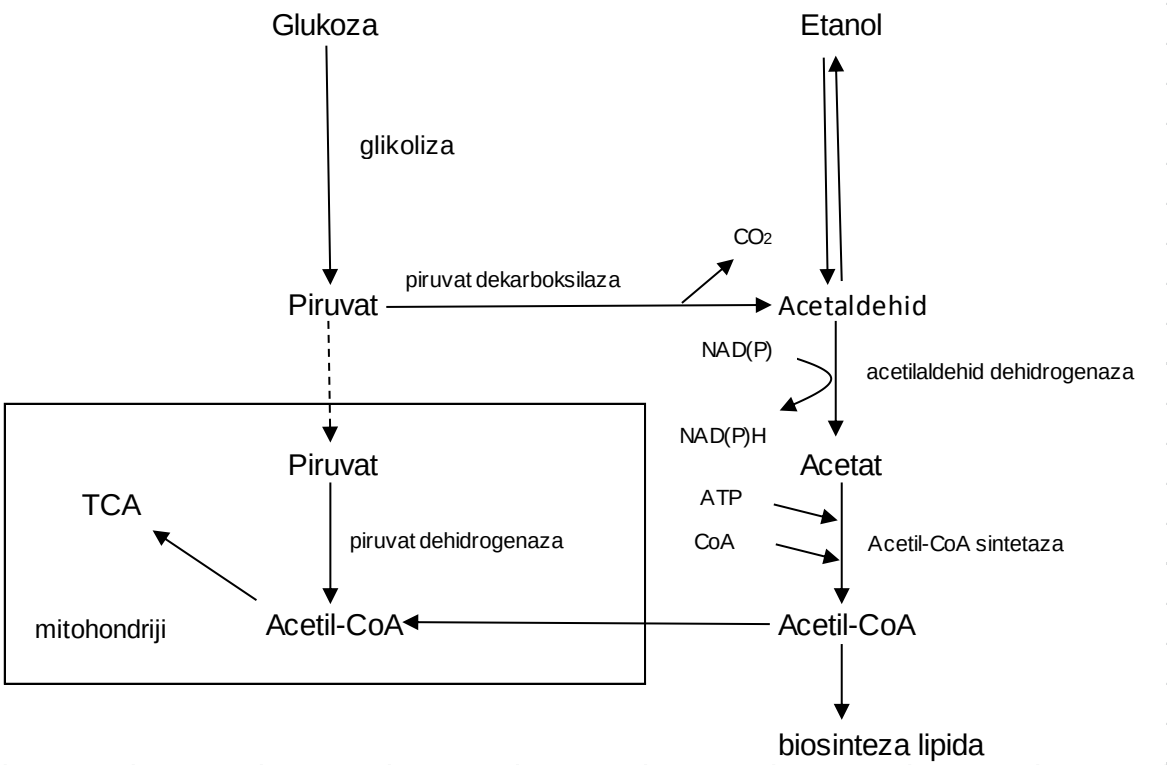
piruvat — uglj. dioksid, acetaldehid — etanol

Piruvat djeluje kao prethodnik mnogih drugih ključnih metabolita, kao što su esteri, karbonili i viših alkoholi (Stewart i Russell, 2009.). Kvasac može koristiti šećer na jedan od dva načina. Ako naiđe na visoku razinu šećera, kao što se nalaze u sladovini, kvasac će ga koristiti fermentativno tj. anaerobno. Konvertira šećere u etanol i ugljični dioksid, uz oslobađanje energije, kako slijedi:

$C_6H1_2O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ + energija (Gay-Lussac, 1815.).

Međutim, ako je sadržaj šećera nizak i ako je kisik dostupan, tada se šećer koristi u respiraciji, odnosno kvasac dobiva potrebnu energiju disanjem:

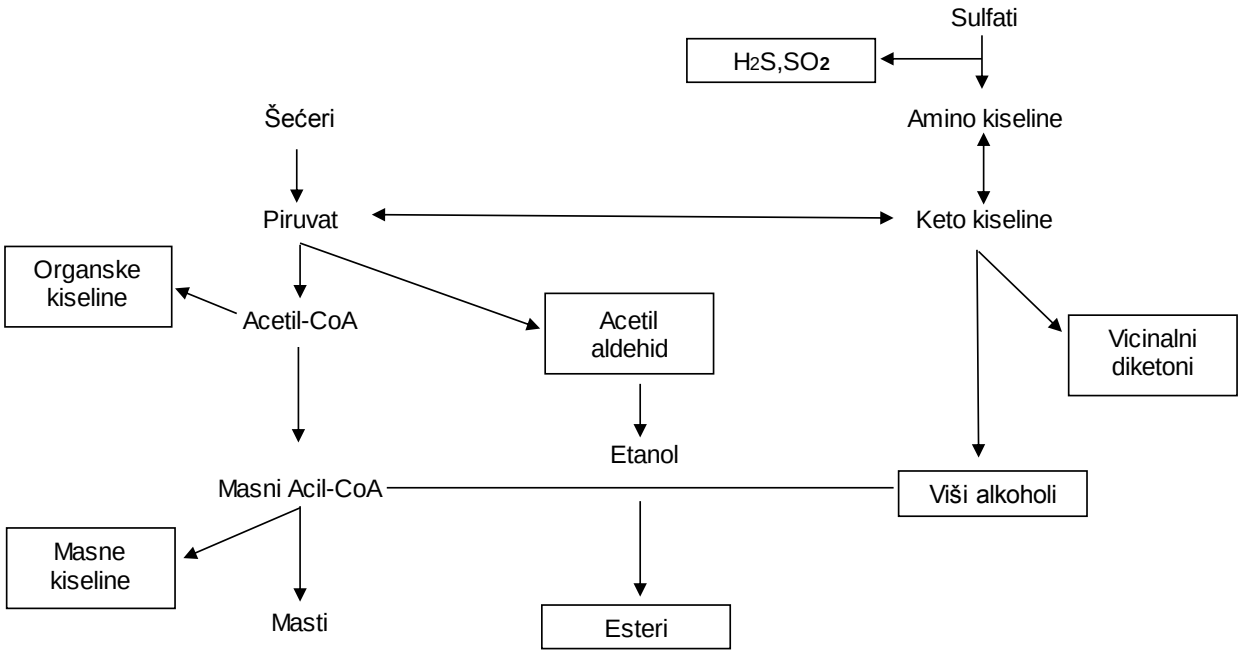
$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + energije (Bamforth, 2003.).



Slika 5 Aerobna i anaerobna razgradnja glukoze (Eßlinger, 2009.)

2.1.3.1 Nusproizvodi alkoholnog vrenja (sladovine) piva

Okus i miris piva vrlo je složen i u njega se ugrađuje veliki broja komponenti koje proizilaze iz brojnih izvora ne samo slada, hmelja i vode, značajni su i proizvodi sinteze kvasca. Najistaknutiji od tih nusproizvoda su, naravno, etanol i ugljični dioksid. Veliki broj drugih spojeva arome kao što su esteri, viših alkoholi i kiseline su proizvodi koji određuju okus, miris i druge karakteristike piva (Goldammer, 2008.). Jedinstven profil arome fermentiranih alkoholnih pića, odnosno piva, može se u najvećoj mjeri pripisati biokemijskim aktivnostima unutar stanica kvasca tijekom fermentacije (Nedović i sur., 2015.). Tijekom alkoholnoga vrenja sladovine nastaju nusproizvodi, koji u optimalnim koncentracijama doprinose punoći okusa, a ako je njihov udjel previsok mogu negativno utjecati na okus, miris i stabilnost pjene piva. Na brzinu biokemijskih promjena koje se odražavaju na brzinu vrenja i kvalitetu piva utječe niz čimbenika kao što su soj kvasca i njegove specifičnosti (sposobnost razmnožavanja, previranja sladovine, pahuljanja i taloženja otpornost na etanol i CO_2), fiziološko stanje kvasca, inokulum, raspodjela kvasca u sladovini, kisik u sladovini, sastav i pH sladovine, temperature vrenja, tlak u vrenju (Marić, 2009.).



Slika 6 Međuodnosi između kvaščevoga metabolizma i nusproizvoda vrenja o kojima ovisi miris i okus piva (Marić, 2009.)

Aldehidi:

Karbonilnih spojeva u pivu ima preko 200 i kao grupa spojeva najznačajniji su aldehidi i vicinalni diketoni. Nastaju metabolizmom kvasca tijekom vrenja, te općenito stvaraju negativan okusu i aromu piva. U skladu s time od velikoga je značaja voditi vrenje u cilju stvaranja prihvatljive koncentracije karbonilnih spojeva. Nekoliko aldehida nastaju tijekom proizvodnje sladovine, dok su drugi oblikovani kao intermedijeri u biosintezi viših alkohola s oksokiselinama kvasaca. Acetaldehid koji nastaje dekarboksilacijom pirogrožđane kiseline je od posebnog interesa zbog svoje uloge neposrednoga prekursora etanola. Acetaldehid se formira u ranoj fazi do sredine procesa vrenja. Glavni uzroci visokih koncentracija acetaldehida u pivu su, prekomjerna aeracija sladovine, visoke temperature fermentacije i prekomjerno doziranje kvasca (Brigs i sur., 2004.). Razni autori opisuju ga kao neugodan „travnat" okus i miris, arome zelene jabuke, pa do pljesnivoga ili „podrumskog" okusa mladoga piva.

Tablica 3 Najznačajni aldehidi u pivu (Bamforth, 2004.)

Aldehid	Opis arome	Koncentracia (mg/L)
Acetaldehid	Zelena jabuka	2,0 – 20
Butiraldehid	Dinja, lakova	0,03 – 0,2
3-Methilbutanal	Nezrele banane	0,01 – 0,3
Heksanal	Gorkast, vinski	0,003 – 0,07
Trans-2-nonenal	Papir, karton	0,00001 – 0,002

Vicinalni diketoni:

Diacetil (2,3 butandion) i pentandion (2,3 pentandion) zajedno čine vicinalne diketone odnosno njihovi su najznačajniji predstavnici i proizvodu su kvasca tijekom fermentacije te su najvažniji sastojci loše arome mladoga piva. U koncentraciji iznad granice osjetljivosti daju pivu nečist, slatkast i odbojan okus koji pri višim koncentracijama prelazi u miris po užeglom maslacu. Prag osjetljivosti diacetila je mnogo niži od 2,3 pentandiona, ali im je učinak isti. Stoga je koncentracija diacetila (vicinalnih diketona) kriterij za ocjenu dozrelosti piva (Marić, 2009.). Oba diketona nastaju iz intermedijera biosinteze aminokiselina, valina odnosno izoleucina. Prvi prekursor u ovome metabolizmu je za diacetil α-acetolaktat, a za 2,3 pentandion je α-aceto-hidroksibutirat koje kvaščeve stanice proizvode tijekom razgradnje šećera i izlučuju u okolinu te su podvrgnuti oksidacijskoj dekarboksilaciji od kojih nastaje diacetil i 2,3 pentadion. Kvaščeve stanice imaju sposobnost redukcije nastalih spojeva, ponovo ih asimiliraju i reduciraju u 2,3 butandiol i 2,3 pentandiol čiji je prag osjetljivost visok te imaju mali utjecaj na okus i aromu piva (Eßlinger, 2009.).

Tablica 4 Vicinalni diketoni u pivu i uobičajena koncentracija (Bamforth, 2004.)

Vicinalni diketoni	Opis arome	Koncentracija (mg/L)
DiacetIl	Maslac	0,01 – 0,4
2,3-pentanedion	Med	0,1 – 0,15
2,3-heksandion	Jagoda	< 0,01
Acetoin	Voćni, pljesniv, drveni	1,0 – 10

Viši alkoholi:

Viši alkoholi predstavljaju najveći dio hlapljivih komponenti u pivu. Preko 90% viših alkohola nastaje tijekom glavnoga vrenja. Najznačajniji su: *n*-propanol, izobutanol, izoamil alkohol, 2-metil butanol, feniletanol i tirozol. Kako navode Brigs i sur. (2004.) viši alkoholi postižu maksimalne koncentracije u fermentaciji u vrijeme kada je koncentracija slobodnoga amino dušik (FAN) minimalna. Formiranje viših alkohola povezano je s metabolizmom

aminokiselina kvasca. Dva su načina prisutna u nastajanju viših alkohola i to katabolički put (Ehrlich mehanizam), s izvornim aminokiselinam iz sladovine, te anabilitički gdje se formiraju viši alkoholi iz ketokiselina tijekom sinteze aminokiselina iz ugljikohidrata. Ketokiseline koje su nusproizvodi metabolizma ugljikohidrata dekarboksilizacijom prevode se u odgovarajući aldehid, a potom redukcijom u alkohol (Eßlinger, 2009.). Propanol se formira isključivo anaboličkim putem jer ne postoji odgovarajuća aminokiselina za njegovu sintezu. U uvjetima gdje sladovine ima visoki sadržaj aminokiselina preferira više katabolički put (Brigs i sur., 2004.).

Tablica 5 Prisustvo najznačajnijih alkohola u pivu (Bamforth, 2004.)

Alkohol	Opis arome	Koncentracia (mg/L)
Etanol	Alkoholna, jaka	< 5000 – 100 000
Propanol	Alkoholno	3,0 – 16
Glicerol	Slatkasta, viskozna	1300 – 2000
izoamil alkohol	Vinski, banana, slatko	30 – 70
2-feniletanol	Gorko, parfimirano	8,0 – 35
Fenol	Fenolna	0,0 – 10,05
TIrozol	Gorko	3,0 – 40

Esteri:

Esteri su najvažniji sastojci arome piva i čine najvažniju skupinu aroma aktivnih spojeva koje nastaju tijekom fermentacije te ih ima više od 100 u pivu. Općenito, esteri nastaju reakcijom alkohola i organskih kiseline (Eßlinger, 2009.). Najvažniji esteri su etil acetat, izomil acetat, izobutil acetat, etil kaprilat i etil kaproat. Rezultat su reakcije između alkohola, acil CoA i acetil CoA, posrednika u sintezi masti (Marić, 2009.).

Maksimalna koncentracija estera postiže se nakon prestanka sinteze viših alkohola. Najintenzivnija sinteza estera je sredinom vrenja što se poklapa s prestankom sinteze lipida tako da se acetil CoA može koristiti u sintezi estera. Prisustvo nezasićenih masnih kiselina (linoleinske kiseline) uzrokuje izrazito smanjenje nastajanja estera, što je posljedica inhibicije alkohol acil-transferaze od nezasićenih masnih kiselina. Tome u prilog je opažanje kako se povećanjem kisika u sladovini smanjuje sinteza estera jer kisik potiče sintezu nezasićenih masnih kiselina, što zauzvrat smanjuje aktivnost alkohol acil-transferaze (Brigs i sur., 2004.). Drugi glavni faktor koji utječu na sintezu ester je temperatura, porast temperature povećava sintezu estera (Eßlinger, 2009.).

Tablica 6 Prisustvo estera u pivu (Bamforth, 2004.)

Ester	Opis arome	Koncentracia (mg/L)
Etil acetat	Otapalo, voćni	8,0 – 42
Butil acetat	Banana, slatko	0,04 – 0,4
Izoamil acetat	Banana, jabuka	0,6 – 4
Etil butirate	Papaja	0,04 – 0,2
Izoamil propionat	Ananas	0,015
Feniletilacetat	Ruža, med	0,05 – 0,2
Etil kaproat	Kozji	0,01 – 1
Etil kaprilat	Jabuka	0,1 – 1,5

Spojevi sa sumporom:

Sumporni spojevi u pivu proizvedeni metabolizmom kvasca nastaju iz organskih spojeva koji sadrže sumpor a to su neke aminokiseline i vitamini. Alternativno mogu nastati usljied prisustva anorganskog sulfata u sladovini (Brigs i sur. 2004). Najznačajniji predstavnici ovih spojeva su H_2S, SO_2, merkaptani i DMS koji mladome pivu daju karakterističan i neugodan miris. Sumporov vodik ima miris na pokvarena jaja, a proizvodi ga stanica kvasca. H_2S je hlapiv pa se uspješno „ispire" s ugljičnim dioksidom koji nastaje tijekom vrenja. Merkaptani su tioalkoholi u kojima je –OH grupa zamijenjena sa –SH skupinom i imaju najnegativniji utjecaj na aromu piva. Prisustvom kisika se oksidiraju u manje po ukus opasne disulfide. DMS (dimetil sulfid) daje pivu miris po povrću, plijesni, kuhanom kukuruzu. Kako je DMS sastojak sladovine a koncentracija mu se ne mijenja tijekom vrenja, važno je da ga u sladovini bude prihvatljiva količina (Marić, 2009.). Kako navode Brigs i sur. (2004.), Schuster i sur. (1988.) za DMS se smatra da je bitna komponenta lager piva, određana koncentracija mu daje svojstvenost. DMS nastaje iz inaktivnoga prekursora S-metilmetiona (SMM) koji se stvara tijekom sladovanja. Količina prisutnoga DMS-a ovisi o sorti ječma, postupku sladovanja, temperature i trajanju dosušivanja slada. U izvjesnome smislu postoji pozitivna korelacija između razine sulfitnih spojeva i stabilnosti okusa piva.

Tablica 7 Sumporni spojevi u pivu (Bamforth, 2004.)

Sumporni spoj	Opis arome	Koncentracia (mg/L)
Sumporovodik	Pokvareno jaje	0,001 – 0,02
Etilmerkaptan	Truli poriluk, luk, češnjak, jaje	0,001 – 0,02
Dimetil sulfid	Kuhano povrće, kukuruz	0,01 – 0,2
Dietil disulfid	Češnjak, spaljena guma	0,001 – 0,01
Metionil acetat	Gljive	0,013 – 0,03
Metional	Krumpir pire	< 0,05

Organske i masne kiseline:

Više od 100 organskih i masnih kiselina identificirani su u pivu. Neke od njih potječu iz sladovine, mnoge su proizvedene kao rezultat metabolizma kvasca. Formiranje i izlučivanje organskih kiselina koje nastaju tijekom fermentacije doprinosi smanjenju pH. One daju pivu „kiseo" ili „slankast" okus. Organske kiseline su uglavnom izvedene iz nepotpunoga TCA *(Krebsovog*) ciklusa koji se javlja pri potisnutome anaerobnom metabolizmu kvasca. Osim toga, neke nastaju katabolitički iz aminokiselina**.** Kratke i srednjelančane masne kiseline imaju neugodne okuse te inhibiraju formiranje pjene piva. Iz navedenih razloga njihova prisutnost u pivu je nepoželjna. Kratkolančane masne kiseline ne izlučuje kvasac u kontroliranom procesu, nego nastaju kao posljedica propuštanja plazmatske membrane, odnosno reakcija na etanolni stres ili u ekstremnim slučajevima, zbog smrti stanica i autolize (Brigs i sur., 2004.).

Tablica 8 Neke od kiselina u pivu (Bamforth, 2004.)

Kiselina	Opis arome	Koncentracija (mg/L)
Octena	Ocat	30 – 200
Propionska	Mliječan	1,0 – 5
Maslačna	Mastan, sirast	0,5 – 1,5
Valerijanska	Znojav	0,03 – 0,1
Oksalna		2,0 – 20
Jantarna		16 – 140

2.1.4. Polifenoli piva

Pivo sadrži spojeve s antioksidativnim svojstvima kao što su reducirajući nefermentabilni šećeri, proizvodi Maillardovih reakcija, vitamini i fenolni spojevi (Siqueira i sur., 2011.; Ditrych i sur., 2015.). Sumpor dioksid nastao tijekom fermentacije je također važan antioksidans te gorke kiseline hmelja koje pokazuju, mada slabije, antioksidativni aktivnost (Mikyška i sur., 2011.). Sastav i količina antioksidativnih spojeva piva ne ovisi samo o kvaliteti sirovina, nego i vođenju tehnološkoga procesa (Jurkova i sur., 2012.).

Fenoli su aromatični spojevi kod kojih je jedan ili više vodikovih atoma benzena zamijenjen s -OH grupom. Sve -OH grupe vezane su direktno za aromatično jezgro. Prema broju -OH grupa dijele se na jednohidroksilne, dvohidriksilne i trohidroksilne fenole (Štajner i Kervešan, 2014.). Fenolna hidroksila skupina (-OH) vezana je na ugljikov atom koji je uključen u mezomerni aromatski sistem. Fenolat-ion ima na raspolaganju mnoge mezomerne oblike te su zbog toga fenoli slabe kiseline, fenol (monohidroksilni fenol) C_6H_5OH je najjednostavniji predstavnik ovih spojeva. Fenolna hidroksilna grupa može stvarati estere i time je slična

alkoholima (Karlson, 1989.). Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, promatrano s kemijskog stajališta, osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Berend i Grabarić, 2008.). Mogu se podijeliti na flavonoide (flavonoli, flavoni. antocijani…) i neflavonoide (fenolne kiseline, hidrolizati tanina, stibeni, kurkumin…), te na podgrupe, jer od preko 8000 poznatih fenolnih struktura 4000 pripadaju flavonoidima (Tazzini, 2014.; Gomez-Pinilla i Nguyen, 2012.; Bačić i Polović, 2013.). Neki autori prema kemijskoj strukturi prehrambene polifenole, odnosno fenolne spojeve klasificifiraju kao flavonoide, fenolne kiseline, tanine i stibene (Han i sur., 2007.; Rastija i sur., 2009.). U pivu je identificirano 47 fenolni spojeva uključujući jednostavne fenolne kiselina (Qufer-Rada i sur., 2015.). Fenoli piva izravno utječu na više karakteristika piva kao što je boja, okus, stabilnost pjene, bistrina (Collin i sur., 2013.). Polifenoli imaju antioksidativna svojstava koji, kada su prisutni u niskim koncentracijama u usporedbi sa spojevima koji mogu oksidirati supstrat, značajno umanjuju ili sprečavaju oksidaciju supstrata (Farcas i sur., 2013.). S pripadajućim svojstvima mogu zaštititi proizvoda od oksidativne degradacije tijekom procesa proizvodnje kao i konačan proizvod (Collin i sur. 2013.). Lako oksidiraju i tako „vežu“ kisik koji ima „kontaminirajući“ utjecaj na pivo. To povoljno utječe na stabilnost okusa i arome piva, usporava „starenje“ piva, antagonistički djeluje na razvoj aerobnih mikroorganizama, ali imaju nepovoljan utjecaj na koloidnu stabilnost piva (Leskošek-Čukalović, 2002.). Oko 70 – 80% polifenola piva potječu iz slada a 20 – 30% od hmelja (Jurkova i sur., 2012.; Mikyška i sur., 2011.; Arranz i sur. 2012.), no udjeli su im različitih skupina gotovo identični (Ondrojevič i sur., 2014.; Carvalho i sur., 2015.). Kako navodi Dvorakova i sur. (2008.), Carvalho i sur. (2015.), Gupta i sur. (2010.) fenolni spojevi u ječmu su fenolne kiseline (derivati benzojeve i cimetne kiseline), flavonoidi, proantocijanidini, tanini i amino fenolni spojevi. Većinu prisutnih polifenola hmelja čine visoko molekularni, a oko 20 % niskomolekularni spojevi (Magalhaesi i sur. 2010.). Polifenole hmelja čine monomerni fenoli, monomerni polifenoli i polimerni polifenoli. Prvi obuhvaćaju npr. galnu, *p*-hidroksibenzojevu, vanilinsku, *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu koje se nalaze bilo slobodne bilo kao glikozidi i koje se kao takve mogu hidrolizirati. Prisutna je protokatehinska kao i kava kiselina (Schuster i sur., 1988.). Polifenoli hmelja su, za razliku od polifenola slada, kondenzirani u većem stupnju i reaktivniji su (Kunze, 1998.). Antioksidativna odnosno antiradikalska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti sparivanja („hvatanja”) elektrona slobodnih reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala i aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza. Polifenoli imaju sposobnost kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina ($Fe^{2+,}$ $Cu^{2+,}$ Zn^{2+} i Mg^{2+}) te vezanja ugljikohidrata i proteina pomoću hidroksilnih skupina (Berend i Grabić 2008.; Kazazić, 2004.). Spektar antioksidanasa čine fenolne kiseline i složeniji flavonoidi (Jurkova i sur., 2012.). Flavonoidi kao što su flavan-3-oli i njihovi kondenzirani proizvodi, proantocijanidini, predstavljaju skupinu lako oksidirajućih spojeva te

mogu ograničiti ili spriječiti oksidaciju drugih molekula prisutnih u pivu. Do danas je identificirano preko 700 spojeva kao posljedica reakcija „starenja" piva, a koje ovise o vrsti i tipu piva, prisustvom kisika, pH vrijednosti i temperature piva, čine ih: proizvodi Maillardovih reakcija, formiranje linearnih aldehida i estera, degradacija estera, tvorbe acetala, eterifikacije, degradacije hmeljnih gorkih kiselina i prisutnost fenolnih spojeva. Kao posljedica oksidacijski promjena u pivu je i nastanak karbonilnih spojeva (npr. trans-2-nonenala, oksidacijom masnih kiselina). Općenito se karbonili koriste kao kemijski pokazatelji razvoja oksidativnih promjena piva (Aron i Shellhamme, 2010.; Weistock i sur., 2010.: Kunz i sur., 2014.). Tu su i moguće promjene vezane za bistinu, ponekad boju te gorčinu i trpkost piva (Pejin, 2009.). Neki od autora navode kako je usporavanje neželjenih procesa tijekom skladištenja piva uglavnom pod utjecajem sumpor dioksida, koji je nastao tijekom fermentacije te da je utjecaj polifenolnih spojeva koji potječu od sirovina znatno manji (Mikyška i sur., 2011.; Weistock i sur., 2010.). Udjeli polifenola u pivu različiti su ovisno o vrsti i tipu piva, a kako je utjecaj polifenila na pivo od velikoga značaja (okus, stabilnost, postojanost, trajnost), tako se i njegove ciljane koncentracije mijenjala u ovisnosti o potrebama i željama proizvođača i zahtjevima tržišta. Današnja svijetla lager piva prisutna na našem tržištu, uglavnom imaju sadržaj ukupnih polifenola (EBC) od okvirno od 90 – 180 mg/L (Marić, 2009.; Eβlinger, 2012.).

Tablica 9 Najznačajniji fenolni spojevi u pivu (Bamforth 2004.)

Fenolna grupa	Spoj	Koncentracia (mg/L)
Fenolni alkohol	Tirizol	3,0 – 40
Fenolne kiseline	Ferulinska, p-kumarinska, vanilinska, kavena i galna kiselina	10 – 30
Fenolni amini i amino kiseline	Hordenini, tiramin, tirozin	10 – 20
Flavan-3-oli	Katehin	0,5 – 13
	Epikatehin	1,0 – 10
Flavan-3,4-dioli	Leukocijanidin	4,0 – 80
Flavonoli	Kvercetin, miricetin, rutin	< 10
Kondenzirani polifenoli	Dimerni katehini	5,0 – 8,0
	Polimerni katehini	< 1,0
	Proanticijanidini	20 – 60
	Prodelfinidini	3,0 – 10

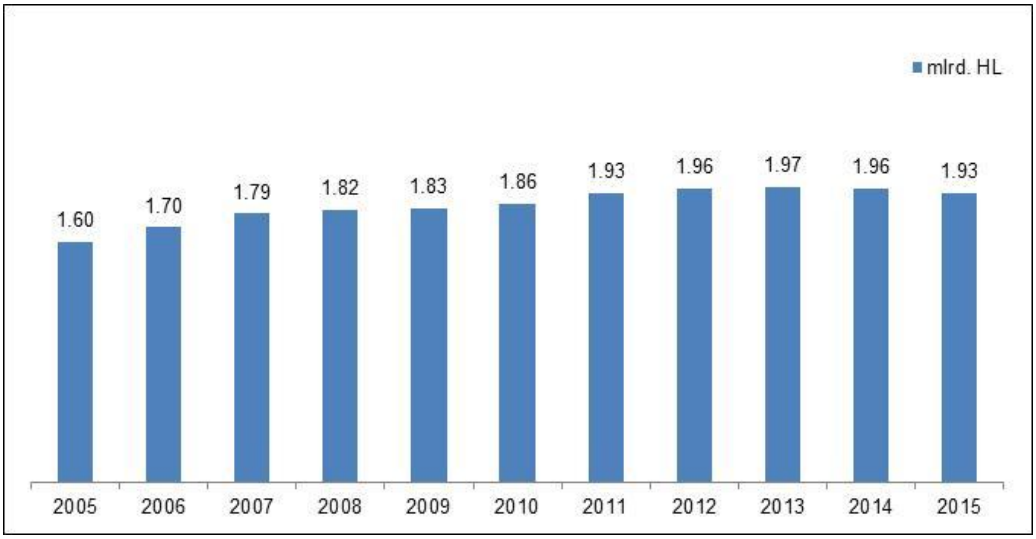
Tablica 10 Sastav svijetloga piva proizvedenoga od sladne sladovine s 12% ekstrakta (Eßlinger i sur., 2012.)

Parametar	Jedinica mjere	Vrijednost
Ekstrakt osnovne sladovine	tež. %	12,0
Ekstrakt osnovne sladovine	g/L	125,6
Granična prevrelost	%	78 – 85
Stvarni stupanj prevrelosti	%	63 – 68
Prividni ekstrakt	tež. %	1,7 – 3,0
Stvarni ekstrakt	tež. %	2,0 – 3,5
Alkohol	mas. %	3,5 – 4,5
Viši alkoholi	mg/L	60 – 120
Octena kiselina	mg/L	120 – 200
Mravlja kiselina	mg/L	20
Esteri	mg/L	20 – 50
Aldehidi	mg/L	5 – 10
Diacetali	mg/L	<0,1
Acetoin	mg/L	<3,0
Ukupni dušik	mg/L	700 – 900
Koagulirani dušik	mg/L	15 – 22
Visoko molekularni dušik	mg/L	150 – 250
Nisko molekularni dušik	mg/L	300 – 600
Slobodni amino dušik	mg/L	80 – 160
Gorke tvari	EBC	16 – 25
UkupnI polifenoli	mg/L	130 – 180
Antocijanidini	mg/L	40 – 80
pH		4,3 – 4,6
Viskoznost (20 °C)	mPa A s	1,4 –1,7

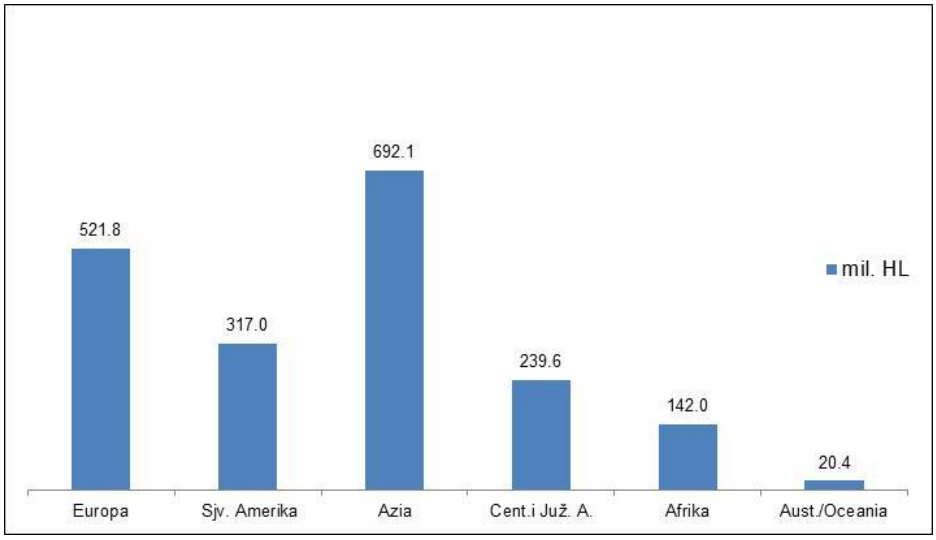
2.1.5. Proizvodnja i potrošnja (konzumacija) piva

Pivo je najpopularnije alkoholno piće u svijetu, a treće nakon vode i čaja. Istraživanja pokazuju kako su ljudi proizvodili ovaj napitak već nekoliko tisuća godina prije naše ere. Nedavne studije tvrde da su proizvodnja i potrošnja piva bili glavni čimbenik u razvoju civiliziranog društva, tvrdeći da je važnu i duhovnu ulogu imalo pivo u tradicionalnim obredima i svečanostima. Pridonijelo je razvoju tradicije, a time i društva u cjelini. U posljednja dva desetljeća pivo je postalo globalan proizvod, kao i neke druge poznate robne marke koje potječu iz jedne zemlje, a mogu se proizvoditi i konzumirati u cijelom svijetu. Tempo globalizacije za pivo uvelike je ubrzan zajedno s povećanom aktivnošću multinacionalnih pivarskih kompanija u smislu stjecanja postojećih pivovara, izgradnjom novih objekata na tržištima u razvoju kao i licenciranju proizvodnje svojih brendova izvan matičnih zemlja. U skladu s promjenama načina života i životnih stilova u zemljama u

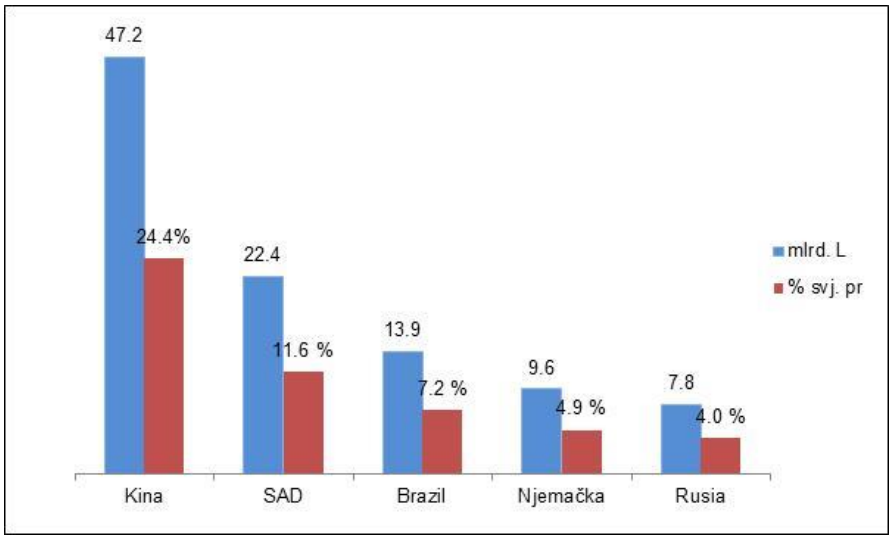
razvoju, potražnja za takvim proizvodima je u porastu. Vodeće zemlje u proizvodnji piva su Kina, SAD i Brazil (Statista, 2016.). Svjetska potrošnja piva dosegla je najvišu razinu u 2014. godini te potvrdila kontinuirani rast od 29 godina. Za zemlje Afrike te Srednje i Južne Amerike visoka potrošnja djelovala je kao razvojna pokretačka snaga. Po državama, Kina je vodeći potrošač već 12 godinu za redom. Prema potrošnji po stanovniku Češka ostaje na svjetskome vrhu već 22. godinu zaredom (Kirin Beer University Report, 2015.).



Slika 7 Proizvodnja piva u svijetu (Statista, 2016.)

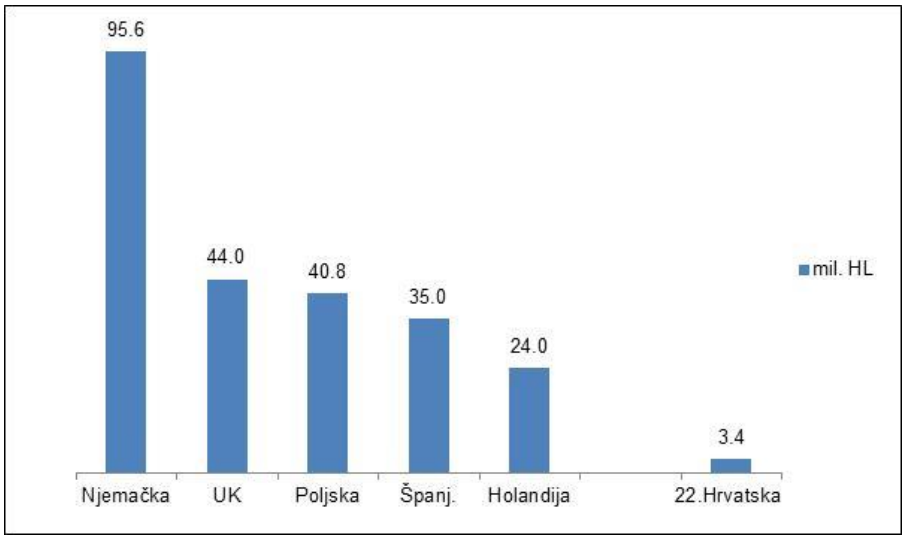


Slika 8 Proizvodnja piva u regijama (Barth Haas Group, 2016.)

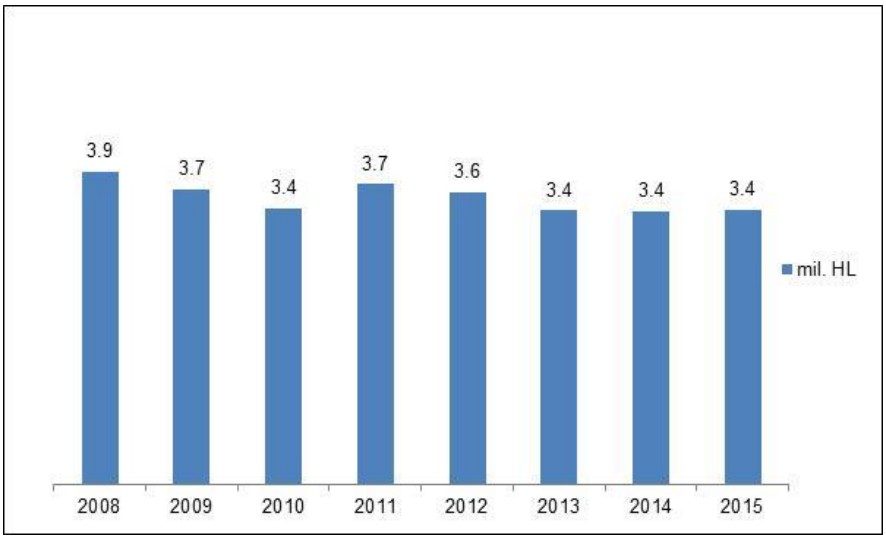


Slika 9 Proizvodnja piva po državama s udjelima u ukupnoj svjetskoj proizvodnji (Barth Haas Group, 2016.)

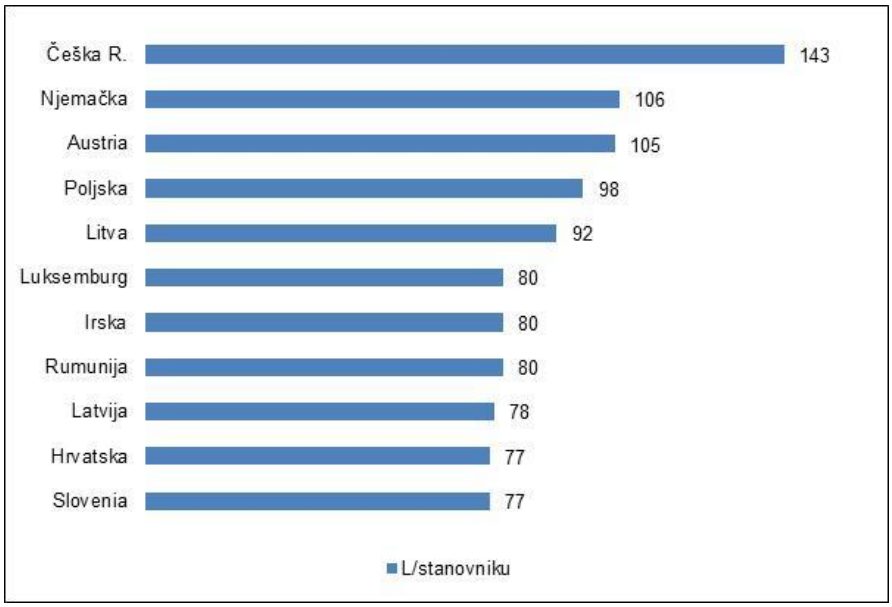
Statistika pokazuje kako je europski pivovarski sektor čvrsto na putu oporavka nakon ekonomske krize 2008./2009. i impresivan je broj novih pivovara koje se otvaraju širom Europe. Europska unija danas broji oko 7500 aktivnih pivovare, gotovo dvostruko više nego 2010. godine. Pivovarski sektor ostaje ključni čimbenik za stvaranje novih radnih mjesta i gospodarstva u cijeloj Europi. Interes koji mnogi potrošači imaju za različitosti i raznolikosti europskih piva također vjerojatno nikada nije bio veći. U 2015. godini potrošnja piva u Europskoj uniji bila je veća od 36 milijardi litara, te se ostvarilo više od 40 milijardi eura poreznih prihoda. Time pivovarski sektor bitno utječe na rast europskoga gospodarstva uz aktivno promicanje odgovornoga konzumiranja piva (Walle 2015.; Walle 2016.).



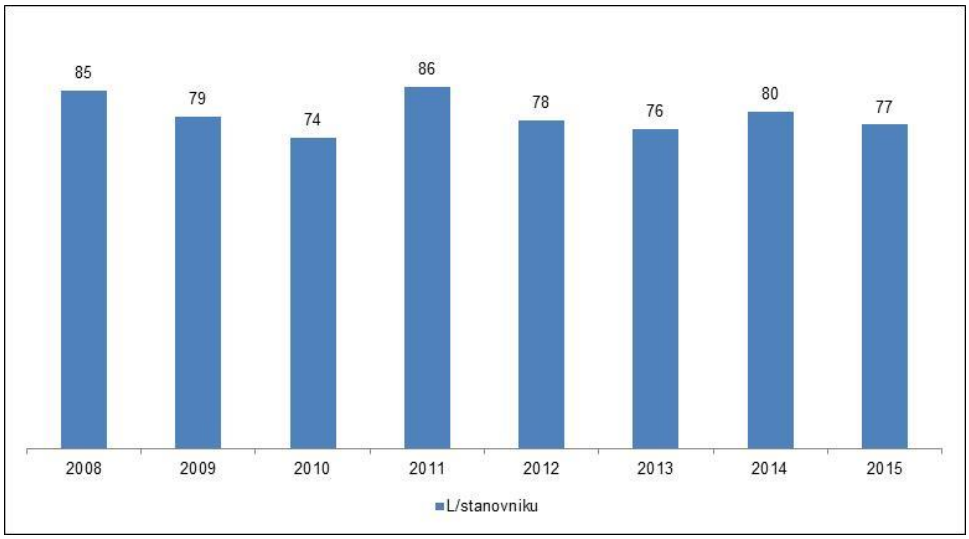
Slika 10 Proizvodnja piva u Europi (Walle, 2016.)



Slika 11 Proizvodnja piva u Hrvatskoj (Walle, 2016.)



Slika 12 Potrošnja piva u Europi (Walle, 2016.)



Slika 13 Potrošnja piva u Hrvatskoj (Walle, 2016.)

2.2. AMBALAŽA I AMBALAŽIRANJE PIVA

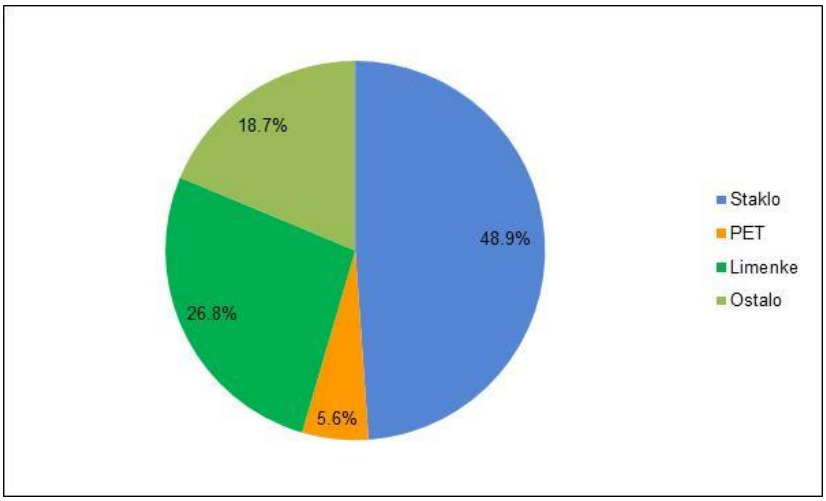
Prva pivska ambalaža bila je jednostavna i uključivala je korištenje osušenih tikvi i bundeva, glinene posude, mješine (izvana prevučene smolom), drvene bačve (osmoljene iznutra). Do početka 16. stoljeća pivo se uglavnom prodavalo u bačvama u kojima se provodilo i sekundarno vrenje da bi bilo „resko", tj. sadržavalo potreban udjel ugljičnog dioksida.Takvo je pivo bilo podložno mikrobnom kvarenju. Iako se do pojave L. Pasteura, krajem 18. stoljeća, malo znalo o mikroorganizmima, pivari su se protiv kiselog piva borili pomoću vapna ili lužine koju su koristili za uklanjanje kiselina i uzročnika kvarenja iz bačava prije ponovnog punjenja. (Marić, 2009). Do početka 20. stoljeća 75% piva se prodavalo u drvenim bačvama kada su pivari počeli koristiti ugljični dioksid pod pritiskom te od četrdesetih godina bačve od čelika, aluminija i nehrđajućeg čelika (Beverage Journal, 2015.; Priest i Stewart, 2006.). Krajem sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća u Engleskoj su se pojavile suvremene metalna bačva za pivo, tzv. *keg*. Iako pivarska literatura spominje masovnu primjenu pivskih boca tek u 20. stoljeću, one su se počele koristiti 400 godina ranije (Beverage Journal, 2015.; Marić 2009.). Prva zabilježena uporaba staklene boce s plutenim zatvaračem bila je 1602. godine kada je Alexander Nowell otkrio da se ovako upakirano pivo može pohraniti na duže vrijeme (Priest i Stewart, 2006.). Razvoju staklene ambalaže pridonio je i Henry Barrett koji je 1870. izumio zatvarač s navojem (Beverage Journal, 2015.). Američka tvrtka Can Co. počela je eksperimentirati s limenkama piva 1931. godine. Prvo komercijalno pakirano pivo u limenci prodano je u Richmondu, Virginia 1935. godine od strane Krueger Brewing Co. Newark, New Jersey, a Velška pivovara Felinfoel prva je pivovara izvan SAD-a koja je na tržište plasirala svoje pivo u limenkama 1936. godine (Priest i Stewart, 2006.; Beverage Journal, 2015.; Ball

Co., 2016.). Pronalazak PET-a patentirali su 1941. John Rex Whinfield i James Tennant Dickson. PET je ušao u komercijalnu uporabu 1953. kao tekstilno vlakno. Najvažniji prodor u modernoj preradbi plastičnih materijala dogodio se sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća primjenom PET-a za proizvodnju boca za gazirana pića, a najnovije tržite mu je i ambalaža za pivo (Rujnić-Sokele, 2003.). Dakle, kao pivska ambalaža PET boce se na tržištu pojavljuju oko 2000. godine, mada je i ranije bio predmetom istraživanja kao mogući pivski ambalažni material.

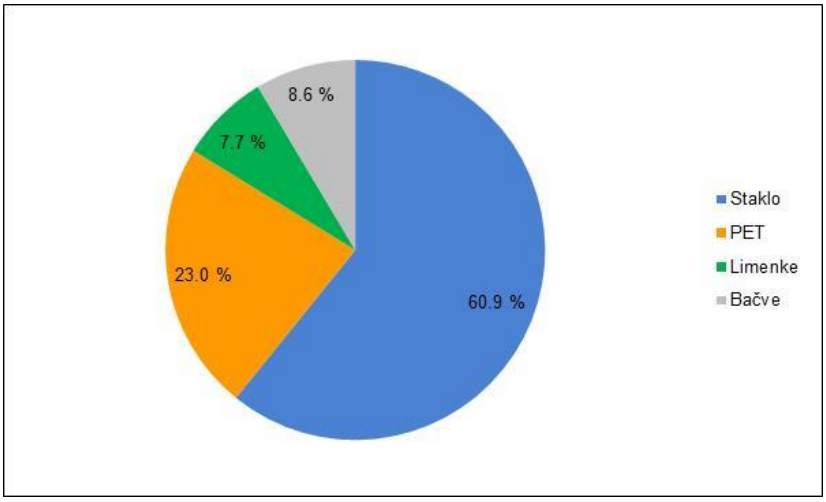
Ambalaža je svaki proizvod, bez obzira na prirodu materijala od kojeg je izrađen, koji se koristi za držanje, zaštitu, rukovanje, isporuku i predstavljanje robe, od sirovina do gotovih proizvoda, od proizvođača do potrošača. Ambalaža predstavlja i nepovratne predmete namijenjene za izradu ambalaže koja će se koristiti za spomenute namjene kao i pomoćna sredstva za pakiranje, koja služe za omatanje ili povezivanje robe, pakiranje, nepropusno zatvaranje, pripremu za otpremu i označavanje robe (NN, 2015.). Ambalaža je uvjet opstojnosti proizvoda u sustavu suvremene potrošnje (Jurečić, 2004.). Ambalaža prati robu od proizvodnje, tijekom transporta, skladištenja, prodaje do uporabe te informira potrošača o sadržanome proizvodu (Rujnić-Sokele, 2007.; Stipanelov-Vrandečić, 2013.). Ona mora dodatno udovoljavati strogim i specifičnim zahtjevima jer mora kroz dulje vrijeme osigurati izvornu kakvoću svježe ili netom proizvedene hrane, pritom mora biti visoke zdravstvene ispravnosti kako ne bi došlo do kontaminacije hrane, a time i do opasnosti za zdravlje potrošača. Zbog toga je odabir adekvatnog ambalažnog materijala za određenu vrstu hrane prvorazredan problem prehrambene industrije (Galić i sur., 2000.). Posebni dijelovi ambalaže čine dijelovi za zatvaranje i dijelovi za unutarnju zaštitu (Stipanelov-Vrandečić, 2013.). Odabir ambalažnog materijala zasniva se i na ekonomskoj osnovi uzimajući u obzir utrošak energije u proizvodnji određenog materijala kao i njegovoj dostupnosti. Proizvodnja plastičnih materijala s obzirom na izvornu sirovinu najpodložnija je ekonomskim promjenama. S porastom urbanizacije povećava se i problem volumena odbačene ambalaže kao i ukupno povećanje otpada, a pri čemu recikliranje zauzima sve značajnije mjesto. Recikliranje se odvija u tri glavna smjera:

- izvorno recikliranje gdje se otpadni materijal upotrebljava kao sirovina za ponovnu proizvodnju istog ili sličnog proizvoda
- posredno recikliranje za proizvodnju novih proizvoda iz različitih odbačenih sirovina
- recikliranje energije, odnosno koristi se energija sadržana u odbačenom materijalu u procesu izgaranja pri čemu se oslobađaju plinovi visoke energetske vrijednosti (Galić i sur., 2000.).

Ekološki opravdana ambalaža je ona ambalaža koja je izrađena od materijala pri čijoj proizvodnji, primjeni i recikliranju imamo manji utrošak energije i manje zagađenje životne sredine nego kod drugih materijala koji imaju istu namjenu (Duraković, 2003.). Izbor ambalaže, osim marketinškog i prodajnog aspekta, treba zadovoljiti svojstvima materijala za pakiranje, u kombinaciji s proizvodom, konkretno piva (Eßlinger, 2009.). Pakiranje odnosno ambalažiranje jedan je sustav čiji je cilj zaštititi sadržani proizvod od uvijek „neprijateljskog" okruženja: vode, vodene pare, zraka i kisika, mikroorganizama (Brody, 2000.). Pakiranje piva doživjelo je mnoge promjene kao rezultat je povećanoga marketinga te entuzijazma za uvođenje novih proizvoda. Kao primjer tvrdnja je jedne marketinške tvrtke da ambalaža postaje emocionalno sučeljavanje potrošača s proizvodom i njegovim vrijednostima (Bamforth, 2006.). Razvoj pivske ambalaže pokazuje da se ona mijenjala kako bi zadovoljila suvremene zahtjeve kao što su praktičnost, privlačnost, inertnost prema sastojcima piva, niska cijena, čvrstoća, mogućnost laganog strojnog pranja i zadržavanja aseptičnosti, pogodnost za brzo strojno punjenje i zatvaranje, otpornost na unutarnji tlak (44 – 58 kg/cm^2), nepropusnost za plinove (ulaz O_2 i gubitak CO_2) i UV zrake, toplinska vodljivost, dugotrajna trajnost izvornih svojstava (okus, miris, boja, bistrina, reskost), ekološka prihvatljivost (višekratno upotrebljiva ili pogodna za recikliranje) (Nemet, 1991.). Neke od nedostataka najzastupljenije staklene ambalaže, kao što su težina i lomljivost, pokušava ispraviti nova ambalaža (PET i aluminijske boce), koja na žalost ima i izvjesne nedostatke, poput cijene, ograničene trajnosti piva, itd. Težina staklene ambalaže 0,50 L korištene u istraživanju je oko 320 g, dok je težina korištene PET ambalaže volumena 1 L, 39,5 g. Raznolika pivska ambalaža pruža neke prednosti kao što su šira mogućnost prodaje piva, transport različitih volumena piva do svih mjesta potrošnje, duže čuvanje piva do trenutka potrošnje, uživanje u pivu na različitim mjestima i u različitim prilikama (Marić, 2009.). Za punjenje piva u svijetu u uporabi su četiri glavne kategorije ambalaže: staklene boce, limenke od aluminija ili bijeloga lima, plastične boce izrađene od poli(etilen-tereftalata), PET i poli(etilen-naftalata) PEN, te bačve izrađene od aluminijskoga materijala, inox materijala (Cr/Ni čelika) ili plastičnih materijala obloženim nehrđajućim čelikom (Eßlinger, 2009.; Marić, 2009.; Eßlinger i sur., 2012.; Walle, 2015.; Brigs, 2004.; Priest i Stewart, 2006.). Prema trajnosti, korištena ambalaža može biti povratna i nepovratna (Galić i sur., 2000.).



Slika 14 Prosječno učešće pivske ambalaže na tržištu Europe (Walle, 2015.)



Slika 15 Prosječno učešće pivske ambalaže na tržištu Hrvatske (HGK, 2014.; Walle, 2015.)

2.2.1. Punjenje i pakiranje (ambalažiranje) piva

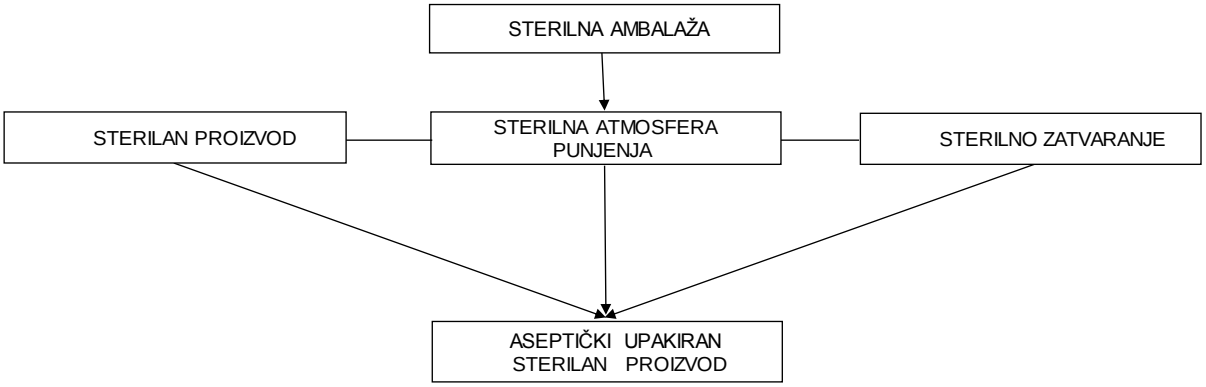
Nakon filtracije piva sve operacije proizvodnje moraju biti usmjereni ka održavanje kvalitete proizvoda. Pogreške koje se naprave u toj fazi procesa vrlo je teško ispraviti i posljedice su najčešće vidljive kasnije na tržištu (Eblinger, 2012.). Zadatak odjeljenja tlačnih tankova je da bude pufer između odjeljenja za filtraciju i postrojenja za punjenje piva. To su u ustvari kompenzacijski tankovi kako bi se mogli prevladati zastoji u radu linije za punjenje ili nagle promjena tlakova u filteru, te da se prihvate potrebne rezerve filtriranog piva. Filtracija i punjenje piva ne idu uvijek sinkronizirano i zahvaljujući tlačnim tankovima odjeljenja filtracije i punjenja mogu raditi neovisno jedan o drugome. Njihovi kapaciteti kreću se od jednodnevne

do trodnevne potrebe za punjenjem. Tlačni tankovi stavljaju pod tlak ugljičnoga dioksida ili dušika. Za izradu tlačnih tankova koriste se nehrđajući, krom-nikal čelik (čelik: sadržaj ugljika manji od 1,2%, nehrđajući čelik: sadržaj kroma najmanje 12% težinskih), dok se aluminij i bakar kao tradicionalni materijali izbacuju iz pivovara, pogotovo gdje imaju kontakt s proizvodom (Petersen, 1996.). Kako navodi (Vujković i sur., 2007.) čelik je legura željeza i ugljika sa sadržajem ugljika ispod 1,7%. Nehrđajući čelici su legirani s nekim metalnim elementom u cilju poboljšanja fizičkih i kemijskih svojstva. Dijele se uglavnom na kromirane i krom-nikal čelike (uobičajeni naziv za nehrđajuće čelike je inoks, prokrom, *rostfrei* i *stainlesssteel*). Punjenje i pakiranje piva od temeljne je važnosti u opskrbi tržišta poizvodom i ključno je u osiguravanju zadovoljstva kupca u pogledu kvalitete, količine i zakonske regulative u vezi proizvoda. Proces i strojevi za punjenje i pakiranje piva vremenom su postali složeniji i razvijali su se u smjeru smanjenja troškova rada, procesa i u očuvanju i unapređenju kvalitete proizvoda. Učinkovitost i djelovanja strojeva za punjenje i pakiranje od ključne je važnosti za profitabilnost pivovare. Zadnje desetljeće razvoj strojeva i opreme u punionicama vodio je posebno računa o aspektima zaštite i sigurnosti pri radu i rukovanju, te o štetnim emisijama po okoliš (Brigs i sur., 2004.). Uspješno punjenje treba zadovoljiti sljedeće pretpostavke:

- spriječiti dodir piva s kisikom zbog nepoželjne oksidacije njegovih sastojaka,
- spriječiti pad tlaka piva, zbog sprječavanja gubitka CO_2 iz proizvoda,
- temperature piva, niža je povoljnija,
- sprječavanje sekundarnoga mikrobiološkoga zagađenja,
- rad s minimalnim brojem zaustavljanja, da su gubici <1,5% od ukupnih,
- učinkovitost sa stanovišta efikasnosti i produktivnosti (Eßlinger, 2009.; Brigs i sur., 2004.).

Proces punjenja treba što više približiti aseptičnim uvjetima kao što prikazuje **Slika 16**. Komercijalni rok valjanosti proizvoda, „najbolje upotrijebiti do“ obvezna je deklaracija na etiketi odnosno ambalaži. Za boce i limenke kreće se od 3 do 18 mjeseci. Bačve s preporučenim rokovima najčešće prate staklenu ambalažu, dok za pivo u PET ambalaži je do 6 mjeseci, pod uvjetom da se koriste kvalitetne boce i čepovi, nepropusnost za ulaz kisika, izlaz CO_2 te otpornost na UV-zračenje. Razlog ovako širokom rasponu trajnosti je u „pomalo” šaljivoj konstataciji: „Suvremenom je pivaru potrebno 20 dana da proizvede kvalitetno pivo koje se može upropastiti za 20 minuta tijekom punjenja u ambalažu”. Najkvalitetnije pivo se može popiti u pivovari, ali ta je mogućnost brojnim potrošačima piva nedostupna. Dakle, ambalažiranje ili pakiranje piva je nužno zlo jer se bez ambalaže pivo ne

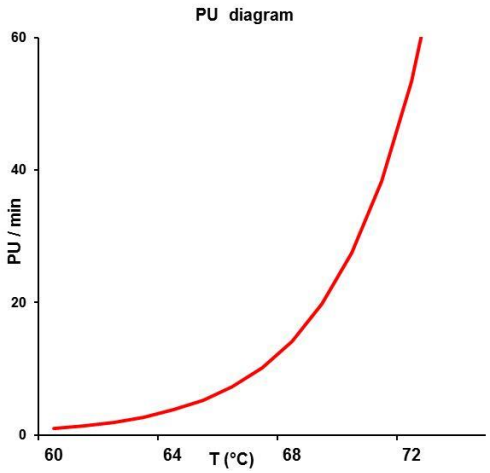
bi moglo transportirati od pivovara do pivnica, restorana, trgovina i domova brojnih potrošača. Problem ambalažiranja piva traje odavno, tj. od trenutka kada je ono postalo trgovačka roba, dakle otkako se počelo konzumirati izvan ili daleko od mjesta proizvodnje. Danas, kada pivo putuje i tisuće kilometara od pivovare do mjesta potrošnje, taj je problem jednako aktualan jer su se pojavili i novi ambalažni materijali (Beluhan, 2013.; Marić, 2009.).U biti svaka pivovara propisuje svoje rokove komercijalne valjanosti svojih proizvoda u skladu s primijenjenom tehnologijom, instaliranom opremom, ambalažom te zahtjevima tržišta koji su često različiti s obzirom na različitost pakovina.



Slika 16 Shema aseptičko pakiranje (Lazić i sur., 1988.)

Pasterizacija piva:

Pasterizacija podrazumijeva uništenje mikroorganizama u vodenim otopinama putem zagrijavanja. Pojam potječe od Louisa Pastera, koji je utvrdio kako tečnost nakon snažnoga zagrijavanja postaje biološki stabilna, pri čemu kisela tečnost postaje sterilna na nižim temperaturama nego tečnosti koje su neutralne ili alkalne. Daljnjim istraživanjima utvrđeno je da se vrijeme potrebno za uništavanje mikroorganizama eksponencijalno skraćuje s linearnim povišenjem temperature. To zapažanje dovelo je do razvoja postupka brze pasterizacije na visokoj temperaturi i pojma pasterizacijske jedinice (PU) koja podrazumijeva vrijeme u minutama na određenoj temperature koja je neophodna da se ostvari isti učinak uništavanja mikroorganizama koji se ostvaruje za 1 minutu na 60 °C. Primjena viših temperatura nije poželjna jer pivo dobiva „pasterizacijski priukus“. Broj pasterizacijskih jedinica se izračunava kao: $PU = t \cdot 1{,}393^{(T-60)}$, gdje je PU (letalni učinak u pasterizacijskim jedinicama), t (vrijeme zadržavanja u minutama), T (temperatura pasterizacije u °C). (Kunze, 1998.; Eblinger, 2009.; Priest i Stewart, 2006.). Uobičajene vrijednosti pasterizacije piva kreću se 10 – 30 PU (Priest i Stewart, 2006.).



Slika 17 Odnos između temperature pasterizacije i broja pasterizacijskih jedinica u jednoj minuti (Big Energy Project Innovation,2002.)

Iako je pivo relativno otporno na kontaminante to ne znači da u potpunosti inhibira rast mikroorganizama. Pivo se tretira kako bi se uklonili preostali kvasci, divlji kvasci i bakterije prije ili tijekom pakiranja. To se postiže pasterizacijom ili filtracijom. Pasterizacija može biti: protočna (engl. *flash*) za pivo prije punjenja (obično za bačve ili pakiranja osjetljiva na topline kao što su PET boce) i tunel pasterizacija za pivo u limenci ili staklenoj ambalaži. Pri protočnoj pasterizaciji pivo prolazi kroz izmjenjivač topline gdje mu se podiže temperaturu obično do 72 °C uz zadržavanje 30 – 60 sekundi. Pozornost treba obratiti na opću sterilnost procesa zbog mogućnosti sekundarne kontaminacije (boce, čepovi, atmosfera, oprema). Tunelski pasterizatori velike su grijane komore kroz koje se uvode limenke ili staklene boce. Konstruiran je sa zonama predgrijavanja, pasterizacije i hlađenja. Temperatura zone pasterizacije u tunelskom pasterizatoru najčešća je 60 – 63 °C u vremenu zadržavanja od 10 - 20 minuta. Tunelskom pasterizacijom rješavaju se i rizici sekundarnih kontaminanata (boca, zatvarač, oprema, atmosfera), ali je višestruko veća potrošnja energije, dugotrajniji proces i pasterizator prostorno zauzima više mjesta (Petersen, 1996.; Bamforth, 2003.). Sa stanovišta moguće promjene okusa, ali više marketinške promidžbe primjenjuju se postupci mehaničkog uklanjanja mikroorganizama uz pomoć biološke filtracije odnosno sterilna membranska filtracije. U tu svrhu koriste se sterilne filter membrane od polipropilena ili politetrafluoretilena, poroznosti membrana između 0,45 i 0,80 μm (Bamforth, 2003.).

2.2.1.1 Punjenje piva u staklenu ambalažu

Staklo je anorganska tvar amorfne strukture koja se dobiva taljenjem određenih sastojaka i hlađenjem taline do postizanja vrlo velike viskoznosti, tj. do očvršćivanja u uvjetima kada je izbjegnuta kristalizacija osnovnih građevnih jedinica. Staklena talina kontinuirano prelazi u

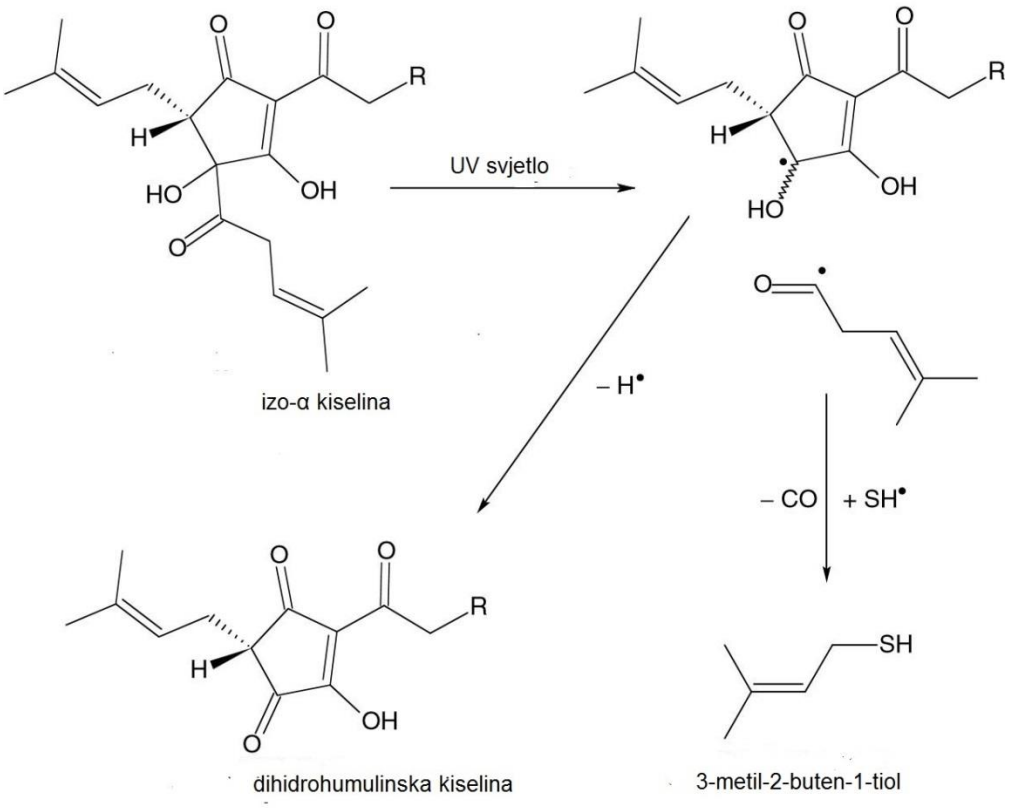
stakleno čvrsto tijelo i obrnuto (Vujković i sur., 2007.). Staklo se može smatrati sa svojim kemijskim i fizičkim svojstvima kao najpovoljniji materijal za pakiranje. Teški metali (bojila: Fe_2O3, Cr_2O_3) u staklu moraju biti vezani na takav način da se ne izlužuju u kiselom mediju. Tipičan kemijskih sastav staklene boce čine: 72% SiO_2 , 13% Na_2O, 10% CaO, 2% MgO i 1,5% Al_2O_3.

Prednosti staklenu ambalažu uključuju:

- inertnost materijala (ne utječe na okus sadržanoga proizvoda)
- otpornost na propusnosti plina
- otpornost na toplinu
- otpornost na deformacije materijala (Peklar, 2010.).

Staklene boce predstavljaju najzastupljeniji vid plasmana piva na domaćem tržištu. Najčešće korišteni volumenu su 0,50 L, 0,33 L i 0,25 L (HGK, 2014.; Walle, 2015.). Prema vrsti primjene, boce su podijeljene na povratne i nepovratne boce. Za vrijeme konstruiranja ambalaže uzima se u obzir način korištenja i obrade na linijama punjenja. Iako razvoj proizvodne tehnologije staklene ambalaže povećava njezinu mehaničku čvrstoću i otpornost na toplinski udar, prilikom uporabe treba obratiti pažnju na specifičnost staklene ambalaže. Općenita granica maksimalne razlike u temperaturi iznosi 30°C (Vetropack, 2011.). Staklo je bilo korišteno kao materijal za pakiranje stoljećima te je njegova boja važna sa stanovišta kvalitete piva (Priest i Stewart, 2006.). Boju stakla možemo između ostalog pojednostavljeno definirati kao vizualnu percepciju nastalu uslijed prolaza svjetlosti ili refleksije svijetla na neki stakleni objekt. Ovisna je o sposobnostima oka te o svojstvima svijetla i stakla (Vetropack, 2011.).Tri boje su u uporabi za pivske boce: bijela, tj. bezbojna (engl. *white flint*), zelena i smeđa (engl. *amber*). Za proizvodnju bezbojnoga staklo potrebno je imati sirovina bez ikakvih nečistoća. Glavna nečistoća je obično željezni oksid te njegov udio treba biti ispod 0,04%, u protivnom staklo ima plavo-zelenu nijansu. U određenoj mjeri to se može neutralizirati dodavanjem „obezbojivača" odnosno kobalta i selena u tragovima. Zeleno staklo dobiva se dodavanjem željeznog i krom oksida. Željezo oksid daje blijedo zelenu boju u udjelu od oko 0,15%. Smeđa (žuto-smeđa) je vjerojatno najčešća boja boca za pivo, a postiže se dodatkom ugljika kao redukcijskog sredstva s umjerenim udjelom željeznog oksida te također zahtijeva prisustvo sumpora u tragovima (Priest i Stewart, 2006.). Svjetlosno zračenje u UV području (uglavnom od 200 do 400 nm) nepovoljno djeluje na kvalitetu piva u bocama (Holcroft, 2008.). Smeđe staklo daje optimalnu zaštitu od svjetla jer apsorbira preko 85% UV zraka, zeleno naprotiv apsorbira samo 50% a bijelo staklo 10% (Štefanić i Marić, 1990.). Osim boje, ulogu ima i debljina stijenki ambalaže (Holcroft, 2008.). Neugodna „*lightstruck*" aroma nastaje kada se 3-metil-2-butenil slobodni radikal odcijepi od

izo-α-kiselina djelovanjem UV svjetlosnih zraka i reagira sa SH radikalom u prisutnošću ribofalvina, koji je uobičajen u pivu, te se stvara 3-metil-2-buten-1-tiol (izopentil merkaptan) (Kolpin, 2009.), a koji ima nizak prag osjetljivosti i u koncentracijama od 1 –35 ng/L daju neugodnu aromu piva (Holcroft, 2008.). Reakcije su blokirane prisustvom molekulskog kisika. Ova se pojava učinkovito rješava primjenom smeđe boce (zelena je manje učinkovita) ili korištenjem kemijsko reduciranih pripravaka izo-α-kiselina (Roberts i Wilson, 2006.). Zanimljivo je napomenuti kako su neke pivovarske marke prihvatile taj okus kao dio njihovoga senzorskog profila (Flavoractiv,2016.).



Slika 18 „*Lightstruck*" reakcija (Roberts i Wilson, 2006.)

Slika 20 prikazuje shemu punjenja (ispitivanog) piva u staklenu ambalažu s pripadajućim strojevima, a samo se punjenje staklenih boca realizira, kao i kod uglavnom većine današnjih punjača, kroz niz procesnih koraka:

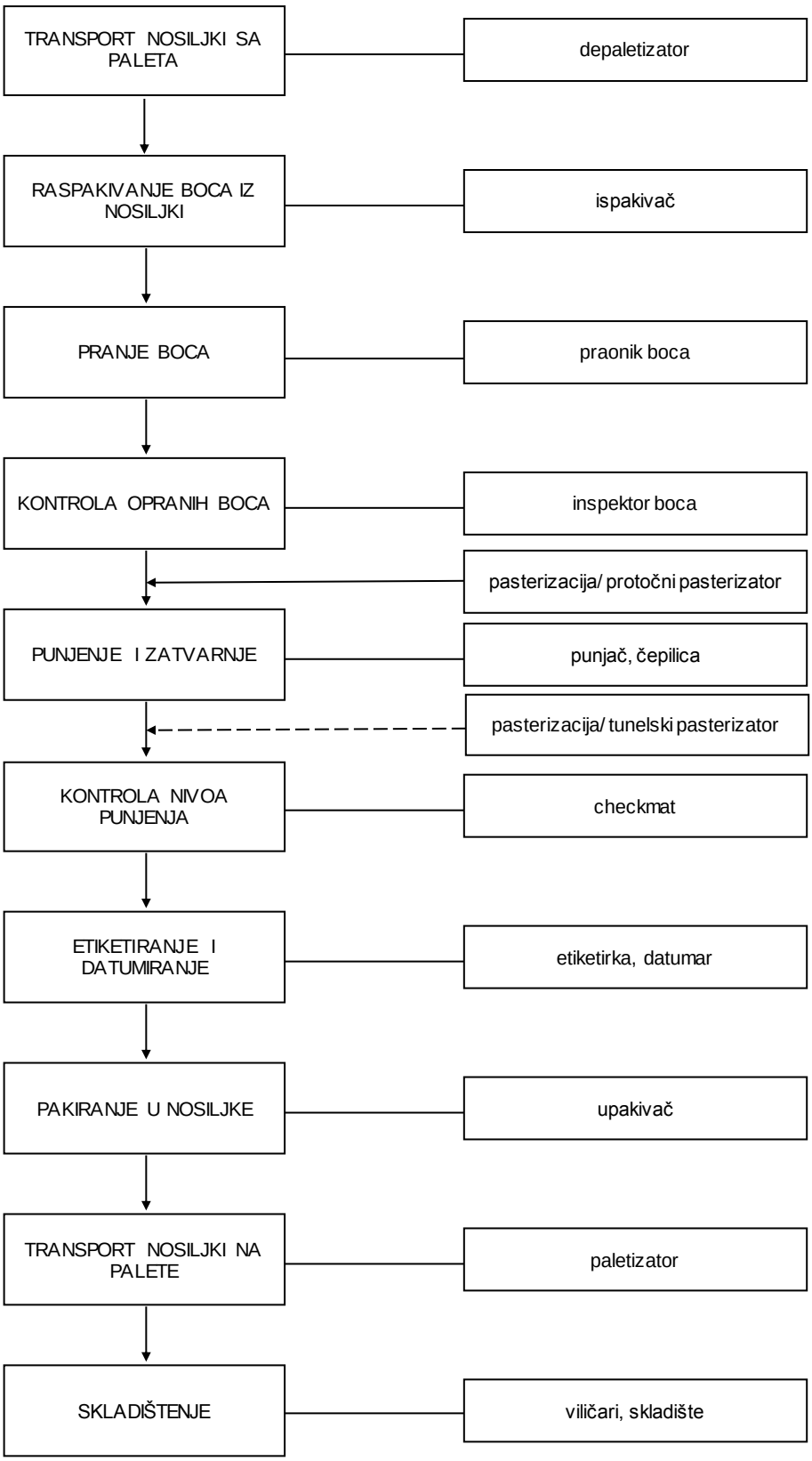
- predvakuumiranje, u ovoj se fazi iz boce izvlači zrak,
- ispiranje boce s CO_2, u bocu se ubacuje CO_2,
- vakuumiranje, iz boce se izvlači CO_2,
- stvaranje protutlaka, izjednačuje se tlak u boci s tlakom u „kapi" punjača,

- punjenje, u bocu ulazi pivo slobodnim padom,
- kraj punjenja, završava punjenje boce,
- dekompresija tj. odzračivanje i rasterećenje boce, u ovoj fazi se izjednačuje tlak CO_2 u grlu boce s atmosferskim tlakom (Technical training series, 2005.).

Krunski zatvarači najrašireniji su oblik zatvaranja staklene ambalaže, a razlog tomu je povoljna cijene i niske propusnosti plina (Peklar, 2007.). Krunski zatvarači proizvode se od lakiranog bijeloga ili kromiranog lima debljine oko 0,24 mm sa zaštitnom prevlakom protiv korozije i masom za brtvljenje na osnovu običnih ili ekspandiranih polimernih materijala, najčešće je to plastična PVC masa. (Vujković i sur., 2007.). Na obodu krunskoga zatvarača nalazi se 21 „zubac" (u SAD-u 23) koji se prilikom zatvaranja boce pritiskuje i osigurava njezino hermetičko zatvaranje (Kunze, 1998.). Proizvođačka tehnička specifikacije staklene ambalaže korištene u istraživanju date su u **Prilogu 1 i 2**.



Slika 19 Punjač staklenih boca u radu i staklene boce s krunskim zatvaračima

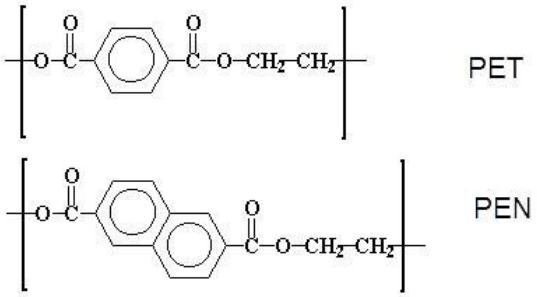


Slika 20 Shema tehnološkoga procesa punjenja piva u staklene boce s pripadajućim strojevima i opremom

2.2.1.2 Punjenje piva u PET boce

PET je skraćenica za poli(etilen-tereftalata), spada u skupinu zasićenih poliestera, polimernih materijala koji u temeljnim makromolekulnim segmentima sadrže esterske skupine -CO·O-. (Rujnić-Sokele, 2003.). PET se dobiva polikondenzacijom estera tereftalne kiseline ili njezinih derivata s etilen glikolom (Vujković i sur., 2007.). PET je linearni, termoplastični poliester i kombinacija aromatskih komponenti, koja proizilazi iz tereftalne kiseline i alifatski komponenti glikola određuje specifična svojstva materijala (Coles i sur., 2003.; Peklar, 2007.). Temeljne sirovine za proizvodnju PET-a su nafta i zemni plin pri čemu se od 1,9 kg nafte proizvede 1 kg PET-a. Osnovne reakcije dobivanja PET-a su reakcije direktne esterifikacije i esterske izmjene uz dodatak katalizatora, a za primjene gdje se zahtijeva veća molekulska masa PET-a primjenjuje se postupak polimerizacije u čvrstom stanju (Dadić i sur., 2012.). 70 – 75% poliestera proizvodi se procesom kontinuirane polimerizacije pri čemu se upotrebljava tereftalna kiselina dobivena katalitičkom (Co) oksidacijom (HNO_3) p-ksilena. Polimeri, među kojima se široko primjenjuje linearni poliester poli(etilen-tereftalata), PET je najsvestraniji sintetski polimer čija se komercijalna primjena pripisuje svojstvima toplinske stabilnosti i otpornošću na gužvanje (Budin, 2007.). Postoje i drugi poliesteri na temelju različitih međuprodukata, ali svi su izvedeni kao reakcije polimerizacije između kiseline i alkohola (ILSI Report, 2000.). Plastične (PET) boce i do deset puta su lakše od odgovarajućih staklenih boca, ali ne štite dovoljno pivo od gubitka plinovitog ugljičnog dioksida te nepovoljnog utjecaja svjetlosti i kisika. Nova generacija tih boca od višeslojne su plastike, s preprekama ili aktivnim preprekama koje reduciraju kisik, no relativno su skupe, a trajnost piva u takvoj ambalaži ipak je kraća nego u staklenim bocama ili limenkama. Alternativa PET bocama su boce od poli(etilen-naftalata), PEN, koji ima 10 – 15 puta veću nepropusnost za plinove. Te se boce mogu prati pri 85 °C što otvara mogućnost njihova povrata, a napunjene pivom mogu se pasterizirati i u tunelskom pasterizatoru,. Mnoge pivovare danas koriste PET i PEN boce tvrdeći kako se pivo u njima brže hladi i lakše pije bez čaše, što je osobito pogodno za potrošače na sportskim natjecanjima gdje ne postoji opasnost od razbijenoga stakla (Marić, 2009.). Ovisno o krajnjoj uporabi PET se može preraditi na više načina. Spremnici za piće prave se injekcijskim razvlačnim puhanjem odnosno prvotno se injekcijskim prešanjem prave predoblici ili pripremci koji se mogu pohraniti ili odmah preraditi u boce puhanjem, gdje svojstva PET boce ovise o udjelima amorfne i kristalaste faze u materijalu. Još jedan postupak puhanja je ekstruzijsko puhanje. Budući da je za ekstruzijsko puhanje nužan materijal visoke čvrstoće taljevine, poliesteri su za taj postupak značajno modificirani ili imaju relativno visoku strukturnu viskoznost (oko 1,0 dL/g). Prilikom proizvodnje PET predoblika dolazi do njegova stvaranja na osnovi dodatne reakcije pri temperaturi iznad 260 °C. Osobito je važno pri proizvodnji PET boca pažljivim upravljanjem

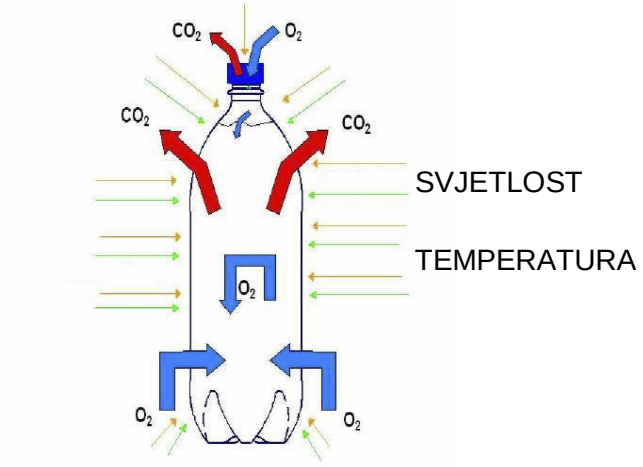
parametrima injekcijskoga prešanja i puhanja smanjiti na najmanju moguću količinu stvaranje acetaldehida (Rujnić-Sokele, 2003.; Rujnić-Sokele, 2007.).



Slika 21 Molekulska struktura poli(etilen-tereftalata) i poli(etilen-naftalata) (Lechat i sur., 2006.)

Kao što je spomenuto najveći nedostatak PET ambalaže je njegova propusnost na plinove, kod piva gubitak ugljičnoga dioksida i unos kisika bitno smanuju trajnost piva i narušava organoleptička svojstva proizvoda. Kao posljedica toga došlo je do razvoja PET barijera jer su standardne PET boce bez aditiva pogodne samo za punjenje pića manje osjetljivih na prisustvo kisika. Propusnost PET materijala može se smanjiti na nekoliko različitih načina od kojih su važne metode barijernih masa, barijernih premaza i višeslojne tehnologije**.** Metoda barijernih masa temelji se na principu pasivne barijere koje mogu usporiti propusnosti plina kroz materijal. Oni se mogu koristiti kao monomaterijal s dodatkom u PET (smjesu) ili mogu djelovati kao poseban sloj kod višeslojne plastične boce. PEN [poli(etilen- naftalat)] smatra se najučinkovitiji monomaterijal zbog svojih povoljnih barijernih svojstava u odnosu na čisti PET, a nedostatak mu je mnogostruko veća cijena (Peklar, 2007.). Postupci oslojavanja (barijernih premaza za jednoslojne plastične boce) mogu se podijeliti u dvije skupine: oni koji primjenjuju podtlak ili plazmu za nanošenje vrlo tankoga filma materijala kao pasivne barijere na unutarnjoj ili na vanjskoj površini napuhana plastična boca, a gdje se koriste anorganski materijali (amorfni ugljik ili silicijski oksid) i organski dvokomponentni epoksidno-aminski materijali, etilen-vinil alkohol, poliviniliden klorid, poliamidi tj. najlon). Druga metode temelji se na rasprskavajućem nanošenju tekućih organskih tvari na vanjsku površinu plastičnih boca (ova metoda je komercijalno upitna). Svakako treba voditi računa da nema negativne interakcije i utjecaja na proizvod primjenjujući bilo koju od metoda (Rujnić-Sokele, 2003.; Peklar, 2007.). Korištenje višeslojne tehnologije pokazalo se kao odlična alternativa. Poseban materijal koristi se kao neograničen viseći sloj višeslojne strukture gdje je unutarnji sloj zatvoren dodatnim slojem nekog drugog materijala (PET ili drugih polimera), uvedeno je do sedam slojeva, troslojne plastične boce koristi se u ambalažiranju piva. Ti slojevi dolaze zajedno kao predoblici za plastične boce. Materijali koji se koriste na bazi su EVOH-a

(etilen/vinil-alkohol), PA (poliamid) i PEN-a i čine dobre pasivne barijere te pružaju zaštitu od gubitka ugljičnoga dioksida iz pića, ali manje su učinkoviti protiv prodiranja kisika. Iz toga razloga, proizvođači su razvili kombinaciju unutarnjih aktivnih (kemijskih) i vanjskih pasivnih (fizičkih) barijera. Funkcija unutarnje aktivne barijere je apsorbirati kisik koji prodire kroz plastičnu bocu prije nego dosegne krajnji proizvod (pivo), a već prisutni kisik u slobodnom prostoru boce i kisik koji se nalazi u krajnjem proizvodu se smanjuje (Peklar, 2007.).To su polimeri ili reagensi koji nisu stabilizirani protiv oksidacije: oksidacijski metali npr. željeza i kobalta, razni oksidacijski akceleratori, askorbinska kiselina ili sustavi kao smjesa organskih komponenata, uključujući kinin, glikol i fenoli(Rešćek, 2014.; Peklar, 2010.). UV zaštita se postiže pigmentima ili bezbojnim organskim spojevima koji apsorbiraju zračenje, gdje je najdjelotvorniji pigment čađa koja pruža optimalnu zaštitu pri koncentraciji od 2 – 3%. Za UV zaštitu samoga plastičnoga filma koriste se UV stabilizatori (derivati benzofenona, derivati benzotriazola, ditiofosfinati, alkil fenoni) (Vujković i sur., 2007.). Osim odabira materijala boce, vrlo važan faktor za unos kisika je i odabir materijala i vrste zatvarača. Literatura navodi da u ambalažu ulazi do 35% kisika kroz čep (zatvarač) i tijekom postupka zatvaranja. Tržište nudi plastične HDPE (polietilen visoke gustoće), LDPE (polietilen niske gustoće) ili aluminijske navojne zatvarače, krunske i takozvane prsten zatvarače (*ring-pull*) a koji imaju i dobre i loše aspekte. Glavna prednost najkorištenijih plastičnih zatvarača s navojem je mogućnost ponovnoga zatvaranja boce. Međutim, zbog propusnosti materijala potrebno je da budu višeslojne izrade s ugrađenom pasivnom (sprečava prodor kisika) ili aktivnom (kemijskom) zaštitom koja apsorbira kisik, a koji prodire kroz zatvarač (natrija ili kalija sulfit, askorbinska kiselina). Nedostatak aluminijskih navojnih zatvarače je mogućnost oštećenja boce prilikom zatvaranja, krunski se ne mogu koristiti nakon otvaranja boce kao ni *ring pull* zatvarači (Peklar 2010.; Peklar 2007.). Proizvođačka tehnička specifikacije PET ambalaže korištene u istraživanju date su u **Prilogu 3 i 4**.



Slika 22 Prikaz permeacije kroz PET ambalažu (Pet planet insider, 2008.)

Polimerni navojni | Aluminijski navojni | Krunski | Ring-pull

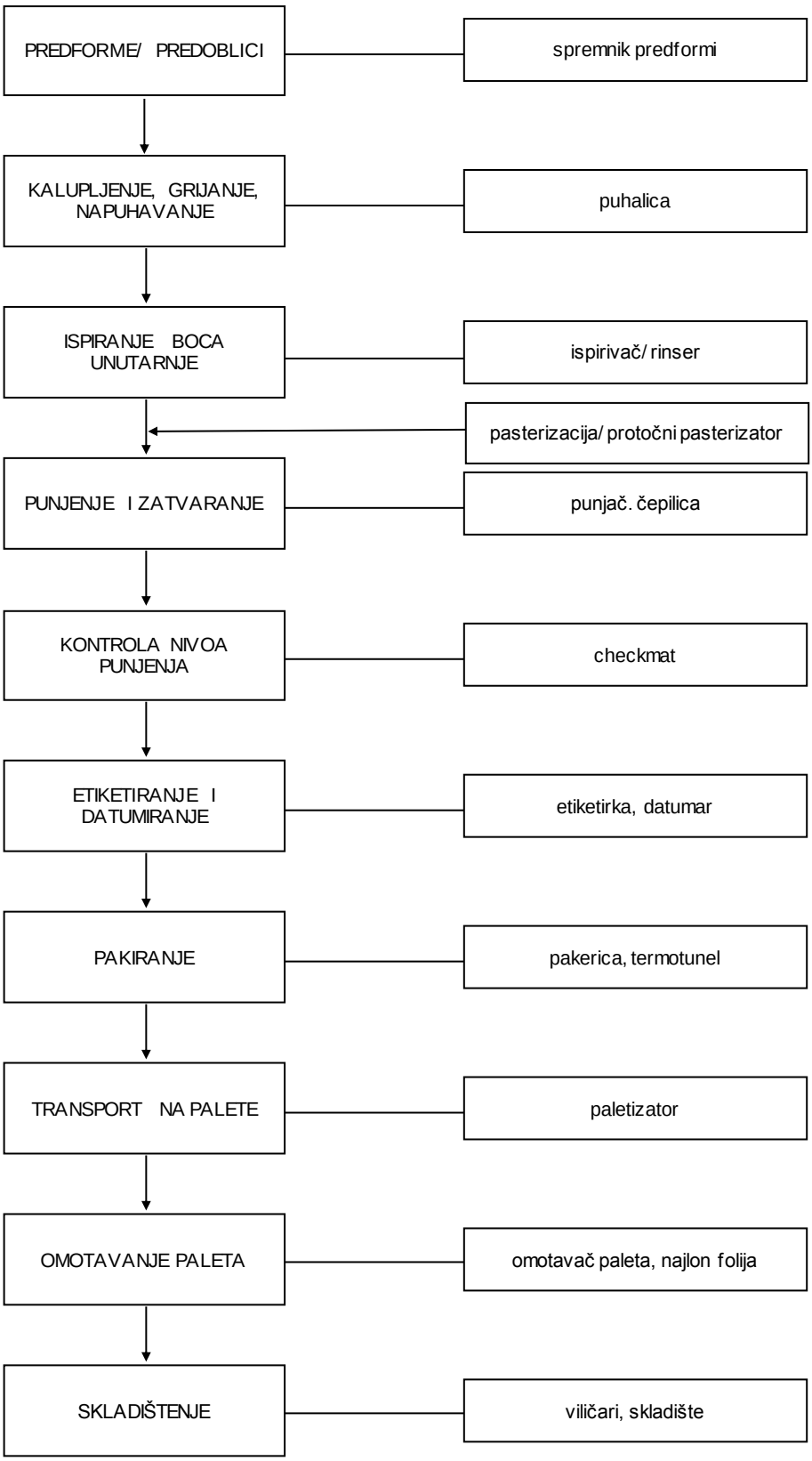


Slika 23 Vrste zatvarača za PET embalažu (Peklar, 2010.)

Slika 25 prikazuje shemu punjenjenja (ispitivanog) piva u PET ambalažu, dok se samo punjenje PET boca realizira, za razliku od staklenih, bez vakuum faze, gdje se boca nakon ispiranja (sterilna i deaerirana voda), ispiru s CO_2 pod atmosferskim uvjetima u cilju uklanjanja zraka (kisika) iz boce i stavljaju pod protutlak, izjednačava se tlak u boci s tlakom u „kapi" punjača i pivo slobodnim padom puni bocu.



Slika 24 PET boca na punjaču i PET ambalaža s plastičnim navojnim zatvaračima i predoblicima



Slika 25 Shema tehnološkog procesa punjenja piva u PET ambalažu s pripadajućim strojevima i opremom

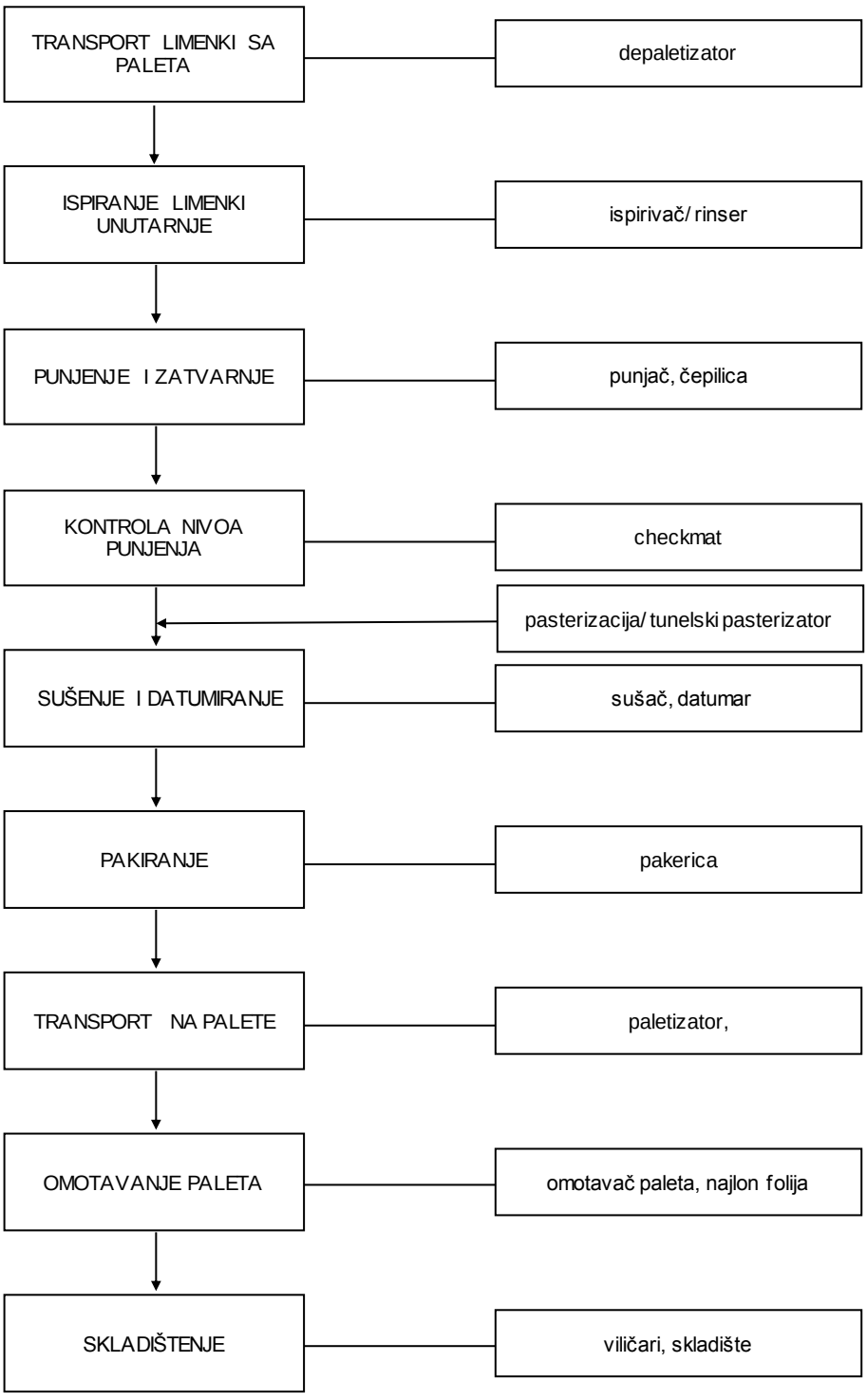
2.2.1.3 Punjenje piva u limenke

Pivo se puni u dvodijelne limenke koje se sastoje od tijela i poklopca limenke. Izrađene su od čeličnoga ili aluminijskoga lima te podnose unutarnji tlak od 6,2 bar-a. Debljina stijenki limenki je samo 0,09 mm, dok se u zoni vijenca održava debljina od oko 0,35 mm kako bi se osigurala dovoljna čvrstoća spajanja limenke i poklopca. Korišteni volumeni su 0,25, 0,33 i 0,50 L. Poklopac se izrađuje po principu „*stay in tab"* što omogućuje da sustav za zatvaranja ostaje na limenci i nakon njezinog otvaranja što je ekološki prihvatljivo, ali ne i higijenski jer dio poklopca uranja u pivo nakon otvaranja (Marić, 2009.; Kunze, 1998.). Prednosti limenki kao pivske ambalaže je njezina nelomljivost, lakše su od staklenih boca, mogućnost pasterizacije piva u zatvorenoj limenci, bolje se slažu, a time i bolje iskorištenje prostora, nema povrata prazne ambalaže, jednostavno otvaranje, ne propuštaju svjetlost i mogu se atraktivno bojiti čime se može efikasno reklamirati proizvod. Nasuprot tomu, iz njih se ne može ugodno piti te su skuplje od staklenih boca (Petersen, 1996.; Kunze, 1998.). Sve aluminijske limenke koriste sustav zaštitnoga laka za sprječavanje kontakta proizvoda s metalom. Dakle, razina alumija obično je niska, ali i ta niska razina može utjecati na pivo te može izazvati i zamućenje proizvoda (Coles, 2003.). Neki autori navode da pasterizacija (izloženost višim temperaturama) aluminijskih limenki piva doprinosi točkastoj koroziji unutarnjega zaštitnoga premaza limenki što utječe na povećanje udjela aluminija u pivu i promjena komponenti arome piva, koloidne stabilnosti te daje pivu „metalik" i gorak okus (Ivušić i sur., 2004.; Buculei i sur., 2011.). Aluminijski lim za izradu ambalaže proizvodi se hladnim valjanjem od aluminija čistoće 99,5% i od legura alumnija s manganom i (ili) magnezijem u cilju poboljšanja mehaničkih svojstava, dok kemijska otpornost raste s čistoćom aluminija, tj. ona se povećava sa smanjivanjem količine željeza, silicija i bakra čije se prisustvo prilikom topljenja ne može potpuno izbjeći. Legirajući metali najčešće su zastupljeni do 5%. Što se tiče kemijske otpornosti, općenito aluminij je otporniji prema kiselinama nego prema lužinama. Aluminij se lako spaja s kisikom iz zraka stvarajući zaštitni sloj aluminijeva oksida ($Al_2O_3 \cdot H_2O$), to je kompaktan sloj koji sprječava oksidaciju dubljih slojeva (Petersen, 1996.; Vujković i sur., 2007.). Omotač i dno limenke proizvode se u jednome ciklusu postupkom (dubokoga) izvlačenja, a poklopac je izrađen od istog materijala kao i ostatak limenke, debljine lima 0,27 mm, te mase oko 3,8 g i promjera poklopca 64,75 mm (nakon zatvaranja 57 mm). Princip dubokoga izvlačenja je u tomu da se obavlja promjena oblika bez da se pri tome mijenja debljina materijala (Kunze, 1998.). Aluminijski otpad ima znatnu tržišnu vrijednost te se može ponovno reciklirati bez gubitka svojstava, atomska struktura mu se ne mijenja tijekom taljenja (European aluminium association, 2005.). Gotovo 75% od ikada proizvedenoga aluminija je i danas u uporabi zbog svojstva beskonačnog recikliranja (The Aluminium Association, 2017.). Proizvodnjom aluminija od

recikliranoga aluminijskoga otpada troši se samo 5% energije u odnosu na proizvodnju primarnoga aluminija (iz aluminijske rude ,boksit), što je značajan doprinos održivosti. Stopa recikliranja aluminijskih limenki za pića u Europi iznosi 71,3%, što je na putu ostvarivanja cilja od 80% do 2020. godine (European aluminium association, 2017.). **Slika 27** prikazuje shemu punjenja (ispitivanog) piva u limenke s pripadajućim strojevima dok se samo punjenje limenki odvija kroz ispiranje limenki (sterilna i deaerirana voda), ispiranje s CO_2, te se limenke stavljaju pod protutlak, izjednačava se tlak u limenci s tlakom u „kapi" punjača i pivo slobodnim padom puni limenku. Proizvođačka tehnička specifikacija limenki korištenih u istraživanju date su u **Prilogu 5.**



Slika 26 Punjač limenki u radu i presjek limenki na punjaču (Cask Brewing Systems Inc., 2013.)



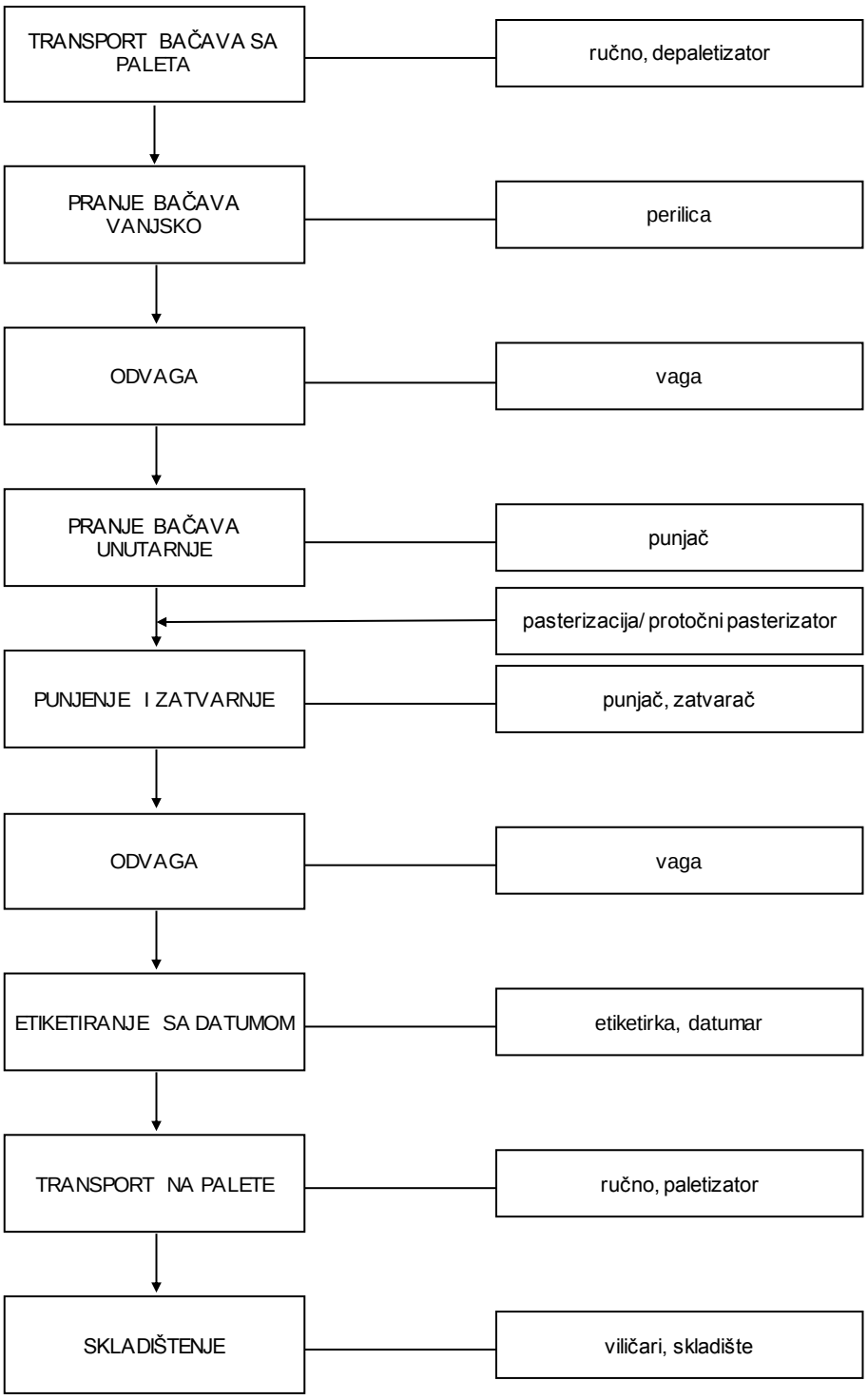
Slika 27 Shema tehnološkoga procesa punjenja piva u limenke s pripadajućim strojevima i opremom

2.2.1.4 Punjenje piva u (*keg*) bačve

Krajem sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća u Engleskoj pojavile su se prve suvremene metalne bačva za pivo, tzv. *keg*. Prednosti *keg* bačvi su brojne, izrađene su od izdržljivog i trajnog materijala (Cr/Ni čelik), imaju ugrađenu armaturu za pranje, sterilizaciju i punjenje, povećana biološka trajnost jer su i ispražnjene bačve pod tlakom inertnog plina (CO_2 ili N_2), isključena je mogućnost ulaska stranih predmeta, omogućena je automatizacija postupka pranja, punjenja, transporta i skladištenja. Punjenje je pojednostavljeno i bačve se mogu samo djelomično prazniti, a ostatak se piva u njima može dugo čuvati (Marić, 2009.). Nedostatak je velik utrošak investicijskih sredstava koji se relativno brzo kompenziraju. Prema definiciji *keg* je standardizirana metalna bačva izrađena od Cr/Ni čelika sa stacionirano ugrađenom armaturom koja služi za punjenje, pražnjenje, pranje i sterilizaciju (Kunze, 1998.). Upotrebljavani Cr/Ni čelik (austenitni) predstavlja glavnu skupinu nehrđajućih čelika koji uz krom kao glavni legirajući element sadrži i nikal. Prisustvo nikla poboljšava korozivnu otpornost tih čelika. Jedan od najpoznatijih Cr/Ni čelika je AISI 304 (18/8) s 18% kroma i 8% nikla (međunarodna oznaka, a u Njemačkoj poznat kao V2A čelik), sljedeći najpoznatiji je AISI 316 (18/10/2,5), s 18% kroma, 10% nikla i 2,5% molibdena (V4A) te oni čine 65% od ukupne svjetske proizvodnje čelika (Vujković i sur., 2007.). Za izradu bačava mogu se koristiti i laki metal (AlMgSi). Iako je cijena aluminija niža u odnosu na Cr/Ni čelik, to nije dovoljna kompenzacija u odnosu na kvalitetnije bačve od nehrđajućega čelika i nisu našli širu uporabu. Unutrašnjost bačve ostaje pod atmosferom CO_2 što onemogućava razvoj i kontaminacije aerobnim miroorganizmima (Petersen, 1996.). *Keg*-ovi se proizvode volumena 7 – 100 L, a u Europi su najzastupljeniji od 20, 30 i 50 L (Marić, 2009.) Najčešća masa *keg* bačava od 30 L kreće od 7,9 – 12,5 kg, a od 50 L od 10 – 15 kg i debljine stijenki 1 – 2 mm (Kunze, 1998.). **Slika 29** prikazuje shemu punjenja (ispitivanog) piva u *keg* bačve. Bačvarija je opremljena sa zasebnom stanicom za pranje i rezervoarom vruće vode. Punjač ima instalirane tri „glave" gdje se preko prve odvija pražnjenje i lužnato pranje, zatim kiselo pranje i ispiranje vrućom vodom, a preko treće sterilizacija vodenom parom, stavljanje pod nadpritisak CO_2 i punjenje. Nadpritisak CO_2 regulira se da bude nešto niži nego tlak u cjevovodu punjača (tzv. diferencijalni tlak) kako bi punjenje bilo brže vodeći računa da se ne naruši potrebni tlak zasićenja piva s CO_2.. Cjelokupan process pranja i punjenja bačve traje oko 1,5 minuta. Proizvođačka tehnička specifikacije *keg* bačve od 30 L data je u **Prilogu 6.**.



Slika 28 Punjenje pivskih (*keg*) bačava i presjek pivske (*keg*) bačve (web 1)



Slika 29 Shema tehnološkoga procesa punjenja piva u (*keg*) bačve s pripadajućim strojevima i opremom

2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I MODELIRANJE

2.3.1. Temeljni statistički pojmovi

Statistika je znanstvena disciplina koja se bavi razvojem metoda prikupljanja, opisivanja i analiziranja podataka te primjenom tih metoda u procesu donošenja zaključaka na temelju prikupljenih podataka. Zadaća statistike je uočiti zakonitosti u masovnim i slučajnim pojavama te da ih iskaže brojčano. Masovne pojave su skupine istovrsnih elemenata koji imaju jedno ili više zajedničkih svojstava. Takvu skupinu nazivamo statističkom masom ili statističkim skupom. Statističko istraživanje usmjereno je na skup jedinki koje zadovoljavaju neka svojstva bitna za obilježje koje se istražuje, tj. populaciju. Dakle, populaciju čine sve jedinke koje su predmet istraživanja. Uzorak je podskup populacije na kojemu je osigurano kvalitetno provođenje istraživanja (Benšić i Šuvak, 2013.; Biljan-August i sur., 2009.). Kao zasebna znanstvena disciplina, statistika se grubo može podijeliti na opisnu (deskriptivnu), koja se temelji na konkretnim rezultatima dobivenima nekim istraživanjima ili mjerenjima te jačine metodi prikupljanja, sistematiziranja, prikazivanja i određivanja parametara osnovnog skupa, i inferencijalnu koju čine statističke metode koje objašnjavaju varijabilitet promatranih pojava pomoću klasifikacijskih, korelacijskih i drugih statističkih pokazatelja, kao i statističke metode koje se bave zaključivanjem na osnovu uzorka (Mirilović i Pejin, 2008.; Pivac i Rozga 2006.). Kako bi zaključci prilikom istraživanja o populaciji na temelju podataka iz uzorka bili ispravni, nužno je da uzorak bude reprezentativan, tj. u njemu moraju biti zastupljene tipične karakteristike populacije bitne za istraživanje (Benšić i Šuvak, 2013.). Statistički skup osnovni je pojam u statistici (kao uostalom i skup u matematici). Čine ga statističke jedinice ili elementi koji imaju barem jedno zajedničko svojstvo (obilježje ili varijabla) koje od elementa do elementa očituje statističku promjenjivost (Kovačić, 2011.). Općenito se statistička obilježja mogu podijeliti na kvalitativna statistička obilježja, koja se izražavaju opisno, i kvantitativna statistička obilježja koja se izražavaju brojčano. Grupiranjem podataka prema modalitetima jednog statističkog obilježja (varijable) nastaje statistički niz, a prema numeričkom obilježju numerički niz. Broj elemenata statističkog skupa koji pripadaju određenoj grupi, tj. jednom modalitetu ili pojavnom obliku promatranog obilježja naziva se apsolutna frekvencija (f_i) (Biljan-August i sur., 2009.). Neformalno, apsolutna frekvencija nekoga modaliteta jednaka je ukupnom broju pojavljivanja toga modaliteta u osnovnom skupu. Relativne frekvencije jednaka je količniku odgovarajuće apsolutne frekvencije toga modaliteta i opsega statističkog skupa (proporcije i postoci). Najbolji način reprezentiranja nizova podataka u slučaju kvalitativnih obilježja su tablični ili grafički prikaz podataka, a za kvantitativna obilježja uvode se posebni numerički pokazatelji i to su tzv. srednje vrijednosti (Kovačić, 2011.).

2.3.2. Osnovne karakteristike numeričkih nizova

Numeričke veličine kojima se opisuju karakteristike promatranog skupa mogu se podijeliti na:

- mjere centralne tendencije (aritmetička sredina, geometrijska sredina, harmonijska sredina, modus i medijan) kojima se opisuje prosječna veličina pojedinačnih vrijednosti promatranog skupa),
- mjere varijabilnosti (disperzije) (raspon podataka, varijanca, standardna devijacija, koeficijent varijacije) kojima se kvantificira varijabilnost pojedinačnih vrijednosti promatranog skupa, i
- mjere oblika rasporeda (koeficijent asimetrije i koeficijent spljoštenosti) kojima se definiraju vrsta i način na koji su pojedinačne vrijednosti obilježja uređene u odnosu na njegov oblik.

U slučajevima kada se u seriji svaki podatak javlja samo jednom (gdje je frekvencija svakog obilježja 1) takve serije se nazivaju serije s negrupiranim podacima (Mirilović i Pejin, 2008.; Pivac 2007.). Aritmetička srednja vrijednost skupa (uzorka) (x, μ) (engl. *mean* ili *arithmetic mean*) predstavlja sumu svih podataka ili obilježja podijeljenu s ukupnim brojem podataka ili obilježja. Medijan (*Me*) (engl. *median*)je vrijednost podatka koja se nalazi u sredini sređene statističke serije, gdje su vrijednosti podataka sređene po veličini i podatke dijeli u dva jednako brojna dijela, dok je mod (M_O) (engl. *mode*) vrijednost podatka koja u analiziranoj statističkoj seriji ima najveću frekvenciju, odnosno najčešće se ponavlja. Mjere varijabilnosti (raspršuje vrijednosti oko središnje tendencije) su raspon podatka (*R*) (engl. *data range*) koji predstavlja razliku između maksimalne i minimalne vrijednosti podataka, varijanca (s^2, σ^2) uzorka ili populacije (engl. *sample variance, population variance*) je suma kvadrata odstupanja svih podataka od njihove srednje vrijednosti podijeljene s $n-1$, gdje n predstavlja ukupan broj podataka u uzorku ili populaciji (srednje kvadratno odstupanje), standardna devijacija (s, σ) uzorka (populacije) (engl. *sample standard deviation*, *population standard deviation*) je pozitivna vrijednost drugog korijena varijance uzorka (populacije), koeficijent varijacije (*CV*) uzorka, (populacije) (engl. *sample coefficient of variation*, *population coefficient of variation*) je omjer vrijednosti standardne devijacije uzorka (populacije) sa srednjom vrijednosti podataka u uzorku, (populaciji). Osim medijana, koriste se i drugi parametri koji opisuju kojim tempom podaci rastu po veličini: Kvantili (q) su pozicijske veličine koje dijele skup, u kome su podaci uređeni po veličini i statistički niz dijele na q jednakih dijelova. Dijele se s obzirom na broj intervala na koji dijele niz podataka (Košmelj 2007.; Eterović i Kardum, 2010.; Mirilović i Pejin, 2008.).

Analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) statistički je postupak koji predstavlja tehniku uporabe razlika između prosjeka uzoraka u zaključivanju o postojanju (ili

ne) razlika između prosjeka populacija i njome je moguće je raščlaniti i procijeniti varijabilnosti uvjetovane različitim čimbenicima (Bašić, 2005.). Predstavlja glavnu statističku metodu za testiranje međuovisnosti procesnih parametara i najčešće se koristi pri analizi nezavisnih parametara između kojih se razlike ne mogu iskazati kvantitativno (Bujan i sur., 2016.). Analizom varijance uspoređuju se različite komponente varijance (kvadrirane standardne devijacije) (Eterović i Kardum, 2010.). To je poseban slučaj regresije gdje su nezavisne varijable kategorizirane i tehnika je za procjenu parametara linearnog modela kada su nezavisne varijable nominalne. U najjednostavnijem slučaju ANOVA se svodi na *t*-test ako nominalna varijabla poprima dvije vrijednosti (Bogunović i Bašić, 2003.). Razlikujemo jednostavnu (ANOVA, univarijantna analiza varijance) i složenu analizu varijance (MANOVA, multivarijantna analiza varijance). Jednostavnom analizom varijance uspoređujemo rezultate jedne zavisne varijable unutar jedne nezavisne varijable koja ima više razina ili kategorija. Općenito logika jednostavne analize varijance počiva na odstupanjima pojedinačnih rezultata od vlastite aritmetičke sredine i na odstupanjima aritmetičkih sredina pojedinih skupina rezultata od zajedničke aritmetičke sredine svih rezultata. Dakle, za analizu varijance bitan je odnos variranja između i unutar skupina. Složena analiza varijance je statistički postupak koji se primjenjuje u onim slučajevima kada uspoređujemo rezultate više zavisnih varijabli unutar više nezavisnih varijabli koje imaju različite razine ili kategorije. Za razliku od jednostavne analize varijance, gdje imamo samo jednu zavisnu varijablu, kod složene analize varijance, osim utjecaja većeg broja nezavisnih varijabli na zavisnu, gledamo i međudjelovanje (interakciju) između većeg broja zavisnih varijabli (Eterović i Kardum, 2010.).

Korelacijska analiza primjenom posebnih metoda i tehnika ispituje stupanj povezanosti između barem dviju varijabli (Kovačić, 2011.). Vrijednost korelacije brojčano se iskazuje koeficijentom korelacije, najčešće Pearsonovim (*r*) ili Spearmanovim (*rs*), a značajnost se koeficijenta iskazuje vrijednošću *p*. Koeficijent korelacije pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable. Predznak koeficijenta korelacije (+ ili –) govori nam o smjeru povezanosti (Udovčić i sur., 2007.). Koeficijent korelacije je numerička karakteristika dvodimenzionalnog slučajnog vektora koja može poslužiti za analizu zavisnosti među njegovim komponentama i predstavlja bezdimenzionalnu veličinu s vrijednostima $-1 \leq r \geq 1$ (Benšić i Šuvak , 2013.). Apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije ($|r|$) ukazuje na jakost veze među varijablama. Što je $|r|$ bliže nuli veza je slabija, a što je bliže jedinici veza je jača. Prigodom interpretacije tog koeficijenta uvijek treba imati na umu da on opisuje isključivo smjer i jakost linearne veze među varijablama. Jedan od mogućih kriterija jakosti veze među varijablama: ako je $r = 1$ veza je potpuna, $0{,}80 \leq r < 1$ veza je jaka , $0{,}50 \leq r < 0{,}80$ srednje jaka, $0{,}20 \leq r < 0{,}50$ slaba,

$0,0 \leq r < 0,20$ neznatna i $r = 0$ potpuna odsutnost veze (Kovačić, 2011.). Ako je koeficijent korelacije značajan s obzirom na postavljenu granicu značajnosti (uobičajeno $p<0,05$), zaključujemo da je koeficijent korelacije značajan i da se smije tumačiti. Ukoliko je vrijednost $p>0,05$ zaključujemo suprotno navedenome (Udovčić i sur., 2007.). Pri $p<0,05$ razina pouzdanosti je 95%. Korelacijska analiza je vrlo često prvi korak u utvrđivanju međusobne ovisnosti dviju ili više promatranih varijabli. Ako se pomoću odgovarajućih statističkih pokazatelja utvrdi kako postoji statistički značajna veza među promatranim varijablama, sljedeći korak u istraživanju te veze je tzv. regresijska analiza kojom se razvija odgovarajući analitički izraz ili algebarski model te veze kako bi se moglo prognozirati očekivanu vrijednost jedne varijable za unaprijed zadanu vrijednost druge varijable (Kovačić, 2011.).

2.3.3. Metode multivarijatne analize (MVA)

U prirodnim situacijama postoji mnoštvo varijabli koje su međusobno povezane. Govorimo o multidimenzionalnosti pojava, tj. o pojavama (događajima ili stanjima) koje su opisane s velikim brojem varijabli. Pritom je svaka varijabla posebna manifestna (mjerljiva) dimenzija. Primjereno je poželjeti te varijable (zbog dinamičkog ekvilibrija u kojem se nalaze) analizirati sve zajedno (kao entitet u cjelini) i istovremeno, a ne jednu po jednu ili par po par jer na taj način varijable bivaju izvučene iz njihovog realnog konteksta. Manje je, dakle, prirodno razbijati cjelinu na dijelove i promatrati ih neovisno o drugim varijablama. Postupke kojima analiziramo više varijabli istovremeno nazivamo multivarijatnim ili multidimenzionalnim analitičkim postupcima (Kujundžić-Tiljak i Ivanković, 2009.). Prednost multivarijatnih metoda je u tome da mogu biti često primjenjivane u situacijama u kojima su alati klasične statističke analize nemoćni i koja se uglavnom primjenjuje na jednoj varijabli (Mutavdžić. 2016.). Multivarijatna analiza grana je statistike koja se bavi analizom višestrukih izmjera većeg broja varijabli na jednom ili više uzoraka jedinki. U prikazu svake od metoda MVA primijenjena su jednaka pravila:

- opis i tijek analize,
- pretpostavke i specifičnosti,
- hipoteze, pouzdanost i testiranje,
- primjena i interpretacija (Pecina, 2006.).

2.3.3.1 Klaster analiza

Klaster analiza (engl. *Cluster analysis*, CA) je naziv za skup multivarijatnih tehnika čija je primarna svrha grupiranje objekata temeljem osobina koje posjeduju. Multivarijatnost označava svojstvo klaster analize da više varijabli analizira istovremeno i zajedno kao dio jedne cjeline. Predmet klaster analize najčešće su objekti, a ne varijable kao što je to slučaj

kod faktorske analize (FA). No, osobine objekata definiraju se pomoću varijabli koje samim time ulaze u proces klaster analize gdje je izbor varijabli presudni korak i ovisi o ciljevima koji se žele postići. Za razliku od ostalih multivarijatnih statističkih tehnika, klaster analiza varijable ne procjenjuje empirijski, već koristi one varijable koje su zadane od strane samog istraživača (Devčić i sur., 2012.). Svaki klaster bi trebao biti homogen i svi klasteri među sobom heterogeni, odnosno objekti klastera trebali bi nalikovati jedni drugima i biti različiti od objekata u drugim klasterima. Klaster analizom nastoji se utvrditi broj klastera i sastav klastera. Osnovna podjela metoda klaster analize je na hijerarhijske metode koje karakterizira razvijanje hijerarhije i nepoznat broj klastera te nehijerarhijske metode kojima se objekti grupiraju u unaprijed određen broj klastera (Kurnoga Živadinović 2007.; Čižmešija i Kurnoga Živadinović, 2009.). U osnovi hijerarhijskih metoda leži iterativan proces spajanja objekata u grupe tako da u sljedećoj etapi spajamo objekte iz prethodno formirane grupe.koji kao krajnji rezultat ima dendogram i predstavlja grafički prikaz klastera (grupa) u obliku stabla povezivanja. Jednom formirane grupe samo se proširuju novim objektima prema specifičnostima izabranog kriterija, a istovremeno ne postoji mogućnost prelaska objekta iz jedne u drugu grupu tijekom postupka iteracije. Tu mogućnost daju nehijerarhijske metode grupiranja, vrši se raščlanjivanje tako da se jedinice mogu kretati iz jedne u drugu grupu u različitim fazama analize (Papić-Blagojević i Bugar, 2009.). Cilj klaster analize je pridružiti objekte u grupe na temelju sličnosti objekata te pronalaženje optimalnoga razvrstavanja kod kojega su opažanja unutar svakoga klastera slična, ali se različiti klasteri međusobno razlikuju. Kao mjera sličnosti ili različitosti za grupiranje varijabli koristi se korelacijski koeficijent (*r*), a za grupiranje objekata metrika (euklidska udaljenost objekata u analiziranom multivarijatnom prostoru). Mjera udaljenosti (engl. *dissimilarity measure*) je mjera različitosti podataka (Puška i Beganović 2016.; Bogunović i Bašić, 2003.).

2.3.3.2 Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Components Analysis,* PCA) predstavlja vjerojatno najrasprostranjeniju i najpopularniju multivarijatnu kemometrijsku tehniku. Jedna od važnijih primjena PCA je u QSAR (engl. *Quantitative Structure Activity Relationships*) istraživanjima (Dabić, 2013.). Analiza glavnih komponenata je multivarijatna metoda za određivanje linearnih latentnih varijabli (komponenti). Može se shvatiti kao metoda pomoću koje se formira novi koordinatni sustav sačinjen od međusobno normalnih latentnih varijabli usmjerenih na pravac najvećeg varijabiliteta među podacima (Trifković, 2013.). Dakle, primjenjuje se u cilju redukcije broja izvornih varijabli, tj. na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli i koji se zovu glavne komponente, te na interpretaciju podataka. Glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način i pokazuje neke skrivene povezanosti, međuodnose podataka. Podaci se prikazuju na način koji nije uobičajen, ali sadrži mnogo bitnih informacija o skupu izvornih

podataka (Bogunović i Bašić, 2003.). Matematički se analiza glavnih komponenti može opisati kao bilinearni model koji traži linearnu kombinaciju varijabli koja opisuje zajedničku strukturu u matrici podataka *X (m · n).* Matrica podataka ima *m* redova koji odgovaraju objektima (u kemometriji obično uzorci) i *n* kolona koje odgovaraju varijablama (Mutavdžić, 2016.). Često se uz analizu glavnih komponenata veže faktorska analiza (FA), bliska, ali koncepcijski različita tehnika. Faktorska analiza, (engl. *Factor Analysis*, FA), statistički je pristup za analizu strukture međusobnih odnosa većeg broja varijabli definiranjem seta zajedničkih skrivenih dimenzija tj. faktora.

Osnovni koraci u analizi glavnih komponenata su sljedeći:

- standardizirati varijable tako da im je prosjek 0, a varijanca 1 kako bi sve bile na jednakoj razini u analizi,
- izračunati matrice korelacija između svih izvornih standardiziranih varijabli,
- pronaći svojstvene vrijednosti glavnih komponenata,
- odbaciti one komponente koje su nositelji proporcionalno malog udjela varijance.

Skorovi glavnih komponenata mogu poslužiti još i za daljnju interpretaciju rezultata grafičkim predstavljanjem, tako se njihov relativni međusobni položaj može i vizualno ispitati. Zatim kao ulazne varijable u drugim multivarijatnim metodama kao npr. klaster, regresijska i diskriminantna analiza. Prednost korištenja skorova je u tome što nove varijable nisu međusobno korelirane čime je riješen problem multikolinearnosti. No, probleme druge vrste tada može izazvati nemogućnost smislene interpretacije glavnih komponenata (Pecina, 2006.). PCA se koristi za vizualizaciju podataka te je temelj mnogim drugim kemometrijskim tehnikama (Šporar, 2011.).

2.3.3.3 Regresijska analiza

Regresijska se analiza sastoji u primjeni različitih metoda ispitivanja ovisnosti jedne varijable o drugoj varijabli ili o više drugih varijabli. Osnova je svake analize regresijski model (Šošić, 2006.). Prvi korak u istraživanju ovisnosti varijabli je grafički prikaz koji se naziva dijagram rasipanja. Dijagram rasipanja u pravokutnom koordinatnom sustavu točkama (x_i, y_i) prikazuje parove vrijednosti dviju promatranih numeričkih varijabli gdje se mogu odmah uočiti osnovne veze među promatranim varijablama (Biljan-August i sur., 2009.). U matematici postoje dva oblika zavisnosti: funkcionalna izražena pomoću matematičkih jednadžbi tako da svakoj kombinaciji vrijednosti nezavisno promenljivih $x_1, x_2, \ldots, x_k$ točno odgovara vrijednost za y i statistička ili stohastička zavisnost koja se na osnovu eksperimentalnih podataka može izraziti pomoću očekivane zavisnosti ili regresijske jednadžbe (aproksimativne krive), tako da svakoj kombinaciji nezavisno promjenljivih $x_1, x_2, \ldots, x_k$ odgovara računska vrijednost za $\bar{y}$ i

greška eksperimenta (regresije) **(1)** $\varepsilon = y - \bar{y}$ od čije veličine ovisi preciznost predviđanja regresijske jednadžbe. To znači da se kao rezultat regresivne analize dobiva regresivna ovisnost, koja se često naziva matematički model objekta istraživanja i standardna greška regresije ε. Regresijska, odnosno matematička ovisnost pruža mogućnost da se za svako $x \ni X$ izračuna odgovarajuća vrijednost za funkciju **(2)** $\bar{y} = f(x_1, x_2, x_3, \ldots x_k)$ primjenjujući naznačene operacije u analitičkom izrazu. Regresijska jednadžba je adekvatnija što je greška eksperimenta $\varepsilon = y - \bar{y}$ manja, tj. ako računske vrijednosti zavisno promjenjive $\bar{y}$ više odgovaraju izmjerenim vrijednostima y (Dašić i sur., 2005.). Regresijski model je algebarski model kojim se analitički izražava statistički odnos među pojavama. Regresijski model je jednadžba ili skup jednadžbi s konačnim brojem parametara i varijabli. Analizira se polazeći od stvarnih vrijednosti pojava, odnosno stvarnih (empirijskih) vrijednosti varijabli. Podaci za regresijsku analizu potječu iz primarnih ili sekundarnih izvora te nastaju opažanjem ili mjerenjem. Regresijski su modeli u općem obliku**(3)** $y = f\ (x_1, x_2, \ldots., x_k) + e$**.** Ako je cilj analize regresijskog modela utvrditi analitički izraz određenih svojstava koji predočuje odnos među varijablama, iskoristit će se metode deskriptivne statistike. Vrijednosti varijable e u tom se slučaju smatraju odstupanjima od funkcionalnoga dijela modela i po pravilu ne podliježe nikakvoj specifikaciji svojstava. Primjena inferencijalne statistike u vezi je s regresijskim modelom kao generatorom pojava. Po definiciji takav model sadrži slučajnu varijablu (varijable) određenih svojstava. Slučajna varijabla e je u kombinaciji s funkcionalnim dijelom modela, pa je zavisna varijabla također slučajna varijabla. Empirijske vrijednosti zavisne varijable smatraju se uzorkom iz zamišljenoga beskonačnog osnovnoga skupa a sam polazni model modelom osnovnoga skupa (Šošić, 2006.). Koeficijent determinacije (R^2, gdje je 0 <R^2< 1) je mjera korisnosti modela. Mjeri proporciju varijance zavisne varijable oko njezine srednje vrijednosti koja je objašnjena prediktorskim (zavisnim) varijablama. Veći *R* znači veću snagu modela u objašnjavanju regresijske funkcije i bolju predikciju zavisne varijable (Bašić, 2005.).

Regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Least Squares Regression*, LSR)

Linearni model kojim se povezuje jedna zavisna promjenjiva s jednom nezavisnom varijablom primjenjuje se kada jedinično povećanje vrijednosti nezavisne varijable uzrokuje približno istu linearnu promjenu vrijednosti zavisne varijable, a predstavlja se sljedećom relacijom:

$$y = a + bx + e \qquad \textbf{(4)}$$

gdje su a i b regresioni koeficijenti, a je odsječak, b je nagib, a vektor e obuhvaća reziduale (odstupanja) uslijed odstupanja podataka od idealnog linearnog odnosa, odnosno predstavlja

grešku za koju važi pretpostavka da je nezavisna i sa srednjom vrijednošću nula. Osnovni zadatak prilikom formiranja linearnog modela je da se regresijski koeficijenti odaberu tako da greške modela budu svedene na minimum (Trifković, 2013.; Herceg i Galetić 2016.). Predviđanje, tj. modeliranje vrijednosti, za uzorak $\hat{y}_i$ i i greška predikcije promatrane ovisnosti e_i dati su sljedećim relacijama:

$$\hat{y}_i = a + bx_i$$

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \textbf{(5)}$$

(Dabić, 2013.; Trifković, 2013.).

Najčešće korištena metoda za određivanje prave, a koja je u skladu s eksperimentalnim rezultatima, metoda je najmanjih kvadrata. Pri tome se traži onaj pravac (vrijednost nagiba i odsječka) koji daje najmanju vrijednost sume kvadrata odstupanja Σ e_i^2, odnosno metoda najmanjih kvadrata sastoji se u određivanju onih procjena parametara za koje je suma kvadrata odstupanja procijenjenih i originalnih vrijednosti, tj. zbroj kvadrata ostataka minimalan. Taj uvjet je ispunjen kada je vrijednost nagiba i odsječka data sljedećim relacijama:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \textbf{(6)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \textbf{(7)}$$

gdje je $\bar{x}$ srednja vrijednost svih vrijednosti x_i , a $\bar{y}$ srednja vrijednost svih y_i vrijednosti. Greške nagiba i odsječka, kao i odgovarajući intervali pouzdanosti, proporcionalni su standardnoj grešci modela $S_{Y/X}$ i dati su sljedećim relacijama:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \textbf{(8)}$$

$$S_a = S_{y/x}\sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \textbf{(9)}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y/x}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \textbf{(10)}$$

$$L_{1,2a} = a \pm t_{(n-2)} s_a$$

$$L_{1,2b} = b \pm t_{(n-2)} s_b$$

gdje je t kritična vrijednost Studentove *t*-raspodjele za određeni nivo povjerenja i broj stupnjeva slobode. Standardna greška modela predstavlja kvadratni korijen sume kvadrata rezidualnih vrijednosti podijeljenih brojem stupnjeva slobode koji u slučaju linearne regresije iznosi $n - 2$, gdje je n broj kalibracijskih točaka (Trifković, 2013.).

Višestruka regresijska analiza (engl. *Multiple Regression*, MR)

Modeli višestruke regresije mogu poprimiti različite oblike. Obzirom na parametre dijele se na linearne i nelinearne. Izbor modela ovisi o zahtjevima konkretne primjene. Najjednostavniji i zbog toga najčešće korišteni su linearni modeli (Ukrainczyk, 2010.). Model višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR) sastoji se od jedne zavisne i dvije ili više nezavisnih varijabli, te slučajne varijable:

$$y_i = \alpha + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \cdots + \beta_j x_{ij} + e \quad \textbf{(11)}$$

Jednadžba **(11)** se može i kraće napisati:

$$Y_{i=} E\frac{Y}{X_i} + \varepsilon_i \quad \textbf{(12)}$$

gdje je:

Y_i zavisno promjenjiva veličina, x_{ij} nezavisno promjenjiva, j je broj nezavisno promjenjivih, i je broj mjerenja, α je odsječak prave a ß su koeficijenti. $E\frac{Y}{X_i}$ je funkcija eksperimentalno određene zavisno promjenjive Y za i mjerenja nezavisno promjenjive X,a vrijednost ε_i je greška mjerenja(Petronijević i sur., 2014.). Jednadžba regresijskog modela je određena ako su poznati parametri $\alpha, ß, j = 1, 2, \ldots, K$ ako ne, procjenjujemo ih i tada procijenjeni regresijski model sa K nezavisnih varijabli glas:

$$\hat{y}_i = \alpha + b_1 x_{11} + b_2 x_{22} + \cdots + b_j x_{ij} + b_K x_{iK} \quad \textbf{(13)}$$

Procjena parametra α naziva se konstantnim članom. To je vrijednost regresijske funkcije uzorka ako su vrijednosti K nezavisnih varijabli jednake nuli. $b_j j = 1, 2, \ldots, K$ su regresijski koeficijenti. Regresijski koeficijent b_j pokazuje za koliko se linearno u prosjeku mijenja vrijednost zavisne varijable Y ako se varijabla X_i poveća za jedan, a vrijednosti preostalih nezavisnih varijabli ostanu nepromijenjene. Kao i u jednostavnom linearnom modelu, za određivanje parametara procijenjenog modela koristi se metoda najmanjih kvadrata, tj. iz uvjeta da zbir kvadratnih grešaka bude minimalan. Suma kvadrata odstupanja ostataka dana je izrazom:

$$\sum_{i=1}^{n} e^2 = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y})^2 \quad \textbf{(14)}$$

Ostatci u višestrukom regresijskom modelu su definirani kao $e_i = y_i - \hat{y}_i$. Oni imaju važnu ulogu u procjenjivanju adekvatnosti modela kao i u jednostavnom regresijskom modelu. Nepristrana procjena varijance višestrukog regresijskog modela jest omjer sume kvadrata odstupanja ostataka i broja stupnjeva slobode $n - (K + 1)$:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-(K+1)} \quad \textbf{(15)}$$

(Grubešić, 2014.).

U literaturi ANOVA tehnika poznata je kao „disperzijska analiza“ i koristi se za testiranje nulte hipoteze o koeficijentima regresije $ß_j$. Pri tome se totalna varijacija zavisne promjenjive y, tj. suma kvadrata odstupanja od aritmetičke sredine, rastavlja na dvije komponente: jedna koja proizlazi iz regresije i druga koja proizlazi iz varijacije oko regresije. Jednadžba analize varijance glasi:

$$\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^{n}(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \textbf{(16)}$$

ST = SP + SR

gdje je:

ST – suma kvadrata odstupanja vrijednosti varijable od njezine aritmetičke sredine,

SP – suma kvadrata odstupanja regresijskih vrijednosti varijable od njezine aritmetičke sredine (odstupanja protumačena modelom),

SR – suma kvadrata odstupanja empirijskih vrijednosti varijable od regresijskih vrijednosti (odstupanja ne protumačena modelom).

Taj izraz koji je u skraćenom obliku dan formulom **(17)** ST = SP + SR zove se jednadžba analize varijance i predstavlja temelj analize reprezentativnosti regresijskog modela. Tablica analize varijance za model višestruke regresije:

Tablica 11 Analize varijance za model višestruke regresije

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode DF	Sume kvadrata SS	Sredine kvadrata MS	F-omjer	PROB>F
Protumačen modelom	k	SP	SP/k	SP / k SR / (n − (k + 1))	
Neprotumačena odstupanja	n-(k+1)	SR	SR / (n − (k + 1))		
Ukupno	n-1	ST			

Utjecaj regresije se ispituje testiranjem hipoteza:

$H_0: \alpha = ß_1 = ß_2 = 0$, ne postoji utjecaj regresije, $H_1: \exists j / (ß_j \neq 0)$, $j = 1, 2$, postoji utjecaj regresije. Koristeći se elementima analize variance određuje se i opći pokazatelj kakvoće

modela koji se naziva koeficijent višestruke determinacije. Koeficijent determinacije predstavlja omjer zbroja kvadrata protumačenoga modelom i ukupnoga zbroja kvadrata:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}, \text{ gdje je } 0 \leq R^2 \leq 1 \quad \textbf{(18)}$$

Korigirani koeficijent determinacije:

$$\bar{R}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-(K+1)}(1 - R^2), \text{ gdje je } \bar{R}^2 \leq R^2 \quad \textbf{(19)}$$

Pri računanju korigiranog koeficijenta uzima se u obzir broj stupnjeva slobode koji za fiksno $n$ovisi o broju nezavisnih varijabli u modelu. Vrijednost koeficijenta višestruke linearne korelacije r pokazuje jačinu linearne veze i jednak je pozitivnom kvadratnom korijenu koeficijenta višestruke determinacije R^2:

$$r = \sqrt{R^2} \quad \textbf{(20)}$$

(Ilić i Mijailović 2014.; Grubešić, 2014.; Šošić, 2006.).

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square*, PLS ili PLSR)

PLS je metoda zasnovana na analizi glavnih komponenata (PCA) i višestrukoj regresiji (MLR), koja ih objedinjuje i kombinira. Ima nekoliko prednosti u odnosu na multiplu regresiju: može se koristiti na multikolinearnim podatcima, može uključivati veliki skup nezavisnih varijabli, a osim toga nekoliko zavisnih varijabli može se modelirati istovremeno (Šerbetar, 2012.). To je izuzetno korisna tehnika kada treba predvidjeti set zavisnih varijabli iz velikog seta nezavisno promjenjivih (Dabić, 2013.). Ustanovljena je šezdesetih godina prošlog stoljeća za uporabu u kemometrici. Metoda za koju se u zadnje vrijeme koristi i naziv *projekcija na latentne strukture*, posljednjih je godina prepoznata i u edukacijskim disciplinama te općenito u društvenim znanostima (Šerbetar, 2012.). PLS metoda koristi se kada želimo model za predviđanje različitih kvantitativnih svojstava uzorka (Šporar, 2011.). Pristup PLS metode omogućava rješavanje problema s kolinearnim varijablama, zamjenjujući ih s nekoliko latentnih, međusobno normalnih varijabli (PLS komponente). Te PLS komponente su linearne kombinacije originalnih varijabli *X*, a kriterij za njihovo dobivanje je visoka korelacija sa zavisno promjenjivom i maksimum kovarijance između *X* i *Y*. Latentne varijable dobijene na ovaj način mogu se iskoristiti za predviđanje *Y* vrijednosti. Prilikom PLS regresije matrice *X* i *Y* se transformiraju prema sljedećim jednadžbama:

$$X = T\,P + E \quad \textbf{(21)}$$

$$Y = U\,Q + F \quad \textbf{(22)}$$

gdje su *T* i *U* matrice skorova (PLS komponenti), *P* i *Q* su matrice koeficijenata latentnih varijabli, a *E* i *F* matrice reziduala (odstupanja). Važno je razmatrati broj latentnih varijabli koji se koristi u PLS modeliranju, a optimalan broj latentnih varijabli se može odrediti primjenom metode unakrsne validacije (LOO-CV, engl. *leave-one-out cross-validation*), gdje se dio podataka (objekata) koristi kao set za kalibraciju (engl. *training set*), a drugi dio se izdvaja kao set za testiranje (engl. *test set*) i koristi za validaciju modela. Uvijek je poželjno da samo nekoliko latentnih varijabli (PLS komponenata) opisuje najveći dio varijacija. Kvaliteta PLS modela definira se na osnovu kvadrata višestrukog korelacijskog koeficijenta za kalibraciju (R^2Y), kvadrata višestrukog korelacijskog koeficijenta za križnu validaciju (Q^2Y), korijena srednjeg kvadratnog odstupanja za kalibraciju (RMSEC, engl. *Root mean square errors of calibration,*) i korijena srednjeg kvadratnog odstupanja za unakrsnu validaciju (RMSECV) (Dabić. 2013.). Drugi koeficijenti korisni za određivanje kvalitete PLS modela su R^2X: dio objašnjene varijacije i dio predviđene varijacije Q^2X. Objašnjena varijacija se izračunava iz:

$$R^2X = 1 - \frac{rezudalni\ zbroj\ kvadrata}{zbroj\ kvadrata} \quad \textbf{(23)}$$

Koliko glavna komponenta ima veći značaj toliko je veći R^2X. Predviđena varijacija je istoznačna objašnjenoj varijaciji osim što je izmjerena na izuzetoj frakciji podataka, a izračunava se iz:

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS_l}{RESS_{l-1}} \quad \textbf{(24)}$$

$$PRESS = \left\| Y - \check{Y}^{[L]} \right\|^2 \quad \textbf{(25)}$$

gdje je *PRESS* predviđeni rezidualni zbroj kvadrata koji je procjena prediktivne sposobnosti modela, a *RESS*, rezidualni zbroj kvadrata prijašnje glavne komponente. Statistik Q^2 također ima praktičnu uporabu u određenju broja komponenata koje mogu biti zadržane u modelu (Šerbetar, 2012.).

Polinomni regresijski model (engl. *Polynomial Regression*, PR)

Model regresijskog polinoma ubraja se među krivolinijske regresijske modele. Poopćeni model sadržava dvije ili više varijabli s potencijama. Model je sa stanovišta metoda statističke analize linearan jer je linearan u parametrima. U njegovoj analizi primjenjuju se isti postupci kao i u analizi modela višestruke linearne regresije, s tom razlikom što u modelu polinomne regresije ulogu „nezavisnih" varijabli ima regresorska varijabla s različitim potencijama. Klasični (standardni) model polinomne regresije *K*-tog stupnja je oblika:

$$y_i = \alpha + ß_1 x_i + ß_2 x_i^2 + \cdots ß_j x_i^j + \cdots ß_K x_i^K + e_i, i = 1, 2, \ldots, n \quad \textbf{(26)}$$

U modelu su y_i vrijednosti zavisne varijable Y, x_i^j, su vrijednosti nezavisne varijable X s potencijom $j, j = 1,2, \dots, K$ su nepoznati parametri, a $e_i$su nepoznate vrijednosti slučajne varijable e. Unutar inferencijalne analize modela za njih se pretpostavlja da su nekorelirane, normalno identično distribuirane s očekivanom vrijednosti nula i konstantnom varijancom. Brojčanu podlogu analize čine parovi vrijednosti zavisne i nezavisne varijable (y_i, x_i), $j = 1,2, \dots, n$. Uvede li se supstitucija $x_{i=}\ x_{iK}$ model postaje :

$$y_i = \alpha + ß_1 x_{i1} + ß_2 x_{i2} + \cdots + ß_j x_{ij} + ß_k x_{ik} + e_i,\ i = 1, 2, \dots, n \quad \textbf{(27)}$$

Vidljivo je kako je model polinomne regresije s formalnog stanovišta ekvivalentan modelu višestruke linearne regresije. Prije njegove analize potrebno je odrediti stupanj polinoma K, što ovisi o datoj primjeni. Teorijski maksimalan $K = n - 1$. U praksi se rijetko rabe modeli polinomne regresije stupnja većega od šest. Najčešće se srećemo s polinomima prvoga, drugoga ili trećega stupnja. U sklopu inferencijalne analize regresijskog polinoma procjenjuju se parametri, druge statistički i analitičke veličine, testiraju hipoteze i provode postupci predočeni za model višestruke regresije (Šošić, 2006.). Model polinomne regresije drugog stupnja s jednom nezavisnom varijablom glasi:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \cdots + \beta_k y^k + e \quad \textbf{(28)}$$

U navedenom modelu y je zavisna ili regresand varijabla, x je nezavisna ili regresorska varijabla, $ß_0, ß_1, \dots, ß_k$ nepoznati su parametri ili regresijski koeficijenti koje trebamo procijeniti, a e je slučajna varijabla. Procjene parametara $ß_1, ß_2, \dots, ß_k$ dobit ćemo metodom najmanjih kvadrata tako da minimiziramo:

$$L = \sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_1 - \hat{\beta}_2 x_i^2 - \cdots - \hat{\beta}_k x_i^k\right)^2 \to min. \quad \textbf{(29)}$$

gdje su $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots., \hat{\beta}_k$ procjene parametara $\beta_0, \beta_1, \dots., \beta_k$. S obzirom na to da su u točki u kojoj funkcija dostiže minimum njezine prve parcijalne derivacije jednake nuli, to se svodi na rješavanje jednadžbe:

$$\frac{\partial L}{\partial \hat{\beta}} = 0 \quad \textbf{(30)}$$

Pojednostavljivanjem gornjeg izraza dobivamo normalne jednadžbe metode najmanjih kvadrata. Rješavanjem normalnih jednadžbi dobiti ćemo procjenitelje najmanjih kvadrata regresijskih koeficijenata (Lulić, 2014.). Predočeni model polinomne regresije aditivnog je tipa. U praksi je zastupljena i njegova eksponencijalna (multiplikativna) varijanta. Model je oblika:

$$y_i = exp(\alpha + ß_1 x_i + ß_2 x_i^2 + \cdots + ß_i x_i^j + ß_K x_i^K + e_i) \quad \textbf{(31)}$$

exp je baza prirodnog logaritma, a izraz u zagradi je eksponent. Model se naziva eksponencijalnim odnosno logaritamskim regresijskim polinomom jer se logaritamskom transformacijom linearizira, odnosno svodi na standardni polinom:

$$lny_i = \alpha + ß_1 x_i + ß_2 x_i^2 + \cdots + ß_i x_i^j + ß_K x_i^K + e_i \quad \textbf{(32)}$$

U transformiranom se modelu umjesto originalnih vrijednosti zavisne varijable rabe njihove logaritamske vrijednosti. Modeli nelinearni u parametrima i oni koji se ne mogu transformirati u linearni regresijski model analiziraju se specifičnim metodama, primjerice nelinearnom metodom najmanjih kvadrata (Šošić, 2006.).

Regresija metodom odzivnih površina (*engl. Response Surface Methodology*, RSM)

Metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) skup je statističkih tehnika koje nalaze primjenu u modeliranju i analizi procesa u kojima se prati odziv koji ovisi o nekoliko varijabli, a cilj je optimizacija odziva (Bujan i sur., 2016.). Mjerljiva veličina kvaliteta proizvoda ili procesa naziva se odziv (Rožić i sur., 2011.). U praktičnim i konkretnim problemima često se javljaju izuzetno složena stanja u kojima odziv sustava predstavlja međusobno djelovanje (interakciju) više parametara (faktora), koji istovremeno mogu biti i promjenjivog karaktera. Posljedica ovog je potreba uzimanja svih parametara u obzir i provođenje eksperimenata u svrhu ispitivanja koji od tih parametara i njihove međusobne kombinacije maksimalno ili minimalno utječu na sam odziv sustava, te koje se empirijske zakonitosti unutar tih eksperimenata pojavljuju (Jankovich, 2011.). Osnovna ideja metodologije odzivne površine jest dobiti odnos utjecajnih (nezavisnih) faktora na zavisnu varijablu (odziv) kroz odzivnu funkciju. Također je moguće razlučiti efekte pojedinih članova modela, kao glavne efekte ili interakcije. Kao uvjet za uporabu RSM-a trebaju postojati barem dvije nezavisne varijable (x_1, x_2) i jedna zavisna varijabla (y). Rezultat procesa (zavisne varijable) je moguće formulirati preko izraza:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad \textbf{(33)}$$

gdje je ε pogreška ili šum koji se javlja u odzivu. Nadalje, očekivana vrijednost odziva može se formulirati preko sljedećeg izraza:

$$E_y = f(x_1, x_2) \quad \textbf{(34)}$$

To je ujedno i oblik odzivne površine (Cajner, 2011.). Sama odzivna površina predstavlja, zapravo, maksimalan ili minimalan odziv karakterističnog promatranog sustava (Jankovich, 2011.). U većini RSM problema, oblik veze između odziva i nezavisnih varijabli je nepoznat. Prvi korak u RSM metodi je traženje odgovarajuće aproksimacijske veze y i nezavisnih varijabli. Obično se koristi polinom nižeg reda u odgovarajućim područjima nezavisnih

varijabli x_i. U samoj praksi dokazano je kako je učestalo korištenje funkcija odziva prvog i drugog reda sasvim zadovoljavajuće (Jankovich, 2011.; Cajner, 2011.). Ako je odziv moguće dobro modelirati linearnom funkcijom nezavisnih varijabli, tada je aproksimacijska funkcija model prvog reda:

$$y = ß_0 + ß_1 x_1 + ß_2 x_2 + \cdots + ß_k x_x + \varepsilon \quad \textbf{(35)}$$

U slučaju da postoji nelinearnost i da linearna funkcija nije odgovarajuća aproksimacija odziva potrebno je koristiti polinom višeg stupnja (Cajner, 2011.). Ako se bilo koji promatrani proces aproksimira sasvim određenim polinomom drugog reda, onda će jednadžba za odzivnu funkciju izgledati:

$$y = ß_0 + \sum_{i=1}^{k} ß_i x_i + \sum_{i=1}^{k} ß_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} ß_{ij} x_i x_j + \varepsilon, i \leq j \quad \textbf{(36)}$$

gdje je:

$i = 1,2,\ldots,N$ - broj izvedenih eksperimenata,

$j = 1,2,\ldots,k$- broj faktora (varijabli),

y - zavisna promjenljiva (odziv), (procjena funkcionalne zavisnosti),

x_{ij} - kodirane nezavisne promjenljive,

$ß_0$ - prekid (konstanta),

$ß_i, ß_{ij}$ - regresijski koeficijenti,

$ß_{ij}k$ - koeficijenti regresije,

$ß_{ii}$ - kvadratni regresijski koeficijenti,

ε - greška.

Kodirana nezavisna promjenjiva x_i se izračunava iz odnosa:

$$x_i = \frac{\xi - \bar{\bar{\xi}}}{d_s} \quad \textbf{(37)}$$

gdje je:

ξ - nezavisna promjenljiva u originalnim jedinicama,

$\bar{\bar{\xi}}$ - vrijednost razine (centralna točka) nezavisne promjenljive,

d_s - vrijednost koraka u originalnim jedinicama (Marković i sur., 2012.; Jankovich, 2011.).

Točnost i pouzdanost ocjene koeficijenata regresije ovise od osobina primijenjenog plana eksperimenta i zato je od velike važnosti dobar izbor plana. Poželjna karakteristika svakog

plana je međusobna nezavisnost procjena glavnih efekata i njihovih interakcija, što se postiže ortogonalnošću i rotatabilnošću. Ortogonalan plan eksperimenta je takav plan gdje su glavni efekti nezavisni. Rotatabilnost centralno kompozitnog plana eksperimenta se postiže dodavanjem točaka u eksperimentalni prostor (stanja eksperimenta) tako da su ova stanja simetrično postavljena oko centra plana (Rožić i sur., 2011.). Koeficijent determinacije, R^2 predstavlja odnos objašnjenih i neobjašnjenih suma kvadrata i koristi se kao kontrola ispravnosti aproksimacijskog postupka (modela), a računa se prema sljedećem izrazu:

$$R^2 = \frac{SKO_E/(N-K-1)}{SKO_Y/(N-1)} \quad \textbf{(38)}$$

gdje je:

SKO_E - suma kvadrata odstupanja ostatka

SKO_Y - suma kvadrata odstupanja regresije

k - broj nezavisnih varijabli u regresiji.

Koeficijent R nalazi se u intervalu između minimalne vrijednosti 0 i maksimalne vrijednosti 1. Što je postupak aproksimacije odzivne površine bolji, to je i koeficijent R bliži vrijednosti 1. Približavanje tog koeficijenta vrijednosti 1 je izuzetno važan pokazatelj unutar procesa ovakve analize (Jankovich, 2011.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak i cilj istraživanja je:

- analizirati i pojasniti utjecaj procesa punjenja (protočna i tunelska pasterizacija) na fizikalno-kemijska svojstva i sastav piva,
- analizirati i opisati promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja 6 mjeseci u različitoj ambalaži (staklo, PET, limenka, *keg* bačva),
- analizirati i opisati promjene sastava piva (lako hlapljive komponente) tijekom skladištenja 6 mjeseci u različitoj ambalaži,
- analizirati pretpostavljeni antioksidacijski učinak polifenola na promjene fizikalno-kemijskih svojstva i sastav različitih piva.
- analizirati povezanost promjena svojstava i sastava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži (staklo, PET, limenka, *keg* bačva),
- na temelju izmjerenih podataka modelirati promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži (staklo, PET, limenka, *keg* bačva),

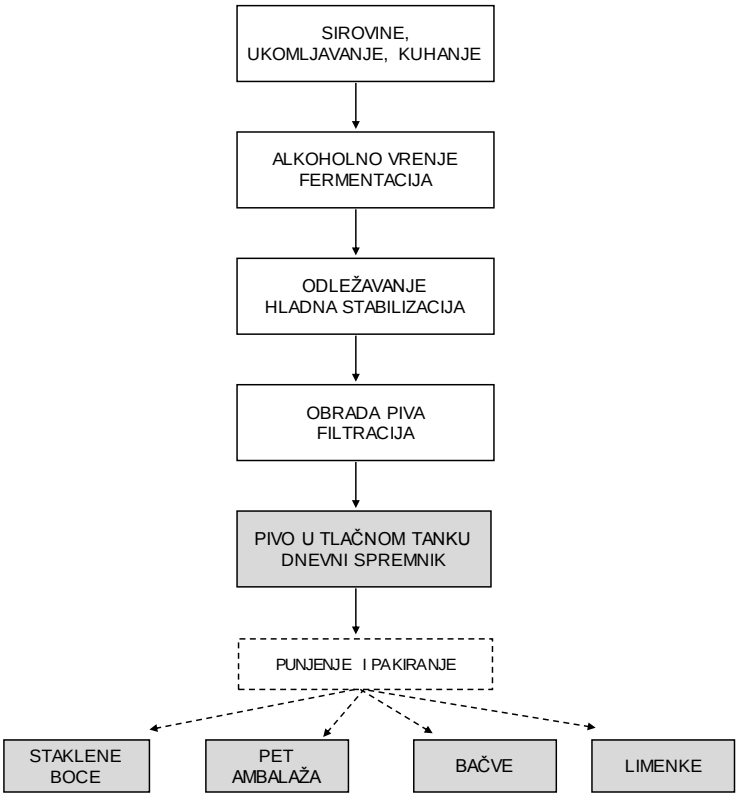
Tijekom istraživanja provedene su sljedeće aktivnosti:

- priprema uzoraka i mjerenje fizikalno-kemijskih svojstava kakvoće i sastava svijetloga lager piva i pils piva u tlačnom tanku, staklenoj i PET ambalaži, limenci i bačvi,
- za pils pivo (staklena ambalaža 0,50 L) i svijetlo lager pivo u različitim pakiranjima mjerenje sljedećih vrijednosti: ekstrakt u osnovnoj sladovini (OE), prividni ekstrakt (AP), specifična težina (SG), alkohol volumni (AL), pH (pH), boja (CL), gorčina (BI), polifenoli (PY), bistroća/mutnoća (HZ), otopljeni kisik (DO), CO_2 (CO), ukupni pakirani kisik (TPO) (bačve ne), trajnost pjene (FO) (tlačni tank ne), zrak u grlu boce/limenke (AI), test trajnosti (HF) (engl. *forcing test*, *haze forcing test*) za pivo u staklenoj boci i limenci, acetaldehid (ACE), dimetil sulfid (DMS), etil acetat (EAC), diacetil (DIA), propanol (PRO), pentandion (PEN), izobutanol (IBU), izoamil acetat (IAC), izoamil alkohol (IAA), viši alkoholi (VAL), esteri (EST).
- mikrobiološka analiza i kontrola piva u tlačnom tanku, tijekom procesa punjenja, upakiranog i uskladištenog proizvoda,
- statistička obrada i analiza eksperimentalno dobivenih rezultata (ANOVA, PCA, klasterska analiza),
- izbor i primjena matematičkih metoda za kreiranje regresijskih modela promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva,
- usporedba rezultata i validacija modela i

- određivanje najprikladnijih matematičkih modela za opis promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva.

Svi analizirani uzorci piva su iz redovite, standardne proizvodnje. Potrebni (planirani) uzorci su izuzeti s linija punjenja jedni za drugim, sredinom procesa zbog ujednačenosti kvalitete ambalažiranja. Pohranjeni su i uskladišteni na 20°C ± 2,0 °C, bez prisustva dnevnog svijetla (UV-zraka) i izvora topline. Mjerenja su realizirana svakih 30 dana (29,28 ± 0,77 dana), tijekom 6 mjeseci. Analiza piva u tlačnom tanku rađena je neposredno prije punjenja. Sve analize i mjerenja rađena su u skladu s pravilima i redovitim, ustaljenim aktivnostima odjela kontrole kvalitete u pivovarama što podrazumijeva godišnje 1 – 2 kalibracije i servis mjerne opreme i uređaja uz svakodnevnu samokontrolu uz realizaciju više mjerenja i analiza. Rezultati fizikalno-kemijskih svojstva piva (korištenih u radu) uglavnom predstavljaju jedno mjerenje uz praćenje vrijednosti ostalih rezultata analiza iz redovite proizvodnje. Analize lako hlapljivih komponenti rađene su na isti način s time da su se radila dva uzastopna mjerenja i prikazani rezultati predstavljaju njihovu srednju vrijednost.

S obzirom na složenost cjelokupnog tehnološkoga procesa, mjesta uzorkovanja i analiza najpreglednije je prikazano unutar sheme procesa proizvodnje (**Slika 30**).



Slika 30 Pojednostavljena shema procesa proizvodnje piva s mjestima uzorkovanja i analiza piva (zatamljena polja)

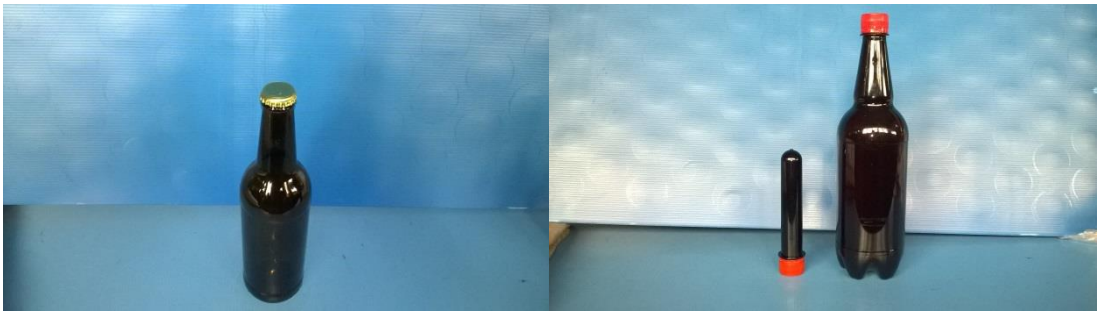
3.2. MATERIJALI

Materijali korišteni u istraživanju su

- svijetlo lager pivo (pivo donjega vrenja, u usipku 20% slada zamijenjen kukuruznom krupicom),
- pils (svijetlo) pivo (pivo donjega vrenja, usipak 100% slad),
- tlačni tankovi sa svijetlim lager pivom (Cr/Ni čelik), volumena 1080 HL,
- tlačni tank s pils pivom, volumena 1080 HL,
- svijetlo lager pivo u staklenim bocama volumena 0,50 L, PET ambalaži (jednoslojnoj, engl. *monolayer*, bez barijera) volumena 1 L, limenkama (aluminijske) volumena 0,50 L i *keg* bačvama (Cr/Ni čelik) volumena 30 L,
- pils pivo u staklenim bocama volumena 0,50 L,
- računalni program *Statistica ver 12*,
- laboratorijska oprema i pribor.



Slika 31 Pivo u tlačnom tanku (mjerenje na Norit Haffmans c-DGM-om)



Slika32 Boce staklo (0,50 L) i PET ambalaža (1 L)



Slika 33 Limenke (0,50 L) i pivska (*keg*) bačva (30 L)

3.2.1. Otopine i kemikalije

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su sljedeće kemikalije i reagensi

- natrijeve karboksimetil celuloze (Acros organics, Francuska)
- EDTA (Grammol 05190, Hrvatska)
- amonijak 25% (Grammol 16155, Hrvatska)
- etil alkohol 96% p.a. (Grammol 15473, Hrvatska)
- voda ISO 3696:1987 čistoće 3.
- destilirana voda
- etilen glikol 90% (Pneu Remix, Hrvatska)
- izooktan (Fisher chemical, UK)
- HCl 6 N p.a. (Grammol 13308, Hrvatska)
- NaOH 1 N p.a. (Grammol 21090, Hrvatska)
- NaOH p.a. (Kemika 1452506, Hrvatska)
- etil alkohol p.a. (Merck 100983,Njemačka)
- acetaldehid p.a. (Merck 100005, Njemačka)
- dimetill sulfid (DMS) (Merck 82083, Njemačka)
- etil acetat p.a. (Merck 109623, Njemačka)
- n-propanol p.a. (Merck 101024, Njemačka)
- izobutanol p.a. (Merck 100984, Njemačka)
- izoamil acetat p.a. (Merck 101231, Njemačka)
- izoamil alkohol p.a. (Merck 100979, Njemačka)
- diacetil p.a. (Merck 803528, Njemačka)
- pentandion p.a. (Merck 818555, Njemačka)
- 2,3-heksandion p.a. (ISTD) (Merck 818732, Njemačka)
- etil metil sulfid (EMS) p.a. (ISTD) (Fluka 04490, Njemačka)

- 1-butanol p.a. (ISTD) (Merck 101990, Njemačka)
- 1-propil-propionat p.a. (ISTD) (Aldrich 11,226-7, Njemačka)
- Wort agar (WA) (Liofilchem 610323, Italija)
- MRS agar (Merck 386560, Njemačka)
- CO_2 ≥ 99,995% (Messer, Hrvatska)

3.2.2. Korišteni laboratorijski uređaji i mjerna oprema

Tablica 12 Mjerene vrijednosti svojstava piva, metode i uređaji

Mjerena vrijednost	Metoda	Uređaj
Ekstrakt u osnovnoj sladovini (OE)	MEBAK 2.13.6.1	Analizator piva, DMA 5000 + SH1, Anton Paar GmbH, Austria, 2004.
Prividni ekstrakt (AE)	MEBAK 2.13.6.1	Analizator piva, DMA 5000 + SH1, Anton Paar GmbH, Austria, 2004.
Spec.težina(20º/20º), (prividni ekstrakt) (SG)	MEBAK 2.13.6.1	Analizator piva, DMA 5000 + SH1, Anton Paar GmbH, Austria, 2004.
Alkohol (v/v) (AL)	MEBAK 2.13.6.1	Analizator piva, DMA 5000 + SH1, Anton Paar GmbH, Austria, 2004.
p H (pH)	MEBAK 2.17	pH metar MP220 Basic pH/mV/°C meter, Mettler Toledo co. Švicarska/USA, 2008.
Boja (CL)	MEBAK 2.16.2	Spektrofotometar, Lambda 25. Perkin Elmer co., USA, 2004.
Gorčina(BI)	MEBAK 2.22.1	Spektrofotometar, Lambda 25. Perkin Elmer co., USA, 2004.
Ukupni polifenoli (PY)	MEBAK 2.21.1	Spektrofotometar, Lambda 25, Perkin Elmer co., USA, 2004.
Bistroća/mutnoća (HZ)	MEBAK, 2.19.1.2	Procesni turbidimetar . LabScat, Sigrist co., Švicarska, 2004.
Otopljeni kisik (DO)	EBC Ann. 9.37	Oksimetar, DIGOX 5, Dr Thiedig Co., Njemačka, 2004.
CO_2/O_2 (CO/DO)	MEBAK 2.35.1.1 MEBAK 2.37.1.2.	Norit Haffmans c-DGM-om, Haffmans B.V.co., Holandija, 2008.
Pjena/trajnost pjene (FO)	MEBAK, 2.23.1	Čaša, sat/ štoperica
Zrak (AI),CO_2 (CO)	MEBAK, 2.37.2.2MEBAK 2.35.1	Mjerač zraka Inpacka 2000 IAM, Haffmans B.V.co., Holandija, 2008., CO2 senzor kalkulator, ICC 2000, Haffmans B.V.co., Holandija, 2008.
Test trajnosi (*haze forcing test*) (HF)	EBC Ann. 9.30 (mod.)	Cirkulatorni grijač/hladnjak, F38-EH Julabo GmbH, Germany, 2008., Procesni Turbidimetar . LabScat, Sigrist co., Švicarska, 2004.
Ukupni pakirani kisik (TPO)	EBC Ann 11.5	Okretač boca BT-002, LG-automatic aps, Danska, 2008,, oksimetar, Digox 5, Dr Thiedig Co., Njemačka, 2004.

Tablica 13 Mjerene lakohlapljive komponente piva, metode i uređaji

Mjerena vrijednost	Metoda	Uređaj
Acetilaldehid (ACE)	EBC Ann.9.39, EBC Ann 9.24.2	Plinski kromatograf (GC),: Perkin Elmer Clarus 580, USA, 2012.
Dimetil sulfid (DMS)		
Etil acetat (EAC)		
Diacetil (DIA)		
Propanol (PRO)		
Pentandion (PEN)		
Izobutanol (IBU)		
Izoamil acetat (IAC)		
Izoamil alkohol (IAA)		
Viši alkoholi (VAL)		
Esteri (EST)		

Tablica 14 Mikrobiološka kontrola, metode i oprema

Mjerena vrijednost	Metoda	Oprema
Kulturni i divlji kvasci, bakterije	EBC Ann. 4.3.2.2 .	MB podloge WA,MRS, mikroskop Olympus BX 41 TF, Njemačka, 2004, membranski vakum filter, anaerobni lonac, inkubator Memmert 2008., termostat, Termo medecinsko aparati BTES – 2, 2004., autoklav Inko, Zagreb
Mliječno kisele bakterija	EBC Ann. 4.2.4.2	
Kvasci, plijesni, bakterije	EBC Ann. 4.1.2, 2.3.4.2	

3.3. METODE

3.3.1. Mjerenje parametara kakvoće i fizikalno-kemijskih svojstava piva

3.3.1.1 Ekstrakt osnovne sladovine (OE), specifična težina(SG), alkohol (AL), prividni ekstrakt (AE)

Ekstrakt u osnovnoj sladovini pokazatelj je jačine piva i nekada se označavao na etiketi (Marić, 2009.). Pokazatelj je ekstrakta u sladovini, tj. s kolikim postotnim udjelom ekstrakta je započela fermentacija (vrenje sladovine). Najveći dio ekstrakta nastalog tijekom komljenja

čine šećeri (maltoza, maltotrioza, glukoza), kao i šećeri prenijeti iz polaznoga ječma (saharoza, fruktoza). Prividni ekstrakt je onaj neprevreli ekstrakt u pivu koji se određuje uz prisutnost alkohola, a pravi se ekstrakt određuje eliminiranjem alkohola iz piva. Ostali sastojci ekstrakta, koje kvasac ne može prevriti, najvećim su dijelom dekstrini, proteinski sastojci, gumasti sastojci i mineralni spojevi (Kunze, 1998).

Princip rada:

Analizator piva DMA 500 korelira gustoću i brzina mjerenja zvuka. Pivo za analizu priprema se tako da se degazira, tj. oslobodi prisutnoga ugljičnoga dioksida. Mjerenja se provedena na 20°C pomoću ugrađenoga termostata. Za obavljanje mjerenja, odabere se jedna od 10 pojedinačnih metoda mjerenja i injektira uzorak u mjernu stanicu. Zvučni signal obavještava kada je mjerenje završeno. Rezultati se automatski pretvaraju u koncentraciju, specifičnu težinu ili drugu vrijednosti odnosno parametre piva pomoću ugrađene pretvorbene tablice i funkcije (Priručnik, eng. *Manual Beer Analyzer* DMA 500, 2004.). Mjerenja su rađena u Pivovari Osijek d.o.o. metodom **MEBAK 2.13.6.1.**



Slika 34 Analizator piva DMA 5000 + SH1

Uklanjanje CO_2 iz piva:

Postupak:

U Erlenmayer tikvicu od 750 ml usipano je 300 – 350 mL piva temperature oko 20 °C. Zatvorena tikvica povremeno je mućkana i otvarana radi smanjenja tlaka (ponavljano je do prestanka pojave tlaka). Zatim je profiltrirano kroz naborani filter papir, pri čemu je lijevak pokriven satnim staklom. Metoda **MEBAK 2.13.1**.

3.3.1.2 pH

Mjerenje pH sladovine i piva predstavlja rutinsku, ali važnu i obaveznu analizu u sklopu kontrole kvalitete. Upućuje na moguće procesne i mikrobiološke nekorektnosti i pogreške. pH piva je nakon degaziranja mjeren pH-metrom sa staklenom elektrodom (MEBAK 2, 1999.).

Princip rada:

pH se definira kao negativni decimalni logaritam koncentracije vodikovih iona:

$pH = - \log C_{H3O+}$

pri čemu se, zahvaljujući konstanti disocijacije vode, dobije skala od 0 do 14. Za mjerenje koncentracije iona u praksi koristi se uređaj koji se sastoji od mjerne (staklene) i referentne (kalomelove) elektrode, s kojih se signal preko pojačala prenosi na instrument sa skalom. Za baždarenje tog uređaja koriste se standardne otopine pufera. Pri tome je pokazivanje pH u području pH = (2 – 10) proporcionalno razlici potencijala koji se uspostavlja između referentne elektrode i elektrode uronjene u tekućinu koja se ispituje. Najčešće se koristi kombinirana elektroda u kojoj su mjerna i referentna elektroda konstruktivno ugrađene u jedinstvenu cjelinu (MEBAK 2, 1999.). Analize su provedene u laboratoriju Osječke pivovare d.o.o. po metodi **MEBAK 2.17**.



Slika 35 pH metar MP220 (mv)



Slika 36 Magnetna miješalica Rotomix 550 MMH

3.3.1.3 Boja (CL)

Boja piva potječe od korištenih sirovina za proizvodnju piva pa i o vođenju cjelokupnoga procesa. Za određivanje boje piva korištena je metoda **MEBAK 2.16.2**. Ovom metodom pokušava se isključiti subjektivni efekti ljudskog oka, kao i razlike u utiscima boje koji se dobiju prilikom usporedbe boje piva i obojenih stakala. Ta metoda se primjenjuje kao službena referentna metoda i može se primijeniti za sve uzorke sladovine iz pogona, piva i tekućih neslađenih sirovina, ali ne i za mjerenje boje laboratorijske (kongresne) sladovine (MEBAK 2, 1999.). Analize su provedene u laboratoriju Osječke pivovare d.o.o.

Princip rada:

Metoda se zasniva na mjerenju ekstinkcije u kiveti od 10 mm na valnoj duljini od 430 nm. Boja u jedinicama EBC dobije se preračunavanjem uz primjenu pogodnog faktora.

3.3.1.4 Gorčina (BI)

Gorčina piva pokazatelj je stalne kvalitete te jako utječe na okus piva, a određuje se mjerenjem udjela α i ß gorkih kiselina u pivu spektrofotometrijskom metodom (Marić 2009.). Uz to pokazatelj je i kvalitete uporabljenog hmelja. Najvažniji gorki sastojci u sladovini i pivu su izo-α kiseline. Osim toga u sladovini i pivu ima i drugih derivata gorkih kiselina hmelja, naročito proizvoda oksidacije, koji također doprinosi gorčini. (MEBAK 2, 1999.).

Princip rada:

Gorke supstance, u prvom redu izo-a-kiseline se iz zakiseljenog uzorka ekstrahiraju izo-oktanom i koncentracija u ekstraktu im se određuje spektrofotometrijski (MEBAK 2, 1999.) Gorčina ispitivanoga piva je određena prema metodi **MEBAK 2.22.1.** u Pivovari Osijek d.o.o.

Fenolni spojevi:

Fenolni spojevi u pivo dospijevaju iz slada i hmelja pri čemu njihova količina zavisi od tehnoloških zahvata u proizvodnji. Ovisno o strukturi i veličini molekula ti spojevi utječu na različite pokazatelje kvalitete piva, kao što su boja, okus, pjena i fizikalno-kemijsku stabilnost piva. Pod nepovoljnim okolnostima, kao npr. u slučaju prisustva velike količine spojeva koji se mogu polimerizirati ili kondenzirati ili uz prisustvo kisika iz zraka, tvore spojeve koje se talože s proteinima i koji daju senzorki nepoželjan proizvoda. (MEBAK 2, 1999.).

3.3.1.5 Ukupni polifenoli (PY)

Princip rada:

U lužnatoj sredini polifenoli reagiraju sa željeznim (III) ionima uz nastajanje obojenih kompleksa, dobivena smeđa boja mjeri se spektrofotometrijski (MEBAK 2, 1999.). Analize su provedene u laboratoriju Osječke pivovare d.o.o. Korištena je metoda **MEBAK 2.21.1**.



Slika 37 Spektrofotometar Lambda 25

3.3.1.6 Bistroća/mutnoća (HZ)

Jedna od najznačajnijih karakteristika piva, kako s aspekta proizvođača tako i s aspekta potrošača, jest bistroća piva, odnosno odsustvo svake vidne opalescencije ili mutnoće. Uzrok narušenoj bistroći može biti raznolik, od same sirovine, vođenja procesa, nedovoljne oštrine filtracije, fizikalno-kemijske nestabilnosti, promjena koje se dešavaju nakon otakanja piva do mikrobiološke kontaminacije (Štefanić, Marić 1990.).

Princip rada:

Mjerenje stalne mutnoće u gotovom pivu na 20°C. Svjetlost, od tungsten izvora koji se rasipa od suspendirane i/ili koloidne tvari u uzorku, mjeri se na 90°. Intenzitet rasute svjetlosti od strane uzorka koji se mjeri i standardne formazinske otopine se uspoređuje i izražava u EBC jedinicama (MEBAK 2, 1999.). Korištena je metoda **MEBAK 2.19.1.2**. Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 38 Turbidimetar LabScat Sigrist

3.3.1.7 Otopljeni kisik (DO u ambalaži)

Princip rada:

Za određivanje koristi se elektrokemijska metoda pomoću Digox uređaja, koji mjeri difuzijske struje na graničnoj površini pri redukciji kisika na srebrnoj elektrodi (Marić, 2009.). Mjerenja su vršena u Pivovari Osijek d.o.o. metodom **EBC Ann. 9.37**.



Slika 39 Oksimetar Digox 5

3.3.1.8 CO_2/O_2 (CO/DO, tlačni tank)

Kisik izaziva oksidacijske promjene, a to znači nepoželjne promjene okusa i mirisa piva. Stoga se tijekom tehnološkog procesa stalno nadzire udio otopljenog plinovitog kisika u pivu u tlačnim tankovima na ulazu u punilicu. Udio CO_2 odgovoran je za dugu „živost" piva te za pjenivost piva. (Marić 2009.; Kunze 1998).

Princip rada:

Za određivanje koristi se elektrokemijska metoda gdje se sadržaj otopljenoga O_2 određuje pomoću elektroda katode (zlato ili platina) i anode (srebro). Uspostavlja se struja elektrona koja odgovara broju molekula O_2 reduciranoj na katodi, koja se mjeri ampermetrom. Ona je proporcionalna parcijalnom tlaku O_2. Zahvaljujući tome prema Henry-jevom zakonu se, uzimajući u obzir koeficijent topivosti kisika, može izračunati koncentracija O_2. U uređaju za mjerenje CO_2 pomoću električnih impulsa se preko platinastih elektroda oslobađa CO_2 iz piva sve dok se ne uspostavi ravnotežni tlak. Na osnovu očitanoga pritiska i temperature piva određuje se sadržaj CO_2. (MEBAK 2, 1999.; Priručnik CO_2/O_2 Norit Haffmans c-DGM-om, 2008.). Korištena metoda **MEBAK 2.37.1.2.2, 2.35.1.1**. Mjerenja su provedena u proizvodnome pogonu Osječke pivovare d.o.o.



Slika 40 CO_2/O_2 Norit Haffmans c-DGM-om

3.3.1.9 Pjena (FO)

Stabilnost pjene piva važan je pokazatelj kvalitete koji se stalno mora kontrolirati. Količina nastale pjene ovisi o sadržaju ugljičnoga dioksida u pivu, koji svaka pivovara može podesiti na željenu vrijednost. Pjenušavost i stabilnost pjene nasuprot tomu pokazatelji su koji ovise o sastavu piva (sadržaj bjelančevinastih supstanci s molekulskom masom preko 12000 Daltona, glikoproteidi, izohumuloni,α-glukani, teški metali) (MEBAK 2, 1999.).

Stabilnost pjene (Metoda sipanja u čašu po Ullmann-u i Pfenningeru):

Princip rada:
Sastoji se u ravnomjernom sipanju piva u čaše s određene visine i mjerenja vremena dok se ne pojavi prva slobodna površina tečnosti (piva). Korištena metoda **MEBAK, 2.23.1.** Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 41 Mjerenje trajnosti pjene prema Ullmann i Pfenningeru

3.3.1.10 Sadržaj zraka u boci i limenci (Al)

Na kraju, udio kisika određuje se u pivu natočenom u ambalažu u pri čemu se mjeri ukupni kisik u pivu, dakle otopljeni i plinoviti kisik što zaostaje u praznom prostoru ambalaže (boce ili limenke). Ukratko, plinoviti se kisik istiskuje iz grla boce u lijevak ispunjen vodom, a zatim se polako vodi kroz kolonu s otopinom natrijeve lužine u kojoj se „hvata” CO_2**.** Preostali plinovi,

zrak koji sadrži i dušik i kisik, odlaze u biretu u kojoj se očitavaju kao zrak u grlu boce (Marić, 2009).

Princip rada:

Radi visoke razine uklopljenog zraka ili otopljenog kisika, često su prisutni problemi s karbonizacijom, intenzivnim pjenjenjem, lošim okusom, korozijom limenki, zatvarača ili stvaranjem rupica u limenci. Ovom metodom uvodi se cjelokupna količina plina iz boce, limenke u kalibriranu biretu, napunjenu lužnatom otopinom. Zrak će zamijeniti volumen otopine i može se očitati direktno iz birete. CO_2, prisutan u boci ili limenci bit će apsorbiran u lužini. Korištena je metoda **MEBAK, 2.37.2.2**. Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.

3.3.1.11 Određivanje CO_2 u boci i limenci (CO)

Sadržaj otopljenoga CO_2 važan je pokazatelj kakvoće piva, doprinosi „recentnosti" piva. Piva u kojima je sadržaj CO_2 manji imaju „bljutav", prazan okus. CO_2 je odgovoran za nastajanje pjene piva. Osim toga pod utjecajem CO_2 mijenjaju se pragovi osjećaja okusa i mirisa drugih sastojaka piva (MEBAK 2, 1999.).

Princip rada:

Metode se temelje na Henry-Dalton-ovom zakonu po kojemu je na datoj temperaturi koncentracija idealnoga plina otopljenoga u nekoj tekućini proporcionalna parcijalnom tlaku plina u plinskoj fazi, ako se uspostavi ravnotežno stanje. To ravnotežno stanje realizira se putem snažnoga mućkanja piva. Za mjerenje ukupnoga tlaka koristi se manometar. Kod piva u bocama u slobodnome prostoru ambalaže (grlo boce) uvijek je prisutna izvjesna količina zraka, uslijed čega se parcijalni tlak CO_2 mijenja. Kako bi se dobili točni rezultati mora se prvo odrediti sadržaj zraka u pivu tj. ambalaži. (MEBAK 2, 1999.) Primijenjena metoda **MEBAK 2.35.1** (manometrijski metodi). Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 42 Ukupni sadržaj zraka u boci (limenci), Inpack 2000 Air Meter IAM, CO_2 senzor kalkulatr ICC 2000

3.3.1.12 Test trajnosti (HF) (engl. *haze forcing test*)

S vremenom pivo postaje mutno. To je uglavnom posljedica reakcije između polifenola i proteina zaostalih u pivu (Cota 2008.). Koloidne čestice, prirodni sastojci piva, izazivaju njegovo zamućenje tijekom čuvanja u ambalaži, nakon dužeg vremena skladištenja. Razlikuju se dvije vrste zamućenja:

- hladno ili prolazno,
- trajno ili starosno.

Prva vrsta zamućenja događa se tijekom čuvanja piva u hladnjaku pri -2 ºC do +5 °C kada se molekule koloidnih sastojaka piva (proteina i polifenola) zbog Brownovog gibanja međusobno povezuju vodikovim mostovima tvoreći labilne veze i povećavaju tj. stvaraju veće agregate. Zatim se na njih vežu i mali udjeli ugljikohidrata i mineralnih sastojaka (soli teških metala), pivo se zamuti. No, kada se pivo izvadi iz hladnjaka i zagrije na sobnu temperaturu labilne veze pucaju i pivo se izbistri. Ova vrsta zamućenja s vremenom prelazi u trajno zamućenje. koje se ne gubi nakon zagrijavanja i naziva starosna mutnoća (Marić 2009).

Princip rada:

Kako bi predvidjeli i ocijenili koloidnu stabilnost piva do isteka roka trajnosti, reakcije između reaktivnih komponenti ubrzavaju se (forsiraju) podvrgavanjem piva precizno definiranim povišenim temperaturama u precizno definiranom trajanju, *forsing* metoda. Poslije faze zagrijavanja pivo se hladi i drži na 0 °C, a zatim mu se mjeri bistroća. Mjerenje i određivanje hladne mutnoće pokazatelj je kako će se isto pivo ponašati nakon duljeg skladištenja na sobnoj temperature ili u tijekom predviđenog roka trajnosti (realni rok trajanja). Razne pivovarske kompanije definirale su, modificirale (EBC Ann. 9.30) forsing test metodu: pivo se drži na t = 60 °C 6 dana, hladi, a zatim drži na t = 0 °C 24 sata. Nakon toga se, na t = 0 °C, mjeri bistroća pod kutem od 90° (Krstanović 2000.). Korištena modificirana metoda **EBC Ann. 9.30.** Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 43 Cirkulatorni grijač/hladnjak Julabo F38-EH



Slika 44 Mjerenje bistroće/mutnoće poslije toplo-hladnog tretmana

3.3.1.13 Ukupni pakirani kisik (TPO)

Samo na osnovu određivanja ukupnoga sadržaja kisika u pivu u bocama ili limenkama može se ocijeniti u kolikoj je mjeri ono ugroženo od prisutnoga kisika. Ukupan kisik obuhvaća kisik koji je otopljen u pivu i kisik iz plinskoga prostora ambalaže. (MEBAK 2, 1999.). Metoda se može koristiti za određivanje ukupnog sadržaja kisika u limenci ili boci piva odmah nakon pakiranja (punjenja) i zatvaranja ambalaže, a prije daljnjeg procesuiranja, npr. pasterizacije. Metodom se detektira i mjeri kisik u pivu i praznom prostoru grla boce (limenke). Na analizu ne utječu dušik i CO_2 (EBC Ann. 11.5, 2010.).

Princip rada:

Četiri limenke ili boce piva uzorkuju se odmah nakon zatvaranja i jako mućkaju (okretač boca, Bottle Turner BT-002) kako bi se uspostavila ravnoteža između kisika u tekućoj fazi (pivu) i plinovitoj fazi (prazni prostor u grlu boce/limenke). Pivo se propušta kroz kalibrirani mjerač kisika, pod pritiskom CO_2 ili dušika i na taj način se određuje koncentracija otopljenog kisika u tekućoj fazi. Mjeri se volumen tekuće faze, volumen praznog prostora u grlu boce i temperatura piva. Rezultati mjerenja koriste se za izračun ukupnog pakiranog kisika. Korištena metoda **EBC Ann. 11.5.** Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 45 Okretač boca BT-002, LG-automatic aps., Oksimetar Digox 5

3.3.2.Određivanje lako hlapljivih komponenti

Tijekom fermentacije sladovine uslijed metabolizma kvasca, pored etanola, nastaje niz lako hlapljivih (isparljivih) supstanci s intenzivnom aromom (izuzev dimetil sulfida koji je sastojak sladovine). Neki spojevi mogu nastati i mikrobiološkom kontaminacijom sladovine i piva. Određuju se: acetaldehid, DMS, etil acetat, izoamil acetat, propanol, izobutanol, izoamil alkohol, diacetil i pentandion. Korištena metoda zasniva se na analizi plina iz plinskoga prostora (MEBAK 3, 2009.). Određivanje se vrši u uzorku plinske faze koja se nalazi u ravnoteži s pivom na određenoj temperature (engl. *headspace* metoda) (Štefanić; Marić, 1990.). Rezultati različitih komponenti preračunavaju se iz površine ispod pik-a u korelaciji s relevantnim internim standardima. DMS, diacetil, pentandion izraženi su u ppb (µg/l) bez decimala; sve ostale komponente su izražene u ppm (mg/l) i zaokružene na jednu decimalu (Cota, 2008.). Metoda je primjenjiva na sve vrste piva: u procesu i gotov proizvod. Analize su provedene u laboratoriju odjela kontrole kvalitete Zagrebačke pivovare d.d. na GC Perkin Elmer Clarus 580, po metodi **EBC Ann.9.39, 9.24.2**. Provedena su dva uzastopna mjerenje, prikazani rezultati srednje su vrijednosti mjerenja.

Princip rada:

Mjerenje plinskom kromatografijom.

Dva detektora FID (detektor ionizacije plamena, engl. *flame Ionization detector*) i ECD (detektor za „hvatanje“ elektrona, engl. *electron capture detector*) koriste se paralelno za mjerenje svih komponenata u jednom krugu. Kada se postigne ravnoteža između tekuće i plinske faze, dio plinske faze injektira se u GC i analizira.

Aparatura i ostala oprema:

Kromatograf:

1. Osnovna GC jedinica + Headspace auto sampler:

- GC: Perkin Elmer Clarus 580
- uzorkovač (engl.*headspace sampler*): Turbomatrix 40
- mikrometar

2. Kapilarna kolona: Elite – WAXETR

- duljina: 60 m
- unutarnji promjer: 0,32 mm
- vanjski promjer: 0,45 mm
- tekuća faza CP WAX 52 C.B
- debljina filma: 1,0 µm

3. Detektori: (FID i ECD)

4. Softver: Integralni link s radnom stanicom + PC (Turbochrom)

5. Plinovi:

- vodik minimalna čistoća = 4,5
- dušik i/ minimalna čistoća = 4,8

  Ili helij minimalna čistoća = 4,6
- komprimirani zrak
- argon / metan (95/5)

Validacija i razvoja metode korištene za mjerenja provedena na plinskom kromatografu prikazani su u **Prilogu 7**.



Slika 46 Plinski kromatograf (GC) Clarus 580

3.3.3. Mikrobiološka kontrola i analize

Tradicionalne metode mikrobiološke detekcije u pivovarama započinju nacjepljivanjem uzoraka na specifične podloge (selektivne ili neselektivne), nakon čega slijedi inkubacija pod strogo definiranim uvjetima (željena temperatura, aerobni ili anaerobni uvjeti) tijekom točno određenog vremena. Nacjepljivanje mikroorganizama na hranjive podloge u petrijevkama i njihov rast u obliku vidljivih kolonija nije dovoljno osjetljiva metoda kada uzorci sadrže mali broj mikrobnih stanica. U takvim slučajevima koristi se metoda obogaćivanja tj. filtracije uzoraka kroz membranu (prosječni promjer pora 0,22 – 0,45 μm), prije nacjepljivanja (Marić 2009.).

Sladovinski (WA) agar:

Medij za određivanje divljih kvasaca (roda *Saccharomyces,* te sojevi iz rodova *Brettanomyces, Torulopsis, Hansenula, Candida*) i kulturnih kvasaca *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), mogući je i rast bakterija.

Metoda:

- MF (membranska filtracija) ili(1 mL uzorka na podlogu), (bris 1/10 mL)
- inkubacija: anaerobno, 27 ± 1 °C / 7 dana, tlak CO_2 (0,5 – 0,7 bar).

Korištena metoda **EBC Ann. 4.3.2.2**

MRSagar(de Man, Rogosa , Sharpe agar):

Medij za detekciju mliječno kiselih bakterija (*Lactic bacteria, Pediococcus*).

Metoda:

- MF (membranska filtracija) ili (1 mL uzorka na podlogu), (bris 1/10 mL)
- inkubacija: anaerobno 27 ± 1° C / 7 dana, tlak CO_2 (0,5 – 0,7 bar).

Korištena metoda **EBC Ann. 4.2.4.2**

WA (aerobno)

Medij za određivanje i brojenje kvasaca i plijesni, detekciju bakterija.

Metoda**:**

- MF (membranska filtracija) ili (1 mL uzorka na podlogu)
- inkubacija: aerobno, 27 ± 1 °C/72 sati.

Korištena metoda **EBC Ann. 4.1.2, 2.3.4.2**

Analize su provedene u Pivovari Osijek d.o.o.



Slika 47 Mikrobiološke podloge WA,MRS, mikroskop Olympus BX 41 TF



Slika 48 Membranska filtracija i nacijepljene podloge



Slika 49 Anaerobni lonac s mikrobiološkim podlogama i inkubator Memmert

4. REZULTATI

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PIVA

U **Tablicama 15** do **19** slijedi prikaz rezultata mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava piva u tlačnom tanku i različitim ambalažama (staklo, PET, limenka i bačva) skladištenog tijekom 6 mjeseci, te sladnoga pils piva skladištenog u staklenoj ambalaži.

Tablica 15 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i staklenoj ambalaži tijekom 6 mjeseci (AI 0,20 mL, HF 3,2 EBC, TPO 46 ppb)

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g /mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
TT	10,98	2,14	1,0083	4,69	4,4	6,6	19	97	0,37	74	5,1	
0	10,98	2,14	1,0083	4,68	4,4	6,6	19	97	0,27	35	5,3	>9
1	11,02	2,16	1,0083	4,69	4,4	6,8	18	95	0,28	30	5,1	8
2	11,02	2,18	1,0084	4,69	4,4	7,8	19	104	0,29	29	5,4	9
3	10,94	2,14	1,0084	4,68	4,4	7,5	19	104	0,29	29	5,2	9
4	10,98	2,15	1,0084	4,69	4,4	7,5	18	105	0,31	29	5,3	9
5	10,96	2,14	1,0084	4,67	4,4	7,5	19	104	0,35	29	5,4	8
6	10,98	2,15	1,0083	4,68	4,4	7,5	18	102	0,40	29	5,2	9
$\bar{x}$	10,98	2,15	1,0084	4,68	4,40	7,31	18,57	101,57	0,31	30,00	5,28	8,73
s	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,44	0,53	3,95	0,05	2,24	0,10	0,50
CV	0,27	0,68	0,01	0,16	0,00	5,98	2,88	3,89	14,85	7,45	1,82	5,72

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), AI (zrak), HF (test trajnosti), TPO (ukupni pakirani kisik)

Tablica 16 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i PET ambalaži tijekom 6 mjeseci (AI 0,20 mL, TPO 58 ppb)

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g /mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
TT	10,98	2,14	1,0083	4,69	4,4	6,6	19	97	0,37	74	5,1	
0	10,98	2,14	1,0083	4,69	4,4	6,6	19	97	0,33	40	5,4	>9
1	10,98	2,16	1,0083	4,68	4,4	7,8	19	91	0,29	50	4,6	6
2	11,05	2,17	1,0084	4,69	4,4	8,8	18	103	0,32	53	4,5	6
3	11,02	2,16	1,0084	4,69	4,4	9,5	18	104	0,44	78	4,2	6
4	11,05	2,15	1,0084	4,68	4,4	10,0	18	105	0,52	90	4,1	6
5	10,96	2,14	1,0084	4,67	4,4	10,1	18	105	1,60	100	4,0	5
6	10,99	2,15	1,0083	4,68	4,4	10,6	17	103	3,07	118	3,7	4
$\bar{x}$	11,00	2,15	1,0084	4,68	4,40	9,06	18,14	101,14	0,94	75,57	4,34	6,01
s	0,04	0,01	0,00	0,01	0,00	1,43	0,69	5,24	1,05	28,98	0,55	1,56
CV	0,33	0,52	0,01	0,16	0,00	15,77	3,80	5,18	111,56	38,35	12,57	25,94

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), AI (zrak), TPO (ukupni pakirani kisik)

Tablica 17 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i limenkama tijekom 6 mjeseci (AI 0,20 mL, HF 5,8 EBC, TPO 85 ppb)

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g/mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
TT	10,80	2,45	1,0096	4,43	4,4	9,2	17	101	0,50	80	5,0	
0	10,74	2,44	1,0095	4,40	4,4	9,2	17	100	0,34	60	5,0	7
1	10,73	2,44	1,0095	4,40	4,4	9,3	18	100	0,40	60	5,0	7
2	10,74	2,44	1,0095	4,40	4,3	9,7	18	102	0,40	60	5,0	7
3	10,77	2,45	1,0095	4,41	4,4	9,8	18	102	0,43	60	5,0	8
4	10,74	2,44	1,0095	4,39	4,4	10,0	18	101	0,53	50	5,0	7
5	10,78	2,46	1,0095	4,41	4,4	10,9	17	101	0,73	50	5,1	7
6	10,80	2,45	1,0095	4,40	4,4	10,9	18	102	0,77	50	5,0	7
$\bar{x}$	10,76	2,45	1,0095	4,40	4,39	9,97	17,71	101,14	0,51	55,71	4,99	7,14
s	0,03	0,01	0,00	0,01	0,04	0,69	0,49	0,90	0,17	5,35	0,05	0,38
CV	0,24	0,32	0,00	0,16	0,86	6,94	2,75	0,89	33,28	9,59	1,07	5,29

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), AI (zrak), HF (test trajnosti), TPO (ukupni pakirani kisik)

Tablica 18 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i bačvama tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g/mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
TT	10,72	2,50	1,0097	4,36	4,4	8,4	18	102	0,28	99	5,2	
0	10,75	2,50	1,0097	4,37	4,4	8,4	18	102	0,27	88	5,3	7
1	10,69	2,50	1,0097	4,34	4,4	8,5	18	101	0,30	40	5,6	7
2	10,71	2,50	1,0097	4,36	4,4	8,5	18	102	0,33	30	5,5	7
3	10,73	2,49	1,0097	4,36	4,4	8,7	18	101	0,34	30	5,5	7
4	10,69	2,47	1,0097	4,36	4,4	8,7	18	101	0,35	25	5,6	7
5	10,78	2,52	1,0097	4,38	4,4	9,0	18	102	0,43	25	5,5	7
6	10,69	2,49	1,0097	4,35	4,4	9,2	17	101	0,53	25	5,5	7
$\bar{x}$	10,72	2,50	1,0097	4,36	4,40	8,71	17,86	101,43	0,36	37,57	5,48	7,00
s	0,04	0,02	0,00	0,01	0,00	0,29	0,38	0,53	0,09	22,87	0,11	0,00
CV	0,33	0,61	0,00	0,30	0,00	3,34	2,12	0,53	24,24	60,87	2,08	0,00

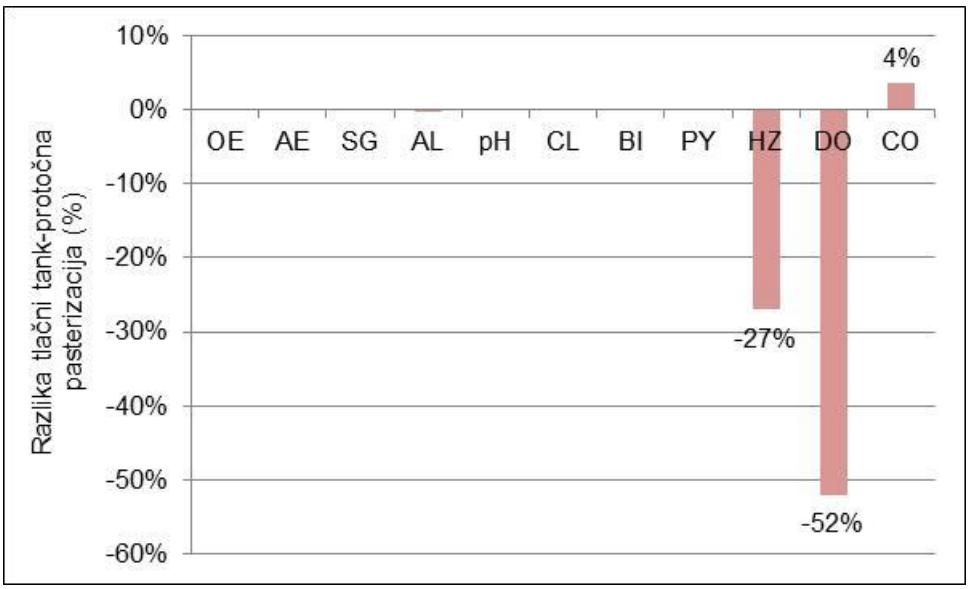
OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2)

Tablica 19 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava pils (sladnog) piva u tlačnom tanku (TT) i staklenoj ambalaži tijekom 6 mjeseci (AI 0,21 mL, HF 8,2 EBC, TPO 72 ppb)

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g/mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
TT	11,47	2,60	1,0101	4,72	4,5	6,6	17	157	0,40	90	5,0	
0	11,47	2,59	1,0100	4,72	4,5	6,6	17	157	0,30	50	5,3	9
1	11,43	2,58	1,0100	4,71	4,5	6,6	17	157	0,31	50	5,1	9
2	11,45	2,59	1,0100	4,72	4,5	7,2	17	158	0,34	50	5,0	9
3	11,47	2,60	1,0100	4,72	4,5	7,7	16	158	0,36	47	5,1	9
4	11,48	2,60	1,0100	4,73	4,5	7,8	16	150	0,38	40	5,2	8
5	11,46	2,60	1,0102	4,71	4,5	8,2	17	159	0,43	40	5,0	8
6	11,42	2,59	1,0100	4,70	4,5	9,0	17	157	0,55	40	5,2	8
$\bar{x}$	11,45	2,59	1,0100	4,72	4,50	7,58	16,64	156,50	0,38	45,29	5,13	8,57
s	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,87	0,48	2,96	0,09	5,06	0,11	0,53
CV	0,19	0,29	0,01	0,21	0,00	11,51	2,86	1,89	22,63	11,17	2,20	6,24

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), AI (zrak), HF (test trajnosti), TPO (ukupni pakirani kisik)

Slike 50 i **51** prikazuju promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom punjenja korištenjem protočne i tunelske pasterizacije



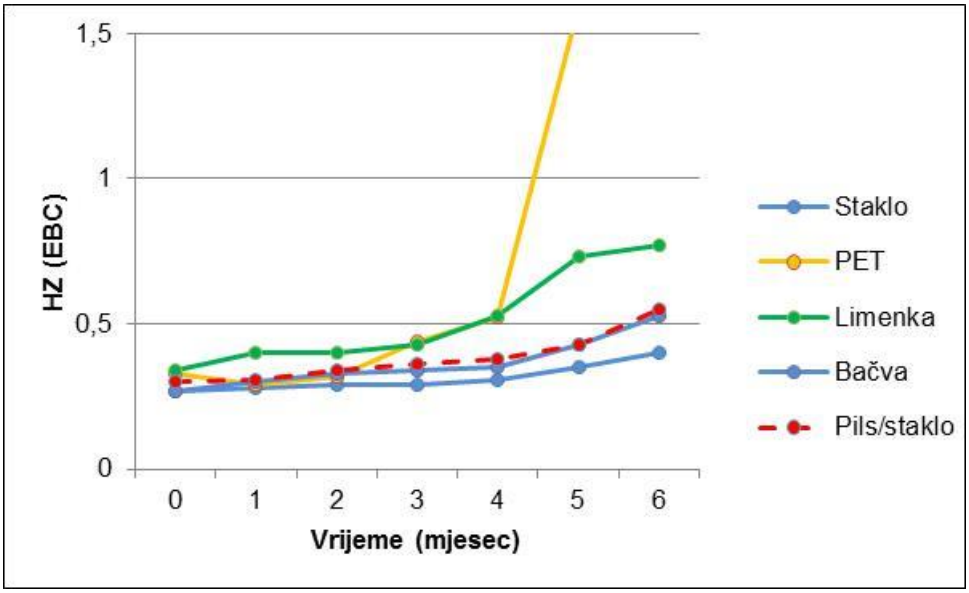
OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2)

Slika 50 Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava piva prije i nakon protočne pasterizacije (staklena ambalaža 0,50 L, 22 – 26 *PU*)

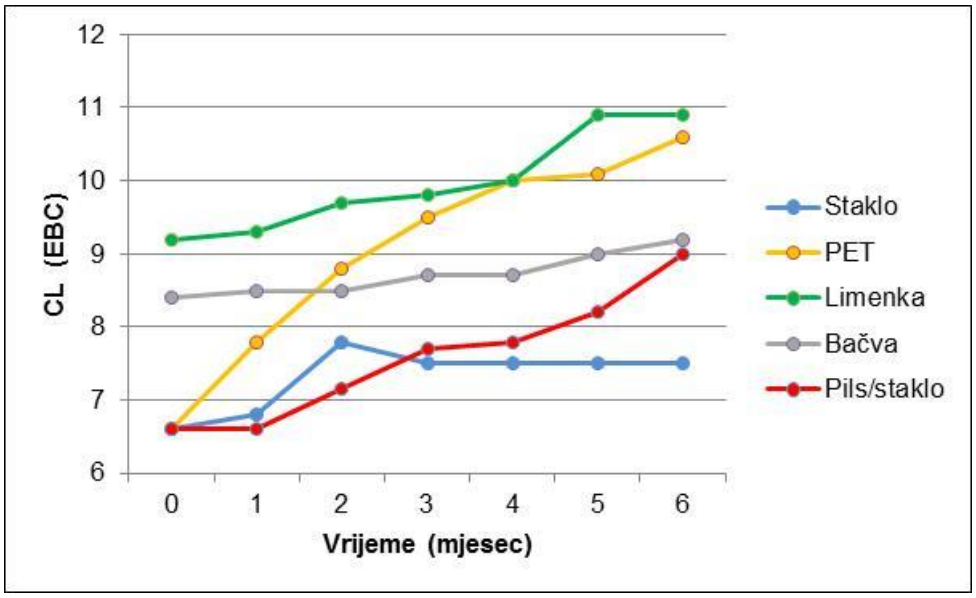


OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2)

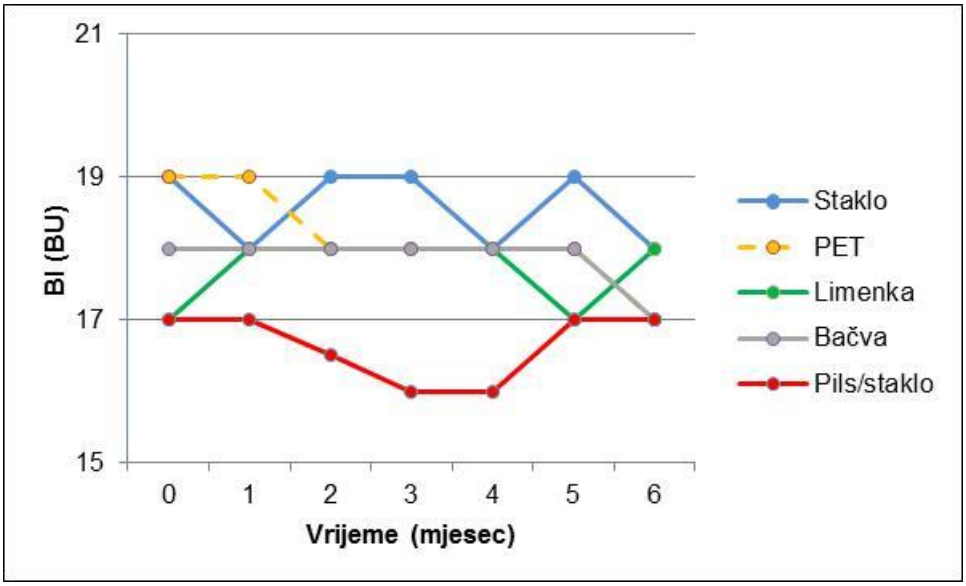
Slika 51 Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava piva prije i nakon tunelske pasterizacije (limenka 0,50 L, 26 – 30 *PU*)



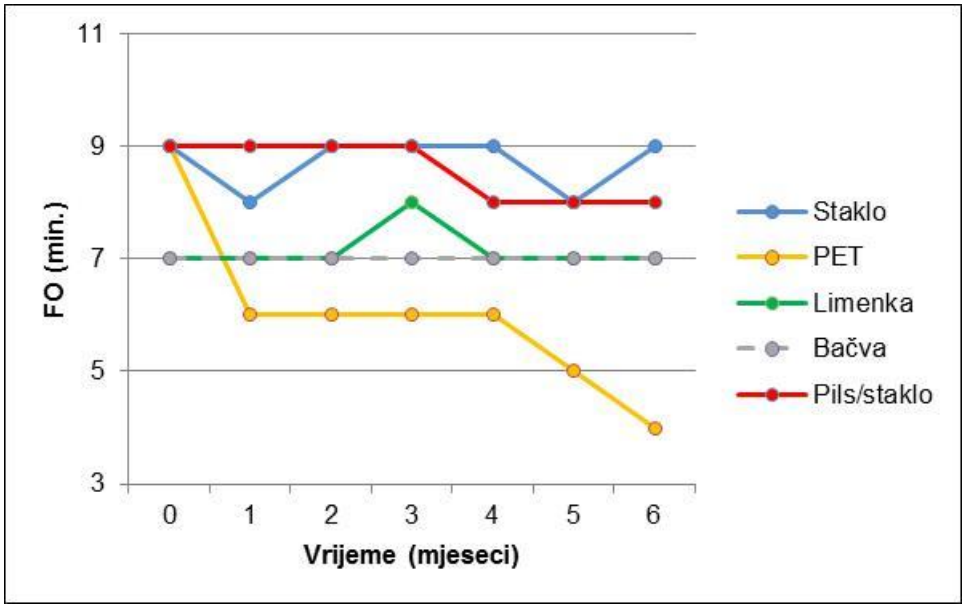
Slika 52 Promjena bistroće (HZ) piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



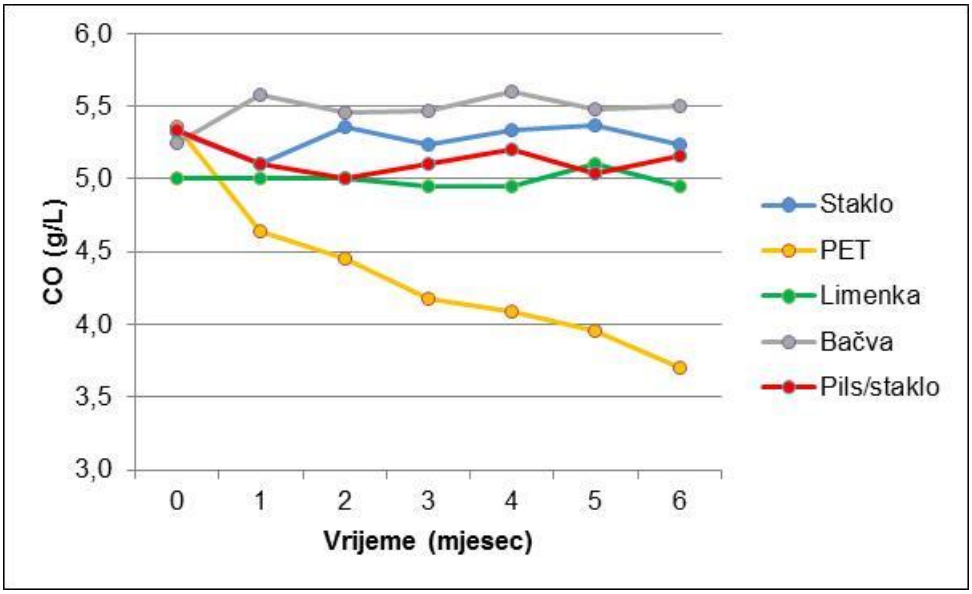
Slika 53 Promjena boje (CL) piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



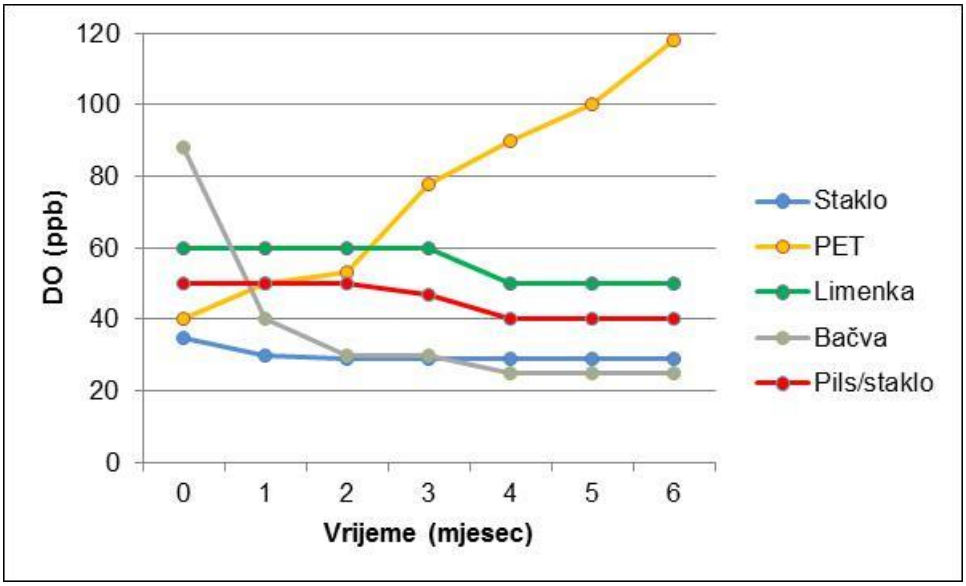
Slika 54 Promjena gorčine (BI) piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 55 Promjena trajnosti pjene (FO) piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 56 Promjena sadržaja CO_2(CO) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 57 Promjena otopljenog kisika (DO) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži

4.2. LAKO HLAPLJIVE KOMPONENTE PIVA

U **Tablicama 20** do **24** slijedi prikaz rezultata mjerenja lako hlapljivih komponenti piva u tlačnom tanku i različitim ambalažama (staklo, PET, limenka i bačva) skladištenog tijekom 6 mjeseci, te sladnoga pils piva skladištenog u staklenoj ambalaži.

Tablica 20 Rezultati mjerenja lako hlapljivih komponenti svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i staklenoj ambalaži tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
mjesec	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
TT	2,4	27	9,4	7	12,6	6,9	8,7	0,6	55,1	76,4	10,0
0	2,4	27	9,6	7	12,8	7,1	8,9	0,6	56,2	77,9	10,2
1	3,0	48	9,4	8	12,0	9,0	8,6	0,5	56,0	76,6	9,9
2	3,0	53	9,4	9	12,3	8,2	8,7	0,6	57,0	78,0	9,9
3	3,0	52	9,2	10	12,2	9,0	8,6	0,5	57,0	78,0	9,7
4	3,5	47	9,3	9	12,8	7,4	8,9	0,5	59,0	81,0	9,8
5	3,9	63	9,5	10	12,5	13,5	8,8	0,6	58,4	80,0	10,1
6	3,6	48	9,3	12	12,2	12,0	8,7	0,5	58,0	79,0	9,8
$\bar{x}$	3,20	48,34	9,39	9,33	12,40	9,46	8,74	0,53	57,37	78,64	9,91
s	0,50	10,73	0,13	1,53	0,31	2,40	0,13	0,04	1,13	1,48	0,18
CV	15,62	22,19	1,43	16,45	2,51	25,39	1,46	6,99	1,97	1,88	1,79

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Tablica 21 Rezultati mjerenja lako hlapljivih komponenti svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i PET ambalaži tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
mjesec	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
TT	2,4	27	9,4	7	12,6	6,9	8,7	0,6	55,1	76,4	10,0
0	2,5	25	9,6	7	13,7	6,9	8,7	0,6	57,1	79,5	10,2
1	4,3	40	9,5	14	12,0	15,0	8,6	0,6	58,0	79,0	10,1
2	5,3	6	9,4	10	12,5	16,0	8,8	0,6	58,0	79,0	10,0
3	5,6	9	9,2	25	12,0	18,0	8,7	0,5	57,0	78,0	9,7
4	6,2	17	9,4	26	13,0	18,0	9,0	0,5	60,0	82,0	10,0
5	6,9	25	9,9	54	12,9	28,8	9,0	0,6	59,9	82,0	10,5
6	6,4	5	9,7	50	12,8	28,0	9,0	0,6	60,0	82,0	10,3
$\bar{x}$	5,31	18,18	9,53	26,56	12,70	18,68	8,83	0,56	58,57	80,21	10,11
s	1,51	12,73	0,23	18,73	0,61	7,62	0,17	0,05	1,37	1,73	0,25
CV	28,47	70,03	2,40	70,50	4,76	40,83	1,94	8,43	2,34	2,15	2,51

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Tablica 22 Rezultati mjerenja lako hlapljivih komponenti svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i limenkama tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
mjesec	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
TT	2,4	18	8,4	10	15,0	13,0	10,0	0,6	56,0	81,0	9,0
0	2,4	24	8,1	10	14,9	11,6	9,7	0,6	55,7	81,0	8,7
1	2,5	36	8,2	8	15,0	9,2	10,0	0,5	55,0	80,0	8,7
2	3,3	37	9,4	8	12,8	10,5	11,3	0,6	62,8	87,0	10,0
3	3,4	36	9,4	8	12,6	9,6	11,3	0,6	62,0	86,0	10,0
4	3,3	35	9,0	9	12,0	9,0	11,0	0,6	60,0	83,0	9,6
5	3,2	31	9,3	9	13,0	9,0	11,0	0,6	62,0	86,0	9,9
6	3,4	29	9,7	11	13,0	12,0	11,0	0,6	65,0	89,0	10,3
$\bar{x}$	3,06	32,49	9,01	8,90	13,33	10,13	10,76	0,59	60,36	84,57	9,60
s	0,42	4,81	0,63	1,30	1,16	1,26	0,64	0,04	3,73	3,31	0,65
CV	13,86	14,80	6,94	14,64	8,69	12,42	5,95	6,45	6,18	3,91	6,75

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Tablica 23 Rezultati mjerenja lako hlapljivih komponenti svijetloga lager piva u tlačnom tanku (TT) i bačvama tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
mjesec	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
TT	5,3	44	9,2	6	12,0	2,0	10,0	0,6	59,0	81,0	9,8
0	5,2	47	8,9	7	12,0	3,0	10,0	0,5	59,0	81,0	9,4
1	5,3	38	8,6	10	12,0	5,0	10,0	0,5	60,0	82,0	9,1
2	5,7	37	9,2	11	12,0	5,0	10,0	0,6	60,0	82,0	9,8
3	6,0	41	9,2	11	12,0	9,0	10,0	0,6	61,0	83,0	9,8
4	6,1	36	9,3	9	12,2	5,8	10,0	0,6	61,0	83,0	9,9
5	5,8	26	9,0	10	12,0	35,5	9,7	0,5	59,7	82,0	9,5
6	6,0	25	8,5	12	12,3	22,8	9,7	0,5	60,2	82,2	9,0
$\bar{x}$	5,73	35,69	8,96	10,06	12,07	12,30	9,91	0,54	60,13	82,17	9,50
s	0,35	7,81	0,31	1,73	0,13	12,21	0,15	0,05	0,71	0,69	0,36
CV	6,19	21,88	3,46	17,20	1,04	99,28	1,48	9,85	1,18	0,84	3,75

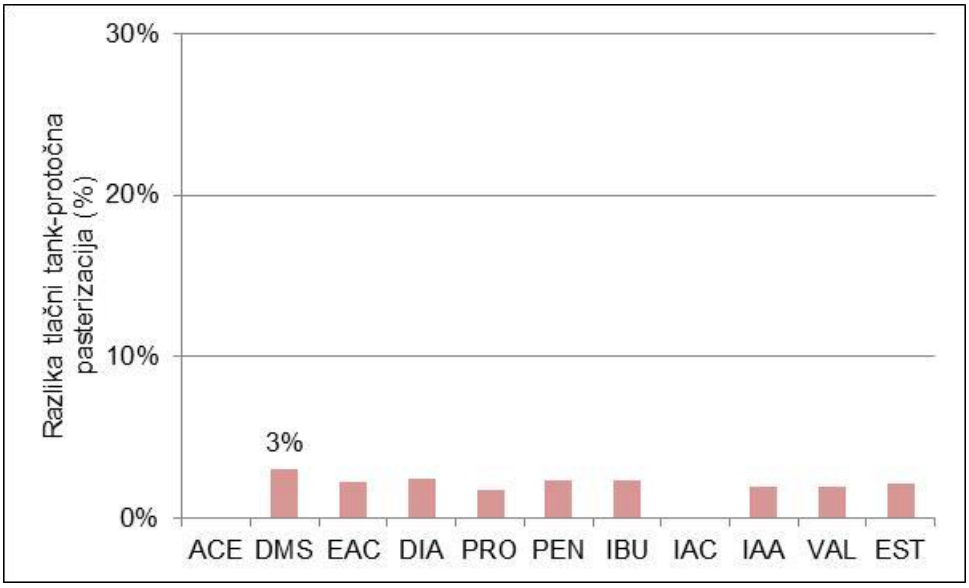
ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Tablica 24 Rezultati mjerenja lako hlapljivih komponenti pils (sladnog) piva u tlačnom tanku (TT) i staklenoj ambalaži tijekom 6 mjeseci

Vrijeme	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
mjesec	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppb	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
TT	1,7	51	8,6	9	12,0	6,0	10,0	0,5	63,0	85,0	9,1
0	1,7	54	8,9	12	12,0	9,0	10,0	0,5	64,0	86,0	9,4
1	2,5	61	8,5	16	12,0	13,0	9,0	0,5	63,0	84,0	9,0
2	2,7	60	8,5	14	12,8	10,1	9,7	0,4	63,9	87,0	8,9
3	2,7	85	8,6	25	12,0	16,0	10,0	0,5	64,0	86,0	9,1
4	2,8	69	8,7	19	13,0	16,0	10,0	0,5	65,0	88,0	9,2
5	2,7	64	8,9	23	13,0	20,0	10,0	0,5	64,0	87,0	9,4
6	2,1	39	8,4	20	16,0	16,1	9,8	0,5	62,2	88,0	8,9
$\bar{x}$	2,45	61,71	8,64	18,44	12,97	14,31	9,79	0,49	63,73	86,57	9,13
s	0,40	14,15	0,21	4,66	1,42	3,85	0,37	0,02	0,89	1,40	0,21
CV	16,32	22,93	2,38	25,29	10,92	26,90	3,75	4,61	1,39	1,61	2,34

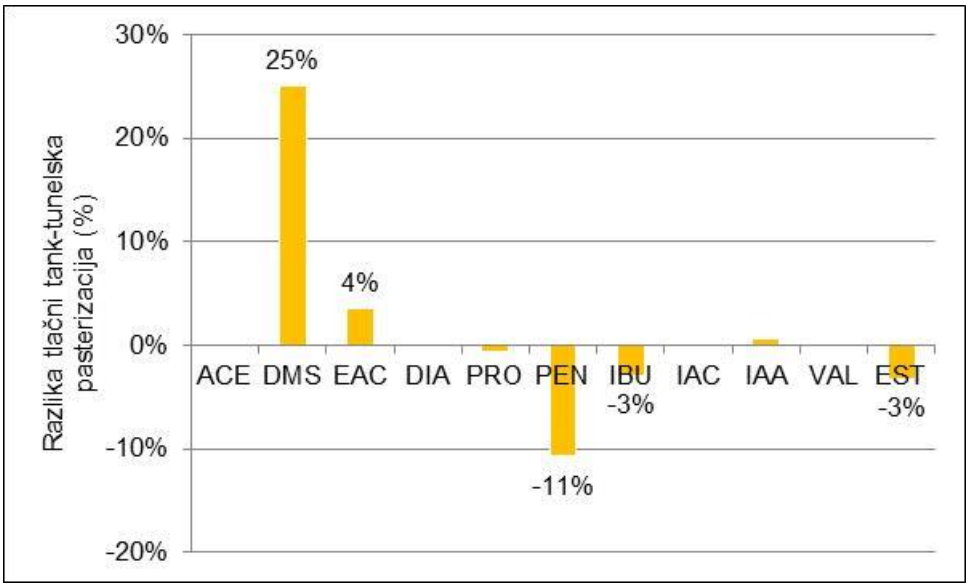
ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Slike 58 i **59** prikazuju promjene sastava lako hlapljivih komponenti piva tijekom punjenja korištenjem protočne i tunelske pasterizacije.



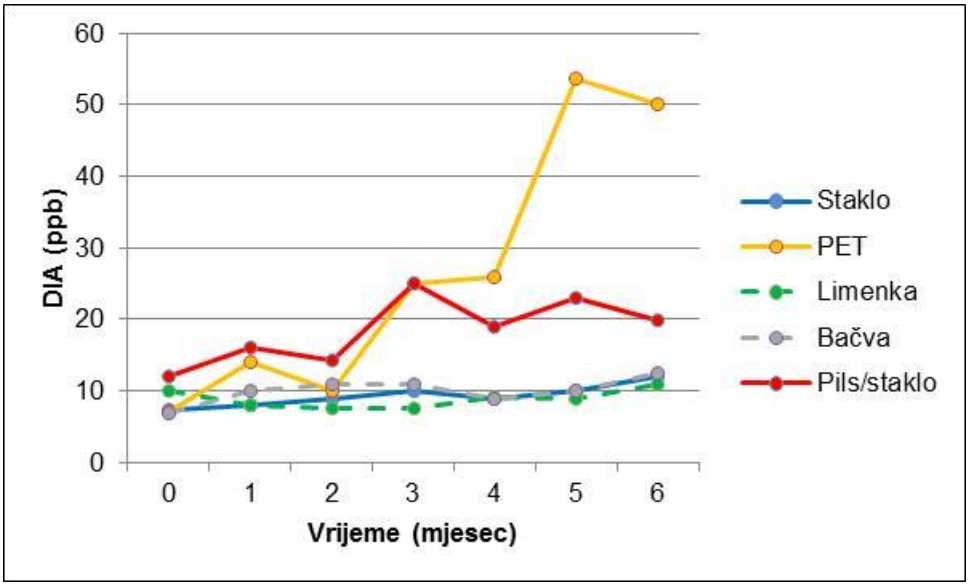
ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Slika 58 Usporedba sadržaja lako hlapljivih komponenti piva prije i nakon protočne pasterizacije (staklena ambalaža 0,50 L, 22 – 26 *PU*)

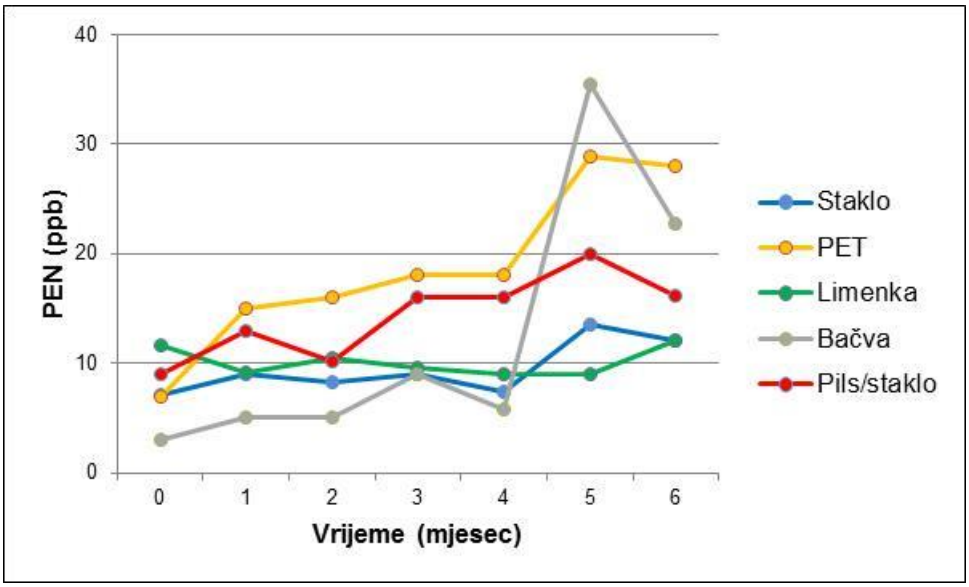


ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

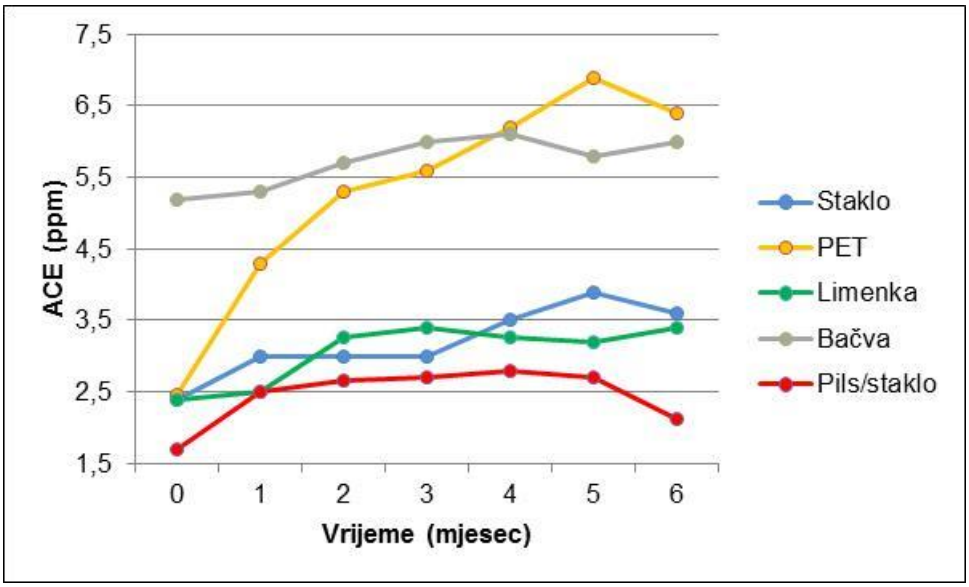
Slika 59 Usporedba sadržaja lako hlapljivih komponenti piva prije i nakon tunelske pasterizacije (limenka 0,50 L, 26 – 30 *PU*)



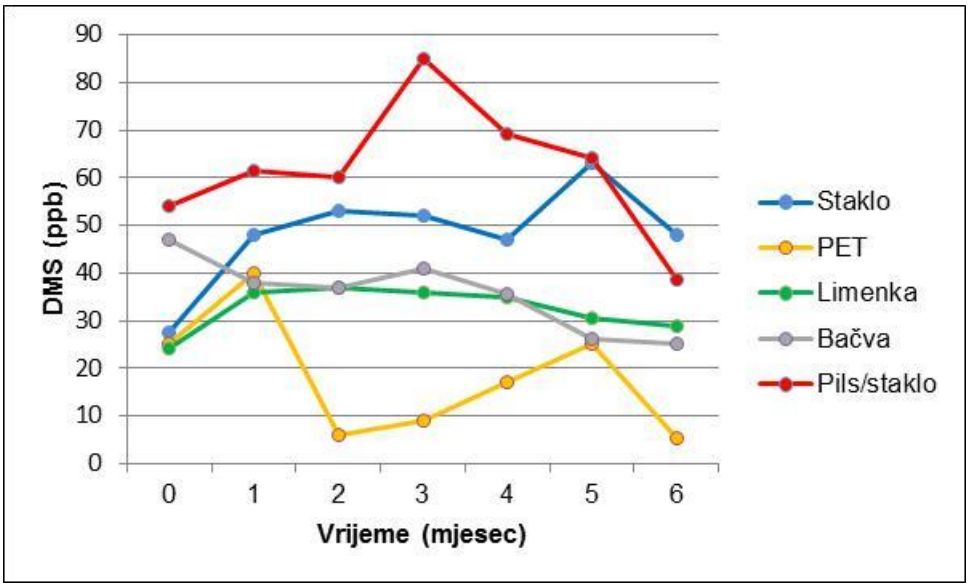
Slika 60 Promjena sadržaja diacetila (DIA) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



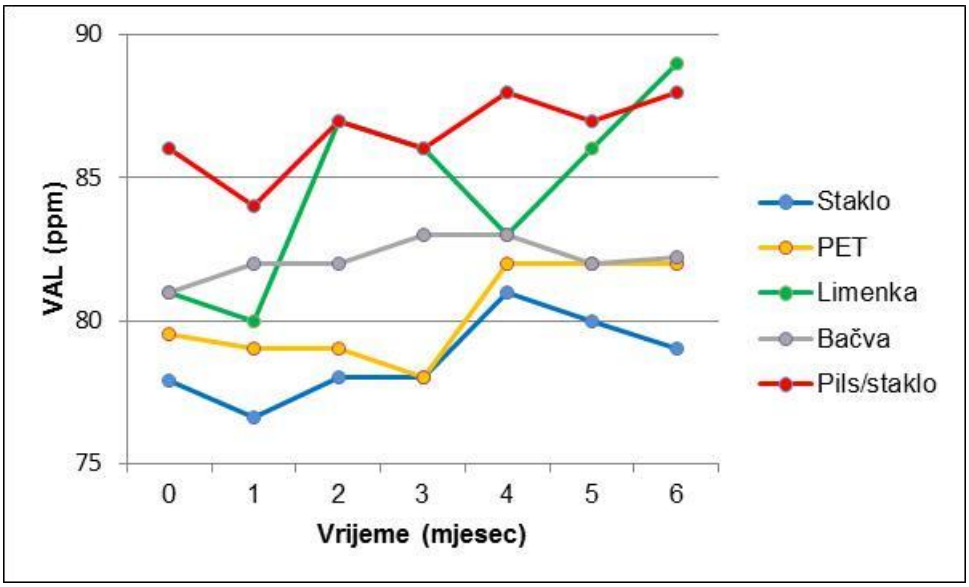
Slika 61 Promjena sadržaja pentandiona (PEN) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



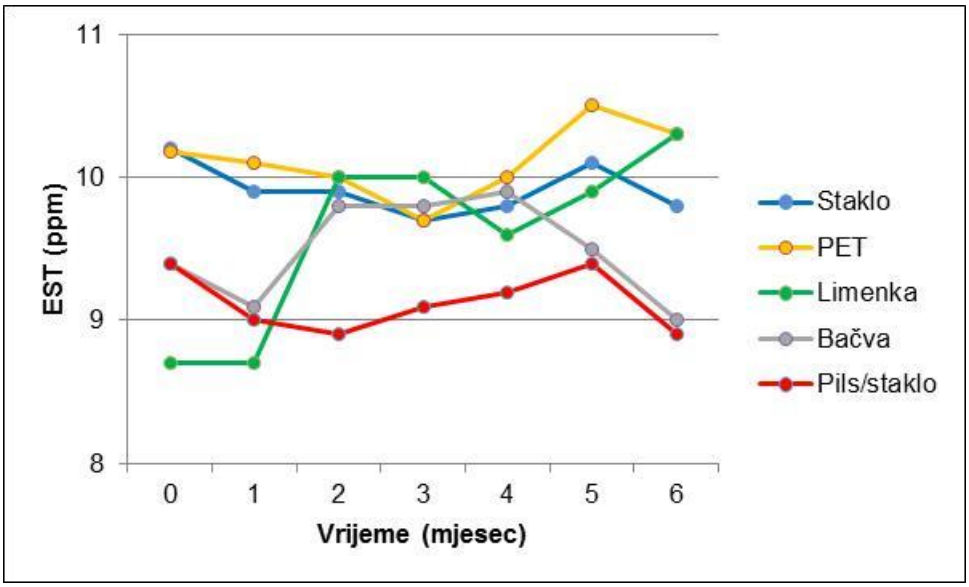
Slika 62 Promjena sadržaja acetaldehida (ACE) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 63 Promjena sadržaja dimetil sulfida (DMS) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 64 Promjena sadržaja viših alkohola (VAL) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži



Slika 65 Promjena sadržaja estera (EST) u pivu tijekom skladištenja u različitoj ambalaži

4.3. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA I ANALIZE

Tablice 25 do **28** prikazuju mjesta uzorkovanja, korištene selektivne podloge (metode) i rezultate mikrobiološke kontrole i analize procesa punjenja piva u ispitivane ambalaže odnosno pakovine.

Tablica 25 Mikrobiološka kontrola i analize punjenja i pakiranja piva u staklenu i PET ambalažu (WA - sladovinski agar, MRS - de Man, Rogosa, Sharpe agar)

	Podloga	WA	MRS	
	Tlačni tank	0	0	
Punionica-Staklo/PET	Podloga	WA	MRS	WA (A)
	Punjač/ulaz	0	0	
	Bris igle	0	0	
	Bris čepa	0	0	
	Bris čepilice	0	0	
	HD (ispirna voda)	0	0	
	Prazna boca I	0	0	
	Prazna boca II	0	0	
	Pivo /izlaz paster.	0	0	
	Pivo/pufer tank	0	0	
	Pivo boca I	0	0	0
	Pivo boca II	0	0	0

Tablica 26 Mikrobiološka kontrola i analize punjenja i pakiranja piva u limenke

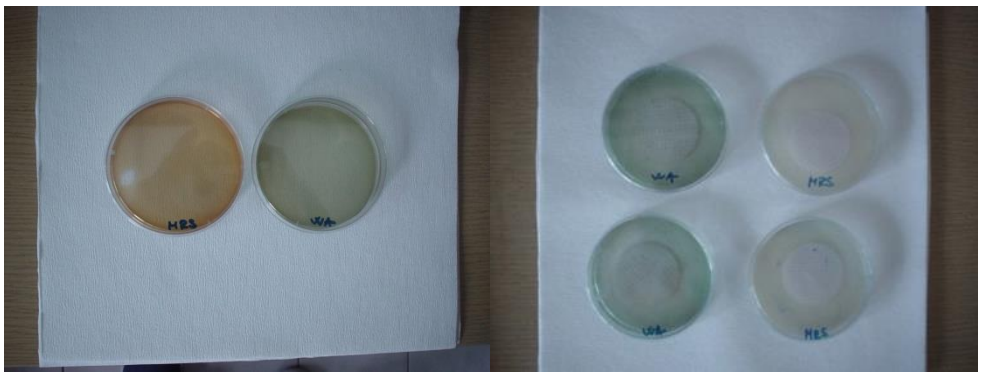
	Podloga	WA	MRS	
	Tlačni tank/cisterna	0	0	
Punionica-Limenke	Podloga	WA	MRS	WA (A)
	Punjač/ulaz	0	0	
	Bris igle	0	0	
	Bris čepa			
	Bris čepilice	0	0	
	Ispirna voda	0	0	
	Prazna limenka I	0	0	
	Prazna limenka II	0	0	
	Pivo/pufer tank	0	0	
	Pivo /izlaz paster.			
	Pivo limenka I	0	0	0
	Pivo limenka II	0	0	0

Tablica 27 Mikrobiološka kontrola i analize punjenja i pakiranja piva u bačve

	Podloga	WA	MRS	
	Tlačni tank	0	0	
Punionica-Bačve	Podloga	WA	MRS	WA (A)
	Punjač/ulaz	0	0	
	Bris igle	0	0	
	Bris čepa			
	Bris čepilice			
	HD			
	Prazna bačva I	0	0	
	Prazna bačva II	0	0	
	Pivo /izlaz paster.	0	0	
	Pivo/pufer tank	0	0	
	Pivo bačva I	0	0	0
	Pivo bačva II	0	0	0

Tablica 28 Mikrobiološka kontrola i analize punjenja i pakiranja pils (sladnog) piva u staklenu ambalažu

	Podloga	WA	MRS	
	Tlačni tank	0	0	
Punionica-Staklo/pils	Podloga	WA	MRS	WA (A)
	Punjač/ulaz	0	0	
	Bris igle	0	0	
	Bris čepa	0	0	
	Bris čepilice	0	0	
	HD Voda	0	0	
	Prazna boca I	0	0	
	Prazna boca II	0	0	
	Pivo /izlaz paster.	0	0	
	Pivo/pufer tank	0	0	
	Pivo boca I	0	0	0
	Pivo boca II	0	0	0



MRS (de Man, Rogosa, Sharpe agar), WA (sladovinski agar)

Slike 66 MRS i WA mikrobiološke podloge nakon inkubacije

4.4. STATISTIKA I MODELIRANJE

4.4.1.Statistika

4.4.1.1 Korelacijske analize

Iz **Tablica 15 – 18** koje prikazuju rezultate mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva tijekom skladištenja 6 mjeseci u različitoj ambalaži i **Tablica 20 – 23** koje prikazuju sastav lako hlapljivih komponenti piva, vidljivo je kako je najveća varijabilnost (koeficijent varijabilnosti, *CV*) za fizikalno-kemijska svojstva piva kod boje (CL), gorčine (BI), stabilnosti pjene (FO) izuzev piva u bačvi, bistroće (HZ) i otopljenog kisika (DO). Najveća varijabilnost sastava lako hlapljivih komponenti je za acetaldehid (ACE), dimetil sulfid (DMS), diacetile (DIA), pentandion (PEN) i izoamil acetat (IAC). Oni čine i najznačajnija svojstva kakvoće piva.

Tablice 29 – 32 prikazuju koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava piva s najvećim zabilježenim varijabilnostima tijekom skladištenja u različitoj ambalaži gdje je:

SP_staklo = svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži (0,50 L)

SP_PET = svijetlo lager pivo u PET ambalaži (1 L)

SP_limenka = svijetlo lager pivo u limenci (0,50 L)

SP_bačva = svijetlo lager pivo u *keg* bačvi (30 L)

Crveno označeni brojevi upućuju na značajne koeficijente korelacije (*r*) s vrijednostima $p<0,05$.

Tablica 29 Koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava piva u staklenoj ambalaži

SP_staklo	CL	BI	FO	HZ	DO
	r				
CL	1,000	0,102	0,196	0,449	-0,818
BI	0,102	1,000	0,116	-0,345	0,279
FO	0,196	0,116	1,000	-0,062	0,224
HZ	0,449	-0,345	-0,062	1,000	-0,465
DO	-0,818	0,279	0,224	-0,465	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik)

Tablica 30 Koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava piva u PET ambalaži

SP_PET	CL	BI	FO	HZ	DO
	r				
CL	1,000	-0,889	-0,878	0,650	0,930
BI	-0,889	1,000	0,787	-0,782	-0,863
FO	-0,878	0,787	1,000	-0,695	-0,809
HZ	0,650	-0,782	-0,695	1,000	0,832
DO	0,930	-0,863	-0,809	0,832	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik)

Tablica 31 Koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava piva u limenci

SP_limenka	CL	BI	FO	HZ	DO
	r				
CL	1,000	-0,078	-0,109	0,978	-0,850
BI	-0,078	1,000	0,258	-0,083	0,091
FO	-0,109	0,258	1,000	-0,217	0,354
HZ	0,978	-0,083	-0,217	1,000	-0,887
DO	-0,850	0,091	0,354	-0,887	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik)

Tablica 32 Koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava piva u bačvi

SP_bačva	CL	BI	FO	HZ	DO
	r				
CL	1,000	-0,736	0,736	0,976	-0,605
BI	-0,736	1,000	-1,000	-0,828	0,242
FO	0,736	-1,000	1,000	0,828	-0,242
HZ	0,976	-0,828	0,828	1,000	-0,594
DO	-0,605	0,242	-0,242	-0,594	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik)

Tablice 33 – 36 prikazuju koeficijente korelacije (*r*) između sastava lako hlapljivih komponenti piva s najvećim zabilježenim varijabilnostima tijekom skladištenja u različitoj ambalaži. Crveno označeni brojevi upućuju na značajne koeficijente korelacije s vrijednostima $p<0,05$.

Tablica 33 Koeficijent korelacije (*r*) između sastava lako hlapljivih komponenti piva u staklenoj ambalaži

SP_staklo	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r				
ACE	1,000	0,773	0,708	0,770	-0,562
DMS	0,773	1,000	0,539	0,667	-0,475
DIA	0,708	0,539	1,000	0,709	-0,694
PEN	0,770	0,667	0,709	1,000	-0,213
IAC	-0,562	-0,475	-0,694	-0,213	1,000

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 34 Koeficijent korelacije (*r*) između sastava lako hlapljivih komponenti piva u PET ambalaži

SP_PET	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r				
ACE	1,000	-0,421	0,801	0,905	-0,157
DMS	-0,421	1,000	-0,217	-0,298	-0,015
DIA	0,801	-0,217	1,000	0,951	0,157
PEN	0,905	-0,298	0,951	1,000	0,147
IAC	-0,157	-0,015	0,157	0,147	1,000

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 35 Koeficijent korelacije (*r*) između sastava lako hlapljivih komponenti piva u limenci

SP_limenka	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r				
ACE	1,000	0,388	-0,051	-0,095	0,582
DMS	0,388	1,000	-0,797	-0,636	-0,322
DIA	-0,051	-0,797	1,000	0,630	0,305
PEN	-0,095	-0,636	0,630	1,000	0,326
IAC	0,582	-0,322	0,305	0,326	1,000

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 36 Koeficijenti korelacije (*r*) između sastava lako hlapljivih komponenti piva u bačvi

SP_bačva	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r				
ACE	1,000	-0,554	0,565	0,364	0,540
DMS	-0,554	1,000	-0,663	-0,836	0,257
DIA	0,565	-0,663	1,000	0,410	0,131
PEN	0,364	-0,836	0,410	1,000	-0,437
IAC	0,540	0,257	0,131	-0,437	1,000

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablice 37 – 40 prikazuju koeficijent korelacije (*r*) između fizikalno-kemijskih svojstava i sastava lako hlapljivih komponenti piva tijekom skladištenja u različitoj ambalaži. Crveno označeni brojevi upućuju na značajne koeficijente korelacije s vrijednostima $p<0,05$.

Tablica 37 Koeficijent korelacije (*r*) između svojstava i sastava piva u staklenoj ambalaži

SP_staklo	CL	BI	FO	HZ	DO	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r									
CL	1,000	0,102	0,196	0,449	-0,818	0,609	0,727	0,659	0,327	-0,596
BI	0,102	1,000	0,116	-0,345	0,279	-0,312	0,059	-0,206	-0,004	0,525
FO	0,196	0,116	1,000	-0,062	0,224	-0,387	-0,511	0,099	-0,531	-0,133
HZ	-0,678	-0,345	-0,062	1,000	-0,465	0,789	0,414	0,892	0,796	-0,469
DO	-0,818	0,279	0,224	-0,465	1,000	-0,745	-0,875	-0,656	-0,453	0,798
ACE	0,609	-0,312	-0,387	0,789	-0,745	1,000	0,773	0,708	0,770	-0,562
DMS	0,727	0,059	-0,511	0,414	-0,875	0,773	1,000	0,539	0,667	-0,475
DIA	0,659	-0,206	0,099	0,892	-0,656	0,708	0,539	1,000	0,709	-0,694
PEN	0,327	-0,004	-0,531	0,796	-0,453	0,770	0,667	0,709	1,000	-0,213
IAC	-0,596	0,525	-0,133	-0,469	0,798	-0,562	-0,475	-0,694	-0,213	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 38 Koeficijent korelacije (*r*) između svojstava i sastava piva u PET ambalaži

SP_PET	CL	BI	FO	HZ	DO	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r									
CL	1,000	-0,889	-0,878	0,650	0,930	0,971	-0,544	0,817	0,890	-0,186
BI	-0,889	1,000	0,787	-0,782	-0,863	-0,790	0,791	-0,715	-0,784	-0,073
FO	-0,878	0,787	1,000	-0,695	-0,809	-0,890	0,340	-0,766	-0,913	0,008
HZ	0,739	-0,782	-0,695	1,000	0,832	0,553	-0,361	0,843	0,801	0,415
DO	0,930	-0,863	-0,809	0,832	1,000	0,859	-0,430	0,932	0,908	-0,049
ACE	0,971	-0,790	-0,890	0,553	0,859	1,000	-0,421	0,801	0,905	-0,157
DMS	-0,544	0,791	0,340	-0,361	-0,430	-0,421	1,000	-0,217	-0,298	-0,015
DIA	0,817	-0,715	-0,766	0,843	0,932	0,801	-0,217	1,000	0,951	0,157
PEN	0,890	-0,784	-0,913	0,801	0,908	0,905	-0,298	0,951	1,000	0,147
IAC	-0,186	-0,073	0,008	0,415	-0,049	-0,157	-0,015	0,157	0,147	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 39 Koeficijent korelacije (*r*) između svojstava i sastava piva u limenkama

SP_limenka	CL	BI	FO	HZ	DO	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r									
CL	1,000	-0,078	-0,109	0,978	-0,850	0,695	-0,131	0,444	0,026	0,428
BI	-0,078	1,000	0,258	-0,083	0,091	0,419	0,744	-0,315	-0,093	-0,258
FO	-0,109	0,258	1,000	-0,217	0,354	0,353	0,322	-0,474	-0,185	0,167
HZ	0,978	-0,083	-0,217	1,000	-0,887	0,569	-0,203	0,554	0,054	0,294
DO	-0,850	0,091	0,354	-0,887	1,000	-0,500	0,192	-0,598	0,096	-0,354
ACE	0,695	0,419	0,353	0,569	-0,500	1,000	0,388	-0,051	-0,095	0,582
DMS	-0,131	0,744	0,322	-0,203	0,192	0,388	1,000	-0,797	-0,636	-0,322
DIA	0,444	-0,315	-0,474	0,554	-0,598	-0,051	-0,797	1,000	0,630	0,305
PEN	0,026	-0,093	-0,185	0,054	0,096	-0,095	-0,636	0,630	1,000	0,326
IAC	0,428	-0,258	0,167	0,294	-0,354	0,582	-0,322	0,305	0,326	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 40 Koeficijent korelacije (*r*) između svojstava i sastava piva u bačvi

SP_bačva	CL	BI	FO	HZ	DO	ACE	DMS	DIA	PEN	IAC
	r									
CL	1,000	-0,736	0,736	0,976	-0,605	0,657	-0,900	0,637	0,840	-0,260
BI	-0,736	1,000	-1,000	-0,828	0,242	-0,338	0,604	-0,597	-0,379	0,354
FO	0,736	-1,000	1,000	0,828	-0,242	0,338	-0,604	0,597	0,379	-0,354
HZ	0,976	-0,828	0,828	1,000	-0,594	0,618	-0,913	0,703	0,778	-0,257
DO	-0,605	0,242	-0,242	-0,594	1,000	-0,792	0,729	-0,775	-0,447	-0,378
ACE	0,657	-0,338	0,338	0,618	-0,792	1,000	-0,554	0,565	0,364	0,540
DMS	-0,900	0,604	-0,604	-0,913	0,729	-0,554	1,000	-0,663	-0,836	0,257
DIA	0,637	-0,597	0,597	0,703	-0,775	0,565	-0,663	1,000	0,410	0,131
PEN	0,840	-0,379	0,379	0,778	-0,447	0,364	-0,836	0,410	1,000	-0,437
IAC	-0,260	0,354	-0,354	-0,257	-0,378	0,540	0,257	0,131	-0,437	1,000

CL (boja), BI (gorčina), FO (pjena), HZ (bistroća), DO (otopljeni kisik), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), DIA (diacetil), PEN (pentandion), IAC (izoamil acetat)

Tablica 41 Koeficijenti korelacije (*r*) između ukupnih izmjerenih fizikalno-kemijskih svojstava piva u staklenoj ambalaži (FK)

Varijable	Korelacije (Datoteka: Spreadsheet43 u GG_SP_Sva_mjerenja) Označene korelacije značajne su na p <, 05000 N = 7 (podaci koji nedostaju su izuzeti iz analize)										
	OE	AE	SG	AL	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
OE	1,0000	,8444	-,3347	,7100	-,1599	-,3347	-,4486	-,2521	,0509	-,2508	-,1662
	p= ---	p=,017	p=,463	p=,074	p=,732	p=,463	p=,313	p=,585	p=,914	p=,588	p=,722
AE	,8444	1,0000	,0913	,7100	,3346	-,1217	,0123	-,1786	-,3055	-,0373	,0391
	p=,017	p= ---	p=,846	p=,074	p=,463	p=,795	p=,979	p=,702	p=,505	p=,937	p=,934
SG	-,3347	,0913	1,0000	-,0589	,7432	,4167	,8453	-,0767	-,5578	,5986	,0536
	p=,463	p=,846	p= ---	p=,900	p=,056	p=,352	p=,017	p=,870	p=,193	p=,156	p=,909
AL	,7100	,7100	-,0589	1,0000	-,0144	-,4714	-,1753	-,4544	-,0986	-,3052	,2398
	p=,074	p=,074	p=,900	p= ---	p=,976	p=,286	p=,707	p=,306	p=,833	p=,506	p=,604
CL	-,1599	,3346	,7432	-,0144	1,0000	,1018	,9102	,4488	-,8177	,4598	,1963
	p=,732	p=,463	p=,056	p=,976	p= ---	p=,828	p=,004	p=,313	p=,025	p=,299	p=,673
BI	-,3347	-,1217	,4167	-,4714	,1018	1,0000	,2141	-,3453	,2789	,5336	,1160
	p=,463	p=,795	p=,352	p=,286	p=,828	p= ---	p=,645	p=,448	p=,545	p=,217	p=,804
PY	-,4486	,0123	,8453	-,1753	,9102	,2141	1,0000	,3801	-,6412	,6609	,3115
	p=,313	p=,979	p=,017	p=,707	p=,004	p=,645	p= ---	p=,400	p=,121	p=,106	p=,497
HZ	-,2521	-,1786	-,0767	-,4544	,4488	-,3453	,3801	1,0000	-,4654	,1111	-,0616
	p=,585	p=,702	p=,870	p=,306	p=,313	p=,448	p=,400	p= ---	p=,293	p=,813	p=,896
DO	,0509	-,3055	-,5578	-,0986	-,8177	,2789	-,6412	-,4654	1,0000	,0388	,2240
	p=,914	p=,505	p=,193	p=,833	p=,025	p=,545	p=,121	p=,293	p= ---	p=,934	p=,629
CO	-,2508	-,0373	,5986	-,3052	,4598	,5336	,6609	,1111	,0388	1,0000	,3365
	p=,588	p=,937	p=,156	p=,506	p=,299	p=,217	p=,106	p=,813	p=,934	p= ---	p=,461
FO	-,1662	,0391	,0536	,2398	,1963	,1160	,3115	-,0616	,2240	,3365	1,0000
	p=,722	p=,934	p=,909	p=,604	p=,673	p=,804	p=,497	p=,896	p=,629	p=,461	p= ---

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli),HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena),

Tablica 42 Koeficijenti korelacije (*r*) između ukupnih mjerenih lako hlapljivih komponenti piva u staklenoj ambalaži (GC)

Varijable	Korelacije (Datoteka: Spreadsheet43 u GG_SP_Sva_mjerenja) Označene korelacije su značajne na p <, 05000 N = 7 (podaci koji nedostaju su izuzeti iz analize)										
	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
ACE	1,0000	,7731	-,2974	,7080	-,0750	,7704	,0262	-,5622	,8333	,6909	-,2444
	p= ---	p=,042	p=,517	p=,075	p=,873	p=,043	p=,956	p=,189	p=,020	p=,086	p=,597
DMS	,7731	1,0000	-,3795	,5388	-,4217	,6673	-,4057	-,4751	,4764	,2896	-,3430
	p=,042	p= ---	p=,401	p=,212	p=,346	p=,101	p=,367	p=,281	p=,280	p=,529	p=,451
EAC	-,2974	-,3795	1,0000	-,5708	,4383	-,0125	,5286	,9430	-,3107	-,1307	,9884
	p=,517	p=,401	p= ---	p=,181	p=,325	p=,979	p=,223	p=,001	p=,498	p=,780	p=,000
DIA	,7080	,5388	-,5708	1,0000	-,3423	,7090	-,2889	-,6944	,5685	,3745	-,5163
	p=,075	p=,212	p=,181	p= ---	p=,452	p=,074	p=,530	p=,083	p=,183	p=,408	p=,236
PRO	-,0750	-,4217	,4383	-,3423	1,0000	-,3282	,9690	,3444	,3897	,6245	,4838
	p=,873	p=,346	p=,325	p=,452	p= ---	p=,472	p=,000	p=,449	p=,388	p=,134	p=,271
PEN	,7704	,6673	-,0125	,7090	-,3282	1,0000	-,2112	-,2132	,3957	,2507	,0565
	p=,043	p=,101	p=,979	p=,074	p=,472	p= ---	p=,649	p=,646	p=,380	p=,588	p=,904
IBU	,0262	-,4057	,5286	-,2889	,9690	-,2112	1,0000	,3757	,4280	,6451	,5594
	p=,956	p=,367	p=,223	p=,530	p=,000	p=,649	p= ---	p=,406	p=,338	p=,118	p=,192
IAC	-,5622	-,4751	,9430	-,6944	,3444	-,2132	,3757	1,0000	-,5504	-,3635	,9205
	p=,189	p=,281	p=,001	p=,083	p=,449	p=,646	p=,406	p= ---	p=,200	p=,423	p=,003
IAA	,8333	,4764	-,3107	,5685	,3897	,3957	,4280	-,5504	1,0000	,9617	-,2477
	p=,020	p=,280	p=,498	p=,183	p=,388	p=,380	p=,338	p=,200	p= ---	p=,001	p=,592
VAL	,6909	,2896	-,1307	,3745	,6245	,2507	,6451	-,3635	,9617	1,0000	-,0600
	p=,086	p=,529	p=,780	p=,408	p=,134	p=,588	p=,118	p=,423	p=,001	p= ---	p=,898
EST	-,2444	-,3430	,9884	-,5163	,4838	,0565	,5594	,9205	-,2477	-,0600	1,0000
	p=,597	p=,451	p=,000	p=,236	p=,271	p=,904	p=,192	p=,003	p=,592	p=,898	p= ---

ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Tablica 43 Koeficijenti korelacije (*r*) između ukupnih mjerenih fizikalno-kemijska svojstava i lako hlapljivih komponenti piva u staklenoj ambalaži (FK-GC)

Varijable	Korelacije (Datoteka: Spreadsheet43 u GG_SP_Sva_mjerenja) Označene korelacije su značajne na p <, 05000 N = 7 (podaci koji nedostaju su izuzeti iz analize)																				
	OE	AE	SG	AL	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
OE	1,0000	,8444	-,3347	,7100	-,1599	-,3347	-,4486	-,2521	,0509	-,2508	-,1662	-,2505	-,1416	,2660	-,3953	-,2563	-,3109	-,1278	,2917	-,3807	-,4198	,1193
	p= ---	p=,017	p=,463	p=,074	p=,732	p=,463	p=,313	p=,585	p=,914	p=,588	p=,722	p=,588	p=,762	p=,564	p=,380	p=,579	p=,497	p=,785	p=,526	p=,400	p=,348	p=,799
AE	,8444	1,0000	,0913	,7100	,3346	-,1217	,0123	-,1786	-,3055	-,0373	,0391	-,1139	,1725	-,0725	-,1208	-,3662	-,2587	-,3068	,0174	-,1990	-,3041	-,2018
	p=,017	p= ---	p=,846	p=,074	p=,463	p=,795	p=,979	p=,702	p=,505	p=,937	p=,934	p=,808	p=,711	p=,877	p=,796	p=,419	p=,575	p=,503	p=,970	p=,669	p=,507	p=,664
SG	-,3347	,0913	1,0000	-,0589	,7432	,4167	,8453	-,0767	-,5578	,5986	,0536	,3742	,6286	-,3311	,1393	,2006	,0352	,0700	-,3101	,5292	,5129	-,2764
	p=,463	p=,846	p= ---	p=,900	p=,056	p=,352	p=,017	p=,870	p=,193	p=,156	p=,909	p=,408	p=,131	p=,468	p=,766	p=,666	p=,940	p=,881	p=,499	p=,222	p=,239	p=,549
AL	,7100	,7100	-,0589	1,0000	-,0144	-,4714	-,1753	-,4544	-,0986	-,3052	,2398	-,3528	-,2402	-,2810	-,3817	-,1418	-,7175	-,1485	-,1686	-,2234	-,2518	-,4086
	p=,074	p=,074	p=,900	p= ---	p=,976	p=,286	p=,707	p=,306	p=,833	p=,506	p=,604	p=,438	p=,604	p=,542	p=,398	p=,762	p=,069	p=,751	p=,718	p=,630	p=,586	p=,363
CL	-,1599	,3346	,7432	-,0144	1,0000	,1018	,9102	,4488	-,8177	,4598	,1963	,6095	,7274	-,5623	,6595	-,1348	,3275	-,1625	-,5959	,6426	,4917	-,5403
	p=,732	p=,463	p=,056	p=,976	p= ---	p=,828	p=,004	p=,313	p=,025	p=,299	p=,673	p=,146	p=,064	p=,189	p=,107	p=,773	p=,473	p=,728	p=,158	p=,120	p=,262	p=,211
BI	-,3347	-,1217	,4167	-,4714	,1018	1,0000	,2141	-,3453	,2789	,5336	,1160	-,3118	,0590	,3642	-,2061	,2006	-,0037	,0700	,5247	-,2448	-,1418	,4271
	p=,463	p=,795	p=,352	p=,286	p=,828	p= ---	p=,645	p=,448	p=,545	p=,217	p=,804	p=,496	p=,900	p=,422	p=,658	p=,666	p=,994	p=,881	p=,227	p=,597	p=,762	p=,339
PY	-,4486	,0123	,8453	-,1753	,9102	,2141	1,0000	,3801	-,6412	,6609	,3115	,5820	,5858	-,4837	,5629	,2170	,2366	,1420	-,5387	,7819	,7207	-,4180
	p=,313	p=,979	p=,017	p=,707	p=,004	p=,645	p= ---	p=,400	p=,121	p=,106	p=,497	p=,170	p=,167	p=,271	p=,188	p=,640	p=,610	p=,761	p=,212	p=,038	p=,068	p=,351
HZ	-,2521	-,1786	-,0767	-,4544	,4488	-,3453	,3801	1,0000	-,4654	,1111	-,0616	,7895	,4138	-,2325	,8918	-,1385	,7963	,0040	-,4694	,6381	,4938	-,1880
	p=,585	p=,702	p=,870	p=,306	p=,313	p=,448	p=,400	p= ---	p=,293	p=,813	p=,896	p=,035	p=,356	p=,616	p=,007	p=,767	p=,032	p=,993	p=,288	p=,123	p=,260	p=,687
DO	,0509	-,3055	-,5578	-,0986	-,8177	,2789	-,6412	-,4654	1,0000	,0388	,2240	-,7454	-,8754	,7203	-,6556	,4795	-,4532	,4686	,7982	-,5551	-,3282	,7147
	p=,914	p=,505	p=,193	p=,833	p=,025	p=,545	p=,121	p=,293	p= ---	p=,934	p=,629	p=,054	p=,010	p=,068	p=,110	p=,276	p=,307	p=,289	p=,031	p=,196	p=,472	p=,071
CO	-,2508	-,0373	,5986	-,3052	,4598	,5336	,6609	,1111	,0388	1,0000	,3365	,2118	,1137	,2987	,0438	,7204	,0321	,6901	,2304	,5392	,6605	,3512
	p=,588	p=,937	p=,156	p=,506	p=,299	p=,217	p=,106	p=,813	p=,934	p= ---	p=,461	p=,648	p=,808	p=,515	p=,926	p=,068	p=,945	p=,086	p=,619	p=,212	p=,106	p=,440
FO	-,1662	,0391	,0536	,2398	,1963	,1160	,3115	-,0616	,2240	,3365	1,0000	-,3874	-,5108	-,2660	,0988	,3652	-,5315	,2662	-,1328	,0668	,1383	-,2691
	p=,722	p=,934	p=,909	p=,604	p=,673	p=,804	p=,497	p=,896	p=,629	p=,461	p= ---	p=,391	p=,241	p=,564	p=,833	p=,421	p=,220	p=,564	p=,776	p=,887	p=,767	p=,559
ACE	-,2505	-,1139	,3742	-,3528	,6095	-,3118	,5820	,7895	-,7454	,2118	-,3874	1,0000	,7731	-,2974	,7080	-,0750	,7704	,0262	-,5622	,8333	,6909	-,2444
	p=,588	p=,808	p=,408	p=,438	p=,146	p=,496	p=,170	p=,035	p=,054	p=,648	p=,391	p= ---	p=,042	p=,517	p=,075	p=,873	p=,043	p=,956	p=,189	p=,020	p=,086	p=,597
DMS	-,1416	,1725	,6286	-,2402	,7274	,0590	,5858	,4138	-,8754	,1137	-,5108	,7731	1,0000	-,3795	,5388	-,4217	,6673	-,4057	-,4751	,4764	,2896	-,3430
	p=,762	p=,711	p=,131	p=,604	p=,064	p=,900	p=,167	p=,356	p=,010	p=,808	p=,241	p=,042	p= ---	p=,401	p=,212	p=,346	p=,101	p=,367	p=,281	p=,280	p=,529	p=,451
EAC	,2660	-,0725	-,3311	-,2810	-,5623	,3642	-,4837	-,2325	,7203	,2987	-,2660	-,2974	-,3795	1,0000	-,5708	,4383	-,0125	,5286	,9430	-,3107	-,1307	,9884
	p=,564	p=,877	p=,468	p=,542	p=,189	p=,422	p=,271	p=,616	p=,068	p=,515	p=,564	p=,517	p=,401	p= ---	p=,181	p=,325	p=,979	p=,223	p=,001	p=,498	p=,780	p=,000
DIA	-,3953	-,1208	,1393	-,3817	,6595	-,2061	,5629	,8918	-,6556	,0438	,0988	,7080	,5388	-,5708	1,0000	-,3423	,7090	-,2889	-,6944	,5685	,3745	-,5163
	p=,380	p=,796	p=,766	p=,398	p=,107	p=,658	p=,188	p=,007	p=,110	p=,926	p=,833	p=,075	p=,212	p=,181	p= ---	p=,452	p=,074	p=,530	p=,083	p=,183	p=,408	p=,236

Varijable	Korelacije (Datoteka: Spreadsheet43 u GG_SP_Sva_mjerenja) Označene korelacije su značajne na p <, 05000 N = 7 (podaci koji nedostaju su izuzeti iz analize)																					
	OE	AE	SG	AL	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO	ACE	DMS	EAC	DIA	PRO	PEN	IBU	IAC	IAA	VAL	EST
PRO	-,2563	-,3662	,2006	-,1418	-,1348	,2006	,2170	-,1385	,4795	,7204	,3652	-,0750	-,4217	,4383	-,3423	1,0000	-,3282	,9690	,3444	,3897	,6245	,4838
	p=,579	p=,419	p=,666	p=,762	p=,773	p=,666	p=,640	p=,767	p=,276	p=,068	p=,421	p=,873	p=,346	p=,325	p=,452	p= ---	p=,472	p=,000	p=,449	p=,388	p=,134	p=,271
PEN	-,3109	-,2587	,0352	-,7175	,3275	-,0037	,2366	,7963	-,4532	,0321	-,5315	,7704	,6673	-,0125	,7090	-,3282	1,0000	-,2112	-,2132	,3957	,2507	,0565
	p=,497	p=,575	p=,940	p=,069	p=,473	p=,994	p=,610	p=,032	p=,307	p=,945	p=,220	p=,043	p=,101	p=,979	p=,074	p=,472	p= ---	p=,649	p=,646	p=,380	p=,588	p=,904
IBU	-,1278	-,3068	,0700	-,1485	-,1625	,0700	,1420	,0040	,4686	,6901	,2662	,0262	-,4057	,5286	-,2889	,9690	-,2112	1,0000	,3757	,4280	,6451	,5594
	p=,785	p=,503	p=,881	p=,751	p=,728	p=,881	p=,761	p=,993	p=,289	p=,086	p=,564	p=,956	p=,367	p=,223	p=,530	p=,000	p=,649	p= ---	p=,406	p=,338	p=,118	p=,192
IAC	,2917	,0174	-,3101	-,1686	-,5959	,5247	-,5387	-,4694	,7982	,2304	-,1328	-,5622	-,4751	,9430	-,6944	,3444	-,2132	,3757	1,0000	-,5504	-,3635	,9205
	p=,526	p=,970	p=,499	p=,718	p=,158	p=,227	p=,212	p=,288	p=,031	p=,619	p=,776	p=,189	p=,281	p=,001	p=,083	p=,449	p=,646	p=,406	p= ---	p=,200	p=,423	p=,003
IAA	-,3807	-,1990	,5292	-,2234	,6426	-,2448	,7819	,6381	-,5551	,5392	,0668	,8333	,4764	-,3107	,5685	,3897	,3957	,4280	-,5504	1,0000	,9617	-,2477
	p=,400	p=,669	p=,222	p=,630	p=,120	p=,597	p=,038	p=,123	p=,196	p=,212	p=,887	p=,020	p=,280	p=,498	p=,183	p=,388	p=,380	p=,338	p=,200	p= ---	p=,001	p=,592
VAL	-,4198	-,3041	,5129	-,2518	,4917	-,1418	,7207	,4938	-,3282	,6605	,1383	,6909	,2896	-,1307	,3745	,6245	,2507	,6451	-,3635	,9617	1,0000	-,0600
	p=,348	p=,507	p=,239	p=,586	p=,262	p=,762	p=,068	p=,260	p=,472	p=,106	p=,767	p=,086	p=,529	p=,780	p=,408	p=,134	p=,588	p=,118	p=,423	p=,001	p= ---	p=,898
EST	,1193	-,2018	-,2764	-,4086	-,5403	,4271	-,4180	-,1880	,7147	,3512	-,2691	-,2444	-,3430	,9884	-,5163	,4838	,0565	,5594	,9205	-,2477	-,0600	1,0000
	p=,799	p=,664	p=,549	p=,363	p=,211	p=,339	p=,351	p=,687	p=,071	p=,440	p=,559	p=,597	p=,451	p=,000	p=,236	p=,271	p=,904	p=,192	p=,003	p=,592	p=,898	p= ---

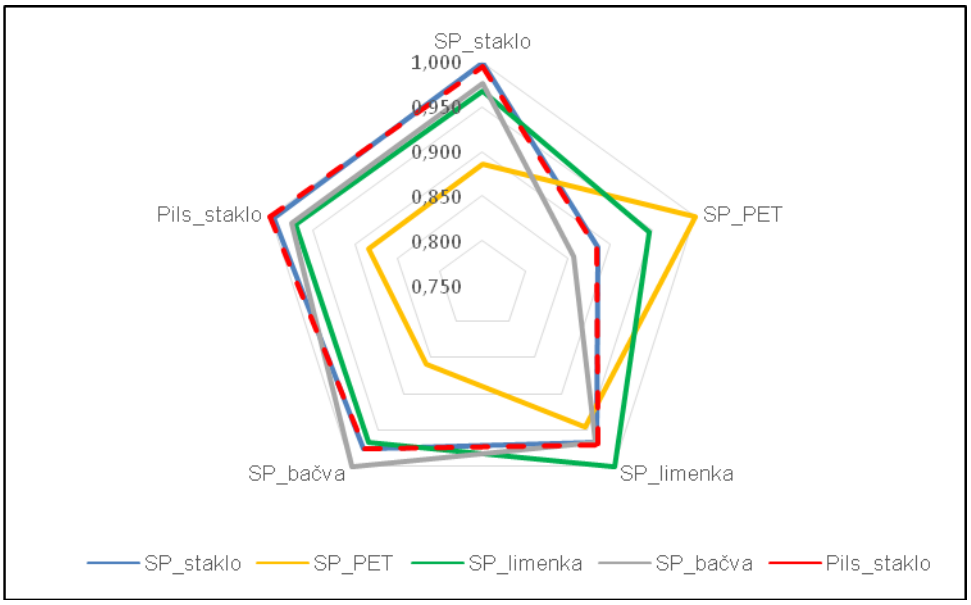
OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO2), FO (pjena), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

U **Tablicama** od **44** do **46** dat je prikaz usporedbe sličnosti promjena ukupnih fizikalno-kemijskih svojstava piva, sastava piva (lako hlapljive komponente) te ukupnih promjena svojstava i sastava piva skladištenog tijekom 6 mjeseci u različitoj ambalaži preko koeficijenta korelacije (*r*) gdje je:

SP_staklo: svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži (0,50 L), SP_PET: svijetlo lager pivo u PET ambalaži (1 L), SP_limenka: svijetlo lager pivo u limenci (0,50 L), SP_bačva: svijetlo lager pivo u *keg* bačvi (30 L), SP_pils: pils (sladno) pivo u staklenoj ambalaži (0, 50 L).

Tablica 44 Koeficijent korelacije (*r*) između ukupnih fizikalno-kemijskih svojstava piva (FK)

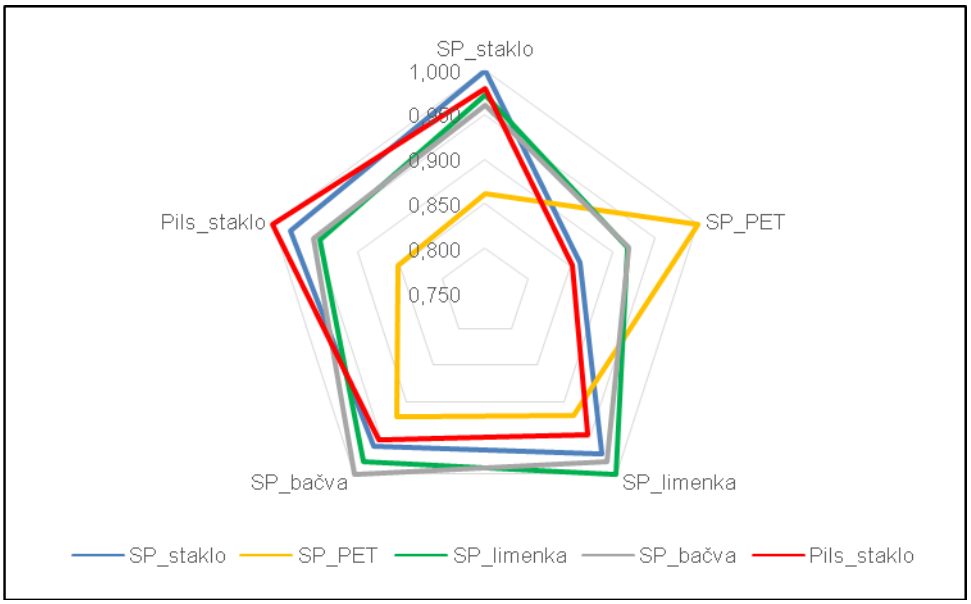
FK	SP_staklo	SP_PET	SP_limenka	SP_bačva	Pils_staklo
	r				
SP_staklo	1,000	0,886	0,967	0,976	0,996
SP_PET	0,886	1,000	0,946	0,858	0,884
SP_limenka	0,967	0,946	1,000	0,966	0,970
SP_bačva	0,976	0,858	0,966	1,000	0,975
Pils_staklo	0,996	0,884	0,970	0,975	1,000



Slika 67 Koeficijent korelacije (*r*) između ukupnih fizikalno-kemijskih svojstava piva (FK)

Tablica 45 Koeficijent korelacije (*r*) između sastava ukupnih lako hlapljivih komponenti piva (GC)

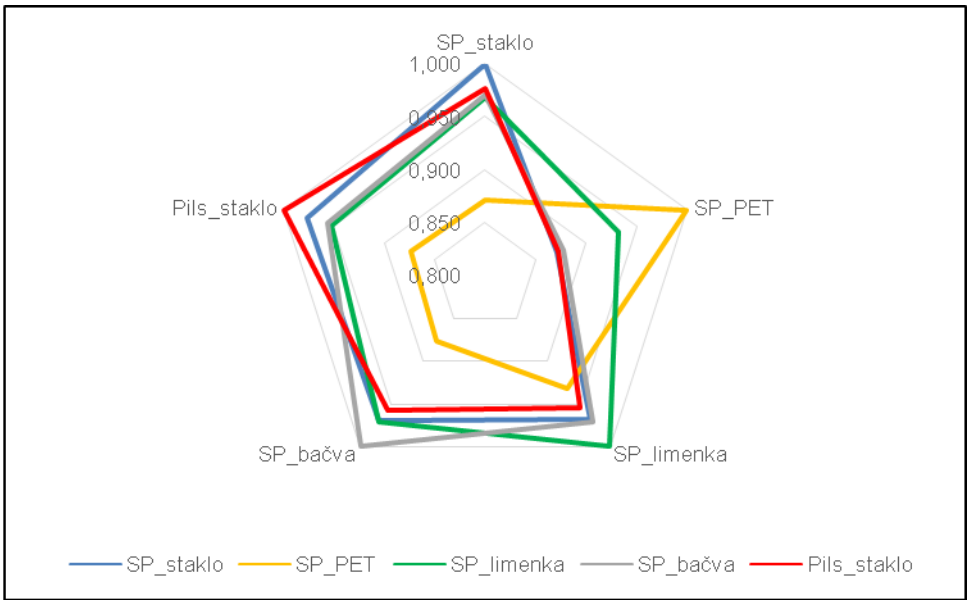
GC	SP_staklo	SP_PET	SP_limenka	SP_bačva	Pils_staklo
	r				
SP_staklo	1,000	0,862	0,972	0,962	0,979
SP_PET	0,862	1,000	0,918	0,919	0,853
SP_limenka	0,972	0,918	1,000	0,982	0,945
SP_bačva	0,962	0,919	0,982	1,000	0,952
Pils_staklo	0,979	0,853	0,945	0,952	1,000



Slika 68 Koeficijent korelacije (*r*) između sastava ukupnih lako hlapljivih komponenti piva (GC)

Tablica 46 Koeficijent korelacije (*r*) između ukupnih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva (FK+GC)

FK+GC	SP_staklo	SP_PET	SP_limenka	SP_bačva	Pils_staklo
	r				
SP_staklo	1,000	0,871	0,968	0,970	0,976
SP_PET	0,871	1,000	0,932	0,878	0,873
SP_limenka	0,968	0,932	1,000	0,972	0,953
SP_bačva	0,970	0,878	0,972	1,000	0,957
Pils_staklo	0,976	0,873	0,953	0,957	1,000



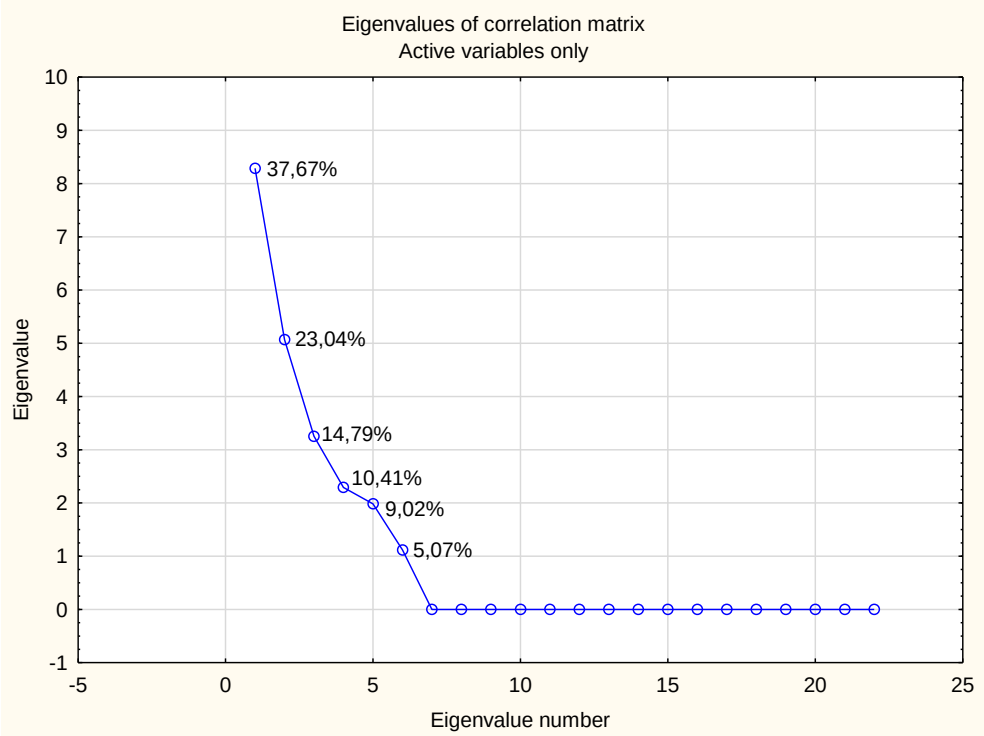
Slika 69 Koeficijent korelacije (*r*) između ukupnih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva (FK+GC)

4.4.1.2 Analiza glavnih komponenti (PCA)

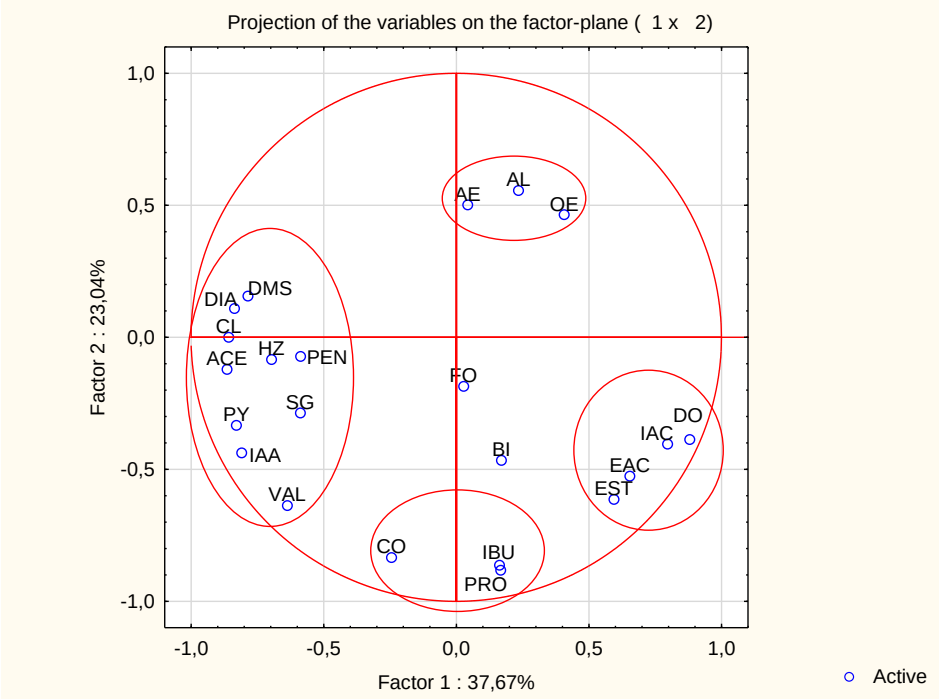
Analiza glavnih komponenti (PCA) izvedena je na kompletnom setu podataka za svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži (osim pH čije se vrijednosti brojčano ne mijenjaju) u cilju utvrđivanja vanjskih vrijednosti, kao i međusobnih odnosa, odstupanja i grupiranja među objektima. Matrica podataka sastojala se od 22 elementa.

Tablica 47 Pregled glavnih komponenti (svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži)

Komponenta	Svojstvene vrijednosti korelacijske matrice i povezane statistike (Datoteka: Spreadsheet8 u GG_SP_staklo_mjerenja.stw) Samo aktivne varijable			
	Svojstvena vrijednost	% Pojedinačni udio	Zbirni udio	Zbirni udio %
1	8,287579	37,67081	8,28758	37,6708
2	5,067922	23,03601	13,35550	60,7068
3	3,253913	14,79052	16,60941	75,4973
4	2,290885	10,41312	18,90030	85,9105
5	1,983380	9,01536	20,88368	94,9258
6	1,116320	5,07418	22,00000	100,0000



Slika 70 Postotni udio glavnih komponenti u ukupnoj varijanci (svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži)



OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Slika 71 Raspored jedinica promatranja na osnovu vrijednosti dvije glavne komponente (svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži)

Tablica 48 Faktorski skorovi za svaku varijablu pojedinačno (svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži)

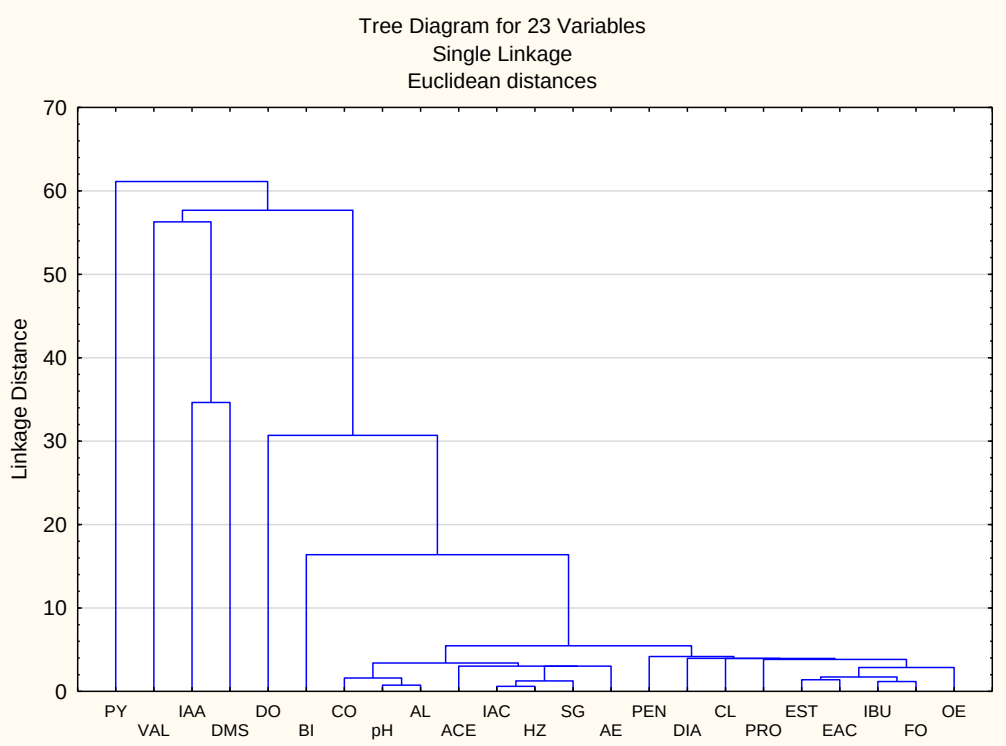
Varijable	Doprinos varijabli na temelju korelacijskih koeficijenata(Datoteka: Spreadsheet8 in GG_SP_staklo_mjerenja.stw)					
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
OE	0,019915	0,042546	0,012311	0,035664	0,232697	0,032286
AE	0,000218	0,049666	0,061009	0,108511	0,099570	0,091278
SG	0,041818	0,016222	0,060094	0,107565	0,020247	0,079818
AL	0,006641	0,060990	0,151512	0,001129	0,066812	0,006952
CL	0,088989	0,000000	0,032900	0,044482	0,000147	0,047698
BI	0,003484	0,042833	0,000022	0,169310	0,172141	0,022118
PY	0,083129	0,021936	0,045397	0,012345	0,009736	0,004104
HZ	0,058699	0,001411	0,060843	0,037411	0,030354	0,145557
DO	0,093355	0,029596	0,001586	0,019774	0,005961	0,012573
CO	0,007199	0,137170*	0,031912	0,039902	0,002126	0,040940
FO	0,000089	0,006774	0,140599	0,066262	0,048970	0,231577
ACE	0,090219	0,002915	0,030381	0,000041	0,062840	0,012496
DMS	0,074506	0,004820	0,014201	0,119620	0,001273	0,031643
EAC	0,051667	0,054500	0,033587	0,035183	0,048473	0,008575
DIA	0,084573	0,002349	0,021232	0,019920	0,005144	0,145358
PRO	0,003374	0,153615**	0,033621	0,019995	0,011746	0,013464
PEN	0,041600	0,001041	0,185515	0,008717	0,002610	0,018953
IBU	0,003185	0,147056***	0,013704	0,024455	0,063392	0,001782
IAC	0,076578	0,032256	0,010830	0,060851	0,003968	0,017350
IAA	0,079171	0,037857	0,004185	0,016364	0,045329	0,009849
VAL	0,049039	0,080132	0,009403	0,022148	0,041201	0,021888
EST	0,042550	0,074315	0,045156	0,030349	0,025264	0,003740

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri); *, **, *** - varijable s najvećim doprinosom objašnjene su u poglavlju Rasprava

Za svaku jedinicu promatranja po pojedinom faktoru urađeni su individualnih skorovi koji su povezani s visinom faktorskog opterećenja.

4.4.1.3 Klaster analiza (CA)

Klaster analiza izvedena je na kompletnom setu podataka za svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži od 23 elementa. Klasterska analiza je set multivarijatnih podataka preveden u klastere. Grafički prikaz rezultata hijerarhijskog klastera obavlja se pomoću dendograma koji pokazuje način na koji su spojene varijable i kolika je udaljenost između njih. **Slika 72** prikazuje stablo povezanosti za 23 varijable, jednostruke veza, euklidske udaljenosti i povezanosti.



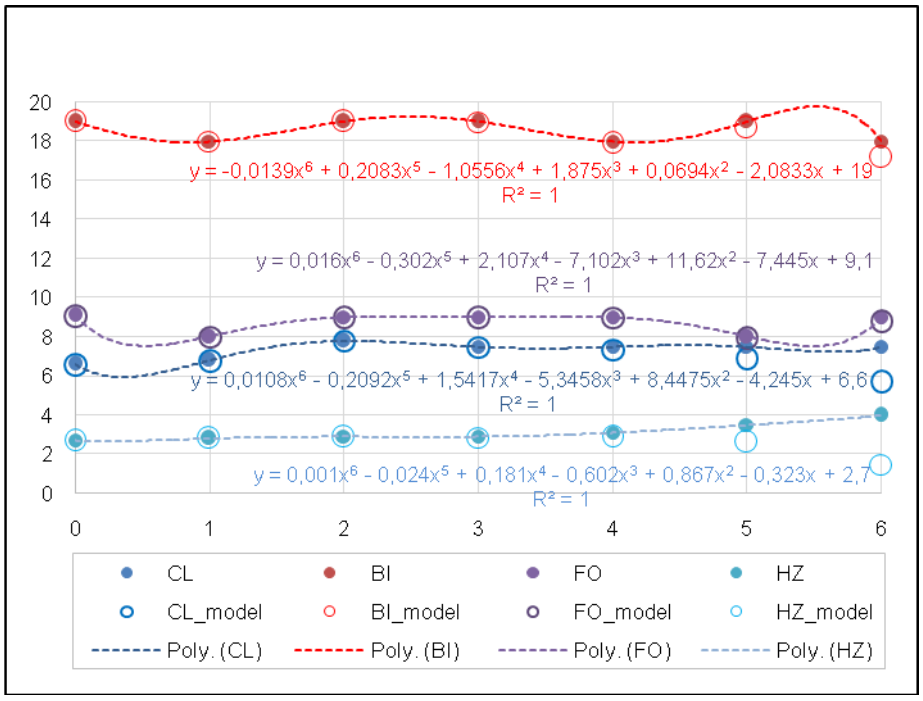
OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), ACE (acetaldehid), DMS (dimetil sulfid), EAC (etil acetat), DIA (diacetil), PRO (propanol), PEN (pentandion), IBU (izobutanol), IAC (izoamil acetat), IAA (izoamil alkohol), VAL (viši alkoholi), EST (esteri)

Slika 72 Dendogram klaster analize (hijerarhijska metoda) fizikalno-kemijskih svojstava i sastava lako hlapljivih komponenti svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži

Korelacijske, analiza glavnih komponenti, faktorske i klaster analiza rađene su u računalnom programu *Statistica ver 12* i manjim dijelom u Microsoft Excel-u 2010.

4.4.2. Modeliranje

Na izmjerene vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži primijenjena je metoda polinomne regresije i dobivene su jednadžbe (polinomi) koje opisuju promjene pojedine veličine tijekom perioda skladištenja piva. **Slika 73** prikazuje izmjerene, regresijske i modelom izračunate vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u staklenoj ambalaži. Za izradu modela korišten je program Microsoft Excel 2010.

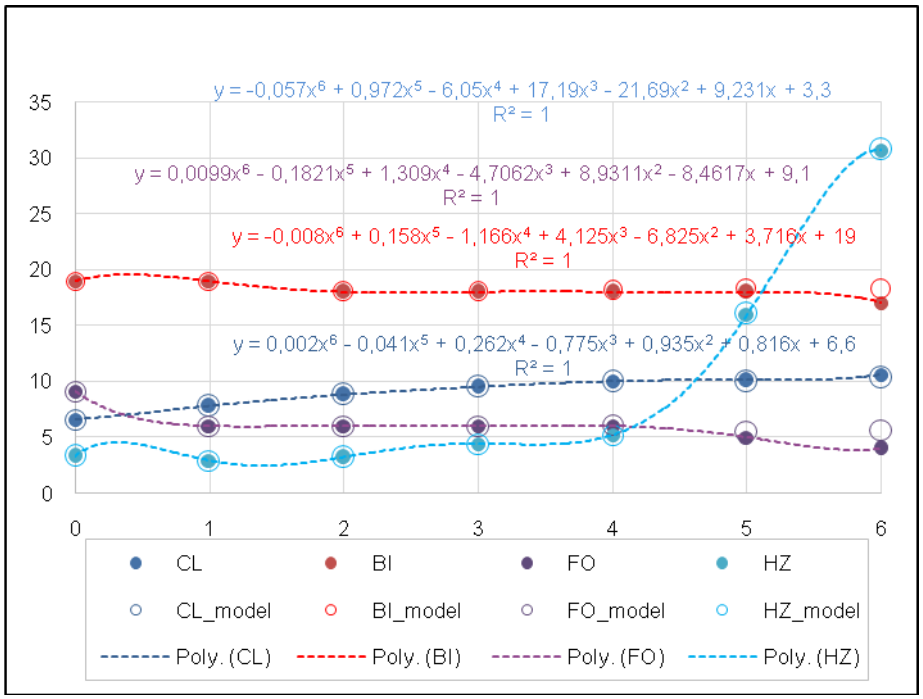


Slika 73 Model promjene fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Za izradu modela upotrijebljeni su uvijek polinomi šestog stupnja jer je za njih uvijek koeficijent determinacije imao jediničnu vrijednost. Polinomni izrazi prikazani su u **Tablici 49**.

Tablica 49 Modeli polinomne regresije fizikalno-kemijskih svojstava piva u staklenoj ambalaži

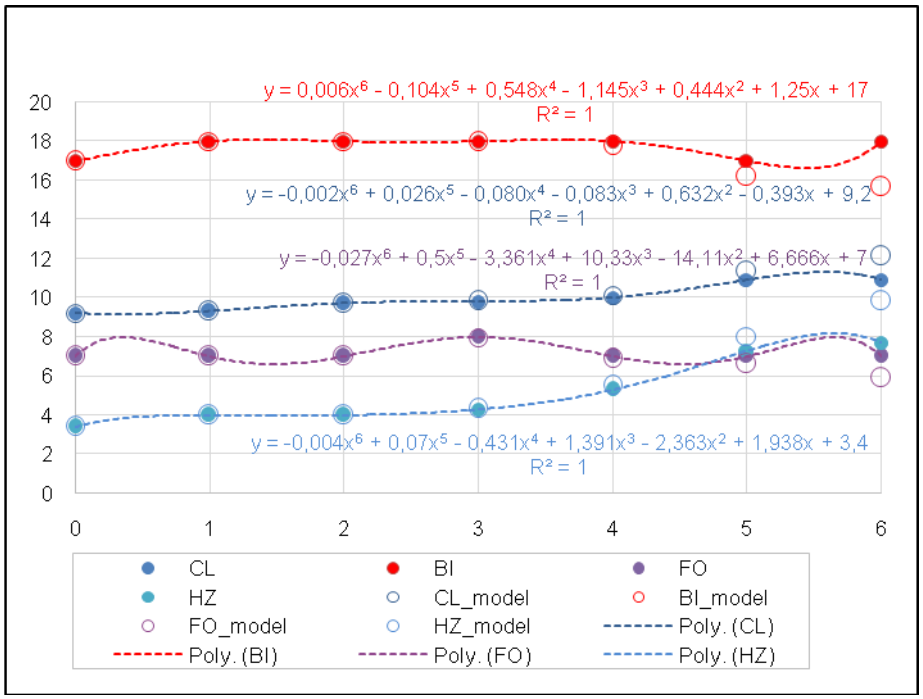
Model	Polinom	Koef. Determ.
CL_model	$y = 0{,}0108x^6 - 0{,}2092x^5 + 1{,}5417x^4 - 5{,}3458x^3 + 8{,}4475x^2 - 4{,}245x + 6{,}6$	$R^2 = 1$
BI_model	$y = -0{,}0139x^6 + 0{,}2083x^5 - 1{,}0556x^4 + 1{,}875x^3 + 0{,}0694x^2 - 2{,}0833x + 19$	$R^2 = 1$
FO_model	$y = 0{,}0168x^6 - 0{,}3029x^5 + 2{,}1076x^4 - 7{,}1021x^3 + 11{,}626x^2 - 7{,}445x + 9{,}1$	$R^2 = 1$
HZ_model	$y = 0{,}0012x^6 - 0{,}0246x^5 + 0{,}1812x^4 - 0{,}6021x^3 + 0{,}8675x^2 - 0{,}3233x + 2{,}7$	$R^2 = 1$



Slika 74 Model promjene fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u PET ambalaži (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Tablica 50 Modeli polinomne regresije svojstava piva u PET ambalaži

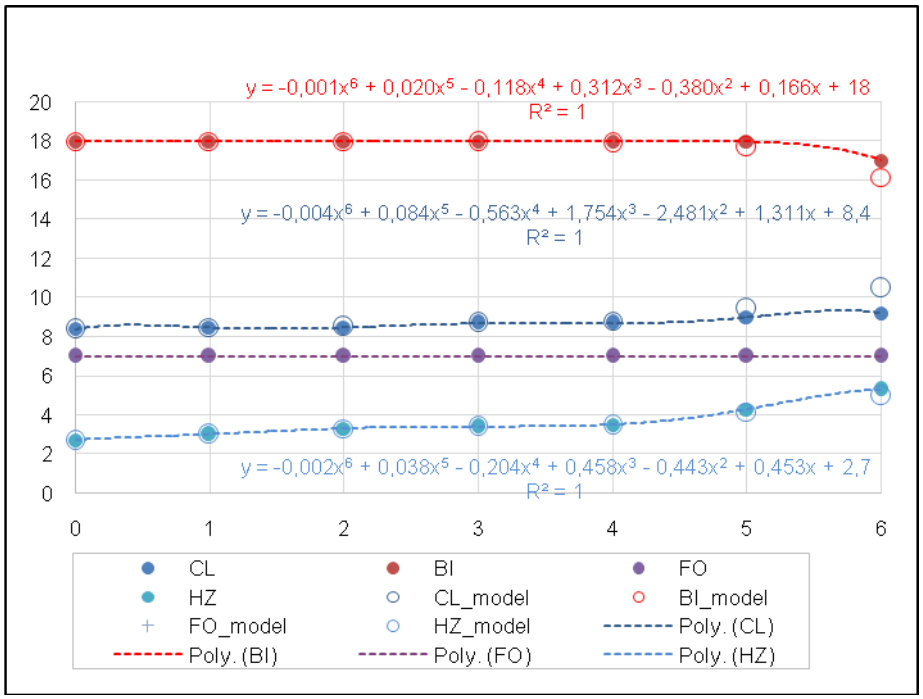
Model	Polinom Koef. Determ.
CL_model	$y = 0{,}0025x^6 - 0{,}0417x^5 + 0{,}2625x^4 - 0{,}775x^3 + 0{,}935x^2 + 0{,}8167x + 6{,}6$ $R^2 = 1$
BI_model	$y = -0{,}0083x^6 + 0{,}1583x^5 - 1{,}1667x^4 + 4{,}125x^3 - 6{,}825x^2 + 3{,}7167x + 19$ $R^2 = 1$
FO_model	$y = 0{,}0099x^6 - 0{,}1821x^5 + 1{,}309x^4 - 4{,}7062x^3 + 8{,}9311x^2 - 8{,}4617x + 9{,}1$ $R^2 = 1$
HZ_model	$y = -0{,}0575x^6 + 0{,}9725x^5 - 6{,}05x^4 + 17{,}196x^3 - 21{,}692x^2 + 9{,}2317x + 3{,}3$ $R^2 = 1$



Slika 75 Model promjene fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u limenkama (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Tablica 51 Modeli polinomne regresije svojstava piva u limenkama

Model	Polinom	Koef. Determ.
CL_model	$y = -0{,}0022x^6+0{,}0267x^5-0{,}0806x^4-0{,}0833x^3+0{,}6328x^2-0{,}3933x+9{,}2$	$R^2 = 1$
BI_model	$y = 0{,}0069x^6-0{,}1042x^5+0{,}5486x^4-1{,}1458x^3+0{,}4444x^2+1{,}25x+17$	$R^2 = 1$
FO_model	$y = -0{,}0278x^6+0{,}5x^5-3{,}3611x^4+10{,}333x^3-14{,}111x^2+6{,}6667x+7$	$R^2 = 1$
HZ_model	$y = -0{,}0044x^6+0{,}07x^5-0{,}4319x^4+1{,}3917x^3-2{,}3636x^2+1{,}9383x+3{,}4$	$R^2 = 1$

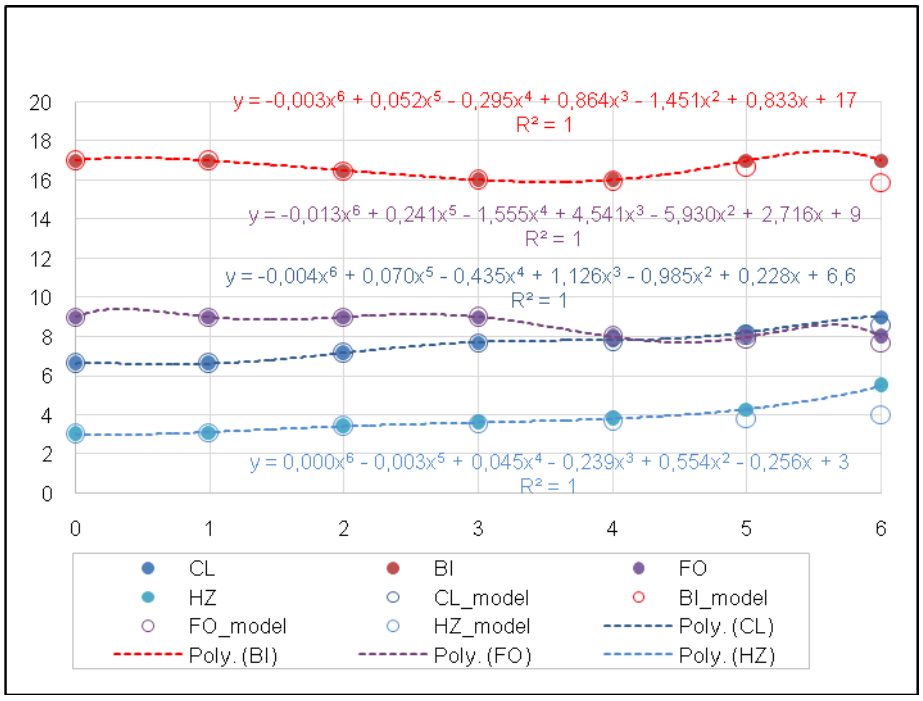


Slika 76 Model promjene fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u bačvama (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Tablica 52 Modeli polinomne regresije svojstava piva u bačvama

Model	Polinom	Koef. Determ.
CL_model	$y = -0{,}0047x^6+0{,}0842x^5-0{,}5639x^4+1{,}7542x^3-2{,}4814x^2+1{,}3117x+8{,}4$	$R^2 = 1$
BI_model	$y = -0{,}0014x^6+0{,}0208x^5-0{,}1181x^4+0{,}3125x^3-0{,}3806x^2+0{,}1667x+18$	$R^2 = 1$
HZ_model	$y = -0{,}0025x^6+0{,}0383x^5-0{,}2042x^4+0{,}4583x^3-0{,}4433\,x^2+0{,}4533x+2{,}7$	$R^2 = 1$

Promjene vrijednosti stabilnosti pjene (FO) kod svijetloga lager piva u bačvama nisu opisane jer su zadržale nepromijenjenu vrijednost tijekom skladištenja.



Slika 77 Model promjene fizikalno-kemijskih svojstava pils piva u staklenoj ambalaži (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Tablica 53 Modeli polinomne regresije svojstava pils piva u staklenoj ambalaži

Model	Polinom	Koef. Determ.
CL_model	$y = -0{,}0041x^6+0{,}0706x^5-0{,}4358x^4+1{,}126x^3-0{,}9851x^2+0{,}2283x+6{,}6$	$R^2 = 1$
BI_model	$y = 0{,}0035x^6+0{,}0521x^5-0{,}2951x^4+0{,}8646x^3-1{,}4514x^2+0{,}8333x+17$	$R^2 = 1$
FO_model	$y = -0{,}0139x^6+0{,}2417x^5-1{,}5556x^4+4{,}5417\,x^3-5{,}9306x^2+2{,}7167x+9$	$R^2 = 1$
HZ_model	$y = 0{,}0001x^6-0{,}0037x^5+0{,}0451x^4-0{,}2396\,x^3+0{,}5547x^2-0{,}2567x+3$	$R^2 = 1$

4.4.2.1 Validacija modela

Zbog opsežnosti provedenog istraživanja nije bilo mogućnosti ponoviti sva mjerenja, nego je za validaciju modela prirađen samo jedan set podataka. Istraživanjima je potvrđeno kako su najveće promjene piva u PET ambalaži. Stoga su za svijetlo lager pivo u PET ambalaži ponovljena mjerenja fizikalno-kemijskih veličina tijekom šest mjeseci skladištenja. Izmjerene vrijednosti prikazane su u **Tablici 54**. Te vrijednosti upotrijebljene su za validaciju predloženih prediktivnih polinomnih modela šestog stupnja.

S obzirom na to da su najveće promjene zabilježene kod promjene boje (CL), gorčine (BI), stabilnosti pjene (FO) i bistroće (HZ) svojstava svijetloga lager piva u PET ambalaži tijekom 6 mjeseci skladištenja, upravo su ove vrijednosti korištene i za validaciju modela.

Tablica 54 Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva u PET ambalaži tijekom 6 mjeseci (AI 0,20 mL, TPO 60 ppb) (uzorak B)

Vrijeme	OE	AE	SG	AL	pH	CL	BI	PY	HZ	DO	CO	FO
mjesec	°Plato	°Plato	g /mL	mL /100 mL		EBC	BU	mg/L	EBC	ppb	g/L	min.
0	10,98	2,15	1,0083	4,69	4,4	7,0	19	98	0,30	50	5,5	>9
1	10,98	2,15	1,0083	4,68	4,4	7,8	18	105	0,30	50	4,7	6
2	11,04	2,16	1,0083	4,69	4,4	9,0	18	106	0,42	65	4,3	6
3	11,02	2,16	1,0084	4,68	4,4	9,7	18	104	0,47	84	4,1	6
4	11,05	2,15	1,0084	4,68	4,4	10,0	18	105	0,98	90	4,0	5
5	10,94	2,14	1,0084	4,66	4,4	10,5	18	104	2,50	110	3,7	5
6	11,02	2,17	1,0083	4,69	4,4	10,7	17	103	3,55	122	3,6	5
$\bar{x}$	11,00	2,15	1,0083	4,68	4,40	9,24	18,00	103,57	1,22	81,57	4,26	6,01
s	0,04	0,01	0,00	0,01	0,00	1,39	0,58	2,64	1,29	28,25	0,64	1,45
CV	0,36	0,45	0,01	0,23	0,00	15,08	3,21	2,55	106,17	34,63	14,96	24,10

OE (ekstrakt osnovne sladovine), AE (prividni ekstrakt), SG (spec. težina), AL (alkohol volumni), CL (boja), BI (gorčina), PY (polifenoli), HZ (bistroća/mutnoća), DO (otopljeni kisik), CO (CO_2), FO (pjena), AI (zrak), TPO (ukupni pakirani kisik)

Tablica 55 Usporedba izmjerenih vrijednosti za svijetlo lager pivo u PET ambalaži (set za validaciju) i vrijednosti izračunatih primjenom predloženih polinomnih modela (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ)

Vrijeme	CL	CL_model	BI	BI_model	FO	FO_model	HZ	HZ_model
(mjesec)								
0	7,0	6,6	19	19	9,1	9,1	0,30	0,33
1	7,8	7,8	18	19	6	6	0,30	0,29
2	9,0	8,8	18	18	6	6	0,42	0,32
3	9,7	9,5	18	18	6	6	0,47	0,44
4	10,0	10,0	18	18	5	6	0,98	0,52
5	10,5	10,0	18	18	5	6	2,50	1,60
6	10,7	10,3	17	18	5	6	3,55	3,08
$\bar{x}$	9,243	9,000	18,000	18,286	6,014	6,443	1,217	0,940
s	1,394	1,365	0,577	0,488	1,450	1,172	1,292	1,050
CV	15,080	15,167	3,208	2,668	24,103	18,186	106,174	111,749
r		0,990		0,592		0,939		0,978

Vrijednost koeficijenta korelacije (*r*) između izmjerenih vrijednosti za svijetlo lager pivo u PET ambalaži (set za validaciju) i vrijednosti izračunatih primjenom predloženih polinomnih modela za boju (CL), gorčinu (BI), pjenu (FO) i bistroću (HZ), $r = 0,99$.

5. RASPRAVA

Osnovni cilj ove disertacije bio je statističkim analizama i metodama te matematičkim modelima opisati primijećene značajne promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva uskladištenoga u različitoj ambalaži.

Sagledati utjecaj punjenja, odnosno pasterizacije, na fizikalno-kemijska svojstva i sastav piva primjenjujući oba u praksi korištena načina, protočnu i tunelsku pasterizaciju. Nadalje, pratiti promjene fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva tijekom vremena skladištenog u različitoj ambalaži (staklene boce, PET ambalaža, limenke i bačve) kroz 6 mjeseci te usporediti navedene promjene piva s obzirom na različit sadržaj polifenola, napunjenog u staklenu ambalažu uzimajuću pretpostavljeni antioksidacijski karakter polifenola i njegov mogući utjecaj na promjene fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva jer su navedene promjene, kako je spomenuto, ili izazvane ili katalizirane prisutnim kisikom u proizvodu. Zbog jednostavnijeg praćenja opisa dobivenih rezultata ovo poglavlje podijeljeno je u potpoglavlja sukladno grafičkim i tabličnim prikazima rezultata u poglavlju **Rezultati**.

5.1.FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PIVA TIJEKOM PUNJENJA I SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI

Iz **Tablice 15** i **Slike 50** vidljivo je da tijekom punjenja piva u staklenu ambalažu korištenjem protočnog pasterizatora, odnosno izlaganjem piva višim temperaturama (cca 27 sec. na 72 ºC, što je 24 *PU*), fizikalno-kemijski parametri kakvoće piva (OE, AE, SG, AL, pH i CL) u tlačnom tanku i upakiranom proizvodu nisu se značajno razlikovali. Zabilježene je smanjenje mutnoće (HZ) za 27%, smanjenje koncentracije otopljenoga kisika (DO) u upakiranom proizvodu za 53**%** te povećanje koncentracije CO_2 (CO) u upakiranom proizvodu za 4%. **Tablica 17** i **Slika 51** prikazuju promjene tijekom punjenja piva u limenke korištenjem tunelskog pasterizatora, odnosno izlaganjem piva višim temperaturama (cca 14,5 min. na 62 ºC, što je 28 *PU*). Zabilježeno je smanjenje mutnoće (HZ) za 32% i smanjenje koncentracije kisika (DO) u upakiranom proizvodu za 25%. Smanjenje mutnoće između nepasteriziranoga i pasteriziranoga piva vjerojatno je pogreška mjerenja. Bistroća nepasteriziranoga piva (pivo u tlačnom tanku) očitavana je pri nižoj temperaturi piva u odnosu na pasterizirano pivo. Zabilježeno povećanje koncentracije CO_2 (zasićenje piva) i smanjenje koncentracije otopljenog kisika (otplinjavanje O_2), što je posljedica povećanja tj. promjene tlakova na liniji punjenja (pogotovo u pufer tanku i „kapi" punjača) te dijelom zbog otapanja O_2 u tlačnom tanku.

Nadalje, iz **Tablica 15, 16, 17, 18, 19** vidljivo je kako je najveća varijabilnost (*CV*) analiziranog uskladištenog proizvoda u svim tipovima ambalaže tijekom 6 mjeseci zabilježena za vrijednosti bistroće (HZ), boje (CL) otopljenoga kisika u upakiranom proizvodu

(DO) i trajnosti pjene (FO) što je u skladu s navodima i istraživanjima Ditrych i sur. (2015.), Jelinek i sur. (2014.), He i sur. (2012.), Bamforth (2011.), Cao i sur (2011.), Shellhammer (2010.), Pejin (2009.), Dvorakova i sur. (2008.), Callemien i Collin (2007.), Aron i Shellhammer (2010.) (Vanderhaegen i sur., 2006.). Iz navedenih tablica također je vidljivo kako nisu zabilježene promjene fizikalno-kemijskih parametara kakvoće piva (OE, AE, SG, AL, pH i CL) tijekom punjenja (tlačni tank – ambalaža). To potvrđuje da nije došlo do miješanja proizvoda s vodom, sredstvima za pranje ili sanitaciju te da zabilježene promjene piva tijekom skladištenja nisu uzrokovane kemijskim „kontaminantima“.

Iz Tablice 16 vidljivo je kako je pivo ambalažirano u PET ambalažu s obzirom na koncentraciju CO_2, van (proizvodne) specifikacije poslije prvoga mjeseca skladištenja (koncentracija CO_2 je 4,6 g/L). Uobičajena koncentracija CO_2 za svijetla lager piva je od 5,0 do 5,4 g/L, pri čemu Pravilnik o pivu (NN, 2011.) propisuje minimalnu količinu ugljičnog dioksida u pivu od 3 g/L.

Iz **Tablice 16 i 18** i **Slike 57** vidljivo je da trajnost pjene (FO) u PET ambalaži ima najveću izmjerenu varijabilnost i vremenom opada. U staklenoj ambalaži i limenkama izmjeren je ujednačeni lagani pad, a trajnost je pjene u bačvama ujednačena uslijed konstantnog rasta CO_2 (posljedica punjenja pod višim tlakom) od čije koncentracije trajnost pjene u mnogome ovisi.

Nakon PET ambalaže (u kojoj vrijednosti DO rastu, a CO opada), najveća varijabilnost koncentracije otopljenog kisika (DO) i ugljičnog dioksida (CO) izračunata je za pivo u bačvi (smanjenje koncentracije kisika i povećanje koncentracije CO_2). Navedene vrijednosti za limenke i staklenu ambalažu bile su ujednačene, odnosno koncentracija CO_2 uglavnom je konstantna, a koncentracija otopljenog kisika smanjuje se vremenom (**Tablice 15, 16, 17, 18**).

Iz **Tablica 15, 16, 17 i 19** vidljivo je kako su vrijednosti ukupno pakiranoga kisika (TPO) i otopljenoga kisika (DO) najveće u pivu u limenkama, zatim u pils pivu u staklenoj ambalaži te u svijetlom lager pivu u PET-u te na kraju pivu u staklenoj ambalaži. Ako su uzme u obzir „dobra proizvođačka praksa“ koja preporučuje vrijednosti za TPO od 250 do 350 ppb, izmjerene vrijednosti ukazuju na ujednačenost i kvalitetu procesa ambalažiranja s obzirom na TPO vrijednosti.

Iz **Tablica 15, 17 i 19** vidi se da su najveće vrijednosti za test trajnosti (HF, toplo-hladni test) na koloidnu stabilnost piva imalo pils pivo upakirano u staklenu ambalažu, zatim pivo u limenkama te svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži (što je veća vrijednost za HF to je pivo koloidno nestabilnije). Uzrok tomu je sastav pils piva u kojemu je udio polifenola i proteina (polipeptida) najveći te nešto većim vrijednostima TPO-a u pils pivu i limenkama u odnosu na

svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži. Ovi spojevi su prepoznati kao glavni uzročnici koloidne nestabilnosti.

Najveću varijabilnost, odnosno promjene navedenih fizikalno-kemijskih svojstava piva, su u pivu ambalažiranom u jednoslojnoj PET ambalaži (**Tablica 16**). To je potvrdilo i istraživanje Šmogrovičove (2012.) koja je istraživala postojanost piva upakiranog u PET ambalažu različitih ugrađenih barijernih svojstava PET ambalaže i temperature skladištenja. Značajnija promjena intenziteta gorčine (BI) piva pokazala se također u PET ambalaži (**Slika 54**).

Razni autori navode kvantitativnu, ali najčešće kvalitativnu, tj. senzorsku, promjenu gorčine piva uslijed gorkih sastojaka iz hmelj, tijekom skladištenja (Vanderhaegen i sur., 2006.; Cao i sur., 2011.). Bilježe i pojavu „trpkoga“ i „gruboga“ okusa piva kao posljedicu smanjenja koncentracije malih polimerizacijskih jedinica flavonoida (monomera i dimera) tijekom „starenja“ odnosno skladištenja piva te njihove oksidacije u tanoide koji su aktivni oblici i sudjeluju u formiranju mutnoće piva (Krstanović, 2000.; Pejin, 2009.).

Tablice 15 i 19 prikazuju promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva s početnim sadržajem polifenola (97 mg/L i 157 mg/L) u staklenoj ambalaži (0,50 L), vrijednostima otopljenog kisika (DO) za svijetlo lager pivo 50 ppb i pils pivo 75 ppb, vrijednostima ukupno upakiranog kisika (TPO) 46 i 72 ppb i testa trajnosti (HF) 3,2 i 8,2. Varijabilnost promjena bistroće (HZ), boje (CL) i otopljenoga kisika (DO) veća je kod pils piva (sladno pivo). Uzrok tomu su najvjerojatnije zapažanja kao i kod zapažanja za test trajnosti (HF).

Kod sladnoga pils piva izračunata je veća varijabilnost vrijednosti za bistroću (HZ) i boju (CL), (povećanje vrijednosti) te otopljeni kisik (DO), (smanjenje vrijednosti) u odnosu na svijetlo lager pivo (**Tablice 19 i 15**). Iz rezultata provedenoga istraživanja i literaturnih navoda nameće se zaključak kako je spomenuta varijabilnost posljedica inicijalno većih vrijednosti za DO i TPO kod pils piva u odnosu na svijetlo lager pivo. To potvrđuje i veća vrijednost rezultata testa trajnosti (HF) za pils pivo.

Nakon pet mjeseci u PET ambalaži izmjerene su vrijednosti bistroće (HZ) piva od 1,6 EBC (**Tablica 16**). Uobičajene vrijednosti bistroće za svijetla lager piva su maksimalno 1 EBC.

Nisu primijećene značajnije promjene koncentracije polifenola tijekom skladištenja suprotno nekim istraživanjima gdje se s vremenom njihov udio smanjivao uslijed oksidacijskih procesa (Siqueira i sur., 2011.; Cao i sur., 2011.). Vjerojatni razlog tomu je generalno niska koncentracija kisika (DO) i ukupno pakiranoga kisika (TPO) te inicijalno nizak udio polifenola u ispitivanim pivima.

U svim pakovinama zabilježene su promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja (HZ, CL, DO i FO). Najveće promjene navedenih svojstava su zabilježene u PET ambalaži.

Općenito, sve zabilježene promjene su u skladu s dosadašnjim istraživanjima i literaturnim navodima, ali su uglavnom minimalizirane (izuzev PET ambalaže) zbog inicijalno malih vrijednosti koncentracije DO, TPO i koncentracije polifenola (PY). Najčešće primjenjivane tolerancije i vrijednosti za koncentraciju otopljenog kisika (DO) su i do 200 ppb, za TPO do 350 ppb, u literarnim izvorima najčešće spominjane vrijednosti polifenola ispitivanih piva kreću se 200 – 400 mg/L.

5.2. LAKO HLAPLJIVE KOMPONENTE PIVA TIJEKOM PUNJENJA I SKLADIŠTENJA U RAZLIČITOJ AMBALAŽI

Iz **Tablice 20** i **Slike 68** vidljivo je da nije bilo značajnijih promjena u sastavu lakohlapljivih komponenti piva tijekom punjenja piva u staklenu ambalažu, korištenjem protočnog pasterizatora, odnosno izlaganjem piva višim temperaturama (cca 27 sec. na 72 ºC, što je 24 *PU*). Zabilježeno je neznatno povećanje dimetil sulfida (DMS) za 3%. **Tablica 22** i **Slika 62** prikazuju promjene tijekom punjenja piva u limenke korištenjem tunelskog pasterizatora, odnosno izlaganjem piva višim temperaturama (cca 14,5 min na 62 ºC, što je 28 *PU*) Zabilježeno je povećanje dimetil sulfida (DMS) u upakiranom proizvodu za 25% te smanjenje koncentracije pentandiona (PEN) za 11%. Dakle, nešto izraženije promjene u odnosu na protočnu pasterizaciju uz nešto veću vrijednost PU tunelske pasterizacije (28 PU naspram 24 PU).

Iz **Tablica 20, 21, 22, 23, 24** i **Slika 60, 61, 62**,**63 i 65** vidljivo je kako je najveća varijabilnost (*CV*) analiziranog uskladištenog proizvoda tijekom 6 mjeseci u svim tipovima ambalaže i piva zabilježena za vrijednosti diacetila (DIA), pentandiona (PEN), acetaldehida (ACE) tj. karbonilnih spojeva, dimetil sulfida (DMS) i izoamil acetata (IAC), što je u skladu s tvrdnjama i istraživanjima Vanderhaegen i sur.(2006.), Cao i sur. (2011.), Chadikovski i sur. (2011.), Šmogrovičova (2012.), Bamforth i sur. (2009.). Sve navedene vrijednosti uglavnom su rasle (izuzev IAC, estera, imao je blage padajuće vrijednosti) tijekom promatranog vremenskog razdoblja. Nadalje, najveće varijabilnosti (u smislu rasta koncentracija) navedenih lako hlapljivih komponenti (DIA, PRO, PEN i ACE) bila je tijekom skladištenja piva u PET ambalaži.

Vrijednosti ukupnih viših alkohola i ukupnih estera nisu pokazale značajniju varijabilnost, iako neki autori bilježe njihov blagi pad koncentracija tijekom skladištenja (Cao i sur.,2011.; Chadikovski i sur., 2011.).

Svaki proizvođač piva za svoj proizvod propisuje odnosno izrađuje standardni senzorski profil piva te u skladu s njim propisuje ciljane vrijednosti i toleranciju za navedene mjerene lakohlapljive komponente.

Uobičajene ciljane vrijednosti za diacetile, koji su najvažniji sastojci loše arome „mladog“ (nezrelog) piva, kod standardnih svijetlih piva donjega vrenja kreću se u rasponu 20 – 40 ppb (Barnes, 2013.), odnosno za vicinalne diketone (diacetili i pentandion) u rasponu 100 – 150 ppb (Marić, 2009.). Iz **Tablice 21** vidljivo je da je u PET ambalaži vrijednost za diacetile, od iznimno male početne vrijednosti od 7 ppb, udvostručena već za mjesec dana, a vrijednost veća od 50 ppb dostignuta je nakon 5 mjeseci skladištenja. U prvom redu to je posljedica propusnosti PET ambalaže i konstantnoga povećanja vrijednosti otopljenoga kisika (DO) tijekom skladištena piva u navedenoj ambalaži.

Uspoređujući rezultate mjerenja i vrijednosti koeficijenata varijabilnosti (*CV*) iz **Tablica 20** i **24** nije primijećen antioksidacijski učinak veće koncentracije polifenola u pivu na promjenu koncentracija lako hlapljivih komponenti. Mogući uzrok je inicijalno niska koncentracija polifenola u oba analizirana piva i njihova mala međusobna razlika. Dodatni mogući uzrok su inicijalno niske vrijednosti DO i TPO te nešto veće vrijednosti DO i TPO u pils pivu u odnosu na svijetlo lager pivo u staklenoj 0,50 L ambalaži.

5.3. MIKROBIOLOŠKA KONTROLA I ANALIZE

Tablice 25, 26, 27 i 28 prikazuju objekte i mjesta uzorkovanja za mikrobiološke kontrole i analize. Iz rezultata u tablicama i **Slike 66** vidljivo je kako su površine, armatura, ambalaža, proces punjenja i upakirani proizvod bez mikrobiološke kontaminacije. Mikrobiološka analiza upakiranoga proizvoda dala je negativne rezultate i poslije isteka komercijalnog roka, odnosno nakon 6 mjeseci. To je značajno za PET ambalažu zbog njezine očekivane propusnosti za plinove. Ovi rezultati isključuju mikroorganizme odnosno mikrobiološku kontaminaciju kao uzročnika mogućih fizikalno-kemijskih promjena svojstava i promjena sastava (lako hlapljive komponente) piva kao što prikazuje **Tablica 2**.

5.4.STATISTIKA I MODELIRANJE

5.4.1.Statistika

5.4.1.1 Korelacijske analize

Koeficijent korelacije (*r*) pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable, a predznak koeficijenta korelacije (+ ili –) govori nam o smjeru povezanosti (Udovčić i sur., 2007.). U ovom slučaju koeficijenti

korelacije (*r*) fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva pokazuju kolika je sličnost promjena navedenih vrijednosti tijekom skladištenja 6 mjeseci u različitoj ambalaži.

U **Tablicama** od **29** do **32** prikazane su usporedbe sličnosti promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva s najvećim zabilježenim varijabilnostima, skladištenog u različitoj ambalaži tijekom 6 mjeseci, preko koeficijenta korelacije (*r*). Crveno označeni brojevi upućuju na značajne koeficijente korelacije (*r*) s vrijednostima $p<0,05$.

Iz **Tablice 29** vidljivo je da se najveća korelacija/sličnost promjena svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži odnosi na promjenu vrijednosti boje (CL) i otopljeni kisik (DO) piva gdje negativni predznak koeficijenta korelacije (r = -0,818) upućuje da rast vrijednosti boje piva korelira s padom koncentracije otopljenoga kisika tijekom vremena skladištenja.

Tablica 30 prikazuje usporedbe sličnosti promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva u PET ambalaži gdje su već evidentirane najveće i intenzivnije promjene. Vidljivo je da promjena boje korelira s promjenom gorčine (BI) r = -0,889, stabilnosti pjene (FO) r = -0,878 i otopljenog kisika (DO) r = 0,930. U tom slučaju je predznak koeficijenta korelacije pozitivan jer je kod PET ambalaže evidentiran stalan porast koncentracije otopljenog kisika zbog propusnosti PET ambalaže. Nadalje, promjena bistroće korelira s promjenom gorčine (BI) piva r = -0,782 i promjenom otopljenoga kisika (DO) r = 0,832. Vidljivo je kako promjena stabilnosti pjene (FO) korelira s promjenama boje (CL) r = -0,878, gorčine (BI) r = 0,787 i otopljenog kisika (DO) r = -0,809. Otopljeni kisik (DO) korelira sa svim promatranim parametrima fizikalno-kemijske kakvoće piva (CL, BI, FO i HZ).

Tablica 31 prikazuje usporedbe sličnosti promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva u limenci. Promjena boje piva korelira s promjenom bistroće (HZ) r = 0,978 i promjenom otopljenog kisika (DO) r = -0,850, a promjena bistroće (HZ) korelira i s otopljenim kisikom (DO) r = -0,887.

Tablica 32 prikazuje usporedbe sličnosti promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva u bačvi gdje je vidljivo da bistroća (HZ) piva korelira s bojom (CL) r = 0,976, gorčinom (BI) r = 0,828 i pjenom (FO) r = 0,828.

Između fizikalno-kemijskih svojstva piva u svim amblažama s obzirom na CL, BI, FO, HZ i DO zabilježena je sličnost promjena nastalh tijekom skladištenja s jakim ili srednje jakim *r* vrijednostima, (*r* je kriterij za jakost veze među varijablama).

U **Tablicama** od **33** do **36** dat je prikaz usporedbe sličnosti promjena sastava lako hlapljivih komponenti piva s najvećim zabilježenim varijabilnostima, skladištenog u različitoj ambalaži tijekom 6 mjeseci preko koeficijenta korelacije (*r*).

Iz **Tablice 33** vidljivo je kako su najveća korelacija promjena izražena preko koeficijenta korelacije (*r*), svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži između acetaldehida (ACE) i dimetil sulfida (DMS) *r* = 0,773 zatim acetaldehida (ACE) pentandiona (PEN) *r* = 0,770.

Iz **Tablice 34** vidljivo je kako su najveća korelacija promjena svijetlog lager piva u PET ambalaži između diacetila (DIA) i acetaldehida (ACE) *r* = 0,801 zatim diacetila (DIA) i pentandiona (PEN) *r* = 0,951 koji spadaju u karbonilne spojeve i označeni su kao pokazatelji oksidativnih promjena i „starenja" piva (Aron i Shellhamme, 2010.; Weistock i sur., 2010.: Kunz i sur., 2014.).

Iz **Tablice 35** vidljivo je da su najveća korelacija promjena promatranih lako hlapljivih komponenti svijetlog lager piva u limenci zabilježena između diacetila (DIA) i dimetil sulfida (DMS) *r* = -0,797.

Tablica 36 prikazuje koeficijente korelacije (r) između promatranih lako hlapljivih komponenti piva u bačvi. Zabilježena je najveća korelacija promjena između pentandiona (PEN) i dimetil sulfida (DMS) *r* = -0,836.

Između sastava lako hlapljivih komponenti piva u svim ambalažama s obzirom na ACE, DMS, DIA i PEN zabilježena je sličnost promjena nastalih tijekom skladištenja s jakim ili srednje jakim *r* vrijednostima (*r* je kriterij za jakost veze među varijablama).

U **Tablicama** od **37** do **40** dat je prikaz usporedbe sličnosti promjena promatranih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva skladištenog u različitoj ambalaži tijekom 6 mjeseci preko koeficijenta korelacije (*r*).

Iz **Tablice 37** vidljivo je da se najveća korelacija promjena svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži promatranih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava (lako hlapljive komponente) piva zabilježen između bistroće (HZ) piva i diacetila (DIA) *r* = 0,892, bistroće (HZ) i acetaldehida (ACE) *r* = 0,789, bistroće (HZ) i pentandiona (PEN) *r* = 0,796, otopljenog kisika (DO) i dimetil sulfida (DMS) *r* = -0,875 zatim otopljenog kisika (DO) i izoamil acetat (IAC) *r* = 0,798.

Tablica 38 prikazuje vrijednosti koeficijenta korelacije (r) između svojstava i sastava piva u PET ambalaži. Vidljivo je kako se najveća korelacija promjena svijetlog lager piva u PET ambalaži između boje (CL) i acetaldehida (ACE) *r* = 0,971, boje (CL) i diacetila (DIA) *r*=0,817 te boje (CL) i pentandiona (PEN) *r* = 0,890. Gorčina (BI) korelira s acetaldehidom (ACE) *r*=0,790, dimetil sulfidom (DMS) *r* = 0,791 i pentandionom (PEN) *r* = -0,784, stabilnost pjene (FO) s acetaldehidom (ACE) *r* = -0,890, bistroća (HZ) s diacetilom (DIA) *r* = 0,843 i pentandionom *r* = 0,801, a otopljeni kisik DO s acetaldehidom (ACE) *r* = 0,859 i diacetilom (DIA) *r* = 0,932.

Iz **Tablice 39** vidljivo je kako je najveća, u ovom slučaju, srednje jaka korelacija promjena svijetlog lager piva u limenci između promatranih fizikalno-kemijskih svojstava i lako hlapljivih komponenti piva između boje (CL) i acetaldehida (ACE) *r* = 0,695 i gorčine(BI) i dimetil sulfida (DMS) *r* = 0,744.

Tablica 40 prikazuje vrijednosti koeficijent korelacije (r) između svojstava i sastava piva u bačvi. Boja (CL) svijetloga lager piva u bačvi značajno korelira sa dimetil sulfidom (DMS) *r* = -0,900 i pentandionom (PEN) *r* = 0,840, bistroća (HZ) također sa dimetil sulfidom (DMS) *r* = -0,913 i pentandionom (PEN) *r* = 0,778 dok otopljeni kisik (DO) sa acetaldehidom (ACE) r = -0,792 i diacetilima (DIA) *r* = -0,775.

Tablica 41 i **42** daju prikaz vrijednosti koeficijenata korelacije svih fizikalno-kemijskih svojstava i sastava lako hlapljivih komponenti svijetloga lager piva u staklenoj ambalaži s pripadajućim *p* vrijednostima. Neke od izmjerenih vrijednosti imaju značajne koeficijente korelacije, ali ih nismo uzeli u razmatranje jer su njihove promjene tijekom skladištenja bez veće varijabilnosti i značaja, skupovi se mogu smatrati homogenima. To isto vrijedi i za **Tablicu 43** koja prikazuje vrijednosti koeficijent korelacije (*r*) i između ukupnih promatranih svojstava i sastava svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži.

Iz **Tablica 37** – **40, 43** te **Tablica 15 i 20, 16 i 21, 17 i 22, 18 i 23,19 i 24** vidljivo je da promjene bistroće i otopljenog kisika (HZ i DO) prate značajnije promjene koncentracija acetaldehida, diacetila, dimetil sulfida, pentandiona i dijelom izoamil acetata (ACE, DIA, DMS, PEN i IAC).

Najviše zabilježenih korelacija promjena svojstava i sastava zabilježeno je u PET ambalaži gdje su evidentirane najveće promjene i varijabilnosti svojstava i sastava piva tijekom skladištenja..

Iz **Tablica 15** i **18** vidljivo je da je tijekom skladištenja najmanja promjena najvažnijih pokazatelja kakvoće (HZ i CL) zabilježena upravo kod svijetlog piva u staklenoj ambalaži i bačvi. To potvrđuje i statistička analiza prema kojoj koeficijent korelacije promjena fizikalno-kemijskih svojstava između ta dva uzorka ima najveću vrijednost.

Iz **Tablice 44** i **Slike 67** vidljivo je da je najveća korelacija/sličnost fizikalno-kemijskih promjena svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži i piva ambalažiranog u bačve (*r* = 0,976), zatim limenke (*r* = 0,967) i na kraju s promjenama piva u PET ambalaži (*r* = 0,886).

Iz iste tablice vidljiva je izrazito visoka sličnost promjena svijetlog lager piva i pils piva u staklenoj ambalaži (*r* = 0,996).

Iz **Tablica 20** – **23** vidljivo je da je tijekom skladištenja najmanja promjena najvažnijih pokazatelja sastava lako hlapljivih komponenti piva (ACE i DIA) zabilježena kod svijetlog piva

u bačvi, limenci pa staklu. To potvrđuje i statistička analiza prema kojoj koeficijent korelacije promjena fizikalno-kemijskih svojstava između ova dva uzorka ima najveću vrijednost.

Iz **Tablice 45** i **Slike 68** vidljivo je da je najveća korelacija/sličnost promjena sastava svijetlog lager piva ambalažiranog u bačve i limenke (r = 0,982), a zatim u staklenoj ambalaži (r=0,962) i na kraju nešto niža korelacija s promjenama piva u PET ambalaži (r = 0,919).

Iz iste tablice vidljiva je izrazito visoka sličnost promjena sastava svijetlog lager piva i pils piva u staklenoj ambalaži (r = 0,979). Navedena zapažanja ukazuju na veću sličnost promjena sastava piva nego fizikalno-kemijskih svojstava u različitim ambalažama.

Gledajući zajedno ukupne promjene i svojstava i sastava piva najveća je sličnost promjena kakvoće piva zabilježena kod piva u bačvi i limenci (r = 0,972), bačvi i staklu (r = 0,970) te piva u staklu i limenci (r = 0,968) (**Tablica 46** i **Slike 69**). Vrijednost koeficijenta korelacije koji ukazuje na sličnost ukupnih promjena svijetlog lager piva u PET ambalaži imao je najniže vrijednosti što ukazuje na najveće razlike u ukupnim promjenama piva tijekom 6 mjeseci skladištenja.

Iz iste tablice vidljiva je izrazito visoka sličnost ukupno zabilježenih promjena (svojstava i sastava) svijetlog lager piva i pils piva u staklenoj ambalaži 0,50 L (r = 0,976) što upućuje na već spomenuto nerealiziranje pretpostavljenog antioksidacijskog karaktera polifenola u pils pivu na promjene fizikalno-kemijskih svojstava i sastava (lako hlapljive komponente) piva.

5.4.1.2 Analiza glavnih komponenti (PCA)

Analizom glavnih komponenti promjena svijetlog lager piva u staklenoj ambalaži određeno je šest glavnih komponenti kojima se objašnjava 100% ukupnog varijabiliteta među podacima. Kumulativna varijanca objašnjena pomoću prve dvije komponente iznosi 60,71%. **Iz Tablice 47** vidljivo je da prva glavna komponenta opisuje 37,67% varijacija izmjerenih podataka, četiri glavne komponente su potrebne da bi se opisalo 85,91% varijacija, a šest za 100%.

Slika 70 prikazuje linijski dijagram postotnog udjela glavnih komponenti u ukupnoj varijanci (svijetlo lager pivo u staklenoj ambalaži).

Za prikazivanje osnovnih razlika svojstava i sastava piva bit će dovoljno u analizu uključiti prve dvije komponente koje zajedno opisuju 60,71% varijacija izmjerenih podataka. Uzajamna projekcija skorova za prve dvije glavne komponente, prikazana je na **Slici 71**. Ovaj grafički prikaz omogućava uočavanje raspodjele fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva u dvodimenzionalnom prostoru, prikazujući njihove međusobne udaljenosti u koordinatnom prostoru. Analizirajući podatke vidljivo je postojanje četiriju odvojenih grupa. Prvu grupu podataka čine DIA, DMS, ACE, PEN, HZ, CL, IAA, VAL, PY i SG. Drugu grupu čine CO, IBU, PRO, treću čine DO, IAC, EAC, EST, a četvrtu CO, IBU, PRO. Preostali

podaci (FO i BI) zauzimaju položaj u blizini ishodišta koordinatnog prikaza. Može se uočiti sličnost ponašanja promatranih varijabli unutar grupa. Vidljiv je porast vrijednosti svojstava iz prve grupe: HZ, CL, DIA, PEN i DMS-a, tijekom skladištenja. Vrijednosti varijabli iz druge grupe nisu se značajno mijenjale kao i vrijednosti iz četvrte grupe. Vrijednosti varijabli treće grupe su tijekom skladištenja padale (smanjenje vrijednosti DO i blagi pad IAC, a time i vrijednosti za EST).

U faktorskoj analizi, kao i u analizi glavnih komponenti, osnovna je ideja da set od p varijabli i (n individua) može biti definiran manjim brojem faktora, pa tako faktorska analiza može poslužiti kao redukcijska metoda. No, primarni je cilj identifikacija faktora i određivanje stupnja do kojeg su izvorne varijable objašnjene svakom dimenzijom tj. faktorom (Pecina, 2006). **Tablica 48** prikazuje faktorske skorove koji predstavljaju rezultate za svako analizirano svojstvo i sastav, odnosno faktorsko opterećenje za svaku jedinicu promatranja po pojedinim faktorima. Iz **Tablice 48** vidljivo je da za faktor 1 ni jedna od 22 varijable nema dominantan utjecaj na varijancu, a njihov ukupan odnos opisuje tek 37,67% varijance. Najveće vrijednosti skora za faktor 2 imaju varijable CO, PRO i IBU, ali su njihove pojedinačne vrijednosti također niske. Ukupna varijabilnost svojstava i sastava piva koju opisuju sve analizirane varijable na razini faktora 2 iznosi tek oko 23%. Iz ovih rezultata vidljivo je kako niti jedna varijabla nema dominantan utjecaj na promjene piva tijekom skladištenja nego su promjene akumulirana posljedica mnoštva malih promjena pojedinih svojstava i sastava.

5.4.1.3 Klaster analiza (CA)

Grafički prikaz rezultata hijerarhijskog klastera obavlja se pomoću dendograma koji pokazuje povezanost varijabli(objekata promatranja) i njihovu međusobnu udaljenost. Kod hijerarhijskih metoda obavlja se iterativan proces spajanja objekata u klastere tako da se u idućoj etapi spajaju objekti i prethodno formirani klasteri. Kada se jednom formiraju skupine, one se samo proširuju novim objektima prema povezanosti s tim kriterijima (Puška i Beganović, 2016.). Kod metoda jednostrukog povezivanja (eng. *Single linkage*), udaljenost između dva klastera je minimalna Euklidska udaljenost između svih parova točaka dva klastera (Papić-Blagojević i Bugar, 2009.). **Slika 72** prikazuje dendogram klaster analize, prema hijerarhijskoj metodi povezanosti fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva u staklenoj ambalaži. Vidljivo je grupiranje na razini udaljenosti 5 gdje se uočavaju četiri grupe s podgrupama koje čine CO, pH, AL, zatim ACE, IAC HZ, SG i AE, treća grupa PEN, DIA,CL,PRO i četvrta grupa sa EST,EAC,BU,FO OE. Na razini udaljenosti 18 pridružuje se jedinica promatranja BI, na udaljenosti 30 je DO, na 32 grupa DMS i IAA, na udaljenosti 58 je VAL i na 61je PY. Najmanju razinu udaljenosti (vrijednost=1) imaju svojstva pH i AL te IAC i

HZ. Najmanja udaljenost pokazuje najveću međusobnu sličnost ponašanja skupova varijabli. Prvu skupinu (CO, pH, AL) čine svojstva koja nisu pokazala promjenjivost tijekom skladištenja. Druga, treća i četvrta skupina uglavnom sadrže svojstva i sastav piva koji su pokazali sličnu varijabilnost (*CV*) i korelaciju iste su razine udaljenosti (5). Izmjerene veličine prve skupine bile su najnižih brojčanih izmjerenih vrijednosti, a brojčane vrijednosti povećavaju se od prve do pete skupine.

5.4.2. Modeliranje

Mjerenjem promjena fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lager piva tijekom skladištenja 6 mjeseci u različitoj ambalaži (staklene boce, PET ambalaža limenke i bačve te pils piva) utvrđeno je da je najveća varijabilnost (promjenjivost) svojstava (*CV*) bila za bistroću, boju otopljeni kisik i stabilnost pjene (HZ, CL, DO i FO). Izvjesna varijabilnost je zabilježena i za gorčinu piva (BI). Upravo zbog toga i rezultata korelacijskih i PCA analiza, promjenjivost je tih svojstva opisana modelima. Koncentracija otopljenog kisika (kojom bi opisali njegovu topivost u pivu, brzinu kemijskih reakcija) nije modelirana u ovom radu.

Korišteni su modeli koji opisuju promjene fizikalno-kemijskih svojstava piva polinomom šestoga stupnja uz koeficijent determinacije $R^2 = 1$. Neke od promjena mogle su se opisati i polinomima nižega stupnja uz zadovoljavajući koeficijent determinacije ali zbog unificiranosti i točnosti korišteni su uvijek polinomi šestog stupnja (**Slike 73** – **77** i **Tablice 49** – **53**).

U cilju validacije modela provedena su paralelna mjerenja fizikalno kemijskih svojstava svijetloga lager piva u PET ambalaži (**Tablica 54**) skladištenog također 6 mjeseci. **Tablica 54** prikazuje rezultate kontrolnog mjerenja (uzorak B) i izračunavanja fizikalno-kemijskih svojstava primjenom prediktivnih polinomnih modela za odabrane vrijednosti (CL, BI, FO i HZ). Odabrana svojstva pokazala su najveću promjenjivost tijekom skladištenja, a i najvažniji su fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće piva. Iz **Tablice 55** vidljivo je da nema značajne razlike aritmetičke sredine ($\bar{x}$), standardne devijacije (*s*) i koeficijenta varijacije (*CV*) između izmjerenih vrijednosti i vrijednosti dobivenih primjenom prediktivnih polinomnih modela. Koeficijent korelacije (*r*) sličnosti ukupnih promjena (CL, BI, FO i HZ) r = 0,99.

Koeficijent korelacije (r) potvrđuje visoku sličnost promjene za vrijednosti boje (CL), r = 0,99, stabilnosti pjene (FO), *r* = 0,94 te bistroće/mutnoće (HZ), *r* = 0,98 između izmjerenih vrijednosti i vrijednosti dobivenih primjenom polinomnog modela. Niža je sličnost promjene za gorčinu (BI), *r* = 0,59.

Na izmjerenim podacima izvedeni su i prediktivni matematički modeli za opisivanje promjena fizikalno-kemijskih svojstava svijetlog lager piva u staklenoj i PET ambalaži te pils piva u

staklenoj ambalaži. Za modeliranje odnosa među multivarijatnim mjerenjima korištene su regresijske metode najmanjih kvadrata: polinomna regresija (PLSR-PR) i metoda odzivnih površina (PLSR-RSM). Utvrđeno je da su obje kemometrijske metode prikladne za modeliranje fizikalno-kemijskih promjena piva nastalih tijekom skladištenja (Gagula i sur.,2016.).

Prikazani modeli mogu se koristiti u opisivanju i boljem razumijevanju promjena fizikalno-kemijskih svojstava piva tijekom skladištenja te za predviđanja navedenih promjena.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata i provedene rasprave u ovoj disertaciji mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava piva pokazali su varijabilnost (promjenjivost) vrijednosti izraženu preko koeficijenta varijacije (*CV*) za vrijednosti boje (CL), stabilnosti pjene (FO) otopljenog kisika (DO) i bistroću piva (HZ), u svim analiziranim tipovima ambalaže. Najizraženije promjene su bile u PET ambalaži.

2. Rezultati mjerenja sastava lako hlapljivih komponenti piva pokazali su najveću varijabilnost mjerenih vrijednosti za acetaldehid (ACE), dimetil sulfid (DMS), diacetil (DIA) i pentandion (PEN). Uskladišteno pivo u PET ambalaži pokazalo je najveću varijabilnost tih vrijednosti.

3. Uspoređivanjem vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava i sastava piva (lako hlapljive komponente) u tlačnom tanku i nakon ambalažiranja korištenjem protočne i tunelske pasterizacije, nisu zabilježene značajnije promjene, s tim da su promjene sastava piva (lako hlapljive komponente) nešto izraženije korištenjem tunelske pasterizacije,

4. Korelacijskim analizama fizikalno kemijskih promjena svojstava piva pokazalo se da su najsličnije promjene svojstava piva u staklenoj ambalaži s promjenama svojstava piva u bačvama, a promjena sastava lako hlapljivih komponenti piva u staklenoj ambalaži bile su najsličnije s promjenama u limenci. Korelacijskom analizom ukupnih promjena svojstava i sastava piva, najsličnije promjene s pivom u staklenoj ambalaži bilo je pivo u bačvama. Razlike vrijednosti koeficijenata korelacije su relativno male. U svim korelacijskim analizama najmanju sličnost promjena sa staklenom ambalažom i ostalim pakovinama imalo je pivo u PET ambalaži. Pils (sladno) pivo u staklenoj ambalaži pokazuje veliku sličnost promjena fizikalno-kemijskih svojstava i sastava sa svijetlim lager pivom uskladištenim u istoj ambalaži.

5. Promjene bistroće (HZ) i otopljenog kisika (DO) u prvom redu te boje (CL) i gorčine (BI) mogu se smatrati indikatorom ukupnih promjena kakvoće piva.

6. Korišteni modeli koji opisuju promjene promatranih fizikalno-kemijska svojstava piva: boje, gorčine, pjene i bistroće (CL, BI, FO i HZ), modeli su polinomne regresije šestog stupnja s koeficijentom determinacije $R^2 = 1$.

7. Između izmjerenih fizikalno-kemijskih vrijednost svojstava svijetloga lager piva (boja CL, gorčina BI, pjena FO, bistroća HZ) u PET ambalaži i vrijednosti izračunatih primjenom prediktivnih polinomnih modela, koeficijent korelacije (*r*) potvrđuje visoku sličnost ukupnih promjena r = 0,99. Za vrijednosti boje r = 0,99, stabilnosti pjene r=0,94 te bistroće r = 0,98. Niža zabilježena sličnost promjene je za gorčinu r = 0,59. Mogući uzrok tomu je relativno mala varijabilnost promjena gorčine tijekom skladištenja, uobičajena primjenjivana tolerancija vrijednosti gorčine piva ± 2 BU, što upućuje i na moguću toleranciju rezultata mjerenja.

8. Dodatnim izračunima pomoću prediktivnih matematičkih modela temeljenih na primjeni metode najmanjih kvadrata uspoređene su dvije regresijske metode. Utvrđeno je kako je metoda odzivnih površina (PLSR-RSM) preciznija i sigurnija u opisivanju promjena fizikalno-kemijskih svojstava svijetloga lagera piva i pils piva u staklenoj ambalaži, dok je polinomni regresijski model (PLSR-PR) dao bolje rezultate za svijetlo lager pivo u PET ambalaži. Vrijednosti R^2 za izračune primjenom modela polinomne regresije bile su do R^2 = 0,94. Za primijenjeni model odzivnih površine vrijednosti su bile i do R^2 = 1 (Gagula i sur., 2016.).

7. LITERATURA

Agu RC: A comparison of maize, sorghum and barley as Brewing adjuncts, *J. Inst. Brew*. 108(1):19-22, 2002.

Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK and Becker T: Humulus lupulus, a story that begs to be told. A review , *J. Inst. Brew*. 120:289-314, 2014.

Arranz S, Chiva-Blanch G, Martínez PV, Lamuela-Raventos RM and Estruch R: Review Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer, *Nutrients* 4, 759-781, 2012.

Aron PM and Shellhammer TH: A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability, *J. Inst. Brew*. 116(4), 369-380, 2010.

Bačić I, Polović I: *Utjecaj područja uzgoja i termina berbe na koncentraciju antocijana, elaginske kiseline i derivata te antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost sjemenki nara*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 4, 2013. http://www.unizg.hr/rektorova/upload_2013/Becic%20Polovic%20Rektorova%202013.doc [15.6.2016.]

Ball Co., 2016. *Products*, http://www.ball-europe.com/Products.htm [10.9.2016.]

Ball Packaging Europe, Beverage Can *Aluminium Specifications, Beverage End Specifications*, Green Luton LU1 3 LG United Kingdom, 2014.

Bamforth CW: Brewing New technologies, Cambridge, England,1-3, 76-77, 124, 185, 208, 293, 2006.

Bamforth CW: Beer: Tap into the Art and Science of Brewing, Second Edition, Oxford University Press, USA, 4-5, 109-122, 117, 146, 153-154, 164-165, 2003.

Bamfort CW: Beer Health and Nutrition, Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, Oxford, UK, 2, 50, 84-85, 124, 2004.

Bamforth CW, Russell I and Graham Stewart: Beer, A Quality Perspective, *A volume in Handbook of Alcoholic Beverages*, The flavor instability of beer, 85-109, 2009.

Bamforth CW: 125th Anniversary Review: The Non-Biological Instability of Beer, *J. Inst. Brew.* 117(4), 488-497, 2011.

Barnes T: The Complete Beer Fault Guide v. 1.4, 2013. http://www.carolinabrewmasters.com/PDF/Complete_Beer_Fault_Guide.pdf [27.3.2017.]

Barth Haas Group, Market Reports 2015/ 2016. http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/press_release/pdfs/692/barthreport2015-2016en.pdf [12.1.2017.]

Bašić BD: *Uvod u statističko zaključivanje, 2005/2006*, Fakultet elektrotehnike i računarstva Zagreb, 2005. http://www.zemris.fer.hr/predmeti/statmod/Uvod%20u%20statisticko%20zakljucivanje.pdf [18.2.2017.]

Bašić BD: *Analiza varijance, ANOVA, nastavni material*, Fakultet elektrotehnike i računarstva Zagreb, 2005. http://www.powershow.com/view4/53acd3-ZmFmN/ANALIZA_VARIJANCE_powerpoint_ppt_presentation [07.2.2017.]

Beluhan S: *Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2-3, 10-13, 28, 2013. http://www.pbf.unizg.hr/content/download/28864/112098/version/1/file/Uvodno+predavanje.pdf [03.3.2015.]

Benšić M, Šuvak N: *Primjenjena statistika*, Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za matematiku, Osijek, 1-5, 170-171, 2013.

Berend S i Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, *Arh Hig Rada Toksikol*, 59:205-212, 2008.

Beverage Journal:*The Evolution of Beer Packaging*, 2015. http://www.beveragejournalinc.com/new/easyblog/entry/the-evolution-of-beer-packaging [10.9. 2016.]

BFBi Keg & Cask Working Committee: *Standards for the desing / manufacture / performance / purchasing of 30L stanliess steel keg beer containers*, 2012. http://www.bfbi.org.uk/keg-and-cask/keg-and-cask—information [17.12.2016.]

Big Energy Project Innovation: Pasteurisation Options for Brewerie, *Workshop Report 2002*., https://industry.gov.au/energy/Documents/best-practice-guides/energy_bpg_pasteurisation_options_for_breweries.pdf [10.9.2016.]

Biljan-August M, Pivac S, Štambuk A: Uporaba statistike u ekonomiji, 2. Izdanje, Ekonomski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2, 3-10, 77, 2009.

Blanco CA, Nimubona D, Fernandez-Fernandez DE, Alvarez I: Sensory Characterization of Commercial Lager Beers and Their Correlations with Iso-α-Acid Concentrations, *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 3, No.1,1-8, 2015.

Bogunović N, Bašić BD: *Otkrivanje znanja o skupovima podataka, Multivarijantna analiza, Bilješke za predavanja, 2003/04*, Fakultet elektrotehnike i računarstva, Zagreb, 2003. http://www.zemris.fer.hr/predmeti/kdisc/bojana/biljeske-OZSP-pogl-1-2-3.pdf [08.2.2017.]

Bokulicha N and Bamforth CW: The Microbiology of Malting and Brewing, Microbiology and Molecular Biology Reviews, *Journals ASM.org*, USA, 2013.

Briggs, D E., Boulton, C A., Brookes, P A., Stevens, R.. Brewing Science and Practice, Woodhead Publishing Limited, chapter 2, chapter 3, chapter 7, chapter 5, chapter 12, chapter 21, Cambridge, UK, 2004.

Brody AL: Development of Packaging for Food Products, Chapter 8, by CRC Press, Inc, 2, 2000.

Budin R, Mihelić Bogdanić E. Vujasinović E: Sačuvanje energije i okoliša primjenom kogeneracije, *Sigurnost*, 49(3), 211-218, 2007.

Bujan F, Oros D, Rezić T: Primjena metode odzivnih površina u optimizaciji parametara procesa biološke obrade otpadnih voda u bioreaktoru s mikrobnim biofilmom, *International Interdisciplinary Journal of Young Scientists from the Faculty of Textile Technology*, *TEDI*, Vol 6, page 48-57, 2016.

Buculei A, Ionescu M, Ioana Rebenciuc I, Constantinescu G , Dabija A: A study of metal migration from packaging in beer during storage, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17 (3), 270-274, 2011.

Cajner H: Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa, Fakultet strojarstva i brodogradnje, *Doktorski rad*, Zagreb, 11-12, 2011.

Callemien D anda Collin S: Involvement of Flavanoids in Beer Color Instability during Storage, *J. Agric. Food Chem*., 55, 9066-9073, 2007.

Carvalho DO, Curto AF and Guido LF: Determination of Phenolic Content in Different Barley Varieties and Corresponding Malts by Liquid Chromatography-diode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometr, *Antioxidants* 4, 563-567, 2015.

Cao L, Zhou G, Guo P and Li Y: Influence of Pasteurising Intensity on Beer Flavour Stability, *J. Inst. Brew*. 117(4), 587-592, 2011.

Cask Brewing Systems Inc.: *Affordable Canning Solutions*, 2013. http://www.cask.com/files/pdf/CanVantages%202013.pdf [15.10.2016.]

Chadikovski A, Winkelhausen E, Doneva-Sapceska D: Beer flavor stability in different types of packaging, *Proceedings 7th International Congress of food technologists, biotechnologists and nutritionist*, 269-272, Opatija, Croatia, 2011.

Coles R, Mcdowell D, Kirwan MJ: Food packaging technology, Blackwell Publishing Ltd, London, 147,194, 2003.

Collin S, Jerkovic V, Bronhan M, Callmien D: Polyphenols and Beer Quality, *Springer-International Publisher Science, Technology, Medicine*, 2013.

Cota T: *Quality Pillar, Chapter VPO.QUAL*. 3.1.11, *Laboratorijske metode i mjerenja 3.1.11.3.2., Fizikalno.kemijske metode: Sladovina i pivo, Plinska kromatografija, Headspace analize*, InBev co., Zagrebačka pivovara d.d., Zagreb, 2008.

Čižmešija M, Kurnoga Živadinović N: Statistička analiza odabranih financijskih varijabli zaštite okoliša u Hrvatskoj, *Proceedings of the Faculty of Economics and Business in Zagreb*, Vol.7 No.1, 2009.

Dabić DČ: Utvrđivanje veze između strukture i retencije oksotiazolidina primenom multivarijantne analize, *Doktorska disertacija*, Hemijski fakultet, 38-44, Beograd, 2013.

Dadić Ž, Dimitrov N, Galić K, Katalenić M, Mijatović I, Papić J, Vahčić N: *Znanstveno mišljenje o utjecaju ambalaže na prirodne mineralne vode San Pellegrino*, Hrvatsla agencija za hranu, 2012.

Dašić P, Milenković D, Prijović A: Diagrami rasipanja i regresiona analiza zavisnosti karakteristika kvaliteta pri sintezi dugouljne alkidne smole Epoal 3065, *Festival kvalitete*, 32. *Nacionalna konferencija o kvaliteti*, Kragujevac, 2005.

Devčić K, Pražić IT, Župan Ž: Klaster analiza: primjena u marketinškim istraživanjima, *Zbornik radova Međimurskog veleučilišta u Čakovcu*, Vol.3. No.1, 2012.

Ditrych M, Kordialik-Bogacka E and Agata Czyzowska A: Antiradical and Reducing Potential of Commercial Beers, *Czech J. Food Sci*., 33(3):261-266, 2015.

Duraković H: Ambalažni materijali i zaštita okoline 3*., Naučno-stručni skup sa međunarodnim učešćem, Kvalitet 2003*., Zenica, B i H, 2003.

Duraković S, Duraković L: Mikologija u biotehnologiji, Zagreb, 64, 2003.

Dvorakova M, Douanier M, Jurkova M, Kellner V and Dostalek P: Comparison of Antioxidant Activity of Barley (Hordeum vulgare L.) and Malt Extracts with the Content of Free Phenolic Compounds Measured by High Performance Liquid Chromatography Coupled with CoulArray Detector, *J. Inst. Brew*. 114(2), 150-159, 2008.

EBC Ann., *Analytica-EBC* (*European Brewery Convention*), 5th ed. Section 9, Beer method, modificirano 9.30, 9.37, 11.5, 9.39, 9.24.2, 2010.

EBC Ann., *Analytica–EBC (European Brewery Convention*), Microbiology methods, 4.3.2.2, 4.2.4.2, 4.1.2 ,2.3.4.2 , 2011.

Eßlinger HM.: *Handbook of Brewing*, 27, 88,131-134,166, 202, 275-280, 2009.

Eβlinger HM, Brauhaus F, Narzis LF.: *Encyclopedia of industrial chemistry*, Beer, Germany, 192, 202, 208-213, 2012.

Edney MJ and Rossnagel BG.: *Producing a Quality Malt from Hulless Barley*, *North American Barley Researchers Workshop*, 2011.

Eterović D, Kardum G: Biostatistika, 5. Izdanje, Medicinski fakultet, Split, 5-7, 26, 2010.

Energoplast: *Tehnička specifikacija, Plastični zatvarač*, Novi Beograd, Srbija, 2008.

European aluminium association, 2005. http://recycling.world-aluminium.org/uploads/media/fl0000217.pdf [12.1.2017.]

European aluminium association, 2017. http://european-aluminium.eu/about-aluminium/aluminium-in-use/packaging/ [12.1.2017.]

Evans E, Vilpola A, Stewart DC, Stenholm K, Pöyri S, Washington JM, Barr AR and Home S: Pilot Scale Investigation of the Importance of the Barley Husk for Mash filtration, *MBAA Technical Quarterly* 36, 4, 375-382, 1999.

Farcas A, Tofana M, Socaci S, Scrob, S, Salanţa L, Borsa A: Preliminary Study on Antioxidant Activity and Polyphenols Content in Discharged Waste from Beer Production, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19(3), 319-324, 2013.

Flavoractiv:Lightstruckbeer flavor standard, 2016. http://www.flavoractiv.com/products/lightstruck-beer-flavour-standard [05.9.2016.]

Gaćeša S: Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 34-35, 1979.

Gagula G, Magdić D, Horvat D: PLSR modelling of quality changes of lager and malt beer during storage, *J Inst Brew* Vol.122(1), pp. 116-125, 2016. Volume 122, Issue 1, pages 116-125, 2016.

Galić K, Ciković N, Berković K: Analiza ambalažnog materijala, Priručnici Sveučilišta u Zagrebu, Hinus, Zagreb, 9, 11, 2000.

Gomez-Pinilla F and Nguyen TJ: Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders, *Nutritional Neuroscience*, 15: 127-133, 2012.

Goldammer T: *The Brewer's Handbook*, 2 Edition, Apex Publishers, chapter 4, chapter 5, USA, 2008.

Gorinstein S, Caspi A, Libman I, Leontowicz H, Leontowicz M,Tashima Z, Kantrich E, Jastrzebski Z and Trakh-Tenberg S: Bioactivity of beer and its influence on human metabolism, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(2): 94 Á107, 2007.

Grubešić N: Karakterizacija procesa uporabom metode regresijske analize i analize varijance, *Diplomski rad*, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 28-34, 2014.

Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallaghar E: Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By Products, *Comprehensive rewiews in food science and food safety*, Vol. 9, Institute of Food Technologists, 318-320, 2010.

Habschied K: Utjecaj plijesni iz roda *Fusarium* na mikotoksikološku kakvoću pšenice, pšeničnog slada i piva, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet sveučilišta u Zagrebu, 30, 2014.

Han X, Shen T and Lou H: Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci*., 8, 950-988, 2007.

He G, Du J, Zhang K, Weie G and Wang W: Antioxidant capability and potableness of fresh cloudy wheat beer stored at different temperatures, *J. Inst. Brew*., 118: 386-392, 2012.

Herceg T, Galetić F: Mikroekonomija, *Zbirka zadataka*, 2.izdanje, Ekonomski fakultet Zagreb, Eurocom, Zagreb, 47-51, 2016.

Heyerick A, Van Hoyweghen L, Biendl M: *Radical Scavenging Capacity of Hop-Derived Products in View of Health and Brewing Applications*. *Proc. of the 32nd EBC Congress,* Hamburg, 2009.

HGK (Hrvatska gospodarska komora), Sektor za poljoprivredu, prehrambenu industriju i šumarstvo, Grupacija proizvođača piva, slada i hmelja u Europskom udruženju pivara (BOE), *Izvješće*, Zagreb 2014.

Holcroft C: Protection from Lightstrike in Lightweight Glass Beer Bottles, *WRAP GlassRite Beer, Cider and Spirits project, Final Report*, 2008.

Huang Y, Tippmann J, and Becke T: Kinetic Modeling of Hop Acids during Wort Boiling, *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 3, No.1, 2013.

Ilić Đ, Mijailović S: Regresiona analiza parametara u procesu unapređenja odlučivanja, Visoka poslovna škola, Br. 4. *Sveska 2/2004*., Kruševac, 2014.

ILSI (International Life Sciences Institute), Report on Packaging Materials: *Polyethylene Terephthalate (PET) for Food Packaging Applications*, Brussels, Belgium, 5, 2000.

Ivušić F, Nemet Z, Berković K, Gracin L, Marić V: Effects of pasteurization on aluminium content and aroma compound changes in beer, *Monatsschrift fiir Brauwissenschaft*, 39-43, 2004.

Jankovich D: Ispitivanje komora za termičku obradu polutrajnih mesnih proizvoda, Fakultet strojarstva i brodogradnje, *Magistarski rad*, Zagreb,30-33, 2011.

Jelinek L, Karabin M, Kotlíkova B, Hudcova T and Dostalek P: Application of a hop by-product in brewing: reduction in the level of haze-active prolamines and improved antioxidant properties of the beer, *J. Inst. Brew*. 120: 99-104, 2014.

Jurečić D: Evolucija elemenata vizualne informacije na grafičkoj opremi ambalaže, *Magistarski rad*, Fakultet organizacije i informatike, Varaždin, 3, 2004.

Jurkova M, Horak T, Haskova D, Culík J, Cejka P and Kellner V: Control of antioxidant beer activity by the mashing process , *J. Inst. Brew*. 118: 230-235, 2012.

Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P: Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.15, 542-559, 2016.

Karlson P: Biokemija, Školska kniga Zagreb, 6,186, 1989.

Kaukovirta-Norja A, Wilhelmson A and Poutanen K: Germination: A Means to Improve the Functionality of Oat., *Agric. Food Sci*., 13:100-112, 2004.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, Arh Hig Rada Toksikol, 55: 279-290, 2004.

Keukeleire DD: Fundamentals of beer and hop chemistry, *QUÍMICA NOVA*, 23(1), 2000.

Kirin Beer University, *Report*, 2015. http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.htm [12.1.2017.]

Klose C, Mauch A, Wunderlich S, Thiele F, Zarnkow M, Jacob F, and Arendt EK: Brewing with 100% Oat Malt, *J. Inst. Brew*. 117(3), 411-421, 2011.

Klose C, Beatus D. Schehl BD, Arendt EK: Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats, *Journal of Cereal Science*,Volume 49, Issue 1, pp 83-91, 2009.

Klašnja M: Voda u pivarstvu, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd, 1998.

Kolpin KM*: Human Bitterness Detection Thresholds of Hop Acids in Beer and Honey*, Oregon State University, USA, 10, 2009.

Košmelj K: Uporabna statistika, 2 dopoljena izd. Biotehnološki fakultet Ljubljana, 45, 53-56, 64-69, 2007.

Kovačić B: Poslovna statistika, TVZ, Elektrotehnički odjel, *interna skripta*, Zagreb, 9, 112-117, 126, 2011.

Krstanović V: Utjecaj zamjene dijela slada kukuruznom krupicom i pšenicom na pokazatelje kvalitete i koloidnu stabilnost piva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet sveučilišta u Zagrebu, *Magistarski rad*, 7-8, 23-24, 40,66, 2000.

Kujundžić-Tiljak M i Ivanković, D: Multivarijatne metode, 2009. studentski.hr/system/materials/w/6a80319e2fde31c461b37add0f0369cecfad4e1f.zip [15.10.2016.]

Kunze W: Tehnologija sladarstva i pivarstva, Prevod: Technologie Brauer und Mälze, 7.auflage, Gaćeša S, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd, 5, 24-25, 58,170, 173, 467, 474-477, 510, 565, 1998.

Kunz T, Frenzel J, Wietstock PC and Methner FJ: Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes, *J. Inst. Brew*. 120: 415-425, 2014.

Kurnoga Živadinović N: Multivariate classification of Croatian counties, *Proceedings of the Faculty of Economics and Business in Zagreb*, Vol. 5. No.1, 2007.

Lazić V, Gvozdenović J, Curaković M: Aseptičko pakovanje voćnih sokova*, Savjetovanje proizvođača alkoholnih, bezalkoholnih pića i octa, Zbornik radova*, Šibenik, 86-87,1988.

Lea AGH and Piggott JR: Fermented Beverage Production, 2 ed., University of Strachlyde, Glasgow, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NewYork, 31, 2003.

Lechat C,Bunsell AR,Davies P and Piant A: Mechanical behaviour of polyethylene terephthalate & polyethylene naphthalate fibres under cyclic loading, *Journal of Materials Science*, 41(6) : 1745-1756, 2006.

Leskošek-Čukalović I: Fiziološki status piva u svakodnevnoj ishrani, *APTEFF*, 31, pp 39-52, 2000.

Leskošek-Čukalović I: Slad i nesladovane sirovine, Poljoprivredni fakultet, Beograd,31-32, 45-47, 245, 2002.

Lewis J, and Young TW: Brewing, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2. ed., 4, New York, 2002.

Livens S: Brewing, *International Food Hygiene*, Vol. 19. Nu. 5, 15-16. 2008.

Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC and Brooks M: The yeast Saccharomyces cerevisiae the main character in beer brewing, The South African Breweries Ltd (SAB), *Journal compilation,Federation of European Microbiological Societies*, Published by Blackwell Publishing Ltd., 1018-1020, 2008.

Lulić I: Uporaba metoda regresijske analize u rješavanju problema vezanih za inženjersku praksu, *Završni rad*, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 32, 2014

Magalhaes PJ, Vieira JS, Goncalves LM, Pacheco JG, Guido LF, Barros AA: Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1217, 3258-3268, 2010.

Magdić D: *Uvod u matematičko modeliranje*, Katedra za modeliranja, optimiranje i automatizaciju, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2011. http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko modeliranje.pdf [15.3.2017.]

Malowicki MG, Shellhammer TH: Isomerization and degradation kinetics of hop (Humulus lupulus) acids in a model wort-boiling system. *J. Agr. Food Chem.* 53(11):4434-9. 2005.

Manual, Beer Analyzer, DMA 5000 + SH1, Anton Paar GmbH, Austria, 2004.

Manula, CO_2/O_2 meter, Norit Haffmans c-DGM-om, Haffmans B.V.co., Netherlands, 2008.

Marić V: Tehnologija piva , Karlovac,18, 24, 37, 43-46, 51, 71-77, 69-98, 122, 125-126, 236, 152-174, 190, 200-206, 2009.

Marić V: Biotehnologija i sirovine, Stručna i poslovna knjiga, 181, Zagreb 2000.

Marić V i Nadvornik Z: Pivo-tekuća hrana, Prehrambeno-tehnološki inženjering Zagreb, 9, 17, 37-38,1995.

Marković D, Čebela Ž, Simonović V,Marković I: Ispitivanje ujednačenosti isejavanja semena metodom odzivnih površina, *Polj. Tehn*., (2012/2), 91-100, 2012.

Maye, JP, Nielson, P: The use of hop acids as an antimicorbial agent to sanitise food processing facilities, World Intellectual Property Organization, *International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT)*, 2005.

MEBAK, *Brautechnische Analysenmethoden*, Bd.II, 3. (1993), Srednjouropska komisija za analize u pivovarstu, Metodi analize 2: Kontrola varionice, sladovine i piva, prevod Gaćeša S, N. Sad, 81-83, 90-92, 114-115, 121,126, 1999.

MEBAK, *Brautechnische Analysenmethoden*, Bd.III, 2. (1996), Srednjouropska komisija za analize u pivovarstu, Metodi analize 3, prevod Gaćeša S.,.N. Sad, 1, 2000.

Miedl M, Rogers P, Day GL, Clarke FM and Stewart GG: The Peroxide Challenge Test: A Novel Method for Holistic Near-Real Time Measurement of Beer Flavour Stabilit, *J. Inst. Brew*. 117(2), 166-175, 2011.

Mikyška A, Krofta K, Haškova D, Čulik J and Čejk P: The Influence of Hopping on Formation of Carbonyl Compounds During Storage of Beer, *J. Inst. Brew*., 117(1), 47-54, 2011.

Mirilović M, Pejin I: Primjena deskriptivnih statističkih metoda u analizi eksperimentalnih podataka, *Vet. glasnik* 62(1-2), 85-95, 2008.

Munoz-Insa A, Gastl M, Zarnkow M and Becker T: Optimization of the malting process of oat (*Avena sativa L*.) as a raw material for fermented beverage, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2), 510-523, 2011.

Mutavdžić DR: Primena multivarijacione analize u spektroskopskim podacima, Univerzitet u Beogradu, Odsek za žive sisteme Instituta za multidisciplinarna istraživanja, *Doktorska disertacija*, Beograd, 4, 2016.

Nemet Z: Tržišni, tehnološki, ekonomski i marketimški aspekti plasmana piva u staklenoj i aluminijskoj ambalaži, *Svijet piva*, Zagreb, 36-41, 1991.

Nedović V, Gibson B, Mantzouridou TF, Bugarski B, Đordjević V, Kalušević A, Paraskevopoulou A, Sandell M, Šmogrovičova D and Yilmaztekin M: Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes, *Yeast*, 32:173-216, 2015.

NN (Narodne novine), br. 88/15, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode RH, *Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži*, Opće odredbe, čl. 4, Zagreb, 2015.

NN (Narodne novine), br. 142/2011 Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, *Pravilnik o pivu*, Opće odredbe, čl. 3, Zagreb 2011.

Ondrejovič M, Chmelova D, Ivanišova E, Drab S, Psota V: Evolution of antioxidant activites of cereals and their malts, *Nova Biotechnologica et Chimica* 132, 172-181, 2014.

Opstaele FV, De Rouck G, De Clippeleer J, Aerts G and Luc De Cooman L: Analytical and Sensory Assessment of Hoppy Aroma and Bitterness of Conventionally Hopped and Advanced Hopped Pilsner Beers, *J. Inst. Brew*. 116(4), 445-458, 2010.

O'Rourke T: Hops and hop products, *Brewer International*, Vol.3, Issue 1, 2003,

Palmer J, and Kaminski C: Water: A Comprehensive Guide for Brewers, *A division of the Brewers Associatio*, Colorada, USA, 2013.

Papić-Blagojević N, Bugar D: Osnove premise analize grupisanja, *Škola biznisa*, Naučnostručni časopis, Br. 4, 166-173, 2009.

Pecina M: *Metode multivarijatne analize*, Agronomski fakultet, Zagreb, 3-12, 2006.

Pejin JD: Ispitivanje sadržaja i antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina u toku proizvodnje slada i piva, *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 51-57, 2009.

Peklar Lj: Beer in PET packaging,*Qurak magazine*,140-145, Ljubljana, Slovenia, 2006./2007.

Peklar Lj: Pivo v PET ambalaži, *Magistrsko delo*, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 21, 24, 34, 45, Maribor, 2010.

Petersen H: Pivara i njena oprema, Prevod: Brauereianlagen, 2. auflage, Gaćeša S, Jugoslovensko udruženje pivovara, Beograd, 122-123,195-196, 268, 400-402, 513-514, 1996.

PET planet insider, *Magazine for bottlers and bottle-makers*, Vol.9 No. 08/08, 35, 2008.

Petronijević RB, Matekalo-Sverak VF, Spirić AT, Vuković IK, Babić JA, Milijašević MP, Trbović DK: Hemometrijski pristup razvoju kolorimetrijske metode za procenu količine prehrambenih boja u proizvodima od mesa, *Hem. Ind*., 68 (6), 781-791, 2014.

Pivac S, Rozga A: *Statistika za sociološka istraživanja*, Filozofski fakultet, Split, 9, 21, 103–121, 2006.

Plutal 2000 d.o.o., Industrija zapiralne embalaže: *Declaration of compliance*, Ljubljana, 2010.

Poreda A, Czarnik A, Zdaniewicz M, Jakubowski M, Antkwicz P: Corn grist adjunct, *J. Inst. Brew*.,120:77-81, 2014.

Priest FG and Stewart GG: *Handbook of Brewing*, 2 ed., Taylor & Francis Group, LLC, NW, USA, 2006.

Puška A, Beganović A: Primjena klaster analize u ekonomskim istraživanjima, *Oeconomica Jadertina*, Vol.6, No.1, 2016.

Rastija V i Medić-Šarić M: Kromatografske analize polifenola, *Kem. Ind*. 58 (3) 121-128 2009.

Rešček A: Aktivna višeseslojna polimerna ambalaža za pakiranje hrane*, Međunarodno savjetovanje, Polimerni materijali i ambalaža*, Zagreb, 2014. http://www.ambalaza.hr/UserFiles/file/ambalaza/Konferencije/polimeri/prez/05_Ana%20Rescek-26%20 [15.9.2016.]

Roberts TR and Wilson RJH : *Handbook of Brewing*, Hops,Taylor & Francis Group, LLC, 191-194, 242-244, 2006.

Rožić Lj S, Petrović SP, Vuković ZM, Novaković TB, Stanisavljev DR: Optimalno faktorno planiranje procesa kiselinske aktivacije bentonita u mikrotalasnom polju, *Hem. ind*., 65 (5), 489-495, 2011

Rujnić-Sokele M: Utjecaj parametara razvlačnog puhanja na svojstva PET boca, *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, 28:225-233 Zagreb, 2007.

Rujnić-Sokele M: Izradba ambalaže od poli (etilen-tereftalata) te njezina uporaba i primjena u prehrambenoj industriji, *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, 24:87-94, Zagreb, 2003.

Schnitzenbaumer B, Arendt EK: Brewing with up 40% unmalted oats, J. Inst. Brew., 120: 315-330, *J. Inst. Brew*. 2014.

Schuster K, Weinfurtner F, Narziss L: Tehnologija proizvodnje slada, Prevod: Die Technologie der Malzbereitung, Gaćeša S i Grujić O, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd, 17-18, 28, 33-36, 56-58, 1990.

Schuster K, Weinfurtner F, Narziss L: Tehnologija proizvodnje sladovine, Prevod: Die Technologie der Würzebereitung, Gaćeša S i Grujić O, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 15, 25-33, 35-75, 88, 102-104, 156, 160, 354-357, 378, 1988.

Siqueira PB, Bolini HMA , Macedo GA: Polyphenols and antioxidant properties in forced and naturally aged Brazilian beer, *Journal of brewing and distilling*,Vol. 2(3), pp. 45-50, 2011.

Srečec S: Gorki sastojci hmelja tijekom vegetacije, prerade u pelete, skladištenja i proizvodnje piva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, *Doktorska disertacija*, 12,16, 2006.

Srečec S, Zechner-Krpan V, Petravić-Tominac V, Srečec V, Marić K: Nužnost restrukturiranja proizvodnje hmelja, korištenjem njegovih dovoljno ljekovitih iosobina hmelja u suvremenom pivarstvu i farmakologiji, *Hmeljarski bilten* 16:53-64, 2009.

Statista, The Statistics Portal, Beer production worldwide from 1998. to 2015. http://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production [05.9.2016.]

Steiner E, Becker T and Gast M: Turbidity and Haze Formation in Beer*, J. Inst. Brew*. 116(4), 360-368, 2010.

Stewar GG: The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research, *J. Inst. Brew*. 115(1), 3-29, 2009.

Stewart GG and Russell I: Bewing science& technology, Brewer's yeast, *The imsitute of brewing and distilling*, England, 3-6, 2009.

Stipanelov-Vrandečić N: *Ambalaža*, Kemijsko-tehnološki fakultet,Split, 2, 2013.

Storgard E: Process hygiene control in beer production and dispensing, *Academic dissertation*, Tehnical reasrch centre of Finland, VTT Publication, Finland, 18, 2000.

Swanston JS, Middlefell-Williams JE, Forster BP and Thomas WTB: Effects of Grain and Malt ß-Glucan on Distilling Quality in a Population of Hull-less Barley, *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 117, Issue 3, 389-393, 2011.

Šakić N, Blesić M: *Osnovi tehnologije slada i piva*, Univezitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fkultet, 57, 80, 2011.

Šerbetar I: Partial Least Squares Regression Analysis: Example of Motor Fitness Data, *Croatian Journal of Education*, Vol. 14. 917-932, 2012.

Šmogrovičova D: The influence of PET bottle composition and storage conditions on beer ageing*, EBC brewing science group meeting*, Copenhagen, 2012.

Šošić I: Primijenjena statistika, Školska knjiga, 2. izdanje, Zagreb, 381-385, 474-475, 2006.

Šporar E: Razvoj modela za določanje velikosti delcev hidroksipropilmetilceluloze s spektroskopijo bližnjeg infrardečega območja, Fakulteta za farmacijo, *Magistrska naloga*, Ljubljana, 33, 2011.

Štajner D i Kervešan S: *Kemija*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 161, 2014.

Šteafanić K, Marić V: *Pivarski priručnik*, Jugoslovensko udruženje pivovara, Beograd, 127,139, 209, 1990.

Tazzini N: Polyphenols: definition, structure and classification, 2014. http://www.tuscany-diet.net/2014/01/12/polyphenols-definition-structure-classification/ [05.7.2016.]

Taylor JRN, Dlamini BC, and Kruger J: The science of the tropical cereals sorghum, maize and rice in realtion to lager beer brewing, *J. Inst. Brew.*,119:1-14, 2013.

Technical training series for front line managers; Bottle filler/filling, Krones, *Interna literatura Zagrebačke pivovare d.o.o.*, 2005.

The Aluminium Association, 2017. http://www.aluminum.org/advocacy/top-issues/aluminum-recycling [12.1.2017.]

Trifković JĐ: Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, *Doktorska disertacija*, Hemijski Fakultet, Beograd, 18, 31-33 , 2013.

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M: Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?, *Biochemia medica*, Vol.17, No.1 Lipanj 2007.

Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G: The chemistry of beer aging – a critical review, *Food Chemistry* 95, 357-381, 2006.

Vidgren V and Londesborough J: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewin, *J. Inst. Brew*. 117(4), 475-487, 2011.

Vetropack straža d.d.: *Standardni uvjeti kvalitete*, Hum na Sutli, 2011.

Vujković I, Galić K, Vereš M: Ambalaža za pakiranje namirnica, Tectus, Zagreb, 61-67, 74, 90-91, 97, 123, 143, 171, 209, 2007.

Walle MV: *Beer statistics*, The Brewers of Europe, edition 2014. http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2014/statistics_2014_web_2.pdf [20.1.2017.]

Walle MV: *Beer statistics*, The Brewers of Europe, edition 2015. http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2015/statistics_2015_v3.pdf [20.1.2017.]

Walle MV: *Beer statistics*, The Brewers of Europe, edition 2016.http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2016/stats_2016_web.pdf [20.1.2017.]

Wietstock P, Kunz T, ShellhammerT, SchönT and Methner FR: Behaviour of Antioxidants Derived from Hops During Wort Boilin, *J. Inst. Brew*., 116(2), 157-166, 2010.

Wolfe E, Bickham S, Houseman D, Wotring G, Sapsis D, Garofalo P, Hanning C: *BJCP Beer exsam study guide* , Revised by Steve Piatz, Saint Louis Park , USA, 37-39, 2015.

Qufer-Rada P, Vallverdu-Queralt A, Martinez-Huelamo M, Chiva-Blanchb G, Jauregui O, Estruch R, Lamuela-Raventosa R: A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS), *Food Chemistry*, Vol. 169, 336-343, 2015.

web1: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=Beer+keg&title=Special:Search&go=Go&uselang=en&searchToken=7myvn4sr4693zimwu83nc7ay3 [02.9.2016.]

8. PRILOZI

Prilog 1 Neke od tehničkih specifikacija staklenih boca (Vetropack, 2011.)

STANDARDI KVALITETE

1. OPĆI UVJETI

1.1. SIROVINE ZA PROIZVODNJU

- kvarcni pijesak
- soda
- krš
- dolomit
- kalcit
- ostale male komponente

1.2. SVOJSTVA BOJE STAKLA

Definicija: Boju stakla možemo između ostalog pojednostavljeno definirati kao vizualnu percepciju nastalu uslijed prolaza svjetlosti ili refleksije svijetla na neki stakleni objekt. Ovisna je o sposobnostima oka te o svojstvima svijetla i stakla. Metoda mjerenja: Mjerenje se radi pomoću fotospektrometra kroz koji se mjeri propusnost uzorka u čitavom vidljivom spektru valnih duljina. Iz izmjerene propusnosti se tada izračunavaju jasne obojene koordinate uzorka u LAB sustavu boja (za bijelo staklo) ili u CIE sustavu boja za obojeno staklo.

Boja	Norma	Debljina stijenke [mm]	Dominantna valna duljina λ [nm]	Zasićenje [%]	Svjetlost [%]	Napomene
Smeđa BR	Standardna boja	2	> 576	70 – 85	27 – 50	Isp. specifikaciju za DBB
Zelena GR		2	551 – 557	13 – 23	60 – 75	
Olive OL	specijalnaGBW	2	569,5 – 572,5	50 – 60	45 – 55	
Olive OL	specijalna	2	568 – 571	40 – 51	54 – 60	
Cuvee CU	specijalna	2	573 – 576	82 – 90	24 – 30	
Feu. morte FM	specijalna	2	571 – 573	27 – 43	56 – 71	
Plava FA	specijalna	2	472,5 – 479,5	33 – 43	31 – 45	

1.3. PRIHVATLJIVOST ZA ZDRAVLJE:

Sirovine, dodatne tvari i dodatni materijali prihvatljivi su za proizvodnju staklene ambalaže.

1.3.1.Certifikat Prihvatljivost za zdravlje dokazana je certifikatima i stalno se provjerava. Certifikat izdaje Državni zavod za javno zdravstvo RH.

1.3.2. Dozvoljeni broj mjehurića u staklu

VELIĆINA MJEHURIĆA (mm)	MAX. BROJ MJEHURIĆA NA 100 g STAKLA	
	Bijelo,smeđe, zeleno	Olive,cuvee,feuile morte,specijalne boje...
	Kom	Kom
0,1 - 0,5	200	300
0,5 - 1,5	max 10	max 15
1,5 - 3,5	3	3
> 3,5	1	1

2. NAČELA ZA OBRADU AMBALAŽE – PREPORUKE

Za vrijeme konstruiranja ambalaže uzima se u obzir način korištenja i obrade na linijama punjenja. Iako razvoj proizvodne tehnologije staklene ambalaže povećava njezinu mehaničku čvrstoću i otpornost na toplinski udar, prilikom upotrebe treba obratiti pažnju na specifičnost staklene ambalaže:

2.1. Načela pravilne upotrebe spremnika

Pranje:

- Općenita granica maksimalne razlike u temperaturi iznosi 30°C. Za ocjenjivanje temperature kupke kod pojedinačnih sekcija perilice važe vrijednosti navedene u tablici i to za spremnike do veličine 4 L i za spremnike osnovnih oblika, tj. za cilindrične staklenke i lagano oblikovane staklenke s okruglim presjekom koji samo malo odstupa od cilindričnog oblika. Za staklenke s uglatim i ovalnim presjekom vrijednosti se moraju ovisno o zahtjevnosti oblika smanjiti za 5 do 10°C, kod velikih staklenki od preko 4 L za 5 do 10°C ovisno o veličini.
- Općenito vrijedi da temperatura boce koja ulazi u perilicu mora biti viša od 0°C i da u bocama ne smije biti leda

Punjenje :

- Za temperaturne odnose kod punjenja staklenki vrijedi točka 1.
- Nadtlak kod punjenja može biti do 0,6 -erostruko tlaka ispitivanja.

Zatvaranje:

- Za zatvaranje treba koristiti zatvarače koji odgovaraju mjerama i tipu te koji su kvalitete koja odgovara odgovarajućoj normi. Zatvaračica mora biti podešena na način da staklenka s uskim grlom i okruglim presjekom u smjeru osi bude opterećena s maksimalnom snagom pritiska od 3500 N, a staklenka sa širokim grlom s 2500 N. Kod staklenki s ovalnim i uglatim presjekom je ovisno o obliku dopušteno opterećenje smanjeno za 10 do 30%.
- Postrojenja za transport moraju biti ispravno podešena, tako da udarci i padovi ne bi uzrokovali oštećenja i uništavanje spremnika

Manipulacija gotovim proizvodom:

- Za vrijeme rukovanja s punim staklenkama u jedinicama za rukovanje, transportnim pakiranjima, transportnim spremnicima i ambalaži treba manipulirati čim pažljivije, tako da ne bi dolazilo do neželjenih udaraca i padova.

Naše preporuke:

Kod povećavanja brzina na linijama punjenja treba već za vrijeme priprema projekta respektirati točku 8. (mogućnost reguliranja brzine traka, njihovog pokretanja i zaustavljanja). Skladištenje paleta s gotovim proizvodima u skladištu treba biti izvedeno na način da ne dolazi do neravnomjerne raspodjele težine.

3.VOLUMEN

3.1. Definicija: Razlika u težini između praznog spremnika (Po) i spremnika napunjenog s vodom (Pp) kod specifične težine vode (K) pri temperaturi vode između 15 i 25 °C. Kod rezultata treba napraviti korekciju za stvarnu temperaturu vode. Obično se radi na 20 °C.

3.2. Tolerancija:

Prema tablici (DIN 6129-1, pravilnik o mjeriteljskim zahtjevima za pakovine)

4. FIZIKALNA SVOJSTVA (OTPORNOST)

4.1. Otpornost na unutarnji tlak:

Definicija: Minimalna vrijednost unutarnjeg tlaka koji stakleni spremnik mora izdržati unutar 1 minute.

Metoda mjerenja (DIN 52 320 ili HRN EN ISO 7458): Ispitivanje se vrši na uređaju RAMP PRESSURE TESTER firme AGR (RPT i RPT2); unutar proizvoda se tlak povećava do: a) postizanja propisanog minimalnog tlaka ispitivanja – ispitivanje otpornosti b) loma proizvoda

ili postizanja maksimalnog podešenog tlaka (42 bar/min.) – ispitivanje do loma s ravnomjerno propisanom brzinom (1 +/- 0,2 Mpa/s-1:1 Mpa=10 bara)

udio CO_2 v g/L		Ispitni tlak u bar/min.	
>	≤	Nepovratna	Povratna boca
2	4	8	10
4	6	10	12
6	7	12	14
7	9	14	16
9	10	16	17
10	12	18	

4.2. Otpornost na okomito opterećenje HRN EN ISO 8113

Metoda ispitivanja (DIN 52 313, DIN 52 321 ili HRN EN ISO 7459)

Tip ambalaže	ispitno opterećenje u *kN*
staklenke	4
nepovratne boce.	6
povratne boce	7

4.3. Izdržljivost na toplinski udar (termošok) HRN EN ISO 7459

Metoda ispitivanja (DIN 52 313, DIN 52 321 ili HRN EN ISO 7459):

Ciljna vrijednost: min. 42 °C (63 °C vruće – 21 °C hladno) ne uzrokuje lom ili funkcionalnu grešku

4.4. Otpornost na udarce

Definicija: Minimalna vrijednost energije pokreta koju stakleni spremnik mora izdržati bez loma.

Metoda ispitivanja (DIN 52 295):

Ciljna vrijednost: prema tablici:

tip spremnika	jačina udarca	
	IPS	N s
staklenke	25	0,315
nepovratne boce	25	0,315
povratne boce	40	0,504

4.5. Raspodjela staklene mase – debljina stijenke

Definicija: minimalna vrijednost debljine stakla na tijelu i na dnu spremnika.

Metoda ispitivanja: Debljina stijenke mjeri se ili uz pomoć specijalnih uređaja (kapacitivni, princip ultrazvuka) ili pomoću mehaničkih sredstava s točnošću od min. 0,1 mm.

Minimalne debljine stijenki definiraju se u skladu s trendom smanjivanja težine spremnika za pojedini proces posebno. Proizvođač je obavezan pridržavati se minimalnoj debljini stijenke s obzirom na težinu i namjenu spremnika. Odnos debljine stijenki u istoj horizontalnoj ravnini < 1 : 2,5 BB proces, 1:2 NNPB i PB process. Podaci za minimalne debljine stijenki prilog su: Specifikaciji artikla.

4.6. POVRŠINSKO OPLEMENJIVANJE

Svrha: Kod oplemenjivanja površine staklenog spremnika (zaštita) razlikujemo, vruće oplemenjivanje nanošenjem metalnog sloja i hladno oplemenjivanje (prskanje). Svrha im je bolja otpornost na trenje površine, bolje međusobno klizanje i veća mehanička otpornost.

Za vruće oplemenjivanje mogu se koristiti sljedeći proizvodi: kositreni dioksid –trgovačka marka TC100 ili drugi ekvivalentni proizvod, titan dioksid.

Za hladno oplemenjivanje mogu se koristiti sljedeći proizvodi: RP 40, R 200, SC100, T 5 ili drugi ekvivalentni proizvod.

Prilog 2 Neke od tehničkih specifikacija krunskih zatvarača (Plutal 2000, 2010.)

DECLARATION OF COMPLIANCE

We hereby declare that the following packaging malcrial(s) is (are) manufactured in accordance with the European Regulation as specified below;

Products; Crown corks with PVC-free liners.

Identity of materials: Chromium/Chromium oxide - Tin-free (according to DIN EN 10202) or Tin (according to DIN EN 10203) coated black steel plates (metal closure body) Interior and exterior varnishes, printing inks where products are printed Liner in direct food contact: Granulen PVC-free compound

Specific statement: The above listed packaging material!s) meet all relevant requirements of the EU Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 Octoher 20Q4 as specified below. Products are manufactured in compliance with general and detailed rules on good manufacturing practice (GMP) according to the EU Commission Regulation (EC) No 2023/2006. Of 22 December 2006 on good manufacturing practice for materials and articles intended to come into contact with food. Printing inks applied to the non-food-contact side of materials and articles are applied in a manner that substances from the printed surface are not transferred to the food-contact side through the substrate or by set-off in the stack or reel in concentration that lead to levels of the substance in the food which are not in line with the requirements of Article 3 of Regulation (EC) No 1935/2004. Printed materials and articles are handled and stored in their finished and semi-finished slates in a manner that substances from the printed surface are not transferred to the Ibod-contact side through the substrate or by set-off in the stack or reel in concentration that lead to levels of the substance in the food which arc not in line with the requirements of Article 3 of Regulation (EC) No 1935/2004. The printed surfaces should not come into direct contact with food.

Specific migration limits: Results of migration tests (deionised water, 3% acetic acid. 15% ethanol, 95% ethanol and olive oil) referring to directives 82/711/EEC, 85/572/EEC and 97/48/EEC show that above mentioned liners complies with overall migration limits.

Other migrations: The lead, cadmium, chromium (CrM) and mercury concentration is less than 100 ppm (Directive 94/62/EEC and its amendment 2004/12/EC). The used raw materials are not of animal origin and can therefore be considered as risk-free concerning the topic of BSE/TSE. Types of food with w hich liners intended to be put in contact: Non-carbonated and carbonated softdrinks and alcoholic beverages up to 20 vol,% of alcohol content, most mineral waters, pharmaceutical and other chemical products - additional test

must be carried out before first use. It is not suitable for fatty and oily foods. Expected pressure retention on regularly closed closures before pasteurisation is over 8 bars, after pasteurisation over 5 bars. Before using, the finished products should be tested by the bottler with a separate analysis according to the country legislation in which is expected to be used. Additional tests must be performed to be able to exclude deterioration of the sensory (smell and taste) characteristics oflhe actual foodstuffs.

Depending on bottle finish it may be necessary to adjust the closing conditions and parameters. Time and temperature of treatment and storage in contact with food: Products are basically intended to use for cold filling 15 – 40°C, they could stand short term pasteurisation for 20 minutes at 70 °C. They are not usable for hot filling and pasteurisation above 75 °C. Storage time and time of use is not limited, hut it recommended not to be longer than two years at temperatures +5 – +35 °C. Ratio of food contact surface area to volume used to establish the complianee of the material or article**:**

Food contact surface area regarding to product diameter is shown below:

Closure diameter (mm)	Linear diameter (mm)	Maximal contact surface (cm)
	24.8	4.83

The same closure diameter is possible to use for containers with different volumes which are not alwrays defined. Therefore the end user - bottler must act according to point 2 of annex I of directive 2007/19/EC and test closures before first use on containers for which they are intended under conditions corresponding to the nonnal or foreseeable use.

Bases for this declaration

This declaration is based on information provided by supplier - manufacturer of used material and analytical reports performed by independent institutes for end products - closures. With the release of new version of this declaration the previous version lose its validity.

Prilog 3 Neke od tehničkih specifikacija PET predoblika (Resilux, 2014.)

PREFORM SPECIFICATION - SHEET

Preform : 39,5 gr Softdrink

preform weight	39.5 gr ± 0.5 gram
preform length	136.0 mm (+0.5 -1 mm)
diameter under the neckr.	25.5 mm
diameter of the neckring	33 mm + 0.2 mm
inside diameter	21.74 mm ± 0.12 mm
T-diameter	27.43 mm ± 0.1 mm
perpendicularity	by rotating a standard preform there is a tolerance of of 2 mm on 360°.
ovality	measurement with a standard caliber.
wall-thickness difference	< 0.2 mm
acetaldehyde	preforms will not contain more than 3 ppm average of acetaldehyde, individual not more than 4 ppm.
Viscosity	0.80 + 0.02 dl/g
visual check	There are3 kinds of failures during the production of preforms
critical defects	membranes > 0.3 mm dimensions out of specification hole in the bottom gates > 4 mm 0 crystallization zone round the gate >10 mm crystallization in the body gate in the body wall-thickness variation too high deformed preforms damages to the thread pollution >

	0.6 mm oval preforms starting preforms unmelte d parts grease or oil on the preforms preforms stuck to each other
main defects	air bubbles pollution < 0.6 mm clearly visible scratches in bottle differences in colouring damage in preform body gatelines and spiderwebs, visible in the bottle condensation spots and water rings
minor defects	pollution, small black spots support ring not full threads, melted into preform scratches, barely visible in the bottle gatelines and spiderwebs, not visible in the bottle

CERTIFICATE OF CONFORMITY

We hereby certify that the preforms have been produced in accordance with the supplier's specifications and quality control requirements; conform with CEE and FDA regulations. The raw material does not contain any heavy metals (mercure, cadmium, plomb, chrome).

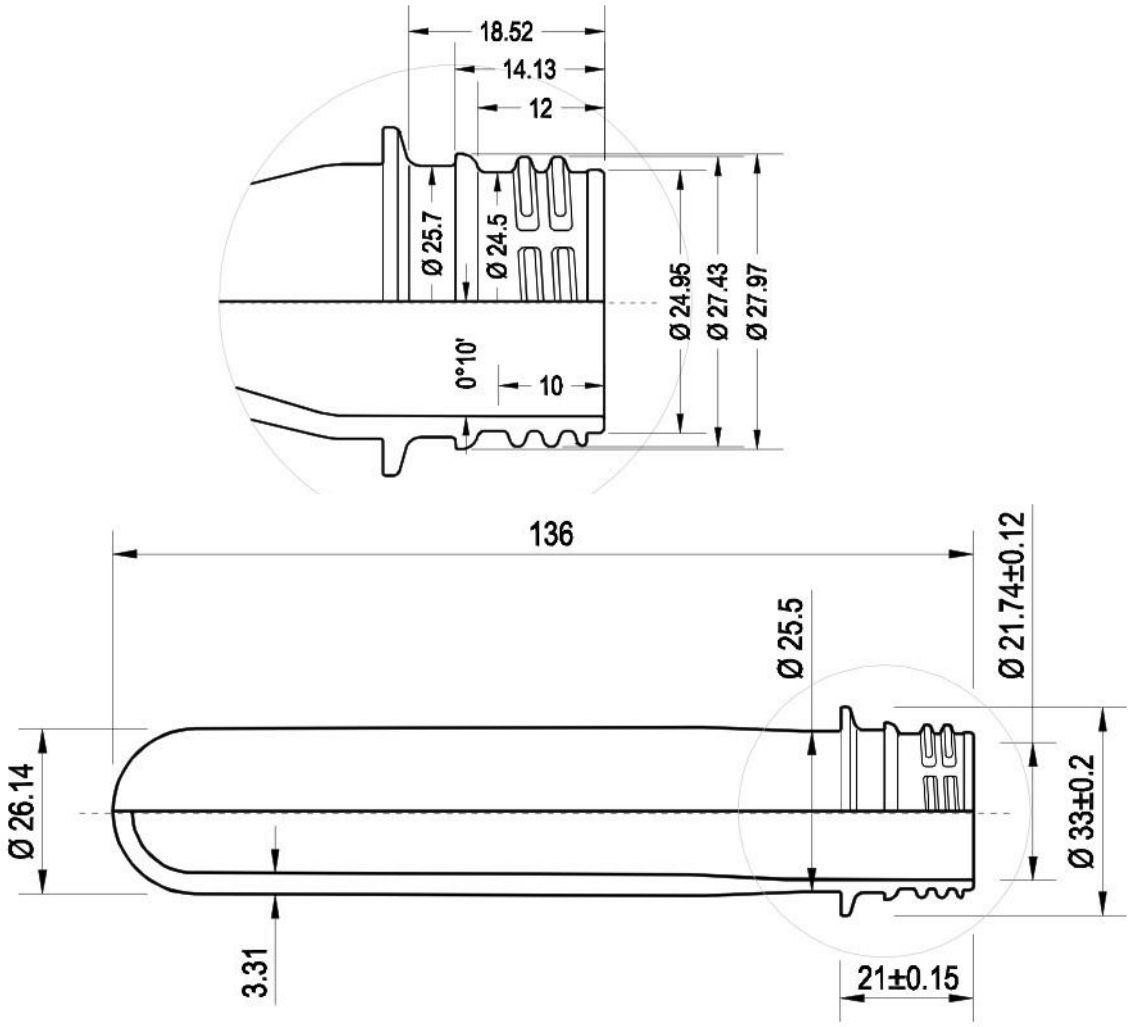
The following tests have been carried out:

1. Acetaldehyd-content	Result: ... <3 ppm ...
2.I.V	Result: ... 0.80 dl/g ±0.02 ...
3. Melt density	Result: ... 1.3 ...
4. Measurement of the dimensions	Result: ... ok...

5. Visual control	Result: ... ok ...
6. Color	Result: ... EE7 Amber
7. Raw Material	Result;... 15.HQ Wankai

All results conform to specifications, any exceptions or remarks are detailed below or attached.

All the monomers and additives used in Resilux preforms are included on the respective “positive list“ in the EU Plastics Directive.
(Commission Directive EU 10/2011)
We therefore confirm that the preforms are suitable for packaging of beverages.



Product Range	Carbonated
Weight	39,5 ± 0,5 gr
Neck-Finish	Standard PCO

Prilog 4 Neke od tehničkih specifikacija plastičnih navojnih zatvarača za PET boce (Energoplast, 2008.)

TEHNIČKA SPECIFIKACIJA

Plastični zatvarači PCC HINGE-LOK III 28mm

Definicija proizvoda: Dvodijelni navojni zatvarač od polipropilena (kopolimera) s EBA podloškom za zatvaranje PET boca s 28 mm navojem.

Tip navoja grla boce: PCO, BPF, PCO/BPF

Zaštitni prsten: Nakon otvaranja ostaje na boci

Broj zareza na bočnoj spoljašnjojj površini zatvarača: 120

Tehnologija proizvodnje: Kompresivno lijevanje

Mogućnost štampe: 1 ili 2 boje

Spoljašnji izgled zatvarača (obojenost)	%	±10%	Vizualni po uzorku
Masa zatvarača (osnovna + podloška)	g	2,95 (2,7+0,25) ± 0,3 (bez podloške 2,70 ± 0,3) (podloška 0,24± 0,04)	Tehnička vaga
Dimenzije zatvarača	mm	Spoljašnji promjer: 30,70 Unutarnji promjer: 25,90 Visina: 20,20	Manualni instrument za Određivanje dimenzija i razni κalibrirani komparatori
Izdržljivost na tlak	bar	Min. 10	Priručni instrument s κontroliranom aplikacijom tlaka
Torzioni moment pri aplikaciji	inch - lb Nm	12 – 16 1,356 – 1,808	Instrument za mjerenje torzionog momenta
Torzioni moment pri odvijanju	inch – lb Nm	< 17 < 1,921	Instrument za mjerenje torzionog momenta
Granični torzioni moment pri kidanju prstena	inch – lb Nm	<11 <1,243	Instrument za mjerenje torzionog momenta

Uvjeti i rok skladištenja:

- Zatvarači se skladište na suhom mjestu, dalje od direktnog utjecaja topline, vlage, sunčeve svjetlosti i jakih mirisa, na temperaturi od 0 ºC do 40 ºC. Rok za aplikaciju – 1 godina od dana proizvodnje.

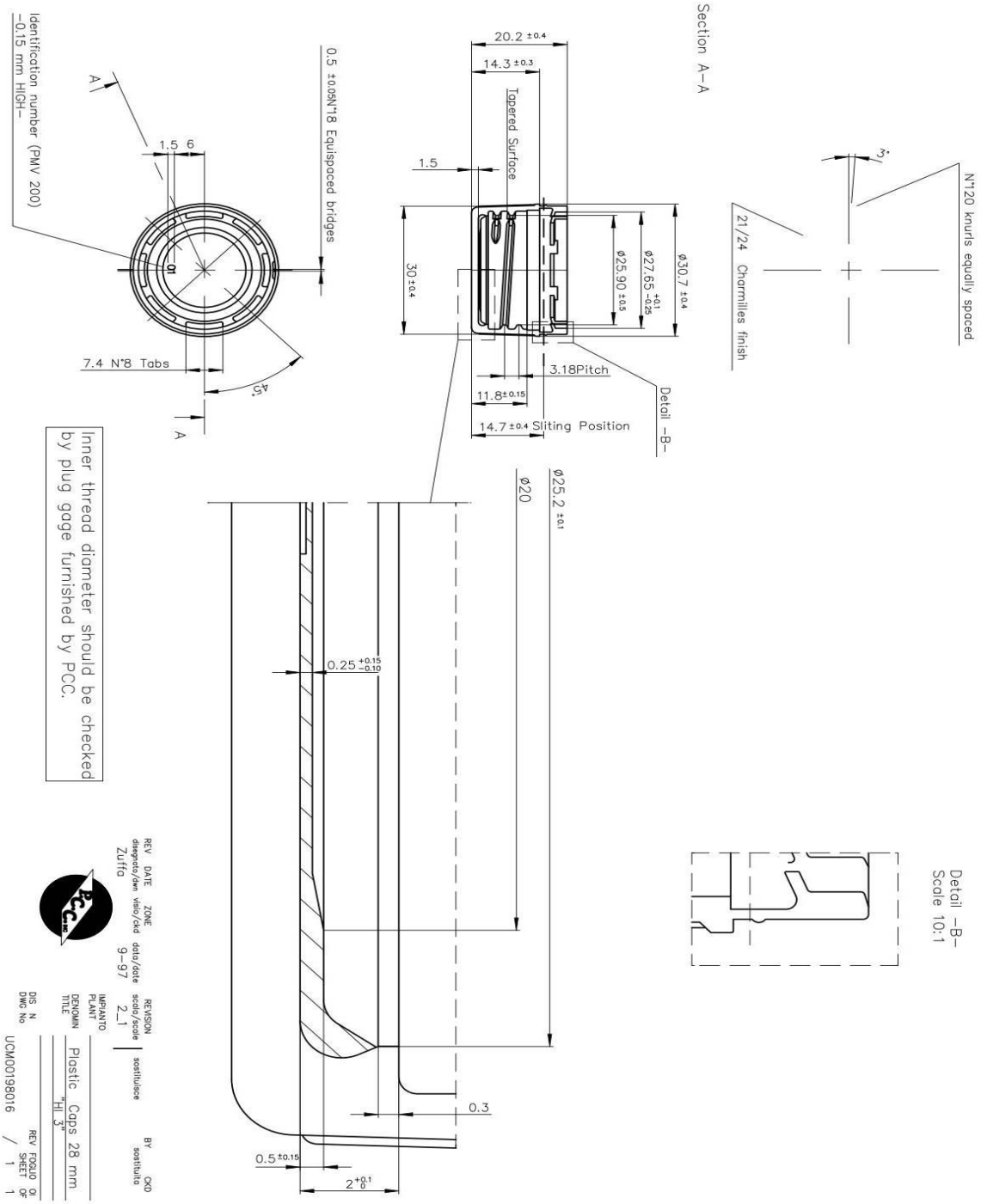
- Primijenti obavezno princip "*first in first out*".

- Prije uporabe preporučljivo je čuvati zatvarače najmanje 24 sata na temperature minimalno 22 °C.

Pakiranje:

- Transportne kartonske kutije 590 x 390 x 372 mm sa zaštitnom polietilenskom vrećom

- Sadržaj pakiranja je 4000 zatvarača (bez oznake korisnika) ili 4000 ± 20 (s oznakom korisnika)


Identification number (PMV 200)
–0.15 mm HIGH–
0.5 ±0.05N°18 Equispaced bridges
A
1.5 6
7.4 N°8 Tabs
45°
A
Section A–A
20.2 ±0.4
14.3 ±0.3
Tapered Surface
1.5
30 ±0.4
Ø25.90 ±0.5
Ø27.65 +0.1 −0.25
Ø30.7 ±0.4
3.18Pitch
11.8±0.15
14.7 ±0.4 Sliting Position
Detail –B–
N°120 knurls equally spaced
3°
21/24 Charmilles finish
Detail –B–
Scale 10:1
Ø20
Ø25.2 ±0.1
0.25 +0.15 −0.10
0.3
0.5 ±0.15
2 +0.1 0
Inner thread diameter should be checked by plug gage furnished by PCC.
REV DATE ZONE
disegnato/dwn visto/ckd data/date
Zuffa 9–97
REVISION
scala/scale 2_1
sostituisce
BY CKD
sostituito
IMPIANTO
PLANT
DENOMIN
TITLE
Plastic Caps 28 mm
"HL 3"
DIS N
DWG No
UCM00198016
REV FOGLIO DI
SHEET OF
/ 1 1

Prilog 5 Neke od tehničkih specifikacija limenki i poklopaca (zatvarača) za limenke (Ball Packaging Europe, 2014.)

Code	Character	Dimensions In mm, unless mentioned otherwise.
		500 ml (211/202/202)
A	Outside body diameter	66.3 max.
C	Nesting height	2.5 nom.
D	Flange diameter	57.5 max.
E	Flange angle	12° max.
F	Flange thickness (with lacquer)	0.175 nom.
G	Empty can height	168.0 ±0.3
J	Neck seaming clearance	3.0 min.
K	Overall neck height	17 ±1
L	Seamed can height	168.0 ±0.4
M	Neck plug diameter	52.4 ±0.3
P	Stand diameter	48.3 max.
T	Flange width	2.13 ±0.25
U	Freeboard	14.0 ±0.5
-	Column strength	800 N min.
-	Internal pressure resistance	620 kPa min. (90 PSI)
-	Nominal finished can weight	≈13.3 g

Code	Character	Dimensions In mm, unless mentioned otherwise.
		ø52 (202) SOT
A	Curl diameter	59.44 ±0.25
B	Countersink diameter	49.61 ref.
C	Curl height	2.11 ±0.15
D	Curl opening	2.72 min.
RE	Countersink radius	0.51 ref.
F	Countersink depth	6.86 ±0.15
G	Material thickness (incl. lacquer)	0.23
H	Panel depth	2.47 nom.
J	Chuck wall angle	12° ref.
-	Compound placement	High Shoulder Placement (HOS)
-	Pressure resistance	620 kPa min. (90 PSI)
-	Units per 2”	23 – 25
-	Opening force	27 N max.
-	End weight	H 2,8 g

Prilog 6 Neke od tehničkih specifikacija *keg* bačve (BFBI, 2012.)

GENERIC DESIGNSTANDARD
30 L STAINLESS STEEL KEG BEER CONTAINERS

1.Materials

1.1 The deep drawn body shells shall be AISI 304 stainless steel of initial thickness 1.5 ± 0.08 mm and a tensile strength of 550 – 700 N/mm .

1.2. Chimbs (skirts) shall be manufactured from AISI 304 stainless steel of initial thickness 1.70 ± 0.08 mm and a tensile strength greater than 850 N/mm .

1.3. Necks shall be stainless steel 304.

2. Capacity and weight

2.1. The capacity of all containers is to be equivalent to 30.25 ± 0.15 litres of water at 4ºC.

2.2. The weight of each finished container, clean and dry (excluding the extractor) is to be 9.50 ± 0.3 kg.

3. Colour identification

To assist container identification, an industry colour-banding scheme is operated in the UK. Colour combinations already allocated are listed on the BBPA/SIBA Container Master Database. The specification for each of [Brewer's] containers is given in Appendix 1 within the Container Master Database.

4. Hand holes

If requested, two hand holes of a minimum size of 115 x 35 mm should be incorporated in the upper chimb, diametrically opposite one another.

5. Drain holes

Drain holes will be required as agreed between manufacturer and customer. Drain holes between top/bottom chimb (skirt) and body need to be specified and of an agreed design.

6. Bursting disc

At the customers discretion, each keg shall incorporate, in its top or bottom dome a point of failure, designed to burst at 40 ± 5 barg (588 ± 73.5 psig) in accordance with DIN 6647-1.

7. Extractor tubes (spears)

All new containers may be sold with appropriate extractor tube. All new extractor tubes (spears) fitted shall be “safety spears” to an approved written design, specification, procedureandwarranty (guarantee).

Safety extractor tubes incorporate a device to prevent an extractor tube ejecting from a keg under pressure. For health and safety reasons only safety extractor tubes should be used in the UK market.

Safety extractor tubes are designed:

To not eject from a pressurised keg up to a pressure of 6 bar should an attempt be made to demount the extractor tube whilst the keg is pressurised

- To actively reduce the keg pressure whilst being demounted

- It is good practice to ensure a new extractor tube to keg neck sealing rubber is fitted every time an extractor tube is fitted in keg

- Metal parts are to be manufactured in 304 or 316 grade stainless steel.

- Service Tools - Safety extractor tubes must only be removed using specialist bespoke tools. These tools are only made available to accredited companies i.e. Brewers; keg manufacturers; keg repair companies

- Extractor tubes (especially seals) should be resistant to exposure to short term temperature of +135 °C.

30 LITRE KEG SINGLE APERTURE CONTAINER SPECIFICATION A. TECHNICAL REQUIREMENT

1. PRESSURE

1.1 Safe Working Pressure. The Safe Working Pressure of all containers shall be 4.14 barg (60 psig).

1.1.1 After manufacture, every container shall be tested to 6.21 barg (90 psig). 1.2 Leak-tightness. After manufacture, every container shall be leak tested by an approved method (either by means of air-under-water, gas detection or equivalent).

1.3 Volumetric change. Containers should be demonstrably designed to suffer a permanent increase in capacity at 10 barg (145 psig) of no more than 100 ml (0.10 litres).

1.4 Pressurisation to failure Should a container be excessively pressurised it must fail in safe manner, i.e: by ductile, not brittle fracture. No part of the container must be ejected dangerously at or before failure.

For safety, the pressurising medium should be water and the containers filled completely before pressurisation.

As per the manufacturing quality procedures, containers should demonstrably withstand a minimum of 75 barg (1102 psig) and then be taken to failure in order to quantify its pressure capability. Such samples should not, of course, have bursting discs.

1.5 Bursting disks. At the discretion of the customer, containers may be fitted with a bursting disc situated on the top/bottom dome.

1.5.1 Where bursting discs are specified, two containers at the start of each production run and one during every day of production thereafter should demonstrably withstand 40 ± 5 barg (588 ± 73.5 psig) in accordance with DIN 6647-1.

1.5.2 Containers, which must be free-standing during the test, must not move at the point of failure. They must fail in a safe manner (see 1.4 above).

2 DROP TESTS 2.1 Horizontal Containers should demonstrate compliance with the following test criteria:

They shall be held in slings (with a quick release mechanism) such that the long axis of the keg is horizontal. They shall be dropped three times from 1200 mm (4 feet) onto a 25 mm (1 inch) steel

Performance Standard 9.12

plate on concrete. It is essential that the point of impact is exactly the same each time. The outside diameter of the rolling rings at A1, A2, B1 and B2 shall be measured.

A1 and A2 shall alter by no more than 8mm and B1 and B2 by no more than 5 mm. Any leakage shall be noted.

2.2 45º angle 45º drop-tests shall be carried out for each of three different points of impact:

2.2.1 at a hand hole in the top chimb, 2.2.2 90º away from the hand holes in the top chimb, 2.2.3 the bottom chimb.

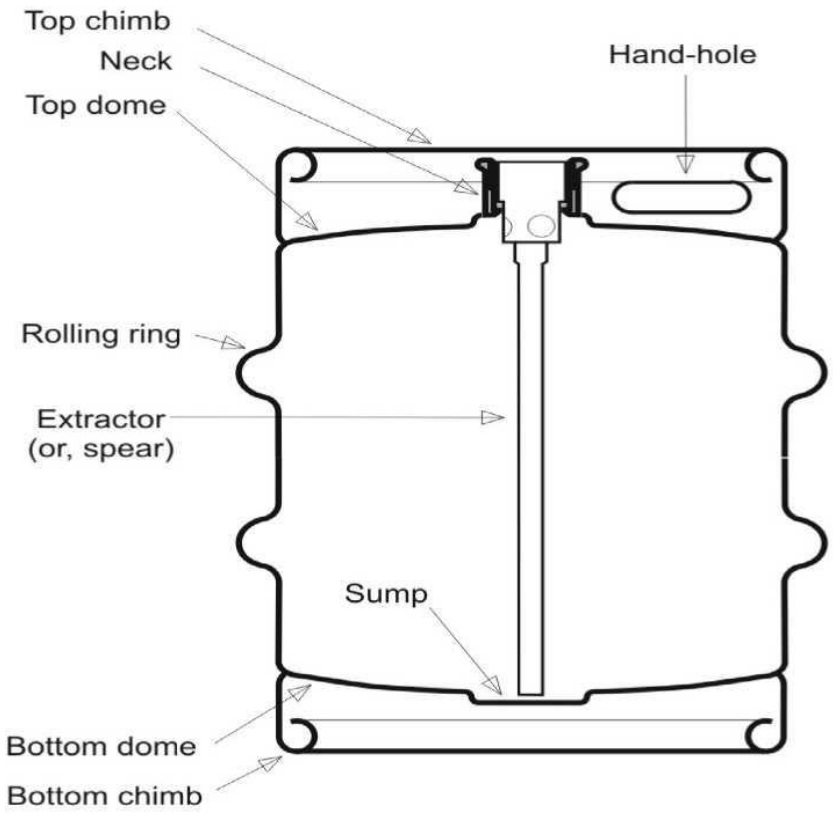
Containers should demonstrate compliance with the following test criteria:

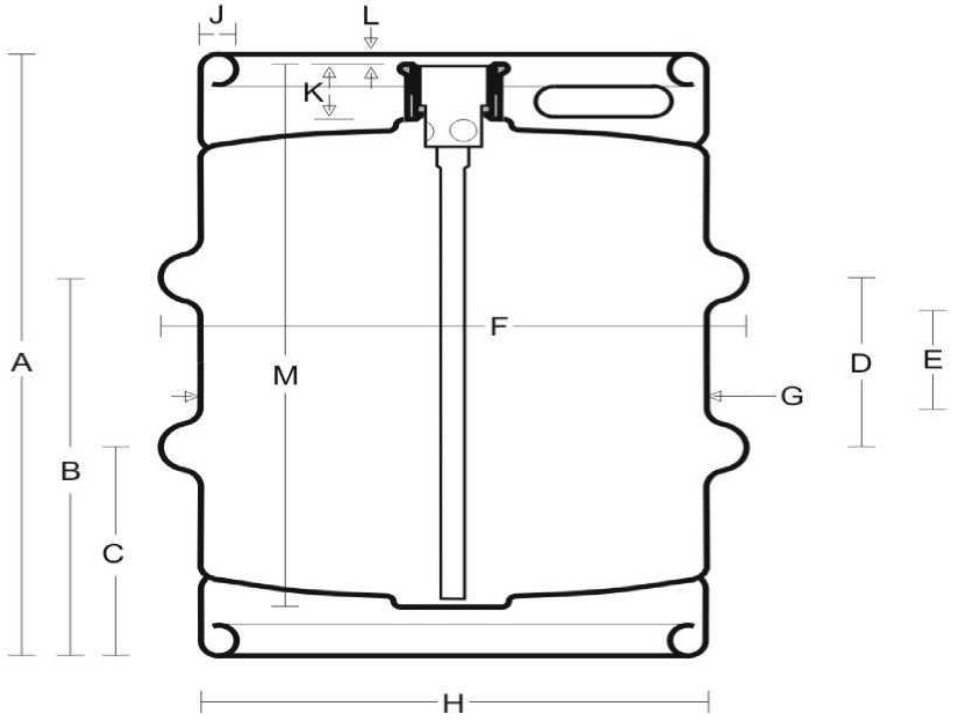
They shall be held in slings (with a quick release mechanism) such that the long axis of the keg is at 45º to the horizontal. They shall be dropped three times from 1200 mm (4 feet) onto a 25 mm (1 inch) steel plate on concrete.

It is essential that the point of impact is exactly the same each time a container is dropped. After each drop, the displacement from the normal inside and outside diameter of the chimb at the point of impact and also inside and outside diameter perpendicular to it shall be measured together with any reduction in chimb to neck clearance at the mid point of the extractor tube (top chimb)/sump (bottom chimb).

The final deformation at the point of impact shall not exceed 18 mm and at a point 90º around the chimb from the point of impact it shall not exceed 2 mm. The reductions in chimb-to-neck and chimb-to-sump clearances shall not exceed 5 mm. No shell deformation is acceptable and there must be no evidence of splitting of the body. Any leakage shall be noted.

TYPICAL KEG FOR PRESSURISED BEERS





Prilog 7 Validacija i razvoj metode korištene za mjerenja provedena na GC-u (Cota, 2008.).

6. KALIBRACIJA METODOM DODATKA

6.1. Priprema kalibracijske otopine

6.1.1 Alkoholi, esteri i acetaldehid (koncentracije u ppm)

Mikropipetom prenijeti sljedeće komponente u odmjernu tikvicu od 100 ml u kojoj je pripremljeno 10 ml vode i ±10 ml etanola na sobnoj temperaturi:

30 mg Izoamil acetat
100 mg Acetaldehid*
200 mg Izobutanol
200 mg Propanol
400 mg Etil acetat
1000 mg Izoamil alkohol

Nadopuniti do 100 ml etanolom.

6.1.2 Diacetil, Pentandion i DMS (koncentracije u ppb)

Mikropipetom prenijeti sljedeće komponente u odmjernu tikvicu od 100 ml u kojoj je pripremljeno 10 ml vode i ±10 ml etanola na sobnoj temperaturi:

50 mg Diacetil
50 mg Pentandion
50 mg DMS*

Nadopuniti do 100 ml etanolom.

6.1.3 RADNA OTOPINA 1 sa svim komponentama

Otpipetirati 50 ml otopine 6.1.1. i 1 ml otopine 6.1.2. u odmjernu tikvicu od 100 ml. Nadopuniti do 100 ml s etanolom.

6.1.4 RADNA OTOPINA 2 sa svim komponentama

Otpipetirati 25 ml otopine 6.1.3. u odmjernu tikvicu od 100 ml. Nadopuniti do 100 ml s etanolom.

6.2. Priprema internih standardnih otopina

6.2.1. Interna standardna temeljna otopina 1

Koristeći analitičku vagu i mikropipete (koristeći nove nastavke radi sprečavanja kontaminacije), prebaciti (i odvagati) sljedeće komponente u odmjernu tikvicu od 100 ml koja sadrži 10 ml etanola + 10 ml vode na sobnoj temperaturi:

125 mg Propil propionat
375 mg 1-butanol

Nadopuniti do 100 ml etanolom

6.2.2. Interna standardna temeljna otopina 2

Koristeći analitičku vagu i mikropipete (koristeći nove nastavke radi sprečavanja kontaminacije), prebaciti (i odvagati) sljedeće komponente u odmjernu tikvicu od 100 ml koja sadrži 10 ml etanola + 10 ml vode na sobnoj temperaturi:

100 mg Etil metil sulfid
50 mg Heksandion

Nadopuniti do 100 ml etanolom.

6.2.3. Interna standardna radna otopina

Otpipetirati 20 ml otopine 6.2.1. i 1 ml otopine 6.2.2. u odmjernu tikvicu od 100 ml. Nadopuniti do 100 ml etanolom. Dodatkom 100 µl ove interne standardne radne otopine u sve kalibracijske i mjerne uzorke, dobivaju se sljedeće koncentracije u uzorku:

Interni standard	čist. (%)	masa mg	Završna konc. u uzorku uzorak = 5 ml		interni standard za:
1-Butanol	99,9	364,3	14,56	ppm (mg/l)	Propanol, Izobutanol, Izoamill alkohol
Propil propionat	99,0	121,3	4,80	ppm (mg/l)	Izoamil acetat, Acetaldehid,Etil acetat
Etl metill sulfid	96,0	108,4	208,13	ppb (µg/l)	DMS
Heksandion	90,0	60,4	108,72	ppb (µg/l)	Diacetil, Pentandion

6.3. Priprema uzoraka za kalibraciju

Pripremiti 28 viala (4 viala za svaku koncentraciju sa 7 različitih koncentracija) od kojih svaki sadrži 5 ml piva. Pivo može biti napunjeno u viale koristeći se pipetama (transpipetorima) Dodati za svaku različitu vrijednost sljedeće količine:

	0 (blanc)	1	2	3	4	5	6
Interna standardna otopina 6.2.3	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Radna otopina 6.1.3					50 µl	100 µl	150 µl
Radna otopina 6.1.4		50 µl	100 µl	150 µl			
Etanol	150 µl	100 µl	50 µl		100 µl	50 µl	

	čist. (%)	masa mg	1	2	3	4	5	6	MJ
Diacetil	95,0	55	13,06	26,13	39,19	52,25	104,50	156,75	ppb
Pentandion	97,0	55	13,34	26,68	40,01	53,35	106,70	160,05	ppb
DMS	98,0	49,8	12,20	24,40	36,60	48,80	97,61	146,41	ppb
Izoamil acetat	98,0	30,7	0,38	0,75	1,13	1,50	3,01	4,51	ppm
Acetaldehid	99,0	102	1,26	2,52	3,79	5,05	10,10	15,15	ppm
Propanol	99,5	203	2,52	5,05	7,57	10,10	20,20	30,30	ppm
Izobutanol	98,0	198	2,43	4,85	7,28	9,70	19,40	29,11	ppm
Etil acetat	99,8	409	5,10	10,20	15,31	20,41	40,82	61,23	ppm
Izoamil alkohol	99,0	1064	13,17	26,33	39,50	52,67	105,34	158,00	ppm

Staviti cca 4 „dummy - warm up" uzorka u auto sampler iza kojih slijede kalibracijski viali sijedećim redom:

0/0/1/1/2/2/3/3/4/4/5/5/6/6/0/0/1/1/2/2/3/3/4/4/5/5/6/6 (+ XR pivo)

6.4. Mjerenje

Analizirati kalibracijske uzorke na isti način kao normalne uzorke.

6.5. Proračun

Odrediti Response faktore metodom regresije.

Određivanje hlapivih supstanci: Priprema viala za analizu

Napuniti viale za GC s 5 ml uzorka. Dodati 100 µl interne standardne radne otopine opisane pod 6.2.3.

Zatvoriti odmah viale i staviti ih u sampler

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Rezultati različitih komponenti preračunavaju se iz površine ispod peak-a u korelaciji s relevantnim internim standardima. DMS, diacetil, pentandion su izraženi u ppb (µg/l) bez decimala; sve ostale komponente su izražene u ppm (mg/l) i zaokružene na jednu decimalu.

$$[X] = \frac{[is]}{R.Fact} \times \frac{Area(X)}{Area(is)}$$

Gdje je R. Fact = a (koef. smijera) x [is]

Kalibracijske komponente

	R^2	St. Dev.	LOD	LOQ	Raspon linearnosti	jedinica
Diacetil	0,999189	0,40	1,32	2,0	2,0 –150	ppb
Pentandion	0,9989	0,5	1.5	2,3	2,3 – 150	ppb
DMS	0,9952	0,97	3,21	4,86	5,0 –150	ppb
Izoamil acetat	0,9994	0,012	0.04	0,061	0,06 – 5.2	ppm
Acetaldehid	0,99892	0,046	0.150	0,228	0,3 – 14.6	ppm
Etil acetat	0,9991	0,17	0,56	0,85	0,9 – 60	ppm
1-Propanol	0,99757	0,15	0,50	0,75	0,8 – 32	ppm
Izobutanol	0,99638	0,18	0,60	0,91	0,9 – 32	ppm
Izoamil alkohol	0,99756	0,70	2,32	3,51	3,5 – 150	ppm

	R. Fakt.	Ret. Vrijeme (min)	detektor	ISTD
Diacetil	0,392	5,125	ECD	Heksandion
Pentandion	0,778	6,613	ECD	Heksandion
DMS	1,06 3	2,4	FID	EMS
Izoamil acetat	1,165	7,66	FID	Propil-propionat
Acetaldehid	0,244	2,16	FID	Propil-propionat
Etil acetat	0,48	3,49	FID	Propil-propionat
1-Propanol	0,792	6,17	FID	1-Butanol
Izobutanol	1,722	6,99	FID	1-Butanol
Izoamil alkohol	1,557	9,19	FID	1-Butanol

R. Fact. = a x [is]

Interni Standardi

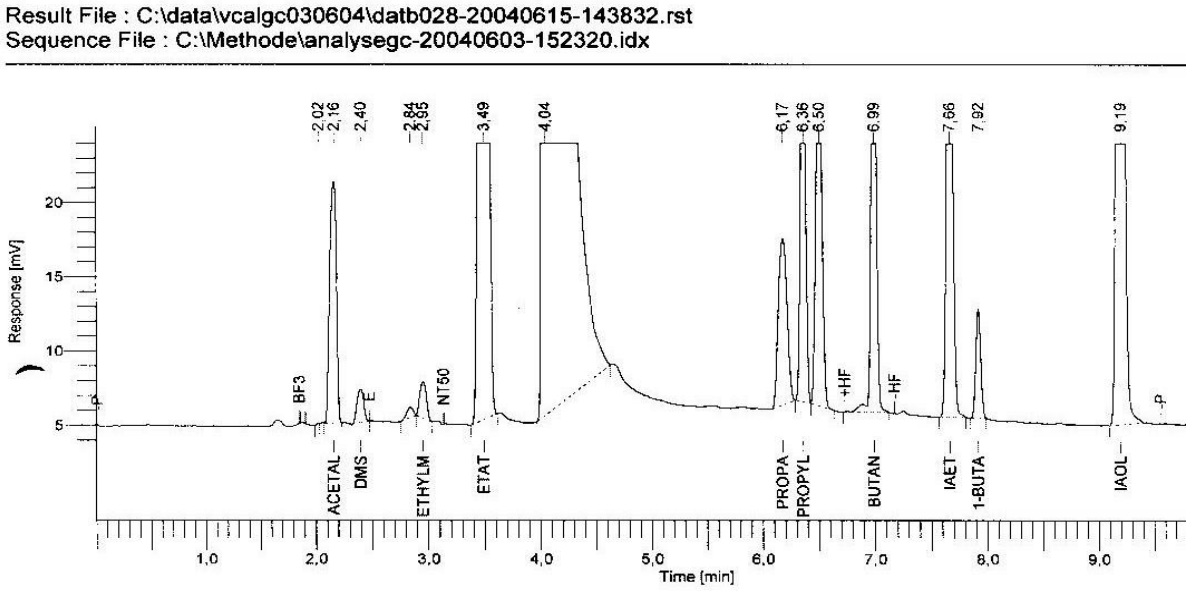
	detektor	Ret. Vrijeme (min)	Koncentracija	jedinica
Heksandion	ECD	7,783	108,72	ppb
EMS	FID	2,95	208,13	ppb
Propil-propionat	FID	6,36	4,80	ppm
1-Butanol	FID	7,92	14,56	ppm

Reproducibilnost N = 9

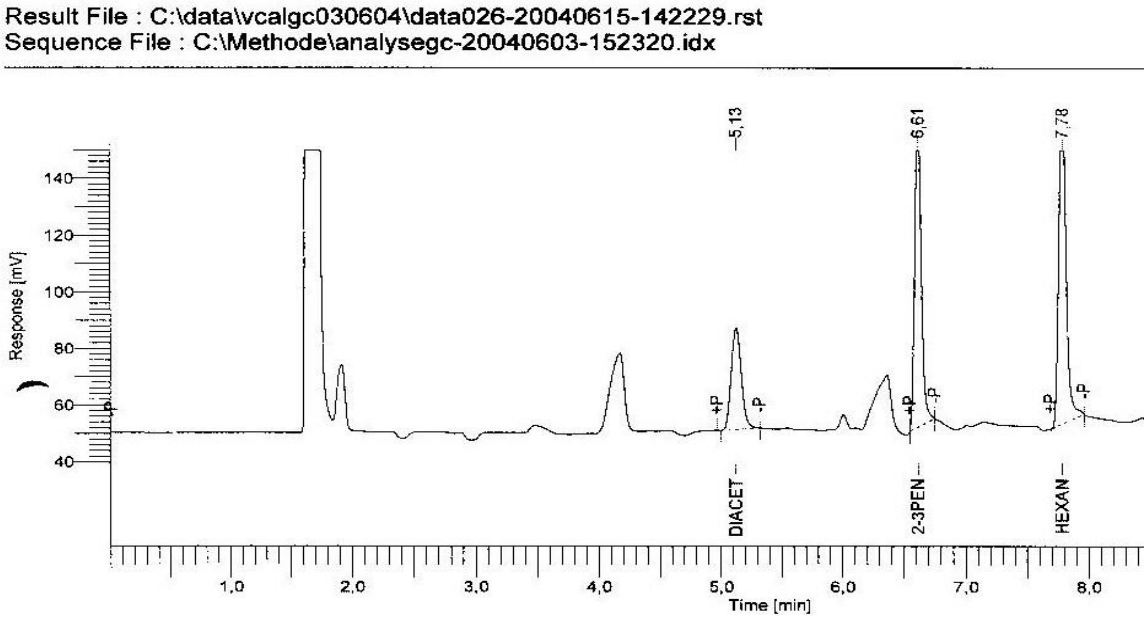
Komponente	Prosjek koncentracija	St Dev.	Koef Var. (%)
Diaacetil	49,5 ppb	0,582167 ppb	1,18
Pentandion	47,7 ppb	0,723266 ppb	1,22
Dimetil sulfid	59,1 ppb	3,726 ppb	6,3
Izoamil acetat	1,75 ppm	0,053 ppm	3,03
Acetaldehid	3,4 ppm	0,078426 ppm	1,55
Etil acetat	28,3 ppm	0,952436 ppm	0,19
Propanol	21,4 ppm	0,736964 ppm	3,44
Izobutanol	13,2 ppm	0,536887 ppm	5,59
Izoamil alkohol	84,7 ppm	3,0455 ppm	0,87

8. KROMATOGRAMI

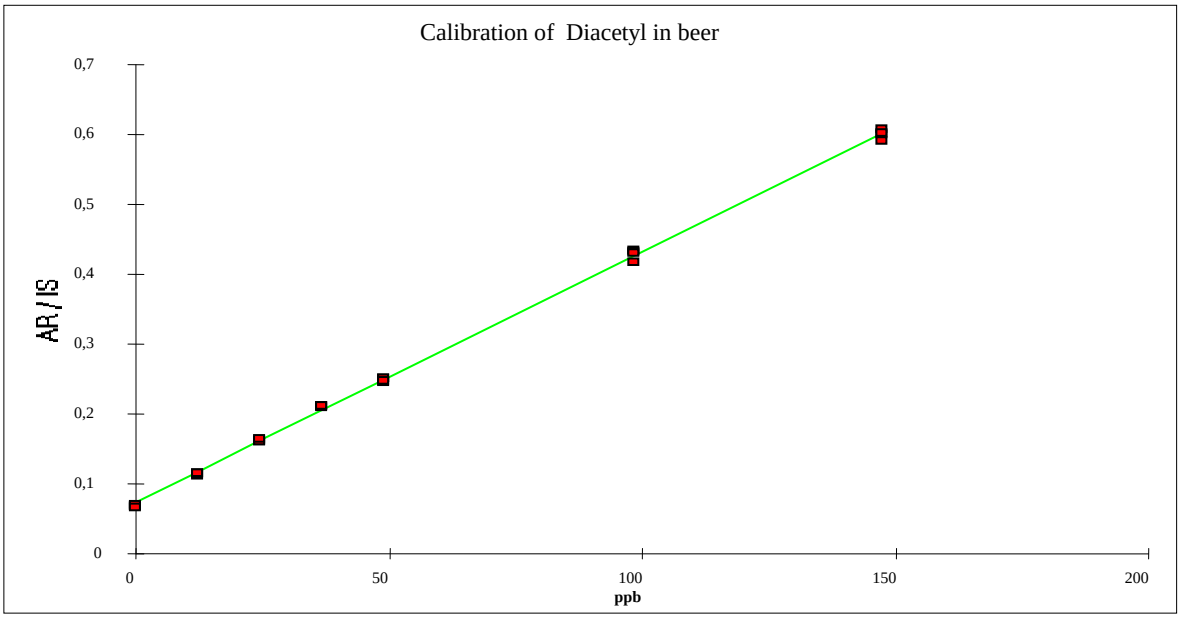
1. FID

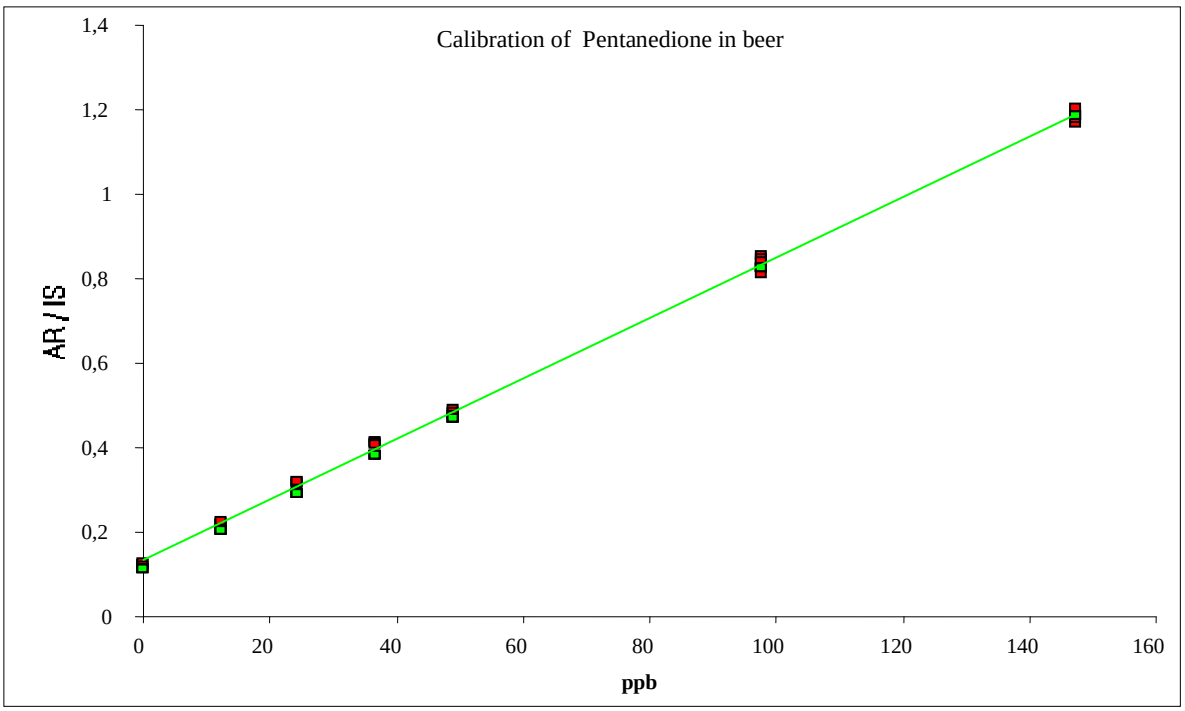


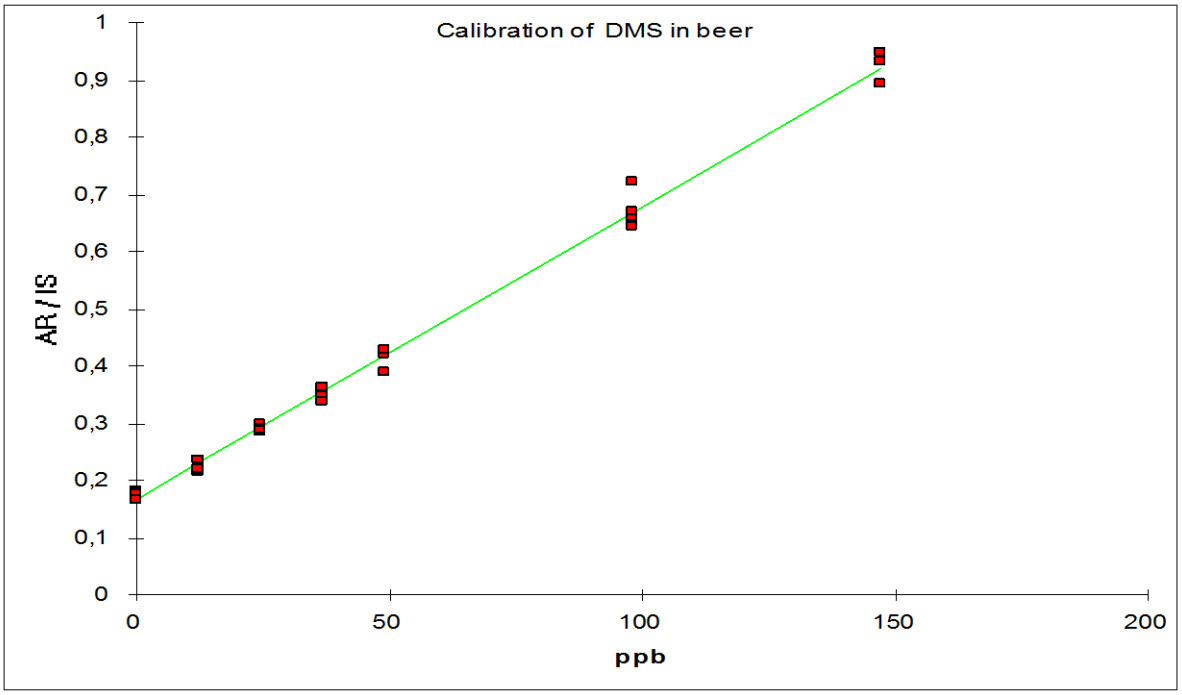
2. ECD

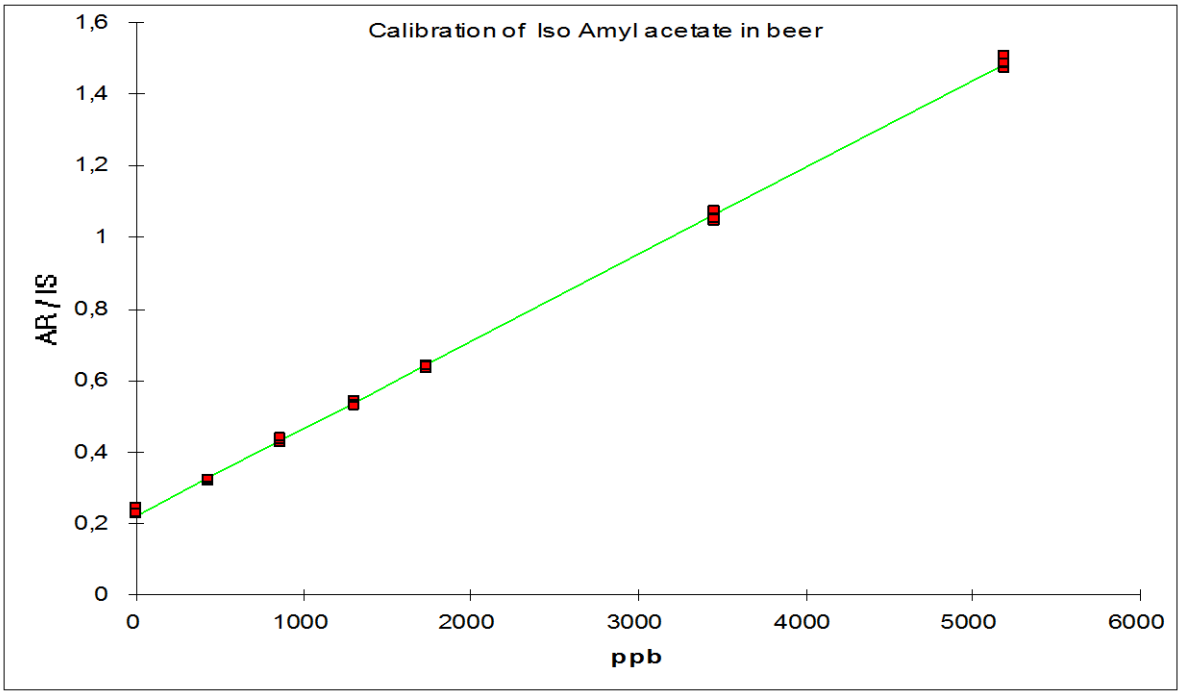


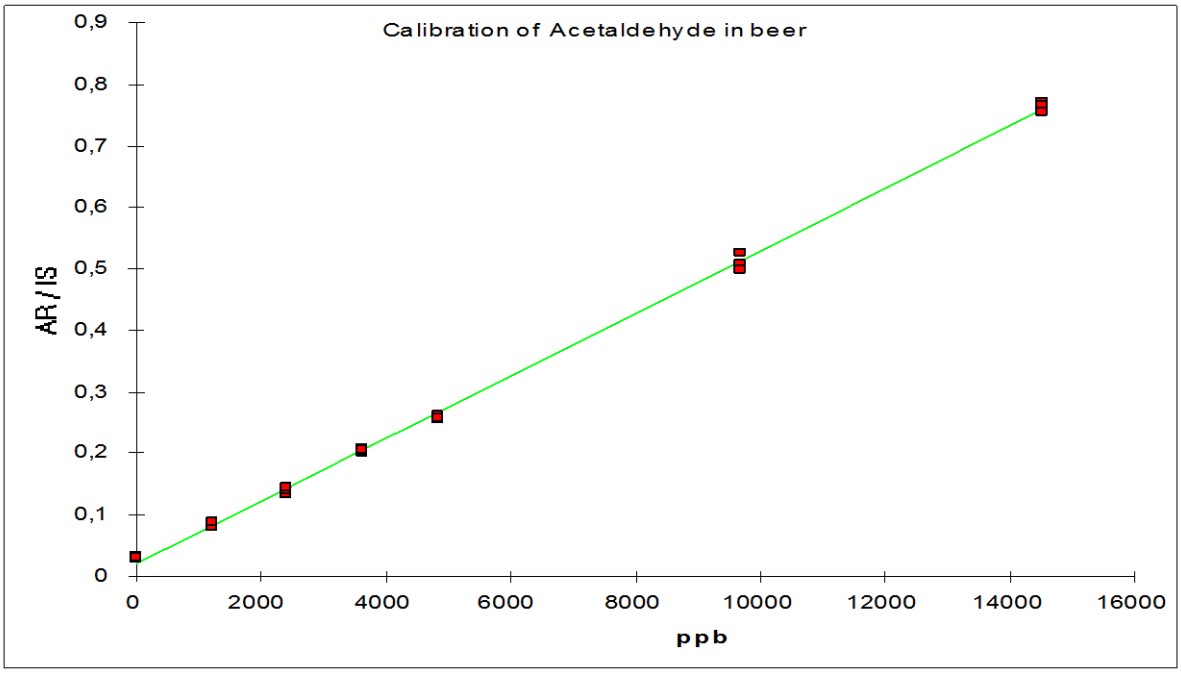
9. KALIBRACIJSKE KRIVULJE

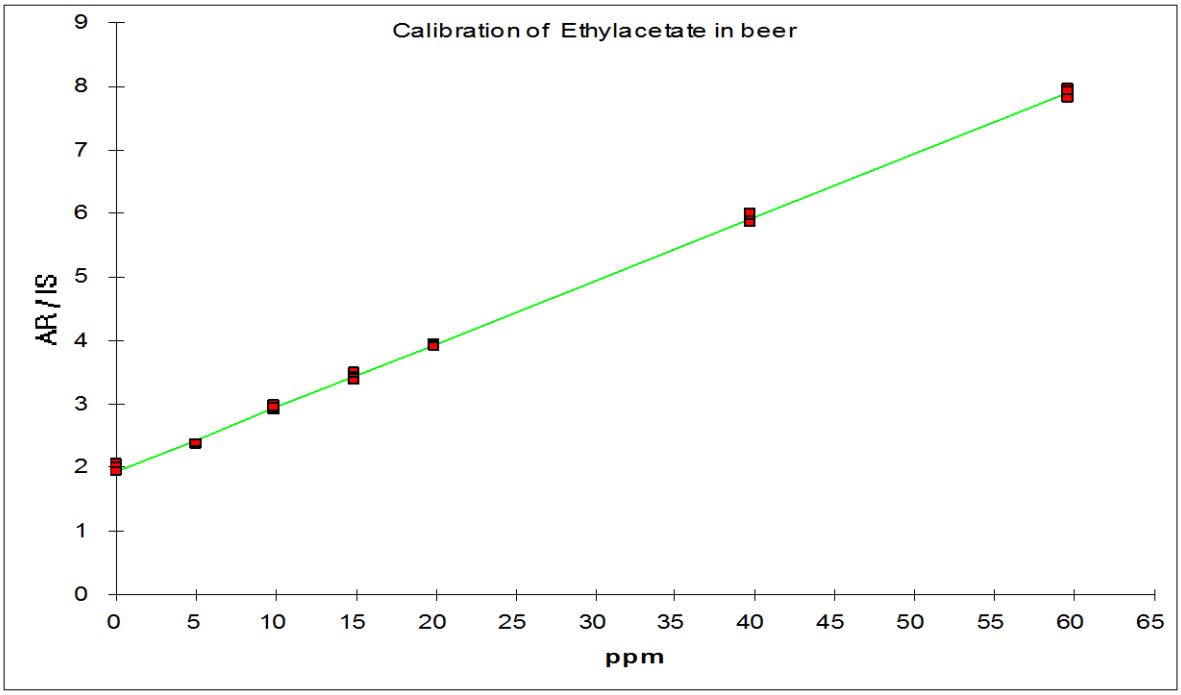


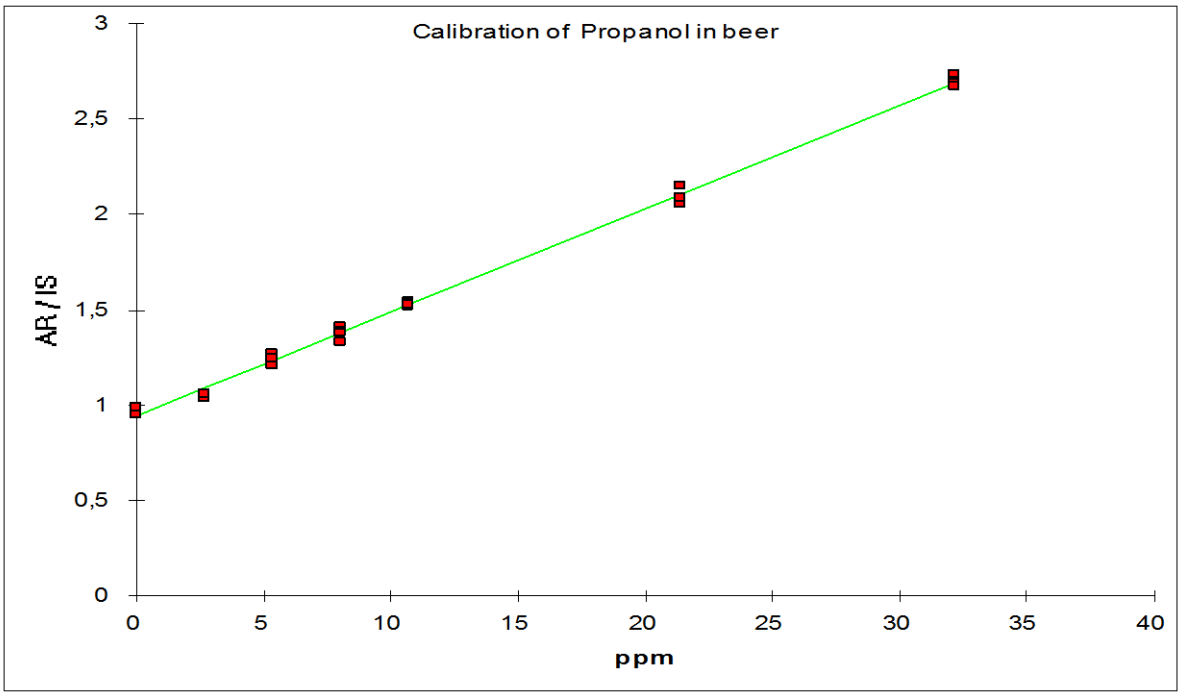

Calibration of Pentanedione in beer
AR / IS
ppb
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
0
20
40
60
80
100
120
140
160

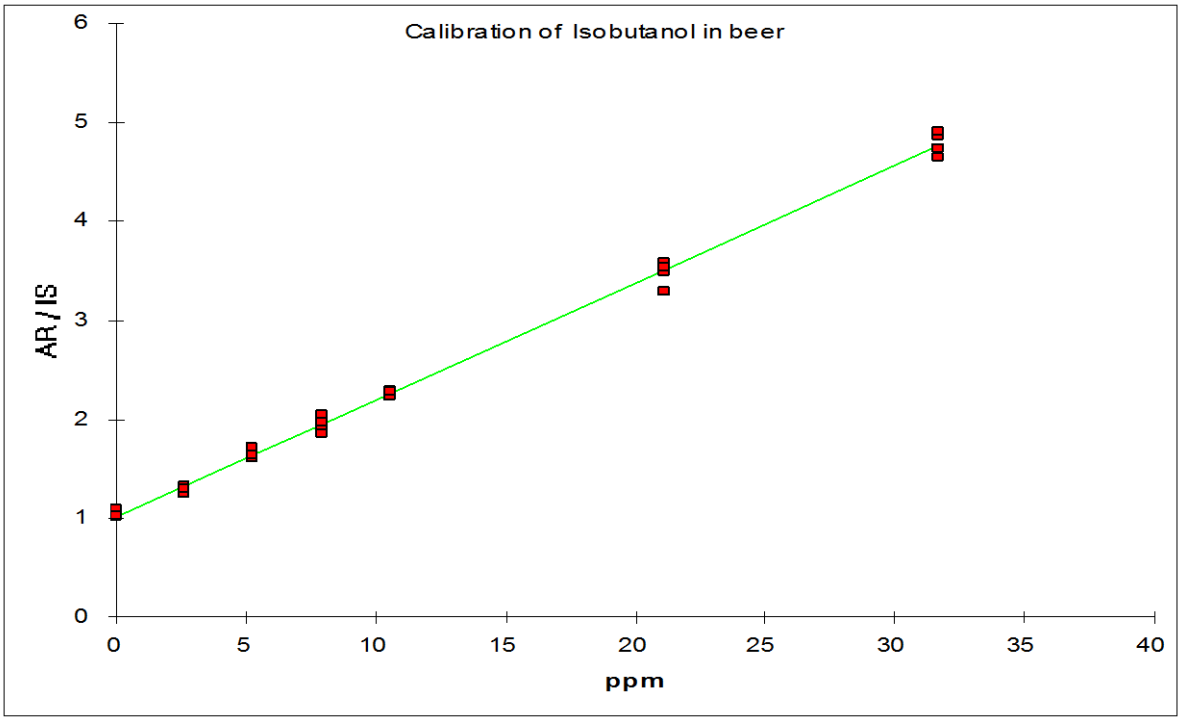

Calibration of DMS in beer
AR / IS
ppb
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
0
50
100
150
200

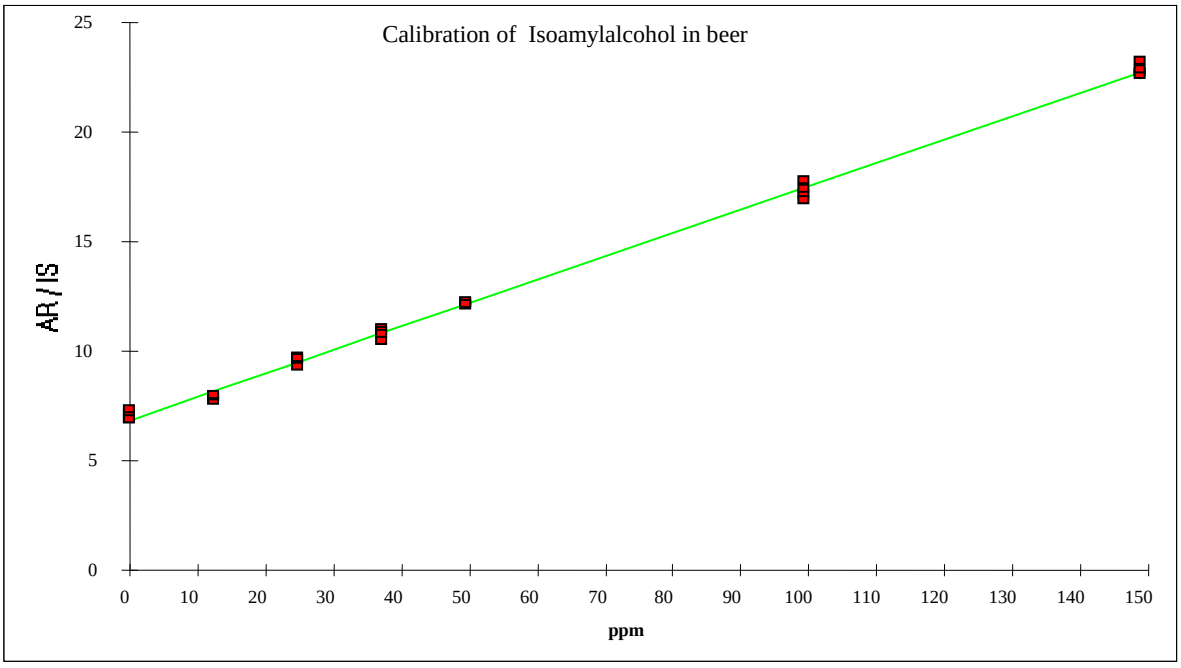

Calibration of Iso Amyl acetate in beer
AR / IS
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
ppb


Calibration of Acetaldehyde in beer
AR / IS
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
ppb


Calibration of Ethylacetate in beer
AR / IS
ppm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65


Calibration of Propanol in beer
AR / IS
ppm
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
0
5
10
15
20
25
30
35
40


Calibration of Isobutanol in beer
AR / IS
ppm
0
1
2
3
4
5
6
0
5
10
15
20
25
30
35
40


Calibration of Isoamylalcohol in beer
AR / IS
ppm
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150