

USODA FENOLNIH SPOJIN MED PROIZVODNJO PIVA

Petra TERPINC¹

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 20. 2. 2020

Sprejeto / accepted: 14. 4. 2020

Izvleček

V pivu pretežni del fenolnih spojin izvira iz ječmenovega slada, medtem ko jih hmelj prispeva precej manj. Vsebnost fenolnih spojin v končnem produktu je odvisna od kakovosti in količine izhodnih surovin ter od samega proizvodnega procesa. Fenolne spojine odločilno vplivajo na fizikalno in senzorično stabilnost piva. Hkrati je njihov zadosten vnos, ob upoštevanju zmerne količine zaužitega alkohola, povezan s preprečevanjem številnih kroničnih bolezni. Raziskave preteklih let se osredotočajo predvsem na interakcije med fenolnimi spojinami in proteini, vendar je antioksidativni potencial fenolnih spojin premaknil zanimanje zanje v smer, kako jih na poti iz izhodnega materiala do piva ohraniti v čim večji meri. Praviloma njihova vsebnost med slajenjem in drozganjem izrazito naraste, vendar kasneje med fermentacijo in skladiščenjem tudi precej upade. Z izbiro kakovostnih surovin in zadostno kontrolo tehnoloških parametrov lahko optimiziramo pogoje za sprostitvev in ohranitev fenolnih antioksidantov. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo dale jasen vpogled v usodo fenolnih spojin med proizvodnjo piva.

Ključne besede: ječmen, slad, hmelj, sladica, varjenje, pivo, fenolne spojine

FATE OF PHENOLIC COMPOUNDS DURING BEER PRODUCTION

Abstract

The phenolic compounds in beer mostly originate from barley malt, whereas minority is derived from hops. The content of phenolic compounds in the final product depends on the quality and quantity of raw materials and production process. Phenolic compounds have a decisive influence on the physical and sensory stability of beer. At the same time, their sufficient intake, taking into account moderate alcohol consumption, is associated with the prevention of chronic diseases. Researches of recent years are focused mainly on protein - polyphenol interactions, but potential of phenolic compounds as antioxidants shifted interest toward preserving these compounds from the raw materials to the final beer. In general, their content is found to increase significantly during malting and

¹ Doc. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija, e-naslov: petra.terpinc@bf.uni-lj.si

mashing, but decrease markedly during the subsequent fermentation and storage. By selecting the appropriate raw materials and adequate control of technological parameters, the conditions for the release and retention of phenolic antioxidants can be optimized. However, further researches are needed to provide a clear insight into the fate of phenolic compounds during beer production.

Key words: barley, malt, hop, wort, brewing, beer, phenolic compounds

1 UVOD

Fenolne spojine so raznolika skupina sekundarnih metabolitov, ki rastline ščitijo pred patogenimi organizmi, insekti, živalmi in ultravijoličnim sevanjem, uravnavajo njihovo rast in razmnoževanje (Mark in sod., 2019). Posamezne fenolne spojine pomembno prispevajo k strukturi rastlinske celice, s čimer vplivajo na adherenco, raztegljivost, dostopnost in biorazgradljivost celične stene (Oliveira in sod., 2019). Fenolne spojine izvirajo iz fenil propanoidne poti, glavna prekursorja sta aminokislina fenilalanin iz šikimatne poti in malonil-CoA iz acetatne poti. Osnovno ogrodje predstavlja aromatski obroč (eden ali več) s hidroksilnimi substituenti (Mark in sod., 2019). Glede na njihov ogljikov skelet, razlikujemo več osnovnih skupin. Med preprostimi monofenolnimi spojinami, ki se nahajajo v sladici, izpostavimo fenolne kisline, razlikujemo hidroksibenzojske (C6-C1) (galna, protokatehujska, *p*-hidroksibenzojska, vanilinska in siringinska kislina) in hidroksicimetne (C6-C3) kisline (kavna, *p*-kumarna, ferulna in sinapinska kislina) (Boulton, 2013). Nekatere med njimi so na račun aktivnosti ustreznih encimov in/ali toplotne obdelave podvržene razgradnji, pri čemer se tvorijo dekarboksilacijski produkti z nižjim pragom zaznave, ki lahko precej zaznamujejo končno aromo piva (med hlapnimi monofenoli izpostavimo 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol) (Vanbeneden in sod., 2007). Kot naslednjo skupino izpostavimo flavonoide (C6-C3-C6), med pomembnejšimi spojinami, ki jih najdemo v sladici omenimo nekatere flavonole (kvercetin in kamferol) in flavanole (katehin, epikatehin, galokatehin in epigalokatehin). Oksidacija in polimerizacija flavanolov omogočata nastanek dimerov, trimerov, tetramerov in pentamerov. V pivu je identificiranih več kot 50 tovrstnih spojin (pomembnejša predstavnika sta procianidin B₃ in prodelphinidin B₃), ki jih poznamo pod skupnim izrazom tanoidi. Nadaljnja polimerizacija slednjih vodi v nastanek mnogo večjih molekul imenovanih tanini (Boulton, 2013).

Fenolne spojine lahko razdelimo na različne načine, za nas bo zanimiva delitev osnovana na njihovi razporeditvi znotraj celice. Med topne fenolne spojine prištevamo proste enostavne fenolne spojine in topne konjugate, tj. ostale fenolne spojine z nizko molsko maso, ki se v vakuoli nahajajo v obliki estrov ali glikozidov. Med netopno vezane fenolne spojine uvrščamo kondenzirane tanine, fenolne kisline in druge komponente z nizko molsko maso, ki so vezane na

arabinoksilane, pektin, celulozo, lignine in/ali proteine. Večina študij je osredotočena na topne fenolne spojine, medtem ko so potencialni zdravilni učinki netopno vezanih fenolov pogosto prezrti, ker so ti, za razliko od proste oblike, preko estrskih, etrskih in C-C vezi pritrjeni na komponente celične stene in jih zato ne uspemo ekstrahirati z vodnimi raztopinami organskih topil (Carvalho in sod., 2016; Santos-Zea in sod., 2018). Maillard in Berset (1995) poročata, da je njihov antioksidativen potencial dvakrat višji v primerjavi s potencialom prostih fenolnih spojin, zato vezane fenolne spojine uvrščata med pomembnejše antioksidante piva. Poleg poznane antioksidativne učinkovitosti, vezane fenolne spojine zavirajo rast rakavih celic, uravnavajo ključne encime v presnovi ogljikovih hidratov in vplivajo na vnetne procese (Santos-Zea in sod., 2018). Ker se vezane fenolne spojine slabo absorbirajo v tankem črevesu, potujejo v nespremenjeni obliki vse do debelega črevesja, kjer so hrana prisotnim mikroorganizmom. Med fermentacijo jih slednji pretvarjajo v razne presnovke, ki pozitivno učinkujejo na črevesno mikrobioto in zavirajo rast patogenih organizmov (Pérez-Jiménez in Torres, 2011).

Uživanje hrane za človeka predstavlja glavni vnos fenolnih spojin. Sadje, zelenjava, polnozrnata žita, kava, zeleni čaj in vino so znani po visoki vsebnosti fenolnih spojin. Pivo predstavlja drugo najpomembnejšo alkoholno fermentirano pijačo na svetu, takoj za vinom (Wannenmacher in sod., 2018). Nedavna študija je pokazala, da lahko zmerno uživanje piva pri zdravih osebah znatno zmanjša tveganje za nastanek srčno-žilnih in nevrodegenerativnih bolezni, predvsem kot posledica specifičnih polifenolov iz slada in hmelja (de Gaetano in sod., 2016). Že pred leti je namreč analiza komercialnih piv pokazala, da lahko pivo pomembno prispeva k vnosu skupnih prehranskih antioksidantov, zlasti fenolnih kislin (Piazzon in sod., 2010). V pivu se večji del fenolnih spojin nahaja v obliki estrov in glikozidov ter vezanih kompleksov (Boulton, 2013).

2 FENOLNE SPOJINE V IZHODNIH SUROVINAH

Vsebnost fenolnih spojin v pivu je določena z osnovnimi surovinami in s samo tehnologijo varjenja piva. Fenolne spojine v pivu v glavnem izvirajo iz žit in hmelja (Lentz, 2018). Čeprav vsebuje ječmen neprimerljivo manj fenolnih spojin (50 do 100 mg / 100 g suhe snovi) kot hmelj (do 4 % suhe snovi), še vedno prispeva 70 – 80 % vseh fenolnih spojin v pivu (Carvalho in sod., 2016; Wannenmacher in sod., 2018). Izjema so močnejše hmeljena piva, kjer je doprinos hmelja lahko vse do 50 % (Roberts in Wilson, 2006). Lahko pa fenolne spojine proizvajajo tudi določeni sevi kvasovk, v tem primeru so v pivu prisotne arome po klinčkih (Langos in Granvogl, 2016). Obstajajo tudi manj direktni viri: bodisi se fenolne spojine ekstrahirajo iz lesa med staranjem piva v lesenih sodih ali pa se sproščajo pri sežigu lesa med proizvodnjo dimljenega slada (Lentz, 2018). Omenimo tudi fenolne spojine, ki jih zaznamo kot izrazito neprijetne (po zdravilih, ostre in trpke zaznave); te so običajno posledica prisotnosti klorofenolov v vodi

(Taylor, 2006). V pregledu se bomo osredotočili predvsem na ječmenov slad, na kratko pa bomo preleteli tudi najpomembnejše fenolne spojine v hmelju.

2.1 Ječmenov slad

Ovojnica ječmenovega zrna je bogata z lignini (polifenolna makromolekula), hemicelulozo (pretežno sestoji iz arabinoksilanov) in celulozo (polimer glukoze). Pomemben sestavni del celične stene je tudi ferulna kislina, ki omogoča prečno zamreženost med lignini in arabinoksilani. Nastanek dimera ferulnih kislin dveh sosednjih arabinoksilanov zmanjša učinkovitost encimske razgradnje in s tem prebavljivost polisaharidov celične stene (Ikram in sod., 2017). Ostanki fenolnih spojin, ki so vezani na molekulo arabinoksilana, segajo od enostavnih spojin (kot sta ferulna in *p*-kumarna kislina) pa vse do kompleksnih polimerov (kot je dimer katehina, tj. procianidin B₃). Procianidin B₃ ima oksidativne lastnosti in lahko reagira s proteini, kar vodi v pojav koloidne motnosti piva (Palmer, 2006). Kot poroča Boulton (2013) so zimske sorte ječmena bogatejše s fenolnimi spojinami kot spomladanske. Fogarasi in sod. (2015) slednje utemeljujejo z razlikami v anatomiji zrn. Zhao (2015) nadalje navaja, da na vsebnost fenolnih spojin vpliva tudi prisotnost pleve (razlike so se pokazale med golim in plevnatim ječmenom) ter velikost zrn (manjša zrna naj bi zaradi večjega razmerja med površino in volumnom imela večji delež zunanje ovojnice in posledično več hidroksicimetnih kislin). Cai in sod. (2015) so pokazali, da je vsebnost fenolnih kislin močno odvisna od genetske raznolikosti med posameznimi genotipi, česar pa Holtekjølén in sod. (2006) niso uspeli potrditi za proantocianidine. Vsebnost skupnih flavanolov se je gibala med 325 in 527 µg/g sveže zatehte ječmenove moke; prevladovali so trimeri sestavljenih iz ponavljajočih enot galokatehina in/ali katehina (do 104 µg/g za posamezen trimer), sledili so dimeri (procianidin B₃: 63 - 126 µg/g in prodelfinidin B₃: 48 - 106 µg/g), najmanj pa je bilo v analiziranih vzorcih monomerov (katehin: 14 - 41 µg/g).

Na splošno je za prvo fazo priprave slada značilen upad fenolnih spojin, saj se te deloma izlužijo v vodi, v kateri se namaka ječmen. Če se fenolne spojine med namakanjem ječmena ne izlužijo iz ovojnice zrna v zadostni meri, se iz perikarpa in alevronske plasti ječmenovega zrna ekstrahirajo kasneje med drozganjem in takšno pivo ima lahko posledično trpek okus. Namakanje zrn v alkalni vodi zmanjša količino fenolov v sladu (Palmer, 2016). Med kaljenjem ječmena nato koncentracija vodotopnih fenolnih spojin izdatno naraste (Wannenmacher in sod., 2018). Toplotna obdelava, ki sledi, vodi v spremenjeno encimsko aktivnost, pomembno pa vpliva tudi na izboljšano topnost fenolnih spojin na eni strani in razpad termolabilnih spojin na drugi. K antioksidativnim lastnostim slada prispevajo tudi produkti Maillardove reakcije, ki nastanejo med sušenjem (Carvalho in sod., 2016). V literaturi objavljene vrednosti za hidroksicimetne kisline v sladu zelo odstopajo in segajo okvirno od 10 do 15 µg/g suhe snovi (SS)

za celokupne pa vse do 100 - 300 $\mu\text{g/g}$ SS za *p*-kumarno kislino oz. 400 - 600 $\mu\text{g/g}$ SS za ferulno kislino v primeru individualne obravnave spojin. Cai in sod. (2015) so v skladu določili skoraj dvakrat večjo količino ferulne kisline (4,07 $\mu\text{g/g}$) kot v izhodnem ječmenu (2,15 $\mu\text{g/g}$), medtem ko se je vsebnost *p*-kumarne kisline med pripravo slada povečala zgolj za tretjino (iz 1,10 $\mu\text{g/g}$ na 1,44 $\mu\text{g/g}$). Kljub enakim pogojem namakanja, kaljenja in sušenja pri vseh vzorcih, je proces slajenja različno vplival na vsebnost ferulne in *p*-kumarne kisline pri različnih genotipih. O dvo- do pet-kratnem prirastu ferulne kisline med zaslajevanjem ječmena poroča tudi Lentz (2018). Nedavna raziskava, kjer so spremljali vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno aktivnost različnih vrst ječmena (Koren in sod., 2019), je med namakanjem in kaljenjem potrdila podoben trend v obnašanju ozimnih in jarih sort, različno pa so se med pripravo slada preizkušeni kultivarji odzvali na proces sušenja. Količina fenolnih spojin, ki izvira iz slada je lahko nadalje odvisna tudi od abiotских dejavnikov. Mikkelsen in sod., (2015) navajajo, da povišana temperatura in nivo ozona v ozračju znatno vplivata na akumulacijo sekundarnih metabolitov, ki omogočajo prilagoditve ječmena na rast v neugodnih pogojih. K vsebnosti skupnih fenolnih spojin, ki izvirajo iz ječmena in so jih uspešno identificirali v pripadajočem sladu, pomembneje doprinesejo še: galna, protokatehujska, kavna, siringinska, vanilinska, sinapinska in klorogenska kislina, *p*-hidroksifenilocetna kislina, umbeliferon, skopoletin, eskulin, kvercetin, katehin, epikatehin, prodelfinidin in rutin (Carvalho in sod. 2016).

Na drugi strani Carvalho in sod., (2016) ugotavljajo, da proces slajenja znatno zmanjša vsebnost katehina, prodelfinidina B₃, in procianidina B₃, medtem ko se ferulna kislina precej bolj uspešno zoperstavlja negativnim vplivom in je tako tudi v ječmenovem sladu še vedno najbolj zastopana fenolna spojina. Raziskava na 10 kultivarjih ječmena (Dvořáková in sod., 2008) je dala pomembne izsledke, kaj se med zaslajevanjem dogaja z različnimi oblikami fenolnih spojin. Avtorji so poročali o znatnem upadu celokupne vezane frakcije ter istočasno o povečanju topnih estrov prav pri vseh kultivarjih, medtem ko je bil vpliv na celokupno prosto frakcijo pogojen z vrsto ječmena. Vpliv zaslajevanja na posamezno fenolno spojino je bil odvisen od kultivarja, oz. različen za različne spojine istega kultivarja. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v primeru ferulne kisline, kot količinsko najpomembnejše fenolne spojine. Kot zanimivost povejmo, da so pri vseh analiziranih vzorcih določili porast topnih estrov, kar so pripisali interakcijam ferulne kisline z molekulami arabinoze in krajšimi oligoarabinoksilani; ti so bili v tej obliki lažje ekstraktibilni kot ferulna kislina vezana na dolge arabinoksilane. K tej transformaciji naj bi pripomoglo tako kaljenje kot začetna faza sušenja (Carvalho in sod., 2016). Potrebno je torej upoštevati, da je uspešnost ekstrakcije hidroksicimetnih kislin iz slada in njihova kasnejša pretvorba v prosto obliko v veliki meri odvisna od pogojev za delovanje encimov, ki so sposobni razgraditi arabinoksilane v ječmenu. Mednje uvrščamo β -endoksilanaze, α -arabinofuranozidaze ter β -ksilozidaze, ki krajšajo dolge verige arabinoksilanov v

krajše oligosaharide oz. omogočajo cepitev stranskih verig (Sungurtas in sod., 2004). Ključen encim, odgovoren za transformacijo zaestrene ferulne oz. *p*-kumarne kisline v prosto obliko, pa je feruloil esteraza, imenovan tudi cinamoil esteraza. Na delovanje dotičnih encimov precej negativno vpliva uporaba strožjega temperaturnega režima med pripravo slada. Ker so aktivnost omenjenih encimov zaznali tako v nativnem ječmenu kot ječmenovem sladu (Ramos-de-la-Peña in Contreras-Esquivel, 2016), je potrebno kontrolirati tako proces slajenja kot tudi kasneje drozganja. Zaustavljeno delovanje encimov je posredno odgovorno za manjšo sprostitvev vezanih fenolov iz celičnih sten, torej njihovo dostopnost, ki kasneje težje preidejo v vodno fazo. Visoke temperature učinkujejo tudi neposredno - nemalokrat inducirajo razpad termolabilnih fenolnih spojin oz. vodijo v njihovo polimerizacijo (Carvalho in sod., 2016). Negativen vpliv sušenja na vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v kaljenih zrnih smo zabeležili tudi sami pri pripravi ajdovega slada, kjer so bili temperaturni pogoji relativno mili (Terpinc in sod., 2016).

2.2 Hmelj

Vse sorte hmelja vsebujejo kompleksno in do določene mere tudi raznoliko ter geografsko specifično mešanico fenolnih spojin. Fenolne spojine, ki izvirajo iz hmelja, pomembno vplivajo na fizikalno stabilnost piva in v določenih primerih tudi znatno definirajo okus piva, tako da prispevajo k trpkosti, grenčici in polnosti piva (Roberts in Wilson, 2006; Oladokun in sod., 2016). Fenolne spojine predstavljajo 3 – 6 % suhe mase hmeljnih storžkov. Razdelimo jih lahko v 4 večje skupine: flavonoli, flavan-3-oli, fenolne kisline in ostale fenolne spojine (fenilflavonoidi, stilbenoidi itd.) (Karabín in sod., 2016). Večina fenolnih spojin se nahaja v cvetnih listih in vretencu hmeljnega storžka. Z izjemo fenilflavonoidov, fenolnih spojin v lupulinskih žlezah ni veliko. Posledično pivovarji, ki uporabljajo aromatične vrste hmelja z majhno vsebnostjo α -kislin vnesejo v vrelo sladico več fenolnih spojin kot pivovarji, ki se poslužujejo kultivarjev z visoko vsebnostjo α -kislin. Izbira hmeljnih briketov z izrazitejšo grenčico bo tako zmanjšala doprinos fenolnih spojin iz hmelja, uporaba CO₂ ekstraktov pa ga bo praktično povsem eliminirala (Roberts in Wilson, 2006). Predstavimo nekaj najpomembnejših predstavnikov fenolnih spojin, ki jih vsebuje hmelj. Kvercetin, kamferol, miricetin so najbolj zastopani flavonoli, ki se pretežno nahajajo kot glikozidi; sladkorna komponenta najpogostejše sestoji iz D-glukoze in L-ramnoze. Flavan-3-oli kot so katehin, epikatehin in galokatehin so v hmelju relativno dobro zastopani fenolni monomeri, ki se lahko povezujejo v di-, tri- ali oligomere (do 20 enot, poznani so kot proantocianidini ali kondenzirani tanini). Med najbolj zastopanimi fenolnimi kislinami omenimo galno, protokatehujsko, *p*-hidroksibenzojsko, vanilinsko, *p*-kumarno, kavno, ferulno in sinapinsko kislino. Fenilflavonoidi so na račun močno izražene biološke aktivnosti in pozitivnega učinka na zdravje brez dvoma najbolj zanimiva skupina fenolnih spojin, še posebej ksantohumol, izoksantohumol,

desmetilksantohumul ter 6- in 8-prenil naringenin (Karabín in sod., 2016). Količina fenolnih spojin, ki izvira iz hmelja je odvisna od sorte, oblike (storžki, briketi, ekstrakt) in trenutka, ko hmelj dodamo v pivino. Nekateri se namreč poslužujejo tudi hladnega hmeljenja med fermentacijo in zorenjem piva. Ne glede na stopnjo hmeljenja, hmelj praviloma ne predstavlja glavnine fenolnih spojin v končnem izdelku (Aron in Shellhammer, 2010; Wannenmacher in sod., 2018).

3 FENOLNE SPOJINE MED PROIZVODNJO PIVA

V običajnem pivu, kjer se kot škrobno surovino uporablja zgolj ječmenov slad, se nahaja okvirno 150 – 350 mg/L fenolnih spojin (Boulton, 2013). Med varjenjem piva so nastale spremembe v strukturi fenolnih spojin posledica ekstrakcije, delovanja encimov, kemijskih reakcij izzvanih s toploto, obarjanja v obliki vroče in hladne usedline ali adsorbcije na površini kvasnih celic ali stabilizatorjev (Wannenmacher in sod., 2018). Obseg sprememb zavisi tako od izhodnih surovin kot od vsakega posameznega koraka, ki vodi do končnega proizvoda (Boulton, 2013).

V splošnem velja, da drozganje pozitivno zaznamuje količino fenolnih spojin, saj so razmere med to fazo ugodne za delovanje encimov, ki pripomorejo k sprostitvi vezanih fenolnih spojin (Zhao, 2015). Z namenom povečane sprostitve antioksidantov iz slada Koren in sod. (2019) predlagajo dolgotrajnejše zadrževanje drozge pri temperaturi 45 ali 52 °C. Dobro razgrajen slad med drozganjem daje več fenolnih spojin, kar lahko pojasnimo s tem, da je v sladu sestava matriksa v katerega so vpete fenolne kisline manj kompleksna kot v izhodnem ječmenu (Carvalho in sod., 2016), manj pa je tudi proteinov, ki bi bili na voljo za vezavo fenolnih spojin (Boulton, 2013), ekstrakcija slednjih v drozgo je torej na ta način olajšana.

Med drozganjem se topne hidroksibenzojske kisline iz slada ekstrahirajo s pomočjo vode, medtem ko je za prenos neekstraktibilne frakcije nujno predhodno delovanje feruloil esteraze. Vendar se je izkazalo, da na nivo hlapnih fenolov v pivu (ki so posledica encimske dekarboksilacije ferulne kisline) ne vpliva zgolj aktivnost sladnih esteraz, temveč tudi količina estrsko vezane ferulne kisline, ki je na začetku prisotna v sladici (Vanbeneden in sod., 2007). Avtorji omenjene raziskave so pokazali, da se med drozganjem prenese v pripadajočo sladico le manjši del hidroksicimetnih kislin oz. da jih večinski delež ostane v trdnem preostanku zrn. Do podobnih zaključkov je prišel tudi Szwajgier (2009), ki je spremljal koncentracijo ferulne, vanilinske, *p*-kumarne kisline in *p*-hidroksibenzojske kisline. Pri pripravi dveh različnih sladici so resda zabeležili relativno visok delež ferulne kisline, ki je v začetni fazi drozganja (52 °C) uspešno prešla v tekočo fazo, medtem ko je bil nivo ostalih treh kislin v sladici praktično zanemarljiv. Omenjene spojine so določali še v kasnejših fazah drozganja. Po zaključeni pavzi pri 63 in 72 °C, so

med sladicama zabeležili različen trend za posamezno fenolno kislino kot tudi znotraj enake sladice za različne fenolne kisline, koncentracija nekaterih je ob koncu drozganja celo znatno preseгла vrednost določeno v izhodnem sladcu. Vanbeneden in sod. (2008b) poročajo, da lahko na količino fenolnih spojin, ki se izlužijo v drozgo pozitivno vplivamo z ustreznim temperaturnim režimom in povišanim pH drozge. Kot optimalno T predlagajo 40 °C in pH 5,8. V svoji raziskavi so ugotovili, da ima na aktivnost dotičnih encimov in posledično na vsebnost proste ferulne in *p*-kumarne kisline v sladici poleg temperature in pH drozge, velik vpliv tudi dodatek surogatov, velikost delcev zmletega slada, gostota drozge in režim mešanja. Navajajo, da lahko z izboljšano encimsko hidrolizo ferulne kisline iz vezane oblike znatno povečamo aromatični potencial drozge. Poudarjajo, da lahko z zadostnim sproščanjem fenolnih aromatičnih prekurzorjev v sladico precej vplivamo na končni nivo hlapnih fenolnih spojin v pivu in izbor ustreznega seva kvasovk ni nujno najpomembnejši dejavnik pri tem procesu. Po drugi strani pa je toplotna dekarboksilacija ferulne kisline v 4-vinilgvajakol, ki je značilna predvsem za temnejše, karamelne in pražene slade, odgovorna, da v pripadajočih sladica določimo nižjo vsebnost prekurzorja, tj. ferulne kisline (Lentz, 2018). V skladu z manj učinkovito ekstrakcijo fenolnih spojin med drozganjem Ikram in sod. (2017) pišejo o filtrni pogači kot o neizkoriščenem viru bioaktivnih spojin, tudi fenolnih spojin, izpostavljajo antioksidativno, antikancerogeno, antiaterogeno in protivnetno funkcijo, ki jo imajo slednje v človeškem telesu in razpredajo o možnih aplikacijah tega stranskega produkta drugod v živilski industriji. V svojem delu predstavijo nove pristope, kako povečati izplen fenolnih spojin iz filtrne pogače, kar bi lahko izkoristili tudi pri proizvodnji piva.

Pascoe in sod. (2003) so spremljali vsebnost nekaterih pomembnejših fenolnih spojin v posameznih fazah varjenja piva, za katerega so uporabili 72 % svetlega slada, 11 % karamelnega slada in ekstrakt hmelja (pridobljen s superkritičnim CO₂). Vzorčenje je potekalo ob zaključku posamezne faze: drozganje, precejanje, hmeljenje, kuhanje sladice, sedimentacija, fermentacija (18 °C, 6 dni), topla pavza (3 dni pri 13 °C in 1 dan pri 3 °C), zorenje (23 dni pri 0 °C), filtracija, karbonizacija, stekleničenje, pasterizacija in staranje (skladiščenje 6 in 10 tednov pri 19 °C). Prisotnost kavne in sinapinske kisline je bila pod mejo detekcije, medtem ko so katehin, ferulno, vanilinsko, klorogensko in *p*-kumarno kislino identificirali v vseh vzorcih. Ob zaključku drozganja se je med slednjimi najbolj povečal nivo klorogenske kisline (2000 %), najmanj pa katehina (625 %). Precejanje drozge je v primerjavi z drozganjem vodilo v znaten porast vsebnosti vseh naštetih spojin (katehin 54 %, ferulna 42 %, vanilinska 52 %, klorogenska 100 % in *p*-kumarna kislina 90 %), medtem ko dodatek hmelja ni doprinesel k nadaljnjim spremembam. Avtorji dotične raziskave (Pascoe in sod., 2003) so predpostavili, da pride med precejenjem pri temperaturi 75 - 80 °C do ekstrakcije fenolnih spojin iz filtrne pogače, ki jo tvori pleva in preostanek zrna. Svojevrstno

vlogo so pripisali tudi katehinom, ki naj bi med precejanjem razpadli v pripadajoče monomerne oblike in tako postali bolj topni. Da je zadostno izpiranje filtrne pogače z nalivnimi vodami ključno za ekstrakcijo bioaktivnih komponent, so v svoji raziskavi poudarili tudi Koren in sod. (2019). Pascoe in sod. (2003) so v nadaljevanju svoje študije pojasnili, da proces hmeljenja po pričakovanjih ni vplival na vsebnost fenolnih spojin v sladici, saj ekstrakt ni bil bogat s fenolnimi spojinami. Tudi Leitao in sod. (2011) navajajo, da je uporaba hmeljnega ekstrakta precej razširjena med pivovarji. Nizko vsebnost fenolnih spojin v tovrstnih pripravkih pripisujejo dejstvu, da so fenolne spojine polarne in se kot take slabo ekstrahirajo z nepolarnim CO₂. Medtem pa dodatek hmelja v neekstraktni obliki lahko pozitivno zaznamuje vsebnost skupnih fenolnih spojin v sladici (Koren in sod., 2019), vendar Kühbeck in sod. (2006) opozarjajo, da se jih del tudi obori in izgubi z vročo usedlino. Pascoe in sod. (2003) v nadaljevanju svoje študije poročajo, da je kuhanje sladice vodilo v 86 % porast *p*-kumarne kisline, medtem ko ni vplivalo na vsebnost nobenega od ostalih obravnavanih spojin. Sedimentacija je povzročila upad katehina (36 %), nivo ostalih fenolnih spojin je ostal nespremenjen. Slednje so skušali razložiti z obarjanjem kompleksov, nastalih med fenolnimi spojinami in proteini ter obarjanjem polimerov fenolnih spojin. Tudi procesi, ki so sledili (razredčitev, fermentacija, topla pavza, zorenje pri nizkih temperaturah) niso značilno vplivali na vsebnost naštetih spojin, z izjemo ferulne kisline, za katero so po zaključeni topli pavzi zabeležili 35 % upad. Nasprotno pa je filtracija negativno zaznamovala vsebnost katehina (77 %), ferulne (53 %) in *p*-kumarne kisline (41 %). S filtracijo so odstranili kvasovke, posredno pa tudi vse spojine, ki so jih bile kvasne celice sposobne adsorbirati na površini celice ali vključiti v svoj metabolizem. Karbonizacija in stekleničenje sta zopet pripomogla k povišani vsebnosti katehina in ferulne kisline (oba 116 %), manj izrazito, a še vedno pozitivno pa tudi na nivo klorogenske (52 %) in *p*-kumarne kisline (60 %). Kot možni vzrok so navedli koloidno motnost, nastalo med zorenjem piva, ki pa naj bi se, z uvajanjem CO₂ pod visokim tlakom in temperaturo podobno sobni, ponovno razpršila, kar naj bi vodilo v vnovično sprostitvev fenolnih spojin (Pascoe in sod., 2003).

Vsebnost posameznih fenolnih spojin v različnih stopnjah varjenja piva je spremljal tudi Szwajgier (2009). Izpostavimo najpomembnejše izsledke njegove raziskave, v kateri je primerjal vzorce dveh svetlih piv. Tako Goolman (11,5 ut. % ekstrakta v osnovni sladici 5,5 vol. % alkohola, grenčica 13–17 BU, barva 8 ± 2 EBC) kot Perla (12,2 ut. % ekstrakta v osnovni sladici 6,2 vol. % alkohola, grenčica 15–19 BU, barva 9 ± 2 EBC) sta bila pripravljena z metodo infuzije, le da je bilo razmerje med sladom in vodo v prvem primeru 150 g:155 g/L, v drugem pa 170 g:180 g/L. Vzorčenje je vključevalo drozgo segreto na 52 °C, 63 °C in 72 °C, sladico po precejanju, kuhano hmeljeno sladico, mlado pivo po glavni fermentaciji ter pivo po zorenju, stabilizaciji, pasterizaciji in embaliranju. Vsebnost skupne ekstraktibilne ferulne kisline je bila najvišja po precejanju (Goolman) oz. pred

precejanjem po zaključeni fazi drozganja pri 72 °C (Perla), čemur je sledil znaten padec po zaključeni glavni fermentaciji, vrednost pa se je do konca procesa (zorenje, filtracija, stabilizacija, pasterizacija in embaliranje) v obeh pivih, ki sta izhajala iz istega slada, še dodatno znižala. Tudi v tej raziskavi dodatek hmelja v vrelo sladico ni bistveno vplival na vsebnost ferulne kisline po hidrolizi, je pa v obeh primerih pozitivno zaznamoval vsebnost kavne in klorogenske kisline ter negativno vsebnost vanilinske in *p*-hidroksibenzojske kisline. Avtor raziskave o morebitnih vzrokih za omenjene spremembe ni razpredal. V podobni raziskavi dve leti kasneje (Szwajgier in Bancarzewska, 2011) so preučevali vpliv kuhanja sladice in sedimentacije na vsebnost fenolnih kislin. Potrdili so, da prosta ferulna kislina v sladici predstavlja zgolj manjšinski delež v primerjavi z vezano, ki je postala dostopna po alkalni hidrolizi. Tako kuhanje sladice (80 min, cca. 100 °C) kot ločevanje usedline od bistre sladice v sedimentacijski posodi ni spremenilo vsebnosti dveh najbolj zastopanih fenolnih spojin, ferulne in *p*-kumarne kisline (niti proste frakcije niti skupno ekstraktibilne frakcije). Z vidika nastanka hlapnih fenolov, ki lahko vodijo v pojav nezaželenih arom, so prednost dali prostim fenolnim kislinam, saj je dekarboksilacija vezanih (v glavnem zaestrenih) spojin manj verjetna. Zaključili so, da kuhanje sladice in sedimentacija praviloma nista vplivala niti na vsebnost proste kavne, protokatehujske, *p*-hidroksibenzojske, sinapinske in siringične kisline. Nasprotno so Vanbeneden in sod. (2008a) pri temperaturah sladice med 90 in 100 °C uspeli določiti linearno povezavo med tvorbo 4-vinilgvajakola in trajanjem toplotne obdelave. Nadalje so fenolne spojine med drozganjem pri višjih temperaturah poleg toplotne dekarboksilacije podvržene tudi oksidaciji, razgradnji, in obarjanju preko tvorbe polimerov ali kompleksov s proteini (Aron in Shellhammer, 2010; Zhao in Zhao, 2012), s čimer lahko prav tako razložimo njihov upad. Med pomembnejšimi encimi izpostavimo polifenol oksidazo, peroksidazo in morda katalazo. Boulton (2013) poroča, da lahko fenolne spojine zaradi interakcij s proteini izgubimo tudi v kasnejših fazah proizvodnje piva v obliki vroče ali hladne usedline in hladne trajne koloidne motnosti.

Različen trend posameznih fenolnih spojin med pretvorbo sladice v pivo je proučevala še ena skupina znanstvenikov (Leitao in sod., 2011). Spremljali so 26 spojin, od tega uspešno identificirali sledeče (po padajočem vrstnem redu v sladici): ferulno kislino, *p*-kumarno kislino, katehin, epikatehin, protokatehujsko kislino, sinapinsko kislino, vanilinsko kislino, kavno kislino, *p*-hidroksibenzojsko kislino, *m*-kumarno kislino. Vzorčenje je vključevalo sladico (režim drozganja: 0-20 min pri 37°C, 20-34 min pri 37-50°C, 34-55 min pri 50°C, 55-59 min pri 50-65 °C, 59-69 min pri 65 °C, 69-82 min pri 65-76°C in 82-92 min pri 76 °C), vrelo sladico brez dodatka hmelja (1h, 100°C), ki je po fermentaciji predstavljala fermentirano sladico ter vrelo hmeljeno sladico z dodanim hmeljnim CO₂ ekstraktom (1h, 100°C), ki je po fermentaciji dala pivo. Koncentracija najbolj zastopane fenolne kisline, tj. ferulne kisline, je bila relativno konstantna, skozi vse faze vzorčenja ni utrpela večjih izgub. Izkazalo se je, da je dodatek hmelja izjemno

vplival na vsebnost *p*-kumarne kisline, manj, a še vedno pozitivno pa na vsebnost protokatehajske kisline in epikatehina. Podobno kot v prejšnji raziskavi, je kuhanje sladice z dodatkom hmelja nekatere spojine zaznamovalo tudi negativno, izpostavimo samo tiste, kjer so bile relativne spremembe očitnejše: *p*-hidroksibenzojsko kislino in *m*-kumarno kislino. Fermentacija je vodila v precejšen prirast *p*-hidroksibenzojske, vanilinske in klorogenske kisline ter bistven padec *p*-kumarne in sinapinske kisline, ne glede na to ali so kvasovke inokulirali v sladico brez dodanega hmelja ali v hmeljeno sladico. Med nastajanjem piva se je spreminjala tudi vsebnost neidentificiranih antioksidativnih spojin, vendar so Leitao in sod. (2011) prirast v vsebnosti fenolnih spojin po fermentaciji bolj kot njihovemu absolutnemu povečanju pripisali boljši topnosti teh spojin v etanolu. Medtem pa Zhao (2015) v svojem pregledu literature poroča o številnih dokazih, da se med zasladiitvijo in drozganjem količina fenolnih spojin praviloma znatno poveča, nato pa med fermentacijo in skladiščenjem prav tako opazno upade. Na sam izplen fenolnih spojin med varjenjem piva lahko nenazadnje vplivamo tudi z opremo, ki jo v ta namen uporabimo. V raziskavi, kjer so pivo varili v laboratoriju in v pilotni pivovarni so se razlike pokazale zlasti v fazi precejanja in kuhanja hmeljene sladice (Koren in sod., 2019). Zato ne preseneča, da obstajajo velike razlike v vsebnosti tako skupnih kot posameznih fenolnih spojin že znotraj iste vrste piva, kaj šele med posameznimi stili piva (Piazzon in sod., 2010; Vanbeneden in sod., 2008a).

4 VLOGA FENOLNIH SPOJIN V PIVU

Med kakovostnimi atributi piva, ki jih potrošnik najprej zazna, so bistra lesketajoča barva in stabilna bogata pena. Takoj za tem, vendar še pomembnejši parameter, je okus piva. Vloga, ki jo imajo fenolne spojine pri naštetih parametrih je dobro poznana (Aron in Shellhammer, 2010; Lentz, 2018; Mikyška in sod., 2002). Fenolne spojine dajejo pivu grenčico, polnost, trpkost (Humia in sod., 2019; Wannenmacher in sod., 2018), za pivovarje pa so še posebej zanimive kot osrednji endogeni antioksidanti, saj imajo ključno vlogo pri upočasnjevanju, omejevanju ali celo preprečevanju oksidacijskih procesov v pivu (Zhao, 2015). Obstajajo študije, ki trdijo, da imajo piva, ki vsebujejo več fenolnih spojin, daljšo življenjsko dobo, stabilnejši okus in aromo ter obstojnejšo peno (Humia in sod., 2019; Jurić in sod., 2015; Mikyška in sod., 2002). O pomenu fenolnih spojin s prehranskega vidika, njihovi sintezi, različnih pojavnih oblikah, ekstrakciji in analizi, metabolizmu in učinku na zdravje je na voljo domača (Terpinc, 2019a, 2019b) in tuja literatura (Gerhäuser in sod., 2002; Pérez-Jiménez in Torres, 2011; Santos-Zea in sod., 2018; Wannenmacher in sod., 2018). Namen aktualnega članka je bil predstaviti pivo, ki je poznano povsod po svetu, kot vir fenolnih spojin. Vrsta in koncentracija fenolnih spojin v pivu je pogojena s stilom piva in povezana s sestavo izhodnih surovin ter samim načinom proizvodnje piva. Humia in sod. (2019) navajajo, da so večji pivovarji nagnjeni k stroškovno učinkovitejši proizvodnji, kar nemalokrat pomeni

tudi cenejšo surovino in uporabo alternativnih virov, surogatov. Na drugi strani kraft pivovarji posegajo predvsem po ječmenu (v manjši meri tudi po pšenici), več poudarka pa namenjajo tudi hmelju, s čimer lahko morda deloma pojasnimo tako večjo raznolikost kot tudi večjo vsebnost posameznih fenolnih spojin. Spet drugi razloge iščejo v filtraciji, večina kraft piv je za razliko od komercialnih, nefiltriranih, zaradi česar ohranijo več ekstrahiranih polifenolov (Marques in sod., 2017). Zanimive izsledke je dala tudi raziskava desetih sadnih piv, kjer so sladici med fermentacijo dodali sadje. V večini sadnih piv je bila antioksidativna aktivnost, vsebnost fenolnih kislin in flavonoidov znatno večja kot pri običajnih pivih brez sadja. Višnjevo pivo je imelo najvišje vrednosti, sledilo je grozdno, slivovo in pomarančno pivo. V vseh pregledanih sadnih pivih so zaznali povečanje vsebnosti katehina in kvercetina, klorogenske, neoklorogenske, *p*-kumarne in kavne kisline glede na običajna piva. Nardini in Garaguso (2020) sta na podlagi dobljenih rezultatov zaključila, da je dodajanje sadja med fermentacijo znatno povečalo antioksidativno aktivnost piva in kakovostno ter količinsko izboljšalo njegov fenolni profil. Pred leti so se tudi Piazzon in sod. (2010) ukvarjali z analizo različnih zvrsti piv. Poročajo, da ferulna kislina nekajkrat preseže koncentracije vseh ostalih fenolnih kislin prav v vseh pivih, sledijo ji sinapinska, vanilinska, kavna, *p*-kumarna in 4-hidroksifenil očetna kislina. Avtorji omenjene raziskave ugotavljajo, da so ferulna, kavna, siringinska, sinapinska in, v manjši meri, vanilinska kislina prisotne v glavnem v vezani obliki, medtem ko so vanilinsko in 4-hidroksifenil očetno kislino določili v približno enakovrednih deležih v prosti in vezani obliki. Seštevek celokupnih posameznih fenolnih spojin je razkril, da so bila med analiziranimi pivi s fenolnimi kislinami najbolj osiromašena brezalkoholna piva, med pšeničnimi pivi, pilsnerji in lagerji, ki so sledili v nadaljevanju, ni bilo bistvenih razlik, piva ale, abbey in bock pa so spet vsebovala več fenolnih spojin. Za večjo verodostojnost rezultatov omenimo, da so za vsak tip piva analizirali 5 različnih znamk in da so bila piva proizvedena v različnih evropskih državah. Na koncu pa omenimo še nedavne ugotovitve Cheiran in sod. (2019). V študijo so vključili piva treh različnih stilov (india pale ale, lager, pšenično) iz treh različnih pivovarn in v skupno 81 analiziranih vzorcih določili 57 fenolnih spojin. Med njimi so v pivu sploh prvič določili nekatere benzojske kisline (2,4-dihidroksibenzojsko kislino, 2,3-dihidroksibenzojsko kislino, dimetoksibenzojsko kislino), konjugate fenolnih kislin (3-*p*-kumaroilkinsko kislino in 4-*p*-kumaroilkinsko kislino, 3-feruloilkinsko kislino, 4-feruloilkinsko kislino, 5-feruloilkinsko kislino) in flavonoide (taksifolin heksozid, kvercetin diheksozid, apigenin-6,8-dipentoizid in izofraksidin heksozid). V isti raziskavi so predstavili tudi spojine, ki bi lahko omogočale razlikovanje med posameznimi stili. S fenolnimi spojinami, ki najbolj pripomorejo k oksidativni stabilnosti piva so se ukvarjali še v eni pomembni raziskavi (Spreng in Hofmann, 2018); tudi v okviru te so v pivu identificirali številne spojine, nekatere prav tako prvič. Zaključili so, da med vsemi spojinami v pivu izražajo največjo antioksidativno aktivnost relativno nepoznani hortadini A, B in C, saponarin ter kvercetin 3-*O*-malonil glukozid. Nenazadnje izpostavimo še izsledke

raziskave (Raquel in sod., 2013), ki poroča, da je antioksidativen potencial nekaterih piv ne samo primerljiv, temveč celo boljši od prenekaterih vin in gaziranih pijač. Vsekakor, toksične vloge alkohola ob tem ne smemo podcenjevati.

5 ZAKLJUČEK

Številne študije zadnjih let se osredotočajo na spremljanje fenolnih spojin od izhodnih surovin do piva, vendar številne neznanke dajejo temu področju še veliko prostora za nadaljnje raziskave. Varjenje kvalitetnega piva je izjemno zahteven proces. Vsebnost fenolnih spojin v končnem izdelku je odvisna tako od genetskih dejavnikov kot od samih pogojev rasti ječmena in hmelja. Pri pripravi slada kot tudi kasneje v vsaki posamezni stopnji varjenja piva lahko s številnimi parametri, ki jih določa recept ali tehnologija, optimiziramo pogoje, ki vodijo v sprostitve fenolnih spojin iz vezanih oblik in na čim večjo koncentracijo celokupnih fenolnih antioksidantov v končnem proizvodu. Študije, vključene v tokratni pregled literature nedvomno kažejo na raznolik in izjemno kompleksen vpliv različnih dejavnikov na vsebnost fenolnih spojin med proizvodnjo piva. Slednje velja tako za različne stile piva kot tudi za isti stil različnih proizvajalcev. Cilj v prihodnosti naj bo tako poiskati kompromis med tehnološko in prehransko kakovostjo piva, saj slednja tudi na račun prisotnih fenolnih spojin vsekakor ni zanemarljiva.

6 VIRI

- Aron P. M., Shellhammer T. H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2010; 116(4), 369-380.
- Boulton C. *Encyclopaedia of Brewing*. Wiley. 2013; 720 str.
- Cai S., Han Z., Huang Y., Chen Z.-H., Zhang G., Dai F. Genetic Diversity of Individual Phenolic Acids in Barley and Their Correlation with Barley Malt Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(31), 7051-7057.
- Carvalho D. O., Gonçalves L. M., Guido L. F. Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(5), 927-943.
- Cheiran K. P., Raimundo V. P., Manfroí V., Anzanello M. J., Kahmann A., Rodrigues E., Frazzon J. Simultaneous Identification of Low-Molecular Weight Phenolic and Nitrogen Compounds in Craft Beers by Hplc-Esi-MS/MS. *Food Chemistry*. 2019; 286, 113-122.
- de Gaetano G., Costanzo S., Di Castelnuovo A., Badimon L., Bejko D., Alkerwi A., Chiva-Blanch G., Estruch R., La Vecchia C., Panico S., Pounis G., Sofi F., Stranges S., Trevisan M., Ursini F., Cerletti C., Donati M. B., Iacoviello L. Effects of Moderate Beer Consumption on Health and Disease: A Consensus Document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016; 26(6), 443-467.
- Dvořáková M., Guido L. F., Dostálek P., Skulilová Z., Moreira M. M., Barros A. A. Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic

- Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008; 114(1), 27-33.
- Fogarasi A.-L., Kun S., Tankó G., Stefanovits-Bányai É., Hegyesné-Vecseri B. A Comparative Assessment of Antioxidant Properties, Total Phenolic Content of Einkorn, Wheat, Barley and Their Malts. *Food Chemistry*. 2015; 167, 1-6.
- Gerhäuser C., Alt A. P., Klimo K., Knauf J., Frank N., Becker H. Isolation and Potential Cancer Chemopreventive Activities of Phenolic Compounds of Beer. *Phytochemistry Reviews*. 2002; 1(3), 369-377.
- Holtekjølén A. K., Kinitz C., Knutsen S. H. Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(6), 2253-2260.
- Humia B. V., Santos K. S., Barbosa A. M., Sawata M., Mendonça M. d. C., Padilha F. F. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*. 2019; 24(8), 1568.
- Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J., Yin M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*. 2017; 82(10), 2232-2242.
- Jurić A., Ćorić N., Odak A., Herceg Z., Tišma M. Analysis of Total Polyphenols, Bitterness and Haze in Pale and Dark Lager Beers Produced under Different Mashing and Boiling Conditions. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015; 121(4), 541-547.
- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016; 15(3), 542-567.
- Koren D., Kun S., Hegyesné Vecseri B., Kun-Farkas G. Study of Antioxidant Activity During the Malting and Brewing Process. *Journal of Food Science and Technology*. 2019; 56(8), 3801-3809.
- Kühbeck F., Schütz M., Thiele F., Krottenthaler M., Back W. Influence of Lauter Turbidity and Hot Trub on Wort Composition, Fermentation, and Beer Quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2006; 64(1), 16-28.
- Langos D., Granvogl M. Studies on the Simultaneous Formation of Aroma-Active and Toxicologically Relevant Vinyl Aromatics from Free Phenolic Acids During Wheat Beer Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 64(11), 2325-2332.
- Leitao C., Marchioni E., Bergaentzlé M., Zhao M., Didierjean L., Taidi B., Ennahar S. Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(4), 1249-1255.
- Lentz M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*. 2018; 4(1), 20.
- Maillard M.-N., Berset C. Evolution of Antioxidant Activity During Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43(7), 1789-1793.
- Mark R., Lyu X., Lee J. J. L., Parra-Saldívar R., Chen W. N. Sustainable Production of Natural Phenolics for Functional Food Applications. *Journal of Functional Foods*. 2019; 57, 233-254.
- Marques D. R., Cassis, Quelhas J. O. F., Bertozzi J. C., Visentainer J. V., Oliveira C. C., Monteiro A. R. G. Characterization of Craft Beers and Their Bioactive Compounds. *Chemical Engineering Transactions*. 2017; 57, 1747-1752.

- Mikkelsen B. L., Olsen C. E., Lyngkjær M. F. Accumulation of Secondary Metabolites in Healthy and Diseased Barley, Grown under Future Climate Levels of CO₂, Ozone and Temperature. *Phytochemistry*. 2015; 118, 162-173.
- Mikyška A., Hrabák M., Hašková D., Šrogl J. The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 2002; 108(1), 78-85.
- Nardini M., Garaguso I. Characterization of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Fruit Beers. *Food Chemistry*. 2020; 305, 125437.
- Oladokun O., Tarrega A., James S., Smart K., Hort J., Cook D. The Impact of Hop Bitter Acid and Polyphenol Profiles on the Perceived Bitterness of Beer. *Food Chemistry*. 2016; 205, 212-220.
- Oliveira D. M., Mota T. R., Oliva B., Segato F., Marchiosi R., Ferrarese-Filho O., Faulds C. B., dos Santos W. D. Feruloyl Esterases: Biocatalysts to Overcome Biomass Recalcitrance and for the Production of Bioactive Compounds. *Bioresource Technology*. 2019; 278, 408-423.
- Palmer G. H. Barley and Malt. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 139-160.
- Pascoe H. M., Ames J. M., Chandra S. Critical Stages of the Brewing Process for Changes in Antioxidant Activity and Levels of Phenolic Compounds in Ale. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2003; 61(4), 203-209.
- Pérez-Jiménez J., Torres J. L. Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(24), 12713-12724.
- Piazzon A., Forte M., Nardini M. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(19), 10677-10683.
- Ramos-de-la-Peña A. M., Contreras-Esquivel J. C. Methods and Substrates for Feruloyl Esterase Activity Detection, a Review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016; 130, 74-87.
- Raquel B. Q., Paula A. R. T., Sales M. G. F. Assessing and Comparing the Total Antioxidant Capacity of Commercial Beverages: Application to Beers, Wines, Waters and Soft Drinks Using Trap, Teac and Frap Methods. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2013; 16(1), 22-31.
- Roberts T. R., Wilson J. H. Hops. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 177-280.
- Santos-Zea L., Vilella-Castrejón J., Gutiérrez-Uribe J.A. Bound Phenolics in Foods. V: Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. Mérillon J. M., Ramawat K. (ur.). Springer International Publishing. 2018; 974 – 988.
- Spreng S., Hofmann T. Activity-Guided Identification of in Vitro Antioxidants in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018; 66(3), 720-731.
- Sungurtas J., Swanston J. S., Davies H. V., McDougall G. J. Xylan-Degrading Enzymes and Arabinoxylan Solubilisation in Barley Cultivars of Differing Malting Quality. *Journal of Cereal Science*. 2004; 39(2), 273-281.
- Szwajgier D. Content of Individual Phenolic Acids in Worts and Beers and Their Possible Contribution to the Antiradical Activity of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2009; 115(3), 243-252.

- Szwajgier D., Bancarzewska M. Changes in the Phenolic Acid Content During Wort Boiling and Whirlpool. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2011; 10(1), 19-33.
- Taylor D. G. Water. V: Handbook of Brewing, Second Edition. Priest F. G., Stewart G. G. (ur.). CRC Press. 2006; 91-138.
- Terpinc P. Bound Phenolic Compounds of Whole Cereal Grains as a Functional Food Component: Part Two. *Acta Agriculturae Slovenica* 2019a; 114(2), 13.
- Terpinc P. Bound Phenolic Compounds of Whole Cereals Grain as a Functional Food Component: Part One. *Acta Agriculturae Slovenica* 2019b; 114(2), 10.
- Terpinc P., Cigić B., Polak T., Hribar J., Požrl T. LC-MS Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Buckwheat at Different Stages of Malting. *Food Chemistry*. 2016; 210, 9-17.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Variability in the Release of Free and Bound Hydroxycinnamic Acids from Diverse Malted Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Cultivars During Wort Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(26), 11002-11010.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Formation of 4-Vinyl and 4-Ethyl Derivatives from Hydroxycinnamic Acids: Occurrence of Volatile Phenolic Flavour Compounds in Beer and Distribution of Pad1-Activity among Brewing Yeasts. *Food Chemistry*. 2008a; 107(1), 221-230.
- Vanbeneden N., Van Roey T., Willems F., Delvaux F., Delvaux F. R. Release of Phenolic Flavour Precursors During Wort Production: Influence of Process Parameters and Grist Composition on Ferulic Acid Release During Brewing. *Food Chemistry*. 2008b; 111(1), 83-91.
- Wannenmacher J., Gastl M., Becker T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018; 17(4), 953-988.
- Zhao H. Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer. V: Processing and Impact on Active Components in Food. V. Preedy (ur.). Academic Press. 2015; 533-539.
- Zhao H., Zhao M. Effects of Mashing on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Malts and Worts. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012; 47(2), 240-247