APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY IN BREWING SCIENCE

IZTOK JOŽE KOŠIR, MATJAŽ DEŽELAK, MIHA OCVIRK

INŠTITUT ZA HMELJARSTVO IN PIVOVARSTVO SLOVENIJE

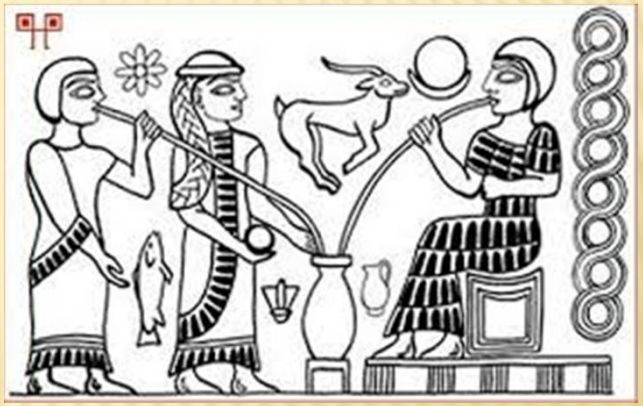
MassTwin 2018, April 2018

OUTLINE

- Introduction
  - Beer
  - Beer aroma
  - Gluten-free beer-like beverages
  - Raw materials origin (hops)
- Methodology
  - Analytical techniques
  - Chemometrics
- Results
- Conclusions

INTRODUCTION - BEER

- Beer is traditional beverage
- More than 7000 years old (served as a food and payment method)
- It‘s a beverage of choice – one of the bestloved foodstufes of a mankind
- Third most consumed drink overall after water and tea
- Water, barley and hop (yeast)
  (1516 Reinheitsgebot)



Introduction – Beer aroma

- Volatile and non volatile compounds originating from raw materails – hop, barley
- Also byproducts of fermentation – esters, higher alcohols and phenols - major part of beer aroma
- Hop – key role for beer aroma
  - alpha-acids – beer bitternes
  - composition of essential oils – - beer aroma

- Before leaving brewery - sensory evaluation of beer samples with panel consisted of experts
- Marks for assessed impression from 1 (not acceptable) to 5 (acceptable)
- Acceptability is in connection with the detection of any off flavors or aroma inbalance.
- Influence of human factor and subjectivity

- **Solution = objective chemical analysis of beer aroma**
- Data bank for constructing a model able to classify samples according to their characteristic

Introduction - Gluten-free beer-like beverages

Celiac disease

- + estimated worldwide **prevalence**: 1% of the general population
- + **treatment**: a strict gluten-free diet

SOLUTION:

- + Production of beer-like beverages from gluten-free sources like buckwheat, quinoa or millet

PROBLEM:

- × Quality of taste and aroma

Introduction - Raw materials origin - hops

Hop is a key raw material for beer aroma.

Amount of bitter substances, quantity and composition of essential oils depends on pedoclimatic conditions

+ GEOGRAPHICAL ORIGIN

HOW CAN WE ASSESS AROMA QUALITY? WHICH BEER IS MORE APPROPRIATE?

HOW CAN WE ASSESS AROMA QUALITY?

SENZORIAL

- VISUALY
- TASTE
- ODOUR
- OVERALL IMPRESSION

CHEMICAL

- GC - FID
- GC - MS
- STATISTICS

SUBJECTIVE

OBJECTIVE

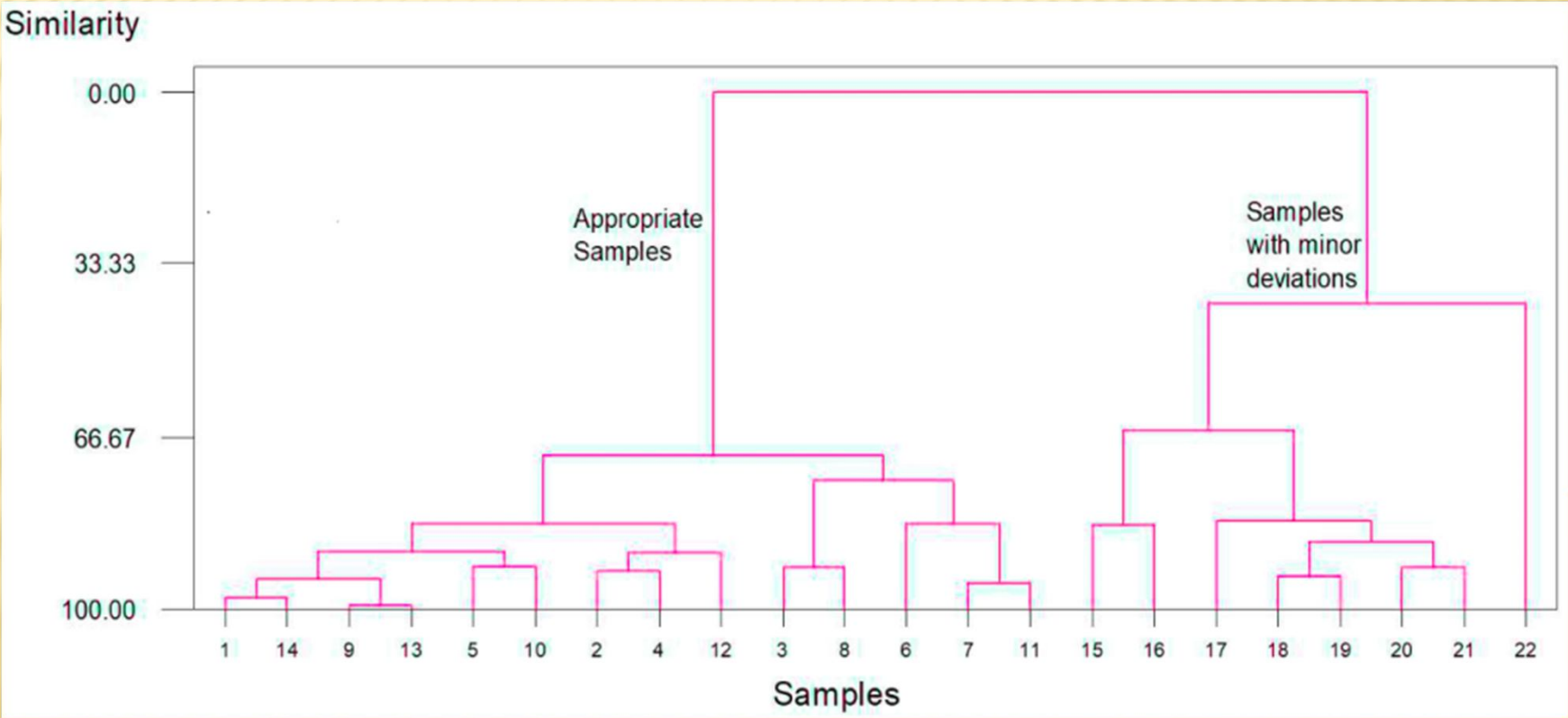
SENSORIAL ASSESMENT

22 different batches of the same beer type

Sensorial assesment by the panel of 6 - 7 members

Marks from 5 – 1

Cut-off point at average 3.5



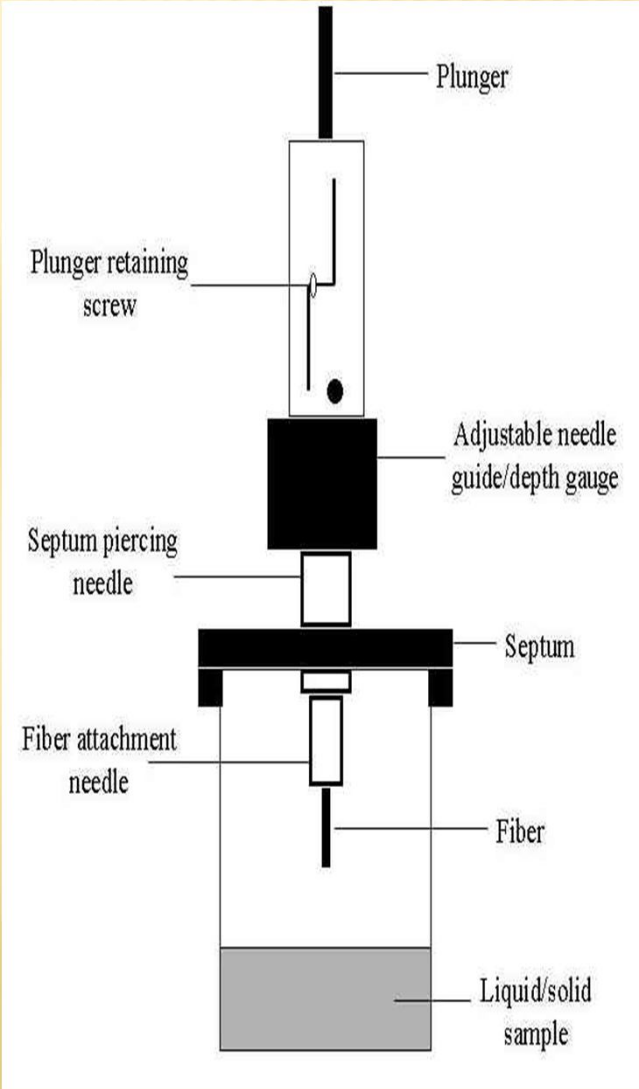
CHEMICAL ASSESMENT

Analytical chemical techniques

- Hop essential oils components in beer (GC-FID) – 15 components. (quantitatively)

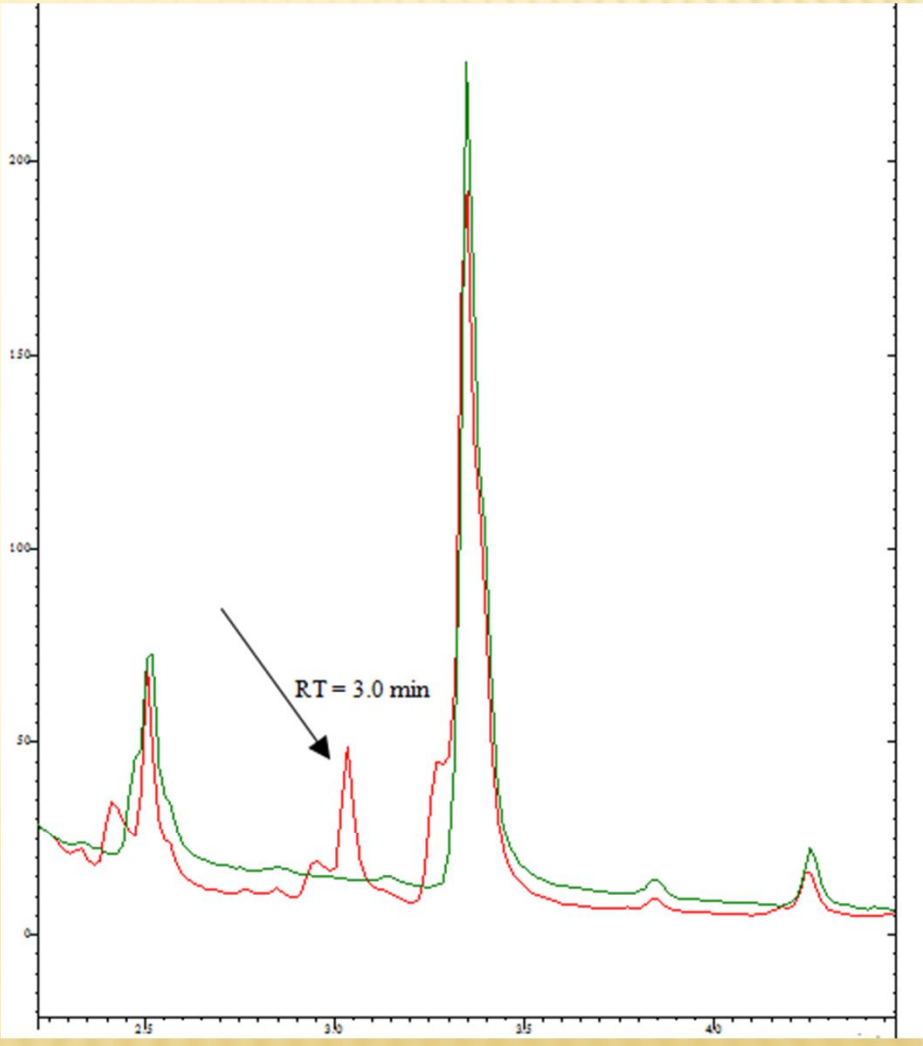
- Higher esters and alcohols (GC-FID) – - 9 components (quantitatively)

- Analysis of volatile aroma profile (HS-SPME GC/MS) - 33 volatiles
- without sample pretreatment
- analyses were performed under the semiquantitative conditions.



CHEMICAL ASSESMENT

- GC/MS chromatograms of samples
- Used as fingerprints
- Identity of all compounds is not confirmed
- Noticable differences between samples
- Peak areas used as input parameters in statistics



Ocvirk M., Kočar Mlinarič N., Košir I. J. 2018b. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by GC and GC/MS. *J.Sci.FoodAgric.*, DOI: 10.1002/jsfa.8840

WHAT WE GET?

A lot of data that seems to be completely confused

PROBLEM ???

SAMPLE	VARIATY	30	33	34	40	51	56	66	69	71	77
3996/02	1	59,789	0,153	1,719	0,675	0,975	0,568	0,204	0,073	0,368	0,159
3997/02	1	53,779	0,21	0,959	0,475	1,175	0,826	0,26	0,068	0,374	0,237
3998/02	1	49,511	0,121	0,914	0,391	1,086	0,569	0,221	0,082	0,329	0,21
3999/02	1	54,747	0,165	1,411	0,607	0,96	0,687	0,221	0,067	0,408	0,229
4000/02	1	49,144	0,108	0,732	0,444	1,068	0,516	0,199	0,064	0,28	0,2
4001/02	1	34,413	0,079	0,356	0,272	0,908	0,422	0,257	0,068	0,231	0,352
1863/03	1	42,267	0,139	0,536	0,192	0,705	0,195	0,436	0,053	0,138	0,182
1864/03	1	34,644	0,124	0,428	0,167	0,483	0,129	0,543	0,039	0,094	0,216
1949/03	1	54,245	0,098	0,421	0,41	0,843	0,397	0,268	0,055	0,262	0,18
2293/03	1	42,684	0,169	0,569	0,205	0,709	0,226	0,415	0,042	0,156	0,235
2294/03	1	35,6	0,102	0,423	0,121	0,692	0,159	0,459	0,047	0,104	0,21
2296/03	1	45,797	0,196	0,581	0,302	0,948	0,289	0,397	0,048	0,184	0,32
2344/04	1	49,265	0,36	1,683	0,49	1,286	0,703	0,331	0,075	0,438	0,23
2512/04	1	54,454	0,238	0,952	0,536	0,956	0,664	0,291	0,034	0,303	0,313
2515/04	1	53,064	0,437	1,967	0,591	1,021	0,616	0,282	0,045	0,359	0,241
2805/04	1	47,027	0,331	1,408	0,472	1,157	0,64	0,37	0,092	0,484	0,264
2964/05	1	45,783	0,342	1,285	0,504	1,06	0,585	0,344	0,069	0,36	0,294
5379/04	1	52,743	0,16	0,653	0,597	0,936	0,486	0,324	0,069	0,341	0,309
5381/04	1	51,296	0,137	0,621	0,474	0,907	0,469	0,262	0,045	0,237	0,346
9095/05	1	62,467	0,293	1,598	0,473	1,064	0,501	0,181	0,047	0,239	0,186
8984/05	1	50,985	0,274	1,85	0,485	1,285	0,447	0,233	0,07	0,259	0,292
8592/05	1	44,831	0,277	1,995	0,523	1,804	0,834	0,33	0,086	0,453	0,331
8981/05	1	32,253	0,199	0,742	0,458	1,563	0,921	0,297	0,079	0,414	0,335
8982/05	1	44,867	0,134	0,639	0,399	0,942	0,616	0,249	0,063	0,28	0,326
9223/05	1	54,564	0,246	1,892	0,288	1,347	0,88	0,244	0,084	0,481	0,206
8800/05	1	42,745	0,304	1,832	0,515	1,673	1,009	0,265	0,088	0,458	0,294
3904/06	1	47,439	0,201	0,975	0,416	1,093	0,74	0,259	0,068	0,361	0,339
3905/06	1	51,943	0,222	1,257	0,481	1,052	0,754	0,293	0,079	0,347	0,26
3906/06	1	24,423	0,128	0,731	0,35	1,766	0,759	0,557	0,093	0,333	0,406
3907/06	1	39,899	0,189	0,954	0,346	1,047	0,751	0,339	0,082	0,399	0,321
3908/06	1	49,217	0,138	0,928	0,522	1,109	0,58	0,207	0,067	0,277	0,281
3986	2	56,147	0,096	1,096	0,688	1,429	0,815	0,137	0,024	0,245	0,061
3987	2	58,305	0,043	0,532	0,57	1,342	0,472	0,098	0,051	0,184	0,359
3988	2	60,009	0,045	0,497	0,787	1,182	0,423	0,114	0,016	0,121	0,35
3989	2	53,419	0,111	1,056	0,405	1,629	0,797	0,136	0,048	0,209	0,245
3990	2	48,211	0,037	0,789	0,372	1,444	0,4	0,206	0,053	0,191	0,046
1951/03	2	45,06	0,102	0,143	0,46	0,676	0,07	0,334	0,04	0,038	0,02
2298/03	2	64,53	0,019	0,216	0,529	0,962	0,219	0,163	0,021	0,102	0,273
4072/03	2	59,42	0,05	0,824	0,446	1,511	0,51	0,285	0,035	0,214	0,179
2510	2	61,422	0,248	2,017	0,613	1,312	0,865	0,204	0,03	0,285	0,11
2653	2	61,973	0,234	1,589	0,846	1,358	0,617	0,171	0,025	0,231	0,099
2654	2	64,25	0,263	1,643	0,685	1,328	0,635	0,167	0,036	0,234	0,128
3479	2	44,818	0,24	1,617	0,553	2,026	1,01	0,306	0,041	0,377	0,33
5386	2	70,113	0,076	1,2	0,866	1,173	0,613	0,153	0,031	0,257	0,146
9178/05	2	43,403	0,121	1,238	0,111	1,885	0,684	0,176	0,103	0,323	0,293
9179/05	2	57,299	0,084	1,495	0,189	1,724	0,896	0,173	0,055	0,372	0,383
8772/05	2	51,308	0,052	0,703	0,474	1,856	0,908	0,188	0,035	0,297	0,417
9097/05	2	44,006	0,128	1,377	0,556	2,271	1,243	0,256	0,07	0,438	0,546
8913/05	2	45,269	0,1	1,146	0,582	2,158	1,105	0,215	0,058	0,355	0,459
3909/06	2	51,829	0,088	1,435	0,665	2,265	0,884	0,261	0,043	0,334	0,206
3910/06	2	53,455	0,076	1,528	0,825	1,638	0,835	0,226	0,052	0,306	0,187
3911/06	2	57,441	0,07	1,25	0,792	1,656	0,825	0,207	0,054	0,357	0,201
3912/06	2	48,673	0,064	1,097	0,649	1,616	0,776	0,213	0,049	0,322	0,185
3974	3	37,349	0,059	0,728	0,143	0,936	0,404	0,088	0,015	0,218	0,083
3975	3	41,319	0,027	0,444	0,102	0,944	0,262	0,103	0,127	0,219	0,101
3976	3	44,22	0,027	0,375	0,1	0,767	0,195	0,114	0,073	0,134	0,121
3977	3	42,153	0,026	0,324	0,099	0,718	0,161	0,104	0,065	0,123	0,128
3978	3	40,317	0,024	0,367	0,105	0,874	0,319	0,105	0,092	0,2	0,062
4069	3	45,138	0,051	0,76	0,103	1,035	0,249	0,122	0,161	0,222	0,098
4071	3	40,24	0,057	0,833	0,095	1,202	0,259	0,142	0,158	0,038	0,117
4077	3	33,471	0	0,234	0,055	1,026	0,103	0,134	0,046	0,086	0,1
2300	3	47,132	0,042	0,225	0,13	0,768	0,184	0,169	0,075	0,148	0,114
4070	3	47,722	0,042	0,706	0,154	0,889	0,14	0,149	0,095	0,15	0,095
2352	3	38,775	0,095	0,618	0,13	1,124	0,503	0,123	0,135	0,276	0,194
2517	3	42,547	0,18	1,124	0,14	1,215	0,558	0,087	0,109	0,274	0,183
2656	3	30,634	0,167	1,449	0,129	2,105	0,745	0,211	0,174	0,463	0,205
2792	3	34,702	0,159	1,169	0,134	1,798	0,63	0,194	0,175	0,435	0,112
2793	3	27,279	0,096	1,178	0,122	1,826	0,629	0,174	0,191	0,428	0,174
9054/05	3	29,676	0,093	0,74	0,119	1,483	0,499	0,149	0,164	0,323	0,169
8804/05	3	22,018	0,107	0,633	0,138	0,987	0,352	0,099	0,098	0,167	0,258
9055/05	3	17,128	0,086	0,684	0,09	1,442	0,405	0,136	0,102	0,222	0,233
8773/05	3	13,853	0,079	0,464	0,21	1,724	0,441	0,15	0,109	0,197	0,2
3916/06	3	28,393	0,106	0,721	0,139	1,39	0,635	0,167	0,133	0,321	0,165
3917/06	3	37,309	0,082	1,048	0,162	0,899	0,325	0,117	0,133	0,22	0,127
3918/06	3	31,106	0,074	0,547	0,137	1,063	0,555	0,156	0,146	0,356	0,105
4002	4	40,585	0,187	0,964	0,168	0,383	0,308	0,15	0,046	0,149	0,132
4003	4	39,788	0,1	0,53	0,125	0,325	0,198	0,08	0,057	0	0,088
4004	4	44,342	0,111	0,618	0,154	0,315	0,189	0,096	0,053	0,137	0,082
4005	4	41,992	0,17	0,77	0,142	0,212	0,103	0,122	0,078	0,143	0,069
4006	4	39,853	0,125	0,586	0,145	0,232	0,194	0,119	0,055	0,139	0,075
1866	4	28,582	0,107	0,349	0,202	0,137	0,084	0,156	0,016	0,063	0,071
2297	4	41,793	0,066	0,2	0,152	0,171	0,119	0,105	0,036	0,115	0,063
4073	4	43,917	0,124	0,376	0,184	0,02	0,239	0,162	0,061	0,189	0,107
4075	4	19,061	0,013	0,035	0,13	0,118	0,043	0,136	0,015	0,049	0,067
2518	4	40,429	0,264	1,019	0,211	0,347	0,302	0,171	0,059	0,157	0,171
2970	4	50,9	0,162	0,81	0,222	0,299	0,325	0,128	0,053	0,204	0,089
3484	4	54,731	0,166	0,996	0,236	0,304	0,282	0,148	0,077	0,218	0,099
3485	4	50,35	0,173	0,8	0,256	0,371	0,301	0,144	0,041	0,182	0,12
5385	4	57,649	0,141	0,8	0,233	0,287	0,324	0,136	0,06	0,201	0,108
8563/05	4	31,91	0,254	0,744	0,189	0,247	0,215	0,182	0,07	0,134	0,147
8990/05	4	47,663	0,175	0,885	0,228	0,297	0,284	0,145	0,058	0,163	0,112
9057/05	4	47,977	0,175	0,96	0,216	0,273	0,201	0,112	0,017	0,117	0,1
8811/05	4	49,699	0,19	0,975	0,237	0,372	0,187	0,12	0,04	0,099	0,126
8812/05	4	40,121	0,244	1,429	0,241	0,693	0,32	0,191	0,059	0,198	0,182
3913/06	4	32,376	0,349	0,742	0,482	0,814	0,445	0,334	0,153	0,014	0,36
3914/06	4	46,89	0,166	0,872	0,207	0,317	0,256	0,143	0,03	0,182	0,075
3915/06	4	47,437	0,208	0,909	0,221	0,28	0,269	0,153	0,07	0,156	0,104
3979	5	46,4	0,058	1,092	0,17	0,723	0,128	0,091	0,154	0,127	0,165
3980	5	33,425	0,043	0,599	0,114	0,571	0,146	0,103	0,105	0,107	0,189
3981	5	37,008	0,022	0,564	0,101	0,565	0,075	0,077	0,096	0,071	0,112
3983	5	43,865	0,032	0,725	0,102	0,612	0,101	0,091	0,097	0,082	0,146
3984	5	45,763	0,023	0,802	0,127	0,716	0,1	0,107	0,127	0,118	0,153
3985	5	51,831	0,043	0,963	0,132	0,682	0,127	0,085	0,14	0,102	0,133
1865	5	30,981	0,014	0,148	0,063	0,414	0,031	0,146	0,062	0,038	0
1950	5	50,507	0,034	0,39	0,12	0,633	0,074	0,089	0,109	0,071	0,026
2295	5	31,425	0,022	0,239	0,046	0,475	0,03	0,105	0,075	0,043	0,075
2299	5	27,492	0,011	0,119	0,165	0,626	0,054	0,107	0,102	0,072	0,03
4076	5	21,272	0,019	0,144	0,049	0,408	0,021	0,163	0,047	0,023	0
2346	5	43,379	0,084	0,818	0,147	0,638	0,168	0,112	0,116	0,114	0,164
2772	5	41,729	0,043	0,569	0,133	0,765	0,161	0,113	0,148	0,141	0,132
3473	5	34,184	0,039	0,385	0,11	0,803	0,131	0,142	0,115	0,121	0,136
5376	5	38,586	0,046	0,436	0,1	0,631	0,136	0,084	0,106	0,108	0,134
5377	5	44,003	0,074	0,501	0,186	0,812	0,254	0,188	0,094	0,186	0,199
8559/05	5	39,406	0,077	0,849	0,113	0,659	0,206	0,084	0,097	0,093	0,197
8545/05	5	47,069	0,045	0,944	0,106	0,817	0,13	0,094	0,107	0,08	0,169
8685/05	5	41,302	0,065	1,205	0,407	1,229	0,186	0,101	0,145	0,125	0,265
3899/06	5	38,154	0,087	0,736	0,091	0,71	0,177	0,121	0,123	0,111	0,159
3900/06	5	37,695	0,056	0,861	0,126	0,755	0,211	0,114	0,2	0,166	0,177
3901/06	5	33,418	0,036	0,652	0,088	0,68	0,118	0,154	0,173	0,135	0,136
3902/06	5	38,007	0,063	1,058	0,119	0,676	0,069	0,107	0,114	0,082	0,145
3903/06	5	36,858	0,055	0,815	0,092	0,745	0,135	0,114	0,163	0,142	0,161

SAMPLE	80	83	85	86	88	98	99	104	108	110	114	116	118	124	127	128	130	132	138	140	142	151	153
3996/02	0,113	1,199	0,976	0,831	0,081	0,161	0,022	3,609	11,45	4,048	0,215	0,146	0,936	0,652	0,611	0,074	0,066	0,022	0,101	0,063	0,401	0,025	0,022
3997/02	0,123	1,419	1,142	0,783	0,137	0,173	0,021	4,184	12,737	4,401	0,394	0,15	1,142	0,873	0,755	0,09	0,084	0,036	0,179	0,069	0,78	0	0
3998/02	0,129	1,168	0,85	0,636	0,098	0,232	0	5,437	16,752	5,373	0,349	0,178	1,118	0,939	0,859	0,075	0,11	0,026	0,393	0,176	1,188	0,043	0,071
3999/02	0,093	1,355	0,989	0,798	0,102	0,162	0,007	4,196	13,215	4,518	0,379	0,14	1,117	0,789	0,715	0,085	0,083	0,047	0,186	0,124	0,699	0,023	0,042
4000/02	0	1,185	0,941	0,652	0,106	0,252	0,003	5,439	18,01	4,82	0,467	0,162	1,102	1,089	0,979	0,11	0,104	0,024	0,255	0,163	0,967	0,033	0,059
4001/02	0,212	1,733	0,901	0,503	0,091	0,368	0,033	7,599	25,518	5,629	0,686	0,289	1,784	1,123	1,074	0,086	0,144	0,033	0,825	0,274	2,325	0,053	0,108
1863/03	0,328	1,26	0,715	0,381	0,026	0,29	0	7,812	24,027	6,234	0,549	0,207	1,27	0,95	1,213	0,101	0,112	0,029	0,114	0	0,426	0	0
1864/03	0,414	1,474	0,546	0,298	0,017	0,347	0,041	9,051	28,718	6,336	0,627	0,261	1,43	0,994	1,362	0,12	0,135	0,025	0,169	0	0,582	0	0
1949/03	0,165	1,05	0,967	0,535	0,061	0,188	0	5,516	16,029	6,226	0,387	0,16	0,898	0,797	0,852	0,079	0,083	0,015	0,086	0	0,305	0	0
2293/03	0,327	1,347	0,761	0,394	0,034	0,3	0,054	7,551	22,515	6,57	0,563	0,213	1,341	1,022	1,234	0,104	0,119	0,03	0,098	0	0,444	0	0
2294/03	0,367	1,224	0,573	0,42	0,023	0,333	0,068	9,235	27,942	5,777	0,647	0,25	1,412	1,113	1,44	0,127	0,144	0,019	0,226	0	0,681	0	0
2296/03	0,262	1,247	0,782	0,352	0,043	0,266	0,015	6,969	19,874	6,539	0,494	0,186	1,196	1,005	1,094	0,105	0,107	0,025	0,098	0	0,438	0	0
2344/04	0,173	1,547	1,159	0,878	0,096	0,246	0	4,674	15,041	4,422	0,439	0,148	0,12	0,931	0,857	0,079	0,088	0,019	0,227	0,216	0,698	0,027	0,057
2512/04	0,15	1,794	1,029	0,562	0,103	0,219	0,013	4,425	14,206	5,131	0,326	0,128	1,284	0,786	0,743	0,042	0,065	0,009	0,06	0,073	1,773	0,02	0,031
2515/04	0,144	1,616	1,006	0,708	0,005	0,196	0,017	3,799	12,44	4,233	0,359	0,139	1,271	0,768	0,696	0,306	0,062	0,011	0,136	0,14	0,352	0,062	0,077
2805/04	0,217	1,814	1,281	0,879	0,075	0,256	0	5,031	16,769	4,56	0,465	0,19	1,386	0,574	0,886	0	0,056	0,013	0,259	0,205	0,72	0,02	0,049
2964/05	0,199	1,668	1,063	0,716	0	0,26	0,029	5,382	17,48	4,794	0,487	0,159	1,321	0,626	0,975	0,068	0,094	0,015	0,236	0,226	0,729	0,016	0,053
5379/04	0,181	1,341	1,04	0,537	0,077	0,219	0,025	5,195	16,364	5,174	0,382	0,133	1,086	0,931	0,839	0,086	0,084	0	0,201	0,086	0,104	0,023	0,03
5381/04	0,182	1,232	0,92	0,562	0,072	0,243	0,029	5,757	17,671	5,069	0,44	0,147	1,083	0,948	0,946	0,082	0,09	0,022	0,213	0,061	0,168	0	0
9095/05	0,098	1,168	0,75	0,627	0,081	0,167	0	3,737	11,63	3,422	0,312	0,139	0,888	0,509	0,634	0,066	0,069	0	0,118	0,083	0,239	0	0
8984/05	0,152	1,739	0,953	0,694	0,093	0,241	0,023	4,536	15,364	0,325	0,422	0,163	1,335	0,773	0,754	0,078	0,085	0,016	0,197	0,155	0,482	0,036	0,04
8592/05	0,275	2,054	1,32	1,063	0,129	0,261	0,042	3,217	12,893	2,999	0,513	0,215	1,465	0,74	0,229	0,038	0,086	0	1,571	0,361	4,189	0,025	0,044
8981/05	0,296	2,562	1,37	0,739	0,212	0,344	0,04	4,607	18,479	4,283	0,766	0,323	2,048	0,168	0,996	0	0	0	3,08	0,525	7,12	0	0
8982/05	0,183	1,814	1,027	0,581	0,118	0,275	0,22	6,435	21,19	4,885	0,577	0,242	1,541	0,692	1,019	0,143	0,122	0	0,217	0,118	0,547	0,035	0,058
9223/05	0,156	1,441	1,321	1,081	0,132	0,205	0,2	3,416	11,757	3,162	0,428	0,142	0,959	0,618	0,326	0,073	0,084	0,001	0,707	0,197	1,822	0,049	0,022
8800/05	0,278	2,361	1,569	1,148	0,182	0,301	0	3,464	13,773	3,42	0,482	0,274	1,713	0,785	0,325	0	0	0	1,964	0,403	5,241	0	0
3904/06	0,14	1,598	1,23	0,873	0,133	0,254	0	5,792	18,833	4,538	0,525	0,175	1,338	1,017	1,029	0,113	0,112	0	0,242	0,193	0,768	0,098	0,041
3905/06	0,152	1,901	1,428	1,018	0,149	0,206	0	4,59	15,082	3,221	0,443	0,375	1,565	0,68	0,706	0,045	0,07	0,032	0,189	0,135	0,525	0,026	0,033
3906/06	0,427	3,432	1,444	0,835	0,161	0,375	0,09	2,834	14,015	3,226	0,795	0,353	2,605	1,002	0,137	0,112	0,431	0	6,007	0,786	12,769	0,07	0,155
3907/06	0,189	1,914	1,505	1,02	0,136	0,317	0,047	6,733	21,806	4,051	0,628	0,291	1,555	1,021	1,05	0,152	0,124	0,107	0,497	0,243	1,253	0,057	0,077
3908/06	0,146	1,505	1,097	0,814	0,097	0,252	0	5,876	19,101	4,119	0,516	0,18	1,253	1,029	0,997	0,12	0,11	0	0,258	0,186	0,809	0	0
3986	0,037	0,846	0,952	0,835	0,068	0,202	0	4,049	12,394	4,096	0,451	0,137	0,702	0,762	0,715	0,077	0,085	0,037	0,311	0,233	1,027	0,026	0,041
3987	0,064	0,608	0,68	0,593	0	0,19	0	4,552	12,957	4,497	0,458	0,143	0,61	0,798	0,714	0,069	0,097	0,026	0,533	0,195	1,339	0,036	0,063
3988	0,034	0,568	0,675	0,575	0,068	0,175	0	4,644	13,051	4,58	0,424	0,133	0,564	0,807	0,77	0,089	0,086	0,022	0,3	0,151	0,943	0	0
3989	0,097	0,978	1,004	0,895	0,085	0,123	0	4,306	13,536	4,138	0,49	0,131	0,729	0,797	0,625	0,047	0,101	0,037	0,676	0,304	1,753	0,017	0,043
3990	0,108	0,952	0,806	0,762	0,094	0,254	0	5,294	15,986	4,351	0,531	0,148	0,86	0,893	0,756	0,043	0,114	0,008	1,221	0,426	3,131	0,038	0,085
1951/03	0,075	0,964	0,27	0,327	0,132	0,245	0,028	8,421	24,988	4,628	0,489	0,223	0,996	0,693	1,073	0,091	0,099	0,024	0,237	0,084	0,589	0,045	0,066
2298/03	0,084	0,526	0,43	0,364	0,024	0,159	0	4,84	12,167	4,567	0,343	0,109	0,522	0,649	0,725	0,073	0,074	0	0,109	0,042	0,3	0,023	0,039
4072/03	0,131	1,019	0,748	0,734	0,035	0,184	0	3,809	10,965	3,496	0,371	0,142	0,743	0,611	0,679	0,402	0,064	0,034	0,322	0,191	0,98	0,03	0,045
2510	0,088	1,187	0,94	0,905	0	0,156	0	2,796	8,423	3,242	0,293	0,136	0,816	0,618	0,538	0,055	0,016	0	0,226	0,163	0,633	0	0
2653	0,072	0,859	0,647	0,724	0,035	0,151	0,019	3,057	8,864	3,521	0,305	0,087	0,612	0,613	0,593	0,063	0,061	0,024	0,26	0,185	0,648	0,021	0,053
2654	0,073	0,869	0,753	0,762	0,054	0,143	0,022	2,773	7,645	3,19	0,27	0,074	0,596	0,59	0,527	0,054	0,057	0,019	0,245	0,15	0,605	0,018	0,046
3479	0,136	1,489	1,272	1,088	0,094	0,253	0,036	4,127	12,671	3,427	0,545	0,156	1,109	0,977	0,853	0,083	0,099	0,032	0,704	0,475	2,169	0,042	0,058
5386	0,07	0,677	0,734	0,733	0,047	0,114	0	2,593	7,22	3,093	0,21	0,068	0,456	0,537	0,432	0,041	0,045	0	0,131	0,078	0,286	0	0
9178/05	0,119	0,872	1,26	1,143	0,029	0,288	0,027	3,771	11,495	2,341	1,054	3,064	3,127	0,973	0,412	0,121	0,122	0	1,898	0,55	4,283	0,044	0,116
9179/05	0,153	1,079	1,029	1,208	0,098	0,189	0,026	2,566	8,89	2,946	0,425	0,188	0,739	0,623	0,254	0,071	0,094	0	1,026	0,25	2,581	0,05	0,035
8772/05	0,184	1,112	1,05	1,021	0,114	0,257	0,051	3,268	12,505	2,845	0,53	0,237	0,726	0,676	0,233	0,088	0,176	0	1,871	0,404	4,474	0	0,052
9097/05	0,135	1,674	1,369	1,237	0,181	0,262	0	2,904	11,281	3,099	0,706	0,298	1,303	1,025	0,341	0,099	0,22	0	2,585	0,582	6,276	0,078	0,074
8913/05	0,179	1,377	1,214	1,219	0,121	0,286	0,063	2,886	11,116	2,974	0,682	0,266	1,006	0,897	0,32	0,102	0,163	0	1,949	0,57	5,311	0,033	0,107
3909/06	0,088	1,083	1,24	1,229	0,07	0,207	0,037	3,707	11,391	2,542	0,444	0,143	0,731	0,739	0,716	0,071	0,081	0,021	0,662	0,345	1,844	0,021	0,079
3910/06	0,076	1,012	1,242	1,141	0,085	0,172	0,011	4,095	12,486	3,666	0,418	0,151	0,797	0,73	0,729	0,045	0,07	0,015	0,345	0,211	0,936	0,021	0,052
3911/06	0,077	0,893	1,184	1,119	0,077	0,185	0,026	3,618	10,976	2,926	0,371	0,131	0,629	0,664	0,629	0,065	0,072	0,014	0,434	0,228	1,188	0,016	0,027
3912/06	0,082	0,988	1,236	1,148	0,086	0,229	0,03	4,812	14,158	3,667	0,548	0,218	0,868	0,89	0,886	0,094	0,106	0,019	0,768	0,358	2,048	0,029	0,09
3974	0,061	0,445	1,01	0,79	0,062	0,313	0	8,619	19,03	3,319	1,437	4,399	5,073	1,51	1,391	0,155	0,164	0,038	0,504	0,241	1,146	0,064	0,109
3975	0,064	0,396	0,816	0,67	0	0,246	0,025	8,425	17,535	3,243	1,283	3,914	4,428	1,279	1,219	0,127	0,139	0,02	0,971	0,266	1,874	0,072	0,129
3976	0,077	0,389	0,724	0,41	0,049	0,262	0	8,798	19,45	3,134	1,13	3,597	4,147	1,331	1,224	0,116	0,123	0,017	0,374	0,143	0,814	0,057	0,099
3977	0,066	0,377	0,638	0,366	0,046	0,26	0	8,785	19,551	8,457	1,23	4,044	4,63	1,511	1,302	0,139	0,142	0,024	0,514	0,182	1,104	0,061	0,103
3978	0,079	0,414	0,927	0,553	0,069	0,271	0	8,81	19,291	3,383	1,34	3,991	4,579	1,406	1,271	0,136	0,143	0,023	0,646	0,222	1,4	0,043	0,113
4069	0,066	0,375	0,959	0,769	0,05	0,229	0	6,715	14,464	3,373	1,068	3,129	3,764	1,053	1,027	0,108	0,116	0,021	1,084	0,286	2,267	0,083	0,141
4071	0,104	0,464	1,146	0,807	0	0,333	0	7,264	15,653	3,18	1,298	3,606	4,29	1,238	1,249	0,134	0,149	0,051	0,955	0,39	2,011	0,074	0,12
4077	0,117	0,468	0,468	0,577	0,028	0,332	0,032	9,729	23,183	2,95	1,293	4,048	4,809	1,08	1,289	0,103	0,14	0,03	1,164	0,37	2,508	0,086	0,141
2300	0,127	0,451	0,601	0,384	0,03	0,241	0,232	8,914	17,842	4,602	0,938	2,389	3,157	1,138	1,184	0,106	0,121	0,009	0,265	0,07	0,492	0,058	0,099
4070	0,093	0,391	0,594	0,586	0,015	0,247	0	7,443	15,495	3,353	0,926	2,59	3,3	1,053	1,06	0,113	0,122	0,018	0,845	0,22	1,739	0,073	0,129
2352	0,087	0,592	1,327	0,788	0,046	0,341	0	7,085	16,972	3,05	1,331	4,217	4,769	1,396	1,175	0,112	0,141	0,036	0,998	0,446	2,224	0,063	0,107
2517	0,111	0,675	1,438	0,952	0	0,27	0	5,579	14,845	3,268	1,182	3,887	4,427	1,296	0,91	0,036	0,114	0,015	1,054	0,36	2,408	0,053	0,034
2656	0,126	0,927	1,669	1,299	0,125	0,372	0,03	5,308	13,566	2,329	1,396	4,207	4,881	1,535	1,163	0,059	0,139	0,043	1,942	0,739	4,369	0,081	0,127
2792	0,094	0,731	1,487	1,156	0,093	0,329	0	5,671	13,402	2,404	1,321	4,078	4,605	1,479	1,137	0,105	0,154	0,048	2,061	0,634	4,001	0,073	0,125
2793	0,044	30,678	1,517	1,187	0,115	0,393	0,02	6,048	14,529	2,094	1,6	5,456	5,819	1,778	1,253	0,114	0,171	0,064	2,268	0,794	4,714	0,083	0,038
9054/05	0,037	0,596	1,312	0,975	0,095	0,35	0	6,964	18,215	2,159	1,721	6,165	6,495	1,766	1,284	0,133	0,167	0,04	1,22	0,528	3,175	0,181	0,195
8804/05	0,095	0,612	1,113	0,605	0,055	0,444	0	8,629	25,178	2,468	1,949	6,509	7,399	2,062	1,631	0,181	0,205	0,052	0,624	0,491	1,773	0,174	0,086
9055/05	0,069	0,588	1,072	0,761	0,055	0,483	0	7,904	21,846	1,619	2,27	8,397	8,418	2,228	1,566	0,197	0,205	0,059	1,623	0,855	4,374	0,168	0,246
8773/05	0,176	0,914	1,407	0,702	0,113	0,471	0	4,615	16,862	1,338	2,187	9,137	5,464	1,533	0,141	0,099	0,502	0	7,336	1,098	13,699	0	0
3916/06	0,075	0,613	1,561	1,031	0,088	0,363	0	6,693	17,179	2,165	1,767	5,598	6,01	1,615	1,349	0,14	0,174	0,059	1,304	0,689	3,299	0,14	0,242
3917/06	0,052	0,414	1,26	0,995	0,057	0,286	0	7,561	17,801	2,651	1,576	5,092	5,676	1,507	1,282	0,135	0,15	0,017	0,69	0,282	1,554	0,138	0,099
3918/06	0,067	0,521	1,454	1,014	0,102	0,356	0,021	7,454	18,084	2,806	1,75	5,638	6,16	1,708	1,392	0,063	0,135	0,024	1,014	0,46	2,484	0,18	0,163
4002	0,092	0,419	1,333	0,449	0,192	0,161	0,019	7,993	28,829	0,158	0,807	0,278	0,772	2,491	1,389	0,155	0,153	0,035	0,158	0,24	0,673	0,035	0,061
4003	0,081	0,052	1,043	0,368	0,092	0,373	0	9,173	31,759	0,276	0,726	0,278	0,701	2,287	1,299	0,115	0,149	0,031	0,396	0,232	1,198	0,043	0,082
4004	0,068	0,279	1,065	0,382	0,117	0,329	0	8,229	28,592	0,078	0,649	0,253	0,646	1,157	1,242	0,135	0,135	0,033	0,246	0,181	0,81	0,04	0,037
4005	0,093	0,332	1,248	0,454	0,107	0,356	0	9,098	31,098	0,132	0,715	0,247	0,734	1,287	1,416	0,151	0,152	0,018	0,127	0,08	0,403	0,039	0,075
4006	0,086	0,349	1,105	0,347	0,144	0,386	0	9,414	32,198	0,154	0,809	0,283	0,776	1,729	1,554	0,171	0,168	0,045	0,174	0,141	0,587	0,04	0,067
1866	0,205	0,494	0,572	0,242	0,037	0,458	0,037	12,888	42,394	0,096	0,929	0,367	0,979	1,016	1,874	0,171	0,185	0,021	0,179	0,041	0,265	0,046	0,069
2297	0,104	0,28	0,874	0,275	0,068	0,343	0,024	10,017	33,163	0,062	0,695	0,277	0,717	1,236	1,465	0,149	0,146	0,024	0,135	0,032	0,171	0,036	0,061
4073	0,132	0,416	1,433	0,347	0,118	0,384	0,031	8,528	29,485	0,082	0,673	0,26	0,692	1,279	1,333	0,137	0,135	0,035	0,163	0,072	0,23	0,027	0,042
4075	0,212	0,442	0,577	0,178	0,023	0,607	0,024	14,095	49,452	0,104	1,187	0,452	1,141	1,259	2,275	0,201	0,235	0,027	0,167	0,092	0,468	0,052	0,084
2518	0,11	0,475	1,643	0,448	0,175	0,355	0,038	7,12	24,699	0,107	0,554	0,108	0,623	1,035	1,071	0,114	0,108	0,007	0,132	0,117	0,36	0,025	0,039
2970	0,076	0,385	1,217	0,473	0,239	0,348	0	7,211	24,348	0,175	0,593	0,19	0,57	1,043	1,133	0,113	0,114	0,043	0,12	0,098	0,342	0,023	0,037
3484	0,098	0,43	1,51	0,529	0,189	0,288	0,034	6,232	21,315	0,127	0,461	0,16	0,323	1,38	0,957	0,101	0,093	0,016	0,064	0,07	0,19	0,031	0,037
3485	0,08	0,425	1,196	0,429	0,181	0,356	0,038	6,985	24,036	0,209	0,599	0,204	0,63	1,328	1,145	0,118	0,12	0,022	0,148	0,108	0,389	0,027	0,044
5385	0,083	0,377	1,301	0,541	0,194	0,293	0	6,185	20,785	0,136	0,461	0,154	0,302	1,391	0,903	0,098	0,091	0	0,1	0,042	0,161	0	0,029
8563/05	0,16	0,594	1,944	0,325	0,139	0,418	0	10,348	37,649	0,103	0,683	0,285	0,89	1,172	1,326	0,151	0,129	0,047	0,206	0,151	0,571	0,033	0,052
8990/05	0,078	0,382	1,161	0,393	0,184	0,335	0	7,813	27,25	0,058	0,633	0,239	0,671	1,567	1,168	0,142	0,126	0	0,094	0,082	0,249	0,028	0,038
9057/05	0,07	0,324	1,032	0,336	0,149	0,35	0	7,671	27,214	0,048	0,672	0,244	0,669	1,752	1,28	0,149	1,324	0	0,068	0,087	0,237	0,028	0,042
8811/05	0,085	0,367	0,91	0,315	0,129	0,333	0	7,141	25,232	0,06	0,66	0,238	0,648	1,834	1,217	0,164	0,136	0,025	0,125	0,13	0,326	0,032	0,039
8812/05	0,14	0,542	1,397	0,454	0,238	0,441	0	6,082	23,872	0,195	0,756	0,303	0,674	2,52	0,511	0,135	0,174	0	1,737	0,468	4,772	0,022	0,051
3913/06	0,241	0,712	2,618	0,36	0,239	0,392	0,078	5,223	21,959	0,073	0,692	0,324	0,58	1,426	0,173	0,025	0,097	0	4,442	0,561	9,503	0,025	0,088
3914/06	0,082	0,377	1,336	0,434	0,168	0,343	0,033	7,838	26,807	0,053	0,615	0,223	0,647	1,037	1,219	0,137	0,122	0,02	0,088	0,07	0,25	0,025	0,036
3915/06	0,091	0,392	1,548	0,386	0,15	0,318	0	7,822	26,912	0,038	0,581	0,213	0,632	0,875	1,15	0,134	0,115	0,022	0,089	0,08	0,257	0,024	0,034
3979	0,088	0,448	0,636	0,815	0,02	0,251	0	7,772	21,489	5,483	0,578	0,21	0,657	1,084	1,178	0,139	0,128	0,011	0,28	0,108	0,748	0,05	0,094
3980	0,119	0,585	0,529	0,562	0,022	0,326	0,037	10,545	27,639	8,154	0,717	0,293	0,967	1,452	1,492	0,153	0,159	0,011	0,407	0,149	1,08	0,069	0,13
3981	0,009	0,312	0,318	0,507	0,008	0,331	0,019	10,467	30,207	4,638	0,656	0,252	0,684	1,231	1,435	0,129	0,142	0,006	0,493	0,188	1,288	0,061	0,109
3983	0,078	0,321	0,381	0,527	0,011	0,303	0,013	9,536	25,513	4,518	0,623	0,263	0,668	1,238	1,353	0,127	0,13	0,009	0,276	0,117	0,663	0,05	0,081
3984	0,111	0,405	0,4	0,6	0,011	0,305	0,026	8,139	23,633	4,133	0,505	0,189	0,593	0,994	1,115	0,084	0,103	0,013	0,408	0,176	1,114	0,052	0,082
3985	0,082	0,361	0,481	0,673	0,013	0,264	0	7	20,376	4,485	0,482	0,169	0,511	0,889	1,026	0,109	0,103	0,012	0,269	0,126	0,723	0,024	0,034
1865	0,134	0,359	0,203	0,356	0,027	0,399	0,022	12,522	35,937	4,933	0,731	0,297	0,778	1,117	1,579	0,123	0,15	0,029	0,324	0,097	0,748	0,068	0
1950	0,074	0,265	0,346	0,498	0	0,231	0	8,565	22,873	4,497	0,53	0,213	0,533	0,915	1,123	0,107	0,116	0,021	0,176	0,049	0,386	0,045	0,075
2295	0,136	0,372	0,267	0,417	0,055	0,378	0,02	12,002	34,65	5,216	0,786	0,289	0,825	1,296	1,721	0,161	0,179	0,021	0,281	0,101	0,711	0,074	0
2299	0,103	0,337	0,343	0,509	0	0,378	0	12,858	33,62	5,605	0,784	0,295	0,776	1,329	1,633	0,145	0,178	0,018	0,899	0,235	1,969	0,088	0
4076	0,169	0,417	0,13	0,255	0,028	0,549	0,026	13,384	42,24	4,071	0,954	0,124	1,043	1,351	2,006	0,159	0,207	0,039	0,483	0,203	1,265	0,089	0,149
2346	0,124	0,562	0,692	0,691	0,018	0,299	0	8,34	24,534	5,645	0,681	0,161	0,7	0,84	1,357	0,108	0,133	0	0,236	0,145	0,645	0,047	0,082
2772	0,087	0,482	0,621	0,725	0,017	0,335	0	8,628	26,656	5,217	0,702	0,234	0,714	0,872	1,398	0,11	0,139	0	0,47	0,224	1,206	0,047	0,078
3473	0,108	0,628	0,602	0,656	0,02	0,373	0	9,456	30,001	5,754	0,82	0,368	0,96	1,339	1,597	0,143	0,185	0,018	0,548	0,276	1,455	0,045	0,062
5376	0,112	0,447	0,566	0,665	0,011	0,362	0	18,887	28,386	3,18	0,774	0,208	0,708	0,939	1,525	0,184	0,172	0,019	0,407	0,109	0,894	0,038	0,086
5377	0,154	0,778	0,731	0,607	0,032	0,317	0	7,843	23,202	5,189	0,624	0,232	0,928	0,788	1,095	0	0,189	0,046	0,539	0,147	1,135	0,041	0,032
8559/05	0,135	0,663	0,716	0,82	0,035	0,352	0	8,518	27,123	4,641	0,635	0,206	0,757	0,806	1,32	0	0,112	0,014	0,359	0,192	0,914	0,051	0,08
8545/05	0,102	0,465	0,496	0,706	0,015	0,289	0	7,467	23,387	3,982	0,552	0,187	0,627	1,083	1,118	0,098	0,113	0	0,41	0,214	1,139	0,046	0,069
8685/05	0,17	0,607	0,638	1	0,034	0,35	0,026	5,832	20,76	3,412	0,666	0,262	0,644	0,995	0,41	0,128	0,206	0	2,741	0,47	5,502	0,042	0,059
3899/06	0,155	0,679	0,768	0,787	0,035	0,353	0	8,482	28,327	4,289	0,777	0,258	0,868	1,03	1,048	0,054	0,154	0	0,935	0,244	2,302	0	0
3900/06	0,13	0,723	1,109	1,4	0,036	0,321	0,028	8,217	25,098	4,331	0,621	0,245	0,804	1,06	1,215	0,131	0,131	0,048	0,641	0,225	1,565	0,054	0,055
3901/06	0,138	0,531	0,531	0,801	0,034	0,35	0,203	9,604	29,51	3,986	0,665	0,348	0,845	1,204	1,354	0,135	0,169	0,061	0,953	0,317	2,051	0,073	0,076
3902/06	0,125	0,543	0,477	0,737	0,01	0,304	0,029	8,755	27,814	3,902	0,683	0,242	0,818	0,833	1,275	0,105	0,145	0,038	0,764	0,28	1,972	0,045	0,052
3903/06	0,149	0,679	0,686	0,915	0,02	0,342	0,024	8,977	28,543	4,276	0,593	0,279	0,844	1,081	1,1	0,057	0,137	0,072	0,043	0,226	2,031	0,05	0,042

SAMPLE	155	174	cohum.	n+adhumu	colupul.	n+adcol.	alfa kis	beta acid	co-alpha	co-beta	alpha/bet	alpha KVH	oil tot.
3996/02	0,524	0,006	1,77	6,36	1,94	2,03	8,13	3,97	21,72	48,92	2,05	7,1	2,36
3997/02	0,658	0,109	1,42	5,2	1,57	1,54	6,63	3,11	21,47	50,45	1,69	5,4	1,94
3998/02	0,632	0,053	1,35	4,8	1,84	1,8	6,15	3,65	21,97	50,54	1,69	5,3	1,81
3999/02	0,655	0,076	1,72	6,33	1,88	1,95	8,05	3,84	21,42	49,1	2,1	7,2	2,02
4000/02	0,65	0,018	1,58	5,44	1,73	1,71	7,03	3,45	22,53	50,3	2,04	5,8	1,68
4001/02	1,075	0,082	1,49	5,9	1,81	2,01	7,39	3,82	20,14	47,39	1,93	6,5	0,98
1863/03	0,981	0	1,47	5,14	1,65	1,66	6,6	3,31	22,24	49,83	1,99	6,6	1,38
1864/03	1,169	0	1,44	4,68	1,6	1,56	6,12	3,16	23,54	50,65	1,93	5,6	0,95
1949/03	0,634	0	1,6	6,05	1,88	2,04	7,65	3,92	20,96	47,99	1,95	7,5	1,48
2293/03	1,141	0	1,69	5,99	1,63	1,53	7,68	3,17	21,98	51,53	2,43	8,4	1,53
2294/03	1,228	0	1,19	3,78	1,1	1,16	4,98	2,25	24	48,67	2,21	5,1	0,94
2296/03	0,926	0,012	1,73	6,25	1,79	1,84	7,98	3,63	21,71	49,4	2,2	8,3	1,46
2344/04	0,695	0,051	2,25	7,75	1,95	1,99	10	3,94	22,5	49,53	2,54	10,5	1,53
2512/04	0,705	0,12	3,46	12,79	3,18	3,33	16,25	6,51	21,29	48,81	2,5	13,2	2,48
2515/04	0,793	0,117	2,91	10,58	2,43	2,65	13,49	5,05	21,59	48,11	2,67	11,1	2,31
2805/04	0,731	0	2,36	8,88	2,39	2,45	11,24	4,84	21,01	49,34	2,32	9,5	1,37
2964/05	0,773	0,046	1,75	6,32	1,69	1,68	8,06	3,37	21,67	50,19	2,39	7,5	1,07
5379/04	0,744	0	2,76	11,06	2,76	2,92	13,82	5,69	19,96	48,61	2,43	11,7	1,48
5381/04	0,752	0	2,25	8,36	2,15	2,27	10,61	4,41	21,17	48,68	2,4	9,5	1,53
9095/05	0,35	0	2,06	6,91	2,15	2,02	8,98	4,17	23	51,66	2,15	10,6	2,05
8984/05	0,668	0	2,5	8,32	2,52	2,51	10,82	5,03	23,14	50,11	2,15	10,7	1,35
8592/05	0,421	0	2,19	7,11	2,16	2,12	9,3	4,29	23,54	50,42	2,17	11,1	1,59
8981/05	0,556	0	1,93	6,14	1,97	1,9	8,07	3,87	23,91	50,96	2,09	8,2	0,99
8982/05	0,734	0,034	1,93	6,72	2,2	2,35	8,65	4,55	22,34	48,37	1,9	8,5	1,02
9223/05	0,328	0,036	2,54	8,37	2,57	2,51	10,91	5,09	23,24	50,58	2,15	11	1,92
8800/05	0	0	2,32	8,04	2,46	2,56	10,36	5,02	22,42	49,08	2,06	11,1	1,6
3904/06	0,669	0,074	1,43	4,6	2	1,58	6,02	3,58	23,67	55,8	1,68	6,5	1,04
3905/06	0,635	0,053	1,99	7,03	2,7	2,45	9,02	5,15	22,1	52,4	1,75	8,5	0,63
3906/06	0,544	0,043	2,12	7,79	2,7	2,57	9,91	5,28	21,41	51,23	1,88	7,8	0,7
3907/06	0,683	0,073	1,02	3,39	1,39	1,21	4,41	2,61	23,19	53,52	1,69	5,6	0,55
3908/06	0,68	0,065	1,21	3,87	1,57	1,38	5,07	2,95	23,82	53,31	1,72	6	1,16
3986	0,204	0,137	1,72	4,36	3,21	3,55	6,08	6,76	28,25	47,51	0,9	5,8	1,87
3987	0,205	0	1,84	4,59	3,34	3,66	6,42	7	28,59	47,68	0,92	5,9	2,11
3988	0,179	0,096	1,64	3,86	3,58	3,84	5,49	7,42	29,79	48,2	0,74	4,9	2,14
3989	0,201	0,151	1,46	3,54	3,49	3,78	5	7,27	29,17	48	0,69	4,7	2,25
3990	0,349	0,234	1,07	2,55	2,83	2,95	3,63	5,78	29,65	48,9	0,63	3,6	1,62
1951/03	0,709	0,019	0,78	1,78	0,91	0,96	2,57	1,87	30,52	48,7	1,37	2,7	1,08
2298/03	0,254	0,013	1,38	3,86	2,68	2,98	5,24	5,67	26,32	47,35	0,92	5	2,56
4072/03	0,334	0,092	1,4	3,81	2,36	2,7	5,22	5,06	26,94	46,65	1,03	3,5	1,9
2510	0,27	0	2,35	6,86	2,79	3,11	9,24	5,9	25,47	47,3	1,57	9,5	2,25
2653	0,229	0,083	1,69	5,27	2,56	2,94	6,96	5,5	24,32	46,59	1,27	6,1	3,18
2654	0,221	0,064	1,72	5,09	2,37	2,54	6,8	4,91	25,22	48,25	1,39	6,1	2,77
3479	0,491	0,566	1,61	4,91	2,19	2,48	6,52	4,67	24,68	46,92	1,4	6,2	1,4
5386	0,153	0	2,14	6,27	3,04	3,76	8,42	6,8	25,46	44,68	1,24	7,3	1,51
9178/05	0,14	0,129	1,93	6,72	2,2	2,35	8,65	4,55	22,34	48,37	1,9	8,5	1,02
9179/05	0,125	0,062	1,31	3,69	2,59	2,64	5	5,23	26,28	49,46	0,96	5,8	1,79
8772/05	0,098	0,07	0,81	2,17	2,44	2,79	2,98	5,22	27,16	46,63	0,57	3,9	0,9
9097/05	0,179	0,152	1,4	4,21	2,53	2,93	5,61	5,46	24,94	46,36	1,03	7,1	1,27
8913/05	0,167	0,234	1,18	3,32	2,65	3,03	4,5	5,67	26,23	46,67	0,79	6,1	1,86
3909/06	0,212	0,135	1,06	2,36	2,71	2,57	3,43	5,27	31,07	51,34	0,65	3,9	1,26
3910/06	0,258	0,11	1,56	4,06	3,24	3,22	5,62	6,46	27,81	50,13	0,87	7,4	1,35
3911/06	0,167	0,087	0,96	2,3	2,57	2,32	3,26	4,89	29,44	52,56	0,67	4,3	1,26
3912/06	0,266	0,147	0,88	2,07	2,45	2,27	2,95	4,72	29,88	51,83	0,63	3,1	1,19
3974	0,168	0,077	1,22	3,58	2,48	1,97	4,75	4,45	25,66	55,79	1,07	4,6	2,25
3975	0,151	0,123	0,74	1,93	1,96	1,31	2,67	3,27	27,71	60,01	0,82	2,7	2,33
3976	0,169	0,043	1,19	2,86	2,63	1,63	4,04	4,26	29,38	61,75	0,95	4,3	2,12
3977	0,168	0,054	1,26	3,14	2,75	1,77	4,4	4,52	28,72	60,82	0,97	4,5	2,05
3978	0,196	0,056	1,24	3,04	2,66	1,69	4,28	4,34	29,04	61,19	0,99	4,4	2,4
4069	0,219	0,105	0,77	2,2	1,46	1,1	2,98	2,56	26	57,07	1,16	2,2	1,04
4071	0,271	0,155	1	3	1,6	1,25	4	2,85	24,96	56,07	1,4	2,9	1,15
4077	0,314	0,125	0,43	1,18	0,82	0,66	1,61	1,48	26,87	55,19	1,09	1,7	0,77
2300	0,343	0,014	1,05	3,07	1,62	1,28	4,12	2,9	25,55	55,81	1,42	4	1,2
4070	0,258	0,101	0,59	1,72	0,98	0,76	2,32	1,74	25,62	56,2	1,33	2,3	1,2
2352	0,158	0,153	1,15	3,74	1,95	1,62	4,89	3,57	23,53	54,68	1,37	5,1	1,16
2517	0,113	0,075	1,39	4,56	1,75	1,5	5,95	3,25	23,35	53,73	1,83	6,4	1,58
2656	0,372	0,259	0,8	2,56	1,07	0,91	3,36	1,97	23,83	54,02	1,7	3,4	1
2792	0,247	0,241	1,05	3,11	1,49	1,21	4,16	2,7	25,31	55,09	1,54	4,2	1,57
2793	0,308	0,422	0,99	3,13	1,56	1,37	4,12	2,93	24,1	53,16	1,41	4	1,32
9054/05	0,193	0,169	1,09	2,88	2,09	1,6	3,97	3,69	27,43	56,54	1,08	5	1,97
8804/05	0,204	0,136	1,29	3,94	2,41	2,03	5,23	4,44	24,63	54,29	1,18	6	1,18
9055/05	0,267	0,234	0,9	2,72	2,14	1,67	3,63	3,81	24,92	56,23	0,95	4,8	1,26
8773/05	0,713	0,159	1,34	4,56	2,89	2,58	5,89	5,47	22,67	52,85	1,08	4,4	1,08
3916/06	0,254	0,362	0,73	2,15	1,66	1,19	2,89	2,85	25,41	58,32	1,01	3,6	1,2
3917/06	0,106	0,096	1,08	3,08	2,64	1,75	4,16	4,39	25,9	60,09	0,95	4,1	1,5
3918/06	0,155	0,168	0,71	2,21	1,79	1,56	2,92	3,34	24,45	53,44	0,87	3,9	0,97
4002	0,408	0	2,77	7,93	2,28	2,85	10,7	5,13	25,89	44,42	2,09	9,1	2,76
4003	0,378	0,042	1,94	5,71	2,06	2,99	7,65	5,05	25,39	40,75	1,51	6,8	2,9
4004	0,347	0,033	1,86	5,38	2,06	2,99	7,25	5,05	25,73	40,81	1,44	6,4	2,75
4005	0,482	0	2,36	6,56	2,54	3,5	8,91	6,04	26,43	42,02	1,48	8	3,06
4006	0,399	0,038	2,55	7,31	2,57	3,61	9,86	6,18	25,85	41,61	1,6	9,8	3,46
1866	0,477	0	2,35	9,73	1,94	3,97	12,08	5,91	19,43	32,83	2,04	11,5	1,89
2297	0,362	0	2,61	9,34	2,51	4,24	11,95	6,75	21,85	37,16	1,77	11,4	2,18
4073	0,337	0,017	3,33	12,6	2,75	4,23	15,93	6,68	20,91	39,43	2,28	12,6	1,85
4075	0,501	0	2,6	10,19	2,58	4,9	12,79	7,48	20,31	34,47	1,71	7,8	1,45
2518	0,435	0	3,95	13,43	3,31	3,92	17,74	7,23	24,3	45,78	1,92	16,7	2,86
2970	0,253	0	3,51	11,68	3,33	4,65	15,19	7,98	23,1	41,7	1,9	12,9	2,88
3484	0,352	0	3,73	12,15	3,37	4,39	15,88	7,76	23,49	43,47	2,05	13,2	1,93
3485	0,316	0,014	3,78	13,53	3,13	4,43	17,31	7,56	21,86	41,39	2,29	13,8	2,99
5385	0,255	0	2,45	8,95	2,21	3,28	11,41	5,49	21,52	40,32	2,08	13,3	3,41
8563/05	0,599	0	2,92	7,3	3,26	3,72	10,21	6,98	28,55	46,74	1,46	12,3	1,11
8990/05	0,266	0	2,99	8,41	3,4	4,3	11,4	7,7	26,22	44,13	1,48	12,1	2,7
9057/05	0,354	0	3,54	9,51	3,41	4,11	13,05	7,52	27,14	45,37	1,74	12,9	2,95
8811/05	0,271	0,004	3,72	10,4	3,27	4,03	14,12	7,3	26,36	44,81	1,93	14,9	3,29
8812/05	0,281	0	3,34	9,4	2,72	3,46	12,74	6,18	26,24	43,97	2,06	14,7	2,41
3913/06	0,131	0,046	4,21	11,88	4,21	4,39	16,09	8,61	26,14	48,96	1,87	12,9	1,3
3914/06	0,255	0,006	3,17	9,17	3,6	4,32	12,34	7,93	25,72	45,46	1,56	10,1	2,11
3915/06	0,312	0,019	3,18	8,61	3,69	4,13	11,79	7,82	26,95	47,13	1,51	11,4	2,26
3979	0,278	0,013	1,28	2,87	1,45	1,42	4,14	2,87	30,8	50,64	1,44	4,1	1,32
3980	0,523	0,061	0,94	2,2	1,09	1,03	3,14	2,12	29,89	51,56	1,48	3,5	0,76
3981	0,244	0,048	0,64	1,24	0,96	1	1,87	1,95	33,96	49,02	0,96	2,3	0,84
3983	0,188	0,028	0,98	2,06	1,27	1,28	3,03	2,55	32,15	49,7	1,19	3	0,84
3984	0,262	0,058	1	2,08	1,35	1,37	3,08	2,72	32,31	49,74	1,13	2,6	0,69
3985	0,087	0,034	1,22	2,56	1,61	1,64	3,74	3,24	31,31	49,55	1,16	3,8	1,02
1865	0,307	0,03	0,76	1,61	1,12	1,28	2,37	2,4	32,21	46,66	0,99	2	0,62
1950	0,155	0,008	0,79	1,54	1,71	1,96	2,33	3,66	34,01	46,58	0,64	2,9	1,18
2295	0,406	0,005	0,8	1,67	0,98	1,01	2,47	1,98	32,46	49,33	1,24	2,7	0,78
2299	0,299	0,021	0,65	1,47	1,13	1,16	2,12	2,29	30,61	49,34	0,93	2,3	0,82
4076	0,423	0,026	0,54	1,27	0,82	0,88	1,81	1,7	29,77	48,16	1,07	1,5	0,71
2346	0,283	0	2,01	5,36	1,96	2,12	7,36	4,08	27,25	48,02	1,8	6,1	1,34
2772	0,321	0,013	1,42	3,8	1,62	1,76	5,21	3,38	27,19	48	1,54	4,7	1,18
3473	0,333	0,028	1,43	3,65	1,59	1,63	5,09	3,22	28,18	49,39	1,58	4,7	0,77
5376	0,259	0	1,46	4,63	1,84	1,99	6,09	3,83	23,97	47,97	1,59	4,5	0,92
5377	0,458	0,022	1,88	6,17	2	2,13	8,05	4,13	23,35	48,45	1,95	6,4	0,7
8559/05	0,306	0	1,32	3,37	1,44	1,58	4,68	3,02	28,1	47,65	1,55	5,7	0,93
8545/05	0,261	0,038	1,23	2,54	1,57	1,53	3,81	3,11	35,51	50,75	1,22	4,3	1,4
8685/05	0,152	0,053	2,07	4,77	2,13	2,32	6,84	4,45	30,26	47,85	1,54	4,3	0,98
3899/06	0,161	0,034	1,14	2,48	1,54	1,25	3,62	2,79	31,48	55,29	1,3	3	0,74
3900/06	0,318	0,049	1,01	2,24	1,49	1,21	3,24	2,7	31,04	55,35	1,2	3,5	0,89
3901/06	0,319	0	0,63	1,35	1	0,84	1,98	1,84	31,88	54,26	1,08	2,2	0,54
3902/06	0,388	0,067	0,76	1,59	0,95	0,75	2,35	1,69	32,38	55,92	1,39	2,9	1,32
3903/06	0,353	0,058	0,86	1,75	1,14	0,88	2,61	2,03	32,99	56,46	1,29	2,1	0,61

STATISTICAL ASSESMENT

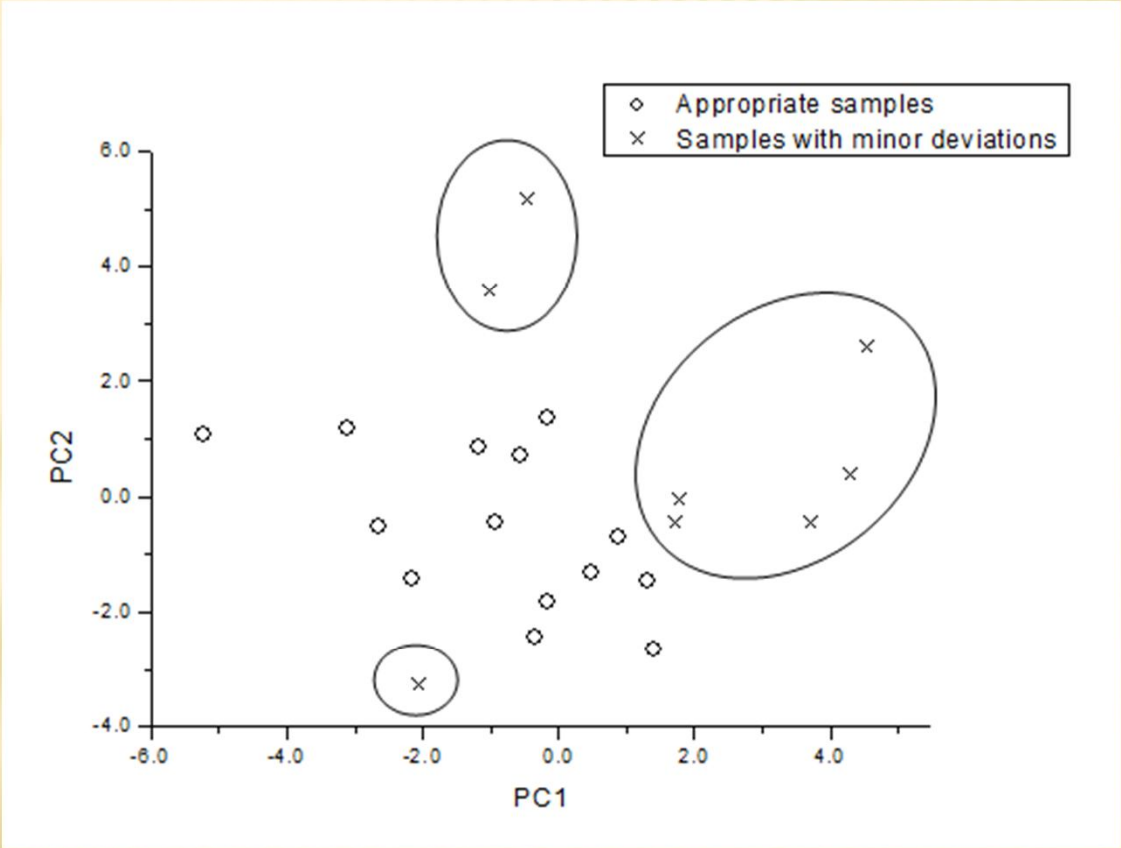
- Tables with a huge number of results
- Univariate statistical analysis (average, min, max, sd...) doesn‘t give results

- **Solution = multivariate statistics like unsupervised PCA, HC and supervised DA**
  - Data bank for constructing a model able to classify samples according to their characteristic is necessary,

MULTIVARIANT STATISTICS - PCA

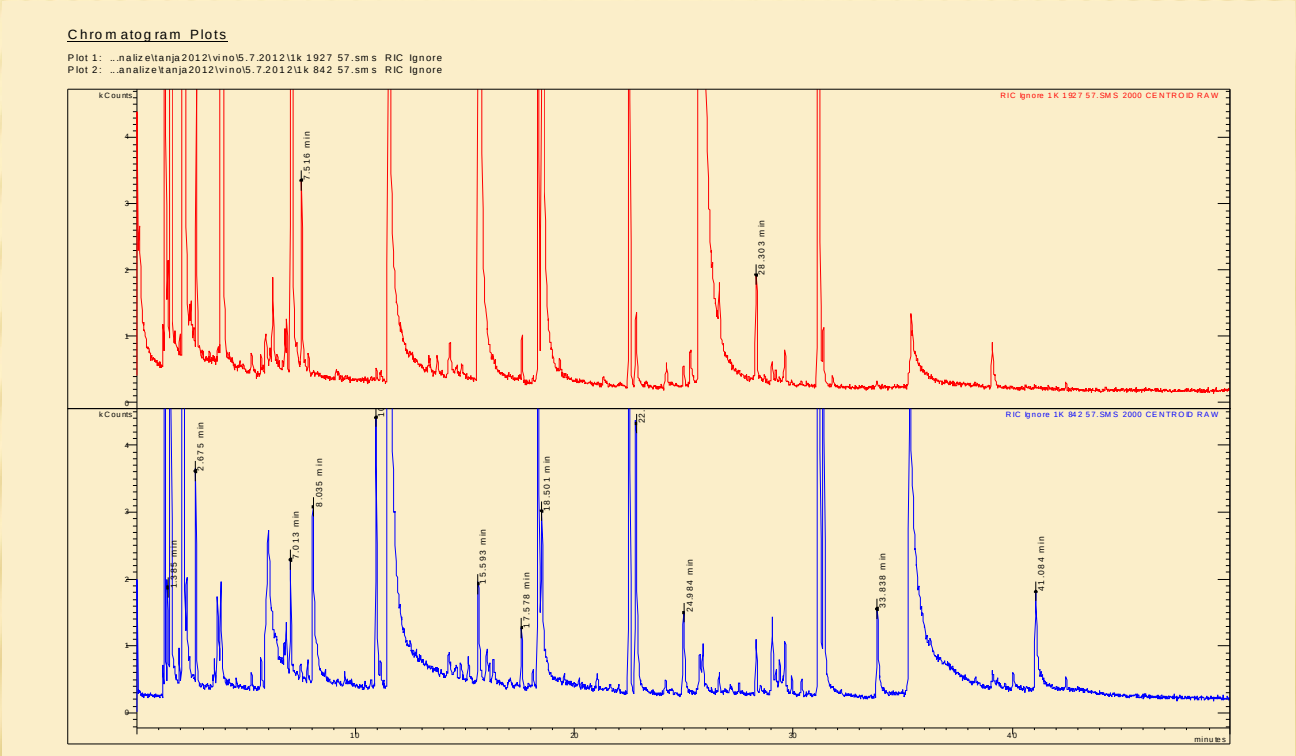
- According to results there were 18 volatiles determined by SPME-GC/MS and 9 alcohols and esters taken into consideration

Challenge is to find the reason back in technological process



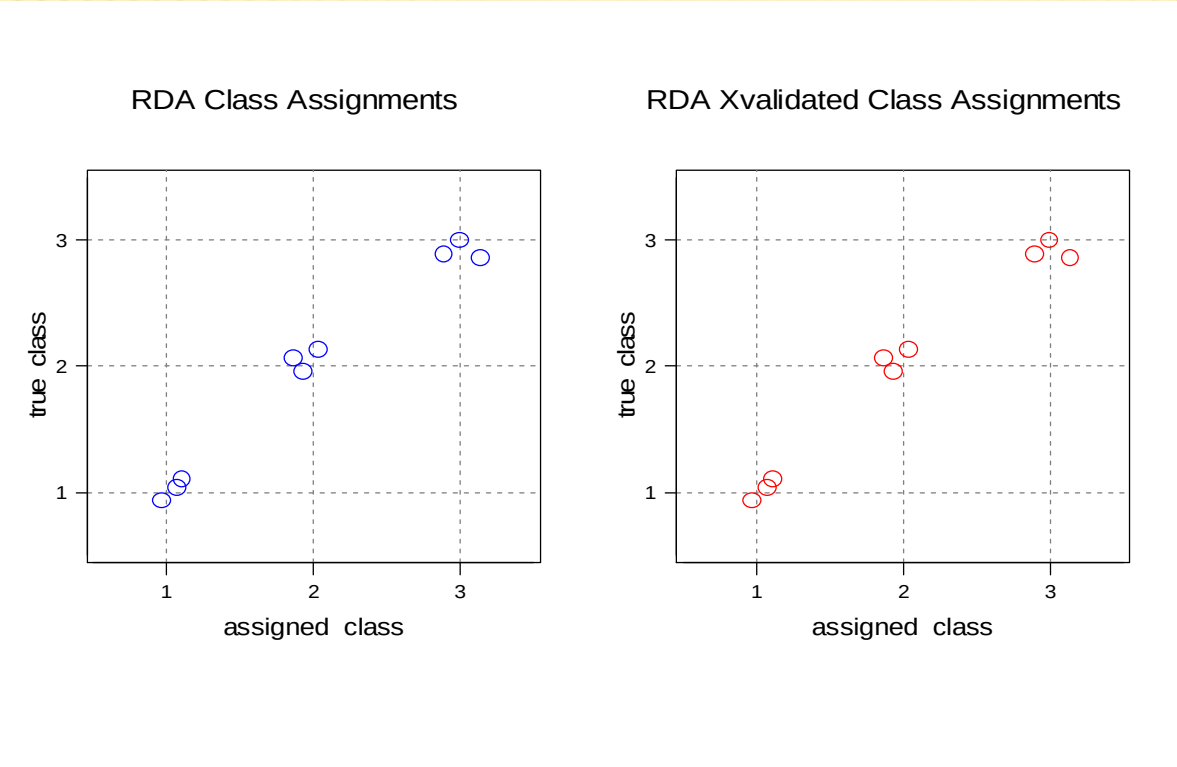
Ocvirk M., Kočar Mlinarič N., Košir I. J. 2018b. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by GC and GC/MS. *J.Sci.FoodAgric.*, DOI: 10.1002/jsfa.8840

BEER – DIFFERENT PRODUCTION SITE – AROMA PROFILES



GC/MS chromatogram of aroma profile

BEER – DIFFERENT PRODUCTION SITE – AROMA PROFILES



RDA classification of samples from 3 DIFFERENT production plants of the same brand of beer of the same producer

Gluten-free beer-like beverages

- The goal is to produce beer-like fermented beverage similar to barley beer.
- Use of enzymes that degrade gluten - expensive
- Use of cereals/pseudocerials without gluten at all

- Problem is completely different nutritional composition ⟹ different taste and aroma

Gluten-free beer-like beverages

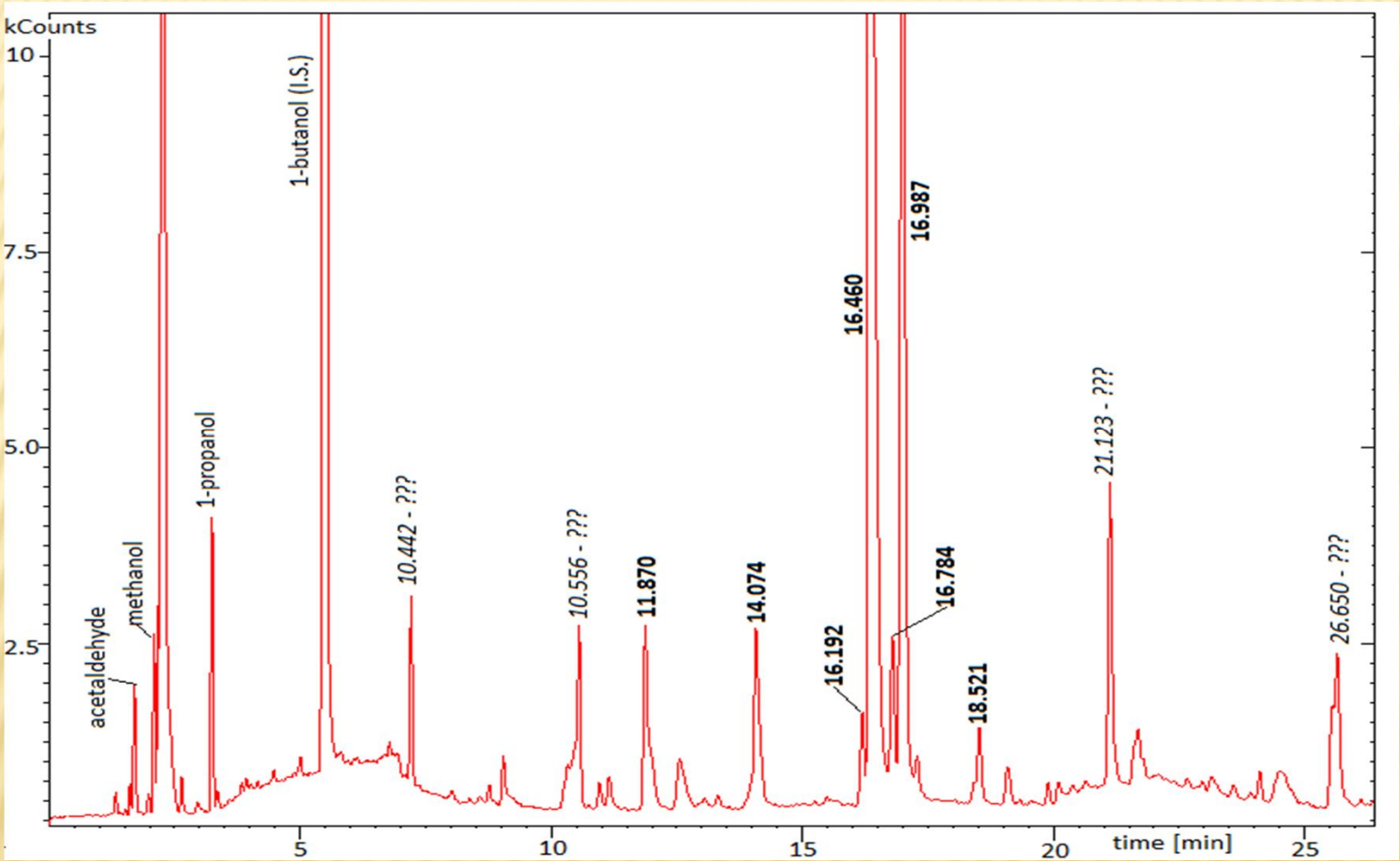
- Analysis of volatile part of aroma using steam distillation as sample pretreatment by GC-FID

⇓

- Many peaks in chromatograms of unknown identity
- Use of GC-MS:
  - 1. step: identification of unknown compounds
  - 2. step: quantification with appropriate standard compounds as external addition if exist

Deželak M., Zarnkow M., Becker T., Košir I.J. Processing of bottom-fermented gluten-free beer-like beverages based on buckwheat and quinoa malt with chemical and sensory characterization. *Journal of the Institute of Brewing*, ISSN 2050-0416, 2014, vol. 120, iss. 4, str. 360-370.

Gluten-free beer-like beverages



Many „new“ compounds present in comparison to standard barley beer.

Gluten-free beer-like beverages

matrix	compound
wort	2,3-dimethyl pyrazine
	2,6-dimethyl-4-pyridinamine
	2,6-dimethyl-3-pyridinamine
	2,5-dimethyl-3-(2-methylbutyl) pyrazine
	2-butyl-3,5-dimethyl pyrazine
	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine
	5-ethyl-2,3-dimethyl pyrazine
	2,6-diethyl pyrazine
	3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine
	N-N-dimethyl-O-(1-methylbutyl) hydroxylamine
	3-furaldehyde
	2-furaldehyde
	tetramethyl pyrazine
	1-(2-furanyl) ethanone
beverage	2,3-dimethyl pyrazine
	2,6-dimethyl-3-pyridinamine
	2,6-dimethyl-4-pyridinamine
	tetramethyl pyrazine
	3-furan methanol
	2-furan methanol

Pyrazine derivatives

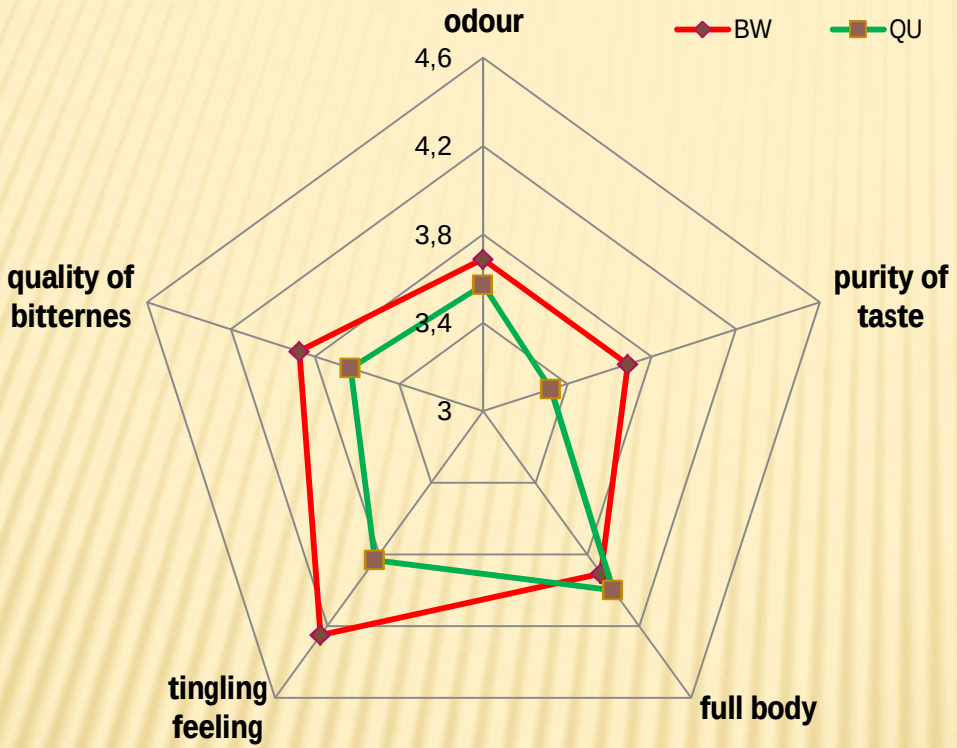
- From amino acids and vicinal diketones

Pyrimidinamine derivatives

- From alkaloids and proteins

Furan derivatives

Sensory analysis



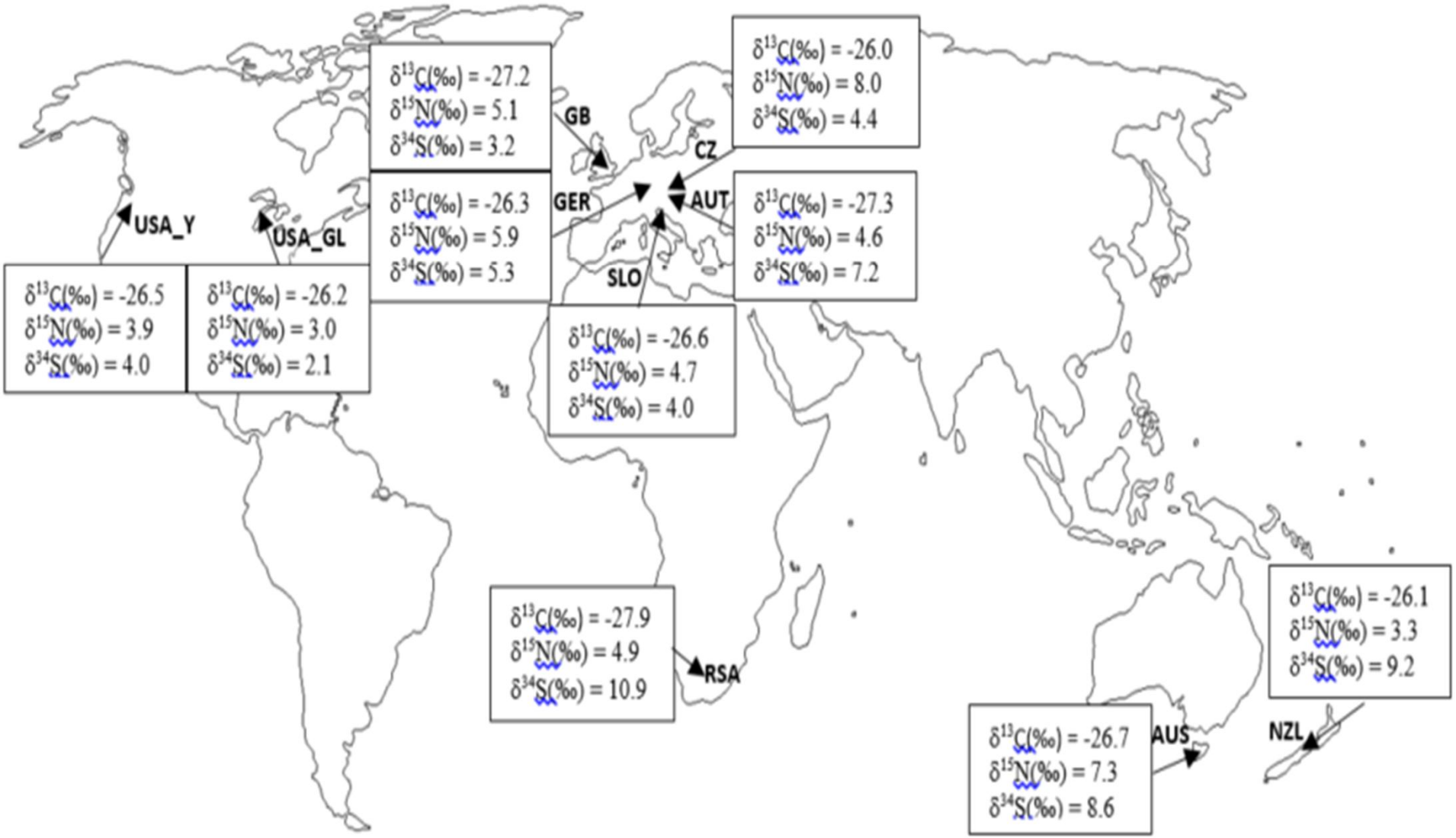
Nutty taste and aroma.

Aroma of buckwheat beverage is close to the barley beer and could be accepted in the future, while quinoa beverage is much different, yet it could be used as a functional food with high nutritional value and low alcohol.

Raw materials origin (hops)

- Determination of $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ and ^{34}S by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS).
- Sampling:
  - 77 hop samples from 10 most important hop growing regions in the world
  - Samples of different parts of hop cones (green part, bitter resins, essential oils) and different products (cones, pellets, CO_2 extracts)

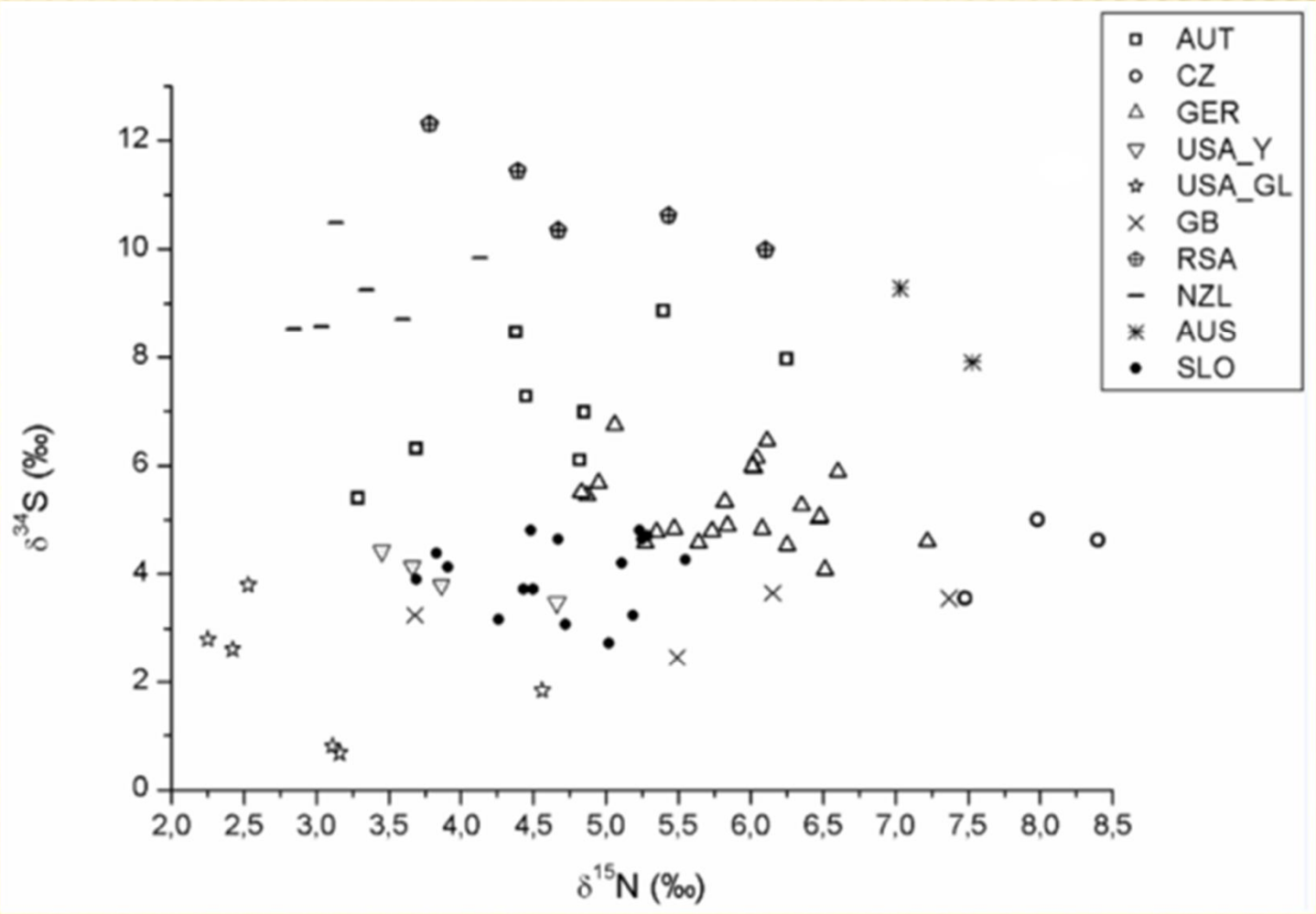
Ocvirk M., Ogrinc N., Košir I. J. 2018. Determination of the geographical and botanical origin of hops (*Humulus lupulus* L.) using stable isotopes of C, N and S. Journal of Agricultural and Food Chemistry, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b06010, *J. Agric. Food Chem.* **2018** *66* (8), 2021-2026



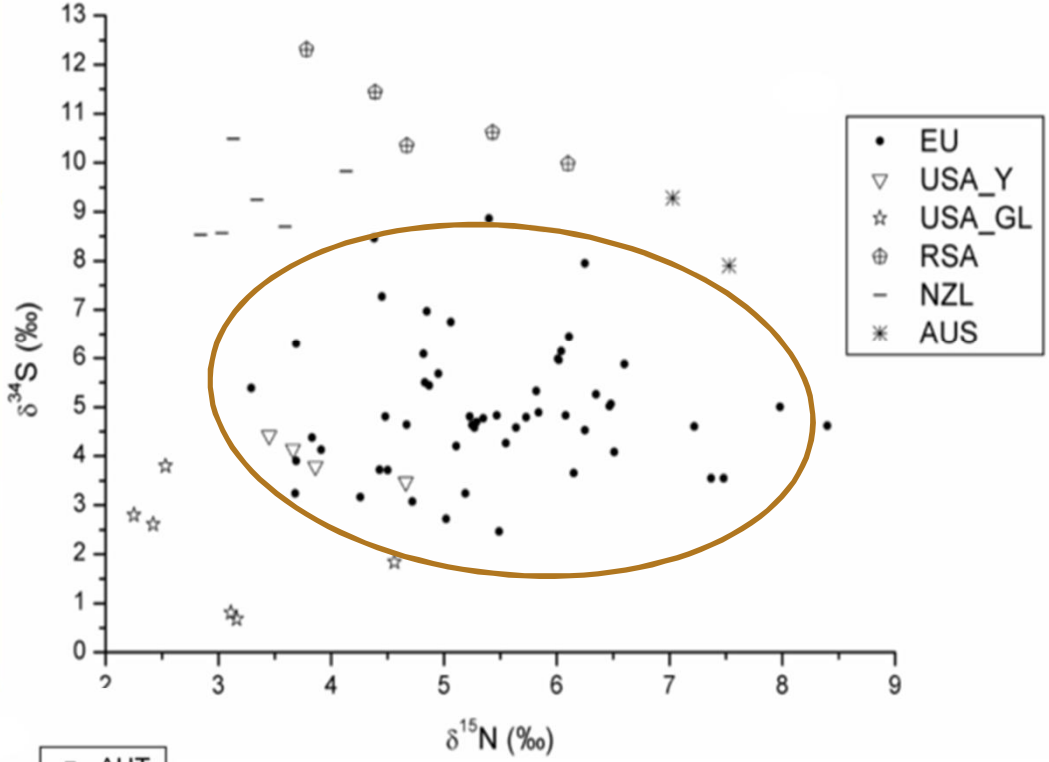
- $\delta^{34}S$ in South hemisphere are significantly higher.
- $\delta^{15}N$ are lower in USA and AUS samples (2,2 ‰ do 4,7 ‰) in comparison to European samples (3,3 ‰ do 8,4 ‰).

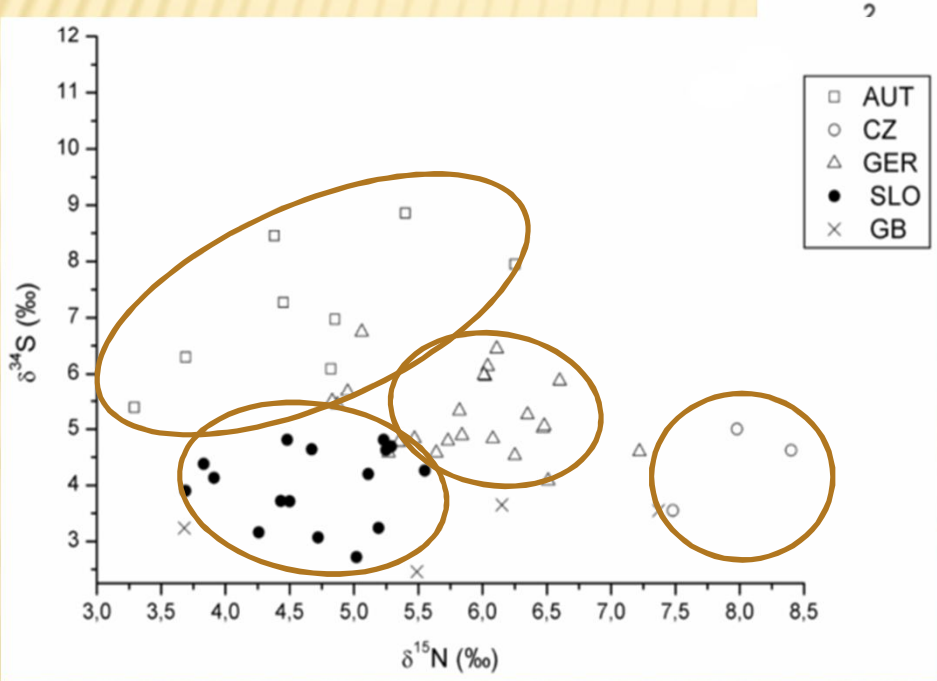
Distribution of samples according to their $\delta^{15}N$ / $\delta^{34}S$ values

- AUS, NZL, JAR, USA_GL, AUT and CZ have their own separate groups
- Partly separated groups of samples from D, SLO, USA_Y and GB are in the center



Distribution of samples according to their $\delta^{15}N$ / $\delta^{34}S$ values in EU and other samples





Distribution of samples according to their $\delta^{15}N$ / $\delta^{34}S$ values inside Europe

CONCLUSIONS

- Classification of appropriate samples and samples with minor deviations in aroma gave comparable results between „classical“ sensorial and chemical analysis
- Chemical analysis is:
  - Relatively simple ✓
  - doesn‘t need a sensorial panel, ✓
  - Free of „human“ factor ✓
  - For each type of beer a new data base is needed.

- GC/MS proved to be a good choice for analyzing complex volatile aroma matrices

CONCLUSIONS

Gluten-free beer-like beverages from malted buckwheat and quinoa have good commercial potential as a healthy functional drinks more than a substitute of beer

The use of stable isotopes ratios of $\delta^{15}N$ and $\delta^{34}S$ could be used as a new powerful tool for differentiating hops according to geographical origin and can be of use to the brewing industry or to hop traders in resolving issues relating to authenticity. The methodology is straightforward, fast, and cheap, relative to standard GC or HPLC techniques and does not need any special sample pretreatment except for weighing the samples.

Thank you for your attention