

# Energijska vrijednost i stabilnost boje tijekom ubrzanog starenja raznih vrsta craft piva

---

**Klinar, Marijan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:492060>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marijan Klinar**

7177/PT

**ENERGIJSKA VRIJEDNOST I STABILNOST BOJE  
TIJEKOM UBRZANOG STARENJA RAZNIH VRSTA CRAFT  
PIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija 2**

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

**Zagreb, 2019.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Energijska vrijednost i stabilnost boje tijekom ubrzanog starenja raznih vrsta craft piva

*Marijan Klinar, 0058208086*

**Sažetak:** Pivo, kao popularno alkoholno piće, velik je dio prehrane opće populacije i kao takvo izvor energije. Energiji u pivu najviše doprinose alkohol, ugljikohidrati i proteini. Craft pokret Hrvatskoj rezultirao je otvaranjem novih pivovara i raznovrsnije ponude pivskih stilova na tržištu. Za određivanje energijske vrijednosti piva postoje analitičke metode propisane od strane raznih institucija i metode u zakonskim propisima. U ovom radu određivala se energetska vrijednost pet pivskih stilova jedne zagrebačke craft pivovare. Uz to analitičkim metodama određivali su se pH, mikrobiološka čistoća uzoraka, alkohol, konačni ekstrakt, sadržaj CO<sub>2</sub> te gorčina. Piva su se također ubrzano starila kako bi se odredila promjena intenziteta boje tijekom skladištenja. Za smanjenje moguće nestabilnosti boje piva preporučeno je skladištenje piva bez prisustva kisika pri niskim temperaturama.

**Ključne riječi:** craft pivo, udjel kalorija, energijska vrijednost, test ubrzanog starenja

**Rad sadrži:** 36 stranica, 17 slika, 3 tablica, 39 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** : Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

**Datum obrane:** 18. 9. 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of biochemical engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Energy value and color stability in forced aged of various craft beers**

***Marijan Klinar, 0058208086***

**Abstract:** Beer is a very popular alcoholic drink, and as such a big part of the diet for many people. For those reasons it is a big contributor to the total energy uptake of a person. Alcohol, carbohydrates and proteins are biggest contributors to the total energy value of beer. A lot of new breweries were opened because of Craft movement in Croatia, and with them the diversity of beer styles on the market increased. For calculation of energy value in beer there exist several analytical methods defined by various institutions and prescribed in legislative rules. In this paper energy values of five beers from one craft brewery from Zagreb were determined. In addition to that pH, microbiological composition of the samples, alcohol, CO<sub>2</sub> content and bitterness were all analytically determined. The beers were also forced aged to determine change of colour intensity during storage. Beer storage in the absence of oxygen and at low temperature is recommended so as to minimize beer color instability.

**Keywords:** Craft beer, Caloric content, Energy value, Forced ageing

**Thesis contains:** 36 pages, 17 figures, 3 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Sunčica Beluhan, PhD

**Defence date:** 18. 9. 2019.

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1 Sastav piva .....	3
2.2 Energijska vrijednost .....	3
2.3 Određivanje energijske vrijednosti .....	4
2.4 Ubrzano starenje piva .....	6
2.5 Boja piva .....	8
2.6 Mikrobiologija piva.....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA.....</b>	<b>15</b>
3.1. Ciljevi i tijek istraživanja .....	15
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1. Materijali .....	17
3.1.1. Uzorci piva .....	17
3.1.2. Hranjive podloge za mikrobiološku kontrolu uzoraka piva.....	17
3.2. Aparati .....	18
3.3. Metode istraživanja.....	19
3.3.1. Određivanje kakvoće piva .....	19
3.3.2. Analitičke metode .....	21
3.3.3. Mikrobiološka ispitivanja.....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>23</b>
4.1. Kemijsko-fizikalna analiza piva .....	23
4.2. Energijska vrijednost piva.....	23
4.3. Boja piva .....	24
4.4. Mikrobiološka provjera istraživanih piva .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>33</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>34</b>

## 1. UVOD

Craft pivovare i craft pivo pojmovi su koji su se na hrvatskom tržištu piva pojavili relativno nedavno. Prve pivovare u Hrvatskoj koje se tako nazivaju osnivaju se i otvaraju 2013. godine, a val otvaranja prvih takvih pivovara krenuo je u SAD-u krajem sedamdesetih godina prošloga stoljeća. Craft u suštini označuje malu proizvodnju, neovisnu proizvodnju, povratak tradicionalnijim *a/e* pivskim stilovima, usredotočenost na kvalitetu te raznovrsniju ponudu od one koju imaju velike korporativne industrijske pivovare. Danas je broj craft pivovara u Hrvatskoj, prema portalu Ratebeer, oko 80. Energijska vrijednost, odnosno, nutritivna deklaracija, prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. godine o informiranju potrošača o hrani, obavezno se moraju označiti na određenim prehrambenim proizvodima. U članku 10. stavku 4 te Uredbe navedeno je da navođenje nutritivne deklaracije nije obavezno za pića koja sadrže više od 1,2% vol. alkohola, u što spada velika većina piva (osim bezalkoholnih). Unatoč tome, problem pretilosti kao moderne bolesti dovodi do toga da potrošači sve više obraćaju pažnju na unos kalorija te žele biti informirani o energetske vrijednostima prehrambenih proizvoda. Pojavom craft pivovara na tržištu ponuda pivskih stilova značajno se povećala te su se stvorili uvjeti usporedbe kalorijskih vrijednosti među njima. Craft pivovara iz Zagreba čije uzorke smo testirali otvorena je 2015. godine, u vrijeme ispitivanja u stalnoj ponudi imala je 5 pivskih stilova koje smo testirali: *Pale ale*, *India pale ale (IPA)*, *Pilsner*, *Stout* te *Citrus india pale ale (CIPA)*. Nutritivna deklaracija iznosi se na način da se odredi i popiše količina pojedinih hranjivih sastojaka u proizvodu te se korištenjem faktora pretvorbe za izračun energetske vrijednosti dane ranije spomenutom uredbom Europskog parlamenta dolazi do energetske vrijednosti proizvoda. Za razliku od piva proizvedenih u velikim industrijskim postrojenjima, craft piva obično se nakon vrenja ne podvrgavaju tretmanima stabilizacije piva kao što su pasterizacija i filtracija. To je iz razloga što se tim procesima gubi dio arome i okusa u pivu, ali i zbog toga što male craft pivovare obično ne raspolažu financijskim sredstvima kao velike pivovare koje su u vlasništvu korporacija. Ne provođenjem tih procesa očuva se okus piva, ali se stvara rizik od porasta mikroorganizama u gotovom proizvodu koji mogu dovesti do nepoželjne promjene okusa i zamućenja kod svijetlih piva. Također, ukoliko se kvasci ne izdoje iz piva nakon fermentacije njegov rok trajanja smanjuje se zbog mogućnosti da kvasci autoliziraju, ostavljajući za sobom neugodne okuse u pivu te moguće probavne probleme kod potrošača.

U ovom istraživanju bavili smo se i ubrzanim starenjem piva kako bismo vidjeli postojanost boje piva pri skladištenju. Primarni cilj ovog rada je određivanje i usporedba kalorijskih vrijednosti raznih craft piva male zagrebačke craft pivovare, uz mikrobiološku analizu svježih uzoraka piva te ubrzano starenje kojim se određivala postojanost boje piva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Sastav piva

Kao slabo alkoholno piće, pivo se uglavnom sastoji od vode. Količina vode u pivu obično iznosi 91 - 98% (neki stilovi kao što je ječmeno vino imaju i 89%) (Briggs i sur. 2004). Udio vode, kao i ostalih tvari koje se nalaze u pivu, varira od stila do stila i ovisi o količini početnog i završnog ekstrakta. Na primjer, gotovo pivo donjeg vrenja od ekstrakta u osnovnoj sladovini 12% masenog udjela suhe tvari sadrži 4 - 4,5% neprevrelog ekstrakta, 3,8 - 4,2% masenog odnosno 4,7- 5,2% volumnog udjela alkohola, 0,42 - 40,55% masenog udjela CO<sub>2</sub>, te 90 - 92% masenog udjela vode. Neprevreli ekstrakt sastoji se od 80-85% ugljikohidrata, 4,5 - 5,2% proteina, 3,5% glicerina, 3 - 4% minerala, 2 - 3% tanina i tvari gorčine i boje, 0,7 - 1% organskih kiselina te relativnog malog udjela vitamina (Gresser , 2009). Spojevi u pivu mogu se podijeliti u hlapive i nehlapive. Za *bouquet*, odnosno aromu piva zaslužni su hlapivi spojevi koji imaju veći tlak para od nehlapivih. U nehlapive spojeve spadaju anorganske soli, šećeri, aminokiseline, nukleotidi, polifenoli i hmeljne smole, kao i makromolekule kao što su polisaharidi, proteini te nukleinske kiseline (Briggs i sur., 2004). Uz vodu, ostali hlapivi spojevi u pivu su: alkoholi i njihovi derivati: viši alkoholi, hlapljive organske kiseline (octena i mravlja), esteri, aldehidi i vicinalni diketoni te plinovi: CO<sub>2</sub> i zrak (kisik i dušik) (Gresser, 2009). Navedeni spojevi su oni koji se nalaze u najvećim koncentracijama, pošto je pivo kompleksna mješavina iz koje je karakterizirano preko 450 sastojaka (Briggs i sur. 2004).

### 2.2 Energijska vrijednost

Ugljikohidrati, masti i proteini glavni su izvori energije za rad ljudskog organizma (Bamforth, 2004). U pivu, sastojci koji najviše doprinose ukupnoj energetske vrijednosti su ugljikohidrati i alkohol, ali i proteini (Olšovská i sur., 2015). Energija u prehrambenim proizvodima kvantificira se pomoću kalorija, pri čemu je jedna kalorija jednaka količini topline potrebne da bi se za jedan stupanj Celzijev povisila temperatura jednog grama vode. Kalorija nije jedinica iz SI sustava te bi za kvantifikaciju ispravnije bilo koristiti Joule (odnosno kilojoule), ali su kalorije (odnosno kilokalorije) u široj upotrebi kada se govori o energiji dobivenoj iz hrane (Bamforth, 2004).



## 2.3 Određivanje energijske vrijednosti

Određivanje energijske vrijednosti piva nije potrebno zbog informiranja potrošača, odnosno nije ju obavezno istaknuti na deklaraciji (Parlament EU, 2011). Bez obzira na to, ono je bilo i ostalo od interesa raznim analitičarima te su razvijeni različiti pristupi kako ga provesti. Ti postupci definirani su u pivarskim analitičkim metodama razvijenim od strane raznih institucija (EBC<sup>1</sup>, MEBAK<sup>2</sup> i ASBC<sup>3</sup>) i u zakonskim propisima. Jedan od načina određivanja je korištenjem kalorimetra, uređaja koji direktno mjeri ukupnu ili bruto energijsku vrijednost raznih makronutrijenata u hrani (Olšovská i sur., 2015). Princip na kojem radi ovaj uređaj je direktna kalorimetrija, potpunim spaljivanjem hrane i mjerenjem oslobođene topline izgaranja (Olšovská i sur., 2015; McArdle i sur., 2010). Izmjerena oslobođena toplina izgaranja odnosi se na toplinu oslobođenu pri oksidaciji specifične namirnice te predstavlja njenu ukupnu energijsku vrijednost. Nedostatak ove metode je što se mogu određivati samo kalorijske vrijednosti čvrste hrane (Olšovská i sur., 2015; Merrill i Watt, 1974). Međutim, 'prava' energijska vrijednost koja se odnosi na određenu hranu ovisi o tome koliko su te izmjerene kalorije dostupne ljudskom organizmu. Ako je određeni sastojak prisutan u velikim količinama u namirnici ne znači da će nužno dospjeti u organizam. To ovisi o više faktora, uključujući oblik u kojem se nutrijent nalazi u namirnici te kakva je njegova probavljivost (Bamforth, 2004). Drugi način određivanja autori su dobili korištenjem infracrvenog spektra za određivanje energijske vrijednosti i koncentracije ugljikohidrata u pićima na bazi voća i u pićima na bazi mlijeka (Olšovská i sur., 2015; Moros i sur., 2005). Korištenjem statističkih metoda uspjeli su pronaći vezu između apsorbancije tih pića u raznim dijelovima infracrvenog spektra i vrijednosti količine ugljikohidrata i energijske vrijednosti namirnice (Olšovská i sur., 2015). Olšovská i sur. u svojem radu iz 2015. uspoređuju dva pristupa određivanju energijske vrijednosti piva: direktnim računskim metodama i računskom metodom. Računska metoda određivanja energijske (kalorijske) vrijednosti piva standardna je metoda određivanja koja koristi matematičku jednadžbu, gdje se ukupna energijska vrijednost hrane ili pića računa kao suma energijske vrijednosti značajnih komponenti analitički određenih relevantnim metodama (Olšovská i sur., 2015). Jednadžba se zasniva na činjenici da nisu sve energijski značajne komponente jednako probavljive te da se njihovom probavom oslobađaju različite vrijednosti energije po jedinici mase. Tako ugljikohidrati, kao što su škrob i saharoza,

---

<sup>1</sup> *European Brewery Convention*

<sup>2</sup> *Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission*

<sup>3</sup> *American Society of Brewing Chemists*

moгу biti skoro u potpunosti probavljени i oksidirani u organizmu i pripisana im je kalorijska vrijednost od 3,75 kcal/g. Masti mogu biti probavljene do 95%, ali organizmu su veći izvor energije (9 kcal/g) jer su manje oksidirane od ugljikohidrata. Proteini su različito probavljivi ovisno o vrsti, a pripisana im je slična energetska vrijednost kao i ugljikohidratima, 4 kcal/g. Potpuno probavljiva tvar koja je bogat izvor energije u pivu je etanol, koji ima kalorijsku vrijednost od 7 kcal/g (Bamforth, 2004). Računska metoda, odnosno faktori pretvorbe količine makronutrijenata u energijsku vrijednost, propisana je u Uredbi (EU) br. 1169/2011, ali je potrebno puno rada, sredstava i vremena kako bi se provela jer zahtjeva korištenje različitih analitičkih metoda kako bi se odredili pojedini makronutrijenti. Formula za pretvorbu količine makronutrijenata u energijsku vrijednost je:

$$EV \text{ (kJ/100 g)} = 17 \times c_{\text{ugljikohidrati}} + 10 \times c_{\text{polioli}} + 17 \times c_{\text{bjelančevine}} + 37 \times c_{\text{masti}} \\ + 29 \times c_{\text{alkohol(etanol)}} + 13 \times c_{\text{organske kiseline}} + 8 \times c_{\text{vlakna}}$$

Dobivena energijska vrijednost je u kilojoulima (kJ), a poveznica između kilojoula i kilokalorija (kcal) je 1 kcal = 4,1868 kJ (Olšovská i sur., 2015; Uredba (EU) 1169/2011, 2011).

Pojednostavljene metode određivanja energijske vrijednosti, u kojima nije potrebno analitički odrediti sve makronutrijente u pivu, razvijene su od strane pivarskih konvencija i udruženja kao što su već spomenuti EBC, MEBAK i ASBC. Tzv. direktne računске metode brze su, jednostavne i lako izvodljive, ali ne pružaju točne rezultate za neke tipove piva (npr. bezalkoholna piva ili slabo alkoholna piva dobivena miješanjem standardnog piva i bezalkoholnih voćnih sokova („radleri“)). EBC metoda 9.45 namijenjena je pojednostavljenom procjenjivanju energijske vrijednosti piva na osnovu količine alkohola i pravog ekstrakta piva. Analizatori piva uglavnom su opremljeni *softwareom* koji direktno računa energijsku vrijednost piva iz pravog ekstrakta, alkohola i izmjerene gustoće prema formuli:

$$EV_{dir} \text{ (kJ/100 mL)} = \rho \times (15 \times E_r + 29 \times c_{\text{alkohol}})$$

Gdje je  $\rho$  gustoća piva (g/mL),  $E_r$  pravi ekstrakt u % tež./tež., a 15 aproksimirani faktor pretvorbe koji u obzir uzima sve važnije komponente ekstrakta kao što su ugljikohidrati i proteini, glicerol,  $\beta$ -glukani, organske kiseline, aminokiseline, fenolni, sumporni, heterociklički i anorganski spojevi itd. (Olšovská i sur., 2015; EBC, 2009). MEBAK metoda 2.10.3.7 (MEBAK, 2012) pruža dvije alternativne metode određivanja energijske vrijednosti. Jedna metoda bazira se na izračunu energijske vrijednosti baziranom na preostalim koncentracijama ugljikohidrata, proteina i alkohola u pivu:

$$EV_{\text{kalk}} (\text{kJ}/100 \text{ mL}) = 17 \times c_{\text{ugljikohidrati}} + 17 \times c_{\text{proteini}} + 29 \times c_{\text{alkohol}}$$

dok se druga bazira na istoj, ranije navedenoj, aproksimativnoj jednadžbi opisanoj u EBC *Analytica* (Olšovská i sur., 2015; MEBAK, 2012). ASBC metoda (ASBC, 2009) daje drugu jednadžbu izračuna koja ispravlja vrijednost pravog ekstrakta kao mjeru sume ugljikohidrata i proteina:

$$EV_{\text{ASBC}} (\text{kcal}/100 \text{ g}) = 6.9 (A) + 4 (B - C)$$

gdje je A maseni udio alkohola (% tež./tež.), B (% tež./tež.) pravi ekstrakt i C (% tež./tež.) udjel pepela u pivu (Olšovská i sur., 2015; ASBC, 2009). Može se vidjeti da se sve navedene direktne računске metode temelje na činjenici da su makronutrijenti koji najviše doprinose ukupnoj energijskoj vrijednosti piva alkohol, ugljikohidrati i proteini. Određivanjem alkohola i ekstrakta, koji se uglavnom i sastoji od ugljikohidrata i proteina, može se dobiti vrlo točna aproksimacija energijske vrijednosti piva. Mnogi laboratoriji koji se bave analizama piva opremljeni su analizatorima koji lako određuju alkohol i koncentraciju pravog ekstrakta. Alkohol se određuje pomoću NIR (*near infra red*) analizatora i mjerenja pravog ekstrakta dobivenog iz izmjerene gustoće (Olšovská i sur., 2015).

## 2.4 Ubrzano starenje piva

Pivo nakon fermentacije je proizvod podložan promjenama s vremenom. To je zbog njegove kemijske strukture koja je dinamični sustav. Taj fenomen, nazivan i „nestabilnost okusa“ ili „ustajalost piva“, je kompleksan proces zbog raznih različitih oksidacijskih i ne oksidacijskih reakcija koje se odvijaju (Lehnhardt i sur., 2018). Tijekom skladištenja može se odviti niz reakcija koje uključuju razne spojeve, stoga za ustajalost piva nije odgovoran jedan spoj već niz produkata iz različitih reakcija (Lehnhardt i sur., 2018; Meligaard, 1972). Posljedice tih reakcija moguće su promjene prvenstveno u aromi, ali i u boji piva. Starenje svijetlih lager tipa piva dobro je istraženo zbog njihove masovne proizvodnje, ali i jer su mu posebno podložni (Lehnhardt i sur., 2018; Baxter i Huges, 2001). Tijekom starenja, gorčina piva se smanjuje, a pojačavaju se slatkasti i karamelni okusi. Okus na karton, kao i okus „na mačke“ (koji s vremenom može i nestati), mogu se razviti tijekom skladištenja kao i okusi na kruh, drvo i *sherry*. Zaključno, svježije arome i efekti maskiranja se smanjuju (Lehnhardt i sur., 2018; Saison i sur., 2009). Kako pivari nemaju vremena čekati nekoliko mjeseci da bi se dogodile prve promjene u skladištenom pivu, razvijen je tzv. *forcing test*, odnosno test ubrzanog starenja piva kako bi se ubrzali procesi koji se događaju tijekom prirodnog starenja

piva i na taj način predviđela njegova stabilnost (odnosno rok trajanja) (Lehnhardt i sur., 2018). Uz prisutnost kisika, temperatura skladištenja smatra se najvećim razlogom promjene okusa, odnosno stabilnosti arome (Lehnhardt i sur., 2018; Bamforth i Lentini, 2009). Prema Arrheniusovom zakonu, za povećanje temperature od 10 Kelvina povećavaju se brzine reakcije za faktor 2 - 3. Međutim nemaju sve reakcije jednake energije aktivacije i stoga se njihova brzina ne povećava jednako (Lehnhardt i sur., 2018; Vanderhaegen i sur., 2006). Posljedično tome, što je viša temperatura skladištenja, veća je razlika od prirodnog starenja koje se događa pri skladištenju piva na 4 ili 20°C (Lehnhardt i sur., 2018). Li i sur. u svojem radu iz 2015. godine potvrdili su da ustajao okus koji se razvija starenjem piva rezultira u promjenama očekivanog okusa piva, a u većini slučajeva rezultira stvaranjem nepoželjnih aroma i okusa (tzv. *off-flavours*). Također, zaključili su da temperatura skladištenja ima veliku ulogu u ubrzavanju starenja, pa tako pivo koje se skladišti jedan dan pri 50°C ima jednak razvoj ustajalih okusa kao pivo koje je skladišteno četiri tjedna na sobnoj temperaturi. Slično tome, ako se pivo skladišti jedan dan na 40°C razvoj ustajalih okusa je kao kod piva koje se skladišti na sobnoj temperaturi osam tjedana (Li i sur., 2015). Tako su testovi ubranog starenja i zamišljeni: pivo se obično skladišti pri temperaturama između 28 i 60°C tri dana do nekoliko tjedana. To je zato jer bi više temperature i dulje vrijeme skladištenja bili nepraktični za ispitivanje. Također, vrlo je česta trešnja uzoraka određeno vrijeme prije skladištenja kako bi se simulirao transport (Lehnhardt i sur., 2018; Eichhorn, 1991). Nakon skladištenja provode se testovi predviđanja roka trajanja ovisnog o stabilnosti okusa. Dio testova baziran je na senzorskoj procjeni piva, drugi dio baziran je na praćenju ili direktnom mjerenju novonastalih kemijskih vrsta u pivu kao indikatora ubranog starenja uzrokovanog toplinom. Također, postoje i grupe testova koje se baziraju na mjerenju slobodnih radikala ili redoks potencijala piva (Mikyška i sur., 2002).

Za slučajeve kada se ubrzanim starenjem ne želi ispitati stabilnost arome piva već druge karakteristike koje se mogu promijeniti skladištenjem, razvijene su modifikacije metode. Jedna od takvih karakteristika je koloidna stabilnost koja se očituje kao stabilnost piva na naknadno stvaranje mutnoće. Najčešće se provjerava ubrzanim starenjem, gdje se pivo prvo skladišti na visokim temperaturama (između 40 i 60°C) nekoliko dana te zatim na niskim (oko 0°C) određeno vrijeme. Mutnoća se provjerava u pravilnim intervalima nakon hladnog skladištenja. Rezultati se obično iskazuju kao dani toplog skladištenja dok mutnoća ne pređe 2 EBC jedinice. Glavni nedostatak takvog testiranja je što se veza između dobivenog rezultata i koloidne stabilnosti mora odrediti zasebno za svako pivo određene pivovare, što otežava uspoređivanje rezultata za različite uzorke piva (Anger i sur., 2009). U preglednom radu Lenhardta i sur. (2018) također se dovodi u pitanje vjerodostojnost ubranog starenja

piva kao metode određivanja roka trajanja piva obzirom na stabilnost okusa. Tvrdi se kako takvo ispitivanje daje nerealističnu sliku ustaljenosti okusa zbog razlika u brzinama odvijanja reakcija uzrokovanih povišenom temperaturom i odvijanja reakcija koje se ne bi odvile pri nižim temperaturama zbog visokih energija aktivacije. Također dolazi do zakiseljavanja piva zbog razgradnje spojeva i kataliziranja reakcija. Zaključeno je da zbog primjene visokih temperatura piva koja su ubrzano starena nisu usporediva s prirodno starenim pivima zbog različitih profila aroma koje nastaju. Stoga se za većinu uzoraka koji su stareni na temperaturama od 20 do 60°C ne može pronaći poveznica među njima. Navodi se da i zbog kompleksnosti fenomena kao što je starenje piva nije dovoljna jedna vrsta indikatora za potpuno opisivanje i predviđanje promjene okusa. Predlažu da se pronađe manje diskriminatorsna metoda za proučavanje stabilnosti okusa te da se, kako bi se dobila potpuna slika o starenju piva, više fokusa stavi na proučavanje vezanih aldehida (Lehnhardt i sur., 2018). Međutim, u već spomenutom radu Lia i sur. (2015), zaključuje se da je TBA vrijednost (količina 2-tiobarbutirne kiseline u pivu) u statistički značajnoj korelaciji sa intenzitetom ustajalog okusa piva, ali i da pokazuje velike varijacije između različitih piva (Li i sur., 2015).

## 2.5 Boja piva

Boja je bitna karakteristika piva jer uvelike određuje njegov stil. Način ukomljavanja i sastav sirovina (vode i slada prvenstveno) određeni su stilom piva koje se kuha, jer gotovo pivo mora imati odgovarajuću boju karakterističnu za svoj stil (Gresser, 2009). Na boju i aromu piva u velikoj mjeri utječe slad koji se koristi (Gresser, 2009; Back, 2005). Boja uglavnom nastaje zbog melanoidina i karamele iz slada i dodataka koji se koriste, ali daljnja karamelizacija može se dogoditi tijekom kuhanja sladovine. Ostali spojevi koji doprinose boji su oksidirani polfenoli, pogotovo u prisutnosti metala u tragovima kao što su bakar ili željezo. Žuti vitamin riboflavin (konc.  $<1 \mu\text{M}$ ) može značajno doprinijeti boji u svijetlim pivima (Briggs i sur., 2004). Kako bi se dobilo pivo tamnije boje mogu se koristiti tamni slad, tamni karamelizirani slad u količini od 3 do 5% ukupnog usipka, slad u boji u količini 5% ili manje te prženi slad. Što se tiče vode, korištenje tvrde vode sa višim alkalitetom rezultirat će pivom tamnije boje. Korištenjem mekše vode istaknut će se aromatski karakteri slada (Gresser, 2009; Back, 2005; Narziss, 1992). Do promjena u očekivanoj boji gotovog piva može doći zbog korištenja neprikladnih sirovina ili kvalitete vode, pogrešaka tijekom proizvodnje sladovine, nedovoljnog odvajanja tropa od sladovine ili loše fermentacije. Također, boja kod piva koja su punjena u boce te u sebi sadrže puno otopljenog kisika povećati će se za 0,5 do 1 EBC jedinice uz dobivanje lagane crvene nijanse (Gresser, 2009; Narziss, 2004). Boja piva



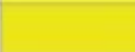






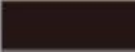
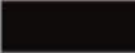

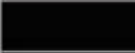

kvantificira se i mjeri standardnom referentnom metodom (SRM) kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbancija na 430 nm valne duljine (Beluhan, 2014). Mjerenje se provodi pri toj valnoj duljini jer njena apsorpcija najbolje odgovara utisku dobivenom ljudskim okom (Anger i sur., 2009). Kako bi se iz mjerenja dobila vrijednost, očitana apsorbancija množi se sa faktorom 12,7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama, koje se i češće koriste za opisivanje boje piva:

$$SRM = 12.7 \times D \times A_{430}$$

pri čemu je D faktor razrjeđenja. Veza između SRM i EBC jedinica je (Beluhan, 2014):

$$EBC = SRM \times 1.97$$

U ovom postupku važna je preciznost mjernog uređaja pa se tako razrjeđenja obično moraju provesti za tamne vrste piva kako bi vrijednost izmjerene apsorbancije bila ispod 1,0, a mutnoća uzorka ne smije prelaziti 1 EBC jedinicu te se u suprotnom uzorak mora filtrirati (Anger i sur., 2009). Spomenuto je da su boje piva karakteristične za pojedine vrste piva pa tako boja Pilsner tipa piva iznosi između 5,3 i 7,5 EBC jedinice, Dortmundski tip i snažna izvozna piva imaju iznos boje između 9,5 i 12 EBC jedinica, Wiener i Märzen tipovi između 18 i 30 EBC jedinica, a tamna piva između 45 i 95 EBC jedinica (Gresser, 2009), (Slika 1.).

SRM/Lovibond	Primjer	Boja	EBC
2	svijetli lager		4
3	Pilsner		6
4	Pilsner Urquell		8
6			12
8	pšenično		16
10	svijetli ale		20
13			26
17	tamni lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	vrhunski Stout		138

**Slika 1.** Tablica za izračunavanje boje sladovine i piva (Beluhan, 2014)

Problem kod mjerenja boje sladovina, piva i karamelnih otopina je što apsorpcijski spektar takvih otopina ne pokazuje maksimum te se boja stoga teže može izmjeriti. Lovibond je još 1893. razvio metodu određivanja boje uspoređivanjem boje piva sa serijom obojenih staklenih diskova. Problem kod takvog određivanja boje je subjektivno određivanje boja koje ovisi o ispitivačima, koji uz to moraju dobro razlikovati boje. Zbog toga je prihvaćeno već spomenuto spektrofotometrijsko određivanje boje na osnovu jedne valne duljine. Ono također ima svoje nedostatke jer daje ograničene informacije. Naime, u ljudskom oku stanice čunjići u središtu mrežnice reagiraju ili na crveno (600 nm), zeleno (550 nm) ili plavo (450 nm) svjetlo i šalju tri signala u mozak koji se tamo integriraju i interpretiraju kao boja (Briggs i sur., 2004). Kao rezultat toga, piva kojima su određene iste vrijednosti boje u EBC jedinicama ili metodom vizualnog uspoređivanja sa standardnim obojenim diskovima u Lovibondovom komparatoru pokazala su različite kvalitativne vrijednosti u svojem području vidljivog spektra (Smedley, 1995). Zbog toga se sve više istražuju načini mjerenja koji bi uključivala sve tri stimulirajuće valne duljine, odnosno ispitivanja na osnovu više valnih duljina. Takva mjerenja dakle mogu pronaći razlike između piva kojima su izmjerene jednake vrijednosti boje u EBC jedinicama (Briggs i sur., 2004; Smedley, 1995). Boja gotovog piva nije konstantna te je, kao i aroma, podložna promjenama tijekom skladištenja, odnosno starenja piva. Vanderhaegen i sur. (2007) dokazali su da se tijekom skladištenja EBC jedinice piva povećavaju sa vremenom. Pripisali su to obojenim molekulama nastalih uglavnom iz Maillardovih reakcija i reakcija oksidacije polifenola. Veće povećanje u boji nađeno je kod uzoraka piva tamnije boje ili višeg udjela alkohola. To je zato što su Maillardove reakcije izražajnije tijekom starenja takvih vrsta piva (Vanderhaegen i sur., 2007). Callemien i Collin (2007) u svojem radu ustvrdile su da osim Maillardovih reakcija strukturne promjene flavan-3-ol monomera također uzrokuju promjenu boje piva pri skladištenju. U njihovom eksperimentu, uzorci piva punjeni su ili u staklene ili plastične (PET) boce te skladišteni u mraku pri 20°C na godinu dana. Tijekom tog perioda boja se u svim uzorcima povećala, a izraženije u uzorcima koji su skladišteni u plastičnim bocama. Pripisale su to tome što je PET ambalaža propusnija za zrak. Svi dobiveni rezultati pokazali su da bi kisik mogao biti limitirajući faktor u dodatnom razvoju boje. Zaključile su da korištenje staklene boce ili povećana antioksidativna aktivnost minimiziraju reakcije degradacije odgovorne za promjenu boje piva (Callemien i Collin, 2007).

## 2.6 Mikrobiologija piva

Mikroorganizmi, prvenstveno kvasci, u gotovom su pivu neizbježna pojava (ukoliko se ne uklone) jer je ono proizvod dobiven fermentacijom. Za većinu piva koja se mogu pronaći na tržištu, sojevi kvasaca roda *Saccharomyces* jedina su mikrobna komponenta piva te se bilo kakva odstupanja u tom smislu smatraju greškom (Bokulich i Bamforth, 2013). Mikrobnim uzročnicima kvarenja piva, mogu biti i bakterije i kvasci, mogu uzrokovati nastanak zamućenja, nepoželjnih okusa i aroma piva. To može dovesti do toga da pivo više nije poželjno za konzumiranje, ali rast kontaminanata generalno ne dovodi do rizika za zdravlje potrošača jer patogeni mikroorganizmi ne preživljavaju u pivu (Briggs i sur., 2004). Pivo je općenito relativno loš medij za rast mikroorganizama. Već nakon inokulacije sladovine kvascem, uvjeti rasta kontaminirajućih mikroorganizama postaju nepovoljni jer, uz pretpostavku da se nalaze u malim količinama, ne uspijevaju prevladati u kompeticiji za nutrijente s kvascima (Briggs i ostali, 2004). Karakteristike gotovog piva, koje su posljedica provedene fermentacije, ne stvaraju povoljne uvjete za rast većine mikroorganizama. Tako prosječno gotovo pivo sadrži etanol (snažni inhibitor mikrobnog rasta) u koncentraciji od oko 5 vol. %, antimikrobne spojeve dobivene iz hmelja, visoke koncentracije CO<sub>2</sub> (anaerobna atmosfera), niski pH (oko 4,5) i količina otopljenog kisika kao i koncentracija rezidualnih nutrijenata (Bokulich i Bamforth, 2013; Briggs i sur., 2004; Back, 2009). Postoji nedostatak iskoristivih šećera i aminokiselina, ali oko 20% svih reducirajućih šećera u sladovini dobivenoj isključivo iz slada sastoji se od nefermentabilnih oligosaharida koji nakon fermentacije zaostaju u pivu te predstavljaju potencijal za poticanje mikrobnog kvarenja (Bokulich i Bamforth, 2013; Back, 2009). Od procesnih parametara koji smanjuju mikrobni rast u pivu koje fermentira su i uglavnom niže temperature fermentacije (Back, 2009). Strogo određeni uvjeti pri kojima pivo fermentira selektirali su samo određene skupine bakterija i kvasaca koji mogu rasti u njemu (Bokulich i Bamforth, 2013).

Kontaminanti u pivu mogu se podijeliti u nekoliko kategorija obzirom na svoju štetnost. Mogu biti obligatno, potencijalno ili indirektno štetni za pivo. Obligatno štetni mikroorganizmi najopasniji su jer mogu tolerirati specifične selektivne karakteristike piva kao medija za rast mikroorganizama te često mogu rasti bez potrebnog vremena adaptiranja na okolišne uvjete u pivu i uzrokovati pad kvalitete gotovog proizvoda. Potencijalno štetni mikroorganizmi mogu se, nakon duljeg kontakta s pivom tijekom proizvodnje ili skladištenja, s vremenom adaptirati na okolišne uvjete te usvojiti karakteristike obligatno štetnih mikroorganizama. Indirektno štetni mikroorganizmi ne mogu rasti i razmnožavati se u gotovom pivu, ali mogu tijekom



raznih procesnih koraka njegove proizvodnje te uzrokovati kvarenje ječma, slada, sladovine, kvasca ili mladog piva. Mane nastale takvim kvarenjem mogu se prenijeti na gotovo pivo te na taj način uzrokovati probleme (Back, 2009). Mikroorganizmi na proces proizvodnje indirektno mogu djelovati preko sirovina na tri načina. Prvi je rast na sirovinama koji uzrokuje nepoželjne promjene na njima takve da sirovine gube svoje očekivane karakteristike. Drugi je takav rast mikroorganizama na sirovinama da se generiraju mikrobnii metaboliti, koji se zatim uvode u proces proizvodnje piva i imaju štetne efekte. Treći je u slučaju teško kontaminiranih sirovina preko kojih se nastala mikrobna biomasa može uvesti u mlado pivo. Iako su takve stanice mrtve, mogu uzrokovati probleme pri filtraciji piva ili zamućenje piva (Briggs i sur., 2004). Osim kategorizacije prema štetnosti, može se koristiti klasifikacija mikroorganizama kao primarnih i sekundarnih kontaminanata. Primarni se mogu pronaći u dijelovima korištenim tijekom proizvodnog procesa (npr. *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus lindneri*) (Back, 2009). Sekundarni se nalaze u području gdje se provodi proces punjenja piva (Back, 1994), posebno kod punilice ili čepilice. Zbog konstantnog kontakta piva i strojeva mogu nastati biofilmovi koji sadrže mikroorganizme uzročnike kvarenja piva. Vlažan okoliš i mehaničke kretnje strojeva mogu uzrokovati prijenosa mikroba ili cijelih biofilmova u otvorene boce. Najčešći sekundarni kontaminanti su *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *Pectinatus* spp. i *Megasphaera cerevisiae* (Back, 2009). Kontaminanti koji se najčešće mogu pronaći od početka fermentacije pa sve do gotovog upakiranog proizvoda su razne Gram pozitivne ili Gram negativne bakterije te divlji kvasci (Bokulich i Bamforth, 2013). Najčešće Gram pozitivne bakterije kontaminanti piva su bakterije mliječne kiseline (BMK). Pošto su najčešći tip bakterija u prirodi, povezane i sa biljkama i ljudima, njihov ulazak u pivovaru je čest i neizbježan, a njihova široka raširenost u sladnoj prašini, aerosolima i na opremi je neupitna. Rast većine bakterija mliječne kiseline u pivu srećom je spriječena zbog antimikrobnog učinka spojeva dobivenih iz hmelja. Hmelj naime sadrži niz spojeva, od kojih su glavne izo- $\alpha$ -kislone, koji inhibiraju rast određenih Gram pozitivnih bakterija. Njihova uloga kao bakteriostatika posebno je važna kod Gram pozitivnih bakterija tolerantnih na etanol i pH piva. Načini na koji BMK kvare pivo su kroz njegovo zakiseljavanje, stvaranje zamućenja i/ili proizvodnju diacetila (Bokulich i Bamforth, 2013). Mnogi sojevi također mogu proizvoditi egzopolisaharide koji pivu daju uljastu konzistenciju ili, u ekstremnim slučajevima, rezultiraju tvorbom sluzi (Bokulich i Bamforth, 2013; Pittet i sur., 2011; Van Oevelen i Verachtert, 1979). Osim BMK, vrlo malo ostalih gram pozitivnih bakterija izolirano je iz piva (Bokulich i Bamforth, 2013). U prošlosti su Gram negativne, aerobne bakterije octene kiseline bile velika prijetnja proizvodnji piva, ali njihova aktivnost u modernoj proizvodnji je neznatna zbog postupaka koji omogućuju minimalno izlaganje piva kisiku (Bokulich i Bamforth, 2013;

Jespersen i Jakobsen, 1996). Te bakterije koje uključuju *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, i *Gluconobacter oxydans* danas se još često mogu pronaći u pivima koje odležavaju u bačvama (Bokulich i Bamforth, 2013; Bokulich i sur., 2012). Kvarenje uzrokovano tim bakterijama posljedica je reakcija oksidacije etanola u acetat, čime se pivo efektivno prevodi u ocat. Uklanjanjem otopljenog kisika iz piva pojavila se opasnost od novih kontaminanata, obligatnih anaeroba. Oni spadaju u porodicu *Veillonellaceae*, a uključuje rodove *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* i *Zymophilus*. Članovi te porodice spadaju u Gram pozitivno koljeno *Firmicutes*, ali boje se Gram negativno i posjeduju lipidni sloj. U pivu uzrokuju kvarenje kroz razvoj mutnoće, prekomjerne proizvodnje propionske i octene kiseline, vodikovog sulfida i merkaptana te inhibicijom rasta kvasaca i proizvodnje alkohola (Bokulich i Bamforth, 2013; Chowdhury i sur., 1997). Kvarenje uzrokovano ovim organizmima pojavilo se zadnjih godina, istovremeno sa rastom udjela nepasteriziranih piva na tržištu te poboljšanjem opreme za punjenje piva što je dovelo do općenito manje otopljenog kisika u pivima (Bokulich i Bamforth, 2013; Jespersen i Jakobsen, 1996). Bilo koji mikroorganizam kojeg pivar tijekom proizvodnje sam nije dodao te na taj način uveo u pivo smatra se kontaminantom. Takav je i koncept iza termina divljih kvasaca, stranih sojeva kvasaca koji dospiju u pivo. Razni divlji sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pivo mogu pokvariti proizvodnjom esterskih ili fenolnih nepoželjnih aroma (tzv. *off flavour* okusa), stvaranjem mutnoće ili sedimenta te pretjeranom atenuacijom koja dovodi do pretjeranog gaziranja i slabijeg tijela piva. Fenolne i esterske arome smatraju se atipične za većinu piva, ali se zato smatraju glavnom značajkom Njemačkih pšeničnih piva i nekih belgijskih *ale* piva. *Brettanomyces* kvasci mogu biti teški kontaminanti u većini piva i ostalih alkoholnih pića. Ovi kvasci kvare pivo proizvodnjom vrlo hlapivih fenolnih spojeva 4-etilgvajakola i 4-etilfenola koji tvore aromu po bolničkim zavojima, znoju i dimu uz ostale metabolite koji tvore širok raspon nepoželjnih okusa (Bokulich i Bamforth, 2013). Međutim, *Brettanomyces* kvasci poželjna su komponenta nekih piva kao što su belgijski Lambic i voćna piva u kojima njihova beta-glikozidazna aktivnost pojačava voćnu aromu (Bokulich i Bamforth, 2013; Daenen i sur, 2008). Većina ostalih ne *Saccharomyces* kvasaca ne može se natjecati za nutrijente sa radnim kvascem te stoga ne uspijevaju porasti u pivu (Briggs i sur., 2004). Oni jesu sposobni za rast u pivu, ali njihov potencijal za rast je limitiran u optimalnim uvjetima skladištenja zbog kombinacije faktora limitiranja kisika, toksičnosti etanola i već spomenute kompeticije sa *Saccharomyces* kvascima (Bokulich i Bamforth, 2013). Mnogo ih naime nije tolerantno na etanol i ne mogu rasti u anaerobnim uvjetima, a samo nekolicina je sposobna fermentirati šećere (Briggs i sur., 2004). Kvasci rodova *Pichia* i *Candida* neki su od kvasaca koji spadaju u tu skupinu, a većina ih kvare pivo produkcijom tvari nepoželjnih okusa (pogotovo organskih

kiselina i fenolnih aroma), stvaranjem mutnoće, sedimenta ili površinskih filmova. Obično nisu problem kod piva proizvedenih u modernim postrojenjima jer su to oportunistički kontaminanti koji će kvarenje uzrokovati samo kod povoljnih uvjeta za njihov rast (Bokulich i Bamforth, 2013). Osim mikroorganizama, putem već spomenute indirektno kontaminacije u pivu se mogu pronaći razni mikotoksini kao posljedica rasta patogenih gljivica na ječmu ili sladu. Nekoliko vrsta gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* metaboliziraju mikotoksine koji, osim što su u višim koncentracijama štetni za zdravlje potrošača, uzrokuju fenomen nekontroliranog pjenjenja piva (Bokulich & Bamforth, 2013; Mateo i sur., 2007). Taj fenomen očituje se na način da kada se otvori pakiranje piva dolazi do pretjeranog pjenjenja i istakanja piva iz otvora. Mateo i sur. (2007) u svojem preglednom radu iznijeli su da su studije provedene u različitim državama pokazale da je velika količina testiranih uzoraka piva kontaminirana okratoksinom A, ali u niskim koncentracijama (obično ispod 0,2 ng/ml). Europska unija nije postavila maksimalni dopušteni limit za taj mikotoksin u pivu iako postoji limit za ječam i slad jer je taj mikotoksin klasificiran kao potencijalni kancerogen za ljude. On se iz žitarica korištenih za ukomjavanje prevodi u sladovinu te u gotovo pivo, iako se fermentacijom smanjuje njegova koncentracija (Mateo i sur., 2007). Spojevi koji mogu biti ozbiljna posljedica mikrobne kontaminacije piva i kod osjetljivih pojedinaca mogu rezultirati u reakcijama sličnim alergijskima, migrenama i/ili toksičnim reakcijama u kombinaciji s nekim lijekovima su biogeni amini i poliamini. U pivo najčešće dospjevaju reakcijama koje provode BMK, ali enterobakterije i neki sojevi kvasca iz roda *Saccharomyces* također imaju ulogu u njihovoj proizvodnji (Bokulich i Bamforth, 2013).

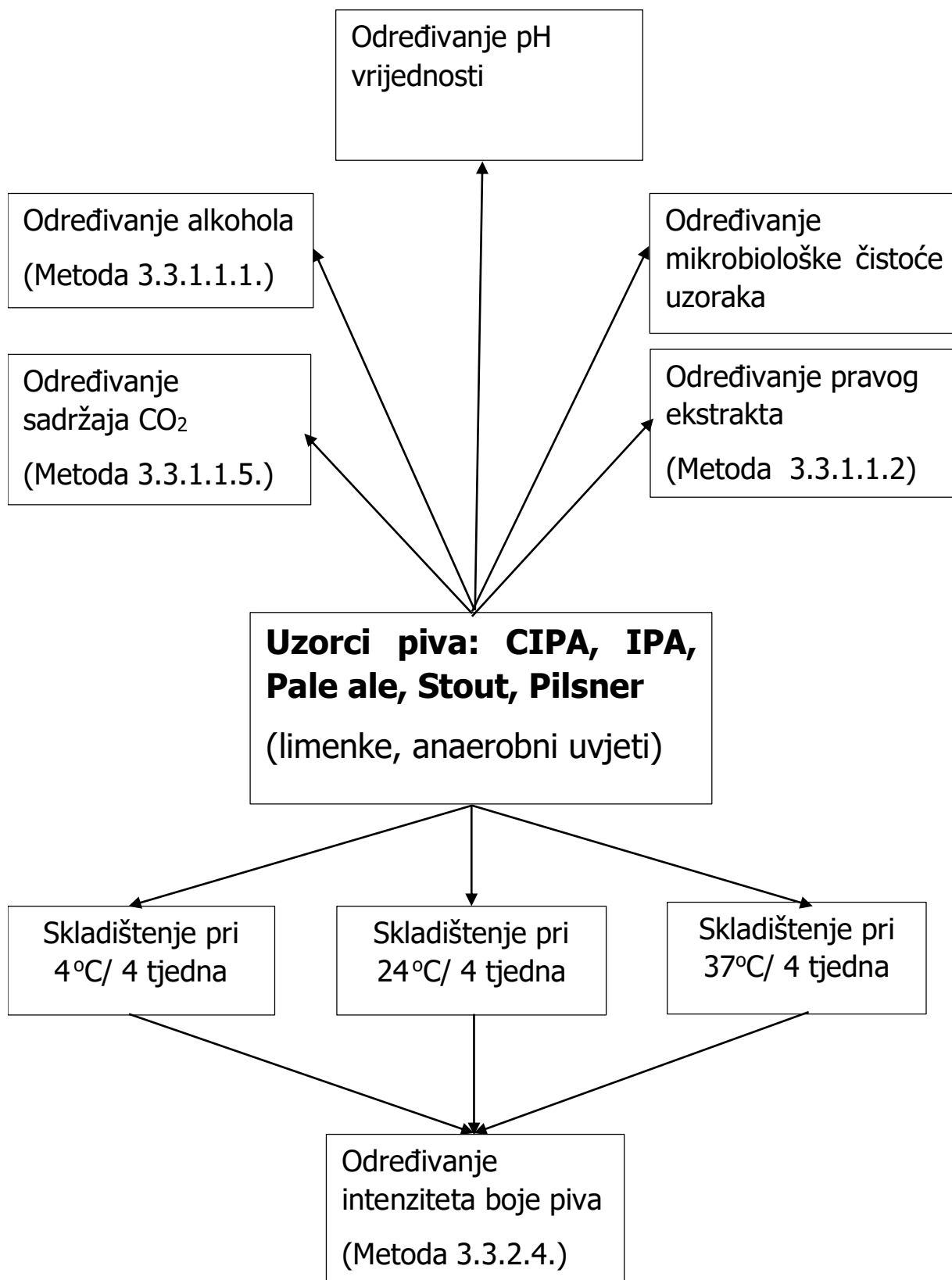
## **3. MATERIJALI I METODE RADA**

### **3.1. Ciljevi i tijek istraživanja**

U ovom su radu istražena energijska i kemijsko-fizikalna svojstva različitih vrsta lager i ale craft piva.

Istraživanja su obuhvatila određivanja (Slika 2):

- kemijskog sastava istraživanih piva: udjela alkohola (vol %), pravog ekstrakta (g/L), sadržaja CO<sub>2</sub> (g/L), gorčine (IBU jedinice)
- određivanje intenziteta boje piva
- određivanje mikrobiološke čistoće uzoraka piva



**Slika 2.** Shematski prikaz cjelokupnog istraživanja

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci piva

Svi su istraživani uzorci piva donirani su od pivovare te čuvani i na sobnoj temperaturi i na 4 °C u hladnjaku do provođenja pokusa.

Uzorci pet istraživanih tipova piva proizvedeni su u craft pivovari u Zagrebu:

- Citrus Indian Pale Ale (CIPA)
- Indian Pale Ale (IPA)
- Pale Ale
- Stout
- Pilsner

#### 3.1.2. Hranjive podloge za mikrobiološku kontrolu uzoraka piva

##### 3.1.2.1. MRS agar

Uporabljena je gotova dehidratirana podloga za izolaciju, brojanje i uzgoj laktobacilla, MRS agar (Difco, USA)

##### Sastav podloge prema deklaraciji proizvođača (g/L):

bakto proteoza pepton broj 3	10 g
bakto mesni ekstrakt	10 g
bakto kvaščeč ekstrakt	5 g
dekstroza	20 g
sorbitan monooleat kompleks	1 g
amonijev citrat	2 g
natrijev acetat	5 g
magnezijev sulfat	0,1 g
manganov sulfat	0,05 g
kalijev fosfat, dibazični	2 g
bakto agar	15 g

### 3.1.5.2. Podloga za ukupan broj bakterija

Uporabljena je gotova dehidratirana "Podloga za ukupan broj bakterija" (Torlak, Beograd).

Sastav podloge prema deklaraciji proizvođača (g/L):

Trypton "Torlak"	5 g
ekstrakt kvasca "Torlak"	2,5 g
dekstroza	1 g
agar	15 g

## 3.2. Aparati

### - pH-metar

Pri radu je korišten pH-metar "Methrom", model 744, Švicarska.

### - Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

### - Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica" model EV-102, Železniki, Slovenija.

### - Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije pri 420, 430 i 520 nm korišten je spektrofotometar Unicam He· ios ·, USA.

### - Termostat

Uzorci piva za test „ubrzanog“ starenja termostatorani su tijekom 4 tjedna pri 4 °C, 24 °C i 37 °C u termostatu Sutjeska, BiH.

### 3.3. Metode istraživanja

#### 3.3.1. Određivanje kakvoće piva

##### 3.3.1.1. *Kemijsko-fizikalna određivanja kakvoće piva (Analytica-EBC, 1998)*

###### 3.3.1.1.1. Određivanje alkohola (Metoda 9.2.1.)

U tikvicu za destilaciju od 500 ml odvagano je točno 100 g piva bez CO<sub>2</sub>, s točnošću od 0,01 g. Tikvica je priključena na Liebig-ovo hladilo produženo na donjem kraju izvučenom cijevi koja se uvodi u piknometar od 50 ml. Tijekom destilacije (30 – 40 minuta), destilat je povremeno promiješan zbog kontrakcije volumena. Destilacija je prekinuta kada je piknometar bio pun skoro do oznake. Nakon toga je piknometar ostavljen 30 minuta u vodenoj kupelji pri 20 °C i dopunjen do oznake destiliranom vodom iste temperature. Nakon vaganja termostetiranog piknometra, gustoća destilata je izračunata prema formuli:

$$d = \frac{a}{b}$$

d = gustoća destilata (d<sub>30/20</sub>)

a = masa destilata (g)

b = vodena vrijednost piknometra (g)

Postotak alkohola očitao je iz tablica po Windischu. Budući da je destilirano 100 g piva, postotak alkohola u pivu je:

$$A = \frac{a \cdot c}{100}$$

a = masa destilata (g)

c = koncentracija alkohola u destilatu (maseni %)

A = koncentracija alkohola u pivu (maseni %)

###### 3.3.1.1.2. Određivanje pravog ekstrakta (Metoda 9.43.1.)

Ostatak u tikvici nakon određivanja alkohola je ohlađen i na vagi dopunjen destiliranom vodom do prvobitne težine od 100 g. Sadržaj tikvice je dobro izmiješan i određena je gustoća



tekućine piknometrom termostatiranjem pri 20 °C. Pravi ekstrakt ( $n$ ) je očitano iz tablice i izražen kao % mase (Prilog 3).

$n$  = pravi ekstrakt (%)

#### 3.3.1.1.3. Određivanje sadržaja CO<sub>2</sub> (Metoda 9.28.1.)

U menzuru od 25 ml dodano je 15 ml 0,1 M NaOH i 10 ml ohlađenog piva (0–5 °C), nakon čega je sadržaj prelijevan u čašu od 50 ml, ispran deioniziranom vodom i titriran s 0,1 M HCl do pH 8,3 (provjera pH vrijednosti pH metrom).

Utrošak HCl za 10 ml piva =  $a$  = mL HCl ·  $f_{\text{HCl}}$

Pivu zagrijanom na 15 – 20 °C uklonjen je CO<sub>2</sub> stresanjem, nakon čega je otpipetirano 50 ml piva, koje je titrirano s 0,1 M NaOH do pH 8,3.

Utrošak NaOH za 10 mL piva:

$$b = \frac{\text{ml NaOH} \cdot f_{\text{NaOH}}}{5}$$

Koncentracija CO<sub>2</sub> (g/l) je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{CO}_2 = 0,44 \cdot [15 - (a - b)]$$

#### 3.3.1.1.4. Određivanje pepela gravimetrijski

Pepeo je u pivu gravimetrijski određivan nakon što je uzorak (20 mL) uparen, nakon toga spaljivanjem karboniziran, a zatim mineraliziran žarenjem kod propisane temperature do konstantne mase.

Postupak:

U čiste i izvagane porculanske zdjelice stavljeno je 20 mL piva, nakon čega su stavljene u vodenu kupelj gdje je pivo isparavalo sve dok na dnu zdjelice nije preostala sirupasta masa. Zatim su zdjelice stavljene u sušionik na 120 °C radi dodatnog isparavanja i ostatka vode.

Nakon sušenja, zdjelice s uzorcima su stavljene u peć gdje su uzorci spaljivani na temperaturi od 500 °C do konstantne mase. Uslijed visoke temperature, masa je prvo karbonizirala, a zatim sagorjela i prešla u pepeo. Nakon spaljivanja su zdjelice stavljene u eksikator i ostavljene da se ohlade, te su nakon toga izvagane.

Udjel pepela u vinu (g/L) je izražen iz jednadžbe:

$$\gamma_p = (\text{masa zdjelice s pivom} - \text{masa zdjelice s pepelom}) / \text{masa prazne zdjelice}$$

Minimalna dopuštena koncentracija pepela u pivu je 1,2 g/L, a sve vrijednosti manje od ove znači ili da je pivo falsificirano ili da je učinjena analitička pogreška.

#### 3.3.1.1.5. Određivanje energijske vrijednosti (Metoda 9.45)

Energijska vrijednost istraživanih uzoraka piva određena je računskom metodom određivanja kalorijske (kJ/100 mL) vrijednosti piva, pri čemu se ukupna energijska vrijednost pića računa kao zbroj vrijednosti značajnih sastojaka čije su vrijednosti analitički određene. EBC metoda 9.45 namijenjena je pojednostavljenom procjenjivanju energijske vrijednosti piva putem izračuna preko pravog ekstrakta, alkohola i izmjerene gustoće piva prema jednadžbi:

$$EV_{dir} \text{ (kJ/100 mL)} = \rho \times (15 \times E_r + 29 \times c_{alkohol})$$

gdje je  $\rho$  gustoća piva (g/mL),  $E_r$  pravi ekstrakt u % tež./tež., a 15 aproksimirani faktor pretvorbe.

### 3.3.2. Analitičke metode

#### 3.3.2.1. Određivanje intenziteta boje piva

Boja piva mjerena je standardnom referentnom metodom (SRM), kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbanacija na 430 nm. Očitana apsorbanacija je množena s faktorom 12.7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama:

$$SRM = 12.7 \cdot D \cdot A_{430},$$

gdje je D faktor razrijeđenja.

Ako se intenzitet boje želi izraziti u EBC jedinicama, tada se koristi jednadžba:

$$\text{EBC} = \text{SRM} \cdot 1.97$$

### 3.3.3. Mikrobiološka ispitivanja

#### *3.3.3.1. Kontrola mikrobnog zagađenja uzoraka piva*

Određivan je ukupan broj bakterija u uzorcima piva tako što su uzorci nacjepljivani na podloge za ukupan broj bakterija. Podloge su zatim inkubirane na 30 °C tijekom 48 sati, nakon čega su prebrojane kolonije. Uzorci su također nacjepljivani na selektivnu MRS podlogu za *Lactobacillus* sp.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kemijsko-fizikalna analiza piva

U radu su istraživana kemijsko-fizikalna svojstva pet vrsta piva gornjeg i donjeg vrenja (ale i lager). Rezultati su prikazani u Tablici 1.

Održavanje kakvoće piva tijekom faza odležavanja, distribucije i, posebice, trajanja gotovog proizvoda, predstavlja za svakog proizvođača piva izazov. Nekoliko parametara određuje kakvoću piva (udjel ječma i neslađenih žitarica, konačni ekstrakt, volumni % alkohola, udjel CO<sub>2</sub>, prevrelost i gorčina). No dva su svojstva izrazito važna, a to su koloidna i biološka stabilnost piva (Aron i Shellhammer, 2010).

**Tablica 1.** Kemijsko-fizikalni sastav istraživanih uzoraka piva

<b>Analiza</b>	<b>CIPA</b>	<b>IPA</b>	<b>Pale ale</b>	<b>Stout</b>	<b>Pilsner</b>
Gustoća (g/mL)	0.9898	0.9877	0.9874	0.9893	0.9869
Alkohol (vol %)	7.05	6.42	4.94	5.64	4.05
Ekstrakt (tež (%))	1.846	1.718	1.565	1.667	1.565
CO <sub>2</sub> (mg/L)	16.05	16.40	16.50	16.43	15.88
Suha tvar (g/100 mL)	6.781	6.523	6.495	6.461	6.361
pH	4.63	4.51	4.35	4.68	4.31

Prema dobivenim rezultatima jasno je vidljivo kako istraživana piva zadovoljavaju kriterije po kojima su proizvedeni jer su CIPA, IPA i Stout, kao piva gornjeg vrenja, osim Pale ale piva imali veći udjel alkohola od piva donjeg vrenja (Pilsner). Gorčina je izraženija kod piva gornjeg vrenja, no gustoća i pH vrijednost svih uzoraka piva je bila podjednaka (Tablica 1).

### 4.2. Energijska vrijednost piva

Određivanje energijske vrijednosti piva ili bilo kojeg napitka nije nužno istaknuti na deklaraciji proizvoda., No u današnje vrijeme, kada svaki potrošač želi znati kojim unosom kcal ili kJ u organizam ispijanjem napitka ili konzumiranjem hrane može povisiti tjelesnu masu, nužno je znati energijsku vrijednost proizvoda koji se konzumira. U ovom radu su

istražene energijske vrijednosti 5 različitih vrsta piva, kojima je energijska vrijednost bila različita, no, s obzirom da se u izračunu te vrijednosti u jednadžbi koristi i udjel alkohola, jasno je da najmanju energijsku vrijednost ima Pilsner pivo s najmanjim udjelom alkohola, a najveću CIPA pivo s najvećim udjelom alkohola (Tablica 2).

**Tablica 2.** Energijska vrijednost istraživanih uzoraka piva

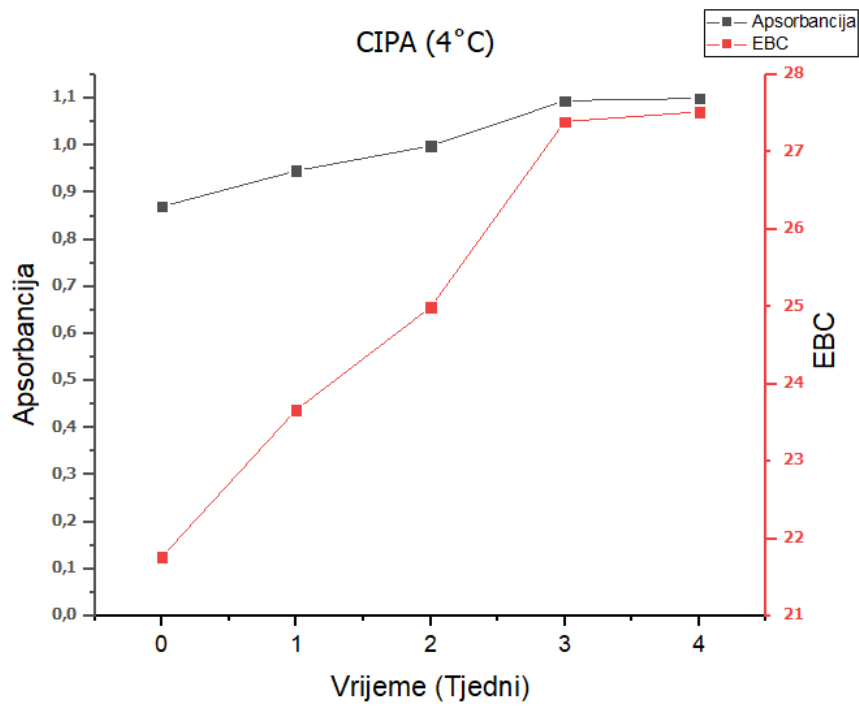
<b>Uzorci piva</b>	<b>Energijska vrijednost (kJ/100 mL)</b>
CIPA	229.68
IPA	209.34
Pale ale	164.63
Stout	186.55
Pilsner	139.08

### **4.3. Boja piva**

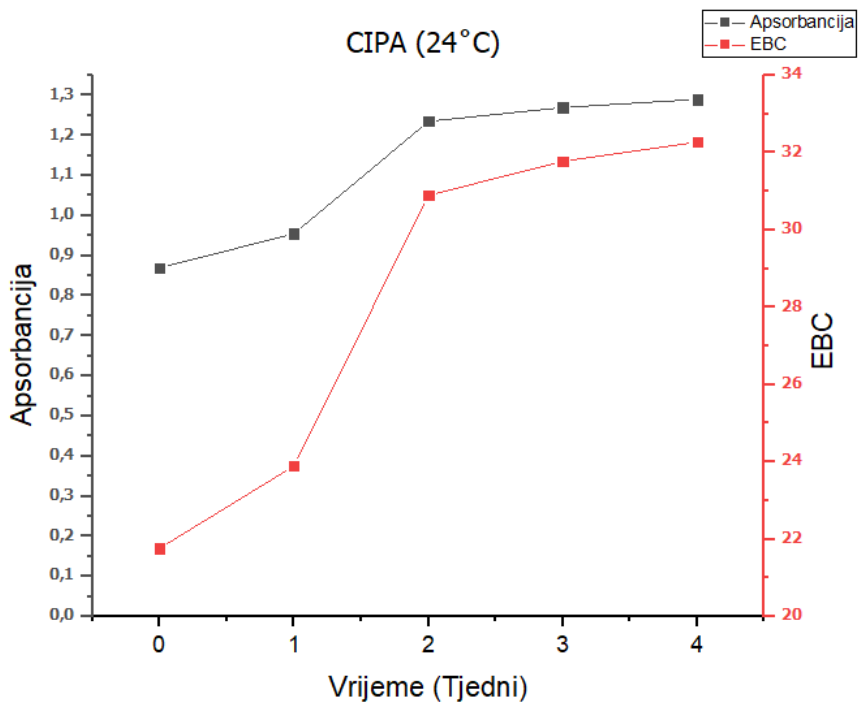
Boja piva ovisi o žitaricama ili dodatcima koji su uporabljeni kao sirovine, načinu njihova sušenja, kao i o načinu dosušivanja. Spojevi koji su odgovorni za boju piva su rezultat Maillardove reakcije, a djelomično i zbog oksidacije polifenola iz ječmene pljevice (Shellhammer, 2009).

Prema literaturnim podacima, postoji vrlo malo znanstvenih podataka koji se odnose na promjenu boje piva tijekom skladištenja, a posebice se to odnosi na pivo gornjeg vrenja (ale), koje još uvijek nije kod većine kupaca prihvaćeno kao pivo donjeg vrenja (lager).

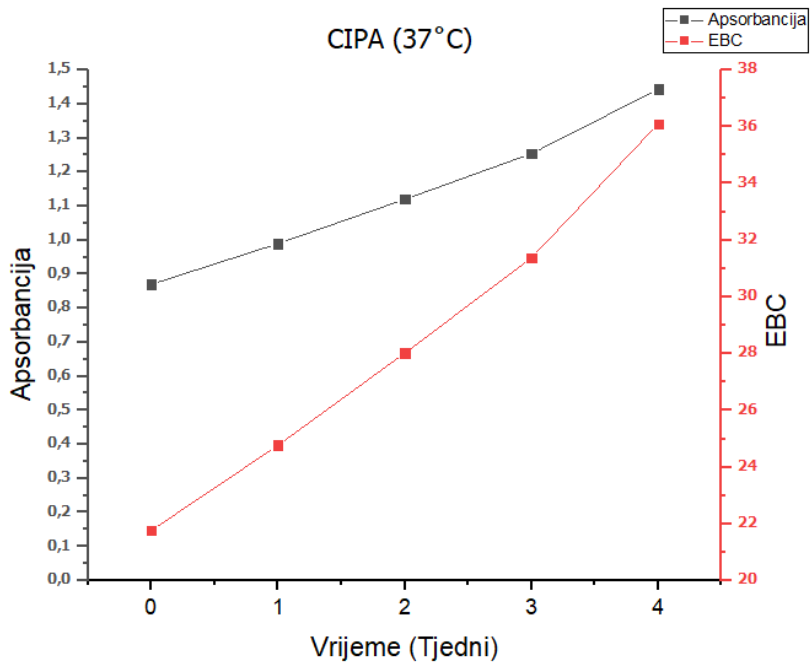
Tijekom 4 tjedna skladištenja piva na 4 °C, sva su piva pokazala nagli porast intenziteta boje. U istom vremenskom razdoblju, pri 24 °C, u svim istraživanim pivima je dokazan izmjeren nagli porast intenziteta boje piva, kao i pri 37 °C (Slike 3-17).



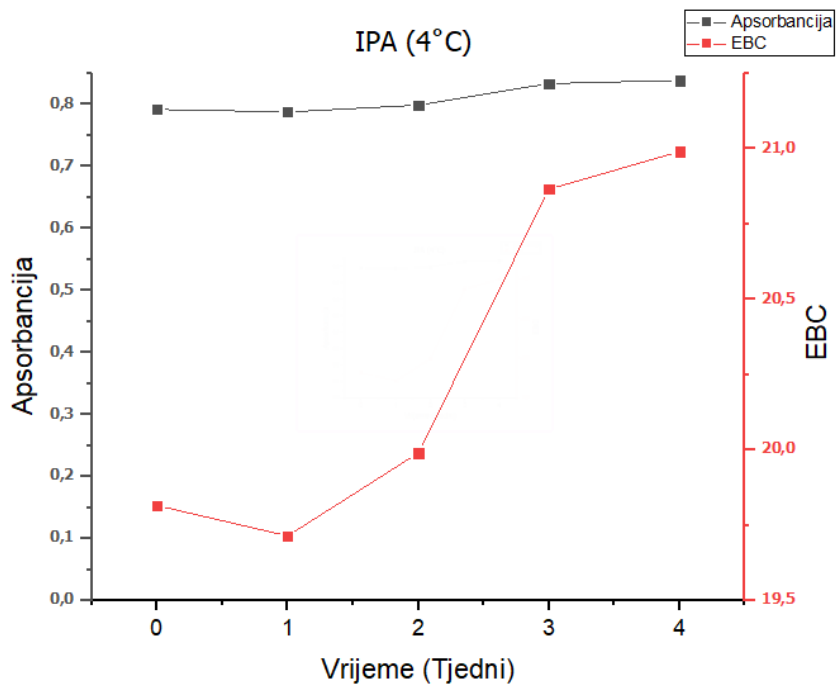
**Slika 3.** Promjena boje CIPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 4 °C



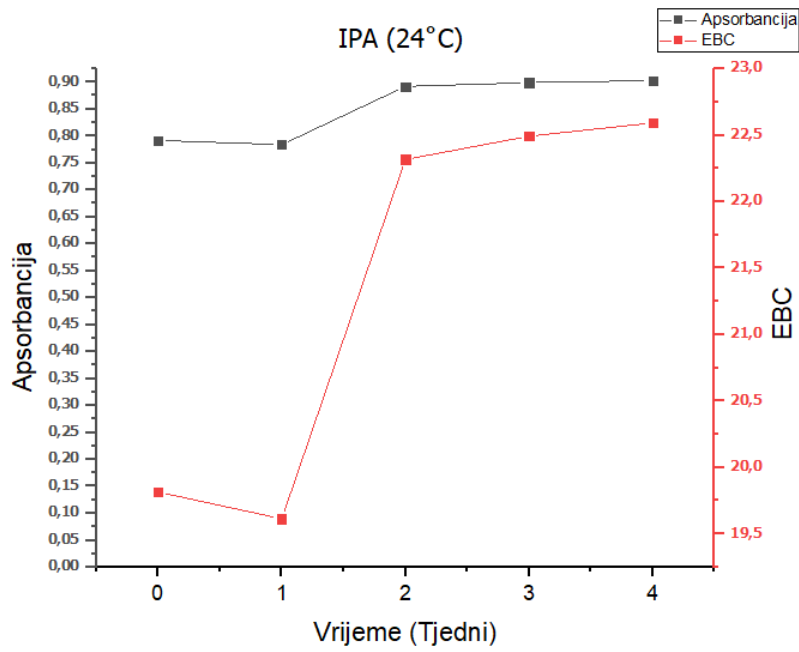
**Slika 4.** Promjena boje CIPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 24 °C



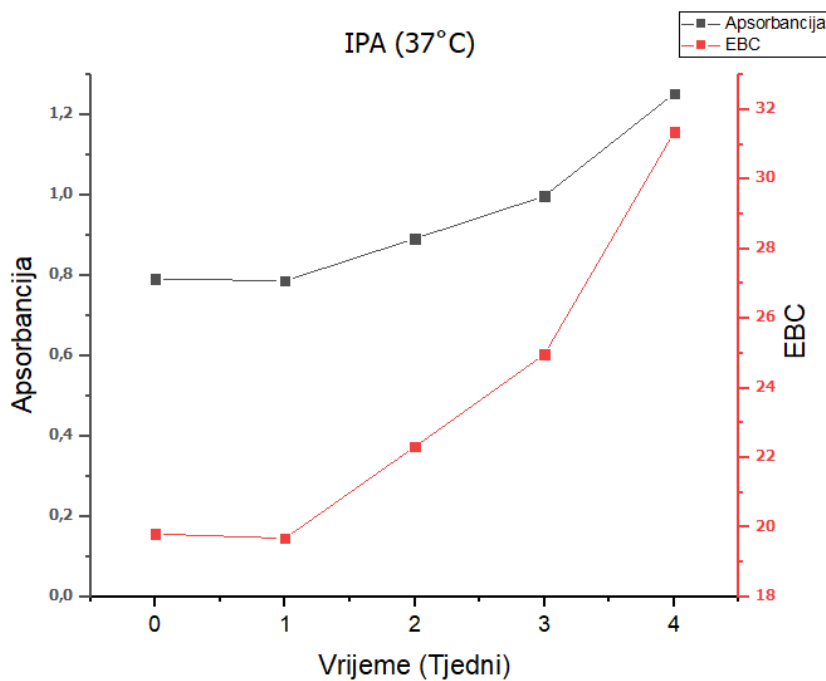
**Slika 5.** Promjena boje CIPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 37 °C



**Slika 6.** Promjena boje IPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 4 °C

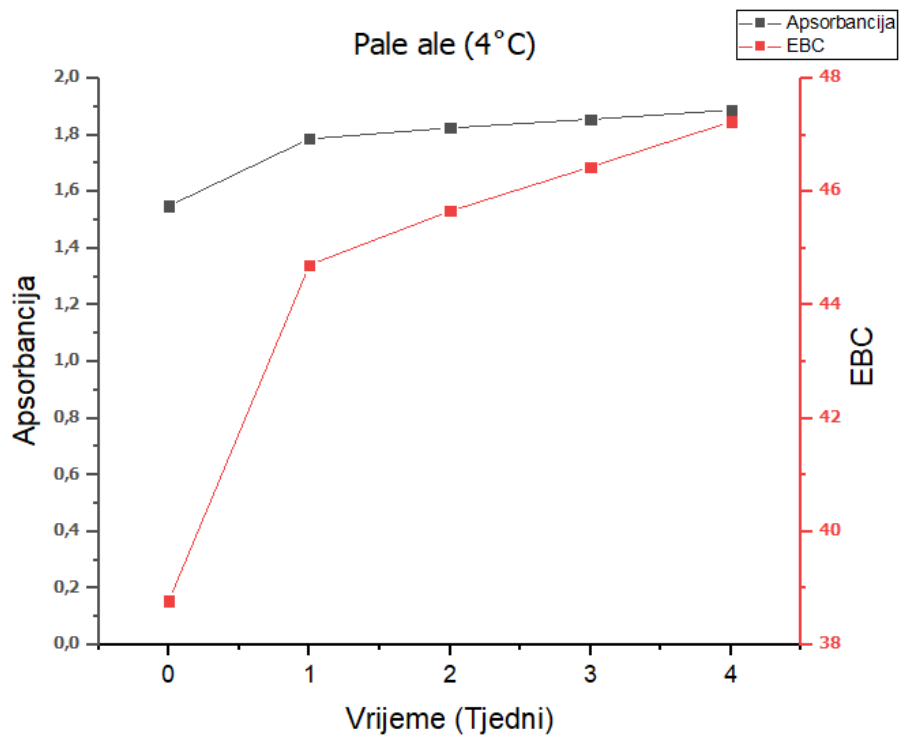


**Slika 7.** Promjena boje IPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 24 °C

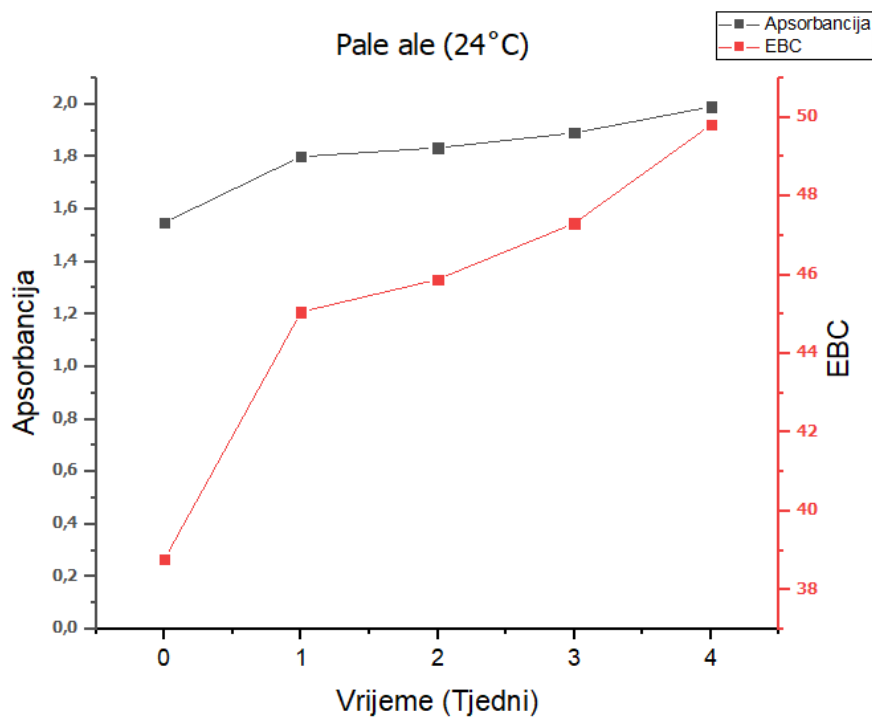


**Slika 8.** Promjena boje IPA piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 37 °C

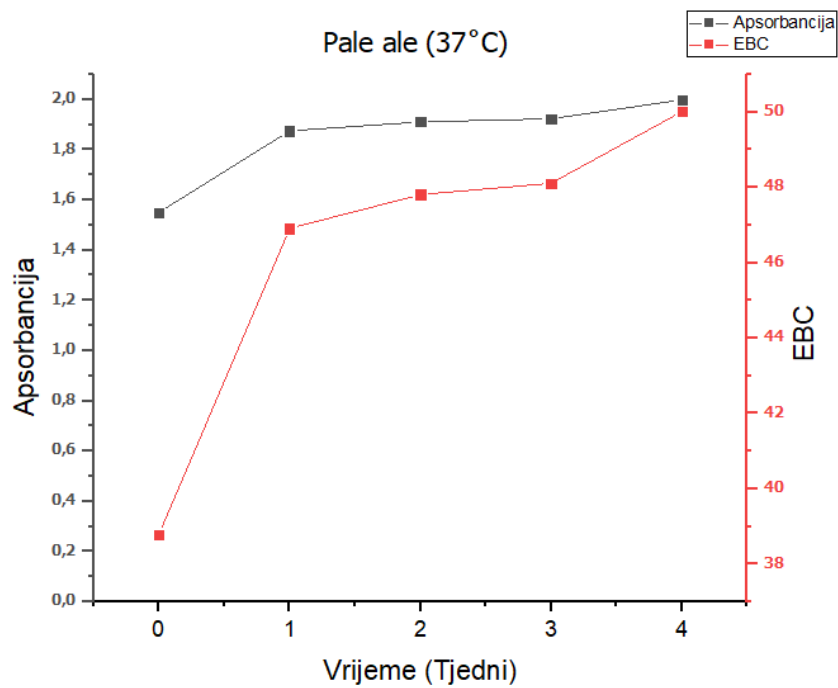




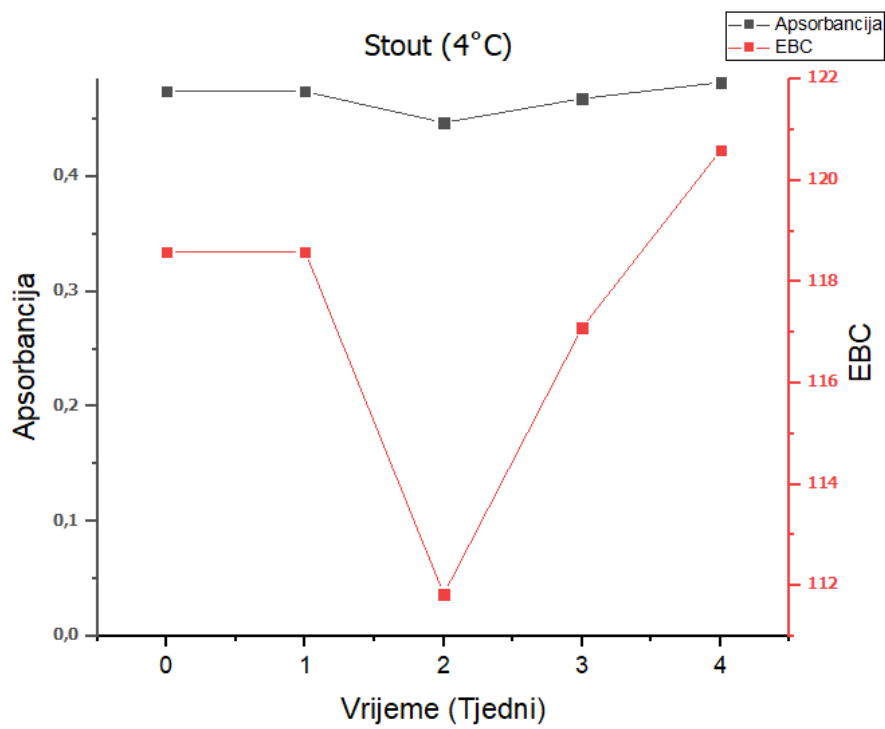
**Slika 9.** Promjena boje Pale ale piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 4 °C



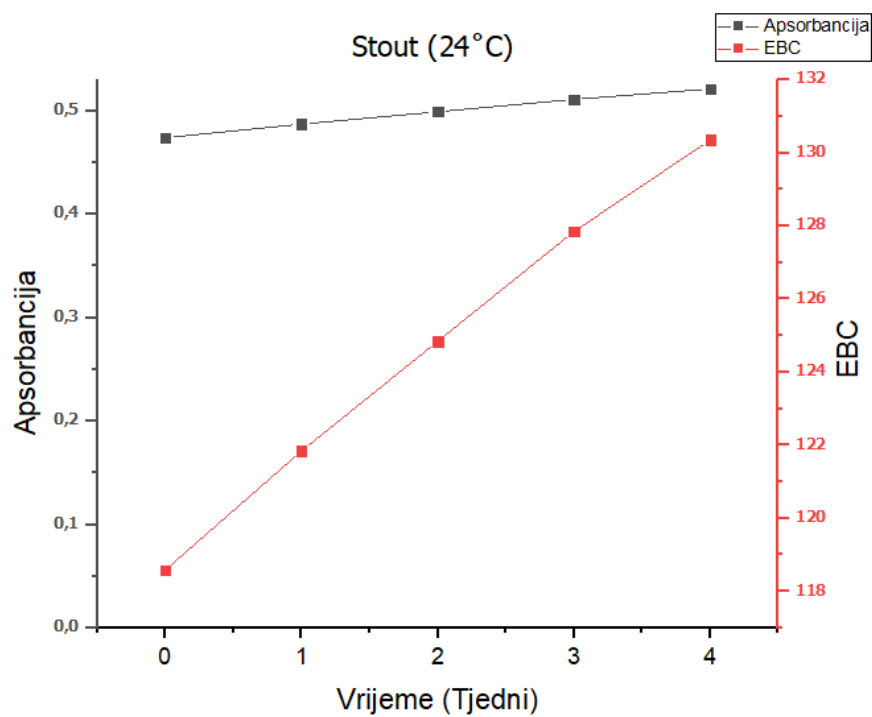
**Slika 10.** Promjena boje Pale ale piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 24 °C



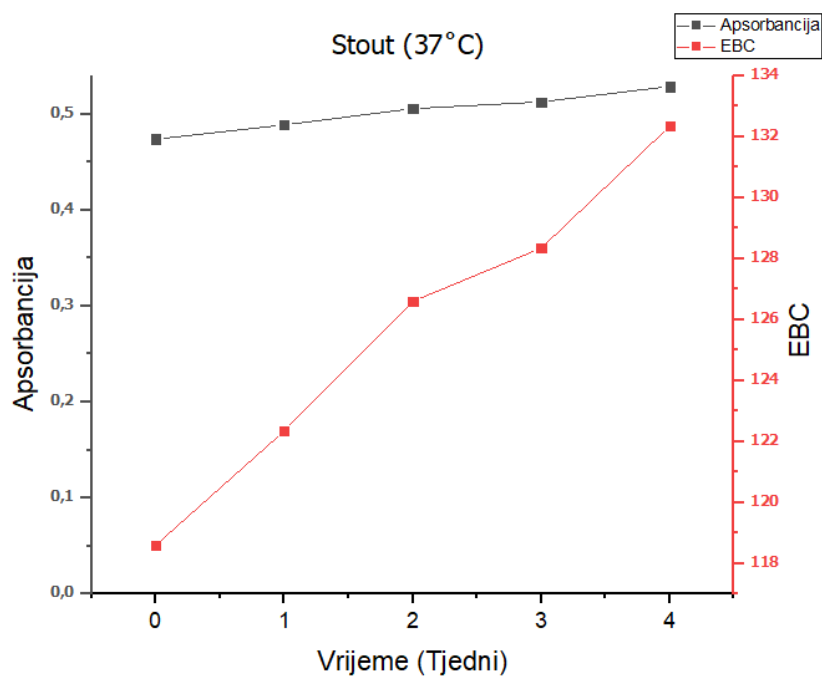
**Slika 11.** Promjena boje Pale ale piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 37 °C



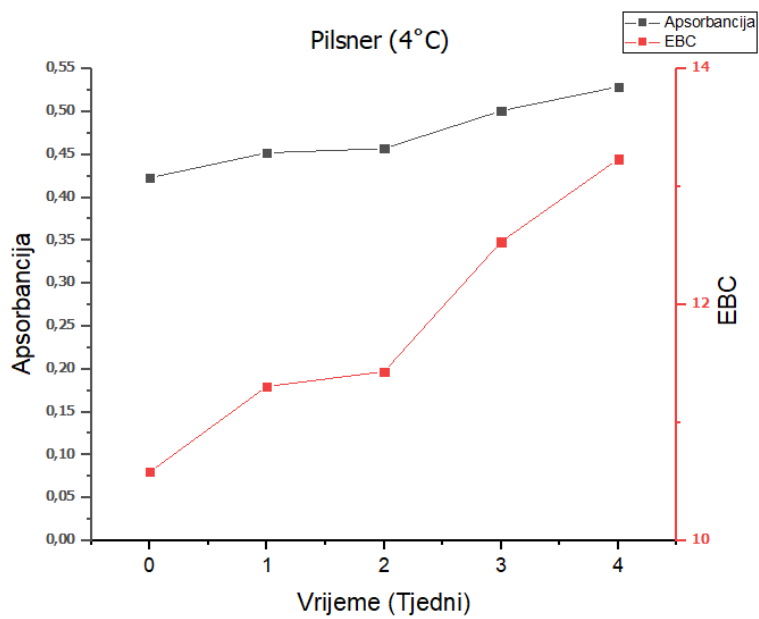
**Slika 12.** Promjena boje Stout piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 4 °C



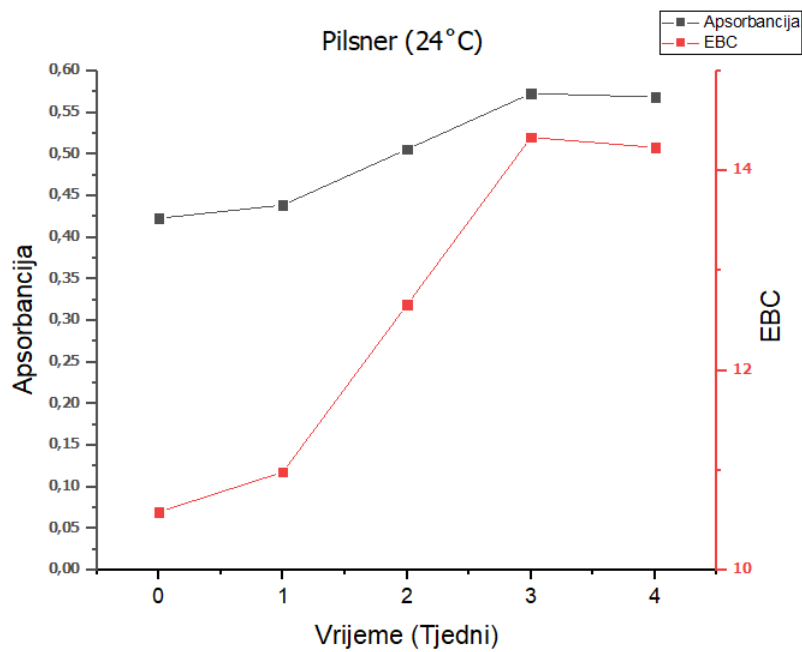
**Slika 13.** Promjena boje Stout piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 24 °C



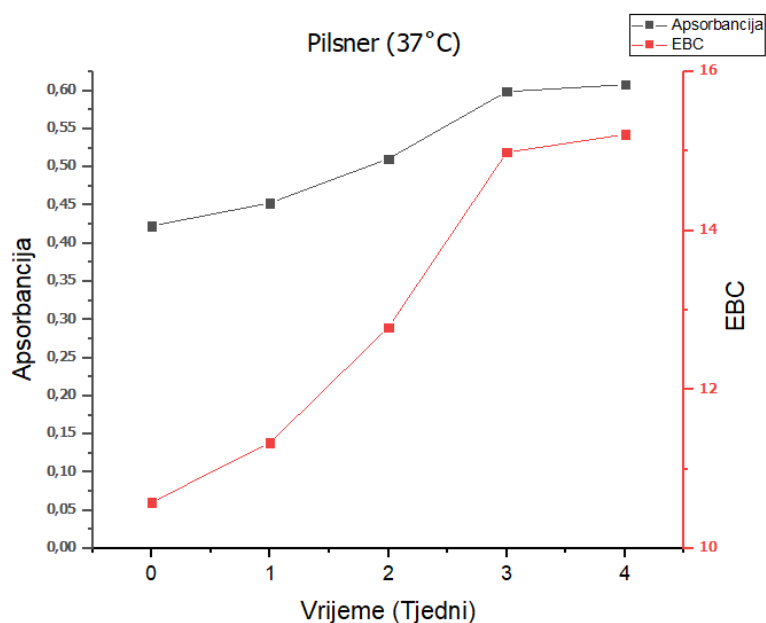
**Slika 14.** Promjena boje Stout piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 37 °C



**Slika 15.** Promjena boje Pilsner piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 4 °C



**Slika 16.** Promjena boje Pilsner piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 24 °C



**Slika 17.** Promjena boje Pilsner piva tijekom 4 tjedna skladištenja na 37 °C

#### 4.4. Mikrobiološka provjera istraživanih piva

Vrlo je važno znati mikrobiološku čistoću piva proizvedenih u industrijskom okružju, a posebice craft piva. Prema mikrobiološkim analizama, svi su uzorci ispitivanih piva zadovoljili zadane kriterije, osim prisutnosti divljih kvasaca, a to su prisutnost radnog soja kvasaca, aerobnih mezofilnih bakterija, anaerobnih bakterija i laktobacila.

Uzorak (1 mL)	Kvasci	Divlji kvasci	Aerobne mezofilne bakterije	Anaerobne bakterije	Laktobacili
CIPA	$3.4 \times 10^2$	$6.5 \times 10^2$	0	0	0
IPA	nb	$2 \times 10^2$	0	0	0
Pale ale	nb	$3.6 \times 10^2$	0	0	0
Stout	nb	$4 \times 10^2$	0	0	0
Pilsner	nb	nb	0	0	0

\*nb - nebrojivo

## 5. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima postignutim u ovom radu, može se zaključiti:

- 1) Energijska vrijednost svih istraživanih piva je bila u skladu s udjelom alkohola.
- 2) Istraživanja su pokazala da piva zadovoljavaju kriterijima po kojima su proizvedeni. Gorčina je izraženija kod piva gornjeg vrenja, no gustoća i pH vrijednost svih uzoraka piva je bila podjednaka.
- 3) Ubrzano starenje piva je utjecalo na intenzitet boje svih ispitivanih piva. Najveća promjena boje ispitivanih piva je primijećena kod Stout piva (10 EBC jedinica).
- 4) Budućnost proizvodnje piva je u boljem poznavanju vrijednosti njegovih sastojaka, te konačnom priznanju da je visokovrijedno piće koje zaslužuje biti dio funkcionalne hrane.

## 6. POPIS LITERATURE

- American Society of Brewing Chemists (2009) Methods of Analysis: Beer-33 caloric content (calculated), The Society.
- Anger H. M., Schildbach S., Harms D., Pankonke K. (2009) Analysis and Quality Control. U: Handbook of brewing, 1. izd., Eßlinger H. M., ur., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 445-446, 456-457.
- Back W. (2009) Microbiology. U: Handbook of brewing, 1. izd., Eßlinger H. M., ur., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 477-478.
- Back W. (2005) Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie, Fachverlag Hans Carl.
- Back W. (1994) Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt International* **12**: 326–333.
- Bamforth C. W., Lentini A. (2009) The flavor instability of beer. U: Beer: A Quality Perspective (Handbook of Alcoholic Beverages series), 1. izd., Bamforth C.W., Russell I., Stewart G., ur., Elsevier, str. 85–109.
- Bamforth C. W. (2004) Beer-Health and nutrition, 1. izd., Blackwell Publishing, str. 86-87
- Baxter E. D., Hughes P. S. (2001) Beer: Quality, safety and nutritional aspects, Royal Society of Chemistry.
- Beluhan S. (2014) Vježbe iz modula Biotehnologija 2, str. 23.
- Bokulich N. A., Bamforth C. W. (2013) The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77(2)**: 157–172.
- Bokulich N. A., Bamforth C. W., Mills D. A. (2012) Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS One* **7**: e35507.
- Briggs D., Boulton C., Brookes P., Stevens R. (2004) Brewing: science and practice, 1. izd., Woodhead publishing limited, str. 52, 607, 610, 627, 662, 695-697.
- Callemien D., Collin S. (2007) Involvement of flavanoids in beer color instability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(22)**: 9066–9073.
- Chowdhury I., Watier D., Leguerinel I., Hornez J. P. (1997) Effect of *Pectinatus cerevisiophilus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production in wort medium. *Food Microbiology* **14**: 265–272.

- Daenen L., Sterckx F., Delvaux F. R., Verachtert H., Derdelinckx G. (2008) Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research* **8**: 1103–1114.
- Eichhorn P. (1991) Untersuchungen zur Geschmacksstabilität des Bieres, Technische Universität München.
- European Brewery Convention (2009) Analytica-EBC, Section 9, Beer Method 9.45. Energy value of beer by calculation, Fachverlag Hans Carl.
- Gresser A. (2009) Properties and Quality. U: Handbook of brewing, 1. izd., Eßlinger H. M., ur., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, str. 359-360.
- Jespersen L., Jakobsen M., (1996) Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **33**:139– 155.
- Lehnhardt F., Gastl M., Becker T. (2018) Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* : 1-12
- Li H., Liu F., He X., Cui Y., Hao J. (2015) A study on kinetics of beer ageing and development of methods for predicting the time to detection of flavour changes in beer. *Journal of the Institute of Brewing* **121(1)**: 38–43.
- Mateo R., Medina Á., Mateo E. M., Mateo F., Jiménez M. (2007) An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* **119(1–2)**: 79–83.
- McArdle W. D., Katch F. I., Katch V. L. (2010) Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance, 7. izd., Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, str. 111-118.
- Meilgaard M. C. (1972) Stale flavor carbonyls in brewing. *Brewers Digest* **47**:48–57.
- Merrill A. L., Watt B. K. (1973) Energy value of foods: Basis and derivation. U: Agriculture Handbook br. 74, Washington D.C. : Human Nutrition Research Branch, Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture.
- Mikyška A., Hrabák M., Hašková D., Šrogl J. (2002) The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. *Journal of the Institute of Brewing* **108**: 78–85.
- Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision (2012) Brautechnische Analysenmethoden— Würze, Bier, Biermischgetränke, Jacob F., ur., MEBAK, str. 165.



Moros J., Iñón F. A., Garrigues S., de la Guardia M. (2005) Determination of the energetic value of fruit and milk-based beverages through partial-least-squares attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **538**: 181-193.

Narziss L. (2004) Abriss der Bierbrauerei, 7. izd., Wiley - VCH Verlag GmbH.

Narziss L. (1992) Die Bierbrauerei: Die Technologie der Würzebereitung, 7. izd., Ferdinand Enke Verlag.

Olšovská J., Štěřba K., Pavlovič M., Čejka P. (2015) Determination of the Energy Value of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **11**: 2–6.

Pittet V., Morrow K., Ziola B. (2011) Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *gtf*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **69**: 57–61.

Saison D., de Schutter D. P., Uyttenhove B., Delvaux F., Delvaux F. R. (2009) Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry* **114(4)**: 1206–1215.

Smedley S. M. (1995) Discrimination between beers with small colour differences using the CIELAB colour space. *Journal of the Institute of Brewing* **101(3)**: 195–201.

Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani (2011) *Službeni list Europske unije*.

Vanderhaegen B., Delvaux F., Daenen L., Verachtert H., Delvaux F. R. (2007) Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry* **103(2)**: 404–412.

Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdelinckx G. (2006) The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry* **95(3)**: 357–381.

Van Oevelen D., Verachtert H. (1979) Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **37**: 34–37.