

# Utjecaj procesa ukomljavaanja na kvalitetu piva

---

**Klinar, Marijan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:277435>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, Rujan 2022.

Marijan Klinar

**UTJECAJ PROCESA  
UKOMLJAVANJA NA  
KVALITETU PIVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka, te uz pomoć doc. dr. sc. Maria Novaka, doc. dr. sc. Antonije Trontel i Božidara Konstanjčara mag. ing bioproc. (pivovara Medvegrad d.o.o.) .

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

### UTJECAJ PROCESA UKOMLJAVANJA NA KVALITETU PIVA

*Marijan Klinar*, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058208086

**Sažetak:** U ovom radu proučavan je utjecaj različitih načina ukomljavanja na kemijski sastav (šećeri, alkoholi i lakohlapivi spojevi) i kvalitetu proizvedenog svijetlog lager piva. Načini ukomljavanja proučavani u ovom istraživanju bili su: infuzijsko ukomljavanje, jednostruko dekokcijsko ukomljavanje i dvostruko dekokcijsko ukomljavanje. Promjene kemijskog sastava sladovine i piva praćene su pomoću tekuće kromatografije visoke djelotvornosti i plinske kromatografije. Sastav šećera dobivenih sladovina ovisi o načinu ukomljavanja, a dobiveni su ovi sastavi šećera za infuziju (maltoza 61,02 g/L, maltotrioza 14,59 g/L, glukoza 12,78 g/L, fruktoza 2,57 g/L), jednostruko dekokciju (maltoza 54,19 g/L, maltotrioza 12,70 g/L, glukoza 9,95 g/L, fruktoza 1,895 g/L) i dvostruko dekokciju (maltoza 61,105 g/L, maltotrioza 14,95 g/L, glukoza 13,03 g/L, fruktoza 2,53 g/L). U gotovom pivu zabilježene su vrlo slične koncentracije glicerola i etanola kod sva tri načina ukomljavanja. Kod infuzijskog ukomljavanja koncentracija etanola bila je 41,70 g/L, a glicerola 1,599 g/L. Kod jednostrukog dekokcijskog ukomljavanja bilo je 39,45 g/L etanola odnosno 1,43 g/L glicerola, a kod dvostruke dekokcije 37,80 g/L etanola i 1,745 g/L glicerola. Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da ne postoje znatnije razlike u kemijskom sastavu sladovina i piva dobivenih različitim načinima ukomljavanja. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se što detaljnije utvrdio utjecaj postupka ukomljavanja na kvalitetu piva.

**Ključne riječi:** *svijetlo lager pivo, infuzijsko ukomljavanje, jednostruko i dvostruko dekokcijsko ukomljavanje, kemijski sastav sladovine i piva, kvaliteta piva*

**Rad sadrži:** 39 stranica, 8 slika, 7 tablica, 42 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Božidar Šantek

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Mario Novak, doc. dr. sc. Antonija Trontel

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Božidar Šantek (mentor)
3. doc. dr. sc. Mario Novak (član)
4. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 27. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### EFFECTS OF MASHING PROCEDURES ON BEER QUALITY

*Marijan Klinar, univ. bacc. ing. techn. aliment.*  
*0058208086*

**Abstract:** The focus of this study is to compare the effect that different mashing procedures had on produced pale lager beer chemical composition (sugars, alcohols and volatiles) and quality. The mashing procedures that were studied were infusion mashing, decoction mashing and double decoction mashing. Changes of the chemical composition of the wort and beer were analyzed by means of ultra performance liquid chromatography and gas chromatography. The sugar composition of the obtained worts depended on the mashing procedure, and they were of the following compositions: infusion mash (maltose 61,02 g/L, maltotriose 14,59 g/L, glucose 12,78 g/L, fructose 2,57 g/L), decoction mash (maltose 54,19 g/L, maltotriose 12,70 g/L, glucose 9,95 g/L, fructose 1,895 g/L) and double decoction mash (maltose 61,105 g/L, maltotriose 14,95 g/L, glucose 13,03 g/L, fructose 2,53 g/L). Finished beers, obtained from all three mashing procedures, had very similar concentrations of glycerol and ethanol. Beer obtained from wort made by: infusion mashing had ethanol concentration of 41,70 g/L, and glycerol 1,599 g/L, decoction mashing had ethanol concentration of 39,45 g/L, and glycerol 1,43 g/L, and double decoction mashing had ethanol concentration of 37,80 g/L, and glycerol 1,745 g/L. Based on the results, conclusion of the thesis is that there are no significant differences in chemical composition of worts produced by different mashing procedures and beers obtained from them. Nevertheless, further investigation is needed to completely detect real effect.

**Keywords:** *Pale lager beer, infusion mashing, decoction mashing and double decoction mashing, chemical composition of wort and beer, beer quality*

**Thesis contains:** 39 pages, 8 figures, 7 tables, 42 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Božidar Šantek, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** *Mario Novak, PhD, Antonija Trontel, PhD*

#### Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Božidar Šantek, PhD, Full professor (mentor)
3. Mario Novak, PhD, Assistant professor (member)
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 27. september 2022.

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1 OSNOVNE SIROVINE.....	2
2.1.1. Šećerne sirovine.....	2
2.1.2. Hmelj.....	3
2.1.3. Voda.....	5
2.1.4. Kvasac i drugi radni mikroorganizmi.....	6
2.2. PROCES PRIPREME SLADOVINE.....	7
2.2.1. Priprema sirovina.....	7
2.2.2. Infuzijsko ukomljavanje.....	8
2.2.3. Dekokcijsko ukomljavanje.....	11
2.2.4. Posebni oblici ukomljavanja.....	14
2.3. GLAVNO I NAKNADNO VRENJE.....	15
2.3.1. Glavno vrenje.....	15
2.3.2. Naknadno vrenje.....	17
2.4. SPOJEVI AROME.....	18
2.4.1. Viši alkoholi.....	18
2.4.2. Esteri.....	19
2.5. PRIPREMA ZA PUNJENJE.....	20
2.4.1. Filtracija.....	20
2.4.2. Koloidna stabilizacija.....	21
2.4.3. Mikrobiološka stabilizacija.....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>22</b>
3.1. MATERIJALI.....	22
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	22
3.1.2. Ječmeni slad.....	22
3.1.3 Hmelj.....	22
3.1.5. Kemikalije i reagensi.....	22
3.2. APARATURA I PRIBOR.....	22
3.2.1. Centrifuga.....	22
3.2.2. UPLC uređaj (visokoučinkovita tekućinska kromatografija).....	23
3.2.3. GC- uređaj.....	23
3.2.4. Informatički programi i obrada rezultata.....	23
3.3. METODE.....	23
3.3.1. Postupci u proizvodnji svijetlog piva donjeg vrenja.....	23

3.3.2. Uzorkovanje.....	24
3.3.3. Određivanje sastava piva donjeg vrenja tijekom procesa proizvodnje visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (UPLC) .....	24
3.3.4. Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg vrenja plinskom „ <i>headspace</i> “ kromatografijom (HS-GC_FID) .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
4.1. INFUZIJSKO UKOMLJAVANJE .....	27
4.2. JEDNOSTRUKA DEKOKCIJA.....	29
4.2. DVOSTRUKA DEKOKCIJA.....	31
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>34</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>35</b>



# 1. UVOD

Pivska kultura u Hrvatskoj zadnjih godina doživljava svojevrsnu „renesansu“. To se može vidjeti prvenstveno iz broja pivovara aktivnih na tržištu (Mijatović, 2009). Njihovo djelovanje neupitno veže i popratne aktivnosti u obliku pivskih festivala i događanja te veći interes javnosti. Povećan interes za pivo kao proizvod potiče i znanost, ponekad direktno od strane samih pivovara, da istražuju kako nove, tako i postojeće procese i tehnike u pivarstvu radi njihovog poboljšanja te dobivanja što boljeg konačnog proizvoda. Predmet intenzivnog istraživanja tako su i tehnike ukomljavanja slada i neslađenih sirovina .

Ukomljavanje je proces miješanja samljevenog slada i neslađenih sirovina s određenom količinom vode određene temperature (Briggs i sur., 2004). S današnje perspektive taj proces mora zadovoljiti ekonomske i volumne potrebe (Krottenthaler i sur., 2009). Generalno gledajući, različiti procesi ukomljavanja koji su se razvili do danas mogu se podijeliti na infuzijske i dekokcijske metode ukomljavanja (Krottenthaler i sur., 2009). Proces se prilično razlikuju, a koji proces se odabire za ukomljavanje ovisi o vrsti piva koja se želi napraviti, načinu na koji se ta vrsta priprema u prošlosti, o postrojenju i sirovinama koje su dostupne te brzini samog postupka i potrošnji energije (Briggs i sur., 2004). Naime, mnogi moderni procesi ukomljavanja ne daju iste rezultate kao procesi korišteni u prošlosti (Briggs i sur., 2004). Olšovská i sur. (2014). ističu da je jedan od mogućih faktora koji doprinose posebnosti piva iz Češke i tehnika proizvodnje, odnosno dekokcijski postupak ukomljavanja.

Iz današnje perspektive svakako se moraju uzeti u obzir svi parametri kada se odabire proces ukomljavanja. Pitanja na koja je, između ostalog, potrebno odgovoriti pri odabiru su: koje su mogućnosti pogona, je li odabrani proces ekonomski i ekološki održiv te kakav je njegov utjecaj na finalni proizvod. Fokus ovog rada bio je upravo na tome kakav je utjecaj odabira procesa ukomljavanja na kvalitetu gotovog piva, odnosno na sastav sladovine te na sintezu hlapivih spojeva arome piva u procesu proizvodnje. Cilj je dakle bio međusobno usporediti infuzijsko, jednostruko i dvostruko dekokcijsko ukomljavanje u proizvodnji standardnog svijetlog lager piva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 OSNOVNE SIROVINE

Za osnovnu proizvodnju piva potrebne su četiri sirovine: voda, hmelj, ječmeni slad te kvasac. Škrobne sirovine, od kojih je ječam najčešća te najvažnija sirovina u proizvodnji piva, za proizvodnju piva mogu se koristiti u slađenom obliku ili neslađenom kao surogati. Voda je količinski najvažnija sirovina, dok gorak okus te utjecaj na aromu dolazi od hmelja. Kvasac je najvažnija sirovina, ili faktor o kojem ovisi proces vrenja odnosno proizvodnje piva (Kunze, 2010).

#### 2.1.1. Šećerne sirovine

Fermentabilni ekstrakt u sladovini dobiva se konverzijom škroba (Kunze, 2010). Izvor ukupnog ugljikohidratnog ekstrakta u sladovini su sirovine korištene pri ukomljavanju, uz moguće dodavanje saharoze i drugih izvora ugljikohidrata kod nekih proizvodnih procesa dobivanja piva (Briggs i sur., 2004). Tradicionalno, izvor enzima za konverziju škroba u jednostavnije ugljikohidrate te na taj način proizvodnju ugljikohidratnog ekstrakta je ječmeni slad (Briggs i sur., 2004) (slika 1).



**Slika 1.** Razne vrste ječmenog slada (Nuttal, 2017)

Sladovi se mogu razlikovati u boji, ovisno o temperaturi njihova sušenja te činjenici jesu li prženi ili ne te kojim intenzitetom (Briggs, 2004). Danas, na globalnoj razini najviše se

koristi pet žitarica od kojih samo dvije u slađenom obliku (ječam, pšenica), dok se preostale tri koriste u nemodificiranom obliku (kukuruz, riža, sirak) (Meussdoerffer i Zarnkow, 2009). Na manjoj razini koristi se puno više njih, pa tako kao neslađene sirovine za proizvodnju piva razlikujemo i žitarice poput kukuruza, siraka, riže, ječma ili pšenice (Kunze 2010). Ječam (*Hordeum vulgare*), odnosno njegov slad pokazali su se iznimno pogodnima za proizvodnju piva zbog visokog udjela hidrolitičkih enzima te ljuske koja predstavlja praktično filtracijsko sredstvo kod cijedenja (Meussdoerffer i Zarnkow, 2009). Razlozi korištenja drugih sirovina umjesto ječmenog slada za dobivanje piva su: bolja cijena u odnosu na ječam, dostupnost ječma ovisno o regiji ili posebna svojstva bojanja za stvaranje inovativnih pivskih stilova (O'Rourke, 1999). Od 17 različitih žitarica koje definira FAO<sup>1</sup>, 11 ih je pogodna sirovina za proizvodnju piva (Meussdoerffer i Zarnkow, 2009). Glavni kriterij za odabir žitarice za proizvodnju piva uvijek mora biti kvaliteta proizvoda i njegova prihvaćenost od strane potrošača (Meussdoerffer i Zarnkow, 2009). Svakako, bilo koja alternativa ječmenom sladu mora biti sličnih svojstava za upotrebu u proizvodnji piva, ali takva žitarica mora ispuniti i kriterije kao što su ekonomska isplativost, dostupnost u adekvatnoj količini te da je adekvatne kvalitete kao i to da postoji mogućnosti za njenim slađenjem (Meussdoerffer i Zarnkow, 2009). Za potrebe ukomljavanja mogu se dodati razni drugi oblici škrobnih sirovina kao što su brašno, razne pahuljice ili krupice (Briggs i sur., 2004). U kojem obliku ćemo dodati škrobnu sirovinu najviše ovisi o temperaturi želatinizacije sirovine (Briggs i sur., 2004). Tako razlikujemo tri kategorije dodataka: dodatci koji se dodaju na početku procesa ukomljavanja bez prethodne manipulacije nad njima (npr. pšenično brašno), dodatci koji su termički obrađeni prije početka ukomljavanja (npr. kukuruzne pahuljice, ekspandirana pšenica) te dodatci koji se kuhaju unutar pivovare kao dio programa ukomljavanja (npr. rižina, kukuruzna ili sirakova krupica) (Briggs i sur., 2004). Osim pri ukomljavanju, razne škrobne sirovine mogu se dodati u kotao pri kuhanju sladovine. Njih dijelimo u dvije kategorije a to su: pojačivači sladovine koji u principu doprinose samo udjelu ugljikohidrata u njoj (npr. saharoza, invertni šećer i sirupi od hidroliziranog škroba) te zamjenske sladovine kao što su sladni ekstrakt te sirupi napravljeni od hidroliziranih žitarica (Briggs i sur., 2004).

### 2.1.2. Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus*) je višegodišnja biljka penjačica čiji se neoplođeni ženski cvjetovi koriste u pivarstvu (slika 2), zato što sadrže gorke smole, kao i eterična ulja koji daju

---

<sup>1</sup> Organizacija za prehranu i poljoprivredu (*Food and Agriculture Organization, FAO*)

komponente gorčine i arome pivu (Kunze, 2010). Još jedan razlog njihovog korištenja je i bakteriostatsko djelovanje gorkih tvari hmelja (Kunze, 2010).



**Slika 2.** Cvjetovi hmelja (Campbell, 2022).

Sami cvjetovi nakon branja sadrže od 75 % do 80 % masenog udjela vode te je u njima otprilike 20 % ukupne mase materijala koji se može koristiti za proizvodnju piva koncentriranog u lupulinskim žlijezdama (Kunze 2010; Briggs i sur., 2004). Iz razloga produljenja roka trajnosti cvjetovi se suše dok količina vode u njima ne iznosi od 8 % do 12 % masenog udjela te se mogu dalje koristiti cijeli ili prerađeni, radi praktičnijeg korištenja i lakšeg skladištenja (Kunze 2010; Briggs i sur., 2004). Hmeljna ulja i gorke supstance najvažnije su komponente hmelja za proizvodnju piva (Kunze, 2010). Suma svih gorkih smola predstavlja ukupnu količinu smola, koja se može podijeliti na tvrde i meke smole (Krottenthaler, 2009). Gorke kiseline glavni su sastojci mekih smola, a mogu se podijeliti na  $\alpha$ -kiseline (3-17 % masenog udjela) te  $\beta$ -kiseline (2-7 % masenog udjela) (Krottenthaler, 2009). Razlog širokog raspona koncentracija gorkih kiselina koje se mogu pronaći u hmelju je taj, što se sastav samog hmelja razlikuje ovisno o vrsti, starosti, zemlji podrijetla i geografskom području uzgoja, vremenu berbe, sušenju te skladištenju (Forster i sur., 2004; Moir, 2000). Tijekom kuhanja sladovine dolazi do reakcije izomerizacije netopivih  $\alpha$ -kiselina u topive izo- $\alpha$ -kiseline, koje se, unatoč taloženju tijekom hlađenja i vrenja, nađu u gotovom pivu te uzrokuju zagorčavanje (Kunze, 2010). Za razliku od njih,  $\beta$ -kiseline su netopive u sladovini te stoga znatno manje

doprinosu gorčini (Krottenthaler, 2009). Gorke tvari su i površinski aktivne, što utječe na stabilnost pjene (Kunze, 2010). Hmeljna ulja, odnosno tvari arome u hmelju se nalaze u količini od 0,5 % do 1,2 % (Kunze 2010). Ona uključuju između 200 i 250 različitih eteričnih supstanci, dok je iz hmelja ukupno izolirano preko 300 hlapivih spojeva (Kunze, 2010; Kamhuber i Hagl, 2001). Oko 20 % do 30 % polifenola u sladovini dolazi od hmelja, dok ih je u samom hmelju od 2 % do 5 % suhe tvari (Kunze 2010; Krottenthaler, 2009). Njihovo svojstvo je to da su antioksidansi, ali i da sudjeluju pri formiranju mutnoće u pivu te doprinose boji i okusu piva (Kunze 2010). Kako bi se smanjio volumen te produljio rok trajanja hmelja iz njega se mogu dobiti razni produkti koji sve više istiskuju korištenje hmeljnih šišarica (Kunze 2010; Krottenthaler, 2009). Hmeljni produkti uključuju hmelj u peletima, hmeljne ekstrakte te ekstrahirana hmeljna ulja (Kunze, 2010). Također, peleti i ekstrakti mogu biti izomerizirani prije samog procesa kuhanja piva (Kunze, 2010).

### 2.1.3. Voda

Voda je količinski najvažnija sirovina, a u pivu se nalazi od 89 % do 98 % (Kunze, 2010; Briggs i sur., 2004). Također, osim što je potrebna izravno za samo pivo, potrebna je i za operacije čišćenja, ispiranja i sl. (Kunze, 2010). Pivovare svoju procesnu vodu dobivaju ili iz svojih izvora (bunara) ili iz javnog gradskog vodovoda (Krottenthaler i Glas, 2009). Kako bi ona bila ispravna ili za piće ili za tehnološke zahtjeve same proizvodnje razlikujemo dva aspekta obrade: obrada izvorske vode za ispunjavanje legalnih kriterija te obrada vodovodne vode za zadovoljavanje tehnoloških zahtjeva proizvodnje (Krottenthaler i Glas, 2009). Prvenstveno, voda za proizvodnju piva mora biti pogodna za piće, dakle, mora biti bezbojna, bez mirisa i bez mutnoće. Također, postoje granice za određene spojeve u vodi, ali i zahtjevi za njenom mikrobiološkom ispravnosti. Što se tiče zahtjeva za vodu potrebnu za proizvodnju piva, u njoj se mogu razlikovati kemijski aktivne i kemijski inaktivne soli. One su kemijski inaktivne ili aktivne u odnosu na to reagiraju li s komponentama slada tijekom ukomljavanja (Kunze, 2010). Soli koje ne reagiraju (kemijski inaktivne) završavaju nepromijenjene u pivu (npr. natrijev klorid, kalijev klorid, natrijev sulfat, kalijev sulfat itd.), dok kemijski aktivne soli reagiraju s komponentama slada te mogu uzrokovati promjene u komini kao što je npr. promjena pH uzrokovana reakcijom kalcija iz vode te fosfata iz slada čime nastaje kalcijev fosfat koji se taloži (Palmer i Kaminski, 2013; Kunze, 2010). Glavni zahtjevi za vodu za proizvodnju piva su da se ukomljavanjem dobije komina određenog pH raspona (obično od 5.2 do 5.6 pH pri 20 °C (pH optimalni za enzime za konverziju škroba u jednostavnije

ugljikohidrate)) te da okusni profil i mineralni sastav vode pojačavaju karakter piva a ne oduzimaju od njega (Palmer i Kaminski, 2013). Tako se mogu razlikovati i razni okusni efekti iona (Palmer i Kaminski, 2013). Neki ioni u pivu imaju snažne okuse (npr. kloridi i sulfati), neki su prilično neutralni (npr. kalcij), dok su neki u koncentracijama manjim od limita detekcije ljudskog okusa (npr. bikarbonat)(Palmer i Kaminski, 2013). Vrlo je važan omjer sulfata i klorida jer on utječe na ravnotežu okusa hmeljno-sladno, odnosno suho-puno (Palmer i Kaminski, 2013).

#### 2.1.4. Kvasac i drugi radni mikroorganizmi

Kvasac je jednostanični mikroorganizam koji ima anaeroban i aeroban metabolizam (Kunze, 2010)(slika 3).



**Slika 3.** Stanice kvasca pod svjetlosnim mikroskopom (Ward, 2022).

Osim nekih vrsta kvasaca korištenih u specijalnim pivima, kvasci korišteni za proizvodnju piva svi pripadaju rodu *Saccharomyces* (Tenge, 2009). Generalno se dijele na: kvasce gornjeg vrenja (*Saccharomyces cerevisiae*) i kvasce donjeg vrenja (*Saccharomyces*

*pastorianus*)(Kunze, 2010). Glavne razlike između te dvije skupine kvasca su: mogućnost previranja trisaharida rafinoze (mogu ga prevresti kvasci donjeg vrenja te samo trećina kvasaca gornjeg), mogućnost sporulacije (većina kvasaca gornjeg vrenja, jako loša kod kvasaca donjeg) te različiti nusproizvodi fermentacije (značajno veće količine fermentacijskih nusproizvoda kao što su esteri i viši alkoholi kod kvasaca gornjeg vrenja)(Kunze, 2010). Proizvodnja etanola kroz metabolizam ugljikohidrata iz sladovine glavni je metabolički put pivarskog kvasca tijekom proizvodnje piva (Tenge, 2009). Kao rezultat ostalih metabolizama kvasca, on ne proizvodi samo etanol već i druge spojeve te tako utječe na okus i karakter piva (Kunze, 2010). Ostali produkti glavnog vrenja uključuju vicinalne diketone, više alkohole, estere, fenolne spojeve, sumporne spojeve te acetaldehid (Tenge, 2009). Osim kvasaca, pri proizvodnji piva mogu se koristiti i drugi mikroorganizmi kao što su bakterije mliječne kiseline kod određenih stilova (npr. Berliner Weiße, određeni belgijski stilovi) te mikroflora prisutna u zraku pivovare kod piva nastalih otvorenim spontanom vrenjem(određeni belgijski stilovi)(Kunze, 2010).

## **2.2. PROCES PRIPREME SLADOVINE**

Postupak pripravljanja slatke sladovine iz koje se zatim vrenjem šećera dobiva etanol i ugljikov dioksid zove se ukomljavanje (Kunze, 2010; Briggs i sur., 2004). To je proces kojim se inicijalno netopive komponente slada prevode u topive (Kunze 2010). Posebno se to odnosi na proizvodnju topivih fermentabilnih šećera koji se dobivaju uz pomoć amilolitičkih enzima (Kunze 2010). Miješanjem samljevenog slada i surogata s određenom količinom vode i na određenoj temperaturi, nakon određenog vremena, događaju se potrebne biokemijske promjene (Briggs i sur., 2004). Kao rezultat tog procesa, odvajanjem rezidualnih krutina (ili tropa) od komine, dobiva se sladovina koja je spremna za daljnje tehnološke procese (Briggs i sur., 2004). Kao što je već navedeno u uvodu, razlikujemo nekoliko vrsta ukomljavanja koja se mogu podijeliti na infuzijske i dekokcijske metode ukomljavanja (Krottenthaler i sur., 2009).

### **2.2.1. Priprema sirovina**

Postupak mljevenja slada koristi se kako bi se omogućio pristup enzimima da razgrađuju različite sastojke slada (Kunze, 2010; Krottenthaler i sur., 2009). To je dakle mehanički proces kojim se dobiva raspon različitih veličina čestica (Kunze, 2010; Briggs i sur., 2004)). Veličina čestica ima utjecaj na postupak cijedenja koji se provodi nakon ukomljavanja, ali i na ekstrakciju šećera iz endosperma slada ili žitarice tijekom ukomljavanja (Krottenthaler i sur., 2009). Sastav usipka koji se miješa s vodom tijekom ukomljavanje utječe na svojstva cijedenja iz dobivenog tropa pa se tako vrsta mlina i mljevenja određuju prema sustavu za

cijedenje (Krottenthaler i sur., 2009). Pretjeranim mljevenjem dobiva se sitno mljeveni slad, koji kao produkt nakon ukomljavanja daje sitno mljeveni trop te on vrlo brzo začepkuje pore filterskog kolača tijekom cijedenja (Krottenthaler i sur., 2009). Posljedica toga je smanjena poroznost filterskog kolača, što dovodi do duljeg vremena cijedenja te potrebe za omekšavanjem kolača mehaničkim postupkom (Krottenthaler i sur., 2009). Sitnije mljevenje ima i svojih pozitivnih strana, pa se koristi zbog brže hidratacije slada tijekom ukomljavanja, što dovodi do bržeg otapanja prethodno nastalih topivih supstanci i bržeg ekstrahiranja ekstrakta iz čestica tijekom ispiranja (Briggs i sur., 2004). Također, odnos površina/volumen je veći kod manjih i čestica u većem broju (Briggs i sur., 2004), što dovodi do veće površine na koju enzimi mogu djelovati te preko koje tvari mogu difundirati (Briggs i sur., 2004). Poželjno je slad sitno samljati kada se koristi kominski filter za cijedenje, ali i tu treba paziti da se slad ne samelje do brašna zbog gubitaka ekstrakta (Krottenthaler i sur., 2009). Tako cijedenje u komovnjaku zahtijeva najgrublje samljeven slad, korištenje raznih kada za cijedenje nešto manje grubo, a cijedenje pomoću kominskog filtera najsitnije samljeven slad (Briggs i sur., 2004). Najčešće se koriste mlin čekićar ili drobilice s valjcima, a razlikujemo mokro i suho mljevenje (Krottenthaler i sur., 2009). Zahtjevi kvalitete vode za ukomljavanje nabrojani su u poglavlju 2.1.3. Voda. Bitno je dakle da je voda ispravna za piće te da je ispravnih tehnoloških svojstava ovisno o vrsti piva koje se proizvodi. Potrebno je da se ukomljavanjem osiguraju optimalni uvjeti (pH i temperatura) za rad enzima, ali i da voda prema potrebi sadrži razne ione koji utječu na okus, percepciju i karakter piva. Potrebno je dakle regulirati omjer privremene i trajne tvrdoće, ukupnu količinu tvrdoće te količinu iona koji mogu utjecati na okus (Narziss 1992, MacWilliam 1975).

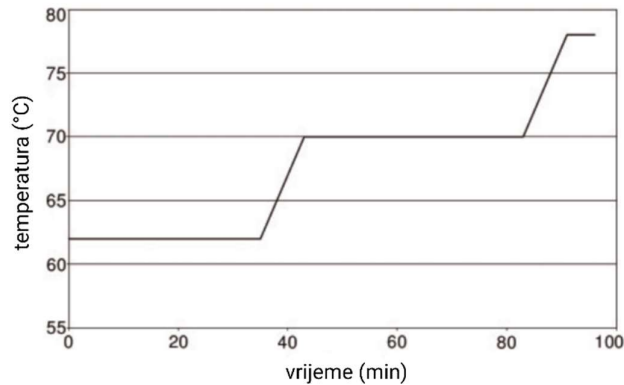
### 2.2.2. Infuzijsko ukomljavanje

Uvjeti ukomljavanja moraju odgovarati vrsti piva koja se proizvodi (Bolton, 2013). Kod infuzijskog ukomljavanja tako najčešće razlikujemo jednostavno infuzijsko ukomljavanje te infuzijsko ukomljavanje s temperaturnim stankama (Bolton, 2013). Za provedbu infuzijskog ukomljavanja u teoriji nam je potrebna jedna posuda, pod uvjetom da se ta posuda može grijati (Kunze, 2010). Kominu tijekom ukomljavanja nije potrebno pumpati iz posude u posudu, što je prednost u odnosu na dekokcijske metode ukomljavanja zbog manjeg otapanja kisika te posljedično manje oksidacije komine i sladovine (Kunze, 2010). Ostale prednosti infuzijskih ukomljavanja nad dekokcijskim uključuju laganu automatizaciju, manju potrošnju energije i lakše praćenje procesa (Kunze 2010).



Tipično za proizvodnju britanskih *ale* piva, kod jednostavnog infuzijskog ukomljavanja samo ukomljavanje i separacija sladovine od tropa odvija se u komovnjaku (Bolton, 2013). Njegova karakteristika su guste komine (2,15-2,42 hL glavnog naljeva na 100 kg usipka) s grubo mljevenim usipkom dobro modificiranog slada (Bolton, 2013). Taj način ukomljavanja provodi se tako da se usipak pomiješa s glavnim naljevom, koji je prethodno zagrijan na određenu temperaturu kako bi se dobila komina određene temperature (63-67 °C) (Bolton, 2013). Komina se na toj temperaturi zadržava oko 30 minuta, sve dok se ne pokaže negativan jodni test (Bolton, 2013). Zatim se u kominu dodaje do 1,3 hL novog vrućeg naljeva na 100 kg usipka kojim se podiže temperatura komine do između 67 i 69 °C (Bolton, 2013). Na toj temperaturi komina stoji idućih dva do tri sata, zatim se odvaja sladovina od tropa koji se ispire (Bolton, 2013). U odnosu na druge postupke ukomljavanja jednostavno infuzijsko ukomljavanje je vremenski zahtjevno, s ukupnim trajanjem zajedno s cijedenjem oko 6 sati (Bolton, 2013). Proces ukomljavanja može se ubrzati korištenjem cijednjaka, što omogućava pripremljanje nešto rjeđe komine s kojom cijedenje ide puno brže (Bolton, 2013). Tada se mora paziti na samu brzinu cijedenja, jer ona može utjecati na koncentraciju dobivenog ekstrakta u sladovini kao i kvalitetu sladovine (Bolton, 2013).

Danas se, poboljšanjem tehnologije, tijekom slađenja u zrnju ječma događa dobra citoliza i proteoliza, odnosno dobra modifikacija slada (Krottenthaler i sur., 2009). Tako kod proizvodnje određenih stilova piva ukomljavanje treba biti predviđeno samo za amilolizu, što se postiže infuzijskim metodama s visokom početnom temperaturom (60-64 °C) (Krottenthaler i sur., 2009). To je danas često i tehnološki moguće pa infuzijsko ukomljavanje s temperaturnim stankama postaje sve popularnije za proizvodnju i lager i *ale* piva (Bolton, 2013; Krottenthaler i sur., 2009). Proces se, kao i jednostavno infuzijsko ukomljavanje, može provoditi u jednoj posudi (komovnjaku), s jedinom razlikom da je tu posudu potrebno moći grijati (Bolton, 2013). Suština procesa je da se toplina direktno prenese na kominu, tako da ona prolazi kroz niz kontroliranih temperaturnih stanki različitih temperatura i vremena trajanja (slika 4) (Bolton, 2013).



**Slika 4.** Režim infuzijskog ukomljavanja s dvije temperaturne stanke (prema Krottenthaler i sur., 2009).

Kako je glavni zadatak ukomljavanja razgradnja škroba u jednostavnije ugljikohidrate, tako su navedene temperaturne stanke ovisne i određene temperaturama želatinizacije škrobnih molekula te optimalnim temperaturama za rad pojedinih enzima. Najvažniji enzimi kod ukomljavanja su  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza (Krottenthaler i sur., 2009). Obje cijepaju  $\alpha$  - (1 – 4) - D – glikozidnu vezu, ali na različitim mjestima pa se njihovom katalitičkom aktivnosti dobivaju različiti produkti (Kruger i Lineback, 1987). Tako  $\beta$ -amilaza s nereducirajućeg kraja škrobne molekule odvaja po dvije jedinice glukoze, efektivno stvarajući maltozu (MacGregor i sur., 1999).  $\alpha$ -amilaza katalizira reakciju razgradnje dugih škrobnih lanaca do manjih dekstirna, koji dalje mogu biti supstrati za  $\beta$ -amilazu (Krottenthaler i sur., 2009). Osim dva najvažnija enzima postoje i brojni drugi koji sudjeluju tijekom ukomljavanja, pa razlikujemo razne peptidaze koje vrše enzimsku razgradnju proteina u komini (Kunze, 2010). One također imaju vlastiti temperaturni optimum, a njihovom katalizom nastaju ili aminokiseline i peptidi ili spojevi veće molekulske mase (Kunze, 2010). Broj stanki i njihov temperaturni režim ovise o kvaliteti, odnosno, modificiranosti slada pa tako slabo modificiran slad loše kvalitete treba više stanki s nižom početnom temperaturom ukomljavanja dok, kako je već spomenuto, dobro modificiran slad zahtjeva manje temperaturnih stanki s višom početnom temperaturom ukomljavanja (Bolton, 2013). Viša početna temperatura ukomljavanja ima dodatnih tehnoloških prednosti kao što su inhibicija fosfatne aktivnosti (temperaturni optimum između 50 i 53°C), što dovodi do formiranja manjeg puferskog kapaciteta i većeg pada pH tijekom fermentacije. Svjetlija boja i bolja koloidna stabilnost također su posljedice toga. Još jedna tehnološka prednost je i smanjenje proteolitičke aktivnosti, odnosno pojava više proteina veće molekulske mase koji pozitivno utječu na stabilnost pивske pjene (Krottenthaler i sur., 2009).

Prema Enge i sur. (2005), ukomljavanje bez prokuhavanja komine kao kod dekokcijskih metoda nije pogodno za češke sorte slada koje nisu toliko modificirane. Također, kod njega postoji problem s hidrolizom beta-glukana, nedovoljno se odvajaju nepoželjni hlapivi spojevi (tek se odvajaju u stadiju kuhanja sladovine), niža je iskoristivost odnosno saharifikacija te je veća bistrina gotovog piva, odnosno svjetlija mu je boja (Enge i sur., 2005). Isti rad bavi se usporedbom četiri načina ukomljavanja (infuzija, dekokcija s jednim, dva i tri odvarka) te zaključuje da se infuzijskom metodom ukomljavanja dobiva pivo najsvjetlije boje te najmanje sljedećih osobina: gorčine i sastava ukupnih i oksidabilnih fenola, tanina, antocijanina, dušika koji koagulira, hladnog taloga te čvrste tvari sladovine. S druge strane, najviše je sadržavala alfa-glukana, DMS<sup>2</sup>-a i njegovog prekursora u sladovini, kao i DMS-a u gotovom pivu. Što se tiče hlapivih spojeva, kod viših alkohola vidljiv je trend (uz iznimku dekokcije s dva odvarka) smanjenja udjela tih supstanci od infuzije prema trostrukoj dekokciji. Esteri su u mladom pivu, uz iznimku trostruke dekokcije, bili međusobno usporedivih vrijednosti kod svih metoda ukomljavanja. U filtriranom pivu, esteru kod dekokcije s dva odvarka smanjili su se na razinu usporedivu sa slučajem dekokcije s tri odvarka. Korelacija omjera viši alkoholi/esteri nije uočena između postupaka ukomljavanja. Bila je najniža kod dekokcije s jednim odvarkom, dok je bila najviša kod dekokcije s dva odvarka, a približno jednakih vrijednosti je bila kod infuzijskog ukomljavanja te dekokcije s tri odvarka. Koncentracija acetaldehida u mladom pivu drastično se smanjuje od infuzije do dekokcije s tri odvarka. U gotovom pivu je vrijedilo isto, jedino u manjem opsegu. Što se tiče sastava ugljikohidrata, sve vrijednosti su bile usporedive između analiziranih metoda, jedino kod dekokcije s dva i tri odvarka pronađene su veće koncentracije glukoze.

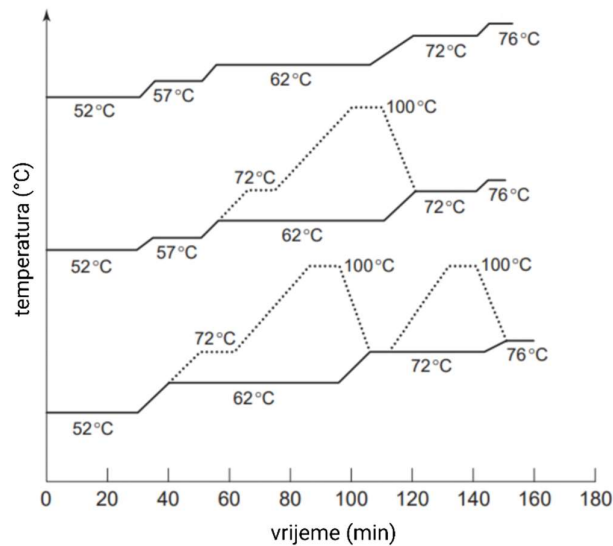
### 2.2.3. Dekokcijsko ukomljavanje

U prethodnom poglavlju već su spomenuta tri najčešća načina dekokcijskog ukomljavanja, a to su dekokcijsko ukomljavanje s jednim, dva ili tri odvarka. Tako je dekokcijsko ukomljavanje s dva odvarka uobičajena metoda proizvodnje čeških piva (Silva i sur., 2008), a tradicionalno se koristi za proizvodnju europskih lager piva (Bolton, 2013). Način izvedbe dekokcijskog ukomljavanja je da se dio komine izdvaja kao odvarak te grije na višu temperaturu u odnosu na originalnu kominu (Kunze, 2010). Nakon postizanja željene temperature, odvarak se pumpom vraća u kominu te tako diže ukupnu temperaturu komine (Kunze, 2010). Komina na novoj temperaturi stoji određeno vrijeme (temperaturna stanka kao

---

<sup>2</sup> Dimetil sulfid (*Dimethyl sulfide*)

i kod infuzijskog ukomljavanja) te se postupak može ponoviti više puta, ovisno o kojem tipu dekokcije se radi (dekokcija s jednim, dva, tri ili više odvaraka) (slika 5) (Kunze, 2010).



**Slika 5.** Usporedba režima infuzijskog ukomljavanja, dekokcijskog ukomljavanja s jednim i s dva odvaraka za proizvodnju sladovine sličnog sadržaja ekstrakta ( prema Briggs i sur., 2004)

Karakteristike dekokcijskog ukomljavanja su korištenje više posuda za njegovu provedbu te rjeđa komina kojom se lakše manipulira (Bolton, 2013). Tri posude koje se koriste su komovnjak, posuda za odvarak te cijednjak (Bolton, 2013). U nekim pivovarama umjesto cijednjaka može se koristiti kominski filter (Bolton, 2013). Ovisno o sastavu usipka i vrsti piva koja se proizvodi, mogu se primijeniti razni režimi dekokcijskog ukomljavanja, jer raspored posuda omogućuje dosta veliku fleksibilnost. Tako varijabilni čimbenici mogu biti količina odvaraka, temperatura na koju se grije kao i period vremena tijekom kojeg je on izdvojen od glavne komine (Bolton, 2013). Miješalo se također može ugasiti prije vađenja samog odvaraka, što dovodi do taloženja čestica u komovnjaku te mogućnosti izdvajanja gušćeg djela komine za odvarak (Bolton, 2013). Varijabilno može biti i vrijeme vraćanja odvaraka u glavnu kominu, čime reguliramo brzinu promjene temperature glavne komine (Bolton, 2013).

Neke od posljedica izdvajanja odvaraka od komine te njegovog zagrijavanja na višu temperaturu su: manje stvaranje toplog taloga zbog bržeg zagrijavanja komine, ekstenzivnija želatinizacija i likvefakcija škroba, povećana ekstrakcija iz ljuske slada, povećana formacija melanoidina, povećano uklanjanje DMS-a, manji broj aktivnih enzima u komini te moguće povećanje prinosa (Kunze, 2010). Tako, korištenjem dekokcijskog postupka, dobivamo puno više tvari arome u sladovini u odnosu na infuzijsko ukomljavanje (Kryl i sur., 2012). U dobivenoj sladovini nakon dekokcijskog ukomljavanja ostaje puno više nefermentabilnih

oligosaharida koji utječu na senzorsku kvalitetu piva, pogotovo na punoću okusa (Kryl i sur., 2012). Povećan udio nefermentabilnih oligosaharida u sladovini dovodi do manjeg stupnja atenuacije te manjeg postotka alkohola nego kod infuzijskog ukomljavanja sličnog režima (Kryl i sur., 2012). To nije u skladu s podacima iz literature (Kunze, 2010) te već ranije spomenutog istraživanja Enge i sur. (2005), koji su kod dekokcije s dva i tri odvarka pronašli veće koncentracije glukoze nego kod infuzijskog ukomljavanja i dekokcije s jednim odvarkom. U istom radu dekokcija s jednim odvarkom bila je senzorski na zadnjem mjestu. Dekokcija s dva odvarka imala je najviše topivog dušika, ukupnih, kao i oksidabilnih te oksidiranih polifenola, a na senzorskom ocjenjivanju završila je druga iza dekokcije s tri odvarka. Što se tiče metode koja je završila prva od četiri na senzorskom ocjenjivanju, kod dekokcije s tri odvarka pronađeni su najmanji udjeli alfa-glukana, DMS-a i njegovog prekursora u sladovini i gotovom pivu, hladnog taloga te krutina u sladovini. Imala je najintenzivniju boju, najveću gorčinu i koncentraciju slobodnih aminokiselina, koagulabilnog dušika, tanina i anticijanogena. Kao što se može vidjeti, a to su potvrdili i drugi radovi (Jurková i sur., 2012), da je povećan udio polifenola u sladovini također karakteristika dekokcijskog ukomljavanja. Istraživanje provedeno na industrijskoj razini dalo je zaključak da korištenjem kombinacije infuzijskog ukomljavanja i dekokcije s jednim odvarkom daje veći sadržaj fermentabilnih šećera u sladovini od dekokcijskog ukomljavanja s dva odvarka (Montanari i sur., 2005). Drugo istraživanje koje se bavilo usporedbom dekokcijsko ukomljavanje/infuzijsko ukomljavanje koristeći sirak kao sirovinu dalo je zaključak da nema razlike, što se tiče količine maltoze u sladovini, između ta dva načina ukomljavanja, uz nedovršenu saharifikaciju (Aniche, 1994). Dobiveni rezultat, doduše, vjerojatno je posljedica korištenja specifičnih sirovina (Aniche, 1994). Rad koji se bavio raspodjelom mase čestica te stupnjem atenuacije u pivima dobivenih iz sladovina dobivenih infuzijskim ukomljavanjem, dekokcijom s jednim ili dva odvarka sličnih početnih temperatura ukomljavanja te temperaturnih stanki na količini od 10 L, kao zaključak navodi da nema značajne razlike u raspodjeli mase čestica te stupnju atenuacije (Rübsam i sur., 2013). Raspodjela mase čestica u pivu refleksija je konačnog sastava ugljikohidrata u njemu, dok stupanj atenuacije daje informaciju o tome koliki je bio stupanj degradacije škrobnih molekula (Rübsam i sur., 2013). Ono što su autori rada uzeli u obzir jest da se kuhanjem odvarka kod dekokcija događa potpuna želatinizacija škrobnih granula iz slada, što omogućava amilazama iz glavne komine pristup dekstrinima veće molekulske mase iz odvarka. Na taj način može se postići usporediva razgradnja ugljikohidrata kod dekokcijskog i infuzijskog ukomljavanja, što može rezultirati sličnom raspodjelom mase čestica dobivenih piva kada se za njihovu proizvodnju koriste materijali visoke kvalitete, pri sličnim uvjetima

ukomljavanja (početna temperatura te temperaturne stanke). Isti autori napominju kako se u obzir doduše mora uzeti da se na industrijskoj razini koriste više početne temperature ukomljavanja kod infuzijskog ukomljavanja nego kod dekokcijskog. Jedino već spomenuti rad Kryl i sur. (2012) daje zaključak koji se ne poklapa s do sad navedenim tvrdnjama. U radu uspoređuju dekokcijsko i infuzijsko ukomljavanje na dva mala pivnička sistema za kuhanje. Problem s tim radom je što uspoređuju piva različitog ekstrakta sladovine, dok za piva istog ekstrakta uspoređuju pšenično i čisto ječmeno pivo. Kod dva piva jednakog ekstrakta i sastava sirovina dobili su rezultate da pivo dekokcijskim postupkom ima veći stvarni stupanj prevrenja, što rezultira i većim udjelom alkohola u njemu, što zapravo odgovara podacima iz literature (Kunze, 2010; Enge i sur., 2005).

#### 2.2.4. Posebni oblici ukomljavanja

Modifikacije prethodno navedenih oblika ukomljavanja, infuzijskog i dekokcijskog, mogu postojati ovisno o potrebi. Razlozi za korištenjem modificiranih načina ukomljavanja su razni, od tehnoloških potreba za dobivanjem piva određenih karakteristika do općenito efikasnijeg procesa ukomljavanja (Kunze, 2010). Jedan od posebnih oblika ukomljavanja je maltaza proces, proces koji se može koristiti kod proizvodnje pšeničnih piva i piva s općenito većim udjelom estera (Krottenthaler i sur., 2009). Naime, koncentracija estera i tvari arome ovise o količini glukoze u sladovini (Krottenthaler i sur., 2009). U uobičajenim procesima ukomljavanja sastav šećera je takav da se sladovina sastoji od 90 % maltoze i maltotrioze, dok preostalih 10 % čine uglavnom glukoza i u manjem djelu fruktoza (Kunze, 2010). Maltaza procesom ili postupkom dobiva se sladovina s udjelom glukoze od 35 % do 40 %, što posljedično ima povećanje udjela etil acetata i izoamil acetata za 70 % do 120 % te smanjenje udjela acetaldehida za 40% (Kunze, 2010). Postupak je dobio svoj naziv po enzimu maltazi, koji svoj temperaturni optimum pokazuje pri 45 °C te cijepa vezu među molekulama maltoze čime se dobivaju dvije molekule glukoze (Krottenthaler i sur., 2009). Kako bi potaknuli rad ovog temperaturno osjetljivog enzima, dio usipka (oko 45 % ukupnog) se ukomljava s dijelom naljeva (oko 60 % ukupnog) standardnim infuzijskim postupkom (Krottenthaler i sur., 2009). Nakon saharifikacije, u kominu se dodaje ostatak ovoga puta hladnog naljeva i usipka čime se postiže optimalna temperatura za rad enzima maltaze (sada prisutnog u novom usipku) te se posljedično dobije ranije opisana sladovina s povećanim udjelom glukoze (Kunze 2010; Krottenthaler i sur., 2009). Još jedan poseban režim ukomljavanja je ukomljavanje s preskokom, odnosno bez stanke za  $\beta$ -amilazu. Pogodno je za proizvodnju piva s niskim udjelom

alkohola (Narziss i sur., 1995). Princip procesa je da se ukomi gusta komina pri temperaturama nižim od 50 °C te se zatim dodavanjem kipuće vode temperatura komine digne iznad 70 °C (Kunze, 2010; Krottenthaler i sur., 2009). Na taj način stanaka za  $\beta$ -amilazu se preskače te nastaje sladovina koja ne daje velik stupanj prevrenja, jer sadrži puno graničnih dekstrina (Kunze, 2010). Posebni oblici ukomljavanja su i Kubessa proces, u kojemu se odvajaju frakcije usipka (pljevica od endosperma) kako bi se spriječilo ekstrahiranje polifenola i gorkih supstanci iz pljevice te ukomljavanje pod pritiskom koje se koristi kako bi se povećala efikasnost procesa ekstrakcije šećera iz slada, ali pod cijenu sladovine lošijeg sastava (Kunze, 2010). Još jedan oblik posebnog ukomljavanja odvija se kada se koriste zamjene za slad kao što su neslađeni ječam, kukuruz, riža, sirak itd. One se dijele u kategorije ovisno o temperaturi želatinizacije njihovih škrobnih molekula na one koje se mogu dodati direktno u usipak (ako je temperatura želatinizacije niža od optimalne temperature za rad  $\beta$ -amilaze) te one za koje se mora koristiti prethodna toplinska obrada ili dodatna posuda u kojoj će se odabrana žitarica kuhati (ako je temperatura želatinizacije viša od optimalne temperature za rad  $\beta$ -amilaze) (Krottenthaler i sur., 2009). Ovisno o količini neslađene sirovine u usipku, sami enzimi iz slada dovoljni su za saharifikaciju (Kunze, 2010). Prema tome, ako se ne koristi više od 15 % do 20 % neslađene sirovine nije potrebno dodavati enzime u kominu kako bi se do kraja odvila saharifikacija (Kunze 2010).

### **2.3. GLAVNO I NAKNADNO VRENJE**

Nakon pripreme sladovine i njenog prokuhavanja, slijedi hlađenje, aeracija te inokulacija sladovine radnim mikroorganizmom koji će sladovinu prevreti u pivo. Vrenjem se, uz proizvodnju CO<sub>2</sub> i etanola, kao nusprodukti proizvode i razni drugi spojevi koji imaju značajan utjecaj na profil arome i okusa gotovog piva (Eßlinger, 2009). Inokulacija sladovine može se postići direktnim dodavanjem kvaščeve biomase u sladovinu ili miješanjem sladovine s mladim pivom u istom tanku (Eßlinger, 2009). U ovom poglavlju proći ćemo kroz glavne promjene koje se događaju tijekom glavnog i naknadnog vrenja.

#### **2.3.1. Glavno vrenje**

Inokulacijom sladovine kvascem (radnim mikroorganizmom) te njenim transferom u fermentacijski prostor započinje proces glavnog vrenja. Kvasac se ispočetka mora naviknuti na novonastale uvjete koji mogu imati efekt šoka na njega, a to su drukčija temperatura, pH, veća koncentracija šećera itd. Ta faza prilagodbe naziva se lag faza te ne traje relativno dugo.

Tijekom te faze stanice kvasca ispuštaju aminokiseline i nukleotide, ali ih ubrzo i resorbiraju. Prije samog intenzivnog kontakta s medijem (sladovinom), kvasac troši svoje rezerve glikogena za dobivanje inicijalne energije. S obzirom na to da u sladovini postoji i višak fermentabilnih šećera, kvasac ih počinje metabolizirati fermentacijom i respiracijom. Respiracija je doduše inhibirana velikom količinom šećera, dok je fermentacija automatski pojačana (Crabtree efekt). Kvasac se u isto vrijeme intenzivno razmnožava pupanjem, dok bi sve nutrijente za svoj rast te rast novih jedinki trebao imati u sladovini. U slučaju da neki od nutrijenata nedostaje to može dovesti do problema tijekom vrenja. Primjeri ključnih nutrijenata su: određene aminokiseline, fosfat, ugljikohidrati, soli i elementi u tragovima (npr. cink) te dovoljna količina kisika (Kunze, 2010). Dominantni metabolički put tijekom aktivnog vrenja je formacija etanola katabolizmom ugljikohidrata (Tenge, 2009). Ta faza naziva se log faza i najvažnija je faza glavnog vrenja u kojoj se okus i aroma sladovine zamjenjuje s okusom i aromom mladog piva. Ostali važniji metabolizmi tijekom glavnog vrenja uključuju metabolizme: proteina, masti i minerala (Kunze, 2010). Tako se osim formiranja nusprodukata dominantnog metaboličkog puta odvija se i formiranje niza drugih nusprodukata. Jedan od kvantitativno većih nusprodukata je glicerol. To je viskozni polialkohol lagano slatkog okusa koji doprinosi punoći okusa i tijelu piva (Scanes i sur., 1998). Njegova biosinteza usko je povezana s katabolizmom šećera u etanol, jer je njegov prekursor jedan od intermedijera glikolize (Nevoigt i sur., 2002). On ne samo da ima kritičnu ulogu u osmoregulaciji i balansiranju redoks potencijala u kvascu, već konkurira za korištenje izvora ugljika etanolu kod alkoholnog vrenja (Zhao i sur., 2015). Povećanje prinosa glicerola tako može doprinijeti okusu pića i redukciji etanola u njemu, a ovisno je o genetici korištenog radnog mikroorganizma te o uvjetima vrenja (Zhao i sur., 2015).

Osim etanola i glicerola, kvasac tijekom vrenja proizvodi i druge alkohole, takozvane više alkohole. Oni čine većinu hlapivih spojeva u pivu (Tenge, 2009). Njihov dojam arome može biti od cvjetnog mirisa do mirisa otapala te alkoholnog mirisa (Tenge, 2009). Također, smatra se da utječu na pozitivan učinak „grijanja“ te da tako intenziviraju okus etanola (Briggs i sur., 2004). Oko 80%- 90% ukupnih viših alkohola nastaje tijekom glavnog vrenja, a svoju maksimalnu koncentraciju u sladovini dostižu otprilike u isto vrijeme kada koncentracija slobodnog amino dušika padne na minimalnu koncentraciju (Kunze, 2010; Tenge, 2009; Briggs i sur., 2004). Najvažniji predstavnici koji doprinose aromi piva su *n*-propanol (1-propanol), izo-butanol (2-metilpropan-1-ol), izoamil alkohol (3-metil-butan-1-ol), 2-metilbutanol, feniletanol te tirozol (4-(2-Hidroksietil)fenol) (Tenge, 2009; Briggs i sur., 2004).



Uz više alkohole nastaju i drugi hlapivi spojevi, a najveća i najvažnija grupa za okus i aromu piva su esteri (Tenge, 2009; Briggs i sur., 2004). Njihova aroma i okus su voćni ili po otapalu, a do sada ih je iz piva karakterizirano preko 100 (Tenge, 2009).

Karbonilni spojevi, kao što su aldehidi i vicinalni diketoni, generalno imaju negativan doprinos aromi i okusu piva (Briggs i sur., 2004). Intermedijer alkoholnog vrenja i najvažniji aldehyd je acetaldehyd (Kunze, 2010). On se iz stanice kvasca u pivo otpušta tijekom prva tri dana fermentacije (Kunze, 2010). Daje specifičnu aromu i okus mladom pivu u kojem se nalazi u koncentracijama od 20 do 40 mg/L, a u gotovom pivu u koncentracijama ispod 8 do 10 mg/L (Kunze, 2010). Za specifičnu aromu i okus mladog piva zaslužni su i vicinalni diketoni, kao i sumporni spojevi (Kunze, 2010). Tijekom glavnog i naknadnog vrenja njihova koncentracija se može smanjiti, čime se dobiva finalna aroma i okus gotovog piva koju uglavnom određuju esteri i viši alkoholi (Kunze, 2010). Uz do sad navedene hlapive spojeve, razlikujemo i razne organske kiseline kao i fenolne spojeve (Kunze, 2010; Tenge, 2009).

### 2.3.2. Naknadno vrenje

Log faza rasta kvasca dolazi do kraja kada u mladom pivu ponestane fermentabilnih šećera (Kunze, 2010). To označava i kraj aktivnog vrenja, a CO<sub>2</sub> i alkohol nastali tijekom vrenja značajno inhibiraju stanicu kvasca (Kunze, 2010). Zbog nedostatka nutrijenata stanica kvasca počinje trošiti svoje rezerve usputno ispuštajući proizvode metabolizma i enzime (Kunze, 2010). Proces koji slijedi zove se naknadno vrenje ili maturacija piva te se može odvititi u istom prostoru kao i glavno vrenje, ako za to postoje uvjeti, ili se odvija u drugom prostoru obično zvanom ležni tank (Kunze, 2010). Najčešći način kako se određuje kraj glavnog, a početak naknadnog vrenja je mjerenje relativne gustoće (Kunze, 2010). Pivo nakon glavnog vrenja ima malo otopljenog ugljikovog dioksida, mutno je te okus i aroma nisu adekvatni za komercijalnu prodaju (Briggs i sur., 2004). Većina piva u svjetskoj proizvodnji zato prolazi kroz proces naknadnog vrenja ili maturacije (iznimka su neka engleska *ale* piva) (Briggs i sur., 2004). Kod piva donjeg vrenja taj proces zove se lageriranje, tradicionalno trajanja od nekoliko tjedana pa sve do nekoliko mjeseci, danas traje tjedan do dva, a ponekad i značajno manje (Briggs i sur., 2004). Ciljevi naknadnog vrenja su promjene arome i okusa piva, zasićenje piva s CO<sub>2</sub> te uklanjanje svih komponenti koje tvore mutnoću u pivu (Kunze 2010; Briggs i sur., 2004). Stupanj dozrelosti piva tako se može pratiti količinom diacetila u njemu (Eßlinger, 2009). On mora pasti ispod okusnog i aromatskog limita detekcije za ljude, u suprotnom pivo dobiva specifičnu aromu (Eßlinger, 2009; Briggs i sur., 2004). Toplo kondicioniranje nekoliko dana

pokazalo se efektivno u uklanjanju diacetila, jer kvasac naime ima sposobnost pretvorbe vicinalnih diketona u spojeve koji nemaju utjecaja na okus i aromu (Briggs i sur., 2004). Osim kod diacetila promjene se događaju i kod sumpornih spojeva, acetaldehida te hlapivih masnih kiselina (Briggs i sur., 2004). Što se otapanja CO<sub>2</sub> tiče, ono je u potpunosti ovisno o temperaturi na kojoj se nalazi pivo te o tlaku u fermentoru (Kunze, 2010). Osim dodavanja CO<sub>2</sub> iz vanjskog izvora, tradicionalno je pivo prolazilo kroz sekundarnu fermentaciju (Briggs i sur., 2004). Njen princip je da preostale stanice kvasca u mladom pivu prevriju naknadno dodani šećer ili sladovinu te se zbog zatvorene posude diže tlak u njoj, što dovodi do otapanja CO<sub>2</sub> (Briggs i sur., 2004). Što se mutnoće tiče, mlado pivo još u sebi sadrži suspendirane stanice kvasca koje se tijekom naknadnog vrenja talože (Kunze, 2010). Osim toga, u mladom pivu prisutan je i hladni talog koji se također taloži na dno (Kunze, 2010). Preporučuje se odležavanje najmanje 7 dana na niskim temperaturama (-1 do -2°C) kako bi se čestice hladnog taloga istaložile (Kunze, 2010). Tehnike naknadnog vrenja generalno se razlikuju za piva donjeg i gornjeg vrenja zbog različitih karakteristika dobivenih mladih piva kod ta dva postupka proizvodnje (Briggs i sur., 2004). Tako je kod piva donjeg vrenja cilj naknadnim vrenjem proizvesti pivo balansirano okusa s minimalnom koncentracijom diacetila, dok je kod piva gornjeg vrenja, čiji je okus mladog piva „robusniji“ u odnosu na mlado pivo donjeg vrenja i uklanjanje diacetila nije problem, glavni cilj postizanje stabilnosti na formiranje mutnoće (Briggs i sur., 2004).

## **2.4. SPOJEVI AROME**

Već spomenuti u prošlom poglavlju, viši alkoholi i esteri imaju glavnu ulogu u formiranju arome, okusa, a samim time i kvalitete gotovog piva (Kunze, 2010). U ovom dijelu obrađeni su kao najvažniji spojevi arome.

### **2.4.1. Viši alkoholi**

Postoji više načina nastajanja viših alkohola u sladovini. Neki od njih mogu nastati redukcijom aldehida i ketona prisutnih u sladovini (Briggs i sur., 2004). Ostatak može nastati na dva načina (Tenge, 2009). Prvi način je katabolički put (Ehrlichov mehanizam) nastanka iz aminokiseline, dok je drugi formiranje viših alkohola preko sinteze aminokiselina (Tenge, 2009). Jednom kada nastanu, ne postoji način uklanjanja viših alkohola iz piva normalnim tehnološkim mjerama, stoga se njihova koncentracija mora odrediti kontroliranjem uvjeta vrenja kao što su temperatura, miješanje mladog piva, količina nutrijenata i dr. Koncentracija viših alkohola iznad 100 mg/L negativno utječe na okus i prihvatljivost piva, a njihova

koncentracija u svijetlim pivima je između 70 i 90 mg/L (Kunze, 2010). Što se tiče faktora koji utječu na formiranje viših alkohola u pivu, oni koji doprinose njihovom stvaranju su: povišena temperatura vrenja, miješanje mladog piva (miješalom ili pumpama), smanjenje količine aminokiselina u sladovini, intenzivna aeracija sladovine prije inokuliranja kvascem, temperatura inokuliranja iznad 8 °C te koncentracija ekstrakta u sladovini iznad 13 %. Faktori koji utječu na smanjivanje njihovog stvaranja su: povećana količina kvasca kojim se inokulira sladovina, hladnije temperature inokulacije, hladnije vrenje, vrenje pod tlakom, izbjegavanje ulaska kisika u sladovinu nakon inokulacije kvascem te dovoljno aminokiselina u sladovini (Kunze, 2010).

#### 2.4.2. Esteri

Što se tiče estera, oni se mogu podijeliti u dvije skupine: acetatni esteri te esteri masnih kiselina srednje dužine lanca (Tenge, 2009). Generalno nastaju reakcijom alkohola i organske kiseline, što je kod acetatnih estera kiselinski ostatak acetat (acil-CoA) i alkohol etanol ili neki od viših alkohola (Tenge, 2009). Kod estera masnih kiselina srednje dužine lanca upravo se iz naziva može vidjeti kiselinski dio jednadžbe koji reagira s etanolom ili nekim od viših alkohola (Verstrepen i sur., 2003). Vidimo kako su za sintezu estera potrebni alkoholi, koji nastaju u glavnom vrenju, tako da sinteza estera slijedi nakon toga (Tenge, 2009). Kada rast kvasca počinje opadati sinteza estera se povećava (Tenge, 2009). Tipična koncentracija estera za pivo donjeg vrenja je 10-30 mg/L, a za pivo gornjeg vrenja 40-80 mg/L (Kunze, 2010). Etil acetat ester je s najvećom koncentracijom, od 10-20 mg/L, dok ostali esteri obično nisu prisutni u koncentracijama većim od 1 mg/L (Briggs i sur., 2004). Unatoč niskim koncentracijama u kojima se nalaze u pivu, neki od njih imaju niski limit detekcije za ljude te već male promjene u njihovoj koncentraciji mogu dati kompletno novi okusni i aromatski profil piva (Renger i sur., 1992). U tablici 1 mogu se vidjeti limiti detekcije za određene estere i više alkohole kod raznih vrsta lager piva, ali treba imati na umu da u praksi okus i aroma jednog spoja mogu biti suprimirani koncentracijama ostalih spojeva (Renger i sur., 1992).

**Tablica 1.** Limiti detekcije određenih estera i viših alkohola kod raznih vrsta lager piva (prema Janish, 2014)

Spoj	Limit detekcije (mg/L)
Etil acetat	33
Izoamil acetat	1,6
Etil heksanoat	0,23
1- propanol	800
2-metil-1-butanol	65
3-metil-1-butanol	70

Kada govorimo o faktorima koji pozitivno utječu na stvaranje estera u pivu to su: povećana koncentracija ekstrakta u sladovini, povećana atenuacija, povećana aeracija sladovine te više temperature vrenja. Faktori koji negativno djeluju na stvaranje estera u pivu su obrniti od faktora navedenih da pozitivno utječu na njihovo stvaranje, uz dodatak vrenja pod tlakom pritiskom kao jednog od faktora. Uz sve navedeno, formacija estera, kao i viših alkohola, ovisna je i o soju korištenog kvasca za fermentaciju (Kunze, 2010).

## 2.5. PRIPREMA ZA PUNJENJE

Nakon naknadnog vrenja, ovisno o potrebama i mogućnostima, pivo ide u proces dorade kako bi mu se sačuvala željene organoleptičke osobine. Pivo je osobito važno, osim ako se ne konzumira u kratkom roku direktno u npr. pivnici, stabilizirati primjenom različitih tehnoloških postupaka. U ovom poglavlju će biti predstavljeni različiti postupci stabilizacije piva prije punjenja u ambalažu.

### 2.4.1. Filtracija

Svojestvo nekih vrsta piva je njihova bistrina. Kako bi se ona postigla potrebno je pivo nakon naknadnog vrenja profiltrirati. Naime, nefiltrirano pivo u sebi ima do  $10^6$  kvašćevih stanica po mL piva i drugih tvari koji uzrokuju mutnoću (Kunze, 2010). Tako je svrha filtracije napraviti pivo stabilno na stvaranje mutnoće kroz duži period (Kunze, 2010). Filtracija ima dvije svrhe: uklanjanje suspendiranih materijala iz piva te stabilizacija piva od potencijalnih tvari koje mogu stvoriti mutnoću (Lindemann, 2009). Nekada su se koristili filtri od papira i pulpe, ali oni su danas potisnuti korištenjem tzv. kiselgura ili dijatomejske zemlje. Uz to mogu se koristiti razni membranski procesi te centrifugalni separatori (Lindemann, 2009). Prema

vrsti filtracija se može podijeliti na površinsku i dubinsku, a dubinska se dijeli na dubinsku koja razdvaja na osnovnu veličine čestice te dubinsku koja razdvaja na osnovu adsorpcije čestice (Kunze, 2010).

#### 2.4.2 Koloidna stabilizacija

Filtracijom se samo djelomično može koloidno stabilizirati i izbistriti pivo. Ukoliko želimo biti sigurni da će naše pivo ostati jednako bistro i u promjenjivim uvjetima kroz vrijeme potrebno ga je koloidno stabilizirati. Mutnoća u pivu može se podijeliti na mutnoću uzrokovanu hlađenjem te trajnu mutnoću (Kunze, 2010). Mehanizam nastanka mutnoće jest reakcija između proteina i polifenola u pivu koji zatim tvore komplekse (Briggs i sur., 2004). Pivo se može koloidno stabilizirati na način da djelujemo ili na proteine ili polifenole u pivu, tako da se oni uklone (Briggs i sur., 2004). U tu se svrhu mogu dodati razni agensi za adsorpciju kao što su preparati na bazi silikagela ili PVPP<sup>3</sup>-a. (Kunze, 2010).

#### 2.4.3. Mikrobiološka stabilizacija

Sladovina je nakon kuhanja sterilna (Kunze, 2010). Nakon kuhanja sladovine strani neželjeni mikroorganizmi mogu dospjeti u pivo s nečistom kulturom kvasca, preko nečistih površina cjevovoda i posuda odnosno sustava za punjenje i nesterilnog zraka (Kunze, 2010). Kako bi se spriječilo razvijanje nepoželjnih mikroorganizama u pivu do trenutka prodaje, na raspolaganju ima nekoliko tehnoloških operacija kao što su: pasterizacija, vruće punjenje piva te hladna sterilna filtracija (Kunze, 2010). Korištenjem tih metoda mikroorganizmi se ili inaktiviraju ili u potpunosti uklanjaju iz piva (Kunze, 2010).

---

<sup>3</sup> Polivinilpolipirrolidon (*Polyvinylpolypyrrolidone*)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

U proizvodnji piva za potrebu diplomskog rada korišten je kvasac donjeg vrenja *Saccharomyces pastorianus* Pivovare Medvedgrad d.o.o.

##### 3.1.2. Ječmeni slad

Za proizvodnju piva donjeg vrenja korišten je standardni usipak za svijetlo lager pivo, receptura Pivovare Medvedgrad d.o.o.

##### 3.1.3 Hmelj

U procesu proizvodnje korišteni su hmeljevi za gorčinu i aromu, receptura Pivovare Medvedgrad d.o.o.

##### 3.1.4. Voda

Voda korištena u proizvodnji piva je iz bunara Pivovare Medvedgrad d.o.o.

##### 3.1.5. Kemikalije i reagensi

**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u eksperimentu

Kemikalija	Čistoća (V/V)	Proizvođač
1-butanol	p. a. 99,5 %	Fisher Chemical, Velika Britanija
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	p. a. 10 %	Gram-Mol, Hrvatska
etanol	p. a. 100 %	Gram-Mol, Hrvatska
destilirana voda		PBF, Hrvatska

#### 3.2. APARATURA I PRIBOR

##### 3.2.1. Centrifuga

Korištena je centrifuga „Harrier 18/80 Sanyo“ (Watford, Engleska) za izdvajanje kvasca i proteina iz piva pri 9000 o/min.

### 3.2.2. UPLC uređaj (visokoučinkovita tekućinska kromatografija)

Korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD). On se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>, Phenomenex) dimenzija 150×7.8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0.0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a protok mobilne faze (0,0025M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 mL min<sup>-1</sup>. UPLC se koristio za određivanje koncentracije glukoze, fruktoze, maltoze, maltotrioze, glicerola i etanola u uzorcima.

### 3.2.3. GC- uređaj

Korišten je uređaj plinski kromatograf Perkin Elmer Autosystems XL GC (Perkin-Elmer, SAD) koji se sastoji od „*headspace*“ sustava za uzorkovanje Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD), uređaja za grijanje kolone (ZB-5MS, Zebron, Phenomenex 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50 µm df), FID detektora i računalnog programa TotalChrom. HS-GC koristio se za određivanje estera i viših alkohola u uzorcima.

### 3.2.4. Informatički programi i obrada rezultata

Obrada podataka i određivanje koncentracije analiziranih spojeva: acetaldehida, 1-propanola, etil-acetata, 3-metil-1-butanola, 2-metil-1- butanola, etil- butirata, izoamil- acetata, etil-heksanoata, glukoze, fruktoze, maltoze, maltotrioze, glicerola i etanola provedena je u računalnom programu Microsoft Excel 2021.

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Postupci u proizvodnji svijetlog piva donjeg vrenja

Slad iz silosa prebacio se direktno u mlin iz kojeg je usipak pao u usipni koš komovnjaka. Standardni usipak za svijetlo lager pivo ukomljavao se u komovnjaku. Za potrebe infuzijskog ukomljavaanja nije se koristio kotao za kominu (proces dekokcije). Kod jednostruke i dvostruke dekokcije odvajao se određeni volumen odvarka koji se zagrijao u kotlu za kominu. Nakon ukomljavaanja infuzijskim ili dekokcijskim postupkom, kako je ranije navedeno u teorijskom dijelu, komina se pumpama prebacila u cijednjak. U cijednjaku se odvijio trop od sladovine, koja se potom pumpom prebacila u kotao za kuhanje sladovine. U kotlu za kuhanje

sladovine tijekom njenog kuhanja dodan je hmelj u dva obroka (prvo gorki, a pri kraju kuhanja aromatični hmelj). Nakon završetka kuhanje sladovine ona je prebačena u Whirlpool taložnjak za odvajanje toplog taloga, a potom je ohlađena na temperaturu glavnog vrenja (8-10 °C). Ohlađena i aerirana sladovina inokulirana je kvascem te prebačena u cilindrično konusne fermentore (CKF). Početna koncentracija ekstrakta sladovine bila je 11 %, a proces glavnog vrenja vođen je dok koncentracija ekstrakta nije poprimila konstantnu vrijednost kroz period of najmanje tri dana. Nakon glavnog vrenja provedeno je naknadno vrenje pri 2 °C tijekom 7 dana. Po završetku naknadnog vrenja proveden je proces separacije kvasca i hladnog taloga iz piva na centrifugalnom separatoru.

### 3.3.2. Uzorkovanje

Uzorci su iz tanka izdvajani odmah nakon kuhanja te kroz određene vremenske periode (otprilike svaka 24 sata) u boce od 500 mL. Pri izdvajanju određen im je postotak ekstrakta. Uzorci piva izuzimani su i nakon naknadnog vrenja te nakon separacije na centrifugalnom separatoru.

### 3.3.3. Određivanje sastava piva donjeg vrenja tijekom procesa proizvodnje visokoučinkovitim tekućinskom kromatografijom (UPLC)

Određivanje koncentracije određenih sastojaka piva donjeg vrenja tijekom njegove proizvodnje izvršeno je uređajem UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD). Potrebno je bilo pripremiti uzorak prije njegovog propuštanja kroz UPLC sustav. Iz uzoraka su prvo odvojeni biomasa kvasca i proteini na način da se 750 µL uzorka pomiješalo sa 750 µL cinkovog sulfata heptahidrata ( $\gamma = 100$  g/L), intenzivno izmiješano (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) te ostavljeno minimalno 10 minuta na sobnoj temperaturi. Sljedeći korak bilo je centrifugirati pripravljenu smjesu (9000 rpm, 7 min) te je razrijediti redestiliranom vodom (vodljivost manja od 1 µS) u odmjernim tikvicama - 10 puta za uzorke jednostruke i dvostruke dekokcije, 20 puta za uzorke infuzijskog ukomljavanja. Tako razrijeđeni uzorci profiltrirani su pomoću šprice na koje je kao nastavak dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Analitički instrument korišten za analizu uzoraka je prethodno naveden UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II sustav koji se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7.8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektora



indeksa loma (G7162A 1260 RID). Rezultati dobiveni kromatografskom analizom obrađeni su pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Tijekom analize kao mobilna faza korištena je 0.0025 M otopina sumporne kiseline, a volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL. Protok mobilne faze iznosio je 1 mL/min. Pomoću baždarnih pravaca izračunate su vrijednosti koncentracija (tablica 3.)

**Tablica 3.** Jednadžbe baždarnih pravaca i njihova retencijska vremena

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Jednadžba baždarnog pravca	R <sup>2</sup> (-)
Maltotrioza	3,725	$A = 131918 \gamma_{\text{maltotrioza}} - 7003,5$	0,9999
Maltoza	4,003	$A = 113613 \gamma_{\text{maltoza}} + 1658,9$	0,9999
Glukoza	4,821	$A = 135278 \gamma_{\text{glukoza}} - 3377$	0,9997
Fruktoza	5,212	$A = 125211 \gamma_{\text{fruktoza}} + 3745,8$	1,0000
Glicerol	7,006	$A = 107908 \gamma_{\text{glicerol}} + 955,97$	1,0000
Etanol	11,072	$A = 55421 \gamma_{\text{etanol}} + 1343$	1,0000

3.3.4. Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg vrenja plinskom „*headspace*“ kromatografijom (HS-GC\_FID)

Lakohlapivi sastojci u pivu (aldehidi, esteri i viši alkoholi) analizirani su na plinskom kromatografu Perkin Elmer Autosystems XL GC opremljenom detektorom FID (Perkin-Elmer, SAD) i sustavom za uzimanje uzoraka Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD). Za održavanje plamena na FID-u upotrijebljeni su vodik i zrak. Uzorci su pripremani na način da je u njih dodano 5 µL internog standarda (1- butanol), a prema potrebi su uzorci razrjeđivani apsolutnim alkoholom do količine alkohola u uzorcima 5 % vol./vol. Od tako pripremljenih uzoraka u odmjernim tikvicama 10 mL je prebačeno u vialu od 22 mL te analizirano na HS-GC\_FID. Pomoću baždarnih pravaca izračunate su vrijednosti koncentracija (tablica 4.).

**Tablica 4.** Jednadžbe baždarnih pravaca i njihova retencijska vremena

<b>Spoj</b>	<b>Retencijsko vrijeme (min)</b>	<b>Jednadžba baždarnog pravca</b>
Acetaldehid	4,1	$A/A_{is} = 0,0285 \gamma_{\text{acetaldehid}} + 0,016$
1- propanol	6,37	$A/A_{is} = 0,0082 \gamma_{1\text{-propanol}} - 0,0169$
Etil- acetat	7,71	$A/A_{is} = 0,0456 \gamma_{\text{etil-acetat}} + 0,015$
3- metil - 1- butanol	12,26	$A/A_{is} = 0,0203 \gamma_{3\text{- metil- 1- butanol}} - 0,0071$
2- metil - 1 - butanol	12,43	$A/A_{is} = 0,0234 \gamma_{2\text{- metil- 1- butanol}} - 0,0145$
Etil - butirat	14,49	$A/A_{is} = 0,099 \gamma_{\text{etil - butirat}} + 0,0015$
Izoamil -acetat	16,80	$A/A_{is} = 0,1458 \gamma_{\text{izoamil - acetat}} - 0,0016$
Etil – heksanoat	19,95	$A/A_{is} = 0,1821 \gamma_{\text{etil - heksanoat}} - 0,08$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

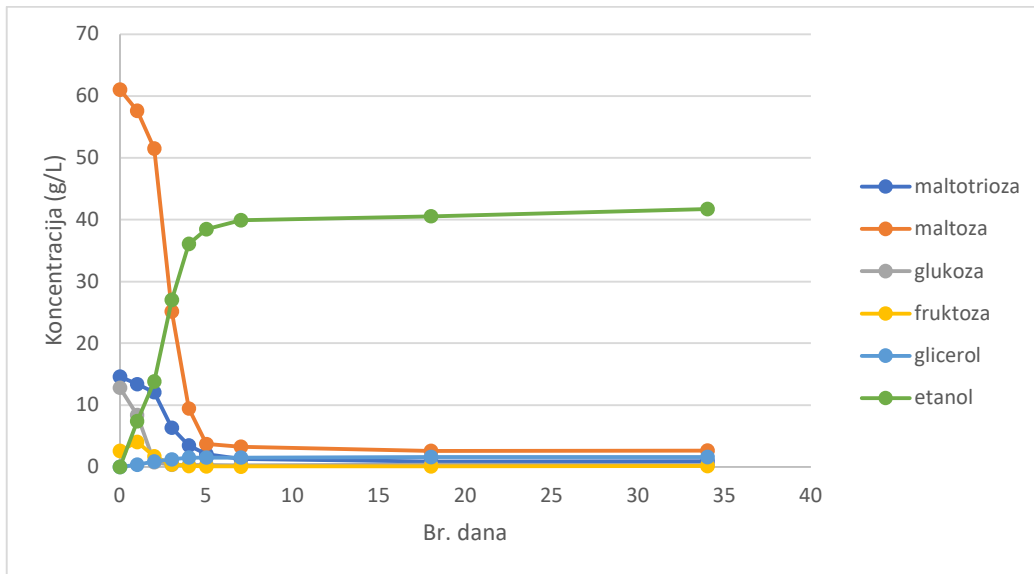
U ovom radu proučavan je utjecaj različitih načina (infuzija, jednostruka i dvostruka dekokcija) ukomljavanja na kvalitetu proizvedenog svijetlog lager piva. Zbog toga su tijekom procesa proizvodnje svijetlog lager piva praćene promjene kemijskog sastava piva primjenom različitih analitičkih tehnika. Analize su uključivale koncentracije šećera (glukoza, fruktozu, maltoza i maltotrioza), alkohola (etanol i glicerol) i lakohlapivih sastojka piva (acetaldehid, 1-propanol, etil-acetat, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, etil-butirat, izoamil-acetat te etil heksanoat).

Proučavane su tri vrste ukomljavanja, a potom su rezultati podijeljeni prema tome na: infuzijsko ukomljavanje (poglavlje 4.1.), jednostruku dekokciju (poglavlje 4.2.) te dvostruku dekokciju (poglavlje 4.3.).

### **4.1. INFUZIJSKO UKOMLJAVANJE**

Kod infuzijskog ukomljavanja cijeli volumen komine držao se u istoj posudi tijekom procesa. Proizvedena sladovina inokulirana je radnim mikroorganizmom te pumpama prebačena u CKF. Tijekom glavnog i naknadnog vrenja uzimani su uzorci, koji su kao i uzorak sladovine nakon kuhanja analizirani za svoj sastav na UPLC-u.

Proizvodnja piva dobivenog standardnim infuzijskim ukomljavanjem za svjetlo lager pivo rezultirala je sladovinom koja je sadržavala najviše maltoze (61,02 g/L), zatim maltotrioze (14,59 g/L), glukoze (12,78 g/L) te fruktoze (2,57 g/L), a dinamika potrošnje tih šećera tijekom procesa proizvodnje piva prikazana je na slici 6.



**Slika 6.** Promjene koncentracije fermentabilnih šećera i alkohola tijekom glavnog i naknadnog vrenja svijetlog lager piva dobivenog infuzijskim postupkom ukomljavanja.

Glicerol i etanol kao produkti fermentacije nisu prisutni u sladovini, već se njihova koncentracija povećava tijekom glavnog vrenja (slika 6). Tijekom glavnog vrenja može se vidjeti da su se prvo značajno smanjile koncentracije monosaharida, glukoze i fruktoze, što je u skladu s literaturom (Lagunas, 1993). Odgođeno je korištenje maltoze i maltotrioze u metabolizmu kvasca događa se zbog kataboličke represije tih šećera u prisutnosti monosaharida (Lagunas, 1993). Pivo proizvedeno iz sladovine dobivene infuzijskim ukomljavanjem sadrži i određenu količinu nefermentiranog ekstrakta koji daje punoću okusa, a što je u skladu s literaturnim podacima (Kunze, 2010; Gresser, 2009). Kao produkt glavnog vrenja može se vidjeti porast koncentracije glicerola i etanola, što je u skladu s literaturom (Kunze, 2010; Gresser, 2009). Koncentracija sintetiziranog glicerola je u skladu s literaturom za svijetlo lager pivo (Kunze, 2010; Gresser, 2009) dok je koncentracija etanola nešto viša u odnosu na literaturne navode za pivo dobiveno iz iste ili slične količine ekstrakta u sladovini (Kunze, 2010; Gresser, 2009) (slika 6).

U istraživanju je praćena i glavnog i naknadnog vrenja svijetlog lager piva uz pomoć plinske kromatografije s „headspace“ sustavom (tablica 5). Iz tablice 5 može se vidjeti povećanje koncentracija svih viših alkohola i estera od početka glavnog vrenja do gotovog piva (uz iznimku etil-heksanoata), dok je koncentracija acetaldehida dostigla svoj vrhunac 6. dan vrenja te su sva iduća mjerenja bila u opadanju što je u skladu s literaturom (Kunze, 2010).

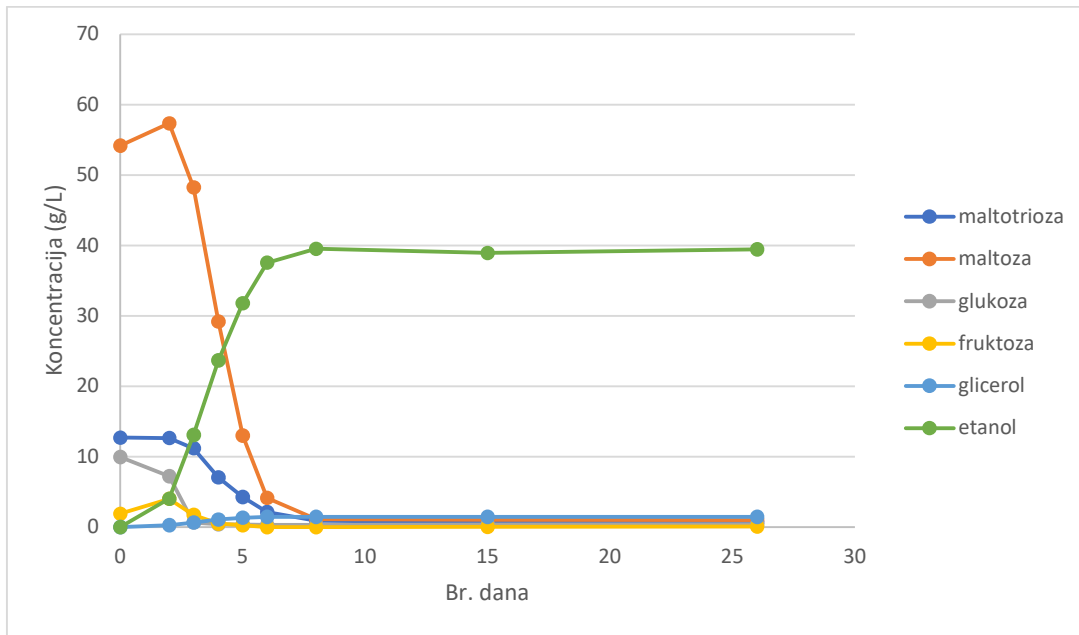
**Tablica 5.** Promjena koncentracije lakohlapivih spojeva tijekom proizvodnje svijetlog lager piva dobivenog infuzijskim postupkom ukomljavanja.

Br. Dana	Spojevi i koncentracija (mg/L)							
	acetaldehid	1-propanol	etil-acetat	3-metil-1-butanol	2-metil-1-butanol	etil-butirat	isoamil-acetat	etil-heksanoat
0	0	4,338	0	0,7566	1,2602	0	0,0279	0,8893
1	13,1036	5,262	0	3,6136	1,8019	0	0,0680	0,9791
2	18,0943	4,7126	0	7,3596	2,6236	0	0,1085	1,0241
3	40,1504	6,0932	6,6399	22,137	6,6821	0	0,5377	1,0191
4	53,38	8,8338	14,4173	34,4324	30,1871	0,0488	1,0282	1,2538
5	33,26	6,2215	12,4828	28,712	9,6868	0,0436	0,8546	0,7432
7	22,55	6,8033	12,4065	28,4716	9,6377	0,0280	0,6627	0,5873
18	9,88	8,7044	16,8923	33,4718	11,5321	0,0526	1,1332	0,6918
34	1,00	10,0564	20,4761	41,0109	14,0373	0,0822	1,4236	0,6208

Svi spojevi navedeni u tablici 5 su u gotovom pivu unutar vrijednosti tipičnih za pivo donjeg vrenja, uz iznimku etil- acetata koji je povišen (Kunze, 2010; Briggs, 2004). Ukupna koncentracija estera, viših alkohola i acetaldehida također je u skladu s literaturnim navodima (Kunze, 2010; Gresser, 2009; Briggs, 2004).

#### 4.2. JEDNOSTRUKA DEKOKCIJA

Jednostruka dekokcija postupak je ukomljavanja kod kojeg je jednom izdvojena masa komine, odnosno odvarak, koji se u kotlu za kominu zagrijava na višu temperaturu od originalne komine te nakon određenog vremena vraćen u isti kotao kao i sladna komina. Kao i kod infuzijskog ukomljavanja, sladovina nakon kuhanja te uzorci uzimani tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva dobivenih metodom jednostruke dekokcije analizirani su za količinu šećera te alkohola u njima na UPLC-u (slika 7)



**Slika 7.** Promjena koncentracije fermentabilnih šećera i alkohola tijekom glavnog i naknadnog vrenja svijetlog lager piva dobivenog postupkom ukomljavanja jednostrukom dekokcijom.

Sladovina dobivena ovim postupkom ukomljavanja sadržavala je kao i kod postupka infuzijskog ukomljavanja najviše maltoze, zatim maltotriose, glukoze te fruktoze, ali u manjim količinama. Kvasac je pokazao istu kataboličku represiju kao i u prvom slučaju, a pivo koje je nastalo kao rezultat njegove metaboličke aktivnosti sadržavalo je manje koncentracije neprevrelih šećera te glicerola i etanola. Koncentracija etanola odgovara literaturnim navodima za sladovine istih ili sličnih količina ekstrakta (slika 7).

Podaci za iskorištenje procesa (količinu dobivenog ekstrakta u sladovini) te količina etanola ne poklapaju se s literaturnim navodima (Kunze, 2010, Enge i sur. 2005) koji tvrde da je dekokcijsko ukomljavanje efikasnije od infuzijskog. Ovdje se doduše moraju uzeti u obzir i moguće pogreške tijekom uzorkovanja i mjerenja te činjenicu da razlika u dobivenoj količini etanola kod jedne i druge metode nije veća od 0,2 % vol. .

U teoriji, razlika u sastavu ugljikohidrata sladovine trebala bi pokazati i razliku u aromatskom profilu, odnosno tvorbi lakohlapivih spojeva tijekom proizvodnje piva (Younis i Stewart, 1998; Engan, 1972). Kao što se može vidjeti u tablici 6, to je ovdje bio i slučaj.

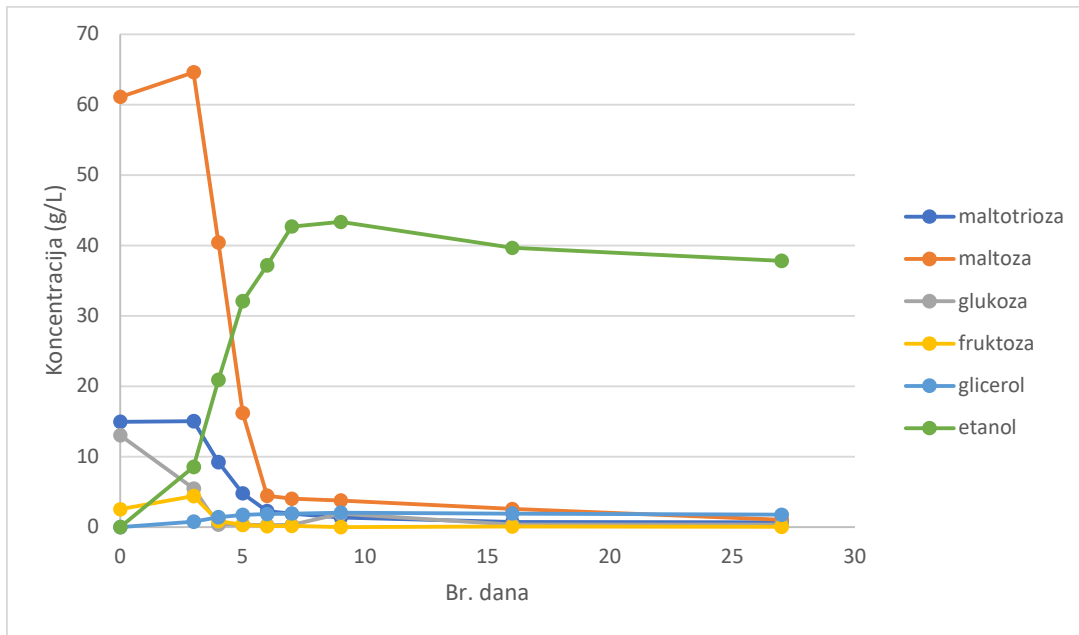
**Tablica 6.** Promjena koncentracije lakohlapivih spojeva tijekom proizvodnje svijetlog lager piva dobivenog postupkom ukomljavanja jednostrukom dekokcijom

Br. Dana	Spojevi i koncentracija (mg/L)							
	acetaldehid	1-propanol	etil-acetat	3-metil-1-butanol	2-metil-1-butanol	etil-butirat	isoamil-acetat	etil-heksanoat
0	0	4,1693	0	0,710	1,2547	0	0,0249	0,8802
2	12,1502	5,4945	0	0,7121	3,4052	0	0,0373	0,9119
3	28,4128	4,6999	1,9189	12,8053	3,0002	0	0,21	0,9518
4	35,8326	4,0153	5,9130	21,1538	5,1372	0	0,5097	1,0844
5	43,53	2,5075	11,7086	29,1401	7,8624	0	0,9238	0,7416
6	48,7391	7,9455	16,3045	35,1876	9,7412	0,0847	1,2381	0,8541
8	31,7609	7,0716	13,2195	28,1709	8,4020	0,0637	0,890	0,6756
15	24,4230	8,1108	13,8516	30,0383	9,6040	0,0566	0,9925	0,6766
26	26,2221	6,9041	14,7298	32,1378	10,4513	0,0845	1,2806	0,5743

Svi lakohlapivi spojevi nalaze se u manjim koncentracijama od hlapivih spojeva u pivu dobivenom infuzijskim postupkom, uz iznimku acetaldehida. Tako se koncentracija etil-acetata, kao i ukupna količina estera i viših alkohola, nalaze u granicama literaturnih navoda, dok je koncentracija acetaldehida u gotovom pivu vrlo povišena (Kunze, 2010; Briggs, 2004). Spoj koji se povezuje sa mladim, „zelenim“, pivom i 26. dan od početka vrenja prema rezultatima nalazi se iznad limita ljudske detekcije u gotovom pivu. Rezultati se možda mogu pripisati ranijem posljednjem uzorkovanju u odnosu na infuzijsko ukomljavanje (26. dan fermentacije u odnosu na 34.), generacijski starijem kvascu koji se koristio u odnosu na kvasac kod infuzijskog ukomljavanja, pogrešci tijekom mjerenja ili uzorkovanja.

#### 4.2. DVOSTRUKA DEKOKCIJA

Postupak ukomljavanja s dva uvaraka (dvostruka dekokcija) je najkompleksniji za izvođenje u procesu proizvodnje piva u odnosu na prethodna dva postupka ukomljavanja. U njemu se u različitim vremenskim periodima prebacuju dva odvarka u kotao za kominu te se dva puta vraćaju u komovnjak (originalnu kominu). Dobiveno svijetlo lager pivo, kao i sladovina iz kojeg je dobiveno te njegovi uzorci tijekom glavnog i naknadnog vrenja, analizirani su da bi se odredio kemijski sastav dobivenog piva pomoću UPLC-a (slika 8).



**Slika 8.** Promjena koncentracije fermentabilnih šećera i alkohola tijekom glavnog i naknadnog vrenja svijetlog lager piva dobivenog postupkom ukomljavanja dvostrukom dekokcijom

Koncentracije ugljikohidrata u dobivenoj sladovini imale su približno jednaku raspodjelu koncentracija pojedinih šećera kao i kod prethodna dva postupka ukomljavanja. Razlikuju su po većoj koncentraciji glukoze koja je zabilježena kod procesa dvostruke dekokcije kao posljedice hidrolize škroba iz slada do glukoze koju je uzrokovalo dvostruko kuhanje odvarka tj. djelovanje temperature vrenja (100 °C) odvarka. Prethodno navedena pojava je u skladu s radom Enge i sur. (2005) koji su kod dvostruke i trostruke dekokcije zabilježili veće koncentracije glukoze u odnosu na infuzijsko ukomljavanje te jednostruku dekokciju. Profil neprevrelih šećera u gotovom pivu bio je usporediv s jednostrukom dekokcijom, dok je ono sadržavalo najveću koncentraciju glicerola te najmanji volumni udio etanola (slika 8).

Problem s dobivenom koncentracijom etanola u gotovom pivu (slika 8) je taj, što je ona u uzorcima ranije izuzetim tijekom glavnog vrenja veća te oscilira od 6. dana vrenja do zadnjeg uzorka uzetog 27. dan odležavanja. Obzirom na dobivene rezultate moguće je da je došlo do pogreške tijekom uzorkovanja piva iz CKF ili do analitičke pogreške prilikom određivanja koncentracije etanola. Koncentracija etanola iz različitih uzoraka kreće se oko vrijednosti usporedive s procesom infuzijskog ukomljavanja i procesom jednostruke dekokcije.



Koncentracije lakolapivih spojeva (tablica 7) više su nego kod jednostruke dekokcije, uz iznimke etil-acetata te izoamil-acetata. Može se konstatirati da su usporedive s onima kod procesa infuzijskog ukomljavanja, uz iznimku etil-acetata. To potvrđuje literaturne navode o povezanosti sastava lakohlapivih spojeva nastalih tijekom glavnog i naknadnog vrenja sa sastavom ugljikohidrata u sladovini (Younis i Stewart, 1998; Engan, 1972). Dobiveni rezultati međutim nisu u skladu s navodima Enge i sur. (2005) koji su kod infuzijskog ukomljavanja pronašli najviše viših alkohola, a kod trostruke dekokcije najmanje.

**Tablica 7.** Promjena koncentracije lakohlapivih spojeva tijekom glavnog i naknadnog vrenja svijetlog lager piva dobivenog postupkom dvostruke dekokcije

Spojevi i koncentracija (mg/L)								
Br. Dana	acetaldehid	1-propanol	etil-acetat	3-metil-1-butanol	2-metil-1-butanol	etil-butirat	isoamil-acetat	etil-heksanoat
0	0,3493	4,2264	0	0,7387	1,2589	0	0,0243	0,8850
3	26,7640	4,3948	0,1998	13,1674	3,1998	0	0,06	1,0557
4	34,0868	7,5917	3,9565	28,0123	6,7903	0	0,3646	1,0645
5	43,9671	10,7888	12,0402	46,8128	13,8850	0,0590	1,0419	3,7540
6	27,8653	7,9544	11,5264	26,9804	12,6218	0,0518	1,0849	0,8168
7	24,8022	8,3985	11,9118	39,3143	12,7806	0,0636	1,0548	0,8133
9	27,8425	8,6369	12,631	42,0363	13,6735	0,0514	0,7823	0,5968
16	4,2436	11,5968	17,0177	48,7025	16,9051	0,0887	1,420	0,7810
27	0,8484	11,069	14,8828	44,0822	15,3115	0,0645	1,3089	0,6128

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sladovina dobivena infuzijskim načinom ukomljavanja, kao i postupkom ukomljavanja jednostrukom i dvostrukom dekokcijom, ima karakterističnu raspodjelu koncentracije različitih šećera sličnu sladovini za proizvodnju svijetlog lagera standardne koncentracije ekstrakta (11 %).

2. Sastav šećera dobivenih sladovina usporediv je, uz iznimku koncentracije glukoze, kod infuzijskog postupka ukomljavanja i postupka ukomljavanja dvostrukom dekokcijom. Postupak ukomljavanja jednostrukom dekokcijom dao je sladovinu s manjom koncentracijom svih šećera. Koncentracije alkohola kod sve tri metode ukomljavanja usporedive su, dok su koncentracije neprevrelog ekstrakta u pivu usporedive kod jednostruke i dvostruke dekokcije. Kod infuzijskog ukomljavanja zabilježene su neznatno veće koncentracije svih šećera osim glukoze čija koncentracija je bila neznatno manja zbog samog postupaka ukomljavanja.

3. Na osnovi rezultata istraživanja vidljivo je da postoji razlika u dobivenim koncentracijama lakohlapivih spojeva u gotovom pivu ovisno o postupku ukomljavanja. Najveća ukupna koncentracija viših alkohola zabilježena je kod piva proizvedenog iz sladovine dobivene dvostrukom dekokcijom, a zatim slijedi infuzijsko ukomljavanje te na kraju postupak jednostruke dekokcije. Ukupne koncentracije estera u gotovom pivu bile su međusobno usporedive, ali je kod infuzijskog ukomljavanja detektirana povećana koncentracija etilacetata u odnosu na ostale postupke ukomljavanja.

4. U ovom ispitivanju uočena su određena odstupanja u sastavu i promjeni koncentracije šećera, alkohola i lakohlapivih spojeva tijekom glavnog vrenja sladovina dobivenih različitim načinima ukomljavanja. Da bi se u potpuno jasno utvrdila navedena odstupanja i utjecaj postupka ukomljavanja potrebno je provesti dodatna ispitivanja u kojim treba uključiti sve fizikalno-kemijske parametre procesa kao i organoleptička ispitivanja proizvedenih piva.

## 6. LITERATURA

Aniche GA (1994) Malting properties of two sorghum cultivars and the effect of mashing schemes on their wort properties. *Proc Biochem* **29**, 369–371. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)87006-3](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)87006-3)

Briggs D, Boulton C, Brookes P, Stevens R (2004) *Brewing: science and practice*, 1. izd., Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge.

Bolton C (2013) *Encyclopaedia of Brewing*, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, str. 168, 397, 550, 592.

Campbell A (2022) What are Hops and How do They Grow? - [canadianfoodfocus.org](https://canadianfoodfocus.org/on-the-farm/what-are-hops-and-how-do-they-grow/). <https://canadianfoodfocus.org/on-the-farm/what-are-hops-and-how-do-they-grow/>.

Pristupljeno 3. rujna 2022.

Engan, S. (1972) Wort composition and beer flavor. II. The influence of different carbohydrates on the formation of some flavor components during fermentation. *J. Inst. Brew.* **78**, 169–173. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb06399.x>

Enge J, Šemík P, Korbel J, Šrogl J, Sekora M (2005) Technological aspects of infusion and decoction mashing. *Kvas Prum* **51**, 158–165. <https://doi.org/10.18832/kp2005008>

Eßlinger HM (2009) Fermentation, Maturation and Storage. U: Eßlinger HM (ured.) *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 207.

Forster A, Schmidt R, Biendl M (2004) Wie bestimmt sich der durchschnittliche alpha – Säuregehalt einer Hopfensorte?. *Brauwelt* **22**, 654–660.

Gresser A (2009) Properties and Quality. U: Eßlinger HM (ured.) *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, 1. izd, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 359.

Janish S (2014) Esters and Fusel Alcohols: A Look at Studies and Experimental Brew – Scott Janish.com. <http://scottjanish.com/esters-and-fusel-alcohols/>. Pristupljeno 28. srpnja 2022.

Jurková M, Horák T, Hašková D, Čulík J, Čejka P, Kellner V (2012) Control of antioxidant beer activity by the mashing process. *J Inst Brew* **118**, 230–235. <https://doi.org/10.1002/jib.35>

Kammhuber K, Hagl S. (2001) Statistische Untersuchungen zur Korrelation von Hopfen ölkomponente. *Monatsschr Brauwiss* **54**, 100–103.

Krottenthaller M (2009) Hops. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 87, 89, 90.

Krottenthaller M, Glas K (2009) Brew Water. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 105.

Krottenthaller M, Back W, Zarnkow M (2009) Wort Production. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 165, 168-170, 174, 176.

Kruger JE, Lineback DR (1987) Carbohydrate - degrading enzymes in cereals. U: Stauffer CE (ured.) Enzymes and their Role in Cereal Technology, 1. izd., American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, str. 117–135.

Kryl P, Gregor T, Los J (2012) Comparison of analytical parameters of beer brewed in two different technological ways at two pub breweries. *Acta Univ Agric Silv Mendeliana Brun* **60**, 137–144. <https://doi.org/10.11118/actaun201260050137>

Kunze W (2010) Technology Brewing & Malting, 4. izd., VLB, Berlin.

Lagunas, R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **10**, 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05869.x>

Lindemann B (2009) Filtration and Stabilization. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 225.

MacGregor AW, Bazin SL, Macri LJ, Babb JC (1999) Modeling the contribution of alpha - amylase, beta - amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *J Cereal Sci*, **29**, 161–169. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0233>

MacWilliam IC (1975) pH In Malting And Brewing—A Review. *J I Brewing* **81**, 65-70. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1975.tb03663.x>

Meussdoerffer F, Zarnkow M (2009) Starchy Raw Materials. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 55, 58, 59.

Mijatović A (2019) Pivarska industrija u Hrvatskoj (diplomski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Moir M (2000) Hops – a millennium review. *J Am Soc Brew Chem* **58**, 131–146. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0131>

Montanari L, Floridi S, Marconi O, Tironzelli M, Fantozzi P (2005) Effect of mashing procedures on brewing. *Eur Food Res Technol* **221**, 175–179. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1166-8>

Narziss L. (1992) Die Bierbrauerei: Band 2 - Die Technologie Der Wurzebereitung, 7. izd., Ferdinand Enke, Stuttgart, str. 402.

Narziss L, Miedaner H, Krottenthaler M (1995) Development of a selection method suitable for serial application for improving the quality of the beer and the quality parameters of barley which influence the taste of beer. *Monatsschr Brauwiss* **48**, 108 – 111.

Nevoigt E, Pilger R, Mast-Gerlach E, Schmidt U, Freihammer S, Eschenbrenner M, Garbe L, Stahl U (2002) Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer, *FEMS Yeast Res* **2**, str. 225–232. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00076-4)

Nuttal D (2017) Beer Styles: Ingredients (Part One) – What Is Malt? - justbeerapp.com. <https://justbeerapp.com/article/beer-styles-the-ingredients-part-one-malt>. Pristupljeno 3. rujna 2022.

Olšovská J, Čejka P, Sigler K, Hönigová V (2014) The phenomenon of Czech beer: A review. *Czech J Food Sci* **32**, 309–313. <https://doi.org/10.17221/455/2013-cjf>

O'Rourke T (1999) Adjuncts and their use in the brewing process. *Brewers' Guardian* **128**, 32–36.

Palmer J, Kaminski C (2013) *Water: A Comprehensive Guide for Brewers*, 1. izd., Brewers Publications, Boulder, Colorado, str. 96, 177, 184, 185, 187.

Renger RS, Van Hateren SH, Luyben KCHAM (1992) The Formation Of Esters And Higher Alcohols During Brewery Fermentation; The Effect Of Carbon Dioxide Pressure. *J Inst Brew* **98**, 509-513. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01137.x>

Rübsam H, Gastl M, Becker T (2013) Determination of the influence of starch sources and mashing procedures on the range of the molecular weight distribution of beer using field-flow fractionation. *J Inst Brew* **119**, 139–148. <https://doi.org/10.1002/jib.69>

Scanes KT, Hohmann S, Prior BA (1998) Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S Afr J Enol Vitic* **19**:,17–24. <https://doi.org/10.21548/19-1-2239>

Silva D, Branyik T, Dragone G (2008) High gravity batch and continuous processes for beer production: Evaluation of fermentation performance and beer duality. *Chem pap* **62**, 34–41. <https://doi.org/10.2478/s11696-007-0076-6>

Tenge C (2009) Yeast. U: Eßlinger HM (ured.) Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 120, 131, 132, 134.

Verstrepen, KJ, Derdelinckx G, Delvaux FR (2003) Esters in beer – part 1: the fermentation process: more than ethanol formation. *Cerevisia* **28**, 41–49.  
<https://eurekamag.com/research/003/754/003754739.php>

Ward B (2022) Yeast Under a Microscope-microscopeclarity.com.  
<https://microscopeclarity.com/yeast-an-amazing-microorganism/>. Pristupljeno 3. rujna 2022.

Younis OS, Stewart GG (1998) Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **104**, 255–264.  
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1998.tb00998.x>

Zhao X, Procopio S, Becker T (2015) Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *J Food Sci Technol* **52**, 7588–7598.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-1977-y>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marijan Klinar izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis



