

Veleučilište u Karlovcu

Studij prehrambene tehnologije

Usmjerenje pivarstvo

Drago Grabovac

**Određivanje udjela otopljenog kisika u različitim fazama
proizvodnje sladovine i piva**

Završni rad

Karlovac, rujan 2016.

Veleučilište u Karlovcu

Studij prehrambene tehnologije

Usmjerenje pivarstvo

Drago Grabovac

**Određivanje udjela otopljenog kisika u različitim fazama
proizvodnje sladovine i piva**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić

Matični broj: 0314614088

Karlovac, rujan 2016.

Zahvala

Ovaj rad je pisan u sklopu završetka mog školovanja prehrambene tehnologije (usmjerenja pivarstvo) na Veleučilištu u Karlovcu, a istraživanja i eksperimentalni dio su rađena u Zmajskoj pivovari. Velika zahvala ide mom mentoru dr.sc.Goranu Šariću koji mi je pomagao u odabiru teme ovog rada, te koji mi je puno pomogao i uvijek bio na raspolaganju tijekom pisanja rada. Zahvaljujem se pročelnici odjela prehrambene tehnologije doc. dr. sc. Marijani Blažić na prenesom znanju i pomoći tijekom studiranja; ing. Ivani Kolić na nesebičnoj pomoći i prenesenoj ljubavi prema pivarstvu te svim ostalim nastavnicima i zaposlenicima Veleučilišta u Karlovcu. Posebna zahvala ide Zmajskoj pivovari, koja mi je omogućila obavljanje stručne prakse i pisanje završnog rada pod njihovim vodstvom, svim zaposlenicima pivovare na čelu sa direktorom Andrejem Čapkom. Svima navedenima se zahvaljujem jer su mi pomogli da shvatim i da se odlučim da se pivarstvom želim baviti i ostatkom života te se veselim nastavku cjeloživotnog učenja.

Sažetak

Pivo se proizvodi tisućama godina diljem svijeta, a danas je prepoznato nekoliko stotina različitih stilova piva. Kao i svaki drugi prehrambeni proizvod, pivo mora biti mikrobiološki i senzorski ispravno. Brojni su patogeni koji uzrokuju kvarenje piva, neugodne okuse, mirise i starenje piva (bakterije, plijesni, nepoželjni kvasci itd.). Kisik je nepoželjan u gotovom pivu, a poželjan je samo tijekom fermentacije, kada ga kvasac koristi za razmnožavanje i alkoholno vrenje. Kisik uzrokuje oksidaciju spojeva u pivu, a samim time ubrzano starenje i kvarenje piva. Stoga se nakon fermentacije sve faze proizvodnog procesa provode u uvjetima bez kisika, te se tome pridodaje velika pozornost pri proizvodnji i punjenju piva u ambalažu. Količina kisika u pivu se može mjeriti i pratiti u različitim točkama proizvodnje, pomoću različitih uređaja, a u ovome radu su prikazani rezultati mjerenja tijekom proizvodnje različitih piva u Zmajskoj pivovari. Mjerenja su obavljena pomoću uređaja Orbispherelaboratories model 3650, a rezultati pokazuju da li je koncentracija kisika unutar prihvatljivih granica, te da li dolazi do porasta koncentracije tijekom filtracije piva.

Ključne riječi

Filtracija, kisik, oksidacija, pivo, starenje piva

Abstract

The beer is produced for thousand of years around the world and today there are hundreds of recognized beer styles. Like any other food product, beer must be microbiologically and sensor properly. There are many patognens that cause decay of beer, upleasant tastes, smells and aging of beer (bacteria, molds, yeasts etc.). Oxygen is undesirable in finished beer, preferably only during fermentation, when the yeast uses oxygen for propagation and fermentation. Oxygen causes oxidation of compunds in beer, and thus accelerated aging and spoilage of beer. Therefore, after fermentation, all stages of production are carried out in oxygen-free conditions, and is totally committed during production and filling in bottles, cans etc.. The amount of oxygen in beer can be measured and monitored at various points in the production, using various devices, and in this paper, results are shown from measuring oxygen content measured in Zmajska pivovara. Measurements are made using device called Orbispherelabaratories model 3650, and the results show if the oxygen concentration is within acceptable limits, and whether an increase of concentration is during beer filtration

Key words

Beer, beer aging, filtration, oxidation, oxygen

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Podjela piva	1
1.2. Proizvodni proces	4
1.3. Sastav piva	7
2. Kontaminacija piva.....	11
3. Kisik u pivu.....	16
3.1. Uloga kisika u metabolizmu kvasca	16
3.2. Oksidacija piva	18
4. Materijali i metode rada	20
4.1. Materijali	20
4.2. Metode rada	22
5. Rezultati.....	25
6. Rasprava	30
7. Zaključak.....	31
8. Literatura.....	32
9. Popis priloga	33

1. Uvod

Pivo je alkoholno piće, dobiveno vrenjem vodenog ekstrakta ječmenog (i/ili pšeničnog) slada uz dodatak hmelja. Pivo se proizvodi tisućama godina, a nađeni su pisani podaci o tom piću u drevnom Egiptu, Mezopotamiji, u antičkom Rimu i Grčkoj. Današnji oblik piva se počeo proizvoditi tijekom srednjeg vijeka (13. st.) kada se počeo koristiti hmelj, kao začin i konzervans. Proizvodnja piva je do 19. stoljeća bila zanatski posao zbog nepoznavanja uzročnika vrenja, kvarenja, posljedica kvarenja i svih promjena koje su se događale tijekom vrenja i odležavanja. Neznanje je bilo tako veliko da se do druge polovice 16. stoljeća za kvarenje piva optužuju zle sile, tj. pivske vještice, a posljednja među njima je spaljena 1581. godine u Švicarskoj (Marić, 2009). Razvojem znanosti, ponajprije kemije, biologije, biokemije i mikrobiologije, počinju se shvaćati i pratiti sve promjene i uzroci promjena tijekom proizvodnje te se unapređuju tehnološki procesi. Otkrićem mikroskopa u 17. stoljeću i istraživanjima L. Pasteura u 19. stoljeću se otkrivaju uzročnici vrenja – kvasci. Uzročnik vrenja u pivarstvu je *Saccharomyces Cerevisiae*, a danas poznajemo više od stotinu sojeva tog kvasca.

1.1. Podjela piva

Pivo možemo podijeliti prema više različitih parametara. Najvažnije podjela je ona prema tipu kvasca koji se koristi, a razlikujemo *ale* i *lager* piva. Stoljećima, jedino pivo koje se proizvodilo je bilo *ale* pivo (pivo gornjeg vrenja). Tijekom fermentacije sloj kvasca bi isplivao na površinu, a često se događalo da se pivo pokvari, posebno u ljetnim mjesecima. Tijekom 19. stoljeća pivari u Njemačkoj su uočili da se pivo manje kvvari ako se pivo proizvodi pri nižim temperaturama, odležava pri nižim temperaturama ili se koristi led ili podrumске, hladnije prostorije. Također su uočili da se kvasac taloži na dnu posude pri nižim temperaturama. Tako su nastala *lager* piva (pivo donjeg vrenja). *Lager* piva se proizvode i odležavaju pri nižim temperaturama od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Kvasac se taloži na dno i ispušta iz dna

posude. *Ale* piva se proizvode pri nešto višim temperaturama, odležavanje im uglavnom traje kraće, a kvasac pri završetku vrenja ispliva na vrh posude odakle se ubire i odvaja. Piva gornjeg vrenja nalazimo u Britaniji i sjevernoj Europi, dok piva donjeg vrenja nalazimo u srednjoj Europi, najčešće Njemačkoj (Harrison, 2009). Najvažnija razlika između kvasca donjeg i gornjeg vrenja je sposobnost fermentacije i asimilacije melibioze. Kvasci donjeg vrenja potpuno koriste melibiozu i rafinozu, a kvasci gornjeg vrenja ne mogu koristiti melibiozu jer nemaju enzim melibiazu i koriste samo trećinu rafinoze. Oba kvasca ne mogu koristiti dekstrine i inulin. Prinos kvasca nakon vrenja je mnogo veći u kvasaca gornjeg vrenja (umnoži se 5-8 puta, a kvasac donjeg vrenja oko 5 puta). Kvasci donjeg vrenja imaju niži sadržaj enzima u odnosu na kvasce gornjeg vrenja. Sposobnost stvaranja spora je ograničena u kvasaca donjeg vrenja, rjeđe stvaraju spore nego kvasci gornjeg vrenja i formiranje spora duže traje. Kvasci gornjeg vrenja ne tvore pahulje i nemaju svojstvo flokulacije za razliku od kvasaca donjeg vrenja.

Obzirom na maseni udjel suhe tvari (ekstrakta) u sladovini prije početka vrenja, tipove piva dijelimo na: slaba ili laka (manji udio alkohola i neprevrela ekstrakta); standardna (10-12 % ekstrakta i 3,5 – 5,5 % alkohola); specijalna (više od 12 % ekstrakta); dvostruko sladna piva (18 – 22 % ekstrakta) i ječmena vina (volumni udio alkohola 8 – 10 %). Pivo možemo podijeliti i ovisno o vrsti slada koje se koristi. Najčešće se koristi ječmeni slad, a ako se najmanje 50 % ječmenog slada zamijeni pšeničnim slalom dobiva se pšenično pivo. Možemo pronaći još i raženo pivo i pivo proizvedeno od prosenog slada. Pivo dijelimo i prema boji, a najosnovnija podjela je na svijetla, crvena, tamna i crna, sa velikim brojem nijansi. Točnu nijansu boje možemo odrediti prema EBC (European Brewing Convention) skali. Pivo možemo podijeliti i prema volumnom udjelu alkohola na bezalkoholna (<0,5 %), lagana (<3,5 %), standardna (3,5 – 5,5 %) i jaka (> 5,5 %).

Tablica 1. Podrijetlo nekih stilova piva u Europi (Harrison, 2009)

Stil piva	Zemlja porijekla
Alt/altbier	Njemačka
Barleywine	Engleska
Bitterale	Engleska
Brown ale/mildale	Engleska
Cream ale	SAD
Imperial stout	Engleska
India pale ale	Engleska
Kolsch	Njemačka
Lambic	Belgija
Porter	Engleska
Saison	Belgija
Stout	Irska
Sweetstout	Engleska
Bock	Njemačka
Dortmunder	Njemačka
Dunkel	Njemačka
Helles	Njemačka
Maltliqour	SAD
Marzen	Njemačka
Pilsener	Češka
Rauchbier	Njemačka
Schwarzbier	Njemačka
Wienna	Austro-Ugarska
Zwickelbier	Njemačka

1.2. Proizvodni proces

Slad se prvotno usitnjava u mlinu, te se potom miješa sa vodom prema receptu. Miješa se sa toplom vodom pri specifičnim temperaturama kako bi se aktivirali enzimi potrebni za pretvorbu škroba u fermentativne šećere. Kod ale piva ciljana temperatura je oko 65 °C. Za lager piva sladovi su uglavnom drugačije modificirani te imaju više glukana i proteina, pa se miješanje vrši pri nižim temperaturama (45 °C) kako bi proteaza i glukanaza razgradile te spojeve (Parker , 2012).

Pretvorba šećera uglavnom traje sat vremena, a nakon toga se sladovina (tekući dio) odvaja od pivskog tropa (kruti dio) u posudi koju nazivamo kadom za cijedenje. Dno te posude je perforirano tako da trop ostaje unutra, dok sladovina prolazi kroz dno i prebacuje se na slijedeću fazu procesa – kuhanje sladovine.

Sladovina se kuha sat vremena, a postoji više razloga za to. Prvi razlog je sterilizacija i mikrobiološka stabilnost sladovine. Drugi razlog je pomoći taloženju proteinskih spojeva kako bi se lakše izdvojili. Treći razlog je dodavanje hmelja u sladovinu. Postoje razne sorte hmelja koji se koriste u pivarstvu, te oni imaju širok spektar karakteristika. One mogu sadržavati veće ili manje količine alfa kiselina, koje su zaslužne za gorčinu u pivu. Alfa kiseline se kuhanjem izomeriziraju u izo-alfa-kiseline koje su topive u vodi pa se zato sorte hmelja sa većom količinom alfa kiselina dodaju na početku kuhanja. (jer je tako potrebno dodati manje hmelja). Aromatične sorte hmelja se dodaju pri kraju kuhanja, kako bi se što manje aroma izgubilo iskuhavanjem. Same arome mogu biti travnate, voćne, citrusne, mango, zemljaste, cvjetne, boraste i njihove kombinacije mogu stvoriti vrlo različita piva. Gorke sorte hmelja se dodaju u početku kuhanja sladovine kako bi se dogodila izomerizacija α -kiselina u izo- α -kiseline (Parker, 2012). Negativna strana dodavanja hmelja na početku je ta da se tijekom kuhanja izgube arome hmelja, stoga se aromatične sorte dodaju pri kraju kuhanja kako bi ti gubitci bili što manji. Postoji još načina dodavanja hmelja, kao što je dodavanje tijekom vrtloženja (whirlpool), ili nakon fermentacije (dry-hopping).

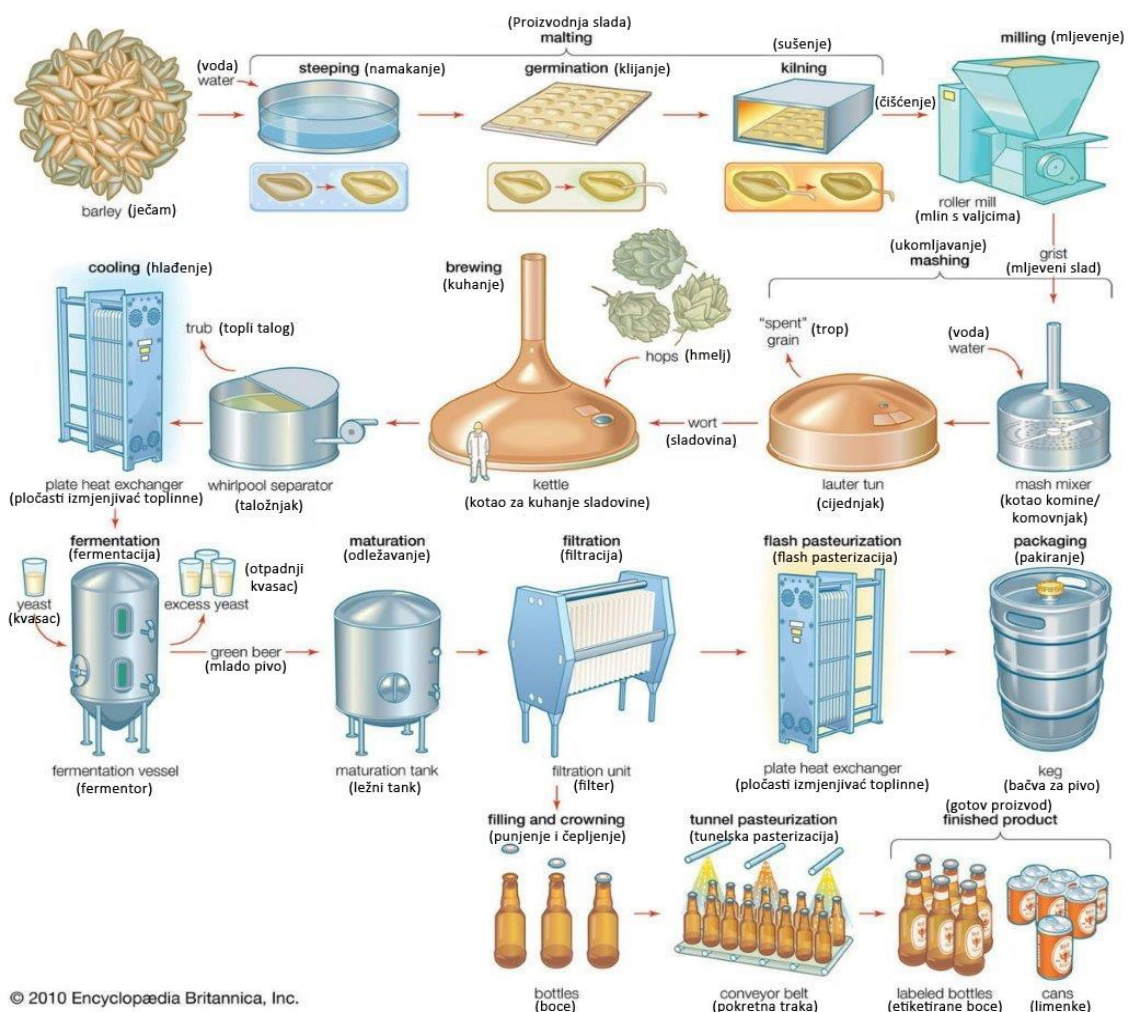
Nakon što je kuhanje završilo, sladovina se tangencijalno uvodi u posudu koja se zove *whirlpool*, kako bi se topli proteinski talog i ostatci hmelja istaložili u obliku konusa na dnu posude (Zarnkow, 2014).

Vruća, ohmeljena sladovina se mora ohladiti prije dodavanja kvasca, uz koji se dodaje zrak ili kisik kako bi se ubrzao rast kvasca. Ale piva se hlade na 16-22 °C, a lager piva na 6-16°C zbog drugačije temperature vrenja.

Tijekom fermentacije kvasac pretvara šećer u alkohol, ugljikov dioksid i ostale komponente koje pridonose okusu. Nakon fermentacije, pivo se naziva 'zelenim' i ima slatkaste, sirove i voćne note zajedno sa notama svježeg kvasca. Kako bi ti okusi nestali, pivo mora odležavati kada se dobiva 'zrelo' pivo (Parker, 2012). Od sredine 19. stoljeća upotreba kvasca donjeg vrenja u zatvorenim spremnicima za fermentaciju se povećala diljem svijeta, kao što je pala upotreba kvasaca gornjeg vrenja. Razlog nije povećanje proizvodnje *lager* piva, već on leži u pronalasku novih sojeva kvasaca gornjeg vrenja (*ale*) koji se talože pri dnu posude, te ih je tako lako moguće izdvojiti bez potrebe za otvorenim spremnicima za fermentaciju i mogućom kontaminacijom (Harrison, 2009).

Nakon odležavanja pivo je spremno za filtraciju, osim ako nije namijenjeno da se pakira u mutnom stanju. Cilj filtracije je gubitak nepoželjnog zamućenja (nastalo od ostataka proteinsko – taninskog taloga i gorkih spojeva iz hmelja), izdvajanje ostataka stanica kvasaca i potencijalno eliminacija bilo kakvih mikroba koji bi se mogli pronaći u pivu te tako izvršiti stabilizaciju piva. Moderna filtracija se vrši pomoću kombinacije filter ploča sastavljenih od celuloznih vlakana i *kieselgura* (dijatomejske zemlje – sitni pijesak napravljen od silikatne sedimentne stijene koja je nastala taloženjem ostataka jednostaničnih alga kremenjašica tj. dijatomeja). Velika nalazišta *kieselgura* se nalaze u Sjedinjenim Američkim Državama i Francuskoj, gdje se ekstrahiraju, melju i prosijavaju te klasificiraju prema veličini čestica (Zarnkow, 2014). Kod velikih količina piva koje se filtrira, potrebno je stalno nadopunjavati novu količinu *kieselgura*, kako bi se osigurala postojana filtracija. Kod filtracija koje koriste celulozna vlakna nije potrebno nadopunjavati nove filterne slojnice, već se one zamjenjuju i stavljaju nove nakon što se pore napune i napravi se takozvani filterni kolač.

Kako bi se pivo dodatno stabiliziralo, u nekim slučajevima prolazi kroz pasterizacijski postupak (naročito kod veće, industrijske proizvodnje). Pasterizacijom se uklanjaju svi potencijalno štetni mikroorganizmi, ali negativna strana je to što zbog velike temperature pivo može izgubiti na aromi i okusu. Najčešći oblik pasterizacije je tretman temperaturom od 62 °C tijekom 20 minuta. Sve češći je oblik pasterizacije pri višoj temperaturi (72 °C) i kraćem vremenu zadržavanja (15-30 s). Hladna pasterizacija je metoda koja nema negativnu stranu kao što je gubitak arome, a ima i bolju energetska iskoristivost. Hladna pasterizacija je tip pasterizacije koja ne koristi toplinu kao sredstvo ubijanja mikroorganizama nego podrazumijeva uključivanje nekih kemijskih tvari pri odležavanju ili filtraciji nakon čega slijedi pakiranje u aseptičkim uvjetima (Harrison, 2009).



Slika 1. Shematski prikaz proizvodnog procesa (Encyclopediabrannica, Inc.).

1.3. Sastav piva

Osim vode, koja sačinjava više od 90% piva, samo nekoliko komponenti možemo naći u koncentraciji većoj od 1 g/l. To su neprevreli ugljikohidrati, etanol, ugljikov dioksid i glicerol. Inače, pivo sadrži oko 800 organskih komponenti, a većina njih zbog jako malog udjela nema utjecaj na okus i miris piva. Većina komponenti dolazi iz samih sirovina (slad, voda, hmelj), dok neki sastojci nastaju kao nusproizvod metabolizma kvasca i promjena koje se događaju tijekom fermentacije i odležavanja.

Voda kao najveći sastojak piva, mora odgovarati propisima, mikrobiološkim i kemijskim standardima kao i pivarevim standardom za bistrinu, okus i nedostatak boje. Mineralni sastav je jako bitan, i ključni je element za odabir vode i izvora vode za proizvodnju piva. Najpoznatije vode su one sa područja Munchena, Beča i Plzena, po kojima su piva iz tih mjesta postala poznata. U današnje vrijeme se korigira sastav mineralnih soli u vodi, te je bitno često provjeravati sastav vode koja se koristi u proizvodnji piva. Najjednostavniji postupak prilagođavanja vode je dodavanje kiseline (kloridne i/ili sulfatne kiseline), a najčešća metoda određivanja tvrdoće vode je titracija sa EDTA (etilendiamin-tetraacetatna kiselina) uz indikator.

Najznačajniji ioni koje nalazimo u proizvodnji piva su kalcij, magnezij, natrij, kalij, sulfati, kloridi, karbonati, bikarbonati i nitrati. Neki ioni se mogu istaložiti tijekom proizvodnje, a neki mogu ući u metabolizam kvasca pa se sastav iona u pivu razlikuje od sastava iona u vodi koja se koristi (Biuatti. 2009). Kalcijev ion je najvažniji jer on povećava kiselost koja je bitna kod aktiviranja enzima potrebnih za razgradnju škroba u jednostavnije šećere. Karbonatni i bikarbonatni ioni nisu poželjni jer uzimaju vodikov ion iz sladovine kako bi proizveli vodu i ugljikov dioksid, čime povećavaju pH vrijednost što je nepoželjno. Magnezij ima ulogu sličnu kalcijevom, dok natrij utječe na slatkoću u okusu. Osim kalija, sulfita, klorida, nitrita i nitrata, pronalazimo i elemente u tragovima kao što su željezo, cink i mangan.

Tablica 2. Anorganski sastav piva (Biuatti, 2009)

Anorganske tvari	Koncentracija (mg/l)	Anorganske tvari	Koncentracija (mg/l)
Kalija	200-450	Fluorid	0,08-0,71
Natrij	20-350	Vodik	0,2-0,3
Kalcij	25-120	Željezo	0,01-0,3
Magnezij	50-90	Olovo	0,01-0,1
Kloridi	120-500	Mangan	0,03-0,2
Sulfati	100-430	Živa	zanemarivo
Oksalati	5-30	Nikal	0,03-0,2
Fosfati	170-600	Nitriti	0-2
Nitrati	13-43	Dušik	1-14
Aluminij	0,1-2	Kisik	0,4-4
Arsen	0,02-0,05	Fosfor	90-400
Brom	0,2-0,4	Silicij	10,2-22,4
Kadmij	0,03-0,68	Selenij	zanemarivo
Krom	<0,04	Kositar	0,01-0,02
Kobalt	0,01-0,11	Vanadij	0,03-0,15
Bakar	0,01-1,55	Cink	0,01-1,48

Dušikovi spojevi se nalaze u koncentraciji od 0,3 – 1,0 g/l i to su uglavnom aminokiseline, peptidi, polipeptidi, nukleinske kiseline, amidi i heterociklički spojevi. Lipidi u pivu uglavnom dolaze iz slada i to u obliku masnih kiselina, digliceraldehida i trigliceraldehida. Dok koncentracija lipida u ječmu iznosi oko 3%, ona u gotovom pivu čini samo oko 0,1% (Biuatti, 2009). Većina ugljikohidrata se tijekom fermentacije pretvori u alkohol, dok dio ostane (do 6%).

Tablica 3. Koncentracija ugljikohidrata u pivu (Biuatti, 2009)

Ugljikohidrati	Koncentracija (g/l)
Fruktoza	0-0,19
Glukoza	0,04-1,1
Sukroza	0-3,3
Maltoza	0,7-3,0
malotrioza	0,4-3,4

Ječam i slad su bogati vitaminima koji se nalaze u aleuronskom sloju zrna. Najznačajniji predstavnici su vitamini B grupe, i to biotin, inozitol i pantoenska kiselina koji su ključni faktor u rastu kvasca. Etanol je najznačajniji alkohol u pivu koji se jako razlikuje u koncentracijama ovisno o vrsti i stilu piva. Osim etanola, nalazimo i neke druge alkohole u pivu, najčešće ih zovemo višim alkoholima zbog velike molekulske mase, a potječu iz metabolizma kvasca, a odgovorni su za glavobolju i mamurluk.

Tablica 4. Koncentracija alkohola u pivu (Biuatti, 2009)

Alkohol	Koncentracija (mg/l)
Etanol	20 000-80 000
Metanol	0,5-3,0
1-Propanol	3-16
2-Propanol	3-6
2-Metilbutanol	8-30
3-Metilbutanol	30-70
2-Feniletanol	8-35
1-Okten-3-ol	0,03
2-Dekanol	0,005
Glicerol	1 200-2 000
Tirosol	3-40

Ugljikov dioksid nastaje tijekom alkoholnog vrenja, a količina mu također varira u različitim tipovima piva, a ima veliki utjecaj na okus i aromu piva. U pivu nalazimo jako veliki broj estera, čiji broj može biti i do 4000, a zbog najvećeg sadržaja etilnog alkohola najčešći ester je etil-acetat. Od ostalih spojeva u pivu mogu se još spomenuti i aldehidi, ketoni, sulfatni spojevi, smole i esencijalna ulja.

Kalorijska vrijednost piva se jako razlikuje od piva do piva, ponajviše zbog različitog udjela alkohola (od 0,05% u bezalkoholnim pivima, do 10% kod nekih belgijskih stilova). Kalorijska vrijednost najčešće varira od 20 do 40 kcal/100ml. Dvije trećine kalorijske vrijednosti dolazi iz sadržaja alkohola, a jedna trećina iz ostatka ugljikohidrata i proteina (Biuatti, 2009).

2. Kontaminacija piva

Patogeni mikroorganizmi ne mogu preživjeti u pivu zbog raznih inhibirajućih faktora ili tzv. prepreka koje onemogućuju njihov rast. Prisutnost etanola (do 10%), gorkih tvari iz hmelja (17-55 ppm izo- α -kiselina), nizak pH (3,9 – 4,4), razina otopljenog ugljikovog dioksida (0,5%) i kisika (<0,1ppm) te nizak sadržaj hranjiva štite pivo od rasta moguće prisutnih patogenih mikroorganizama (Menz i sur., 2009). Osim ovih inhibirajućih faktora, zaštiti piva pomažu i procesi u proizvodnji piva poput ukomljavanja, kuhanja sladovine, pasterizacije, filtracije, aseptičkog punjenja i skladištenja u hladnim uvjetima. Unatoč tome, ponekad se znaju pojaviti patogeni mikroorganizmi u pivu zbog nedostataka inhibirajućih 'prepreka' ili kada su te prepreke preslabe da bi djelovale u potpunosti. Primjeri kada su inhibirajući faktori preslabi da bi djelovali na patogene su pronalasci bakterija *Pseudomonas spp.* i *Escherichia spp.* tijekom prvog i drugog svjetskog rata u tzv. 'slabim' pivima koji su imali pH veći od 5,0; te *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *SalmonellaTyphimirium*, *Shigella sonnei* i *Staphylococcus auerus* u tradicionalnim belgijskim pivima sa alkoholnim sadržajem manjim od 1% (uz nedostatak hmelja). Također, neke koliformne bakterije se mogu pronaći u tradicionalnim afričkim pivima koja imaju nedostatak inhibirajućih faktora (nizak udio alkohola i nedostatak hmelja) (Menz i sur., 2009).

Tablica 5. Primjeri pronađenih patogena u pivu i pivu sličnim proizvodima (Menz i sur., 2009)

Proizvod	Kratak opis proizvoda	Glavni inhibirajući faktor	Preživjeli patogen
Boza	Fermentirano proseno pivo sa malo alkohola	<1% etanola, mliječna kiselina	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Slabo pivo (Weak beer)	Slabo pivo proizvedeno tijekom svjetskih ratova sa viskom pH vrijednošću	Povećana pH vrijednost	<i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i>
Orubisi	Tradicionalno tanzanijsko pivo od banane i šećerne trske sa spontanom fermentacijom	2,2% etanola, pH 3,7, mliječna kiselina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigela</i>
Pivo od šećerne trske (Sorghum beer)	Mliječna i alkoholna fermentacija, Južno afričko	<3% etanola, pH 3,1, mliječna kiselina	<i>Bacillus spp</i>

Najveći rizik od kontaminacije se javlja tijekom punjenja piva što je ujedno i jedna od kritičnih kontrolnih točaka u njegovoj proizvodnji. Kontaminacija nastala tijekom punjenja se naziva sekundarna kontaminacija, za razliku od primarne kontaminacije koja se javlja tijekom proizvodnje piva. Punjenje piva možemo podijeliti na suhi dio, gdje se vrši paletizacija, pakiranje i raspakiranje, te na 'mokri' dio koji započinje čišćenjem i ispiranjem ambalaže i punjenjem proizvoda (Hofmann i Fischer, 2015).

Kako bi se izbjegla moguća kontaminacija tijekom punjenja važno je obratiti pozornost na sljedeće stvari: sve površine trebaju biti pripremljene za CIP (*cleaning in place*) pranje, sve površine koje dolaze u kontakt sa proizvodom moraju biti podložne sterilizaciji i moraju biti što je više moguće glatke, sa što manje mikroskopskih udubljenja te se moraju vrlo lako ispirati od ostataka proizvoda. Tijekom samog punjenja rizik od kontaminacije postoji prije istakanja proizvoda (ambalaža je otvorena pa je moguć ulazak patogena iz zraka) te nakon punjenja i prije zatvaranja ambalaže (također putem zraka). Nakon zatvaranja ambalaže riziko od kontaminacije je minimalan. Ambalaža mora biti čista od patogena, a kod staklene ambalaže se po pitanju čistoće razlikuju povratne i nepovratne boce. Nepovratne boce se smatraju čistima nakon proizvodnje ali se uglavnom dodatno ispiru prije punjenja; dok je povratne boce obavezno propisno i temeljito oprati i sterilizirati prije punjenja (Hofmann i Fischer, 2015).

Tablica 6. Inhibirajući faktori mikrobioloških patogena (Menz i sur., 2009)

Inhibirajuće prepreke	Primarna meta	Model inhibicije
etanol	Svi patogeni	Inhibira funkciju stanične membrane
Niski pH	Svi patogeni	Utječe na enzime i pojačava inhibirajući efekt hmelja
Hmelj	Gram pozitivne bakterije	Inhibira funkciju stanične membrane
Ugljikov dioksid	Aerobni patogeni	Stvara anaerobne uvjete, snižava pH, inhibira enzime i funkciju stanične membrane
Niska razina kisika	Aerobni patogeni, gram negativne bakterije	Stvara anaerobne uvjete
Nedostatak hranjivih nutrijenata	Svi patogeni	Izgladnjuje stanice

Sumporov dioksid	Gram negativne bakterije	Utječe na razne metaboličke enzime
Ukomljavanje	Gram negativne bakterije	Uzrokuje termičko razaranje stanice
Kuhanje sladovine	Svi patogeni	Uzorkuje termičko razaranje stanice
Pasterizacija	Svi patogeni	Uzrokuje termičko razaranje stanice
Filtracija	Svi patogeni	Izdvađa patogene iz otopine
Priprema boce	Aerobni patogeni	Stvara anaerobne uvjete

Kisik je jedan od glavnih inhibirajućih faktora, no on utječe samo na gram negativne bakterije i aerobne patogene, dok anaerobni mikroorganizmi mogu preživjeti i u uvjetima bez prisutnosti kisika. Prve takve vrste su pronađene tijekom 1970-ih godina, a postoje dokazi o njihovoj prisutnosti i ranije -1946. godine (Haikara, 1984). Najčešće je pronađeno devet sojeva anaerobnih bakterija unutar vrsta *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas* i *Propionispira*. Ti sojevi su izolirani iz piva koja nisu pasterizirana te tijekom proizvodnje piva, a još nije točno određeno na koji su način dospjele u pivovare (Juvonen, 2015). Anaerobni mikroorganizmi uzročnici kvarenja piva mogu se također podijeliti u dvije skupine, apsolutno i potencijalno štetne bakterije. Po definiciji, apsolutni uzročnici kvarenja mogu rasti u pivu bez dugog vremena adaptacije i uzrokuju očite nedostatke kvalitete piva. Potencijalni uzročnici kvarenja ne rastu u uobičajenim pivima, treba im duže vrijeme adaptacije ili ne uzrokuju očite promjene kvalitete piva.

Moguće posljedice kontaminacije su sljedeće: povećana zamućenost, formacija flotirajućih čestica, promjene u okusu, zakiseljenost, rast pritiska (povećanje ugljikovog dioksida) i deformacija ambalaže.



Slika 2. Pivo zaraženo bakterijom *Megasphaera cerevisiae* (lijevo) i *Pectinatus friginensis* (desno) (Juvonen, 2015)

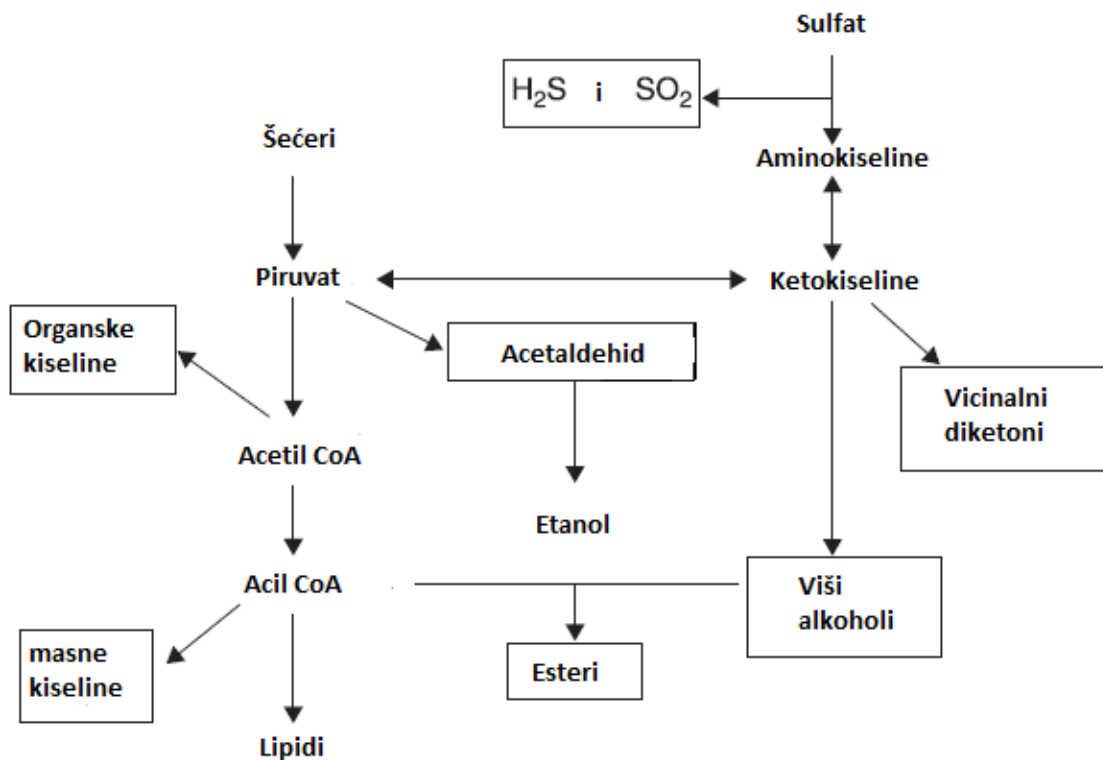
Hmelj se dodaje u pivo prvenstveno zbog gorčine i arome koje daje pivu, ali ima i bitnu antimikrobnu ulogu. Kako bi se pivo duže očuvalo na svojim preookeanskim putovanjima, u 18. stoljeću je razvijen IPA stil piva (*India Pale Ale*) kojeg karakterizira razmjerno veća količina hmelja u odnosu na standardne stilove piva. Najznačajnije komponente su α i β -kiseline. Tijekom kuhanja sladovine α -kiseline se izomeriziraju u svoj topljivi oblik, što utječe na gorčinu i antimikrobno djelovanje. Iako β -kiseline pokazuju veće antimikrobno djelovanje, one su manje topljive u sladovini te tako imaju manji utjecaj na patogene u pivu. Komponente hmelja kao što su humulon, lupulon, izohumulon i humulonska kiselina izazivaju propuštanje stanične membrane bakterije *Bacillus subtilis*. To razaranje stanične membrane dovodi do inhibicije aktivnog transporta šećera i aminokiselina preko membrane što smanjuje sintezu proteina, DNA i RNA (Menz i sur., 2009).

3. Kisik u pivu

Kisik je kemijski element koji nosi simbol 'O', atomski broj mu je 8, a atomska masa mu iznosi 15,9994. Pri normalnim uvjetima je bezbojan plin, bez mirisa i okusa, ne gori ali podržava gorenje, te je teži od zraka. U prirodi se javlja u molekularnom obliku od dva atoma kisika, i u obliku od tri atoma (ozon). Kisik je neophodan za život svim živim bićima jer sudjeluje u raznim biokemijskim procesima i dok kratkotrajno udisanje čistog kisika ne šteti, njegovo dugotrajno udisanje može stvarati probleme. Dakako, i kvasac koristi kisik za rast. Iako je fermentacija anaeroban proces, kisik je potreban za rast i umnažanje stanica kvasca.

3.1. Uloga kisika u metabolizmu kvasca

Kvasac koristi molekularni kisik na početku fermentacije kako bi sintetizirao sterole i nezasićene masne kiseline koje su esencijalne komponente u membrani stanice kvasca. Potreba za kisikom se može maknuti ukoliko se steroli (npr. ergosterol) i nezasićene masne kiseline dodaju direktno u sladovinu. Kada se gleda otpuštanje energije (ATP), aerobna fermentacija je efikasnija nego anaerobna fermentacija, no potreba kvasca za kisikom u aerobnoj fermentaciji je potisnuta pomoću efekta kojeg nazivamo Crabtree efektom (povećana koncentracija glukoze ubrzava glikolizu te tako povećava koncentraciju ATP-a (adenozintrifosfata) što smanjuje potrebu za oksidativnom fosforilacijom samim time i potrebu za kisikom. Kvasac tako koristi glukozu kako bi proizveo etanol, a kisik koristi kako bi zadovoljio potrebe za lipidnim komponentama (steroli i masne kiseline) (The BREWER international, 2002). Nedostatak tih lipidnih komponenti dovodi do nepoželjnih posljedica kao što su usporena fermentacija, pokvaren okus, usporen rast i vitalnost kvasca te slaba formacija estera. S druge strane, previše kisika također može dovesti do nepoželjnih posljedica kao što su prebrza fermentacija, preveliki rast kvasca (veći gubitci piva) te veći sadržaj estera (veći voćni okus) (Stewart, 2014).



Slika 3. Shematski prikaz metabolizma kvasca (Parker , 2012)

Kisik se slakovini se dodaje tijekom proizvodnog procesa za vrijeme prebacivanja slakovine iz posude za bistrenje (*whirlpool*), preko hladnjaka do fermentora, ali prije dodavanje kvasca (*pitching*). Najčešće se to obavlja nakon hlađenja slakovine jer istraživanja pokazuju da je topljivost kisika u slakovini veća pri nižim temperaturama.

Tablica 7. Topljivost kisika u slakovini pri različitim temperaturama i istom tlaku (The brewer int., 2002)

Temperatura	Koncentracija kisika u vodi (mg/l)	Koncentracija kisika u slakovini (mg/l)
0	14,5	11,6
5	12,7	10,4
10	11,2	9,3
15	10,0	8,3
20	9,9	7,4

Samo se dio kisika otopi pri direktnoj aeraciji sladovine, pa je poželjno imati uređaj za mjerenja kisika smješten što dalje od mjesta aeracije kako bi se što kvalitetnije očitale mjerenje. Količina potrebnog kisika ovisi o soju kvasca koji se koristi, kao i o tipu piva koje se proizvodi, a obično se kreće između 6-8 ppm. Proizvodnja sladovine s povećanom količinom ekstrakta (*high gravity brewing*) zahtijeva i veću količinu kisika (16 ppm).

3.2. Oksidacija piva

Pivo stari, čak i ono mikrobiološki ispravno, tj. bez ikakvih patogena. Jedan od glavnih razloga starenja piva je kisik koji uzrokuje oksidaciju piva. Smanjenjem količine kisika se produžuje rok trajanja piva pa se pokušava doći do gotovog proizvoda bez prisustva kisika. Ciljana koncentracija kisika u gotovom pivu je 0,0 - 0,5 ppm (Marić, 2009). Tijekom starenja piva događaju se brojne kemijske promjene, a neke od njih su uvjetovane kisikom. Samo neki od brojnih spojeva koji nastaju tijekom starenja su aldehidi, ketoni, heterociklični spojevi, etil-esteri, laktoni i suporni spojevi (Vanderhaegen i sur., 2005).

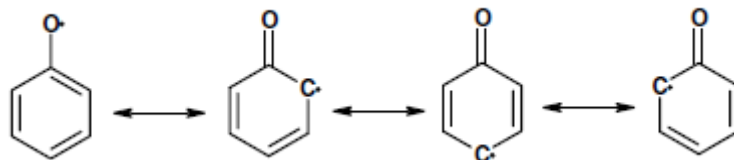
Kisik se nalazi u svom trostrukom obliku ($^3\text{O}_2$), jako je stabilan i teško ulazi u reakciju sa drugim molekulama. Ioni željeza i bakra dolaze u kontakt sa kisikom i stvaraju superoksidni anion O_2^- . Taj superoksidni anion može biti protoniran tako da tvori perhidroksidni radikal OOH^- koji je puno reaktivniji. Superoksidni anion može biti reduciran u peroksidni oblik O_2^{2-} . Od njega vrlo lako nastaje vodikov peroksid H_2O_2 iz kojeg može nastati hidroksidni radikal OH^- . Reaktivnost ovih oblika kisika se povećava sa njihovom redukcijском sposobnošću (superoksidni anion <perhidroksidni radikal <hidroksidni radikal). Koncentracija ovih slobodnih radikala se povećava sa koncentracijom željeza i bakra, količinom kisika i višom temperaturom (Vanderhaegen i sur., 2005). Ti slobodni radikali reagiraju sa komponentama iz piva kao što su polifenoli, izohumuloni i alkoholi, što dovodi do raznih promjena u samom pivu.

Najvažniji alkoholi u pivu su etanol, 2- metil-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol i 2-fenil-etanol, a pomoću kisika oni se oksidiraju u pripadajuće im aldehide. Direktna oksidacija tih alkohola kisikom nije moguća bez prisustva melanoidina. Reakcijski mehanizam je takav da alkoholi prenose elektron u reaktivnu karbonilnu skupinu

melanoidina. Bez tog prijenosa elektrona nebi došlo do oksidacije alkohola u prisustvu kisika

Degradacija hmeljnih komponenti poput α -kiselina, β -kiselina i izo- α -kiselina dovodi do nepoželjnih promjena u pivu koje rezultiraju nepoželjnim okusom. Iako nije dokazana uloga kisika u degradaciji ovih spojeva, dokazano je da se degradacijom stvaraju kisikovi i ugljikovi radikali koji mogu reducirati druge spojeve.

Kako postoje 'prooksidansi' poput iona željeza i bakra, koji djeluju kao donori elektrona i od molekularnog kisika stvaraju reaktivni kisik (slobodni radikal), tako postoje i tvari koje stupaju u reakciju sa slobodnim radikalima i tako smanjuju njihovu ulogu u starenju piva. Te tvari se nazivaju antioksidansima, a najznačajniji u pivu su sulfiti i polifenoli. Sulfiti nastaju iz sulfata putem metabolizma kvasca, te odgađaju nastajanje slobodnih radikala, najprije zahvaljujući reakciji sa peroksidom. Najveći udio polifenola potječe iz ječma (70-80%) a manji iz hmelja (20-30%), s naglaskom da spojevi manje molekulske mase imaju veću antioksidacijsku sposobnost. Polifenoli reagiraju sa slobodnim radikalom tvoreći fenoksi radikale koji su stabilni zahvaljujući delokalizaciji slobodnog radikala preko aromatičnog prstena u svom sastavu (Vanderhaegen i sur., 2005).

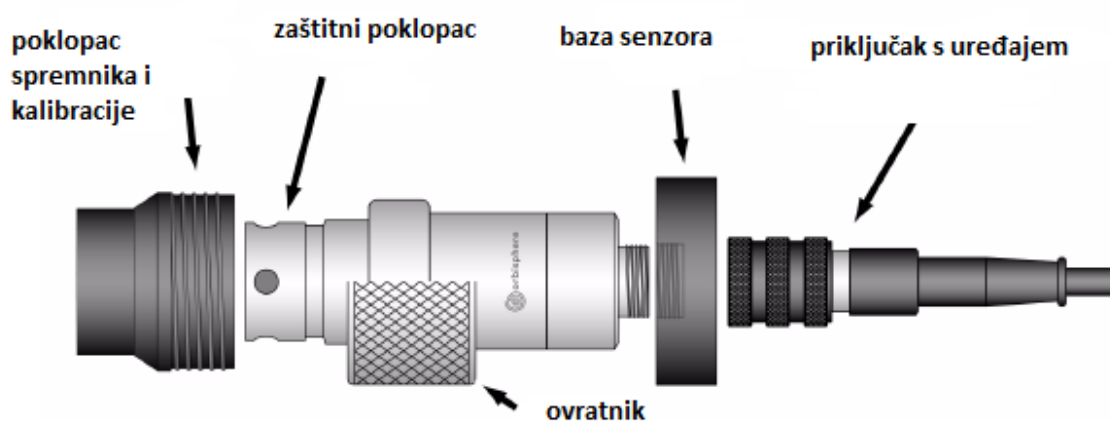


Slika 4. Stabilizacija slobodnog radikala pomoću aromatskog prstena
(Vanderhaegen i sur., 2005)

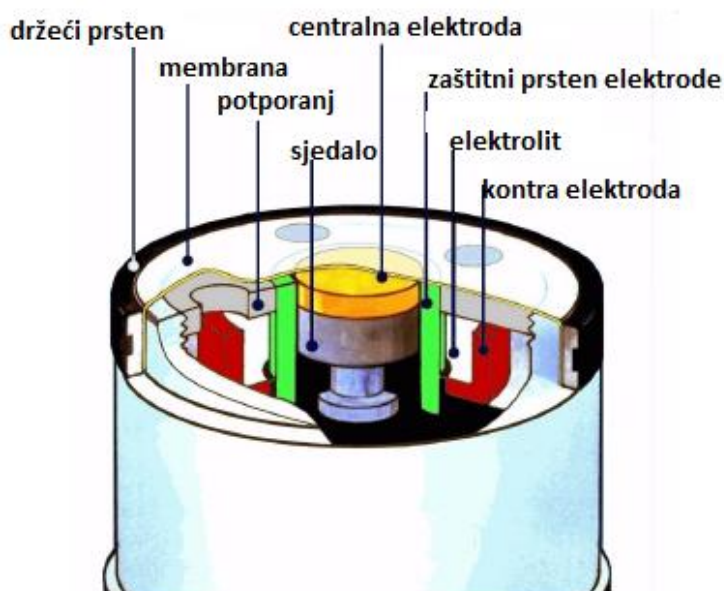
4. Materijali i metode rada

4.1. Materijali

Količina otopljenog kisika je mjerena pomoću elektrokemijskog senzora uređaja Orbisphere modela 3650, tvrtke Orbisphere laboratories (Geneva, Švicarska). Senzor je proizvela i kalibrirala tvrtka Hach Lange (Švicarska). Senzor je predviđen za mjerenje kisika u vodi, slakovini i pivu te u ostatku industrije pića. Plin koji se koristi za kalibraciju je zrak, raspon mjerenja je 0 – 80 ppm, a preciznost uređaja je ± 2 ppb.



Slika 5. Shematski prikaz senzora kisika (Hach user manual, 2015)



Slika 6. Dijelovi 'glave' senzora (Hach user manual, 2015)

Tablica 8. Karakteristike membrane senzora (Hach user manual, 2015)

model membrane	2956A	2958A	29552A	2952A
Preporučena upotreba	Kontrola korozije Deaerirana voda	Pića Rad u laboratoriju	U protoku sladovine	Kontrola korozije U protoku pića Deaerirana voda
Materijal	PFA	Tefzel®	PTFE	Tefzel®
Debljina [um]	25	12.5	50	25
Plin za kalibraciju	zrak	zrak	zrak	zrak/čisti O ₂
Raspon otopljenog sadržaja	0 ppb do 20 ppm	0 ppb do 40 ppm	0 ppb do 80 ppm	0 ppb do 80 ppm
Raspon plinovitog sadržaja	0 Pa do 50 kPa	0 Pa do 100 kPa	0 Pa do 200 kPa	0 Pa do 200 kPa
Preciznost	više od ±1% očitanja ili ± 0.1 ppb ¹ , ili ± 1 ppb ² , ili ± 0.25 Pa	više od ±1% očitanja ili ± 1 ppb, ili ± 2 Pa	±1% ± 2 ppb, ± 5 Pa	više od ±1% očitanja ili ± 2 ppb, ili ± 5 Pa
	1 preciznost ± 0.1 ppb za 410, 510, 362x, 360x i 3655 instrumente 2 preciznost ± 1 ppb za 366x i 3650 instrumente			
Granica integriranog radijusa (rad)	2 x 10 ⁴	10 ⁸	N/A	10 ⁸
Očekivana struja pri 1 bar 25°C [µA]	26.4	9.4	6.3	5.4
Očekivana struja O ₂ [µA]	132	47	31.4	27
Potrošnja kisika u zasićenoj vodi pri 25°C [µg/ sat]	40	14	9.4	8

4.2 Metode rada

Princip rada senzora je sljedeći: senzor se sastoji od dvije elektrode, katode i anode uronjene u otopinu elektrolita (stvoren je strujni krug između katode i anode). Elektrode i elektroliti su odvojeni od plinovitog ili tekućeg uzorka sa membranom koja je propusna za plin. Oko centralne elektrode (katode) se nalazi prsten koji štiti senzor od utjecaja drugih plinova te tako pozitivno utječe na stabilnost i preciznost mjerenja. Glava senzora je zaštićena sa omotačem (*sensor cap*) kako bi se dodatno zaštitila membrana senzora. Plin koji prolazi kroz membranu se otapa u elektrolitu, dolazi do reakcije na katodi uzorkujući mjerivu električnu struju. Količina struje je proporcionalna količini plina koja prolazi membranu, a ta količina je proporcionalna parcijalnom tlaku plina koji se nalazi u uzorku. Rezultat se prikazuje u obliku koncentracije plina, koja se na uređaju prikazuje ovisno o vrsti uređaja koji se koristi, a u ovom slučaju je to koncentracija mjerena u jedinicama ppm i ppb.

Elektronika senzora vrši četiri funkcije: primjenjuje stalnu voltažu anodi, mjeri struju koja prolazi kroz senzor, kompenzira razliku temperature u uzorku i konvertira mjerenu struju u analogni signal za prikaz na uređaju (Hach user manual, 2015).



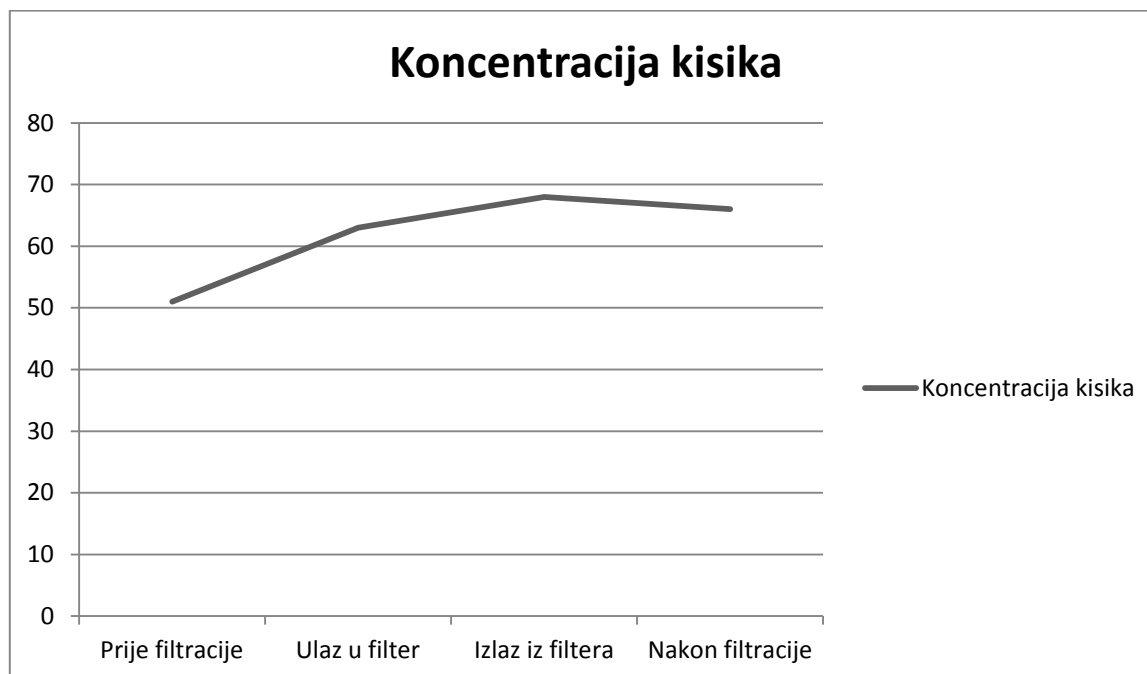
Slika 7. Uređaj Orbisphere model 3650 (Grabovac, 2016)

U nastavku rada su prikazani rezultati mjerenja kisika u sladovini i pivu, u raznim točkama proizvodnog procesa, tijekom proizvodnje Pale Ale i Porter piva u Zmajskoj pivovari. Zmajska pivovara proizvodi Pale Ale, pivo koje pripada američkom stilu pale ale piva, i Porter, tipično britansko tamno ale pivo. Oba piva se proizvode na sličan način, uz recept kao jedinu razliku.. Hlade se na isti način, preko pločastog hladnjaka, nakon kojeg slijedi aeracija i dodavanje kvasca (*pitching*). Kapaciteti fermentora su 4000 l i 8000l, a količina sladovine proizvedena nakon jednog 'kuhanja' iznosi otprilike 2000l. Prema tome, kako bi se napunio jedan fermentor od 4000l potrebna su dva 'kuhanja', a za fermentor od 8000l četiri 'kuhanja'. U oba slučaja, kvasac se dodaje isključivo nakon prvog kuhanja, a dodaje se količina ovisno o tome da li se drugi dio proizvodi isti ili sljedeći dan. Kod većih fermentora rade se dva kuhanja prvi dan, i dva kuhanja drugi dan, kvasac se dodaje tijekom prvog kuhanja, a aeracija sladovine se vrši tijekom prvog i drugog kuhanja, dok tijekom drugog dana (treće i četvrto kuhanje) nema dodavanja kvasca i nema aeracije. Sukladno tome, rezultati i mogućnosti mjerenja se razlikuju ovisno o pivu i količini koja se proizvodi. Pivo se filtrira pomoću pločastog filtra, koriste se filtarske slojnice od celuloznih vlakana i dijatomejske zemlje.

5. Rezultati

Tablica 9. Rezultati mjerenja kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A101, 3.8.2016.

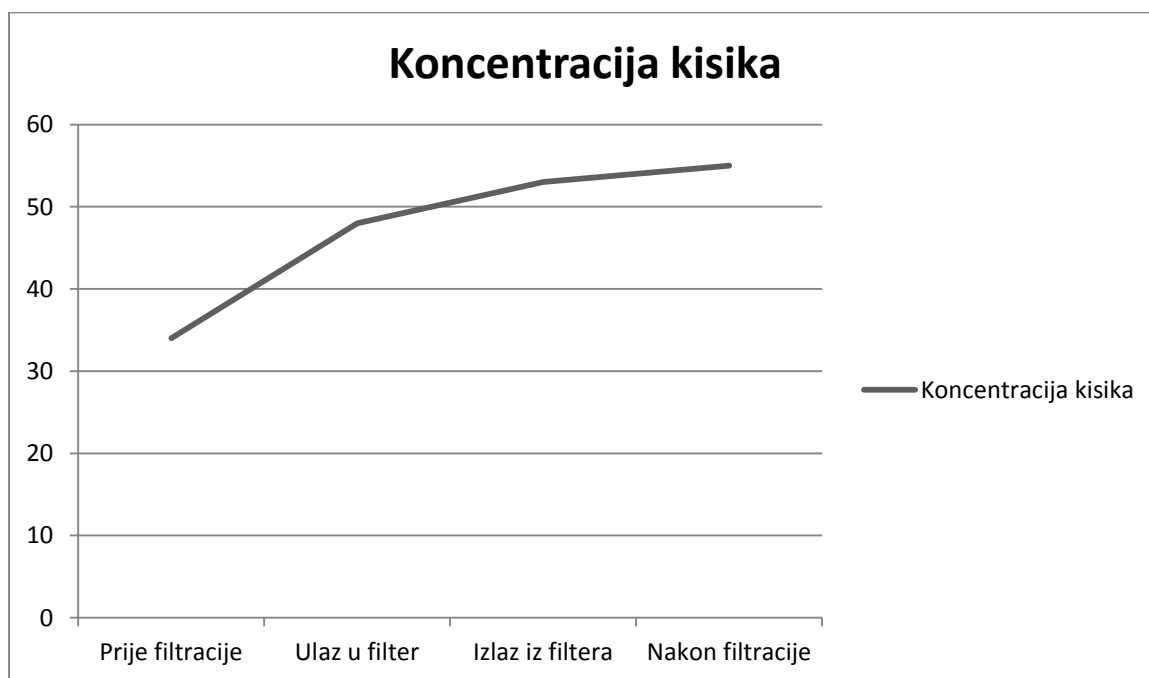
<u>Mjesto mjerena</u>	<u>Rezultati mjerena</u>			<u>Minimalna vrijednost</u>	<u>Maksimalna vrijednost</u>	<u>Srednja vrijednost</u>	<u>Standardna devijacija</u>
<u>Fermentor (prije filtracije)</u>	51	52	50	50	52	51	1
<u>Ulaz u filter</u>	60	65	64	60	65	63	2,64
<u>Izlaz iz filtera</u>	70	67	67	67	70	68	1,73
<u>Fermentor (nakon fermentacije)</u>	69	64	65	64	69	66	2,64



Slika 8. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A101, 3.8.2016.

Tablica 10. Rezultati mjerenja kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarža A102, 9.8.2016.

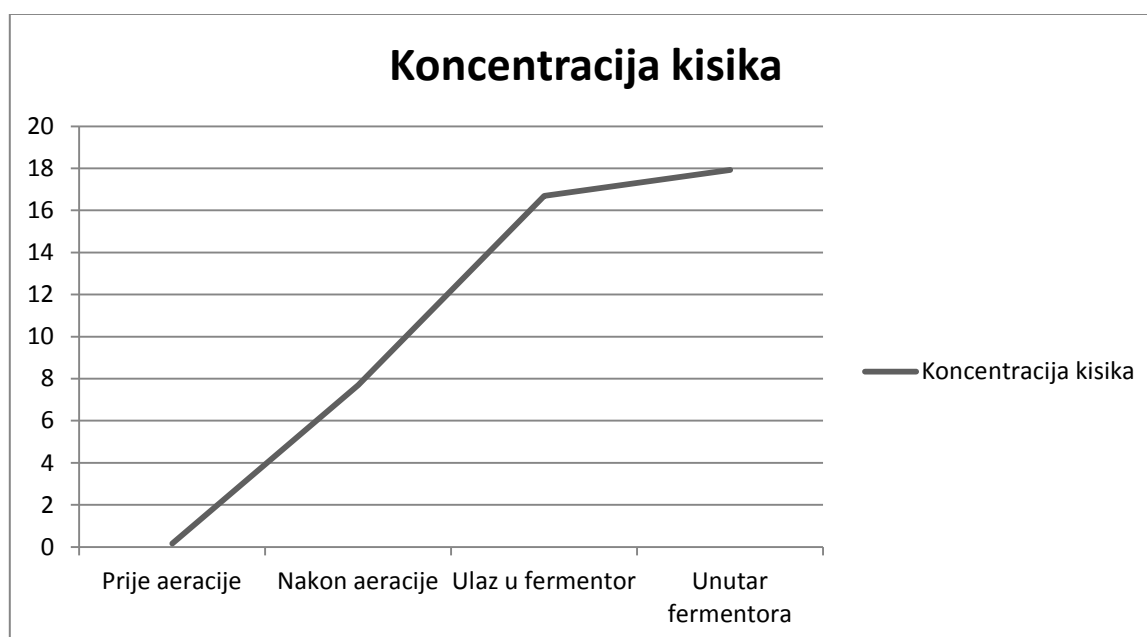
<u>Mjesto mjerena</u>	<u>Rezultat mjerena</u>			<u>Minimalna vrijednost</u>	<u>Maksimalna vrijednost</u>	<u>Srednja vrijednost</u>	<u>Standardna devijacija</u>
<u>Fermentor (prije filtracije)</u>	34	35	33	33	35	34	1
<u>Ulaz u filter</u>	46	52	46	46	52	48	3,46
<u>Izlaz iz filtera</u>	52	52	55	52	55	53	1,73
<u>Fermentor (nakon filtracije)</u>	56	55	54	54	56	55	1



Slika 9. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A102, 9.8.2016

Tablica 11. Rezultati mjerenja kisika tijekom aeracije sladovine Pale Ale-a, šarža A106, 2.8.2016.

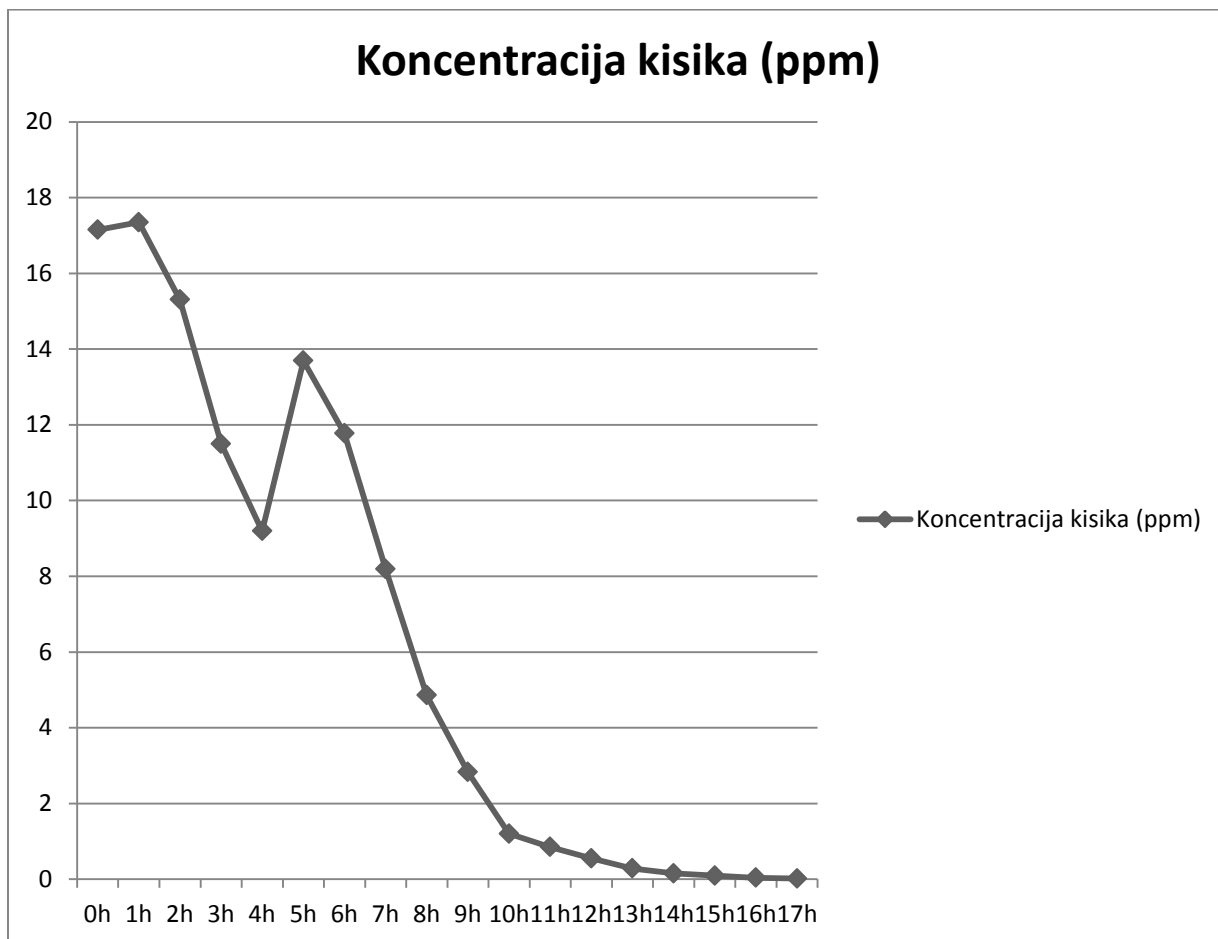
<u>Mjesto mjerjenja</u>	<u>Rezultati mjerenja</u>			<u>Minimalna vrijednost</u>	<u>Maksimalna vrijednost</u>	<u>Srednja vrijednost</u>	<u>Standardna devijacija</u>
<u>prije aeracije</u>	0,175	0,158	0,162	0,158	0,175	0,165	0,0088
<u>Nakon aeracije</u>	7,65	7,805	7,645	7,645	7,805	7,7	0,0909
<u>Ulaz u fermentor</u>	16,55 2	16,84 4	16,66	16,552	16,844	16,685	0,1476
<u>Unutar fermentora</u>	17,85 5	17,96 2	17,93 3	17,855	17,962	17,916	0,055



Slika 10. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom aeracije sladovine Pale Ale-a, šarža A106, 2.8.2016.

Tablica 12. Rezultati mjerenja kisika u fermentoru tijekom fermentacije Pale ale-a, šarža A107, 10.8.2016.

<u>Vrijeme</u> <u>mjereni</u> <u>a</u>	<u>Rezultati mjerenja</u> <u>(ppm)</u>			<u>Minimaln</u> <u>a</u> <u>vrijednos</u> <u>t (ppm)</u>	<u>Maksimaln</u> <u>a</u> <u>vrijednost</u> <u>(ppm)</u>	<u>Srednja</u> <u>vrijedno</u> <u>st (ppm)</u>	<u>Standardn</u> <u>a</u> <u>devijacija</u> <u>(ppm)</u>
<u>14:30</u>	17,15 0	17,08 0	17,22 0	17,080	17,220	17,150	0,07
<u>15:30</u>	17,32 2	17,41 5	17,30 5	17,305	17,415	17,347	0,059
<u>16:30</u>	15,28 0	15,29 5	15,34 0	15,280	15,340	15,305	0,031
<u>17:30</u>	11,48 4	11,49 9	11,51 5	11,484	11,515	11,499	0,015
<u>18:30</u>	9,170	9,205	9,210	9,170	9,210	9,195	0,021
<u>19:30</u>	13,70 0	13,70 5	13,65 5	13,655	13,705	13,686	0,027
<u>20:30</u>	11,67 5	11,68 0	11,69 5	11,675	11,695	11,683	0,010
<u>21:30</u>	8,195	8,190	8,185	8,185	8,195	8,19	0,005
<u>22:30</u>	4,950	4,795	4,820	4,795	4,950	4,855	0,083
<u>23:30</u>	2,795	2,842	2,852	2,795	2,852	2,829	0,030
<u>00:30</u>	1,195	1,196	1,208	1,195	1,208	1,199	0,007
<u>01:30</u>	0,844	0,852	0,848	0,844	0,852	0,848	0,004
<u>02:30</u>	0,545	0,552	0,553	0,545	0,553	0,550	0,004
<u>03:30</u>	0,282	0,288	0,279	0,279	0,288	0,283	0,004
<u>04:30</u>	0,148	0,153	0,166	0,148	0,166	0,155	0,009
<u>05:30</u>	0,090	0,092	0,092	0,090	0,092	0,091	0,00
<u>06:30</u>	0,038	0,042	0,037	0,037	0,042	0,039	0,002
<u>07:30</u>	0,017	0,015	0,016	0,015	0,017	0,016	0,001



Slika 11. Grafički prikaz mjerenja kisika u fermentoru tijekom fermentacije Pale ale-a, šarža A107, 10.8.2016.

6. Rasprava

Iz dobivenih rezultata mjerenja kisika može se zaključiti da je koncentracija kisika u prihvatljivim granicama. Pivo neposredno prije filtriranja ima jako malo otopljenog kisika (34 ppb i 51 ppb), a tijekom samog procesa filtriranja dolazi do minimalnog porasta koncentracije kisika (66 ppb i 55 ppb), što dovodi do zaključka da je filter zajedno sa slojnicama dobro pripremljen, dezinficiran tj. deaeriran te da se filtracija vrši u zatvorenom sustavu u koji ne može doći kisik (Marić, 2009).

Mjerenja tijekom aeriranja pokazuju da se dodaje optimalna količina kisika (7,7 ppm – mjereno neposredno nakon aeriranja), te da se kisik nastavlja otapati unutar crijeva kojim pivo putuje te u fermentor dolazi sa koncentracijom od 17,9 ppm (The BREWER Int., 2009).

Tijekom fermentacije vidljiv je pad koncentracije kisika, kvasac koristi kisik za proizvodnju sterola i lipida. Na grafičkom prikazu rezultata je vidljiv trenutni porast koncentracije kisika, a do njega dolazi zbog ubacivanja nove količine piva koje je aerirano te se miješa sa pivom kojem je koncentracija kisika već pala. Nakon toga opet dolazi do brzog pada koncentracije, te je nakon 17h potrošena gotova sva količina kisika u fermentoru (0,016 ppm).

7. Zaključak

Svi rezultati mjerenja su u skladu sa očekivanim – nema porasta koncentracije kisika tijekom filtriranja; sladovina se aerira dovoljnom količinom kisika i kisik se dodatno otapa tijekom putovanja u fermentor; kvasac troši kisik u potpunosti tijekom prvih 24h te je jasno vidljiv porast koncentracije nakon dodavanja novog aeriranog piva.

8. Literatura

1. Marić V. (2009.) : Tehnologija piva, Karlovac, str. 15-20
2. Harrison M. A. (2009.) : Beer/Brewing, University of Georgia, Athens, USA, str. 23-33
3. Parker D. K. (2012.) : Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis, Campden BRI, UK, str 133-158
4. Zarnkow M. (2014.) : Beer, Technische Universitat Munchen, Freising, Germany, str. 209-215
5. Buiatti S. (2009.) : Beer in Health and Disease Prevention, University of Udine, Italy, str 211-225
6. Menz G., Aldred P., Vriesekoop F., (2009.) :Beer in Health and Disease Prevention, University of Ballarat, Ballarat, Australia, str. 403-414
7. Hofmann R., Fischer J. (2015.) : Brewing Microbiology, VLB Berlin, Berlin, Germany, str. 319-335
8. Haikara A. (1984.) : Beer spoilage organisms. Occurence and detection with particular reference to a new genus Pectinatus, Technical Research Centre of Finland Publications, Espoo, Finland, str. 1-47
9. Juvonen R. (2015.) : Brewing Microbiology, VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland, str. 195-219
10. The Brewer International magazine, (March 2002), str 45-47
11. Stewart G. G. (2014.) : Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3, Cardiff, UK, str. 302-308
12. Vanderhaegen B., Hedwig N., Verachtert H., Derdelinckx G. (2005.) , The chemistry of beer aging – a critical review, Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, Belgium, str. 357-381
13. Orbisphere model 31xxx Electrochemical sensors User Manual, Edition 9, (05/2015)

9. Popis priloga

Tablica 1. Podrijetlo nekih stilova piva u Europi (Harrison M. A., 2009.)

Tablica 2. Anroganski sastav piva (Biuatti S., 2009.)

Tablica 3. Koncentracija ugljikohidrata u pivu (Biuatti S., 2009.)

Tablica 4. Koncentracija alkohola u pivu (Biuatti S., 2009.)

Tablica 5. Primjeri pronađenih patogena u pivu i pivu sličnim proizvodima (Menz i sur., 2009.)

Tablica 6. Inhibirajući faktori mikrobioloških patogena (Menz i sur., 2009.)

Tablica 7. Topljivost kisika u sladovini pri različitim temperaturama i istom tlaku (Thebrewer int., 2002.)

Tablica 8. Karakteristike membrane senzora (Orbisphereuser manual, 2015.)

Tablica 9. Rezultati mjerenja kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A101, 3.8.2016.

Tablica 10. Rezultati mjerenja kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarža A102, 9.8.2016.

Tablica 11. Rezultati mjerenja kisika tijekom aeracijesladovine Pale Ale-a, šarža A106, 2.8.2016.

Tablica 12. Rezultati mjerenja kisika u fermentoru tijekom fermentacije Pale ale-a, šarža A107, 10.8.2016.

Slika 1. Shematski prikaz proizvodnog procesa (DeutscherBrauerbund e. V., NeustädtischeStrasse 7A, D-10117 Berlin.)

Slika 2. Pivo zaraženo bakterijom *Megasphaera cerevisiae* (lijevo) i *Pectinatus friginensis* (desno) (Juvonen R., 2015.)

Slika 3. Shematski prikaz metabolizma kvasca (Parker D. K., 2012.)

Slika 4. Stabilizacija slobodnog radikala pomoću aromatskog prstena (Vanderhaegen i sur., 2005.)

Slika 5. Shematski prikaz senzora kisika (Orbisphereuser manual, 2015.)

Slika 6. Dijelovi 'glave' senzora (Orbisphereuser manual, 2015.)

Slika 7. Uređaj Orbisphere model 3650 (Zmajaska pivovara)

Slika 8. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A101, 3.8.2016.

Slika 9. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom filtracije Pale Ale-a, šarže A102, 9.8.2016

Slika 10. Grafički prikaz koncentracije kisika tijekom aeracijesladovinePelaAle-a, šarža A106, 2.8.2016.

Slika 11. Grafički prikaz mjerenja kisika u fermentoru tijekom fermentacije Pale ale-a, šarža A107, 10.8.2016.