

USPOREDBA LACTOBACILLUS HELUETICUS I LACTOBACILLUS PLANTARUM U PROIZVODNJI KISELIH PIVA

Grmek, Matej

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:681581>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Veleučilište u Karlovcu
STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA
PIVARSTVO

Matej Grmek

**USPOREDBA BAKTERIJA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* I
LACTOBACILLUS PLANTARUM U PROIZVODNJI KISELIH
PIVA**

ZAVRŠNI RAD

KARLOVAC, 2022.

Veleučilište u Karlovcu
Stručni studij prehrambena tehnologija
Pivarstvo

Matej Grmek

**USPOREDBA BAKTERIJA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* I
LACTOBACILLUS PLANTARUM U PROIZVODNJI KISELIH
PIVA**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić
Broj indeksa studenta: 0415621008

Karlovac, ožujak 2022.

IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Matej Grmek**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **USPOREDBA BAKTERIJA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* I *LACTOBACILLUS PLANTARUM* U PROIZVODNJI KISELIH PIVA** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac 24. ožujak 2022.

Ime i prezime studenta

Matej Grmek

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Veleučilište u Karlovcu
Odjel prehrambene tehnologije
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

USPOREDBA BAKTERIJA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* I *LACTOBACILLUS PLANTARUM* U PROIZVODNJI KISELIH PIVA

Matej Grmek

Rad je izrađen na Veleučilištu u Karlovcu

Mentor: Dr.sc. Goran Šarić, v. pred

Sažetak

Tradicionalna proizvodnja kiselih piva temelji se na spontanoj fermentaciji, u kojoj sudjeluje više vrsta kvasaca i bakterija koje se nalaze u zraku iznad sladovine ili u porama posude u kojoj se odvija fermentacija. Nad ovakvim procesom nije moguće imati potpunu kontrolu, zbog čega se u moderno doba pivovare odlučuju na proizvodnju kiselih piva sa selekcioniranim mikroorganizmima, najčešće bakterijama roda *Lactobacillus*, a koji u kratkom vremenu mogu zakiseliti sladovinu. Kuhana su dva piva u stilu „Berliner weisse“ na sistemu Grainfather, sa tehnikom zakiseljavanja „Kettle sour“. Oba piva su kuhana istim tehnikama i istim osnovnim sirovinama (voda, ječmeni i pšenični slad, hmelj, kvasac), ali su korištene različite bakterije za zakiseljavanje. U jednom pivu korišten je „Sour pitch“ (*Lactobacillus plantarum*), a u drugom „Helveticus pitch“ (*Lactobacillus helveticus*). Tjekom kiseljenja mjerena je pH sladovine, kao i tokom fermentacije, dok je nakon odležavanja piva odrađena senzorska analiza kojom se potvrđuje drugačiji utjecaj ovih bakterija na određena senzorska svojstva piva.

Broj stranica: 39

Broj slika: 5

Broj tablica: 12

Broj literaturnih navoda: 18

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Bakterije, fermentacija, kiselo pivo, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*.

Datum obrane: 24.ožujak 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Goran Šarić*, v. pred
2. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof.v.š.
3. dr. sc. *Sandra Zavadlav*, prof.v.š.
4. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof.v.š.

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, I. Meštrovića 10, 4700 Karlovac, Hrvatska.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Karlovac University of Applied Sciences
Department of Food Technology
Professional Study of Food Technology

Final paper

Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

DIFFERENCE BETWEEN BACTERIA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* AND BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN SOUR BEER PRODUCTION

Matej Grmek

Final paper performed at Karlovac Unveristy of Apllied Sciences
Supervisor: Ph.D. *Goran Šarić*, sen. lecturer

Abstract

Traditional sour beer production is based on spontaneous fermentation, which involves several types of yeast and bacteria found in the air above the wort or in the pores of the tank in which the wort is fermenting. It is not possible to have full control over this process, which is why in modern times breweries decide to produce sour beers with selected microorganisms, most often lactobacillus, which can acidify the wort in a short time. Two "Berliner weisse" beers were brewed on the Grainfather system with "Kettle sour" method. Both beers were brewed using the same techniques and the same basic ingredients (water, barley malt, wheat malt, hops, yeast) but different bacteria were used for acidification. One beer was pitched with "Sour pitch" (*Lactobacillus plantarum*), and the other with Helveticus pitch (*Lactobacillus helveticus*). During process of souring, the pH of the wort was measured, as well as during fermentation, while after aging the beer, a sensory analysis was performed, which proves the different influence of these bacteria on certain sensory properties of beer.

Number of pages:39

Number of figures: 5

Number of tables: 12

Number of references: 18

Original in: Croatian

Key words: Bacteria, fermentation, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, sour beer.

Date of the final paper defense: 24 March 2022

Reviewers:

1. Ph.D. Goran Šarić, sen. lecturer
2. Ph.D. Marijana Blažić, collage prof
3. Ph.D. Sandra Zavadlav, collage prof
4. Ph.D. Bojan Matijević, collage prof (substitute)

Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, I. Meštrovića 10, Karlovac, Croatia.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OSNOVNO O PIVU	2
2.1. SIROVINE.....	2
2.1.1. Hmelj	2
2.1.2. Voda	2
2.1.3. Slad	3
2.1.4. Kvasac	3
2.2. PODJELA PIVA	4
2.2.1. Podjela piva prema vrsti kvasca	4
2.2.2. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini.....	5
2.2.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine.	5
2.2.4. Podjela piva prema boji	6
2.2.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola	6
3. PROIZVODNJA KISELIH PIVA	7
3.1. OPĆENITO O KISELOM PIVU	7
3.2. LAKTOBACILI U PIVU	7
3.3. TRADICIONALNA PROIZVODNJA KISELIH PIVA.....	8
3.4. RIZIK U TRADICIONALNOJ PROIZVODNJI KISELIH PIVA	9
3.5. SUVREMENE METODE PROIZVODNJE KISELIH PIVA.....	10
4. STILOVI KISELIH PIVA	12
4.1. BERLINER WEISSE.....	12
4.2. FLANDERS RED ALE.....	12
4.3. OUD BRUIN	12
4.4. LAMBIC.....	13
4.5. GUEUZE	13
4.6. BRETT PIVO	14
4.7. DIVLJE SPECIJALNO PIVO	14
4.8. KISELO PIVO MIJEŠANE FERMENTACIJE	14
5. EKSPERIMENTALNI DIO	16
5.1. MATERIJALI RADA	16

5.1.1. Oprema za kućnu proizvodnju piva.....	16
5.1.2. Sirovine za proizvodnju piva Berliner Weisse	17
5.1.3 Mjerni instrumenti i kemikalije korištene u proizvodnji piva.	19
5.1.4. Mjerni instrumenti za provođenje fizikalnih analiza	19
5.1.5. Panel skupina i metode korištene za senzorsku analizu.....	20
5.2. METODE RADA.....	20
5.2.1. Proizvodnja piva pomoću Grainfather sistema.....	20
5.2.2. Fizikalno-kemijske analize.....	22
5.2.3 Senzorske analize	23
6.REZULTATI.....	25
6.1. DNEVNICI KUHANJA.....	25
6.2. REZULTATI BAKTERIJSKE FERMENTACIJE	27
6.3. REZULTATI ALKOHOLNE FERMENTACIJE.....	29
6.3. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE	31
6.3.1. Triangle test.....	31
6.3.2. Metoda profila okusa	32
7. RASPRAVA	34
8. ZAKLJUČAK	36
9. LITERATURA.....	38

1. UVOD

Zanatsko (craft) pivarstvo je u zadnjih nekoliko godina u velikom porastu, kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Dokaz tome je da se je u zadnjih 10 godina otvorilo preko 40 takvih pivovara u Republici Hrvatskoj.

Kako se većinom u craft pivarstvu proizvodi veći broj stilova piva, suprotno industrijskim pivovarama koje svoju proizvodnju baziraju na proizvodnji samo nekoliko različitih piva, uglavnom lagera, potrošači se svakim danom upoznaju sa pivskim stilovima koji im do sada nisu bili dostupni. Upravo zbog velikog interesa i otvorenosti tržišta prema novim i manje poznatim pivskim stilovima, craft pivovare se odlučuju na njihovu proizvodnju.

U zadnjih nekoliko godina na tržištu craft pivasu se pojavila i kisela piva, koja su se do tada manje-više proizvodila većinom u Belgiji, državi poznatoj u svijetu po takvim stilovima piva. Takav stil piva se naziva „lambic“, a proizvodi se na način da se pivska sladovina stavlja u otvorene posude, odnosno fermentore, gdje divlji kvasci i bakterije iz zraka „padaju“ u nju i započinju fermentaciju. U ovakvim je uvjetima teško predvidjeti kakav će biti finalni proizvod, jer se ne može znati koje će bakterije i kvasci širiti svoju kulturu u sladovini. Zbog navedenih problema, craft pivovare se uglavnom odlučuju na proizvodnju kiselih piva metodom „kettle sour“, gdje se nakon kuhanja i hlađenja sladovine u nju nacjepljuje selekcionirana kultura bakterija, uglavnom laktobacila. Nakon što je zadovoljen intenzitet kiselosti u sladovini, bakterije se ubijaju pomoću kuhanja, nakon čega se sladovina hladi te se u nju nacjepljuje kvasac.

Cilj ovog rada je usporediti dvije bakterije iz roda *Lactobacillus* najčešće korištena u proizvodnji kiselih piva metodom „kettle sour“, prepoznati njihovu sposobnost i brzinu kiseljenja pomoću pH-metra, te usporediti aromu, okus i intenzitet kiseline pomoću senzorske analize.

2. OSNOVNO O PIVU

Pivo je pjenušavo slabo alkoholno piće, specifične gorčine i arome po hmelju, dobiveno alkoholnim vrenjem pivske sladovine pomoću pivskog kvasca. (Marić, 2009) Proizvodnja piva prisutna je već tisućama godina, a danas je treće najčešće konzumirano piće u svijetu nakon vode i čaja. Pri samoj proizvodnji piva mogu se primjenjivati različiti procesi i različite sirovine, što objašnjava da se u svijetu konzumira više stotina vrsta piva.

2.1. SIROVINE

2.1.1. Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus*, L.) je višegodišnja biljka iz porodica konopljovki (*Cannabaceae*). Za pivarsku industriju sade se ženske biljke zbog njihovih cvatova koji se nazivaju šišarice, koje na početku svojih listića (brahteola) imaju žuti prah zvan lupulin koji nastaje u lupulinskim žlijezdama. Lupulinske žlijezde su odgovorne za sve gorke i aromatske spojeve koji potiču iz hmelja ako se zanemare polifenoli.

Osim što je zaslužan za gorčinu i aromu u pivu, on pridonosi boljem taloženju proteina koji uzrokuju zamućenje. Isto tako, hmelj uz alkohol i ugljikov dioksid služi kao konzervans, te pospešuje stabilnost pjene. (Veselov i Čukmasova, 1966)

Hmelj se prema udjelu alfa kiselina i eteričnih ulja može djeliti na hmeljeve za gorčinu koji se u sladovinu stavljaju na početku kuhanja zbog potrebne izomerizacije alfa kiselina, te na hmeljeve za aromu koji se dodaju krajem kuhanja, na kraju fermentacije ili tijekom odležavanja kako eterična ulja ne bi isparila. (Kosch i Allyn, 2011)

2.1.2. Voda

Gledajući ukupnu potrošnju vode u proizvodnji piva, ona je kvantitativno najviše zastupljena sirovina, no samo se dio koristi za direktnu proizvodnju piva jer se većina troši pri čišćenju i ispiranju pogona i ambalaže.

Ovisno o koncentraciji otopljenih minerala, voda se djeli na meke, srednje tvrde i tvrde vode. U pravilu se tvrde vode koriste za proizvodnju tamnih piva po čemu je poznata Engleska, dok se mekša voda koristi za proizvodnju svijetlih piva po čemu su poznate češka i njemačka. Po

navedenome se može vidjeti kako je u prošlosti tvrdoća vode određivala stilove piva koji se kuhaju, što danas nije slučaj zbog dostupnosti različitih metoda za pripremu vode. Voda za proizvodnju piva mora biti mikrobiološki i kemijski ispravna.

2.1.3. Slad

Pivo se uglavnom proizvodi od slada proizvedenog od ozime i ozimo-jare sorte dvorednog ječma (*Hordeum distichum*). Dvoredni ječam ima prednost zbog većih i debljih zrna, što rezultira većim udjelom škroba i manjim udjelom pljevice, što je važno za bolju iskoristivost u proizvodnji piva.

Škrob otprilike čini 63% od ukupne mase zrna i služi kao hrana zrnu za početak rasta, što ne bi bilo moguće bez enzima koji se nalaze u samom zrnu, točnije u aleuronskom sloju. Ti enzimi u početku cijepaju staničnu stijenu stanice škroba, a nakon toga škrob cijepaju na jednostavne šećere (većinom nastaje maltoza, ali ima i glukoze, maltotrioze te različitih oligosaharida). Upravo je ovo razlog slađenja ječma, kako bi se oslobodili enzimi (najvažniji α -amilaza i β -amilaza) koji će tokom ukomljavanja cijepati škrob na manje šećere koje kvasac može koristiti kao hranu, odnosno fermentirati i pritom proizvoditi alkohol i ugljični dioksid.

Slađenje ječma i drugih žitarica je složen proces, a neki od osnovnih postupaka pri slađenju su: Čišćenje i sortiranje, namakanje, klijanje, sušenje. Žitarice se čiste od stranih čestica i stvari koje mogu doći s polja, te se zrna sortiraju po veličini. Zrna se prije namakanja u većini slučajeva skladište, gdje se obavezno prozračuju, kako bi se „odmorila“ i bila spremna za klijanje. Nakon skladištenja zrna idu na proces namakanja gdje se prozračuju pomoću kisika, zatim kreće klijanje koje se mora zaustaviti grijanjem, odnosno sušenjem u pravo vrijeme, odnosno u vrijeme kada su se enzimi oslobodili, ali još nisu krenuli cijepati škrob na šećere koje zrno može koristiti kao hranu. Ovaj korak je bitan kako bi se sačuvalo što više šećera u zrnu, što rezultira boljom iskoristivosti slada prilikom proizvodnje piva. Tokom sušenja slada, visina temperature i vrijeme tokom kojeg je zrno izloženo uvelike utječu na slad, a tako i na pivo. Npr. bazni slad se suši na nižim temperaturama kako bi ostao svijete boje i neutralnog okusa, dok se tamni sladovi suše na visokim temperaturama tokom čega dolazi do proizvodnje Maillardovih produkata, što čini zrno tamnim i daje mu zagoreni okus i miris.

2.1.4. Kvasac

Kvasci su jednostanični mikroorganizmi, koji energiju za život mogu dobivati staničnim disanjem u prisutnosti kisika i vrenjem u nedostatku kisika. U proizvodnji piva kvasac

previre šećere sladovine u alkohol, ugljikov dioksid i nusprodukte alkoholnog vrenja. Odabrani sojevi ovog kvasca predstavljaju pivski kvasac koji se sistematski čuva i uzgaja kao čista kultura. (Kunze, 1998) Pivski kvasac se dijeli u dvije glavne skupine; *Saccharomyces cerevisiae*, odnosno kvasci gornjeg vrenja te *Saccharomyces uvarum*, odnosno kvasci donjeg vrenja. Oni se bitno razlikuju prema tome kako fermentiraju sladovinu pa prema tome razlikujemo dva osnovna tipa piva, ale (kvasci gornjeg vrenja) i lager (kvasci donjeg vrenja). Prema fiziološkim osobinama najvažnija razlika između kvasca gornjeg i kvasca donjeg vrenja je u sposobnosti fermentacije melibioze. Kvasac donjeg vrenja iskorištava rafinozu i melibiozu, dok kvasac donjeg vrenja iskorištava samo trećinu rafinoze. (Beluhan, 2013).

Odabir soja kvasca te temperature fermentacije uvelike utječu na karakteristike gotovog piva kao što su okus, aroma, bistrina, udio alkohola, prevrelost šećera, udio nusprodukata alkoholne fermentacije te brzina i trajanje alkoholne fermentacije.

2.2. PODJELA PIVA

Podjela piva na tipove i vrste nije proizvoljna već je definirana strogim pravilnicima o kvaliteti piva, a koji su proizašli iz pivarske prakse. (Marić, 2009)

2.2.1. Podjela piva prema vrsti kvasca

Diljem svijeta, pa tako i u Hrvatskoj, najviše se konzumira lager pivo ili pivo donjeg vrenja. Ova vrsta piva dobiva se fermentacijom pivske sladovine kvascom vrste *Saccharomyces uvarum*. Ovaj kvasac fermentira na niskim temperaturama (6°C – 13°C), dok se pred kraj fermentacije može podići temperatura do 18 °C kako bi se uklonio sav diacetil stvoren tokom fermentacije. Nakon fermentacije kvasac pada na dno fermentora, zbog čega se i naziva pivo donjeg vrenja. Lager pivo u pravilu odležava na hladnome minimalno 2-3 tjedna, od čega dolazi naziv „lager“, što bi se s Njemačkog jezika moglo prevesti kao skladištenje.

Najčešća asocijacija potrošača na lager je svijetlo pivo zlatne boje, s nešto nižim udjelom alkohola, umjerene do jake karbonizacije i blage gorčine, no lageri mogu biti i tamna piva s višim postotkom alkohola.

Drugi tip piva je ale pivo ili pivo gornjeg vrenja, u Njemačkoj poznat i kao Altbier. Ale pivo se proizvodi fermentacijom pivske sladovine kulturom pivskog kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Ova vrsta kvasca u pravilu fermentira na višim temperaturama od lager kvasca (15 °C – 25 °C).

Na proizvodnju ovakvih piva se većinom odlučuju male craft pivovare zbog kraćeg vremena odležavanja, ali i jednostavnijeg kontroliranja temperature fermentacije. Najpoznatiji podstilovi su Pale ale i Indian pale ale koje karakterizira jača gorčina i izražena aroma koja dolazi najčešće od američkih hmeljeva.

2.2.2. Podjela piva prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini

U proizvodnji piva se prema masenom udjelu suhe tvari, odnosno ekstrakta u sladovini može otprilike znati koliki će udio alkohola biti u gotovom proizvodu. Prema tome se piva mogu dijeliti na "Slaba piva" koja imaju mali udio alkohola (ispod 3,5%), "Standardna piva" koja su i najčešća, s udjelom ekstrakta od 10 – 12 %, a imaju udio alkohola od 3.5 - 5,5 vol %, "Specijalna piva" koja se prave od sladovine s više od 12% ekstrakta, a sadrže i više neprevrela ekstrakta, zbog čega se nazivaju i puna piva. "Dvostruko sladna piva" se proizvode od sladovine s 18-22 % ekstrakta i nazivaju se još i jakim pivima. Zadnja vrsta piva su " Ječmena vina" koja sadrže volumni udio alkohola kao i vina, ali sadrže i veliki dio neprevrelog ekstrakta zbog čega su i punog okusa, a udio alkohola iznosi od 7,5 – 10 vol%. (Marić, 2009)

2.2.3. Podjela piva prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine.



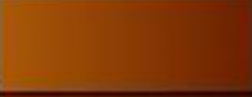
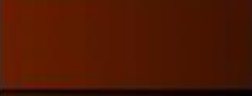
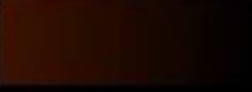
Ječmeni slad je u pravilu osnova za proizvodnju piva, bilo ono lager ili ale. U nekim državama dozvoljeno je ječmeni ili pšenični slad zamijeniti s nekim neslađenim sirovinama, ali se te sirovine moraju nalaziti na etiketi piva.

U zamjenu za ječmeni slad se najčešće koristi pšenični slad. Dodavanjem više od 50% pšeničnog slada u proizvodnju dobiva se pšenično pivo, koje se u njemačkoj zove Weissbier ili Weizenbier, a u Belgiji Witbier. Skoro sva pšenična piva proizvode se sa kvascima gornjeg vrenja, što znači da spadaju u ale piva. Karakteristika pšeničnog slada u gotovom pivo je punoća okusa i velika, čvrsta pjena za što je zaslužan veći dio proteina koji se nalazi u pšeničnom sladu, u odnosu na ječmeni slad. Isto tako, pšenična piva su kiseliya od piva napravljenih isključivo od ječmenog slada. U Europi se osim pšeničnog slada, često se koristi i raženi slad, dok se u Africi ječmeni slad mijenja sa prosenim sladom.

2.2.4. Podjela piva prema boji

U osnovi, piva mogu biti: svijetla, crvena, tamna i crna, ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene, crveno smeđe i crne boje (Beazly, 1994)

Boja piva se mjeri u EBC jedinicama (europska jedinica boje), a po pravilniku o pivu dijeli se na svijetlo (intenzitet boje do 15 EBC jedinica), crveno ili tamno (pivo s intenzitetom od 16 do 40 EBC jedinica) i crno pivo (pivo s više od 40 EBC jedinica). Boja piva dolazi od sladova koji se koriste u njihovoj proizvodnji, a svaki proizvođač slada navodi EBC jedinicu slada. Preko EBC jedinice i količine slada može se izračunati EBC jedinica gotovog piva. U Americi se kao jedinica boje koristi SRM (Standard Reference Method).

EBC	Lovibond CU	SRM	Engleski	Hrvatski	Boja	Pivski stil
4 - 8	2	2	yellow straw, pale	Žuta		Norddt. Pilsner, Helles Lager
8 - 12	5	3 - 6	golden, pale orange	Zlatna		Klassisches Pilsner
12 - 20	10	10	amber	Amber		Märzen, Festbier, Pale Ale
20 - 35	16	16	light brown copper	Bakrena		Klassisches Weizen, Dunkles Lager, Alt,
35 - 60	20 - 25	17	brown	Smeđa		Dunkler Bock, dunkl. Weizen
> 60	> 30	> 35	dark brown black	Tamno-smeđa		Stout, Schwarzbier, Porter

Slika 1. Boje piva prikazane kroz EBC, SRM i stil piva (Izvor: <http://aartedabebida.blogspot.com/2010/09/tabelas-de-cores.html>, 22.11.2021.)

2.2.5. Podjela piva prema volumnom udjelu alkohola

Danas se u svim europskim zemljama na etiketi piva mora naznačiti udjel alkohola u volumnim%. Prema udjelu alkohola u pivu određuje se i visina posebnog poreza na pivo, koji kod nas iznosi 0,8 kn/L bezalkoholnog i 2,0 kn/L standardnog (alkoholnog) piva (Marić, 2009)

3. PROIZVODNJA KISELIH PIVA

3.1 OPĆENITO O KISELOM PIVU

Kiselopivo se može dijeliti u puno podstilova te kao takvo nije ograničeno na jednu specifičnu definiciju temeljenu na proizvodnom procesu, sirovini ili zemljopisnom podrijetlu. Zajednička osobina kiselih piva je povećana koncentracija organskih kiselina, što uzrokuje smanjeni pH (3,0 – 3,9) u usporedbi sa “standardnim pivom“. To dovodi do povišenog intenziteta kiselog okusa. (Tonsmeire, 2014) Povišene razine organskih kiselina potječu od bakterija koje proizvode kiselinu u procesu fermentacije.

Dok je fermentacija standardnog piva obično ograničena na fermentaciju kvasca jednog soja, kiselopivo nastaje fermentacijom više mikroorganizama, uključujući i kvasce i bakterije.

Postoje različite tehnike za proizvodnju kiselog piva, uključujući spontanu fermentaciju, kontroliranu miješanu fermentaciju, kiselopukovanje i slično, gdje se različiti mikroorganizmi odvajaju u određenom vremenu.

Popularnost kiselih piva u Hrvatskoj je porasla u zadnjem desetljeću, što govori i podatak, prema aplikaciji “Untappd“, da je u tom razdoblju na tržište stavljeno više od 50 kiselih piva. Neka od tih piva rađena su tradicionalnim načinom, odnosno spontanom fermentacijom ili sekundarnom fermentacijom u drvenim bačvama, koje sadrže divlje kvasce i bakterije, dok je velika većina piva rađena u kontroliranim uvjetima sa selekcioniranim laktobacilima, na što se i stavlja fokus ovog rada.

3.2. LAKTOBACILI U PIVU

Laktobacili su gram-pozitivne štapičaste bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu kao glavni metabolički produkt. Njihov metabolizam klasificira se ili kao obvezni homofermentativni, što znači da skoro uvijek pretvaraju heksozu u mliječnu kiselinu, ili kao fakultativno heterofermentativni, pretvarajući heksozu u mliječnu kiselinu, kao i CO₂, etanol ili octenu kiselinu. (Spitaels i sur., 2015)

U pivu, laktobacili mogu biti glavni krivci za njegovo kvarenje, ali mogu biti i važna komponenta u fermentaciji, ovisno o stilu piva. U lager i ale pivu laktobacili se smatraju kvariteljima, jer te bakterije uzrokuju neželjeno zamućenje i taloženje, neugodne okuse, te stvaranje kiseline i trpkosti. U proizvodnji kiselih piva laktobacili su dobrodošli i mogu se smatrati nužnim za

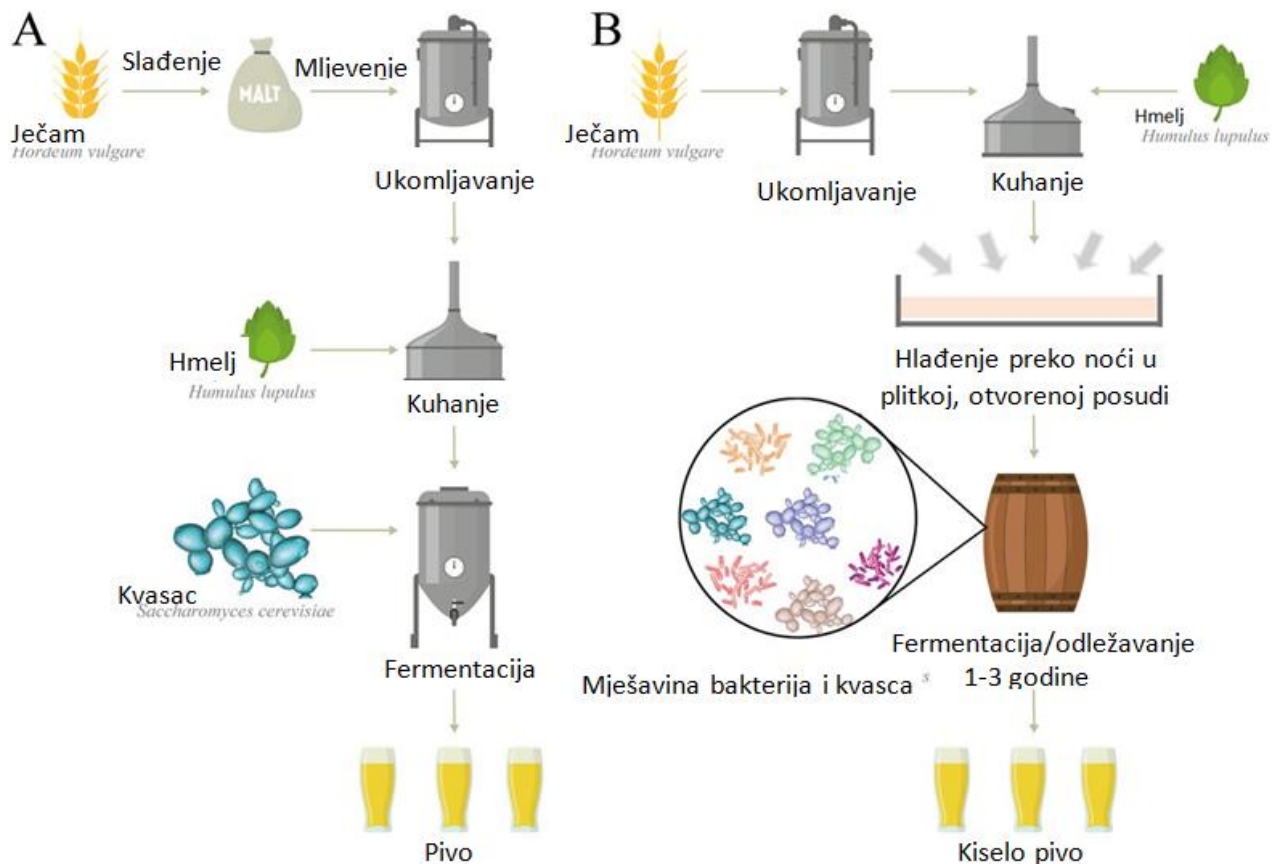
željene organoleptičke karakteristike..

Laktobacili su općenito tolerantni na etanol, međutim pokazuju velike varijacije u otpornosti, jer neki sojevi (npr. *Lactobacillus plantarum*) prestaju rasti u mediju koji sadržava 5% -6% etanola, dok drugi sojevi, kao što je *Lactobacillus brevis*, mogu rasti u medijima s puno većom koncentracijom alkohola.

3.3 TRADICIONALNA PROIZVODNJA KISELIH PIVA

Kisela piva proizvedena tradicionalnim načinom nazivaju se “Lambic“ i potječu iz Belgije. Lambic piva se proizvode spontanom fermentacijom u kojoj se ne provodi inokulacija mikrobnih kultura.

Kuhana sladovina se vruća prenosi u plitke, otvorene posude, poznate kao i rashladne posude te se potpuno otvorena ostavlja da se hladi. Pretpostavlja se da ova izloženost potpuno olakšava nacijepljivanje mikroorganizma iz okoliša prisutnih u zraku prostorije. (De Roos i sur., 2018) Inokulacija mikroba se može dogoditi i iz bačvi, u kojima se veliki broj mikroorganizama nalazi u fazi mirovanja u mikrošupljinama na površini drva. Kako bi se osiguralo da se hlađenje dogodi u razumnom vremenu i kao sredstvo za određenu razinu kontrole mikroba, tradicionalno se kuhanje lambica provodi samo tijekom zimskih mjeseci. (Verachtert i Debourg, 1995) Kad sladovina dosegne temperaturu od približno 20°C, prenosi se u drvene bačve za fermentaciju i dozrijevanje. Prema studijama provedenim klasičnim tehnikama ovisnim o kulturi, tijekom fermentacije u drvenim bačvama odvija se četverofazna mikrobna sukcesija. Prva faza se često naziva faza enterobakterije, jer one dominiraju. Bakterije octene kiseline i oksidativni kvasci također su prisutni u ovoj fazi, koja može trajati od tjedan dana do jednog mjeseca. Tijekom ove prve faze stvaraju se niske koncentracije etanola i organskih kiselina. (De Roos i sur., 2018) Slijedeća faza je glavna faza fermentacije, u kojoj *Saccharomyces spp.* dominiraju 3 do 4 mjeseca, nakon čega slijedi faza acidifikacije u kojoj dominiraju laktobacili i bakterije octene kiseline. Proizvodnja etanola i ugljičnog dioksida dominira glavnom fazom fermentacije, a organske kiseline kao što su mliječna kiselina i octena kiselina nastaju tijekom faze zakiseljavanja. (Verachtert i Debourg, 1995) Završna faza je faza sazrijevanja, u kojoj dominiraju divlji kvasac *Brettanomyces*, kao i *Lactobacillus*, *Pediococcus* i bakterije octene kiseline, obično od otprilike 8 mjeseci nadalje. (Van Oevelen i sur., 1977)



Slika 2, Usporedba sheme proizvodnje standardnog piva i tradicionalne proizvodnje kiselog piva (Izvor: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00566-20>, 1.12.2021)

Lambic može služiti kao baza za razne stilove piva. Geuze (poznato i kao ("Gueuze")) je jako gazirano pivo koje se proizvodi miješanjem mladog 1-godišnjeg i starijeg (2 godine ili više) lambica nakon fermentacije u bocama. Faro je stil piva koji se dobiva miješanjem lambica s kandis šećerom. Kriek je voćni lambic koji se dobiva miješanjem višnje sa mladim lambicom, što omogućuje sekundarnu fermentaciju uz voćne šećere. Maline se također mogu koristiti na isti način u lambic pivu, što rezultira proizvodom koji se naziva "Framboise".

3.4. RIZIK U TRADICIONALNOJ PROIZVODNJI KISELIH PIVA

Proizvodnja kiselog piva spontanom fermentacijom povezana je s nekoliko izazova. To uključuje nedosljednu kvalitetu proizvoda, gubitak zbog neuspjele fermentacije i potrošnju vremena. Studija Spitaelsa i sur. u kojoj su promatrali mikrobiotu i metabolite odležanog geuze piva, pokazala je nedosljednost u proizvodnji, budući da je različitost metabolita od boce do boce onemogućila generaliziranje učinaka odležavanja na pivo. (Spitaels i sur., 2015) Različitost

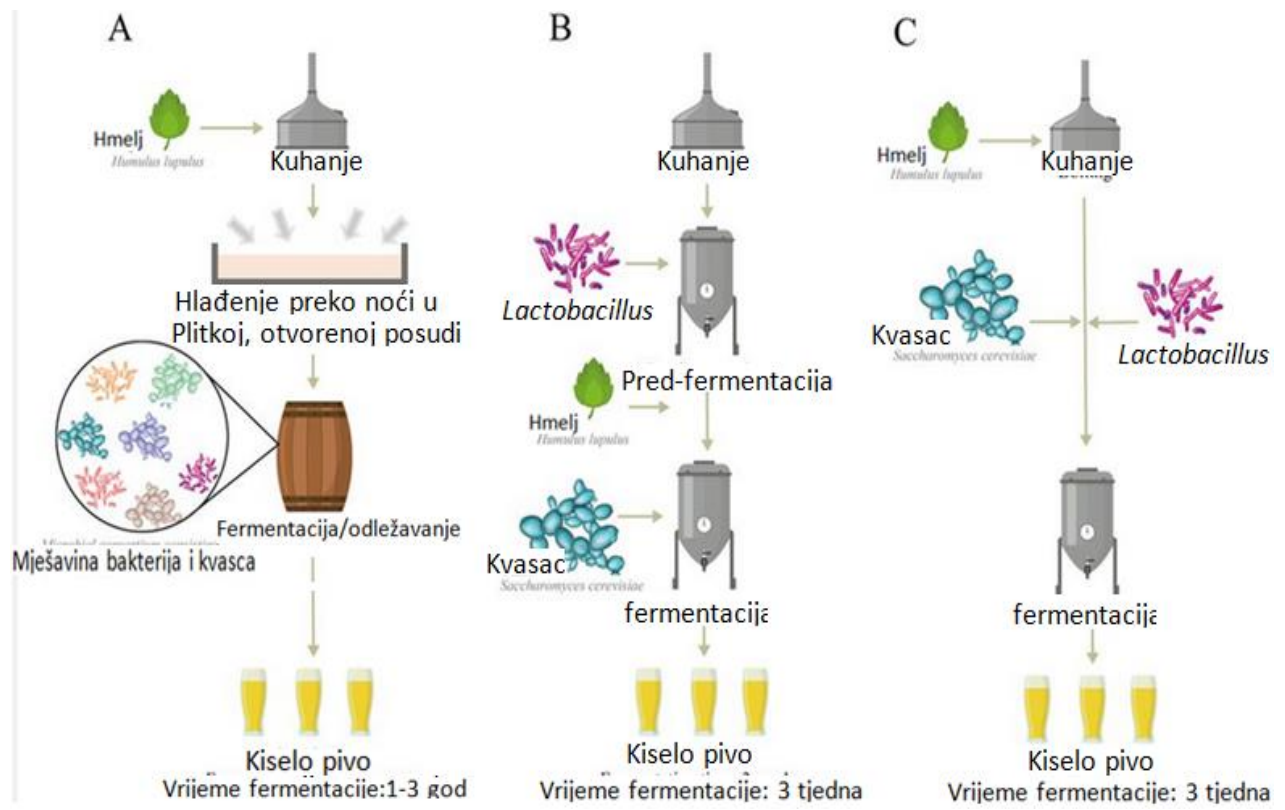
proizvoda koja nastaje u tradicionalnoj proizvodnji kiselih piva može se smatrati pozitivnom stavkom i često je cijenjeno od strane nekih potrošača, jer upravo to predstavlja znak autentičnosti i prirodne proizvodnje. Isto tako, nedosljednost piva može se smatrati negativnim, osobito ako se pivo mora odbaciti zbog organoleptičkih neuspjeha nakon godina fermentacije i sazrijevanja. Ideja korištenja čistih kultura u kontroliranim miješanim fermentacijama privlačna je ne samo zato što može ponuditi poboljšanu kontrolu procesa, konzistentnost proizvoda i potencijalno smanjiti vrijeme proizvodnje kiselih piva, već i zato što kontrolirana miješana fermentacija nudi veliki potencijal za stvaranje novih proizvoda. Mješovite fermentacije piva s čistim kulturama sve se više koriste u craft pivarskoj industriji jer primjena miješanih kultura i nekonvencionalnih mikrobnih sojeva u fermentaciji piva nudi velike mogućnosti za stvaranje specifičnih i ciljanih okusa i aroma. Osim toga, mogućnost nekonvencionalnih pivarskih mikroorganizama za iskorištavanje različitih ugljikohidrata omogućuje uključivanje modernih i novih sirovina u proizvodnju kiselih piva. (Dvysik i sur. 2020)

3.5. SUVREMENEMETODE PROIZVODNJE KISELIH PIVA

Proizvodnja kiselih piva u kontroliranim fermentacijama s čistim kulturama nipošto nije nova ideja. U kasnim sedamdesetima, studija o mikrobiologiji spontane fermentacije sladovine predložila je pitanje za buduća istraživanja: "Može li se lambic napraviti s čistim kulturama?" (Tonsmeire, 2014). U industriji su se pojavili eksperimenti i razvoj alternativnih metoda proizvodnje, a za komercijalnu proizvodnju provode se različiti načini spontane, poluspontane i čiste fermentacije. Primjer za to je metoda "Kettle sour", gdje se fermentacija *Lactobacillus* za proizvodnju kiseline provodi prije fermentacije uz pomoć kvasca.

Primjena početnog biološkog koraka zakiseljavanja sladovine još je jedna alternativna metoda proizvodnje kiselog piva. Biološko zakiseljavanje može se provesti u posudi za ukomljavanje, u kotlu za kuhanje ili nakon što je sladovina prebačena u posudu za fermentaciju. Cilj je provesti fermentaciju uz pomoć laktobacila u nehmeljenoj sladovini prije fermentacije uz pomoć kvasca unutar kratkog vremenskog okvira (24 – 48 h). Na taj se način mogu zaobići prepreke koje nameće alkoholna fermentacija (stvorenje etanol, nedostatak hranjivih tvari, nizak pH, itd.) i izo- α -kiseline iz hmelja na metabolizam laktobacila, dok je s druge strane sposobnost laktobacila da brzo proizvedu velike količine mliječne kiseline iskorištena. Kada se postigne željena razina

mliječne kiseline, sladovina se prokuha kako bi se zaustavila bakterijska fermentacija, nakon čega se sladovina hladi, te se na nju nacjepljuje selekcionirani kvasac. Još jedna suvremena tehnika je i miješana fermentacija, odnosno fermentacija u kojoj zajedno fermentiraju selekcionirani laktobacili i kvasci.



Slika 3, Usporedba proizvodnje kiselog piva na tradicionalni način, kettle sour način i način miješane fermentacije (Izvor: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00566-20>, 1.12.2021.)

4. STILOVI KISELIH PIVA

4.1. BERLINER WEISSE

Ovaj stil se opisuje kao vrlo blijedo, oscjeđavajuće, niskoalkoholno njemačko pšenično pivo s kiselošću u okusu dobivenom od mliječne kiseline. Ovo pivo karakterizira visoka razina karbonizacije, lagani okus slada s kiselošću koja se ne čini umjetnom.

U proizvodnji se u pravilu koristi 50% pšeničnog slada i 50% pilsnerskog slada. Za fermentaciju se odabire Ale kvasac i laktobacili koji služe za zakiseljavanje piva. Hmelj se dodaje u izrazito malim količinama, te gorčina ne dolazi do izražaja.

Kao neki komercijalni primjerci mogli bi se navesti; Berliner Kindl Weisse, Nodding Head Berliner Weisse i The Bruery Hottenroth.

4.2. FLANDERS RED ALE

Flanders red ale je kiselo, voćno pivo belgijskog podrijetla, koje može okusom biti slično kao crveno vino. Pivo je bistro, crvenkaste do smeđe boje s jakom aromom voća i slada. Kod okusa su većinom u prvom planu šljive, naranče, višnje ribiz ili slična voća koja se dodaju u pivo. Često su u okusu i aromi prisutni i čokolada ili vanilija.

U proizvodnji se uz bazni slad koristi do 20% tostiranih sladova, koji naglašavaju sladnost piva, dodaje se hmelj s niskim udjelom alfa kiselina kako bi se izbjegla jaka hmeljna aroma i gorčina. U fermentaciji su uz laktobacile često prisutni divlji kvasci koji donose specifične arome i okuse pivu. Udio alkohola iznosi od 4.6% do 6.5%.

Kao komercijalni primjeri mogu se navesti; Cuvee des Jacobins Rouge, Duchesse de Bourgogne i Rodenbach Klassiek.

4.3. OUD BRUIN

Sladno, voćno pivo koje odležava u drvenim bačvama, a kao i flanders red ale može biti crvenkaste do smeđe boje, te je bistro sa čvrstom pjenom.

U aromi se osjeća kombinacija voćnih estera i bogatog sladnog karaktera. U mladom pivu kiselost je slabo izražena no kako pivo stari ona sve više dolazi do izražaja. U okusu piva bi se

trebala osjetiti kompleksna kombinacija slada i voća (voće kao sušene šljive, smokve i sl.), s karamelom u pozadini koja dolazi od visokog udjela karamelnih sladova.

Veliki udio tamnih karamelnih sladova, pa čak i prženih sladova doprinose kompleksnosti ovog piva. Tradicionalno se koriste hmeljevi s niskim udjelom alfa kiselina. U fermentaciji se većinom koriste kvasci gornjeg vrenja, u kombinaciji s laktobacilusom, a ponekad i octenokiselinskom bakterijom. Udio alkohola može varirati od 4% do 8%.

Kao komercijalni primjerci mogu se navesti; Petrus Oud Bruin, Ichtegem Oud Bruin i Liefmans Goudenband.

4.4. LAMBIC

Kiselost, pšenično belgijsko pivo, nastalo divljom fermentacijom. Boja može varirati od svijetlo žute do zlatne, a bistrina piva je izraženija u pivu koje duže odležava.

Kiselost je jako izražena već u aromi, mogu se osjetiti i arome koje se opisuju kao miris konjske štale, za što su zaslužni divlji kvasci koji sudjeluju u fermentaciji. U okusu se često mogu osjetiti arome jabuke i meda, kao i nekih citrusa.

Za proizvodnju lambica se koristi do 40% neslađene pšenice u kombinaciji s pilsnerskim sladom. Hmelj koji se dodaje u pivo većinom je stariji od 3 godine i koristi se primarno kao konzervans, a ne za gorčinu i aromu. Za fermentaciju se ne dodaju selekcionirani mikroorganizmi, već se pivo ostavlja na otvorenom kako bi u njemu završili mikroorganizmi iz zraka. Udio alkohola iznosi od 5% do 6.5%.

Kao najpoznatiji primjer Lambica može se navesti Cantillion Grand Cru Bruocsella.

4.5. GUEUZE

Kompleksno, ugodno kiselost, ali uravnoteženo belgijsko pšenično pivo koje je jako gazirano i vrlo osvježavajuće. Karakter spontane fermentacije može pružiti vrlo zanimljivu kompleksnost, sa prisutnom aromom štale (kao kod lambica), koja se miješa s citrusno-voćnim okusima i kiselosti. Kao kod lambica, koristi se do 40% neslađene pšenice i stari hmelj, a fermentacija je isto tako "divlja". Razlika je u tome da je gueuze kompleksniji i gaziraniji od lambica, a divlja

fermentacija uzrokuje veću i izraženiju kompleksnost arome i okusa. Udio alkohola varira od 5% do 8%.

Neki od najpoznatijih komercijalnih primjera su; Drie Fonteijn Oud Gueuze, Cantillon Gueuze i Boon Oude Gueuze.

4.6. BRETT PIVO

Mlada piva fermentirana kvascima iz roda *Brettanomyces* imaju više voćnih nota (npr. tropsko voće, koštuničavo voće ili citrusi), ali to je ovisno o soju korištenog kvasca. Za Brett piva koja su jako hmeljena američkim sortama hmelja, okuse dobivene fermentacijom često je teško osjetiti zbog prisutnih aroma hmelja. Starija Brett piva mogu početi razvijati malo "funk" arome na mokro sijeno ili blago zemljane ili zadimljene note, ali takav karakter ne bi trebao dominirati. Ako se pivo fermentira sa standardnim pivskim kvascem uz *Brettanomyces*, u gotovom pivu se može osjetiti i dio karaktera primarnog kvasca. Slaba kiselost je prihvatljiva, ali ne bi trebala biti izražena.

Kvasci iz roda *Brettanomyces* se mogu dodavati u svako pivo u sekundarnu fermentaciju. Za razliku od ostalih pivskih kvasca oni mogu fermentirati sve jednostavne šećere, zbog čega je gotovo pivo jako suho.

Od komercijalnih primjera mogu se istaknuti Hill Farmstead Arthur i Russian River Sanctification.

4.7. DIVLJE SPECIJALNO PIVO

Kisela verzija voćnog, biljnog ili začinskog piva, odležanog u drvenoj bačvi. Boja piva ovisi o dodanom voću, bilju ili začinima.

Kao i boja, arome i okus ovise od dodacima u pivu, no mogu biti dominantni voćni esteri i karakteristike tipične za divlju fermentaciju.

Kao komercijalni primjeri mogu se navesti Cascade Bourbonic Plague i New Belgium Eric's ale.

4.8. KISELO PIVO MIJEŠANE FERMENTACIJE

Pivo je karakterizirano blagom kiselinom i aromama po konjskoj staji i sjenu, koje dolaze od divlje fermentacije. Aroma mora biti blaga i ugodna, a ne napadna i neugodna, što je često slučaj

kod divljih fermentacija. Okus ovisi o bazi piva, što znači da može biti izrazito zahmeljeno, voćno ili pak pivo slabog tijela i neutralno, gdje u prvi plan dolaze arome i okusi divlje fermentacije.

Većinom se za zakisljavanje koriste bakterije iz roda *Laktobacillus* u kombinaciji s bakterijama iz roda *Pediococcus*, dok se za alkoholno vrenje koristi pivski kvasac specifičan za bazno pivo, često u kombinaciji s *Brettanomyces* kvascem.

5. EKSPERIMENTALNI DIO

5.1. MATERIJALI RADA

5.1.1. Oprema za kućnu proizvodnju piva

Piva berliner weisse kuhana su na sistemu Grainfather G30, koji se sastoji od inox posude volumena 30 L, perforiranog inox lažnog dna s bubnjem, temperaturne sonde, protusmjernog izmjenjivača topline te pumpe i električnog grijača kontroliranih preko Grainfather kontrolera. Maksimalna količina slada koja se može upotrijebiti je 9 kg. Kontroler koji se stavlja na posudu omogućuje lako praćenje procesa zbog vidljive temperature, lakog podešavanja temperature i mogućnosti postavljanja pojedinih faza proizvodnog procesa, odnosno automatskog podizanja temperature, kako je upisano u recepturi. Pumpa spojena na sustav omogućuje recirkulaciju sladovine kroz slad tokom ukomljavanja, što rezultira boljim ošecerenjem i čistom sladovinom. Osim u fazi ukomljavanja, pumpa se koristi i tokom hlađenja jer se može direktno spajati na protusmjerni izmjenjivač topline. Zbog dobre i lagane kontrole temperature, nakon kuhanja i hlađenja na prikladnu temperaturu, Grainfather se koristio za fermentaciju Laktobacilima. Nakon zadovoljavajuće pH vrijednosti sladovine fermentacija Laktobacilima se zaustavlja ponovnim kuhanjem. Piva su fermentirana u konusnim FermZilla starter kit fermentorima volumena 27 L, koji su napravljeni od visokokvalitetnog PET-a, sa mogućnosti tlačne fermentacije (2,3 Bar). Za kontrolu temperature fermentacije koristila se komora za fermentaciju napravljena od kuhinjskog hladnjaka i termostata.



Slika 4. Grainfather sistem za kućno pivarstvo (Izvor: Autor)

5.1.2. Sirovine za proizvodnju piva Berliner Weisse

Tablica 1. Usipak korišten za proizvodnju Berliner Weisse-a

Proizvođač slada	Slad	Količina (kg)	Postotak slada (%)
Bestmaltz	Heidelberg	2	47,8
Bestmaltz	Pšenični slad	2	47,8
Bioritz	Rižine ljuske	0,18	4,3

Tablica 2. Hmelj korišten za proizvodnju Berliner Weisse-a

Vrsta Hmelja	Količina (g)
Magnum	5

Tablica 3. Bakterije korištene za kiseljenje Berliner Weisse-a

Proizvođač	Naziv proizvoda	Naziv bakterije	Količina (g)
Lallamand	Sour Pitch	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,5
Lallamand	Helveticus Pitch	<i>Lactobacillus Helveticus</i>	2,5

Sour Pitch klasicifiran je kao *Lactobacillus plantarum*, fakultativno hetero – fermentativni soj. Lallamand za ovaj proizvod navodi da ističe čisti i balansirani citrusni profil koji je tipičan za tradicionalna i moderna kisela piva. Isto tako, tvrde da je sposoban spustiti pH na željenu vrijednost kroz 24 do 36 h.- Udjel proizvedene mliječne kiseline bi trebao biti veći u odnosu na udjel proizvedene octene kiseline, dok se aroma opisuje kao citrusna i oštra, s notama voća. Idealna temperatura za fermentaciju je između 30 i 40 °C.

Helveticus Pitch klasificiran je kao *Lactobacillus helveticus*, koji je kao i *Lactobacillus plantarum* hetero – fermentativan soj. Proizvođač tvrdi da ovaj soj bakterija stvara balansirani

profil sa jače izraženim citrusnim notama u odnosu na *Lactobacillus plantarum*. Idealna temperatura za fermentaciju je između 38 i 45 °C, a pad pH vrijednosti na željenu vrijednost u pravilu traje 24 do 36 h.

Tablica 4. Kvasac korišten u proizvodnji Berliner Weisse-a

Proizvođač	Kvasac	Količina (g)
AEB	AY4	15

5.1.3 Mjerni instrumenti i kemikalije korištene u proizvodnji piva.

Mjerni instrumenti:

- Hanna pH metar za pivo, za određivanje pH vrijednosti sladovine.
- Hanna digitalni refraktometar za mjerenje analize šećera u sladovini i pivu.
- AE ADAM Nimbus analitička vaga, korištena za precizno vaganje kvasca i bakterija prije naciepljivanja.

Kemikalije:

- Jod (I₂)
- Mliječna kiselina 80% (C₃H₆O₃)

5.1.4. Mjerni instrumenti za provođenje fizikalnih analiza

Mjerni instrumenti:

- Hanna pH metar za pivo, za određivanje pH vrijednosti piva.
- Anton Paar analizator Alex 500, za mjerenje alkohola i ekstrakta u pivu.
- Mikroskop, za brojanje kvasca u pivu.

5.1.5. Panel skupina i metode korištene za senzorsku analizu

Panel skupina za senzorsku analizu broji četiri člana, od kojih svi imaju višegodišnje iskustvo u radu u pivovari, te na profesionalnoj razini svakodnevno sudjeluju u senzorskoj analizi i kontroli kvalitete piva.

U senzorskoj analizi kao prva metoda koristio se triangle test (test u trokutu), kojim se utvrđuje da li ima razlike između analiziranih uzoraka, nakon kojeg se koristila metoda profila okusa, kojom se specifično odredila senzorska razlika u oba piva.

5.2. METODE RADA

5.2.1. Proizvodnja piva pomoću Grainfather sistema

U prvom koraku proizvodnje piva potrebno je napraviti recept, odnosno upoznati stil piva koje se kuha, odabrati vrstu i količinu sirovina (slad, neslađene žitarice, hmelj, kvasac, voda i ostale sirovine koje se mogu dodavati kao što su soli i minerali za vodu, bakterije i sl.), te temperature ukomljavanja i fermentacije. Nakon napravljenog recepta potrebno je odvagnuti slad i samljeti ga. U Grainfather posudu dodaje se 14 litara vode, nakon čega se pomoću kontrolnog panela namješta temperatura na 50°C. Nakon što se voda zagrije na željenu temperaturu u nju se polagano uz miješanje dodaje slad. Na 50°C dolazi do visoke aktivnosti enzima proteaza uslijed čijeg djelovanja dolazi do kidanja dugih lanca proteina na kratkolančane peptide i aminokiseline, što pridonosi zdravoj fermentaciji i boljoj bistrini samog piva, no može dovesti i do gubitka "tijela"* i smanjenja postojanosti pjene, što u ovom stilu piva nije ključno. Posuda se poklopi, te se upali pumpa za recirkulaciju kako bi se djelovanje enzima pospješilo. Dok se temperatura zadržava na 50°C u kotao za toplu vodu dodaje se voda i grije na 78°C. Važan korak tokom ukomljavanja je podešavanje pH vrijednosti na optimalnu. Uzima se uzorak komine te se pomoću pH metra mjeri pH vrijednost, koja je na početku ukomljavanja iznosila 5,9. Zbog visoke pH vrijednosti koja negativno utječe na aktivnost enzima, te koja potiče otapanje polifenola iz slada u pivu što daje astringenost finalnom proizvodu, dodano je 11 mL 80%-tne prehrambene mliječne kiseline, nakon čega je pH vrijednost pala na 5,5. Nakon prve faze ukomljavanja, odnosno zadržavanja komine 30 minuta na 50°C, pomoću kontrolnog panela pali se grijač i temperatura se diže na 64°C. U ovoj fazi ukomljavanja počinju djelovati enzimi amilaze, koji cjepaju duge lance škroba na jednostavnije i fermentabilne šećere, od kojih je najviše zastupljena maltoza.

Nakon druge faze ukomljavanja, odnosno zadržavanja komine 1 sat na 64°C temperatura se diže na 72°C kako bi došlo do potpunog ošecerenja, te se komina ostavlja na ovoj temperaturi pola sata. Nakon pola sata gotova je i treća faza ukomljavanja, no potrebno je napraviti jodnu probu* kako bi bili sigurni da u sladovini nema zaostalog škroba. Ako je jodna proba negativna, kreće se na cijedenje sladovine. Grainfather sustav u grijanoj posudi ima cilindričnu posudu sa lažnim dnom, koja se lagano podiže iz grijane posude i stavlja se na držače iznad nje, čime počinje proces cijedenja. Nakon što se prvijenac ocijedi, na slad se postepeno dodaje prethodno zagrijana voda u posudi za vodu. Voda se tijekom cijelog procesa ukomljavanja dodavala dok gustoća sladovine nije podešena na 9,5°P. Nakon što je cijedenje gotovo pali se grijač kako bi sladovina prokuhala. Prema uputama proizvođača kultura za zakiseljavanje, sladovina je prokuhana 15 minuta kako bi se osigurala sterilnost sladovine, a pH vrijednost je dodatkom 2,5 mL 80% -tne mliječne kiseline spuštenu na 4,45, što sprječava aktivnost nekih drugih mikroorganizama, a daje idealne uvjete za fermentaciju bakterijama korištenim za ova piva. Nakon prokuhavanja sladovine i namještanja pH vrijednosti, sladovina korištena za *Lactobacillus plantarum* hladila se pomoću sterilnog protustrujnog izmjenjivača topline na 37°C (proizvođač preporučuje od 30 – 40°C), dok se sladovina korištena za *Lactobacillus helveticus* hladila do 44°C (proizvođač preporučuje od 38 – 45°C). 2,5 g svake kulture je dodano u sladovinu u Grainfather na kojem je ostavljena upaljena pumpa, te je grijač preko kotrolnog panela podešen na potrebne i prije navedene temperature. Mjerenje pH vrijednosti sladovine počelo je 12 sati nakon naciepljivanja bakterija, a fermentacija obje sladovine je zakuhanjem prisilno zaustavljena pri pH vrijednosti od 3,4. Na početku kuhanja je dodano 5 g hmelja magnum za minimalnu gorčinu i prevenciju infekcije, dok se za aromu nisu dodavali hmeljevi. Nakon kuhanja od 1 h izmjerena je gustoća koja je u sladovini s *L. helveticus* iznosila 10,2 °P, a u sladovini s *L. plantarum* 10,3 °P. Sladovine su se hladile pomoću protusmjernog izmjenjivača topline na 19°C, prebačene su u fermentore i aerirane sa čistim kisikom, nakon čega je u svaki fermentor ubačeno 15 g suhog kvasca AY4. Fermentori su stavljeni u komoru za fermentaciju u kojoj je hlađenje namješteno na 19°C kako bi se osigurala optimalna temperatura za fermentaciju. Tokom fermentacije, svakodnevno je mjerena gustoća i pH, a završetkom fermentacije temperatura u komori spuštenu je na 1°C kako bi se pospješilo taloženje kvasca koji je nakon toga izdvojen iz piva kako ne bi došlo do autolize.

Pivo se ostavlja na taloženju pod malim pritiskom (0,2 – 0,5 Bar), tokom kojeg se svakodnevno

uzima mali uzorak koji se stavlja pod mikroskop kako bi se izbrojali kvasci. Kad broj kvasca u pivu bude blizu nuli, pivo se pretače u keg, gdje se i gazira dodavanjem CO₂. Kad je pivo gazirano, spremno je za konzumaciju.

Tijelo* piva se odnosi na punoću okusa. Ako pivo ima jače tijelo, u pravilu ima više zaostalih šećera i proteina koji doprinose punoći okusa, u odnosu na pivo koje ima slabije tijelo. Za pivo s jačim tijelom kaže se da je punije, dok se za pivo sa slabijim tijelom kaže da je suho.

Jodna proba* je tehnika kojom se kontrolira konverzija škroba, a provodi se na način da se mala količina komine razlije na bijelu površinu (npr. tanjurić), te se na nju doda nekoliko kapi joda (lugolove otopine). Ukoliko komina promjeni boju u tamno plavu, proba je pozitivna i dokazuje prisutstvo škroba u komini. Ako nema promjene boje, proba je negativna i potvrđuje konverziju škroba do koje je došlo tokom ukomljavanja i djelovanja enzima amilaze.

5.2.2. Fizikalno-kemijske analize

U pivovari pri razvoju novih proizvoda, kao i u proizvodnji važno je pratiti fizikalno – kemijske parametre koji utječu na kvalitetu i ujednačenost samog piva. Kako bi analize bile valjane i točne, odrađuju se u laboratoriju na umjerenim uređajima.

5.2.2.1. Mjerenje pH vrijednosti

Prije mjerenja, uzorak se mora degazirati i zagrijati na 20°C, nakon čega se pH metar pali te se sonda uranja u uzorak, pH-vrijednost se očitava nakon stabilizacije pH-metra. Kako bi osigurali točnost mjerenja, pH-metar se mora često kalibrirati prema uputstvima.

5.2.2.2. Mjerenje šećera u sladovini

Destilirana voda zagrijana na sobnu temperaturu se nanosi na prethodno očišćenu leću, te se tipkom „calibrate“ refraktometar kalibrira. Leća se osuši te se na nju nanosi ohlađeni uzorak sladovine, a tipkom „read“ očitava se vrijednost otopljenog šećera. Za točan rezultat rade se tri mjerenja i uzima se srednja vrijednost.

5.2.2.3. Mjerenje alkohola i gustoće piva

Za ovu metodu koristi se analizator koji je prije uporabe potrebno isprati destiliranom vodom. Uzorak je potrebno zagrijati na 20°C, deaerirati i po potrebi filtrirati pomoću lijevka, filter papira i dijatomejske zemlje. Za mjerenje je potrebno otprilike 150 mL uzorka u kojeg se uranja cijev s malim filterom preko koje uređaj uzima uzorak. Prije mjerenja potrebno je napraviti probu s vodom, odnosno water check, te ako uređaj pokazuje da je sve u redu, u opcijama se odabire da se mjeri pivo, a pritiskom na tipku za start pokreće se proces mjerenja. Preporuča se raditi dva mjerenja, kako bi se dobili što točniji rezultati.

5.2.3 Senzorske analize

5.2.3.1. Triangle test

Ispitivačima se prezentiraju tri kodirana uzorka, kaže im se da su dva ista, a jedan različit. Uzorci se probavaju s lijeva na desno i potrebno je zaokružiti različiti uzorak. Točni odgovori se zbrajaju te se donosi statistički valjani zaključak.

5.2.3.2. Metoda profila okusa

Ona uključuje analize arome i okusa proizvoda, njihov intenzitet, redosljed javljanja i naknadni okus. Panelisti zasebno ocjenjuju jedan uzorak obzirom na aromu i okus, pišu bilješke o intenzitetu, redosljedu javljanja, naknadnom okusu i zatim ocjenjuju drugi uzorak. Rezultati se daju voditelju panel grupe koji zatim vodi diskusiju s panelistima da se postigne zajednički profil za svaki uzorak.

Metoda profila okusa

AROMA/OKUS	Intenzitet (1-5)	
	Sour pitch	Helveticus pitch
Crvena jabuka		
Tropsko voće		
Citrusno voće		
Zelena jabuka		
Kiselost		

Komentar (Sour pitch):

Komentar (Helveticus pitch):

Senzoričar:

Datum:

Slika 5., Obrazac za metodu profila okusa (Izvor: Autor)

6.REZULTATI

6.1. DNEVNICI KUHANJA

Tablica 5. Dnevnik kuhanja piva s *Lactobacillus helveticus*

Proces	Početna temperatura (°C)	Završna temperatura (°C)	TRAJANJE (min)
Mješanje vode i slada	50	45	10
Grijanje	45	50	5
Djelovanje enzima proteinaze	50	50	30
Grijanje	50	64	10
Djelovanje β -amilaze	64	64	60
Grijanje	64	72	10
Djelovanje α -amilaze	72	72	30
Grijanje	72	78	5
Denaturacija enzima	78	78	5
Grijanje	78	100	15
Prokuhavanje sladovine	100	100	15
Hlađenje sladovine	100	44	25
Nacjepljivanje <i>L. helveticus</i> i njegova fermentacija	44	43	1020 (17 H)
Grijanje	43	100	25
Kuhanje sladovine	100	100	60
Hlađenje sladovine i pretok u fermentor	100	19	40

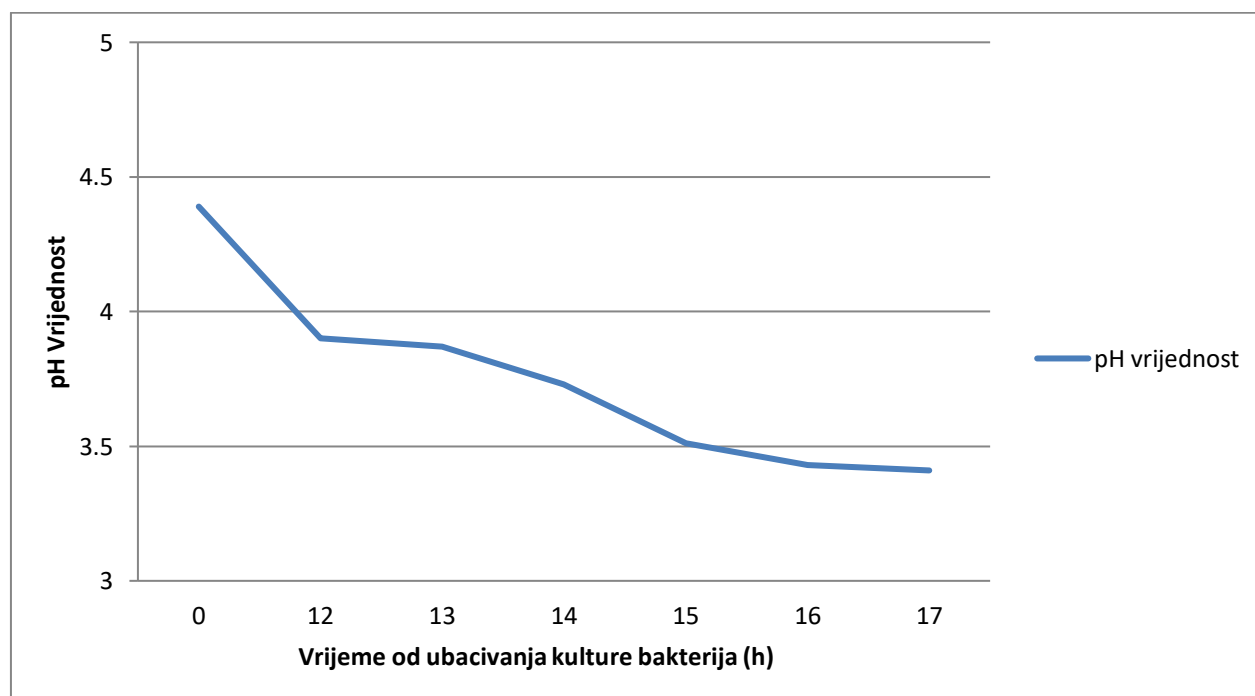
Tablica 6. Dnevnik kuhanja piva s *Lactobacillus plantarum*

Proces	Početna temperatura (°C)	Završna temperatura (°C)	TRAJANJE (min)
Mješanje vode i slada	50	45	10
Grijanje	45	50	5
Djelovanje enzima proteinaze	50	50	30
Grijanje	50	64	10
Djelovanje β -amilaze	64	64	60
Grijanje	64	72	10
Djelovanje α -amilaze	72	72	30
Grijanje	72	78	5
Denaturacija enzima	78	78	5
Grijanje	78	100	15
Prokuhavanje sladovine	100	100	15
Hlađenje sladovine	100	37	30
Nacjepljivanje <i>L.</i> <i>plantarum</i> i njegova fermentacija	37	35	900 (15 H)
Grijanje	35	100	30
Kuhanje sladovine	100	100	60
Hlađenje sladovine i pretok u fermentor	100	19	40

6.2. REZULTATI BAKTERIJSKE FERMENTACIJE

Tablica 7. Rezultati mjerenja pH tokom fermentacije *L. helveticus*

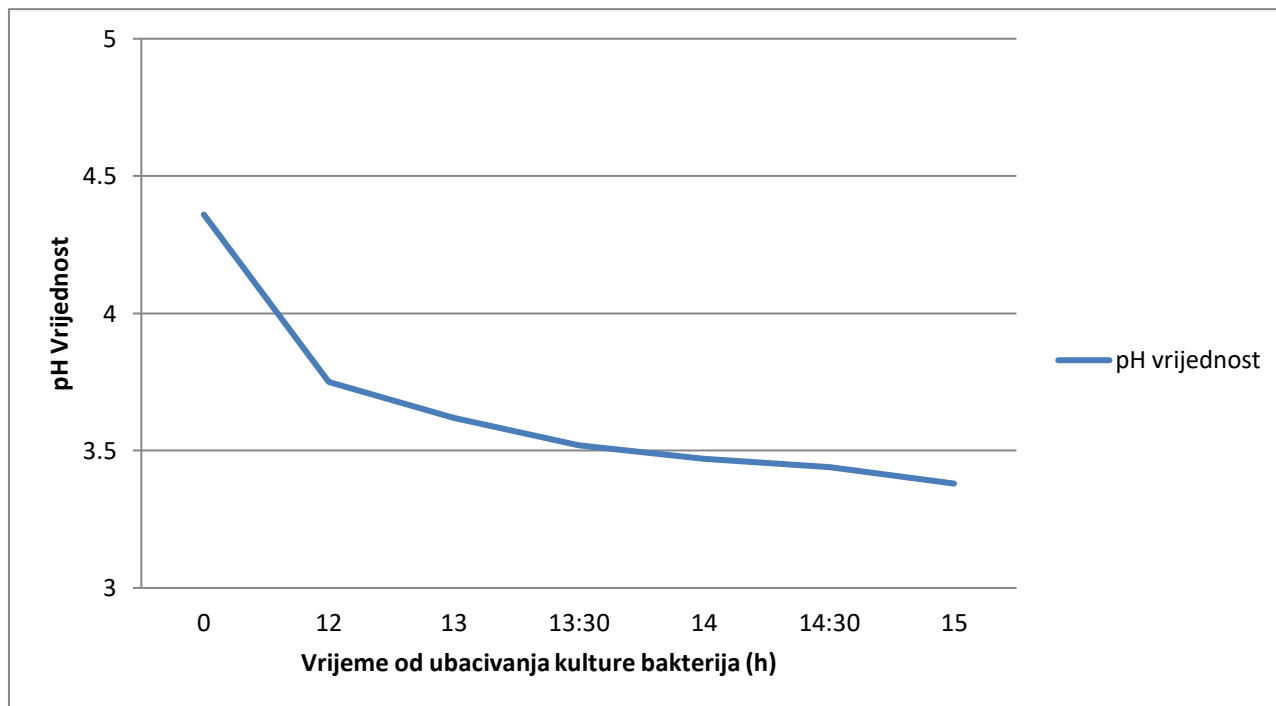
Vrijeme od dodavanja bakterija (h)	pH vrijednost	Temperatura (°C)
0	4,39	44
12	3,9	43,8
13	3,87	43,6
14	3,73	43,5
15	3,51	43,5
16	3,43	43,2
17	3,41	43



Dijagram 1. Promjena pH vrijednosti sladovine uslijed fermentacije *L. helveticus*

Tablica 8. Rezultati mjerenja pH tokom fermentacije *L. plantarum*

Vrijeme (h)	pH vrijednost	Temperatura (°C)
0	4,36	37
12	3,75	36,2
13	3,62	36
13:30	3,52	35,7
14	3,47	35,5
14:30	3,44	35,2
15	3,38	34,9



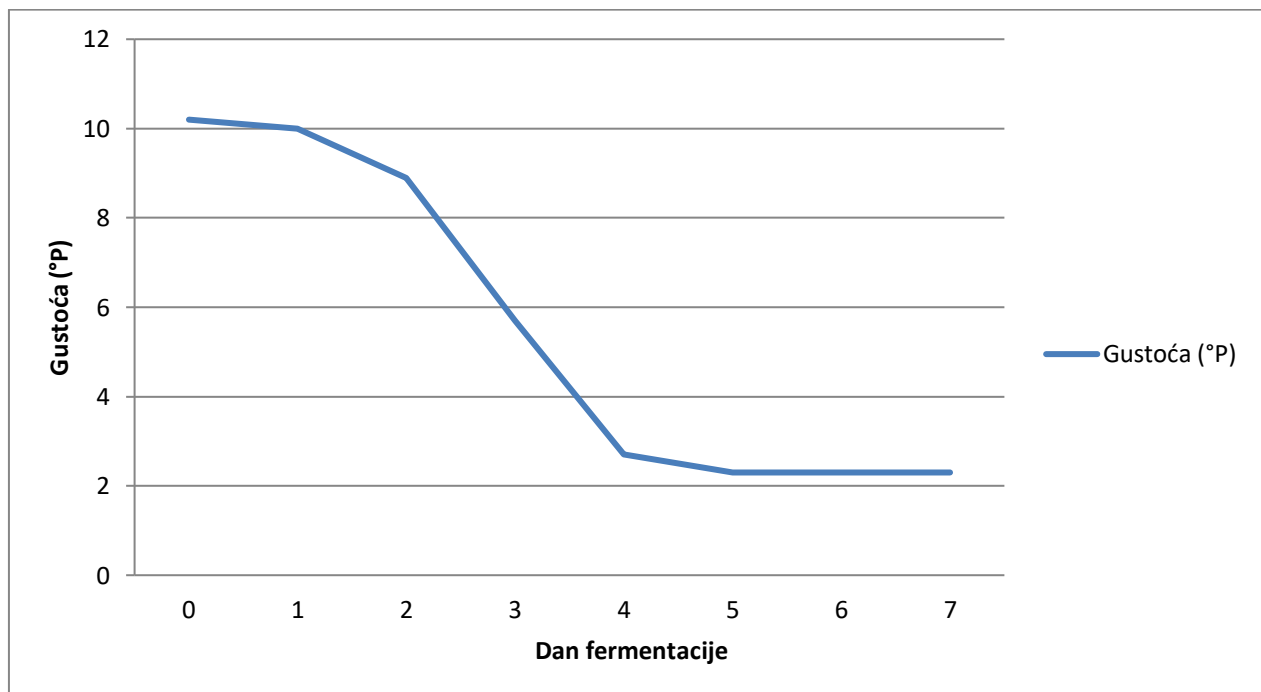
Dijagram 2. Promjena pH vrijednosti sladovine uslijed fermentacije *L. plantarum*

6.3. REZULTATI ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Tablica 9. Dnevnik fermentacije piva kiseljenog s *L. helveticus*

Dan	Temperatura (°C)	Gustoća (°P)	pH
0	18,7	10,2	3,39
1	19	10	3,33
2	18,7	8,9	3,33
3	18,8	5,7	3,25
4	19,1	2,7	3,23
5	18,9	2,3	3,27
6	19	2,3	3,3
7	18.6	2,3	3,33

Prema mjerenju pomoću analizatora, udio volumnog alkohola u pivu iznosi 4,19%.

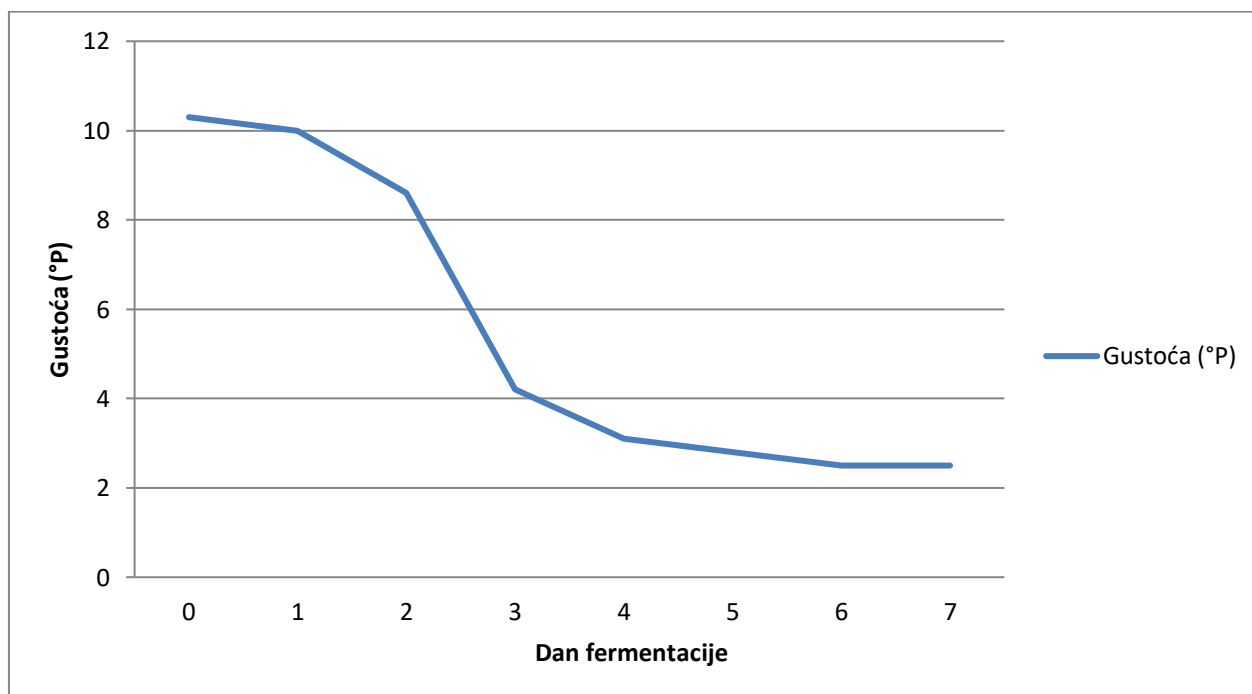


Dijagram 3. Promjena gustoće tijekom alkoholne fermentacije piva kiseljenog s *L. helveticus*

Tablica 10. Dnevnik fermentacije piva kiseljenog s *L. plantarum*

Dan	Temperatura (°C)	Gustoća (°P)	pH
0	19,4	10,3	3,36
1	19	10	3,32
2	18,8	8,6	3,28
3	18,9	4,2	3,21
4	19,3	3,1	3,20
5	19,1	2,8	3,22
6	18,6	2,5	3,25
7	18	2,5	3,31

Prema mjerenju pomoću analizatora, udio volumnog alkohola u pivu iznosi 4,14%.



Dijagram 4. Promjena gustoće tijekom alkoholne fermentacije piva kiseljenog s *L. helveticus*

6.3. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE

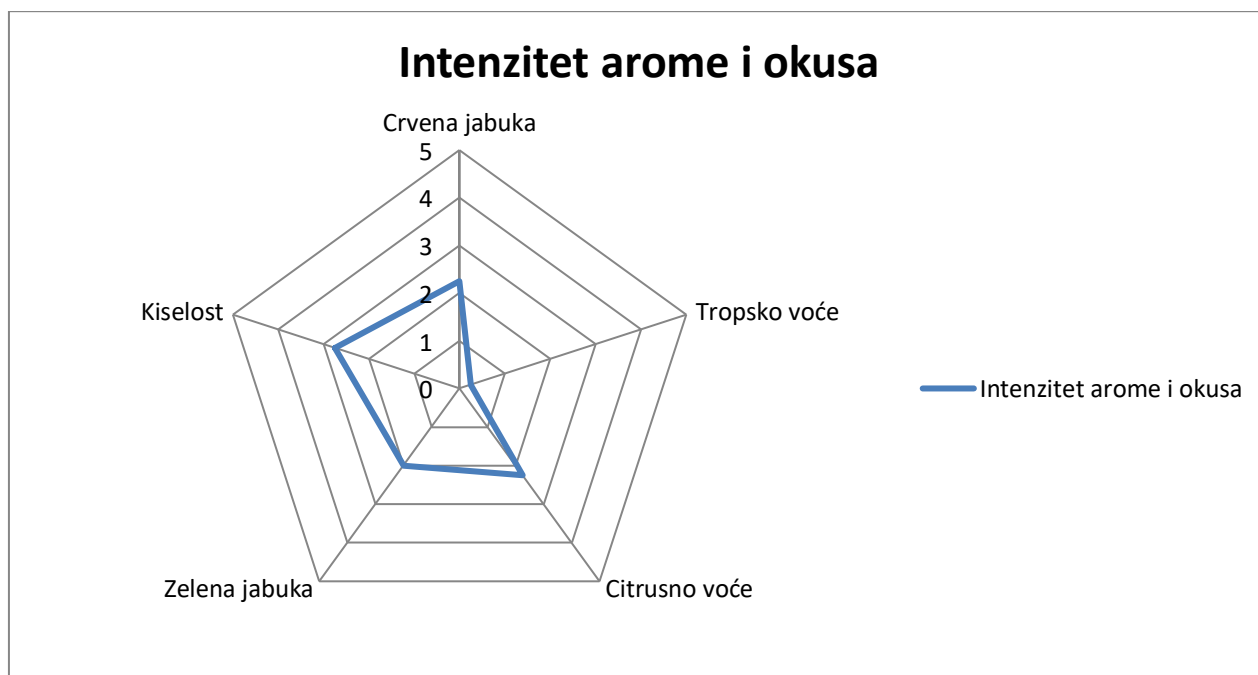
6.3.1. Triangle test

Članovi senzorskog panela dobili su 3 uzorka piva ohlađena na istu temperaturu. Dva uzorka piva bila su ona kiseljena s *L. helveticus*-om, dok je jedan uzorak piva bio onaj kiseljen s *L. plantarum*-om. Svi sudionici pogodili su koje se pivo razlikuje, što je omogućilo prelazak na metodu profila okusa.

6.3.2. Metoda profila okusa

Tablica 11. Rezultati metode profila okusa piva kiseljenog s *L. helveticus*.

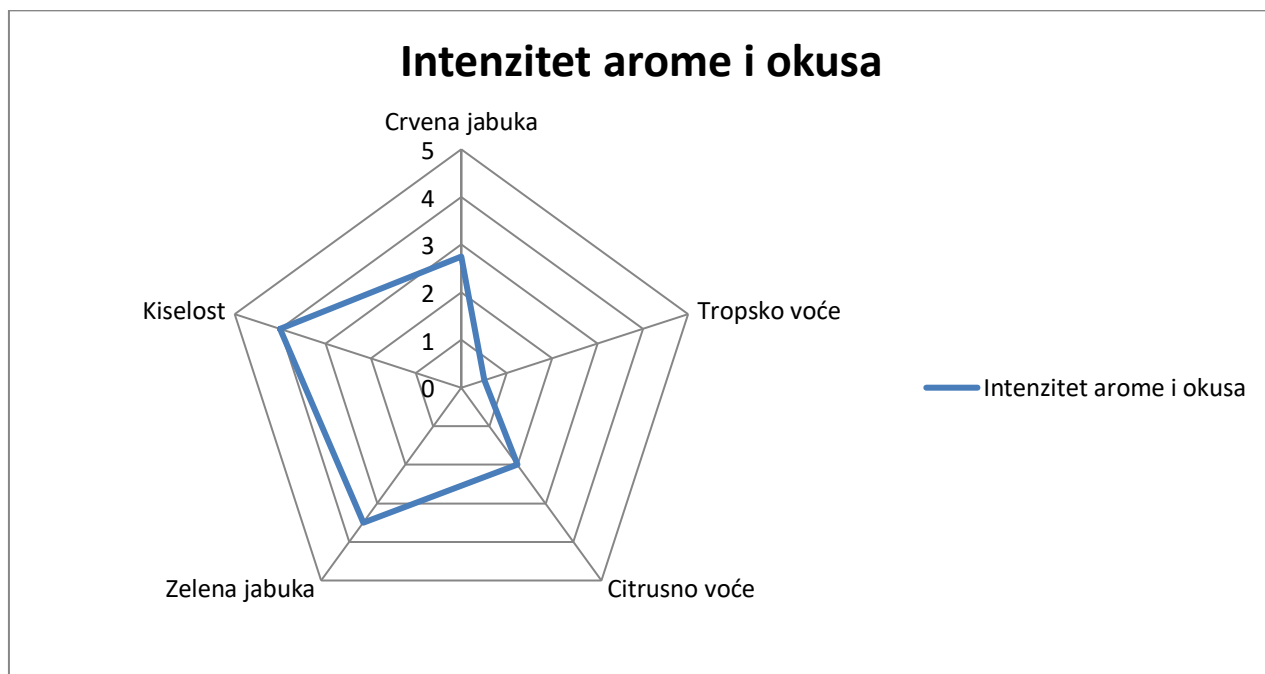
Aroma/okus	Intenzitet (1-5)				
	Senzoričar 1	Senzoričar 2	Senzoričar 3	Senzoričar 4	Ukupno
Crvena jabuka	3	3	1	2	2,25
Tropsko voće	0	1	0	0	0,25
Citrusno voće	2	3	2	2	2,25
Zelena jabuka	1	2	1	4	2
Kiselost	2	4	2	3	2,75



Dijagram 5. Intenzitet aroma i okusa piva s *L. helveticus* prikazani u mreži.

Tablica 12. Rezultati metode profila okusa piva kiseljenog s *L. plantarum*

Aroma/okus	Intenzitet (1-5)				
	Senzoričar 1	Senzoričar 2	Senzoričar 3	Senzoričar 4	Ukupno
Crvena jabuka	3	4	1	3	2,75
Tropsko voće	0	0	2	0	0,5
Citrusno voće	1	2	3	2	2
Zelena jabuka	3	4	4	3	3,5
Kiselost	4	4	4	4	4



Dijagram 6. Intenzitet aroma i okusa piva s *L. plantarum* prikazani u mreži.

7. RASPRAVA

Istim receptom i istim metodama kuhanja piva dobivene su dvije sladovine na koje su se naciepljivali *L. helveticus* i *L. plantarum*. Sirovine korištene za kuhanje, upisane u tablici 1, tablici 2, tablici 3 i tablici 4, standardne su u proizvodnji stila Berliner weisse, koji je odabran zbog njegovog laganog tijela i nepostojeće hmeljne arome, što stavlja arome, okuse i kiselost nastalu tokom bakterijske fermentacije u prvi plan. Tokom ukomljavanja, osigurana je konverzija škroba djelovanjem α -amilaze i β -amilaze pomoću njihovih optimalnih temperatura koje su prikazane u tablici 5 i tablici 6, čije je djelovanje prekinuto dizanjem temperature iznad 80°C što uzrokuje njihovu denaturaciju. Nakon ukomljavanja sladovine su prokuhane kako bi se osigurala sterilnost, te su ohlađene na optimalnu temperaturu za fermentaciju laktobacila. Bakterijska fermentacija, odnosno kiseljenje sladovine kontrolira se mjerenjem pH vrijednosti, što je prikazano u tablici 7 i tablici 8, kao i u dijagramu 1 i dijagramu 2. Kiseljenje sladovine odvijalo se dok pH vrijednost sladovine nije pao do 3,4, kako bi se moglo usporediti vrijeme brzine kiseljenja, te se kasnije, prilikom provođenja senzorske analize moglo vidjeti kakve su razlike pri jednakoj pH vrijednosti. Fermentacija laktobacila je prekinuta kuhanjem sladovine i dodavanjem hmelja, koji također ima antibakterijsko djelovanje. Obje sladovine su nakon toga ohlađene na 19 °C kako kvasac ne bi doživio temperaturni šok, te je dodana ista količina suhog kvasca, kao što je upisano u tablici 4. Prema dnevniku fermentacije koji je upisan i prikazan u tablici 9 i tablici 10, odnosno u dijagramu 3 i dijagramu 4, može se vidjeti da je razlika u trajanju alkoholne fermentacije 1 dan. Pivu je nakon fermentacije spuštana temperatura na 1°C kako bi se ubrzao proces taloženja, nakon čega se počeo izbacivati kvasac iz konusnog dijela fermentora čime je spriječena autoliza kvasaca, koja utječe na promjenu pH vrijednosti koja raste te na promjenu senzorskih svojstva piva. Kad se pivo izbistrilo pretočeno je pomoću čistog CO₂ u sterilan i prethodno odzračenu inox bačvu kako ne bi došlo do kvarenja piva ili oksidacije koji također uvelike utječu na senzorska svojstva. Piva su se gazirala dodavanjem CO₂ u inox bačvu, nakon čega su bila spremna za senzorsku analizu.

Tokom senzorske analize dobiveni su rezultati koji su upisani u tablicu 11 i tablicu 12, te su prikazani kao mreža u dijagramu 5 i dijagramu 6. Senzorski analitičarisi osim prikazanih tablica imali i rubriku za komentar u kojoj su svi naglasili da pivo s *L. helveticus*-om ima ugodnu i

uglađenu kiselinu, dok pivo s *L. plantarum*-om ima intenzivniju i agresivnu kiselinu. Osim intenziteta kiseline komentirali su i blagu aromu kruške koja se osjeti u pivu s *L. plantarum*.

8. ZAKLJUČAK

Kako u Hrvatskoj raste potražnja za kiselim pivom, tako raste i zanimanje za njegovu proizvodnju. Cilj ovog rada bio je usporediti svojstva kiseljenja sladovine i prikazati razliku u senzorskim svojstvima dvije trenutno najčešće korištene bakterije u modernom načinu proizvodnje kiselih piva.

Kroz dnevnik kuhanja prikazano je i vrijeme koje je bilo potrebno laktobacilima da zakisele sladovinu od pH vrijednosti 4,4 do pH vrijednosti 3,4. Iz njih se da iščitati da je *L. helveticus* potrebno 17 h, odnosno 2 h više u odnosu na *L. plantarum* da spusti pH vrijednost za 1, što u nekim pivovarama koje su vremenski ograničene za broj uvaraka može igrati veliku ulogu.

Kako bi se utvrdilo utječe li nastala kiselina, odnosno smanjena pH vrijednost kako na kvasce, tako i na alkoholnu fermentaciju, svakodnevno su mjerene gustoća i pH vrijednost mladog piva. Pomoću tih parametara je dokazano da je kvasac uspješno prevreo šećer iz sladovine u kratkom vremenskom roku, što je bitna stavka uzme li se u obzir da se moderna metoda proizvodnje kiselog piva u odnosu na tradicionalnu proizvodnju kiselog piva koristi, između ostaloga, zbog vremenske razlike u ukupnom procesu proizvodnje.

Pomoću senzorske analize u triangle testu dokazana je senzorska razlika oba piva na temelju arome i okusa, gdje su sva 4 člana senzorskog panela prepoznala različiti uzorak. Ova metoda omogućila je da se odradi metoda profila okusa, kako bi se odredio stupanj intenziteta određenog okusa i arome. Iz tablice 11 i tablice 12 može se iščitati da pivo kiseljeno s *L. plantarum* ima izraženiju kiselost, te su ju članovi senzorskog panela komentirali kao oštru i intenzivnu u odnosu na pivo kiseljeno s *L. helveticus*, čiju su kiselost opisali kao ugodnu i uglađenu. Također, za pivo kiseljeno s *L. plantarum* vidljivo je da ima izraženije sve navedene arome i okuse osim aroma citrusnog voća, koje je prema ovoj senzorskoj analizi intenzivnije u pivu kiseljenom s *L. helveticus*.

Iz ovog rada i provedenih analiza može se potvrditi postojanje razlike između *L. helveticus* i *L. plantarum*, te prikazuje kako pivar može birati između bakterije *L. helveticus* koja će gotovom pivu dati uglađenu i ugodnu kiselinu, s izraženom citrusnom notom, ili pak bakterije *L. plantarum*

koja će u gotovom pivu dati izraženu i oštru kiselinu, s dominantnim aromama crvene i zelene jabuke.

9. LITERATURA

1. Marić, V. (2009.): Tehnologija piva, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska.
2. Koch, G., Allyn M. (2011.): The brewer's apprentice, Quarry books, Beverly, Massachusetts.
3. Hieronymus, S. (2010.): Brewing with wheat, Brewers association, Boulder, Colorado
4. Veselov, I. J., Čukmasova, M. A. (1996.): Tehnologija piva, Poslovno udruženje ind. Piva, Beograd, Srbija
5. Verachter, H., Debourg, A. (1995): Properties of Belgian acid beers and their microflor.. *Cerevisia* **20**, str. 37–41.
6. Marthens, H., Dawoud, E., Verachter. H. (1991): Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the first month of lambic fermentation. *Journal of Institute of Brewing.* **97**, str. 435-439.
7. Tonsmeire, M. (2014.): American sour beers, Brewers publications, Boulder, Colorado
8. Palmer, J. J., (2016.): How to brew, Brewers publications, 3. izd., Boulder, Colorado
9. Homebrewers association:
<https://www.homebrewersassociation.org/how-to-brew/sour-microbes-yeast-and-bacteria-explained/> , Sour microbes: Yeast and bacteria explained (15.10.2021.)
10. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., Stevens, R. (2004.): Brewing – Science and practice, Woodhead publishing limited, Sawston, UK
11. Spitaels, F., Van Kerrebroeck, S., Wieme, A., Snauweart, I., Aerts, M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P. (2015): Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition, *Food Microbiol.* **47**, str. 1-11.
12. Van Oevelen, D., Spaepen M., Timmermans, P., Verachter, H. (1997): Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze, *Journal of the institute of Brewing.* **83**, str. 356-360.

13. Lallamand, <https://www.lallemandbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-sour-pitch/>, Wildbrew sour pitch (12.09.2021.)
14. Lallamand, <https://www.lallemandbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-helveticus-pitch/>, wildbrew helveticus pitch (12.09.2021.)
15. Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B., Wicklund, T. (2020): Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. *ASM Journals*. **86**.
16. Beer judge certification program, <https://www.bjcp.org/bjcp-style-guidelines/>, Style guidelines (24.10.2021.)
17. Beer and brewing, <https://beerandbrewing.com/the-art-of-tart-the-many-ways-both-quick-and-slow-to-make-sour-beer/>, The art of tart: The many ways (both quick and slow) to make sour beer (11.09.2021.)
18. Narzis, L., Schuster, K., Weinfurtner, F. (1998): Tehnologija proizvodnje sladovine, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.