

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE POLUGOTOVOG I GOTOVOG PROIZVODA U PIVARSTVU

Šeketa, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:128:856933>

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

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



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 REPOZITORIJ

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA
PIVARSTVO

IVANA ŠEKETA

FIZIKALNO - KEMIJSKE ANALIZE POLUGOTOVOG I
GOTOVOG PROIZVODA U PIVARSTVU

ZAVRŠNI RAD

Karlovac, 2024.

Veleučilište u Karlovcu

Stručni prijediplomski studij Prehrambene tehnologije

Pivarstvo

Ivana Šeketa

**Fizikalno - kemijske analize polugotovog i gotovog proizvoda u
pivarstvu**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Jasna Halambek, v.pred.

Broj indeksa studenta: 0314615018

Karlovac, 2024

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici dr.sc. Jasni Halambek na pomoći, trudu i savjetima tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem i svojoj obitelji, svojoj sestri i majci za svu podršku koju su mi pružale, ljubav i strpljenje tijekom cijelog mog studiranja. Zahvaljujem se i svom zaručniku koji mi je bio oslonac i poticaj pri kraju studija kada mi je bilo najpotrebnije. Hvala i mojim prijateljicama na pruženoj podršci tijekom studiranja.

IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Ivana Šeketa**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Fizikalno - kemijske analize polugotovog i gotovog proizvoda u pivarstvu** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja 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, srpanj 2024.

Ivana Šeketa

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Veleučilište u Karlovcu
Odjel prehrambene tehnologije
Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE POLUGOTOVOG I GOTOVOG PROIZVODA U PIVARSTVU

Ivana Šeketa

Mentor: Dr.sc. Jasna Halambek, v. pred.

Sažetak: Tema ovog rada bila je opisati najvažnije i najčešće korištene fizikalno – kemijske analize u pivarstvu, jer upravo te analize omogućuju proizvođačima kontrolu procesa i svih parametra kao što je alkohol, CO₂, boja, gorčina, pjena, bistrina i dr. Kroz analize sladovine, kao i piva u fazi vrenja i odležavanja, može se pratiti proces i intervenirati prema potrebi na vrijeme. Konstantnom kontrolom svakog dijela procesa, osiguravaju se proizvodi visoke kvalitete koji zadovoljavaju zahtjeve potrošača. Uz fizikalno- kemijske analize u radu je opisana i metoda plinske kromatografije i spektroskopija. Plinska kromatografija se koristi se za identifikaciju spojeva u uzorcima. S obzirom da pruža precizne i brze rezultate, ubraja se u važnije i neophodne analize u brojnim područjima kao što su farmacija, klinička ispitivanja i prehrambena industrija. Spektroskopija se također koristi u raznim područjima i prehrambenim industrijama, a u pivarstvu ima važnu ulogu u kontroli kvalitete i najčešće se primjenjuje za određivanje boje, gorčine i koncentracije polifenola u uzorcima piva.

Broj stranica: 33

Broj slika: 14

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 20

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fizikalno – kemijske analize, kontrola kvalitete piva, plinska kromatografija, spektroskopija.

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr.sc. Ines Cindrić, prof. struč. stud.
2. Elizabeta Zandona, mag. ing. bioproc., pred.
3. Dr.sc. Jasna Halambek, v. pred.
4. Dr.sc. Goran Šarić, v. pred. (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska

BASIC DOCUMENTATION CARD

Karlovac University of Applied Sciences
Department of Food Technology
Professional undergraduate study of Food Technology
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

Final paper

PHYSICO-CHEMICAL ANALYSES OF SEMI - FINISHED AND FINISHED PRODUCTS IN BREWING

Ivana Šeketa

Supervisor: Ph.D. *Jasna Halambek*, senior lecturer

Abstract: The aim of this study was to describe the most important and commonly used physico-chemical analyses in brewing, as these analyses enable producers to control the process and all parameters such as alcohol, CO₂, color, bitterness, foam, clarity, etc. Through analyses of wort, as well as beer from fermentation and beer from maturation, the process can be monitored, and interventions can be made as needed in a timely manner. By constantly controlling each part of the process, high-quality products that meet consumer requirements are ensured. In addition to other physicochemical analyses, the study elaborates on gas chromatography and spectroscopy. Gas chromatography is employed for compound identification within samples. Given its capability to deliver precise and rapid outcomes, it is deemed one of the pivotal and indispensable analyses across numerous domains, including pharmaceuticals, clinical investigations, and the food industry. Spectroscopy is also used in various fields and in the food industry, and in brewing it plays an important role in quality control and is most often used to determine the colour, bitterness and concentration of polyphenols in beer samples.

Number of pages: 33

Number of figures: 14

Number of tables: 1

Number of references: 20

Original in: Croatian

Key words: gas chromatography, physico-chemical analyses, quality control of beer, spectroscopy.

Date of the final paper defense:

Reviewers:

1. *Ph.D. Ines Cindrić, college prof.*
2. *Elizabeta Zandona, lecturer*
3. *Ph.D. Jasna Halambek, sen. lecturer*
4. *Ph.D. Goran Šarić, sen. lecturer (substitute)*

Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, J. J. Strossmayera Square 9, 47000 Karlovac, Croatia.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Općenito o pivu.....	2
2.1.1. Tipični stilovi piva.....	3
2.2. GOTOV I POLUGOTOV PROIZVOD U PIVARSTVU	5
2.2.1. Gotov proizvod.....	3
2.2.2. Polugotov proizvod.....	5
2.3. FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE	7
2.3.1. Određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara piva.....	7
2.3.2. Određivanje mutnoće piva.....	10
2.3.3. Određivanje ukupnog kisika i CO ₂ u pakiranju.....	11
2.3.4. Određivanje koloidne stabilnosti piva.....	13
2.3.5. Određivanje stabilnosti pjene.....	14
2.3.6. Određivanje nivoa napunjenosti piva.....	17
2.4. INSTRUMENTALNE METODE ANALIZE	18
2.4.1 Primjena spektroskopije u pivarstvu.....	18
2.4.1.1 Određivanje polifenola u pivu.....	21
2.4.1.2 Određivanje gorčine piva.....	23
2.4.2. Primjena plinske kromatografije u pivarstvu	24
2.4.2.1. Metoda plinske kromatografije i uređaj	25
3. ČIŠĆENJE I KALIBRACIJA UREĐAJA	29
4. ZAKLJUČAK	31
5. LITERATURA	32

1.UVOD

Pivo je slabo alkoholno pjenušavo piće gorkastog okusa i izrazite arome hmelja. Osnovne sirovine za proizvodnju piva su voda, slad, pivski kvasac i hmelj, a proizvedeno je alkoholnom fermentacijom pивske sladovine s pivskim kvascem (Marić, 2009). Fermentacija je anaerobna razgradnja šećera uz pomoć kvašćevih gljivica gdje nastaju etanol i ugljikov dioksid. Pivo se pije ohlađeno na 5°C do 14°C te natočeno u čaši daje bogatu i gustu pjenu koja je znak dobre kakvoće piva. Obično pivo sadrži 3%-5,5% alkohola, ovisno o vrsti piva može sadržavati i više ali i manje, kao što su bezalkoholno pivo ili radleri.

Proizvodnja piva je složen proces stoga je važno kontinuirano pratiti parametre u svakom dijelu procesa. Fizikalno - kemijske analize su važne kako bi održali kvalitetu proizvoda i zadovoljili zahtjeve potrošača.

U pivarstvu, fizikalno - kemijske analize odnose se na mjerenje alkohola, gorčine, boje, pjene, originalnog ekstrakta, otopljeni kisik, pH, mutnoća itd.

S druge strane plinska kromatografija je instrumentalna metoda kojom se analiziraju hlapljivi spojevi kojih u pivu ima od 600 do 700, koji također doprinose okusu i aromi piva. Plinska kromatografija ima i veliku zastupljenost u ostalim područjima i industrijama, a posebice u farmaceutskoj industriji. Spektroskopija se također koristi u raznim područjima i prehrambenim industrijama, a u pivarstvu ima važnu ulogu u kontroli kvalitete i primjenjuje se za određivanje koncentracije tvari u uzorku. Sve navedene analize omogućuju identifikaciju različitih komponenata u uzorku, te zadatak svih fizikalno – kemijskih analiza koje su opisane u ovom radu, je osigurati kvalitetu proizvoda i zadovoljavanje zahtjeva potrošača praćenjem procesa od samog početka proizvodnje pa do gotovog proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Općenito o pivu

Pivo se sastoji od više od 600 različitih komponenti, pri čemu su najvažniji voda, neprevreli ekstrakt i alkohol. Udio vode iznosi od 89-93%, sadrži alkohola ovisno o vrsti piva od 0,1-10,0 volumna udjela, udio neprevrelog ekstrakta koji je sastavljen od ugljikohidrata (75-80%), dušikovih spojeva (6-9%), i ostalih organskih (4-5%) i anorganskih sastojaka (Marić, 2009). Pivo je namirnica bogata vitaminima B skupine (riboflavin, piridoksin, kobalamin i folati), i bogato je mineralima kao što je kalij, magnezij, fosfor i silicij.

Proizvodnja piva odvija se u više faza, ali glavne tehnološke faze su proizvodnja sladovine, glavno vrenje sladovine, naknadno vrenje, dorada piva i punjenje u ambalažu. Kako bi proizveli sladovinu, potrebno je samljeti slad i neslađene žitarice, ako se koriste. Zatim slijedi ukomljavanje sladne prekrupe i neslađenih žitarica, prvo odvojeno, a onda se dodaje komina neslađenih žitarica u komovnjak sa sladnom kominom. Zajedno se podvrgavaju procesu enzimske hidrolize kako bi se škrob razgradio do jednostavnijih šećera i proteini do aminokiselina. Zatim se odvaja tekući dio sladovine od krutog dijela (tropa) i nakon toga sladovina se kuha sa hmeljem, i bistri prolaskom kroz filter. Hmelj se dodaje zbog njegove specifične arome i gorčine. Sladovina se prije ili nakon toga hladi, aerira i zasićuje kisikom iz zraka.

Druga bitna tehnološka faza je glavno vrenje sladovine gdje se sladovina naciepljuje čistom kulturom pivskog kvasca vrste *Saccharomyces uvarum* ako se proizvodi pivo donjeg vrenja, ili *Saccharomyces cerevisie* za proizvodnju piva gornjeg vrenja. Tako naciepljena sladovina s kvascem postepeno postaje mlado pivo odnosno tekućina koja sadrži etanol, otopljeni ugljikov dioksid i povećani broj živih kvašćevih stanica (Marić, 2009). Fermentabilni ugljikohidrati u sladovini su maltoza (59%), maltotrioza (oko 20 %), saharoza (6%), glukoza (oko 14%) i fruktoza (1%). Ovi ugljikohidrati ulaze u biokemijski put razgradnje u obliku D-glukoze ili D-fruktoze. Alkoholnim vrenjem sladovine nastaju i nusproizvodi koji mogu pozitivno utjecati na punoću okusa, ali i negativno na okus, stabilnost pjene i miris piva.

Nusproizvodi koji negativno utječu na aromu mladog piva su sumporni spojevi, diacetili i aldehidi, koji se stvaraju tijekom glavnog vrenja. Ostale promjene koje se događaju tijekom alkoholnog vrenja i dozrijevanja mladog piva su promjena oksido – redukcijaskog potencijala i

boje, otapanje CO₂, smanjenje pH vrijednosti, smanjenje udjela dušikovih spojeva i izdvajanje gorko taninskih sastojaka.

Naknadno vrenje (dozrijevanje) piva odvija se u ležnim tankovima ili u novije vrijeme cilindrično – konusnim fermentorima. Svrha naknadnog vrenja je izdvajanje suspendiranih sastojaka zbog prirodnog bistrenja piva, ispiranje hlapivih sastojaka kao što su sumporni spojevi, i zasićenje piva sa CO₂. Nakon naknadnog vrenja slijedi izdvajanje kvasca iz piva filtracijom pomoću filtracijskih sredstva (dijatomejska zemlja, perlit).

Prije punjenja u ambalažu, pivo se treba doraditi, tj. stabilizirati dozvoljenim sredstvima kao što su prirodni alumosilikati, silikageli i PVPP (polivinilpolipirolidon). Kako bi ocijenili koloidnu stabilnost piva, mogu se provesti fizikalno – kemijske metode kao što su sedam dana test, određivanje polifenola u odležanom pivu, određivanje udjela proteina itd.

Punjenje piva u ambalažu je također složeni proces i posao kao što je i proizvodnja piva. Sastoji se od pranja boca, punjenja i zatvaranja boca, pasterizacija piva i boca i etiketiranje.

2.1.1. Tipični stilovi piva

Postoje razni stilovi piva, no osnovna podjela dva tipa piva prema vrsti kvasca koji se koristi su lager (pivo donjeg vrenja) i ale (pivo gornjeg vrenja) piva. Lager piva se razlikuju prema tvrdoći vode, boji slada za pripremu sladovine i razgrađenosti slada (Marić, 2009). Zbog tvrdoće vode i boje slada lager piva se razlikuju po punoći okusa, aromi i nijansi boje. Kod lager piva vrenje započinje na nižim temperaturama (6 – 8°C) i završava na 9 – 18°C, te se zbog niskih temperatura početka vrenja naziva još i hladno vrenje. Kada se vrenje završi i mlado pivo hladi, kvasac se istaloži na dno fermentora i uklanja. Odležavanje se odvija do 3 tjedna od 0 – 1°C. Ale piva započinju sa vrenjem na višim temperaturama oko 10°C. Završava na otprilike 25°C i dozrijeva na 20°C kraći vremenski period od lager piva.

Unutar lager piva jedan od najpoznatijih vrsta lager piva je Pilsner.

Pilsner je prvi puta skuhan u Plzenu po kojemu je ova vrsta lager piva dobilo ime. Pivo je bistro, te ovisno o recepturi pilsnera koji se proizvodi je svijetle do srednje tamne boje. Temperatura fermentacije je oko 8 – 12°C. Udio alkohola je od 4,5 do 6%, a gorčina je umjerena. Originalni ekstrakt se kreće od 11 – 14 (°Plato).

Dunkel je tamna vrsta lager piva koja dolazi iz Njemačke. Pivo je izrazite sladne arome sa umjerenom gorčinom. Originalni ekstrakt je od 13 – 14 (°Plato), udio alkohola od 4,5 – 5%, udio gorčine se kreće od 16 – 25 IBU (International Beer Units).

Stout je pivo gornjeg vrenja prženog slada što rezultira tamnosmeđu do crnu boju, okusom podsjeća na kavu ili nezaslađenu čokoladu i na zagorijelost. Udio alkohola varira od 4 – 12%, a originalni ekstrakt se kreće do 18 (°Plato). Boja stout piva se kreće do 80 EBC (European Brewery Convention). Najpoznatija vrsta stout piva je irski Guinness.

Porter je također pivo gornjeg vrenja nekada jako popularno, dok se danas više zamjenjuje stout pivom (Marić, 2009). Pivo je blago smeđe do tamnosmeđe boje, a mogu imati i crvenu nijansu. Odlikuje ga gusta i stabilna pjena. Udio alkohola se kreće od 5,0 – 6, 5%, originalni ekstrakt 11 – 15 (°Plato), a boja isto kao i stout do 80 EBC.

India Pale Ale je pivo gornjeg vrenja koje karakterizira vrlo visoka gorčina (40 – 80) i visoki udio alkohola (5 – 7 %). Originalni ekstrakt je od 12,5 – 17,5 (°Plato). Pivo je zlatne do tamno bakrene boje (16 – 35 EBC), voćno esterski okusi i arome su umjereni, a mogu biti i vrlo jaki.

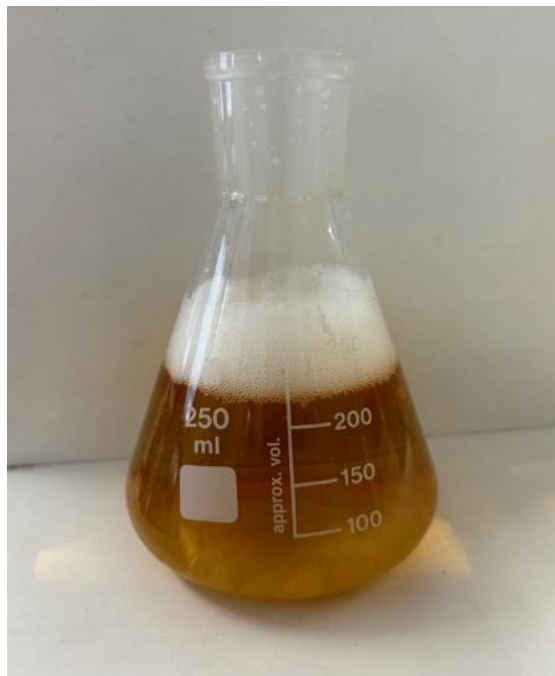
Pšenično pivo dolazi u raznim podstilovima piva, a najpoznatija su belgijska pšenična piva sa citrusnim okusom i jarko zlatne boje, berlinska pšenična piva slatkog okusa i niskog udjela alkohola, njemačka pšenična piva koja imaju voćnu aromu i čvrstu pjenu i američka pšenična piva sa manje voćnim aromama, ali izuzetno hmeljnom aromom. Većina pšeničnih piva je mutnog izgleda pogotovo berlinsko pšenično zbog prisutnosti kvasca u pivu koje se ne filtrira. Sve ove vrste pšeničnog piva imaju različite fizikalno kemijske parametre, berlinsko i njemačko pšenično pivo imaju udio alkohola od 4 – 6 % dok npr. drugo njemačko pšenično pivo Weizenbock koji može imati udio alkohola od 7% i više.

Svaki stil i podstil piva ima različite fizikalno – kemijske parametre koji ovise o recepturi i načinu proizvodnje. Postoje i piva koja su nastala spontanom fermentacijom pomoću divljih kvasaca koji dospjevaju u sladovinu iz zraka ili sa zidova posuda. Ova vrsta piva poznata je pod nazivom Lambic piva kojima se dodaju voćne arome. Afričko pivo se proizvodi od prosenog umjesto ječmenog slada na 30 – 40°C sa kvascem vrste *Schizosaccharomyces pombe*.

2.2. GOTOV I POLUGOTOV PROIZVOD U PIVARSTVU

2.2.1. Gotov proizvod

Pod pojmom gotov proizvod, u pivarstvu se smatra proizvod u boci, limenci, ili bačvi koji je prošao proces pasterizacije i mora odgovarati specifikacijama za određeni proizvod, odnosno specifikacijama za određenu vrstu piva. Gotov proizvod odlikuje karakteristična čvrsta i stabilna pjena.



Slika 1. Primjer gotovog proizvoda koji je natočen u Erlenmayer tikvici (autor Ivana Šeketa).

2.2.2. Polugotov proizvod

Polugotov proizvod odnosi se na svaki uzorak koji se uzima tijekom proizvodnje piva, a tu ubrajamo sladovinu odnosno nefermentirano pivo, pivo na vrenju, pivo na odležavanju, te filtrirano pivo koje se nalazi u tanku do početka punjenja.



a)

b)

Slika 2. Primjer polugotovog proizvoda u Erlenmayer tikvici: (a) slakovina i (b) pivo na odležavanju (autor Ivana Šeketa).

2.3. FIZIKALNO - KEMIJSKE ANALIZE PIVA

2.3.1. Određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara piva

U pivarstvu određivanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara u pravilu obuhvaća određivanje volumnog udjela alkohola, specifične težine, prividnog i pravog ekstrakta, osnovne sladovine, boje, gorčine i pH. Svi navedeni parametri mogu se određivati/mjeriti zasebnim uređajima odnosno metodama, no puno praktičniji način određivanja ovih parametara je korištenje modularnih uređaja za analizu alkoholnih pića koji su danas dostupni na tržištu.

Modularni uređaji imaju mogućnost jednim uzorkovanjem analizirati sve ili željeni dio parametara. U osnovi glavni dijelovi takvog modularnog uređaja koji se koristi za analizu piva mogu uključivati, osim obaveznih komponenta za automatsko uzimanje uzoraka i računala koje upravlja sa navedenim jedinicama, komponentu za laboratorijsko mjerenje gustoće i sa gustoćom povezane parametre, komponentu za određivanje volumnog udjela alkohola, komponentu za mjerenje mutnoće, komponentu za mjerenje pH-vrijednosti, komponentu za određivanje boje piva.

Važno je naglasiti da s obzirom da je uređaj modularan, u njega se mogu ugrađivati razni moduli ovisno o tome koje parametre želimo određivati na ovaj način, odnosno one parametre koje ne određujemo na pojedinačnim uređajima za mjerenje npr. boje, pH i dr.

Primjer jednog takvog modularnog uređaja je analizator piva prikazan na slici 3. Glavni dijelovi prikazanog uređaja su digitalni denzitometar, zatim Alcoalyzer kojim se mjeri sadržaj alkohola, uzorkivač i računalo. Uređaj sadrži i senzore temperature zato što temperatura može utjecati na točnost mjerenja stoga je bitno da uzorak bude temperiran na oko 20°C. Denzitometar služi za mjerenje gustoće piva, a koristi oscilacijsku U-tube (cijevnu) tehnologiju. Alcoalyzer mjeri alkohol infracrvenom tehnologijom gdje se infracrvena svjetlost usmjerava kroz uzorak piva i softver u analizatoru izračunava koncentraciju alkohola u uzorku.

Mjerenje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara piva neophodno je za praćenje parametara procesa, te s obzirom da su rezultati ako se koriste modularni uređaji vrlo brzo gotovi, čak u roku od par minuta može se brzo reagirati na neke eventualne nepravilnosti u samom procesu proizvodnje.

Analiza piva na ovom uređaju započinje temperiranjem uzorka piva na 20°C i uklanjanjem CO₂, te filtriranjem preko naboranog filter papira (metoda MEBAK 2.13.1). Ukoliko je uzorak bistar (gotov proizvod, pivo iz BBT-a i HG) filtrira se 3 puta i natoči u odgovarajuće čašice.

Mutni uzorci, kao što je sladovina, pivo sa vrenja, pivo sa odležavanja, i gotov proizvod mutnog piva kao što je npr. radler pivo, filtriraju se 3 puta preko filter papira u koji je prethodno dodana žlica dijatomejske zemlje. Filtrirano pivo se prelije u odgovarajuće čašice na koje se stavlja gumeni čep kako bi se spriječio gubitak alkohola, te se postavljaju na uzorkivač za analizu. Prije uzorka stavi se slijepa proba odgovarajuće jačine. Ukoliko su uzorci iste jačine nije potrebno stavljati ispred svakog uzorka slijepu probu.

Tipično pivo od 5% (V/V) udjela alkohola, obično počinje kao sladovina sa specifičnom težinom od 1,045 do 1,050, te kada je završena fermentacija, specifična težina se kreće u rasponu od 1,007 – 1,012. Ovaj raspon može varirati ovisno o vrsti piva i recepturi, a što je niža konačna težina u pivu takvo pivo sadrži manje šećera. Po sadržaju volumnog udjela alkohola, piva se klasificiraju na: standardna lager i ale piva koja sadrže više od 3,5%, bezalkoholna do 0,5%, lagana piva koja sadrže do 3,5 %, i jaka piva koja imaju više od 5,5% (V/V).

Sastav ekstrakta su pretežito ugljikohidrati, mala količina proteina, aminokiselina i glicerina te sastavni dijelovi hmelja. Ekstrakt u osnovnoj sladovini pokazatelj je jakosti piva (Marić, 2009). Podrazumijeva koncentraciju otopljenih tvari u sladovini prije fermentacije. Za lager piva obično se kreće u granicama od 10 – 12°P (Plato), za crna piva raspon je od 10 – 16°P, a za pšenična 11 – 14°P.

Tablica 1. Primjeri parametra i raspon granice za svijetlo pivo (Marić, 2009)

Parametar	Jedinica mjere	Ciljana vrijednost	Dozvoljeni raspon
Ekstrakt u osn. sladovini	%	11,90	11,80-12,20
Pravi ekstrakt	%	4,00	3,75-4,20
Prividni ekstrakt	%	2,20	1,90-2,30
Konačni ekstrakt	%	1,95	1,65-2,05
Alkohol	% tež./tež.)	4,00	4,00-4,15
Alkohol	% vol./vol.)	5,10	5,10-5,30
pH	-	4,20	4,05-4,30
Boja	EBCj.	7,50	6,50-8,50
Bistroća/mutnoća	EBCj.	0,50	maks. 0,50
Gorčina	EBCj.	22,00	19,00-21,00
CO ₂	g/L	5,20	5,00-5,50
Ukupni dušik	mg/L	500	450-550
Koagulirajući dušik	g/L	10	8-12
Polifenoli	mg/L	105	90-120
Oksalati	mg/L	20	15-25
Forcing test	EBCj.	2,0	maks. 2,0
Zrak (boca 0,5 l)	ml	0,0	0,0-1,5
Otopljeni kisik	g/L	0,0	maks. 0,5

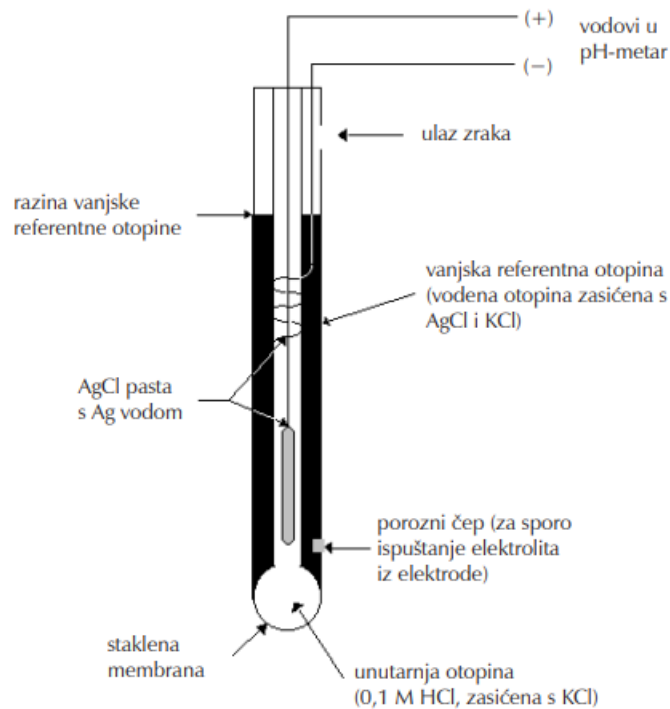


Slika 3. Modularni uređaj za analizu alkoholnih pića Anton Paar DMA 4500 M (autor Ivana Šeketa).

Ako navedeni modularni uređaj ne sadržava komponentu za mjerenje pH vrijednosti, tada je najjednostavniji i najbrži način mjerenje pH vrijednosti u uzorcima pomoću pH metra.

Po definiciji, pH predstavlja negativan logaritam množinske koncentracije vodikovih iona. Definira se kao stupanj kiselosti ili bazičnosti. Mjerenje pH ugrubo određuje se indikatorskim trakama koje ovisno o pH vrijednosti mijenjaju boju, dok se preciznije vrijednosti određuju pomoću potenciometrijskog uređaja – pH metra.

Elektroda pH metra je glavna komponenta ovog uređaja koja ima stakleni vrh, a unutrašnjost staklene elektrode sadrži referentnu otopinu. Osim staklene elektrode, pH metar sadrži i referentnu elektrodu koja se nalazi u elektrolitskoj otopini. Mjerenje pH vrijednosti temelji se na elektrokemijskoj metodi jer omogućuje brzo i precizno određivanje kiselosti ili lužnatosti otopine na osnovi koncentracije vodikovih iona.



Slika 4. Struktura pH elektrode (Bolf i Dorić, 2015).

pH vrijednost se mjeri u sladovini, fermentiranom pivu, kvascu, biopropagatoru, propagatoru, pivu na odležavanju, pivu u BBT-u nakon filtracije, u gotovom proizvodu i pivu u cisternama koje se također degazira prije početka mjerenja. Tijekom vrenja i dozrijevanja piva, optimalni pH za rast i/ili aktivnost stanica kvasca mora biti unutar određene pH vrijednosti pa je važno pratiti pH vrijednost i držati je pod kontrolom.

U polugotovom proizvodu kao što je sladovina, pH se mora kretati u rasponu od 5,2 do 5,8, dok je u gotovom proizvodu važno da pH nije viši od 4,4 i manji od 4,2; jer je postojanost piva bolja ukoliko je pH niži.

2.3.2. Određivanje mutnoće piva

Turbidimetrija je metoda kojom se određuje koncentracija tvari suspendiranih u nekoj tekućini u obliku sitnih čestica. Bistrina/mutnoća je vrlo važna karakteristika piva, a uzrok narušene bistrine može biti zbog loših sirovina, fizikalno – kemijske nestabilnosti, zbog neke mikrobiološke kontaminacije ili starenjem piva. Isto tako treba imati na umu da pojedine vrste piva moraju imati određenu mutnoću pa je tako mutnoća znak kvalitete kod craft piva, i znači da se druga fermentacija dogodila u boci. S druge strane, lager pivo ne smije biti mutno. Mutnoća piva određuje se mjerenjem upadne svjetlosti koja se raspršila pod pravim kutom od uzorka. Najčešće se koristi metoda MEBAK 2.19.1.2.

Koristeći turbidimetar (slika 5.) određuje se bistrina filtriranog piva pod kutem 90° i 25° sa infracrvenim izvorom svjetlosti, valne duljine $650 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$. Mjerenje se izvodi propuštanjem snopa crvene svjetlosti kroz uzorak u kivetu te detektor mjeri količinu svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. Pod kutem od 90° se detektiraju sitne čestice veličine $0.1 - 0.5 \text{ }\mu\text{m}$ (koloidi, proteini, ugljikohidrati), a pod kutem od 25° čestice od $0.5 - 5 \text{ }\mu\text{m}$ (kvasci, bakterije, talog, ostaci dijamomejske zemlje).

Uzorak piva temperira se na 20°C i prije početka mjerenja se ukloni CO_2 . Uzorak se stavlja u odgovarajuću kivetu za mjerenje bistrine pazeći da se pri tome ne formira pjena. Stupanj bistrine u uzorku se ubrzo prikaže na ekranu, a izražava se u EBC (European Brewery Convention) jedinicama koje se koriste za mjerenje intenziteta boje piva, ali pruža informacije i o bistrini/mutnoći piva (Mebak, 1997).



Slika 5. Turbidimetar (autor Ivana Šeketa).

2.3.3. Određivanje ukupnog kisika i CO₂ u pakiranju

Određivanjem ukupnog kisika i CO₂ u pakiranju ključno je zbog okusa piva, ali i stabilnosti proizvoda tijekom skladištenja, te mogu znatno skratiti rok trajanja proizvoda.

TPO (Total package oxygen) ili ukupni kisik u pakiranju i CO₂ mjere se u gotovom proizvodu u boci ili limenci najčešće koristeći TPO/CO₂ uređaj.

Kisik nije poželjan u većoj količini u proizvodu kako ne bi došlo do oksidacije piva, čime se narušavaju organoleptička svojstva piva. Zbog toga se sadržaj kisika mora mjeriti tijekom procesa u tlačnim spremnicima i na ulazu u punionu. Uloga CO₂ u pivu je gaziranost i pjenušavost i povećanje trajanja piva. Niske razine CO₂ u pivu mogu rezultirati smanjenjem svježine proizvoda i premaloj karbonizaciji.

Obično se kisik i CO₂ u pogonu mjere pomoću Haffmans uređaja, dok se u laboratoriju mjere većinom pomoću uređaja za mjerenje TPO i CO₂ (slika 6.) koji je jako precizan i s njim se mjeri samo gotov proizvod. Ukupni kisik (TPO) je zbroj DO i HSO. Koncentracija otopljenog kisika (DO – Dissolved oxygen) u gotovom proizvodu ne bi smjela biti veća od 0,5 ppm. Na uređaju se mjeri i HSO – Oxygen in Headspace, što predstavlja kisik koji se nalazi u grliću boce. Mjerenje se provodi automatski na način da senzor ulazi u zatvorenu bocu bušenjem čepa

ili poklopca. Optički senzor prvo mjeri kisik u headspace-u zatim u tekućini, te se također mjeri i temperatura te volumen headspace-a. Ukupni kisik u pakiranju (TPO) i CO₂ mjere se istovremeno na istoj boci.

Mjerenje se mora obaviti unutar sat vremena nakon punjenja piva, dužim stajanjem piva količina kisika će biti niža. Uređaj mora biti spojen na dušik i ventil kojim se može podesiti tlak koji bi trebao biti konstantan između 2,5 – 4,5 bara. Početak mjerenja započinje odabirom vrste proizvoda iz izbornika, ovisno o veličini boce i vrsti piva. Bocu ili limenku je zatim potrebno promiješati horizontalnim pokretima otprilike 10 puta. Odmah nakon toga postavi se boca u uređaj i pokrene se mjerenje.



Slika 6. Uređaj za mjerenje TPO i CO₂ (autor Ivana Šeketa).

2.3.4. Određivanje koloidne stabilnosti piva

Sedam dana test (eng. Forcing test) koristi se za određivanje koloidne stabilnosti piva. Zamućenje piva može biti posljedična reakcija koloidnih čestica koji su prirodni sastojci piva (proteini i polifenoli) nakon dužeg vremena skladištenja. Prolazno zamućenje nastaje kada se pivo čuva u hladnjaku gdje se molekule koloidnih sastojaka piva međusobno povezuju tvoreći nestabilne veze i pivo se zamuti. Pivo se izbistri kada se izvadi iz hladnjaka i zagrije na sobnoj temperaturi zato što nestabilne veze pucaju. Onda kada prolazno zamućenje vremenom prelazi u trajno zamućenje dolazi do nastanka starosne mutnoće (Marić 2009).

Metoda sedam dana test temelji se na mjerenju bistrine piva, koja je inducirana pomoću forsir testa u laboratoriju i daje ranu indikaciju o koloidnoj stabilnosti piva. Kako bi se ocijenila koloidna stabilnost piva do isteka roka trajnosti, reakcije između reaktivnih komponenti se ubrzavaju tj. forsiraju zagrijavanjem piva na povišene temperature (oko 60°C) i nakon toga hlade i mjeri se mutnoća. Ova metoda je pokazatelj kako će se pivo ponašati tijekom dužeg skladištenja na sobnoj temperaturi i pokazatelj je predviđenog roka trajnosti piva. Metoda je primjenjiva za većinu tipova piva, do 50 EBC jedinica.

Uzorak piva, odnosno gotov proizvod stavi se u vodenu kupelj u forsir uređaj (slika 7.) i drži se 7 dana na 57°C. Nakon sedam dana, boce se ohlade na sobnoj temperaturi kroz 3 sata, zatim na 0°C i drže se 24 sata, te se očita bistrina na turbidimetru. Za održavanje na 0°C dodaje se povremeno 96%-tni alkohol. Boce se moraju pažljivo izvaditi iz kupelji po jedna ili dvije kako se ne bi dodatno zagrijavale (Mebak, 1997).



Slika 7. Forsir uređaj za određivanje koloidne stabilnosti piva (autor Ivana Šeketa).

2.3.5. Određivanje stabilnosti pjene

Pjena je jako važna za pivo jer ima ulogu zadržavanja okusa i arome, stoga je ova analiza važna i za postizanje željenog izgleda piva, ali i okusa. Kvalitetna pjena trebala bi se zadržati na površini neko vrijeme nakon točenja piva. Pjena sadrži mjehuriće ugljikovog dioksida, a formira se tijekom točenja iz boce ili limenke u čašu. Nedovoljna količina pjene utječe na manjak arome i okusa, te na ukupni doživljaj piva kada se konzumira.

U pivarskoj industriji, pjena se mjeri pomoću uređaja Nibem prikazanog na slici 8. koji ima pokretnu elektrodu sa dugim iglama koje mjere brzinu opadanja razine pjene u sekundama, a koristi se metoda MEBAK, 2.23.1. (Mebak, 1997).

Što je veća vrijednost bolja je trajnost pjene npr. 220 je loša trajnost, preko 260 je dobra trajnost i do 300 sekundi je vrlo dobra trajnost (Marić, 2009). Uređaj sadrži optičke senzore za mjerenje stabilnosti pjene. Princip rada mjerača temelji se na mjerenju gustoće i viskoznosti tekućine kako bi se procijenila stabilnost pjene.

Prije početka mjerenja uzorci boca, limenki ili PET-a moraju biti temperirani na 20°C. Temperatura je izuzetno važan faktor jer čak i mala odstupanja mogu rezultirati značajnim

promjenama tijekom mjerenja jer $\pm 1^{\circ}\text{C}$ može uzorkovati razlike u stabilnosti pjene za oko ± 4 sekunde.



Slika 8. Nibem uređaj (autor Ivana Šeketa).

2.3.6. Određivanje nivoa napunjenosti piva

Automatski punjač piva u punionici dozira određenu količinu piva u bocu i postrojenje za punjenje ima svoj sustav kontrole razine napunjenosti kontrolnim vagama ili sustavom za vizualnu kontrolu koji koriste kamere i softver za kontrolu, a sadržaj mora biti jasno vidljiv u ambalaži.

Unatoč automatskim kontrolama napunjenosti u punioni, potrebno je dodatno kontrolirati nivo napunjenosti jer postoji mogućnost previše napunjenog piva u boci ili premalo zbog mehaničkih poteškoća koje se mogu dogoditi tijekom punjenja. Određivanje nivoa napunjenosti piva je analiza koja se primjenjuje za gotov proizvod u boci, a osim u pivovari većina prehrambenih i farmaceutskih industrija ima neku vrstu dodatne kontrole napunjenosti tekućine. Ova analiza osim kvalitete osigurava i zadovoljstvo potrošača jer nedostatak ili višak napunjenosti piva može utjecati na okus i sam izgled piva u boci.

Postupak određivanja nivoa napunjenosti je kratkotrajan, prvo se izvažu pune boce sa čepom. Nakon vaganja punih boca iste boce se otvore i izlije se pivo, te se boce okrenu naopačke kako bi se cijedilo. Kada se sadržaj iz boce iscijedio, važu se prazne boce sa čepom. Na ovaj način izvaže se oko 10 boca sa čepom.

Nivo napunjenosti računa se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Volumen napunjenosti boce} = \frac{m_1(\text{puna boca}) - m_2(\text{prazna boca})}{\text{specifična težina boce}} \text{ (mL)}$$

Specifična težina boce dobiva se mjerenjem na modularnom Anton Paar uređaju.

2.4. INSTRUMENTALNE METODE ANALIZE

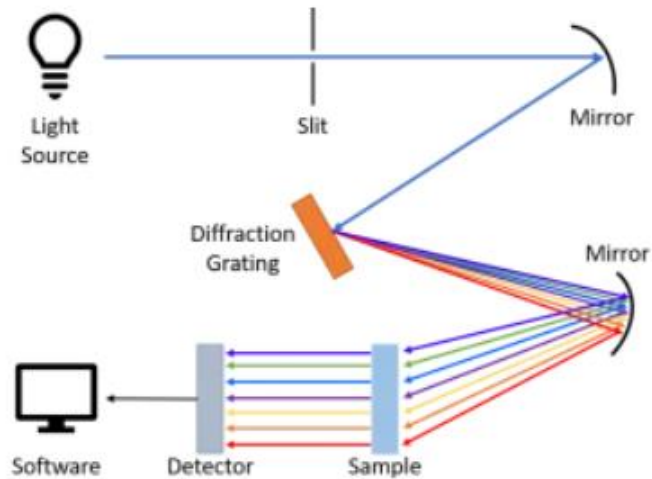
2.4.1 Primjena spektroskopije u pivarstvu

Spektroskopija je jako poznata i često korištena analitička tehnika koja se temelji na interakciji tvari s ultraljubičastim, vidljivim i infracrvenim zračenjem (elektromagnetskim zračenjem). Elektromagnetsko zračenje prolazi kroz tvar, i tvar apsorbira elektromagnetsko zračenje i dolazi do promjene energije (Anonymus, 2022). Optička spektroskopija koristi se u različitim područjima kao što je kemija, fizika, medicina i forenzika.

Spektrofotometri su tako uređaji koji mjere apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Za izvor svjetlosti se koristi lampa sa volframovom niti, a za ultraljubičasti dio spektra koristi se deuterijeva lampa. Glavne komponente spektrometra su ulazni prorez, rešetka i detektor. Ulazni prorez služi kako bi svjetlost ušla i veličina proreza određuje koju količinu svjetlost može instrument izmjeriti. Ukoliko je prorez manji bolja je rezolucija spektrometra. Zrake se usmjeravaju prema rešetki, te ona dijeli svjetlost na njene sastavne valne dužine. Snop postaje opet divergentan nakon što se reflektira od rešetke pa udara u drugo ogledalo kako bi se usmjerio na detektor. Detektor služi za hvatanje svjetlosnih spektra i mjeri intenzitet svjetlosti. Sastoji se od fotoćelije koja služi kao senzor (Tomljanović, 2000).

U praksi se spektrofotometar često koristi za mjerenje koncentracije otopljenih tvari u otopini procjenom količine svjetlosti koju otopina apsorbira unutar kivete postavljene unutar spektrofotometra.

UV-vidljivi spektrofotometar je tip uređaja koji koristi svjetlost u ultraljubičastom (UV) području (185-400 nm) i vidljivom području (400-700 nm) elektromagnetskog spektra. Koristi se za analizu obojenih spojeva i određivanje njihove koncentracije u otopini. Dok infracrveni (IR) spektrofotometar radi pomoću svjetlosti u infracrvenom rasponu (700-1500 nm) elektromagnetskog spektra, te se koristi za analizu tvari koje apsorbiraju infracrveno svjetlo, i pritom daju informacije o funkcionalnim skupinama i molekularnim strukturama.



Slika 9. Princip rada spektrometra (Izvor: <https://wavelength-oe.com/bs/articles/what-is-a-spectrometer/>)

U pivarstvu se npr. najčešće koristi UV- spektrofotometar za određivanje koncentracije tvari u otopini, i za mjerenje boje. UV spektroskopija koristi svjetlost u intervalu od 200 – 400 nm kako bi se izmjerilo koliko svjetlosti uzorak apsorbira i kako bi se odredila koncentracija tvari u uzorku.

Primjer korištenja ove metode je određivanje boje piva (EBC) koja se mjeri na 430 nm u kvarcnoj kivetu. Svaki uzorak se otplini od CO₂, temperira na 20°C i filtrira preko naboranog filter papira. Prije početka mjerenja uzorka, potrebno je napuniti kivetu s destiliranom vodom i namjestiti apsorbanciju na 0,000 tj. nulirati. Nakon toga ispere se kiveta sa uzorkom, ponovno napuni do vrha i očita se apsorbancija na 430 nm. Spektrofotometar se u laboratoriju u pivarskoj industriji također koristi se za mjerenje gorčine i polifenola (slika 10.).



Slika 10. Spektrofotometar (autor Ivana Šeketa)

2.4.1.1 Određivanje polifenola u pivu spektrofotometrom

Polifenoli su molekule koje sadrže jedan ili više aromatskih prstena i dvije ili više hidroksilnih skupina pripojenih za aromatski prsten. Nalaze se u skoro svim biljakama i biljnim namirnicama. Prema kemijskoj strukturi mogu se podijeliti na: fenolne kiseline, flavonoide, tanine (kondezirani i hidrolizirani) te ostale polifenolne spojeve (lignani, kumarini). Fenolni spojevi su značajni antioksidansi koji se nalaze i u pivu. Pivo je bogato različitim skupinama polifenola od kojih su najznačajniji tanini (posebice u tamnim pivima), fenolne kiseline, flavoni i flavonoli i proantocijanidini. Većina polifenola u pivu dolazi iz slada (oko 70%), ali i 30% dolazi iz hmelja, taj udio može varirati ovisno o načinu uzgoja hmelja i sorti (Collin i sur., 2013).

Polifenoli u pivu doprinose značajno okusu i aromi, također mogu utjecati i na koloidnu stabilnost piva. Što se tiče svijetlih lager piva, sadržaj polifenola se kreće od 100 – 200 mg/L, pšenična piva imaju od 100 do 250 mg/L, ale piva od 150 do 300 mg/L, indian pale ale imaju

od 250 do 450 mg/L i stout/porter vrste piva imaju od 200 do 400 mg/L polifenola (Lugasi, 2003). Određivanje polifenola u pivu temelji se na spektrofotometrijskoj metodi MEBAK 2.21.1.

U lužnatoj sredini polifenoli reagiraju sa željeznim (III) ionima uz nastajanje obojenih kompleksa, dobivena smeđa boja mjeri se spektrofotometrijski. Kod ove metode koristi se EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) i CMC (karboksimetil celuloza), otopina amonijevog željezo (III) – citrata i otopina amonijaka.

Svi uzorci piva se moraju osloboditi od CO₂. Polugotov proizvod koji je mutan npr. sladovina ili pivo sa vrenja se centrifugira. Zatim slijedi glavna proba gdje se u odmjernu tikvicu doda 10 ml uzorka i 8 mL CMC-EDTA i promiješa. U istu odmjernu tikvicu doda se željezov reagens, dobro se promiješa i doda se 25 ml destilirane vode. Razrijeđena otopina amonijaka (0,5 ml) se doda u istu tikvicu i dobro promiješa. Nakon 10 minuta izmjeri se apsorbancija na 600 nm na spektrofotometru. Slijepa proba radi se paralelno uz glavnu probu, a postupak je isti (Mebak, 1997).

Ukupni sadržaj polifenola računa se prema formuli :

$$P = A \times 820 \times F$$

P – označava ukupni sadržaj polifenola (mg/l)

A – apsorbancija kod valne duljine 600 (nm)

F – faktor razrijeđenja

Polifenoli u pivu kreću se u rasponu od 150 – 200 (mg/L) što su normalne vrijednosti. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola u pivu važno je zbog negativnih učinaka na stvaranje mutnoće i stabilnost piva, ali i pozitivnih učinaka na antioksidacijsku aktivnost.

2.4.1.2. Određivanje gorčine piva

Gorčina u pivu potječe od izo- α kiselina iz hmelja, koje nastaju prilikom kuhanja hmelja u sladovini. Osim izo- α kiselina iz hmelja, gorčinu daju i oksidacijski produkti β -kiselina. Određuje se zakiseljavanjem uzorka sa HCl, i ekstrakcijom gorkih kiselina sa izo-oktanom te se mjeri spektrofotometrijskom metodom (Marić 2009).

Uzorak se mjeri na spektrofotometru i mjeri se apsorbancija pri 275 nm pri čemu količina apsorpcije određuje razinu gorčine u uzorku (Rodammer, 2024). Ova metoda može se odrediti na sve vrste piva i radlera, odnosno koristi se metoda MEBAK 2.22.1. (Mebak, 1997).

Izražava se u IBU jedinicama (International Bitterness Units), te što je veći broj IBU veća je i gorčina piva. Treba uzeti u obzir da bude optimalna gorčina u pivu, niti preniska jer rezultira manje izraženiji okus, a visoka gorčina može preuzeti druge karakteristike piva i aromu.

Priprema uzorka sastoji se od bistrenja mutnih uzoraka centrifugiranjem 15 minuta, i nakon centrifugiranja pivo se temperira na 20°C, otplini i tu je bitno izbjeći gubitak pjene jer je bogata gorkim spojevima više nego pivo. Zatim se u odmjernu tikvicu odpipetira 10 ml prethodno pripremljenog uzorka, 1 ml HCl i 20 ml izo-oktana. Tikvica se zatvori staklenim čepom i stavi na mehaničku mješalicu na miješanje 5 minuta (slika 11.). Kada se završi miješanje, pusti se još 10 minuta da se istaloži uzorak ili se stavi na centrifugu (slika 12.) ako je potrebno. Čisti i bistri izo-oktanski sloj prebaci se u suhu malu tikvicu sa čepom te se stavi u mrak na 30 minuta prije početka mjerenja apsorpcije. Uzorak se nakon 30 minuta pažljivo odpipetira u kvarcnu kivetu i započne se mjerenje iako se prije uzorka mora kalibrirati čistim izo-oktanom te ukoliko je kalibracija u redu može se staviti idući uzorak (Mebak, 1997).



Slika 11. Mehanička mješalica (autor Ivana Šeketa).



Slika 12. Centrifuga (autor Ivana Šeketa).

2.4.2. Primjena plinske kromatografije u pivarstvu

Plinska kromatografija (eng. Gas Chromatography, GC) je kvantitativna analitička metoda koja se temelji na razdvajanju i detekciji hlapljivih organskih spojeva i nekih anorganskih plinova iz smjese. Vrlo je raširena metoda u farmaciji, prehrambenoj industriji i medicini. Plinsku kromatografiju predstavili su Archer J. P. Martin i Anthony T. James oko 1950–te godine u Londonu, a 10 godina prije Archer J. P. Martin ju je tada izumio kada je sa Synge-om predložio da se korištenjem pare kao mobilne faze mogu razdvajati hlapljive komponente. (Piantanida i Barron, 2014).

2.4.2.1. Metoda plinske kromatografije i uređaj

Plinska kromatografija je tehnika razdvajanja tj. separacije u kojoj se komponente uzorka razdjeljuju između mobilne plinske faze i stacionarne faze. Za mobilnu fazu koristi se plin dušik, helij ili vodik, a stacionarnu fazu predstavlja tekućina ili neka krutina. Plin nositelj (dušik, helij ili vodik) bi trebao imati čistoću od 99,998% i tlak od 30 - 60 kPa jer bi u suprotnom mogao utjecati na kvalitetu provedbe same analize. Spojevi koji se mogu analizirati plinskom kromatografijom su spojevi koji se ne razgrađuju na temperaturi isparavanja, spojevi

koji imaju visoko vrelište (do 400 °C) i spojevi koji se razgrađuju na temperaturi isparavanja (uvijek istom količinom, piroliza GC) (Shimadzu, 2024).

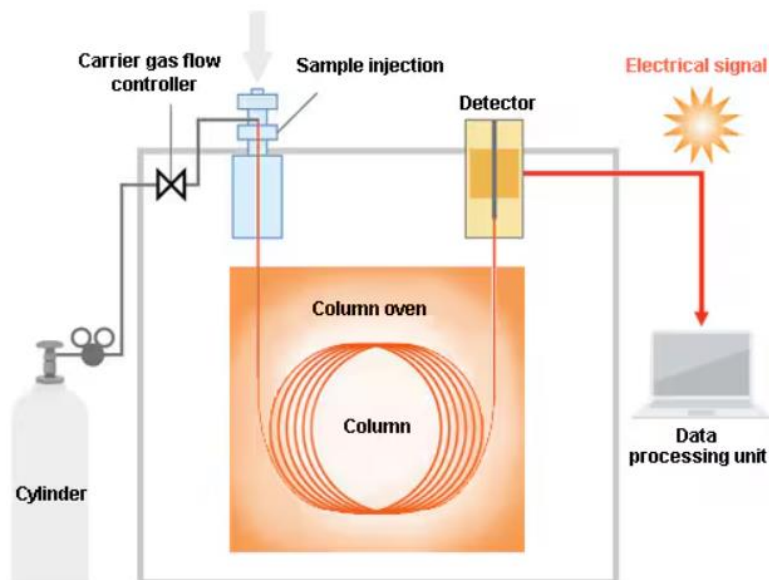
U pivarskoj industriji najviše se koristi plinska kromatografija (GC). Glavne stavke ove metode za separaciju komponenata su injektiranje uzorka, separacija uzorka na komponente i detekcija komponenata u smjesi (EBC Ann.9.39, 9.24.2).

Na početku kromatografa nalazi se injektor koji služi za injektiranje tj. uvođenje uzorka u kolonu pomoću plina nositelja. Uvođenjem uzorka u kolonu, uzorak se miješa sa plinom, ali plin nema interakciju sa uzorkom zato što je inertan. U injektoru uzorak postaje hlapljiv i isparava. Separacija uzorka na komponente odvija se u kromatografskoj koloni. Postoje punjene i kapilarne kolone, a razlika je u unutrašnjem promjeru i duljini. Kapilarne kolone su bolje za neke složenije smjese, brže su i učinkovitije, dok su punjene ekonomski isplativije jer su pogodnije za veći broj uzoraka i jeftinije su (Piantanida i Barron, 2014).

Detektor prepoznaje spojeve u uzorku te ih pojača i prevodi ga u električni signal. Postoji jako puno vrsta detektora, ali najviše se koriste plamenoionizirajući detektor (FID – Flame Ionization Detector), detektor apsorpcije elektrona (ECD – Electron Capture Detector), i detektor toplinske vodljivosti (TCD – Thermal Conductivity Detector). FID detektor se koristi za određivanje koncentracije hlapljivih spojeva koji sadrže ugljik. Plamenoionizirajući detektor FID proizvodi vodikov plamen izgaranjem vodika i zraka, ugljik koji plin nositelj odvodi u detektor oksidira se plamenom vodika što uzrokuje reakciju ionizacije. Rezultati su gotovi za otprilike 30 minuta po jednom uzorku (Anonymus, 2024).

TCD se koristi za detekciju anorganskih spojeva i komponenti koje FID ne detektira. Detektira komponentu na principu mjerenja promjene temperature filameta koju uzrokuje razlika u toplinskoj vodljivosti plina nosača i komponente.

ECD detektira ione mjereći promjenu napona, te što je jača elektronegativnost elementa, veća je i osjetljivost detektora. Ovaj detektor učinkovit je u detekciji spojeva koji sadrže sumpor, kisik, amine, karbonile i halogene elemente. Svaki detektor kada detektira komponentu šalje električni signal na računalo, koji se bilježi kao pik na kromatogramu. Potrebno je oko 16 minuta po uzorku kako bi rezultati bili gotovi.



Slika 13. Shematski prikaz plinskog kromatografa (Izvor: Shimadzu, 2024.)

U pivarskoj industriji, najviše se koriste FID detektor koji služi za detekciju acetaldehida, dimetilsulfida, estera i viših alkohola u pivu, i ECD koji detektira diacetil i 2,3 – pentadion u pivu. To su spojevi koji nastaju tijekom fermentacije, osim acetaldehida koji se razgrađuje daljnjim koracima fermentacije. Ovi spojevi mogu uvelike utjecati na aromu i okus piva stoga se moraju pratiti u fazama proizvodnje piva. Koncentracija diacetila je kriterij za ocjenu dozrelosti piva, te u koncentraciji od 0,20 (mg/L) daju pivu slatkast i odbojan okus koji u još višim koncentracijama prelazi u miris po maslacu (Marić, 2009).

Acetaldehid se u mladom pivu skuplja tijekom vrenja prva tri dana u koncentraciji od 20 – 40 (mg/L), a daje pljesniv okus mladog piva. Dozrijevanjem se koncentracija acetaldehida smanjuje na 8 – 10 (mg/L). Dimetilsulfid (DMS) daje miris po kuhanom povrću i plijesni, a koncentracija mu se ne mijenja tijekom vrenja, stoga je jako važno da mu koncentracija u sladovini bude što niža, a tipičan raspon detekcije za DMS je 0.01 – 0.2 (mg/L).

Viši alkoholi su sastojci arome gotovog piva, lager piva ih sadrže od 60 – 90 (mg/L) , a veću koncentraciju (>100 mg/L) ih sadrže ale piva (Marić, 2009). Različitih estera u pivu ima više od 60 vrsta, a najzastupljeniji je etil acetat (8 – 10 mg/L). Optimalna razina estera u ale pivu je 80 (mg/L), a u lager pivu 60 (mg/L).

Plinska kromatografija je važna precizna metoda detekcije prethodno navedenih parametara kako bi se kontrolirano pratio proces proizvodnje i dozrijevanja piva.

Kada se pripremaju uzorci, moraju biti prije pripreme u hladnjaku na temperaturi od 2°C - 6°C. Za gotov proizvod u staklenu bocu od 500 ml doda se 2 ml hladne radne otopine ISTD (interni standard), koji se priređuje sa stock otopinom (99,9 % etanol, 1- butanol, 4- heptanon, 2,3- heksadion) i matrixom (99,9 % etanol + destilirana voda), i 250 ml hladnog neotplinjenog piva, zatim odstoji 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ukoliko pivo ima više od 6 – 9% (V/V) alkohola mora se nadopuniti vodom i upisati faktor razrjeđenja u GC ovisno o vrsti piva, tj. količini alkohola. Ukoliko pivo ima manji postotak alkohola, od 0 – 4% (V/V) u menzuru se doda 99,9 % -tnog etanola ovisno o količini alkohola u uzorku piva.

Za polugotov proizvod također prema vrsti piva i količini alkohola u pivu radi se razrjeđenje sa vodom, ili ako ima manje alkohola doda se etanol. Kada se uzorak pripremi, vezano za polugotov proizvod npr. pivo sa odležavanja ili vrenja, centrifugira se 10 minuta na 1600 okretaja, kako bi se uklonio kvasac. Tako pripremljeni uzorak može se čuvati jedan dan u hladnjaku. Tijekom pripreme uzroka stavi se prazna zatvorena vijala za GC zbog provjere hlapivih komponenata u zraku.

Sladovina se ne treba centrifugirati, doda se samo 250 ml uzorka i 2 ml ISTD otopine.

Pivo iz BBT-a odnosno filtrirano pivo radi se na isti način kao gotov proizvod i može se čuvati 2 dana.

Nakon pripreme uzorka, otpipetira se 10 ml uzorka u odgovarajuće vijale za GC. Nakon toga, upisuje se uzorak na GC uređaj ovisno o FID ili ECD analizi. Zatim se nakon upisa uzorka, pokrene sekvenca. (Interni materijali pivovare Heineken Hrvatska)

Rezultati se određuju integriranjem površine ispod pika.

Izračun omjera površine pika se računa prema formuli :

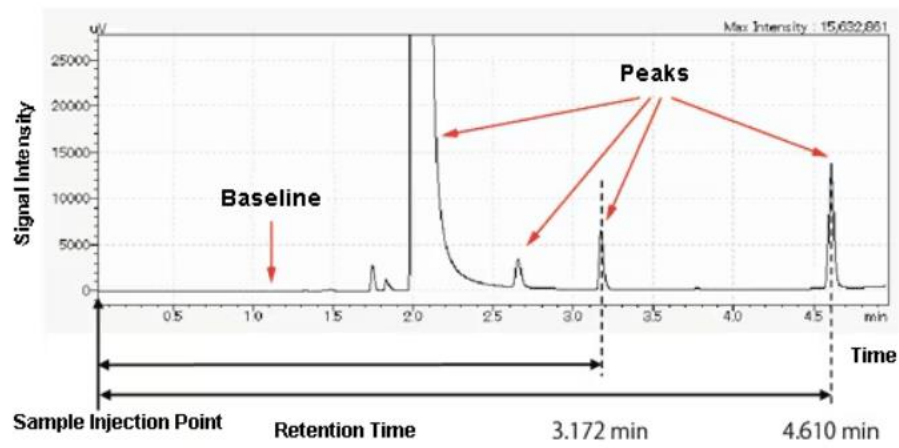
$$Omjer_{konc.} = \frac{površina_{konc}}{površina_{ISTD}}$$

gdje je: $Omjer_{konc}$ = omjer komponenti

$Površina_{konc}$ = površina pika komponente od interesa

$Površina_{ISTD}$ = površina pika internog standarda.

Analysis Results—Chromatogram



Slika 14. Primjer rezultata i pikova na kromatogramu (Izvor: Shimadzu, 2024)

3. ČIŠĆENJE I KALIBRACIJA UREĐAJA

Čišćenjem uređaja nakon svakog mjerenja ili na kraju smjene, ovisno o kojem se uređaju radi važno je za održavanje njihove funkcionalnosti, ali bitno je i za pouzdanost rezultata. Kada se kupi novi uređaj uz koji se dobije certifikat o prvoj kalibraciji, dobije se ispravan i kalibriran uređaj, međutim tijekom nekog vremena i upotrebe uređaja može doći do odstupanja u točnosti mjerenja, a osnovni cilj kalibracije je osiguranje ujednačenosti mjerenja. Tijekom radnog vijeka uređaja, preciznost mjerenja opada zbog promjena temperature, tlaka, vibracija ili mehaničkog trošenja.

Kalibracijom se potvrđuje točnost i preciznost industrijskih instrumenata i uređaja. Pojedini uređaji zahtijevaju tjednu ili mjesečnu kalibraciju koju može provoditi odgovorna osoba za taj uređaj, dok se za svaki uređaj provodi kalibracija i servis jednom godišnje i to obavlja ovlašteni serviser. Kalibracija se ostvaruje na način da se direktno uspoređuje sa standardom ili certificiranim referentnim materijalom, a provjerava se ispravnost mjernog uređaja (Oruč i sur., 2019).

Modularni uređaj za određivanje fizikalno-kemijskih parametara piva se čisti tako da se nakon svakog mjerenja stave po dvije čašice vode kako bi isprale cjevčicu kroz koju prolazi pivo, jer bi u suprotnom moglo doći do začepjenja. Na kraju radnog dana, stavi se jedna čašica 20% -tnog Mucasola, tri čašice vode i odabere se na ekranu „rinsing“.

Čišćenje pH metra je jednostavno, elektroda se nakon svakog mjerenja ispere redestiliranom vodom i obriše, te ju je za vrijeme mirovanja potrebno držati u otopini KCl. Kalibracija pH metra provodi se jednom tjedno, može je obaviti odgovorna osoba koja radi na tom uređaju. Uređaj se kalibrira koristeći dvije standardne vrijednosti kako bi se provjerila preciznost (Interni materijali Heineken Hrvatska).

Turbidimetar se čisti ispuštanjem vode iz uređaja svakog dana nakon zadnjeg mjerenja, i prije svake kalibracije. Prije početka mjerenja svakog dana kalibrira se sa destiliranom vodom gdje vrijednosti moraju biti 0.0.

TPO i CO₂ uređaj čisti se vodom i 97 % -tnim alkoholom. Kalibracija senzora kisika odvija se automatski prilikom početka svakog mjerenja. Ako se mjerenje zaustavi, senzor se mora očistiti. Mjerna sonda čisti se destiliranom vodom i alkoholom kada se sonda spusti prema

dolje i tapka se mekanom krpom 10 puta vertikalnim pokretom. Mehanički ventil čisti se jednom dnevno, skidanjem ventila i ispranjem toplom vodom.

Forsir uređaj za mjerenje 7 dana test čisti se tako da se ispusti voda i ukoliko nastanu naslage ručno se operu. Nije potrebna dnevna ili mjesečna kalibracija za ovaj uređaj ukoliko je sve u redu.

Nibem mjerač pjene prije mjerenja se treba iskalibrirati tako da se standardna odgovarajuća čaša u kojoj se mjeri pjena napuni hladnom vodom iz slavine i stavi u centar ispod elektroda i pritisne gumb za kalibraciju i start. Uređaj se čisti sa otopinom natrijeva karbonata i destilirane vode.

GC kalibracija se vrši 4 puta godišnje, koristeći ampulu za kalibraciju. Ukoliko je potrebno kalibracija se radi i prije npr. ako je velika razlika u rezultatima kontrolnog piva. Ampula za kalibraciju sastoji se od estera i alkohola kalibracijskog mixa. Kada se ampula izvadi iz zamrzivača otvori se i sav sadržaj premjesti u vijalu za GC. Kada se dostigne temperatura oko 18°C kalibracijski mix je spreman. Uzorci za kalibraciju se pripreme sa hladnim etanolom dodaju se iz menzure u staklenu bocu i u svaku bocu doda se kalibracijski mix. Nakon toga tako pripremljeni uzorci premjeste se oko 10 (ml) u vijalu za GC, i unesu podatci u software te se pokrene kalibracija.

4. ZAKLJUČAK

Proizvodnja piva je složen i dugotrajan proces, te postoji niz parametra koji se moraju pratiti od samog početka, preko polugotovog proizvoda do gotovog proizvod. Fizikalno – kemijske analize, odnosno fizikalno-kemijski parametri imaju ključnu ulogu u proizvodnji piva, budući da se kontroliraju od početka do kraja procesa kako bi se na vrijeme mogle ukloniti eventualno nastale poteškoće, s ciljem dobivanja željenog proizvoda određenih specifikacija. Neki od najčešćih parametra koji se određuju fizikalno – kemijskim analizama u pivarstvu su volumni udio alkohola, boja, CO₂, gorčina, pH, pjena i bistrina. Ovi parametri su ključni za održavanje visoke razine kvalitete i dosljednosti proizvoda jer utječu na okus, miris, te u konačnici i na izgled piva. Fizikalno – kemijske analize mogu također pomoći u otkrivanju neželjenih spojeva u pivu kao što su npr. ostaci kiseline ili lužine za pranje cjevovoda.

Plinska kromatografija je metoda koja se koristi u raznim područjima kao što je farmacija, prehrambena industrija, kemijska i druge. Kroz separaciju komponenata uzorka pruža precizne informacije o sastavu spojeva koji se nalaze u uzorku. U pivarstvu to su produkti fermentacije diacetil i 2,3-butandiol. Važno je postići niske koncentracije ovih komponenti zato što mogu biti glavni off – flavori piva. Također određuje se i sastav estera, viših alkohola i DMS-a.

Spektroskopske metode u pivarstvu imaju važnu ulogu u kontroli kvalitete i najčešće se primjenjuje UV-vidljiva spektroskopija i to za određivanje boje, gorčine i koncentracije polifenola u uzorcima piva.

Redovito čišćenje i kalibracija uređaja za fizikalno – kemijske analize ključni su za dobivanje točnih i preciznih rezultata.

5. LITERATURA

1. Anonymus (2022): Spektroskopija u prehrambenoj industriji, Hanna Instruments, Hrvatska (Izvor: <https://blog.hannaservice.eu/hr/spektroskopija-u-prehrambenoj-industriji/>, pristupljeno 26.03. 2024.).
2. Anonymus (2024): Detektor plinske kromatografije, (<https://antiteck.com/hr/detektor-plinske-kromatografije-2/#headline-1345-2357>, pristupljeno 14.4.2024)
3. Amić D. (2008): Organska kemija za studente agronomske struke, Zagreb.
4. Beer month club (2024): Lager Beer Styles, (<https://www.beermonthclub.com/beer-style-guide-lagers>, pristupljeno 8.5.2024)
5. Jurić A., Ćorić N., Odak A., Herceg Z., Tišma M. (2015) : Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions, Wiley Online library, 541 – 547
6. Bamfort, C.W., Russel, G., Stewart, A. (2008): Beer: A Quality Perspective - A Volume of the Handbook of Alcoholic Beverages Series (Russell, G., Bamforth, C.W., Stewart, A., ured.), Elsevier, Amsterdam.
7. Berend S., Grabarić Z. (2008): Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Arhiva higijene rada, 59, 205-212.
8. Bolf, N. i Dorić, H. (2015): Mjerenje i regulacija pH (I. dio), *Kemija u industriji*, 64 (9-10) 578–580.
9. Collin, S., Jerkovic, V., Brohan, M., Callemien, D. (2013): Polyphenols and Beer Quality, Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_78.
10. Fachverlag Hans Carl Nürnberg, (2004): European Brewery Convention; Analytica - EBC
11. Hrvatska enciklopedija (2021), <https://www.enciklopedija.hr/clanak/pivo>, (5.3.2024)
12. Interni materijali pivovara Heineken, Hrvatska.
13. Lugasi, A. (2003): Polyphenol content and antioxidant properties of beer, *Acta Alimentaria*, 32 (2) 181-192.
14. Marić, V. (2009) : Tehnologija piva, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
15. MEBAK-Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision Brautechnische Analysenmethoden, Bd. I, 3, izdanje, str. 89-90, 1997.

16. Oruč, M., Muminović, B., Agić, D. (2019): Značaj kalibracije uređaja, Metalurško-tehnološki fakultet, Univerzitet u Zenici,
https://www.researchgate.net/publication/331014833_ZNACAJ_KALIBRACIJE_UR_EDAJA_THE_IMPORTANCE_OF_THE_CALIBRATION_OF_DEVICES
17. Piantida, A.G., Barron, A.R. (2014): Principles of Gas Chromatography OpenStax-CNX.
18. Roddamer, N. (2024): The Effect of Post-Boil/Whirlpool Hop Additions on Bitterness in Beer, izvor: <https://www.homebrewersassociation.org/how-to-brew/effect-post-boilwhirlpool-hop-additions-bitterness-beer/> , pristupljeno 15.3.2024).
19. Tomljanović, M. (2000): Instrumentalne kemijske metode I dio, Hijatus, Zenica. ISBN 9958 – 716 – 03 – 8.
20. Shimadzu (2024): What is gas chromatography
<https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/>, (pristupljeno, 09.4.2024)