

# FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KVALITETE ALE I LAGER PIVA NAKON REFERMENTACIJE KORIŠTENJEM RAZLIČITIH ŠEĆERA

---

Hursa, Rene

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:128:302354>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



**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 PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENATEHNOLOGIJA**  
**PIVARSTVO**

**RENE HURSA**

**FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KVALITETE ALE I**  
**LAGER PIVA NAKON REFERMENTACIJE KORIŠTENJEM**  
**RAZLIČITIH ŠEĆERA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2024.**



**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Pivarstvo

Rene Hursa

**Fizikalno-kemijski parametri kvalitete ale i lager piva nakon  
refermentacije korištenjem različitih šećera**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić, prof. struč. stud.

Broj indeksa studenta: 0314620001

Karlovac, 11. rujan 2024.

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Rene Hursa**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KVALITETE ALE I LAGER PIVA NAKON REFERMENTACIJE KORIŠTENJEM RAZLIČITIH ŠEĆERA** 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, 11. rujana 2024.

Rene Hursa

---

## 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-KEMIJSKI PARAMETRI KVALITETE ALE I LAGER PIVA NAKON REFERMENTACIJE KORIŠTENJEM RAZLIČITIH ŠEĆERA

*Rene Hursa*

Rad je izrađen u Grif mikropivovari, K pivovari d.o.o.

Mentor: Dr.sc. Goran Šarić, prof. struč. stud.

#### Sažetak

Pivo je karbonizirano piće, a za otapanje ugljikovog dioksida u pivu se mogu koristiti različite metode. Jedna od njih je refermentacija ili sekundarna fermentacija, a može se odvijati u tlačnim tankovima, *caskovima* ili bačvama, te bocama. U eksperimentalnom dijelu završnog rada korištena je metoda refermentacije piva u bocama, uz korištenje saharoze, dekstroze i suhog ekstrakta slada, a provodila se na pivima gornjeg i donjeg vrenja. Sladovina je proizvedeno na *homebrew* opremi, podijeljena je u dva fermentora te su njih nacijepljeni različiti kvasci, a fermentacija se odvijala pri optimalnim temperaturama za njihov metabolizam. Cilj završnog rada je bio usporediti fizikalno- kemijske parametre u proizvedenim pivima, a fizikalno-kemijski parametri su obuhvaćali mjerenje ekstrakta, pH-vrijednosti, boje, udjela alkohola i gorčine, te mjerenje nastalog ugljikovog dioksida za vrijeme trajanja refermentacije.

Broj stranica: 38

Broj slika: 16

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 9

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Ale, fermentacija, kvasac, lager, pivo.

Datum obrane: 11. rujan 2024.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Sandra Zavadlav*, prof. struč. stud.
2. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof. struč. stud.
3. dr. sc. *Goran Šarić*, prof. struč. stud.
4. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof. struč. stud. (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

Final paper

Scientific Area: Biotechnical Sciences  
Scientific Field: Food Technology

### PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF ALE AND LAGER BEER AFTER REFERMENTATION USING DIFFERENT SUGARS

*Rene Hursa*

Final paper performed at Grif microbrewery, K pivovari d.o.o.  
Supervisor: Ph.D. *Goran Šarić*, collage prof.

#### Abstract

Beer is a carbonated beverage and different methods can be used to dissolve carbon dioxide in beer. One of these methods is refermentation or secondary fermentation, which can take place in pressure tanks, casks or bottles. In the experimental part of the final paper, the method of beer refermentation in bottles was used, utilizing sucrose, dextrose and dry malt extract on top-fermenting and bottom-fermenting beers. The wort was produced using homebrew equipment, divided into two fermenters and inoculated with different yeasts, while fermentation was occurring at optimal temperatures for their metabolism. The aim of the final paper was to compare the physico-chemical parameters of the produced beers. The physico-chemical parameters included the measurement of extract, pH, color, alcohol content and bitterness, as well as the measurement of the carbon dioxide produced during the refermentation process.

**Number of pages: 38**

**Number of figures: 16**

**Number of tables: 15**

**Number of references: 9**

**Original in:** Croatian

**Key words:** Ale, beer, fermentation, lager, yeast.

**Date of the final paper defense:** 11 September 2024

#### Reviewers:

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

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

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Faze proizvodnje piva.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Mljevenje slada i neslađenih žitarica .....	2
2.1.2. Ukomljavanje i izdvajanje sladovine .....	3
2.1.3. Kuhanje sladovine .....	4
2.1.5. Fermentacija sladovine i odležavanje mladog piva.....	5
<b>2.2. Kvasac .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Općenito o kvascu .....	6
2.2.2. Kemijski sastav stanice kvasca .....	6
2.2.3. Stanična struktura kvasca .....	7
2.2.4. Metabolizam kvasca .....	9
2.2.6. Kvasci gornjeg vrenja, ale kvasci, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2.2.7. Kvasci donjeg vrenja.....	12
<b>2.3. Refementacija.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Postupci refermentacije u industrijskim pivovarama .....	13
2.3.2. <i>Cask</i> pivo, refermentacija piva u bačvi .....	14
2.3.3. Refermentacija piva u boci.....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Materijali rada .....</b>	<b>19</b>
3.1.1. Oprema za proizvodnju piva .....	19
3.1.2. Sirovine za proizvodnju piva.....	21
3.1.3. Laboratorijska oprema korištena za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize piva.....	22
3.1.4. Kemikalije korištene za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize piva .....	22
<b>3.2. Metode rada.....</b>	<b>23</b>



3.2.1. Proizvodnja piva Speidel Braumeister sistemom.....	23
3.2.2. Fizikalno-kemijske analize piva.....	24
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>37</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>38</b>

## 1. UVOD

Pivo je karbonizirano piće s niskim udjelom alkohola, a proizvodi se alkoholnom fermentacijom sladovine. Pretpostavlja se da je prvo pivo nastalo sasvim slučajno, tako što je kiša pala u posude u kojima se čuvao kruh te su kvasci iz zraka upali i fermentirali tu smjesu. Takvo pivo, odnosno tekućina nalik pivu, proizvedena je prije više tisuća godina te se značajno razlikuje od piva kakvog danas poznajemo. Prema njemačkom Zakonu o čistoći piva (*Reinheitsgebot*) iz 1516. godine, pivo se proizvodi od tri sirovine, vode, slada, hmelja, dok je kvasac dodan tek nakon izuma mikroskopa i otkrića samog procesa fermentacije.

Današnje pivo proizvodi se kroz nekoliko faza, od kojih je prva mljevenje slada. Samljeveni slad se ukomljava na određenim temperaturama, te se zatim iz njega cijedi sladovina. Sladovina se kuha te se u nju dodaje hmelj, a nakon kuhanja se hladi i u nju se nacjepljuje kvasac. Ubrzo nakon nacjepljivanja kvasca u sladovinu započinje fermentacija, čiji su glavni nusprodukti alkohol i ugljikov dioksid. Nakon fermentacije, mlado pivo odležava kako bi se kvasci istaložili, pivo izbistrilo i stabiliziralo.

Refermentacija je postupak kojim se mlado pivo, nakon završene primarne fermentacije, uvodi u sekundarnu fermentaciju, s glavnim ciljem karbonizacije piva. Pivo se može refermentirati u tankovima s mogućnošću regulacije tlaka, pivskim bačvama, odnosno *caskovima*, ili u bocama. Važni parametri za provođenje uspješnog procesa refermentacije su dovoljan broj živih stanica kvasca, određena temperatura ovisno o vrsti korištenog kvasca, te dovoljna količina kisika i fermentabilnih šećera. Refermentacija se tako može potaknuti dodatkom svježije sladovine koja je u stadiju aktivne fermentacije, dodatkom različitih šećera u krutom stanju ili dodatkom otopina šećera.

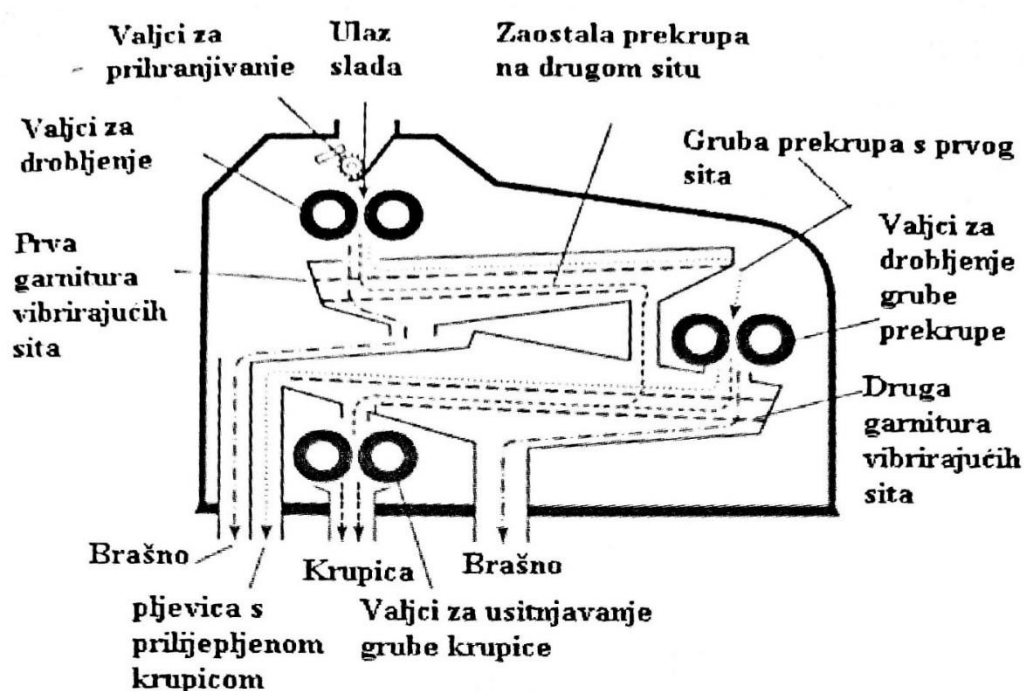
Cilj ovog završnog rada je usporediti fizikalna i kemijska svojstva dvaju piva, proizvedenih iz iste sladovine. Sladovina je podijeljena u dva dijela te je fermentirana kvascem gornjeg i donjeg vrenja. Nakon fermentacije primijenjen je postupak refermentacije piva u boci, koji je potaknut dodatkom različitih šećera u pivo. Nakon refermentacije, provedene su fizikalno-kemijske analize koje uključuju mjerenje ekstrakta, pH-vrijednosti, boje, udjela alkohola i gorčine, a nastali ugljikov dioksid je mjereno i za vrijeme trajanja refermentacije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Faze proizvodnje piva

#### 2.1.1. Mljevenje slada i neslađenih žitarica

Slad se melje kako bi se tijekom ukomljavaanja postigao što bolji kontakt između vode i slada, te time omogućio enzimima da razgrade škrob na jednostavnije šećere. (Kunze, 2004). Slad koji se čuva u silosima, prije mljevenja prolazi kroz liniju za čišćenje kako bi se odstranile prisutne nečistoće, metalni predmeti i kamenčići. Slad se može samljeti na više načina, suhim drobljenjem, kondicioniranim suhim drobljenjem, mokrim drobljenjem ili suhim usitnjavanjem u mlinu čekićaru. Metoda suhog drobljenja se najčešće primjenjuje u malim, *craft* pivovarama. Na taj način se melje slad koji je prhke strukture, dobro razgrađen i rastresitog endosperma, a mljevenjem u šest valjčanom mlinu je moguće dobiti poželjnu prekrupu sastava: 20% pljevice, 50% krupice i 30% brašna. Metoda suhog usitnjavanja u mlinu čekićaru primjenjuje samo ako se koristi kominski filter za odvajanje sladovine od tropa (Marić, 2009).



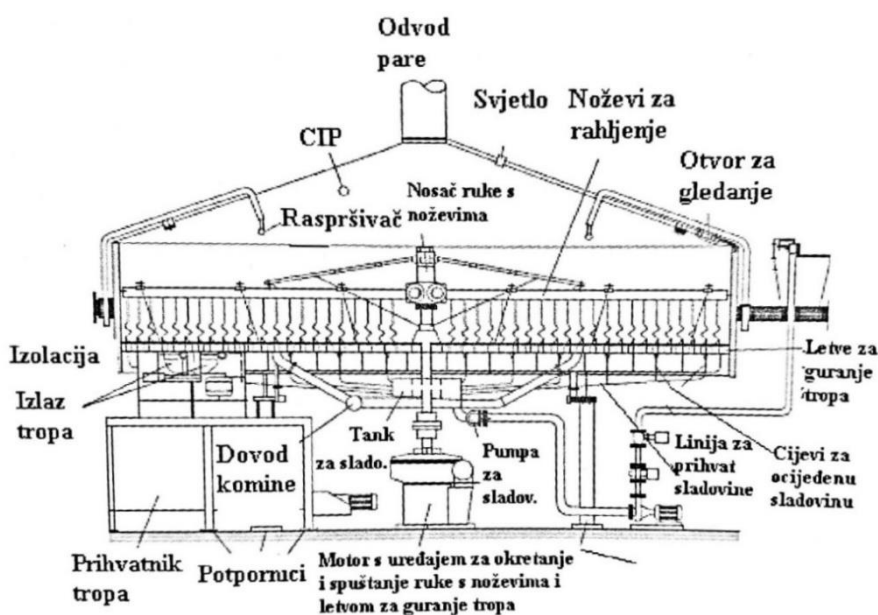
Slika 1. Shematski prikaz šestvaljanog mlina za suho mljevenje (Marić, 2009)

### 2.1.2. Ukomljavanje i izdvajanje sladovine

Ukomljavanje je proces koji počinje miješanjem usitnjenog slada i drugih neslađenih žitarica s toplom vodom. Provi se kako bi se netopljivi sastojci iz slada i neslađenih sirovina pretvorili u topive, a to se odvija pomoću različitih enzima koji se nalaze u zrnu slada. Najvažnije varijable za djelovanje određenih enzima su pH vrijednost i temperatura. Škrob iz slada se tijekom ukomljavanja pretvara u jednostavnije šećere kroz tri faze, klajsterizaciju, likvefakciju i šećerenje. Klajsterizacija je proces prevođenja škroba u škrobni lijepak, likvefakcija je otapanje škrobnog lijepka u vodi, dok je šećerenje razgradnja otopljenog škrobnog lijepka do jednostavnijih šećera (Marić, 2009).

Najvažniji enzimi koji sudjeluju u procesu ukomljavanja su  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza.  $\alpha$ -amilaza je enzim koji je zaslužan za smanjenje viskoznosti te djeluje tijekom procesa klajsterizacije, a djeluje na način da razgrađuje dugačke lance amiloze i amilopektina iz škroba do dekstrina. Optimalna temperatura mu je od 72°C do 75°C.  $\beta$ -amilaza je enzim koji razgrađuje dekstrin do maltoze, ali i drugih jednostavnijih šećera -glukoze i maltotrioze. Optimalna temperatura za djelovanje  $\beta$ -amilaze je od 60°C do 65°C. Proteinaze i  $\beta$ -glukanaze su također značajni enzimi tijekom procesa ukomljavanja, iako kod korištenja dobro modificiranih sladova nema potreba za temperaturnim stankama za njihovo djelovanje.

Nakon ukomljavanja, kominu koja se sastoji od tropa i osnovne sladovine treba razdvojiti. To je moguće učiniti na dva načina, cijedenjem komine kroz perforirano dno u kadi za cijedenje ili perforiranim cijevima, dok se sladovina prolaskom kroz trop dodatno bistri.



**Slika 2.** Shematski prikaz kade za cijedenje (Marić, 2009)

Drugi način je korištenjem kominskog filtra, kojim se sladovina iz tropa istiskuje preko filtarskog platna.

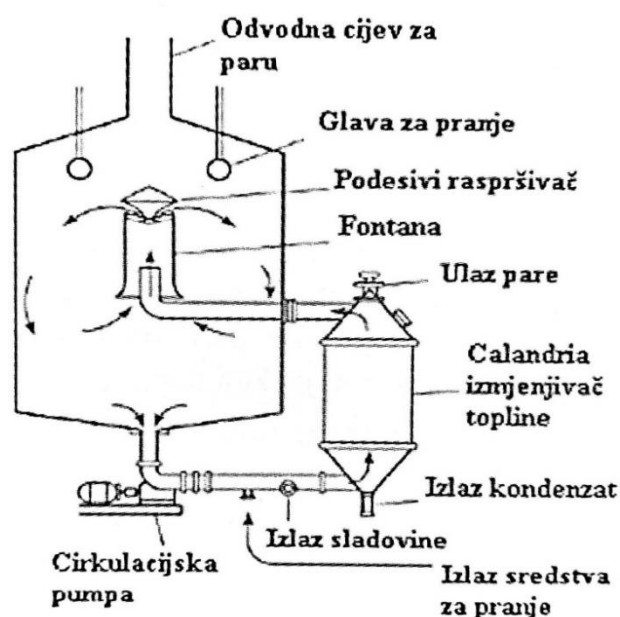
Sladovina koja prva izađe iz komine naziva se prvijenac. Nakon prvijenca se na trop izlijeva naknadni naljev temperature 78°C, kojim se ispiru zaostali šećeri iz tropa.

### 2.1.3. Kuhanje sladovine

Sladovina, koja se dobije miješanjem prvijenca i naljeva za ispiranje tropa, se nakon odvajanja od tropa kuha. Kuhanje sladovine traje 60-70 minuta, te se za to vrijeme otpari 4-6% početnog volumena (Marić, 2009).

Kuhanjem se sladovina sterilizira, deaerira, otparuje se višak vode, isparava DMS te se sladovina zakiseljava. Pri postignutim višim temperaturama dolazi i do izomerizacije hmeljnih sastojaka, povećava se obojenost sladovine, enzimi se inaktiviraju te nastaju proteinsko-taninski spojevi koji se talože u obliku toplog taloga. Za vrijeme kuhanja se u sladovinu mogu dodati i sredstva za bistrenje, kao što je na primjer irska mahovina (Mosher i Trantham, 2017).

U povijesti su kotlovi za kuhanje sladovine grijali direktno pomoću ugljena, a kasnije pomoću plina i termo ulja. Današnji kotlovi za kuhanje sladovine koriste vodenu paru kao ogrijevni medij. Mogu biti izvedeni u obliku kotlova s duplim dnom. Dno kotla može biti različitih oblika i nagiba što omogućuju bolju cirkulaciju i miješanje sladovine tokom kuhanja. Moderniji kotlovi za sladovinu koriste kuhala (*boilere*) koji se mogu nalaziti unutar ili izvan samog kotla, a kroz koje sladovina prolazi i zagrijava se (Kunze, 2004).



Slika 3. Kotao za kuhanje sladovine s vanjskim kahalom (Marić, 2009)

Nakon što je sladovina skuhana, potrebno je iz nje istaložiti što više suspendiranih čestica. Te čestice su proteini i tanini, ali i čestice od hmelja koji je dodan prilikom kuhanja sladovine. Sladovina se taloži pomoću taložnjaka, odnosno vrtložnog kretanja sladovine, a može se odvijati u kotlu kojem je sladovina kuhana ili u posebnom spremniku namijenjenom samo za tu svrhu.

Nakon taložnjaka, sladovina se hladi i aerira kako bi se postigli što bolji uvjeti za fermentaciju. Kvascu je kisik potreban na početku fermentacije, a omogućava mu pretvorbu masnih kiselina u nezasićene masne kiseline koje imaju mogućnost brže izmjene tvari kroz staničnu membranu, te za sintezu sterola kako bi uvećao svoju biomasu.

#### 2.1.5. Fermentacija sladovine i odležavanje mladog piva

Ohlađena i aerirana sladovina se zatim puni u fermentore, te se u nju naciepljuje kvasac. Optimalna temperatura fermentacije ovisi o vrsti kvasca i stilu piva, a za kvasce gornjeg vrenja iznosi od 18°C do 22°C, dok je za kvasce donjeg vrenja optimalna temperatura od 8°C do 12°C. Temperatura se u modernim spremnicima za fermentaciju regulira pomoću rashladne tekućine koja cirkulira kroz duplu stjenku fermentora. Fermentori koji se danas uglavnom koriste u suvremenim pivovarama su cilindričnog oblika sa konusnim dnom, što omogućava ispuštanje nastalog hladnog taloga od ostataka tropa i hmelja tijekom fermentacije, te ispuštanje kvasca na kraju fermentacije koji se može naciepiti u novu šaržu sladovine.

Odležavanje, odnosno dozrijevanje mladog piva odvija se u tlačnim tankovima ili u fermentorima ako su cilindrično- konusnog oblika te imaju mogućnost fermentacije pod tlakom, a odvija se pri niskim temperaturama. Svrha odležavanja piva je istaložiti kvasac kako bi se pivo izbistrilo, izbalansirati i pročistiti nepoželjne arome i mirise mladog piva te podesiti udio otopljenog ugljikovog dioksida.

## 2.2. Kvasac

### 2.2.1. Općenito o kvascu

Kvasac je jednostanična gljiva kuglastog, jajolikog, elipsoidnog ili cilindričnog oblika. Stanice se pojavljuju samostalno ili u parovima te mogu formirati kratke lance ili grozdove. Eukariotski je organizam, što znači da su jezgra stanice i ostali organeli okruženi membranom (Mosher i Trantham, 2017). Stanica kvasca je veličine od 5 do 10  $\mu\text{m}$ , tako da nije vidljiva golim okom. Volumen stanice može varirati od 50 do 500  $\mu\text{m}^3$ . Odnos dužine i širine stanice je u omjeru 1,4:1 iako neke stanice mogu biti duže i tanje. Kvasci energiju mogu stvarati na dva načina, staničnim disanjem uz prisutnost kisika, ili fermentacijom bez prisustva kisika.

### 2.2.2. Kemijski sastav stanice kvasca

**Tablica 1.** Kemijski sastav stanice kvasca (Briggs i sur., 2004)

Kemijski sastav stanice kvasca	
<b>Voda</b>	80%
<b>Elementi</b>	
<b>Ugljik</b>	<50%
<b>Kisik</b>	30-35%
<b>Dušik</b>	5%
<b>Vodik</b>	5%
<b>Fosfor</b>	1%
<b>Mineralne tvari i drugi elementi u tragovima</b>	5-10%
<b>Makromolekule</b>	
<b>Proteini</b>	40-45%
<b>Ugljikohidrati</b>	30-35%
<b>Nukleinske kiseline</b>	6-8%
<b>Lipidi</b>	4-5%

### 2.2.3. Stanična struktura kvasca

Stanična stjenka je vanjski sloj stanice, robusne konstrukcije. Debljine je od 150 do 200 nanometara te čini oko 20% suhe mase stanice kvasca. Stanice koje su se razmnožavale vegetativnim načinom (pupanjem) na staničnoj stijenci imaju kružne ožiljke od pupoljaka, koje označavaju mjesto na kojem se stanica kćeri odvojila od majčinske stanice. Stanična stjenka se sastoji od oko 90% ugljikohidrata, dok ostatak čine proteini. Najzastupljeniji ugljikohidrati su glukani, koji čine 30 do 50% suhe mase stanične stijenke. Manoproteini se većinom nalaze na vanjskom dijelu stijenke, dok unutarnji dio čine manoproteini u kombinaciji s glukansom i hitinom. Stanična stjenka ima nekoliko uloga. Osnovna uloga je zaštitni sloj preko krhke stanične membrane. Ima određeni stupanj fleksibilnosti što omogućuje nagle promjene volumena stanice ovisno o osmotskom tlaku, dok s druge strane ima dovoljnu mehaničku čvrstoću s kojom sprječava puknuće stanice kod hipoosmotskog šoka. Također služi i kao spremište enzima te ograničava veličinu molekula koje mogu ući ili izaći iz periplazme.

Periplazma je prostor između stanične stijenke i stanične membrane, te kroz njega prolaze sve hranjive tvari koje ulaze u stanicu, a izlaze svi nusprodukti metabolizma koji su štetni za stanicu. Velikim dijelom je sačinjena od proteina, koji pri velikim količinama čine gelastu strukturu. Na taj način periplazma može imati i dodatnu zaštitnu funkciju.

Stanična membrana okružuje citoplazmu te je razdvaja od periplazme. Sačinjena je od približno jednakih količina proteina i lipida. Proteini imaju funkcionalna svojstva, odnosno sadrže enzime koji su odgovorni za sintezu stanične stijenke te unos hranjivih tvari u stanicu. Lipidi koji čine staničnu membranu su uglavnom fosfolipidi, uz manje količine sterola. Model tekućeg mozaika opisuje staničnu membranu kao fosfolipidni dvosloj, u kojem su hidrofobne skupine okrenute prema unutra, jedna prema drugoj, dok su hidrofilne okrenute prema van te su u kontaktu s periplazmom i citoplazmom. Fosfolipidi nisu fizički povezani, što membrani daje fleksibilnost i polupropusnost. Voda i plinovi slobodno prolaze kroz membranu, dok druge tvari i spojevi u stanicu ulaze pomoću specifičnih proteina.

Citoplazma je tekući dio stanice koji se sastoji od vode, te zajedno s drugim otopljenim tvarima čini citosol. Okružuje ju stanična membrana te je iznimno bogata RNA molekulama koje su zaslužni za sintezu proteina. U citoplazmi se nalaze i enzimi koji sudjeluju u glavnim metaboličkim procesima, na primjer glikolize i sinteze masnih kiselina.



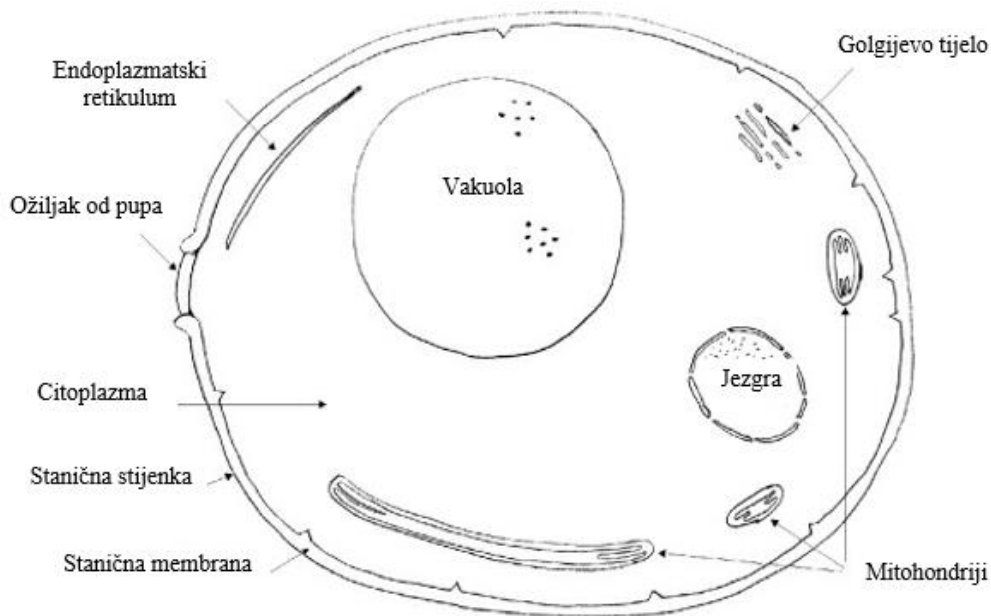
Enzimi u citoplazmi nisu raspršeni, već su raspoređeni u prostoru pomoću intercelularnih membrana. pH vrijednost citoplazme iznosi 5,2, ali može varirati na pojedinim dijelovima ovisno o metaboličkim aktivnostima u stanici.

Vakuola je organel omeđen membranom, odnosno tonoplastom. Broj i veličina vakuola u stanici kvasca ovisi o stanju stanice i o stadiju staničnog ciklusa u kojem se stanica nalazi. Stanica koja se nalazi u stadiju aktivne fermentacije neće imati formirane vakuloe, dok će stanica u završnim stadijima fermentacije, u fazi gladovanja ili pod velikim staničnim stresom, imati veći broj formiranih vakuola. Razlog tome je što vakuola služi kao privremeno skladište potrebnih metabolita, a u njoj se i kataboliziraju makromolekule kao što su proteini te je bogata aminokiselinama i dušičnim spojevima.

Golgijevo tijelo sastoji se od brojnih membrana i vezikula, a uloga mu je izlučivanje tvari iz stanice, te čini vezu između endoplazmatskog retikuluma i stanične membrane. Pomoću Golgijevog tijela se proteini, sintetizirani na ribosomima u hrapavom endoplazmatskom retikulumu, raspoređuju i usmjeravaju do potrebnog mjesta u stanici.

Mitohondriji su stanični organeli čiji izgled ovisi o fiziološkom stanju stanice, a glavna uloga ima je stvaranje energije oksidativnom fosforilacijom. Sadrži brojne enzimske sustave koji omogućuju transport raznih metabolita u mitohondrij i van njega, pa tako i proizvedeni ATP. Prilikom aerobnog stadija fermentacije, volumen mitohondrija čini oko 12% ukupnog volumena stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, dok se tijekom anaerobne faze taj postotak znatno smanjuje. Mitohondrij se sastoji od dvije membrane koje su razdvojene međuprostorom. Za vrijeme fermentacije, mitohondriji ne stvaraju energiju, ali imaju važnu ulogu kod flokulacije, metabolizma aminokiselina i diacetila te sinteze sterola.

Jezgra je dio stanice u kojem se nalazi najveći dio genetskog materijala, nepravilnog je sfernog oblika, promjera 1-2  $\mu\text{m}$  te je vidljiva svjetlosnim mikroskopom. Omeđena je dvostrukom membranom koja sadrži pore, a one omogućuju prolazak genetskog materijala iz jezgre u ostatak stanice. Izgled i unutarnja struktura jezgre se mijenjaju tijekom staničnog ciklusa (Briggs i sur, 2004). Jezgra stanice kvasca se sastoji od jezgrice, plazme i kromosoma, a genetski materijal koji čine DNA i RNA molekule, definiraju sintezu proteina, enzima i ostalih staničnih metabolita (Mosher i Trantham, 2017).



**Slika 4.** Struktura stanice kvasca (White i Zainasheff, 2010)

#### 2.2.4. Metabolizam kvasca

Kvasac se u procesu proizvodnje piva najepljuje u otopinu bogatu šećerima, odnosno sladovinu. Uz fermentabilne šećere, sladovina je bogata aminokiselinama i drugim potrebnim nutrijinima za uspješan rast kvasca. Za rast kvasca je također potreban i kisik, te se u aeriranoj sladovini treba nalaziti u količinama od 8 do 10 mg/L. Uvjeti pri kojima kvasca ima pristup kisiku nazivaju se aerobni uvjeti, a pri takvim uvjetima kvasac ulazi u fazu aerobnog metabolizma čiji su finalni produkti voda i ugljikov dioksid. Kvasac prilikom rasta troši kisik, a kada je sav kisik potrošen, kvasac ulazi u fazu anaerobnog metabolizma. Pri anaerobnim uvjetima, kvasac nastavlja koristiti fermentabilne šećere, ali ih pretvara u etanol i ugljikov dioksid (Mosher i Trantham, 2017).

#### *Aerobni metabolizam*

Aerobni uvjeti su oni kod kojih postoji prisutnost kisika u sladovini u kojoj se kvasac nalazi. Pri takvim uvjetima, kvasac konzumira fermentabilne šećere, a to su glukoza, maltoza i maltotrioza. U prvim koracima kvasac koristi saharozu, koju pomoću invertaze hidrolizira do glukoze i fruktoze. Otkriveno je da je glukoza prvi ugljikohidrat kojeg stanica kvasca iskoristi, i to duplo brže od fruktoze. Nakon glukoze, iskorištavaju se prvo fruktoza, pa maltoza, a zadnje maltotrioza. Kada maltoza uđe u stanicu kvasca, pomoću enzima hidrolaze, razgrađuje se na dvije molekule glukoze, a maltotrioza na tri molekule glukoze. Glukoza se metabolizira putem koji se zove glikoliza, a ona omogućava razgradnju glukoze

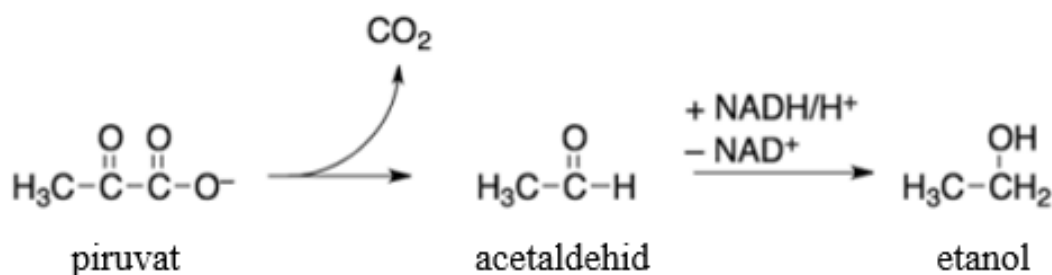
do dvije molekule piruvata, a stvara se i mnogo energije koja služi za sintezu ATP-a.

Piruvat nastao glikolizom se oksidacijskom dekarboksilacijom pretvara u acetil-CoA, koji služi kao gorivo u ciklus limunske kiseline ili Krebsovom ciklus. Krebsov ciklus je aerobni proces te se odvija u matriksu mitohondrija, a sastoji se od niza oksidoredukcijskih reakcija u kojima se acetilna skupina oksidira te nastaje ugljikov dioksid.

Zadnji korak aerobnog metabolizma je oksidativna fosforilacija, a odvija se na unutarnjim membranama mitohondrija. U ovom procesu molekule NADH i FADH<sub>2</sub> doniraju elektrone molekularnom kisiku te postaju NAD<sup>+</sup> i FAD<sup>+</sup>, a posljedica je oslobađanje velike količine energije koja se koristi za sintezu ATP-a iz ADP-a pomoću ATP sintaze (Mosher i Trantham, 2017).

#### *Anaerobni metabolizam*

Kada kvasac potroši sav kisik, procesi glikolize, ciklus limunske kiseline i oksidativne fosforilacije se ne mogu nastaviti. Iako glikoliza i ciklus limunske kiseline ne zahtijevaju kisik, ne mogu se izvršiti u potpunosti. Stanica kvasca tada ulazi u fazu anaerobnog metabolizma tj. fermentaciju i crpi energiju na drugi način. Prilikom fermentacije piruvat koji je nastao u procesu glikolize, se dekaroksilacijom koristi za proizvodnju acetaldehida te dolazi do oslobađanja ugljikovog dioksida. NADH zatim reducira acetaldehid do etanola i nastaje NAD<sup>+</sup>. Taj proces također pomaže uklanjanju kiseline nastale u stanici prilikom konzumacije šećera, a nastali NAD<sup>+</sup> stanica može koristiti za dodatnu molekulu ATP-a prilikom glikolize (Mosher i Trantham, 2017).



**Slika 5.** Reakcija fermentacije kvasca (Mosher i Trantham, 2017)

### *Efekti metabolizma kvasca*

Postupci prilikom proizvodnje, odnosno karakteristike proizvedene sladovine mogu imati značajan utjecaj na kvasac. Tako postoji fenomen koji se naziva *Crabtree* efekt, u kojem kvasac prilikom velike koncentracije glukoze u aerobnim uvjetima fermentira i proizvodi etanol i ugljikov dioksid. Do takvog efekta dolazi zbog velike koncentracije glukoze koja uzrokuje stvaranje velike količine ATP molekula, a ciklus limunske kiseline i oksidativna fosforilacija se zaobilaze. Takav efekt uzrokuje usporen rast kvasca zato što je sva glukoza usmjerena u stvaranje etanola.

Drugi poznati fenomen je Pasteurov efekt, koji objašnjava da je prilikom prisutnosti kisika rast kvasca u prednosti pred fermentacijom. Pa tako u procesu aktivne fermentacije, fermentacija zbog kisika može biti usporena ili u potpunosti stati. Do toga dolazi zbog kisika koji omogućuje kvascu da oksidativnom fosforilacijom stvori velike količine energije. Isti takav efekt se događa prilikom naciepljivanja obnovljenog kvasca u novu sladovinu, gdje se kvasac koji je u fazi anaerobnog metabolizma iz mladog piva naciepljuje u aeriranu sladovinu te ulazi u fazu aerobnog metabolizma (Mosher i Trantham, 2017).

#### 2.2.6. Kvasci gornjeg vrenja, ale kvasci, *Saccharomyces cerevisiae*

Spadaju u veliku skupinu, a uključuju i pekarski kvasac, destilacijske kvasce i broje druge laboratorijske sojeve kvasca. Pivski ale kvasaci se od drugih kvasaca mogu razlikovati po njihovom ponašanju i nastalim aromama tijekom fermentacije, a najznačajnije karakteristike su im da fermentiraju brzo, fermentiraju željene vrste šećera, preživljavaju u umjerenijom alkoholnom okruženju i anaerobnim uvjetima. Kao što im i ime govori, kvasci gornjeg vrenja se za vrijeme fermentacije nakupljaju u gornjem dijelu sladovine i stvaraju pjenu na vrhu. Razlog tome je hidrofobna površina ale kvasca koji se prijanjaju na mjehuriće ugljikovog dioksida koji nastaje tijekom fermentacije i putuje prema vrhu, a omogućava skupljanje kvasca s vrha fermentora. Prednost toga je što je taj kvasac vrlo zdrav i čist te nije pomiješan s talogom kao kvasac koji se skuplja s dna fermentora, ali je nedostatak rizik od kontaminacije zbog otvaranja fermentora. Postoje mnogi sojevi ale kvasca, raznolikost im se proteže sve od čistih pa do fenolnih belgijskih vrsta, a razlikuju se i po mogućnosti flokulacije. Većini sojeva ale kvasca zajednička je idealna temperatura fermentacije za, koja iznosi od 18°C do 20°C, a također mogu podnijeti i više temperature, do 35°C. Ale kvasci tijekom fermentacije stvaraju različite spojeve aroma i okusa, u slučaju da je tih spojeva malo smatraju se „čisto“ fermentirajućim kvascima, a u slučaju da je tih spojeva više, smatraju se „voćnim“ ili „esterastim“ (White i Zainasheff, 2010).

### 2.2.7. Kvasci donjeg vrenja

Za razliku od kvasca gornjeg vrenja, većina se sojeva kvasac donjeg vrenja (lager kvasca) tijekom fermentacije ne diže prema vrhu fermentora. Iako postoje iznimke, dizanje kvasca donjeg vrenja je uglavnom minimalno, kao i njihova sposobnost flokulacije. Loša flokulacijska svojstva lager kvasca, odnosno loša sposobnost kvasca da se skuplja u veće nakupine, onemogućuje da nastali ugljikov dioksid podiže kvasca prema vrhu. Nedostatak flokulirajućih svojstva uzrokuje dulje zadržavanje kvasca u suspenziji, a što naposljetku omogućuje bolju redukciju nusprodukata fermentacije. Lager kvasci fermentiraju sporije, a zbog svojstva stanične membrane koja zadržava estere unutar stanice, u pivu tokom fermentacije nastaje manje estera. Temperature fermentacije kvasca donjeg vrenja kreću se od 10°C do 13°C, što uzrokuje više otopljenih sumpornih spojeva, ali takve niske temperatura stvarju poteškoće prilikom redukcije diacetila. Lager kvasci mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine, oni koji proizvode suše, čišće i svježije pivo, te oni koji proizvode punija piva, sladnih i kompleksnih aroma i okusa (White i Zainasheff, 2010).

## 2.3. Refementacija

### 2.3.1. Postupci refermentacije u industrijskim pivovarama

Refermentacija ili sekundarna fermentacija, poželjan je dio procesa proizvodnje piva, a često se svrstava u fazu dozrijevanja mladog piva te se provodi kako bi se dodatnom fermentacijom karboniziralo pivo.

U tom procesu, mlado pivo se može recirkulirati u jednom spremniku, pomoću pumpe premjestiti u drugi spremnik koji ima mogućnost hlađenja i regulacije tlaka. Mlado pivo nakon primarne fermentacije može sadržavati preko milijun stanica kvasca po mililitru piva, a recirkulacija piva ili njegov transfer omogućava da se taj kvasac miješanjem pobudi te pokrene novu fermentaciju. U procesu refermentacije, tijekom transfera mladog piva, moguć je dodatak kisika kako bi se povećao broj stanica kvasca. Ta pojava zove se Pasteurov efekt, a omogućava povećanje biomase kvasca te nastajanje novih aktivnih stanica koje će nastaviti fermentirati zaostale šećere, ali i ukloniti nepoželjne arome u mladom pivu.

Kako dodatak kisika mladom pivu predstavlja rizik od oksidacije piva koji rezultira gubitkom poželjnih i stvaranjem nepoželjnih aroma, postoje druge metode kojima se može potaknuti sekundarna fermentacija. Jedna od tih metoda je ubrizgavanje novog soja kvasca nakon završetka primarne fermentacije, kojim će se fermentirati ostatak šećera te reducirati nepoželjne arome. Ova metoda se također može koristiti kod proizvodnje piva s visokim udjelom alkohola, na način da se u pivo fermentirano standardnim kvascem, nakon primarne fermentacije doda soj kvasac koji je otporniji na visoku koncentraciju alkohola. Tako će se fermentirati svi fermentabilni šećeri, a drugi soj kvasca omogućit će i dozrijevanje pri nižim temperaturama zahvaljujući svojoj otpornosti.

Drugi način je dodavanje dijela sladovine i pijene, koja sadrži aktivne stanice kvasca, iz iduće šarže koja je u stadiju aktivne fermentacije. Pijena u kojoj se nalazi kvasac naziva se *kräusen*, pa je prema tome i sam proces dobio naziv *kräusening* (krajzlanje). Najčešće se koristi na početku hladne maturacije, a pomaže izbalansirati arome u mladom pivu (Mosher i Trantham, 2017). Kako bi se provela sekundarna fermentacija, važno je da kvasac ima pristup fermentabilnim ugljikohidratima. Ugljikohidrati u mladom pivu mogu proizaći iz zaostalih šećera iz samog ekstrakta sladovine, šećeri se mogu naknadno dodati ili se dovoljne količine ugljikohidrata osiguravaju „krajzlanjem“. Kod primjene postupka „krajzlanja“, preporuča se dodatak 5-10% volumena sladovine u stadiju aktivne fermentacije u spremnik

sa mladim pivom.

Dodatak suhog kvasca za sekundarnu fermentaciju može uzrokovati previsoku prevrelost, što će uzrokovati premalu količinu zaostalog ekstrakta u pivu. Također, može zaostati u suspenziji te na taj način otežati proces bistrenja piva, pa se iz tih razloga suhi kvasac ne preporuča za ovu primjenu (Briggs i sur., 2004).

### 2.3.2. *Cask* pivo, refermentacija piva u bačvi

*Cask beer* ili *real ale*, odnosno pivo punjeno u bačve, je prirodno karbonizirano pivo koje se nefiltrirano i nepasterizirano puni u bačve. Takvo pivo sadrži žive stanice kvasca te zahtijeva sekundarnu fermentaciju piva u bačvi kako bi se pivo karboniziralo i bilo spremno za piće. Pivo se iz bačve ne istače pomoću ugljikovog dioksida kao kod klasičnih pivskih kegova, već se iz bačve ispumpava pomoću ručnih pumpi. Ovaj tip piva se u velikim količinama proizvodi jedino u Ujedinjenom Kraljevstvu, te tamo čini oko 10% od ukupno proizvedenog piva. Tradicionalno su se za ovakav tip piva koristile drvene bačve, dok su ih danas zamijenile bačve od nehrđajućeg čelika i aluminijske. *Cask* piva su uglavnom jače zahmeljena te bogata aromama i okusima. Prednosti korištenja takvog načina pakiranja piva su relativno mala količina potrebne energije i niski troškovi opreme, dok su nedostaci rizik od infekcije i kvarenja piva, potrebna vještina osobe koja istače pivo te rizik od oksidacije ako se pivo ne potroši dovoljno brzo.

*Cask* (bačva) je nestlačivi spremnik oblika bačve puno jednostavnije izvedbe od klasičnog pivskog kega. Sadrži rupu na samom vrhu bačve, kroz koju se puni, te se zatvara drvenim ili plastičnim čepom. Druga rupa nalazi se na kraju bačve, uglavnom zatvorena drvenim čepom, kroz koji se ušarafi slavina za istakanje piva.

Pivo koje se puni u *cask* sadrži žive stanice kvasca, pa je prije punjenja piva njihov broj vrlo važan parametar. Pivo se u bačve može puniti direktno iz fermentora nakon odgovarajućeg vremena taloženja, uglavnom 16 do 48 sati, ovisno o stanju u kojem se pivo nalazi i potrebe za pivom na tržištu. Za pripremu piva prije punjenja, također se mogu koristiti i sredstva za taloženje. Potrebno je postići oko 1 milion stanica kvasca na mililitar piva kako bi pivo bilo spremno za punjenje, ali su prihvatljive i vrijednosti od 0.25 do 4 miliona stanica kvasca po mililitru piva. Previše kvasca u suspenziji uzrokovat će previše

burnu sekundarnu fermentaciju, a posljedica će biti pretjerano pjenjenje piva kod otvaranja bačve te gubitak piva. Ostatak piva iz bačve postat će neutralnijeg okusa i izgubiti svoj prvobitni karakter te neće imati stabilnu pjenu. Također, nedovoljna količina kvasca u pivu uzrokovat će presporu sekundarnu fermentaciju, a pivo će biti nedovoljno karbonizirano. U fazi pripreme piva za punjenje, također se dodaju i fermentabilni šećeri, uglavnom otopina saharoze (37%) od 0,35L do 1,75L po hektolitr piva, te omogućuju uspješnu sekundarnu fermentaciju u *cask*-u. *Cask*, u kojem se nalazi pivo i traje sekundarna fermentacija, je potrebno skladištiti na temperaturi između 10 i 17 °C zbog prisutnosti živih stanica kvasca. U slučaju da su temperature niže, kvasac bi stao s fermentacijom te bi se počeo taložiti i odumirati (Briggs i sur., 2004).

### 2.3.3. Refermentacija piva u boci

Refermentacija piva u boci ne primjenjuje se u velikim industrijskim pivovarama, u rijetkim slučajevima se primjenjuje u malim, odnosno *craft* pivovarama, ali je česta pojava prilikom kućne proizvodnje piva (*homebrewing*). *Homebrewing* je način proizvodnje piva koji zahtijeva manju količinu opreme i sirovina, ali i rezultira manjim količinama proizvedenog piva. Oprema za takvu proizvodnju piva može biti običan lonac i cijedilo te posuda za fermentaciju, pa sve do 3 u 1 sustava u kojima se ukomljava, cijedi i kuha pivo, a u istima je moguća i fermentacija. Upravo kod ovakve proizvodnje piva, bez pristupa tlačnim tankovima u kojima bi se pivo moglo karbonizirati, korištenje refermentacije piva u boci nalazi najčešću primjenu.

#### *Povijest refermentacije piva u boci*

Kroz povijest, proizvodnja piva gornjeg vrenja je prevladavala sve do druge polovine 19. stoljeća. Takva piva su zbog više temperature fermentacije imala niži stupanj karbonizacije od piva donjeg vrenja. Upravo zbog toga, refermentacija piva u boci je osmišljena i počinje se upotrebljavati kako bi se pivo dovoljno karboniziralo. Takav princip karbonizacije inspiriran je *champanoise* metodom, kojom se proizvode pjenušava vina od kraja 17. stoljeća. Dodatkom šećera i kvasca u staklene boce debelih stjenki, započinje fermentacija na temperaturama od 12 do 14°C što uzrokuje povećanje udjela etanola za 1,2 do 1,5% te nastaje oko 11.8g/L ugljikovog dioksida. Nakon 15 mjeseci dozrijevanja, boce se otvaraju, izdvaja istaloženi kvasac od čistog pjenušavog vina, te se boca ponovo zatvara. Refermentacija piva u boci također ima dugu tradiciju u proizvodnji belgijskih kiselih piva,



koja se proizvode spontanom fermentacijom pomoću kombinacije kvasca i bakterija, a dobiveno pivo naziva se *lambic*, odnosno *Gueze* nakon miješanja i refermentacije. U takva piva se mogu, ali i ne moraju, dodavati dodatni šećeri i kvasac kako bi se potaknula sekundarna fermentacija (Štulíková i sur., 2020).

#### *Kemijske i senzorske promjene piva prilikom postupka refermentacije*

Refermentacija piva u boci pomoću kvasca i dodatka šećera uzrokuje brojne promjene u kemijskim i senzorskim svojstvima piva, pa tako dolazi do nastanka brojnih produkata metabolizma kvasca, od kojih su najvažniji viši alkoholi, esteri, vicinalni diketoni, aldehidi i sumporni spojevi.

Viši alkoholi sintetiziraju se anaboličkim putem od ugljikohidrata ili Echerlichovim putem kao produkti katabolizma aminokiselina. U pivu su najprisutniji n-propanol, iso-butanol, 2-metilbutanol i 3-metilbutanol, a zaslužni su za pojačavanje alkoholnog okusa i osjećaja topline. U nekim stilovima piva poželjna je i veća količina 2-feniletanola koji je zaslužan za arome ruže i biljne arome.

Esteri se formiraju kondenzacijom organskih kiselina i alkohola, a pridonose biljnim i voćnim aromama piva. Najvažniji su etil acetat (aroma zelene jabuke), izoamil acetat (aroma banane), etil butirac (aroma ananasa), etil heksanoat (aroma slatke jabuke), izobutil acetat (aroma slatke banane) i 2-feniletil acetat (aroma ruže).

Vicinalni diketoni, odnosno diacetil i pentan-2,3-dion, formiraju se kao produkti sinteze valina i izoleucina, ali se daljnjom fermentacijom reduciraju pomoću kvasca. Zaslužni su za aromu maslaca, te se generalno smatraju nepoželjnima u pivu.

Aldehidi se formiraju prilikom sinteze viših alkohola, ali i prilikom starenja piva oksidacijom viših alkohola. Imanju niži senzorski prag za razliku od viših alkohola, a najistaknutiji je acetaldehid s aromom zelene jabuke. Drugi aldehidi mogu davati okuse oraha, papira i kartona.

Sumporni spojevi koji se pojavljuju u pivu dolaze iz različitih skupina spojeva i u različitim strukturama, a to su sumporovodik i sumporov dioksid, tioli, sulfidi, disulfidi, trisulfidi i tioesteri. Osim sumpornih nota koje nastaju zbog prisutnosti anorganskih sumpornih spojeva u pivu, drugi spojevi koji sadrže sumpor zaslužni su za nepoželjne arome kupusa, kukuruza, luka i pokvarenog povrća.

Kada se svi fermentabilni šećeri potroše i pivo postane zasićeno ugljikovim dioksidom, prestaje proces rasta kvasca i stanice ulaze u stacionarnu fazu. Prilikom odumiranja stanica kvasca, dolazi do autolize stanice, te puknućem stanične stijenke,

hidrolitički enzimi, masne kiseline, aminokiseline, peptidi i nukleotidi ulaze u pivo. Ti spojevi imaju negativan utjecaj na okus i aromu piva, dolazi do gubitka voćnih nota i javljaju se nepoželjne arome koje se povezuju uz starenje piva. Također dolazi do razgradnje estera pomoću esteraza iz kvasca, pa se u nekim slučajevima preporuča pasterizacija piva te naknadno dodavanje sojeva kvasca donjeg vrenja za refermentaciju, kod kojih je aktivnost esteraza slabija (Štulíková i sur. 2020).

#### *Metode primjene refermentacije u boci*

Za refermentaciju piva u boci mogu se koristiti različite kulture kvasca i bakterija, a također postoje i različiti načini na koje se može provoditi. Kvasac se tako može dodati iz sladovine koja fermentira, može se obnoviti nakon fermentacije, a može se koristiti i svježije propagirana kultura. Pri korištenju obnovljenog kvasca važno je paziti na vitalnost kvasca koji se ponovo koristi, a korištenje sladovine koja je u fazi fermentacije može utjecati na koloidnu stabilnost piva. Miješane kulture različitih mikroorganizama se također mogu koristiti za refermentaciju na način da se spontano inokuliraju ili dodavanjem selekcioniranih vrsta.

Soj kvasca i broj stanica najvažniji su parametri pri određivanju karakteristika konačnog piva proizvedenog refermentacijom. Količina kvasca ovisi o vrsti piva i stupnju razrijeđena. Promjenom tijeka i brzine refermentacije, moguće je utjecati na profil aroma konačnog piva, ali prekomjerna karbonizacija može uzrokovati preveliko pjenjenje gotovog piva. Preporučene količine kvasca za svijetla piva sa vrijednošću boje ispod 12 EBC jedinica i 5% volumnog udjela alkohola iznose 100000 stanica kvasca po mililitru piva. Za jača i tamnija piva, sa vrijednošću boje iznad 35 EBC jedinica i 7% volumnog udjela alkohola, preporuča se 500000 stanica kvasca po mililitru piva. Za refermentaciju koristi se šećer, bilo u kristalnom obliku 100%-tne čistoće ili u obliku otopina koje sadrže od 25% do 90% fermentabilnih šećera. Šećer se može otopiti na sobnoj ili povišenoj temperaturi, a moguća je i sterilizacija kako bi se izbjegla mikrobiološka kontaminacija.

Količina šećera u suspenziji s kvascem dodana u pivo može se izračunati preko sljedeće formule:

$$A=2B-(0.3C+D)$$

A -količina potrebnog šećera,

B -željena količina ugljikovog dioksida u gramima,

C -vrsta i količina zaostalog šećera u pivu (koeficijent za maltotriozu iznosi 0)

D -količina ugljikovog dioksida u pivu prije refermentacije.

Željena količina ugljikovog dioksida u pivu pakiranom u bocu se kreće od 5 do 8 grama po litri. U slučaju da je količina ugljikovog dioksida manja, pivo neće biti dovoljno gazirano, a u slučaju da je prevelika, pivo će se pretjerano pjeniti, pogotovo pri višim temperaturama.

Za sekundarnu fermentaciju piva moguće je koristiti sve vrste pakiranja i materijale koji se uobičajeno koriste u pivarstvu. Tako se mogu koristiti limenke, staklene ali i PET boce, ali je pritom potrebna pažnja pri korištenju fleksibilnijih materijala kako ne bi došlo do pretjeranog naticanja ili pucanja spremnika. Optimalna temperatura za refermentaciju piva u boci ovisi o soju kvasca koji je korišten za proizvodnju piva, ali se preporučene temperature kreću od 14 do 22°C.

Tijek refermentacije piva u boci može se pratiti na više načina, mjerenjem nastalog ugljikovog dioksida, promjenama gustoće, udjela ekstrakta, koncentraciji i životnosti kvasca, zamućenosti i količini nastalog taloga od kvasca (Štulíková i sur., 2020).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali rada

##### 3.1.1. Oprema za proizvodnju piva

Za proizvodnju piva za ovaj završni rad korišten je *Speidel Braumesiter* sistem. Sastoji se od kotla od nehrđajućeg čelika volumena 50 L, u koju se za vrijeme ukomljavanja stavlja bubanj. Na dno i vrh bubnja stavlja se perforirane ploče i mreže koje omogućavaju cirkulaciju vode, odnosno sladovine, kroz slad, a sprječavaju prolaz većih čestica iz slada. Sladovina cirkulira pomoću dvije elektromagnetske pumpe ugrađene u dnu kotla, a cirkulacija se odvija odozdo prema gore. Na dnu kotla nalazi se i kontroler u koji se prije početka kuhanja unesu temperature i vremena pojedinih faza tijekom ukomljavanja, te vrijeme kuhanja i vremena dodavanja hmelja. Kotao na taj način funkcionira automatski, pali i gasi pumpe i grijač kada je potrebno, te daje zvučne i vizualne signale kada je potrebno ubaciti hmelj. Na kraju kuhanja u kotao se stavlja cijevni izmjenjivač topline, koji je na ulazu spojen na dovod vodovodne vode kojom se sladovina hladi, a na izlazu se vruća voda izbacuje u odvod.



**Slika 6.** *Speidel Braumeister* sistem za proizvodnju piva (izvor: vlastita fotografija)

Za fermentaciju piva korišteni su cilindrično-konusni fermentori proizvođača Speidel volumena 60 L. Fermentori sadrže potpuni i nepotpuni ispušt, slavinu za uzorkovanje, čahuru za temperaturnu sondu te vrenjaću. Nemaju mogućnost fermentacije pod pritiskom, ali imaju dupli plašt kojim je omogućena kontrola temperature fermentacije. Na plaštu se

nalaze dva izlaza, za dovod i odvod rashladne tekućine, te se preko kontrolera na fermentoru zadaje željena temperatura fermentacije. Kontroler je povezan s elektromagnetskim ventilom koji prema potrebi otvara ili zatvara dovod rashladne tekućine.



**Slika 7.** *Speidel* cilindrično-konusni fermentor (izvor: vlastita fotografija)

Rashladna tekućina za hlađenje fermentora je 30% otopina glikola, a hladi se pomoću rashladnog uređaja proizvođača Quantor.



**Slika 8.** *Quantor* rashladni uređaj za hlađenje fermentora (izvor: vlastita fotografija)

### 3.1.2. Sirovine za proizvodnju piva

**Tablica 2.** Vrsta slada korištenog za proizvodnju piva

Vrsta slada	Proizvođač	Količina (kg)
<b>Pale ale</b>	Badass Barley Malt	9

**Tablica 3.** Vrste hmelja korištene za proizvodnju piva

Vrsta hmelja	Količina (g)
<b>Magnum</b>	25
<b>Citra</b>	100

**Tablica 4.** Vrste kvasca korištene za proizvodnju piva

Proizvođač	Naziv	Tip vrenja	Količina (g)
Fermentis	<b>SafAle US-05</b>	Gornje vrenje (Ale)	11,5
Fermentis	<b>SafLager W-34/70</b>	Donje vrenje (Lager)	23

**Fermentis SafAle US-05:** *Saccharomyces cerevisiae* kvasac gornjeg vrenja za proizvodnju neutralnih, balansiranih i čistih aleova. Ima dobru sposobnost zadržavanja u suspenziji za vrijeme fermentacije. Idealan za američke stilove piva i jače hmeljena piva. Nacjepljivanje: od 50 do 80 g/hL pri temperaturi od 18 do 26°C.

**Fermentis SafLager W-34/70:** *Saccharomyces pastorianus* kvasac donjeg vrenja, poznati soj kvasca za proizvodnju lager piva. Omogućava proizvodnju piva s dobro balansiranim biljnim i voćnim aromama, te pitkih piva čistog okusa. Nacjepljivanje: od 80 do 120 g/hL pri temperaturi od 12 do 18°C.

**Tablica 5.** Vrste šećera korištene za refermentaciju piva u boci

Vrsta šećera	Količina (g/0,5L)
<b>Saharoza</b>	4
<b>Dekstroza</b>	4
<b>Suhi ekstrakt slada</b>	4

### 3.1.3. Laboratorijska oprema korištena za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize piva

Za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize korišteni su sljedeći uređaji:

- pH metar (Boeco BT-675),
- prijenosni mjerač gustoće (Antoon Paar DMA 35),
- analizator (Anton Paar Alcolyzer DMA 4500 M),
- spektrofotometar (Haach Lange DR6000),
- mjerač ugljikovog dioksida u boci (Pentari Haffmans Inpack CO<sub>2</sub> Calculator).

### 3.1.4. Kemikalije korištene za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize piva

Za proizvodnju i fizikalno-kemijske analize korištene su sljedeće kemikalije:

- fosforna kiselina (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>),
- jod (I<sub>2</sub>),
- kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>),
- kalcijev sulfat (CaSO<sub>4</sub>),
- dijatomejska zemlja,
- oktanol (1-oktanol),
- klorovodična kiselina (HCl (6M)),
- izo-oktan (2,2,4-Trimetilpentan):

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Proizvodnja piva Speidel Braumeister sistemom

Početak proizvodnje piva je priprema i mljevenje slada. Prema pripremljenom receptu, odvaže se 9 kg Pale Ale slada koji se zatim samelje u mlinu. U kotao se ulije 55 L vruće dekarbonizirane vode, te se u kontroler na kotlu unesu potrebni parametri recepta. Početna temperatura ukomljavanja je 65°C, te se grijači pale i zagrijavaju vodu do zadane temperature. U vodu se zatim dodaje 2 mL fosforne kiseline, 7 g kalcijevog klorida i 6 g kalcijevog sulfata kako bi se podesio pH i kemijski sastav vode. U kotao sa zagrijanom vodom se ubacuje bubanj sa perforiranim dnom, te se u njega počinje usipavati samljeveni slad uz miješanje kako bi se spriječilo nastajanje gruda od slada. Kada se sav slad usipa u bubanj, na vrh bubnja se stavlja druga perforirana ploča s mrežom, te se zavije pomoću matice. Perforirane ploče u bubnju omogućuju cirkulaciju vode, odnosno sladovine, kroz slad, a da pritom ne propuštaju čestice slada i pljevicu koji bi se mogli zaglaviti u pumpama. Cirkulacija se provodi pomoću dvije elektromagnetske pumpe koje se pale i gase automatski, prema potrebi. Ukomljavanje na temperaturi od 65°C traje 60 minuta. Nakon 60 minuta, grijači se ponovo pale i podižu temperaturu komine na 72°C, te je održavaju na toj temperaturi 15 minuta. Iz kotla se izuzme uzorak komine, ohladi se i provede jodna proba kako bi se provjerilo je li tijekom ukomljavanja došlo do potpune hidrolize škroba. Nakon 15 minuta, grijači se ponovo pale i zagrijavaju kominu na 78°C kako bi se smanjila viskoznost komine i olakšalo cijedenje. Kada je ukomljavanje gotovo, bubanj s lažnim dnom se diže iz kotla kako bi se sladovina iscijedila iz tropa. Istovremeno se u bubanj s tropom dodaje vruća voda, koja se zagrijavala u drugom kotlu, kako bi se što više šećera ispralo iz tropa. Za nalijeve je korišteno 8 L vode, te je ekstrakt prije kuhanja iznosio 10,4°P, a pH je iznosio 5,42. Nakon što se gotovo sva sladovina iscijedila, bubanj s tropom se miče te se pokreće kuhanje. Kada je postignuta temperatura od 100°C, zvučni signal na kontroleru obavještava da je potrebno ubaciti prvi hmelj, 25 g Magnuma čija je uloga dati gorčinu pivu. Nakon 60 minuta kuhanja, ubacuje se drugi hmelj, 100 g Citre, te kuhanje završava. U kotao se stavlja spiralni izmjenjivač topline, kroz koji prolazi hladna vodovodna voda te se na taj način hladi sladovina. Sladovina se prvo hladi na 18°C, te se polovina sladovine iz kotla stavlja u prvi fermentor gdje će se fermentirati kvascem gornjeg vrenja. 11,5 g suhog kvasca SafAle US-05 se ubacuje u fermentor, te se na kontroleru fermentora namješta temperatura fermentacije od 18°C. Druga polovina sladovine se nastavlja hladiti do 15°C, prebacuje se u fermentor u koji se dodaje 23 g suhog kvasca SafLager W-34/70. Na kontroleru drugog fermentora se podešava temperatura fermentacije od 12°C. Fermentori se zatvaraju, te se na



vrh stavljaju vrenjaće kako bi se spriječio ulazak zraka i kontaminanata iz atmosfere. Nakon 10 dana fermentacije, fermentori se premještaju u hladnjake na temperaturu od 1°C kako bi se kvasac istaložio i ispustio iz konusa fermentora. Nakon 3 dana odležavanja na hladnome, pivo se istaće u staklene boce volumena 0,5 L, u koje je prethodno dodano po 4 g saharoze, dekstroze ili suhog ekstrakta slada za sekundarnu fermentaciju u boci. Pivo je potom čuvano na sobnoj temperaturi, uz povremene analize nastalog ugljikovog dioksida, dok su ostale fizikalno-kemijske analize izvršene na kraju sekundarne fermentacije.

### 3.2.2. Fizikalno-kemijske analize piva

Fizikalno-kemijske analize u proizvodnji piva se provode zbog osiguranja kvalitete, stabilnosti i konzistentnosti krajnjeg proizvoda. Također, pomažu otkriti potencijalne probleme u procesu proizvodnje, a koriste se i kod razvoja novih proizvoda. Za analizu su korištene EBC i MEBAK metode.

#### *Određivanje ekstrakta u osnovnoj sladovini, pravog i prividnog ekstrakta i udjela alkohola*

Za određivanje ekstrakta u osnovnoj sladovini, pravog i prividnog ekstrakata te udjela alkohola koristi se Anton Paar analizator. Uređaj se prije korištenja ispiru destiliranom vodom. Uzorke piva je prije analize potrebno zagrijati na 20°C, degazirati te profiltrirati koristeći filter papir i dijatomejsku zemlju kako bi mjerenje bilo što preciznije. Uzorci piva se zatim uliju u čašice, te stavljaju na utore na analizatoru. Uređaj zatim sam uranja iglu za uzorkovanje te mjeri potrebne parametre.

#### *Određivanje boje*

Uzorak za mjerenje boje potrebno je degazirati te ne smije sadržavati nikakve mjehuriće. U slučaju da je uzorak mutan, potrebno ga je izbistriti filtracijom ili centrifugiranjem, a u slučaju da se određuje boja tamnih piva, uzorak je potrebno razrijediti destiliranom vodom. Uzorak se zatim stavlja u jednu kivetu, dok se u drugu stavlja destilirana voda za slijepu probu. Kivete se stavljaju u uređaj. Odabere se program 430nm, a ako su uzorci mutni koristiti se i program 700 nm, te se iz dva rezultata izračunava vrijednost apsorpcije. Pritisne se tipka Start i na kraju mjerenje očita rezultat. Rezultat se zaokružuje na jednu decimalu, a mjerna jedinica je EBC jedinca.

### *Određivanje gorčine*

Gorčina u pivu se određuje pomoću spektrofotometra. Uzorke piva prije analize je potrebno degazirati te moraju biti temperature 20°C, a u slučaju da su uzorci mutni, treba ih se profiltrirati pomoću dijatomejske zemlje ili centrifugirati kako bi se izbistrili. U uzorke se zatim dodaje oktanol, 1 kap na 100 mL piva, koji sprječava nastanak pijene. 10 mL uzorka piva se otpipetira u menzuru, te se dodaje 0,5 ml klorovodične kiseline i 20 mL izo-oktana. Smjesa se zatim tresu 1 minutu, nakon toga se ostavlja 20 minuta da odstoji kako bi se razdvojili slojevi emulzije. Pipetom se zatim otpipetira gornji sloj emulzije te se stavlja u kivetu. Kiveta se potom stavlja u spektrofotometar i pokreće se mjerenje pri valnoj duljini od 275 nm. Nakon što je mjerenje gotovo, spektrofotometar automatski množi dobiveni rezultat apsorbancije sa 50, a gorčinu izražava u BU (*Bitternes Unit*) jedinacama.

### *Određivanje pH- vrijednosti*

Uzorak piva je prije mjerenja potrebno degazirati te zagrijati na 20°C. Sonda pH metra se uranja u uzorak, pritisne se tipka *Read* te se očita vrijednost kada se pH metar stabilizira. Nakon mjerenja, sonda pH metra se vadi iz uzorka i ispiru se destiliranom vodom te se uranja u otopinu za čuvanje sonde pH metra.

### *Određivanje ugljikovog dioksida*

Za određivanje količine ugljikov dioksida u flaširanom pivu nakon sekundarne fermentacije, koristi se uređaj Pentari Haffmans Inpack CO<sub>2</sub> Caclulator. Kako bi mjerenje bilo što preciznije, boca i sadržaj u njoj moraju biti temperature 20°C. Zatvorena boca s pivom se stavlja na postolje za bocu, te se glava za mjerenje spušta na oko 2mm od čepa boce. Ventil na glavi se zatvara, zakretanjem poluge postolje boce se diže, igla u glavi za mjerenje probija čep te se spušta sonda za mjerenje temperature. Na uređaju se pritisne tipka start te se uređaj primi s obje ruke i okreće naopako 5 puta. Uređaj se zatim vrati u početnu poziciju te se s njega očita rezultat. Nakon očitavanja rezultata, otvori se ventil za ispuštanje pritiska, podiže se sonda za mjerenje temperature te se zakreće poluga kako bi se spustilo postolje za bocu i uklonila boca.

## 4. REZULTATI

**Tablica 6.** Dnevnik kuhanja sladovine na Speidel Braumeister sistemu

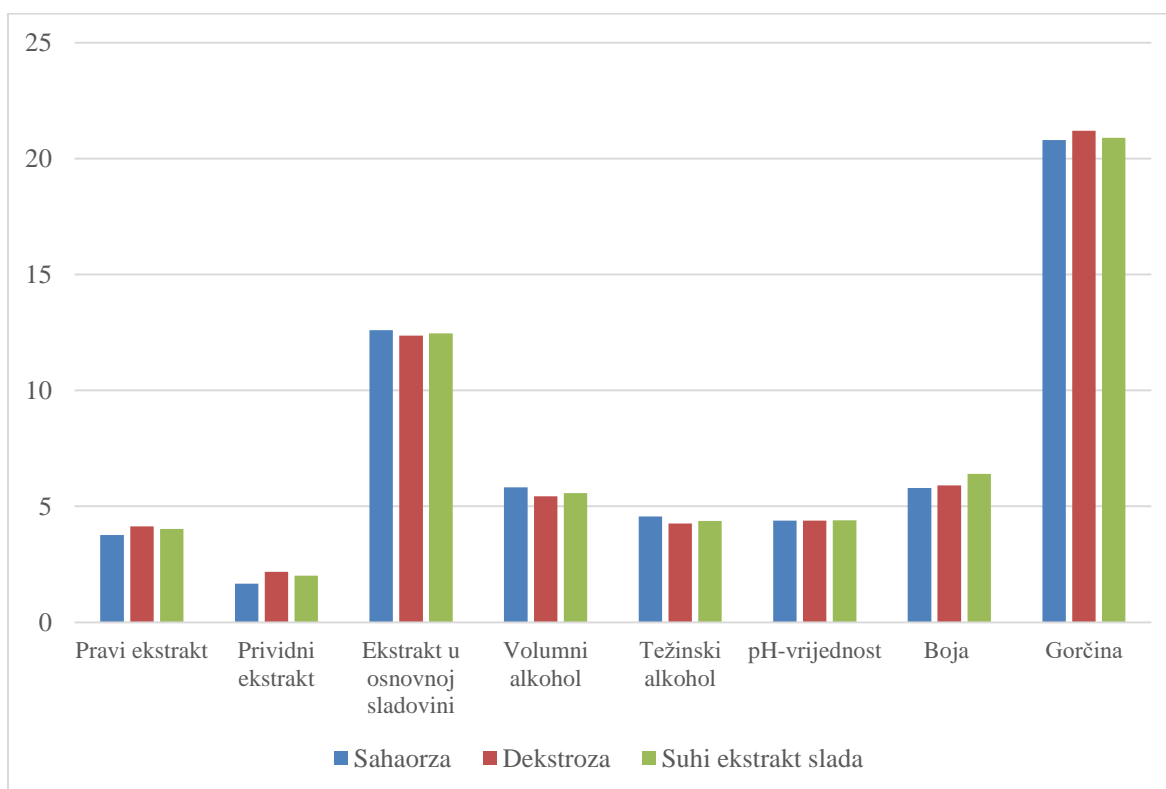
Faza u proizvodnji	Početna temperatura (°C)	Željena temperatura (°C)	Trajanje (min)
Zagrijavanje komine nakon miješanje slada i vode	58	65	10
Maltozna pauza	65	65	60
Zagrijavanje	65	72	16
Ošćerenje	72	72	15
Zagrijavanje	72	78	8
Deaktivacija enzima	78	78	2
Zagrijavanje	78	100	26
Kuhanje sladovine	100	100	60
Hlađenje sladovine	100	18	33
Pretok sladovine u 1. fermentor	18	18	5
Nacijepaljivanje Ale kvasca u 1. fermentor	18	18	1
Hlađenje sladovine	18	12	8
Pretok sladovine u 2. fermentor	12	12	5
Nacijepaljivanje Lager kvasca u 2. fermentor	12	12	1

**Tablica 7.** Fizikalno-kemijski parametri proizvedene sladovine mjereni u pogonu

Parametar	
Ekstrakt u osnovnoj sladovini	11,4 °P
pH vrijednost	5,14

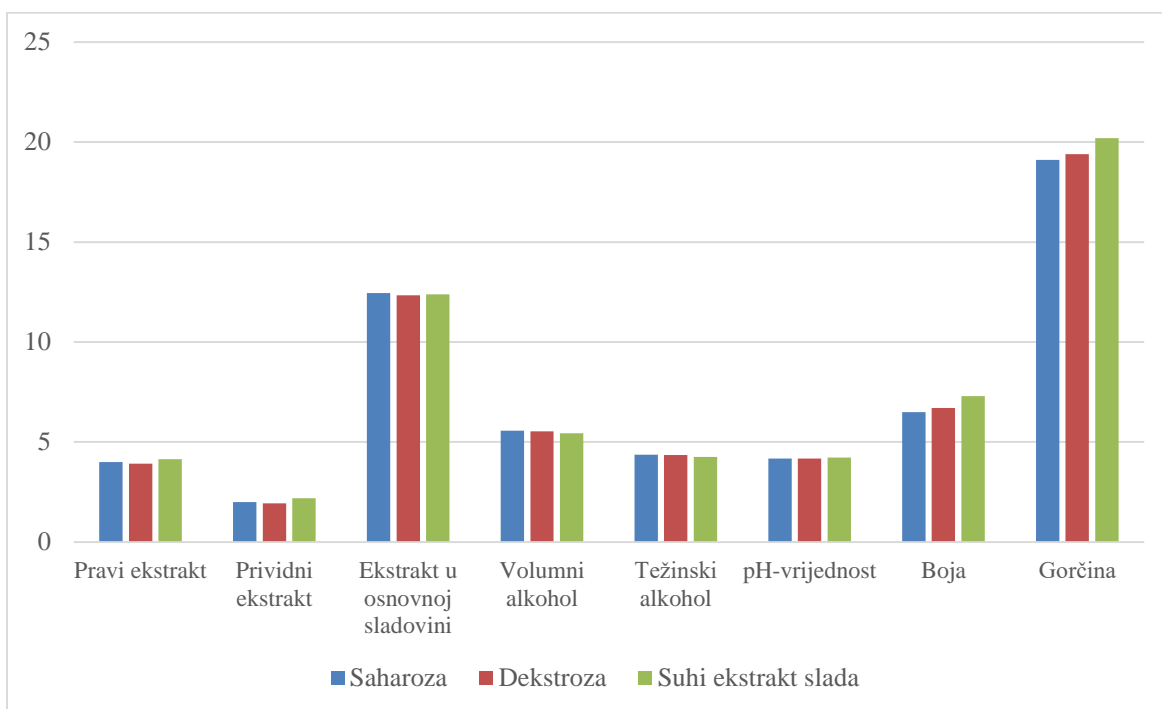
**Tablica 8.** Rezultati fizikalno-kemijske analize piva gornjeg vrenja

Datum analize: 6.12.2023.		US-05, gornje vrenje		
		Vrsta šećera korištena za refermentaciju		
Parametar		Saharoza	Dekstroza	Suhi ekstrakt slada
Pravi ekstrakt	°P	3,77	4,13	4,02
Prividni ekstrakt	°P	1,67	2,17	2,01
Ekstrakt u osnovnoj sladovini	°P	12,60	12,37	12,47
Volumni alkohol	ml/100ml	5,82	5,43	5,57
Težinski alkohol	g/100g	4,57	4,26	4,37
pH-vrijednost	-	4,39	4,38	4,40
Boja	EBC	5,8	5,9	6,4
Gorčina	IBU	20,8	21,2	20,9

**Slika 9.** Grafički prikaz rezultata fizikalno-kemijske analize piva gornjeg vrenja

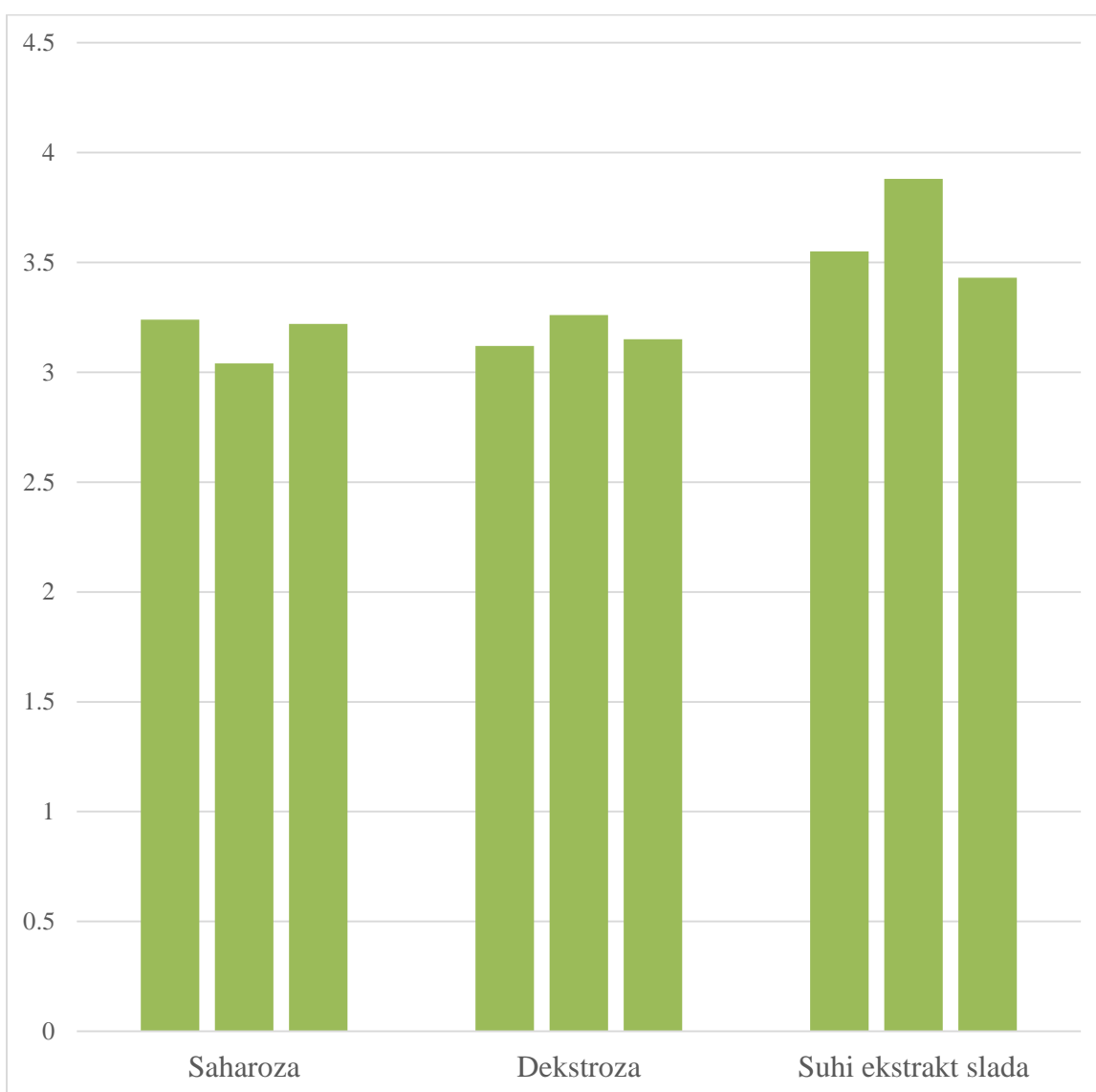
**Tablica 9.** Rezultati fizikalno-kemijske analize piva donjeg vrenja

Datum analize: 6.12.2023.		W-34/70, donje vrenje		
		Vrsta šećera korištena za refermentaciju		
Parametar		Saharoza	Dekstroza	Suhi ekstrakt slada
Pravi ekstrakt	°P	3,99	3,91	4,14
Prividni ekstrakt	°P	1,99	1,93	2,18
Ekstrakt u osnovnoj sladovini	°P	12,44	12,33	12,39
Volumni alkohol	ml/100ml	5,56	5,54	5,44
Težinski alkohol	g/100g	4,37	4,35	4,26
pH-vrijednost	-	4,18	4,17	4,22
Boja	EBC	6,5	6,7	7,3
Gorčina	IBU	19,1	19,4	20,2

**Slika 10.** Grafički prikaz rezultata fizikalno-kemijske analize piva donjeg vrenja

**Tablica 10.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem gornjeg vrenja nakon 5 dana refermentacije

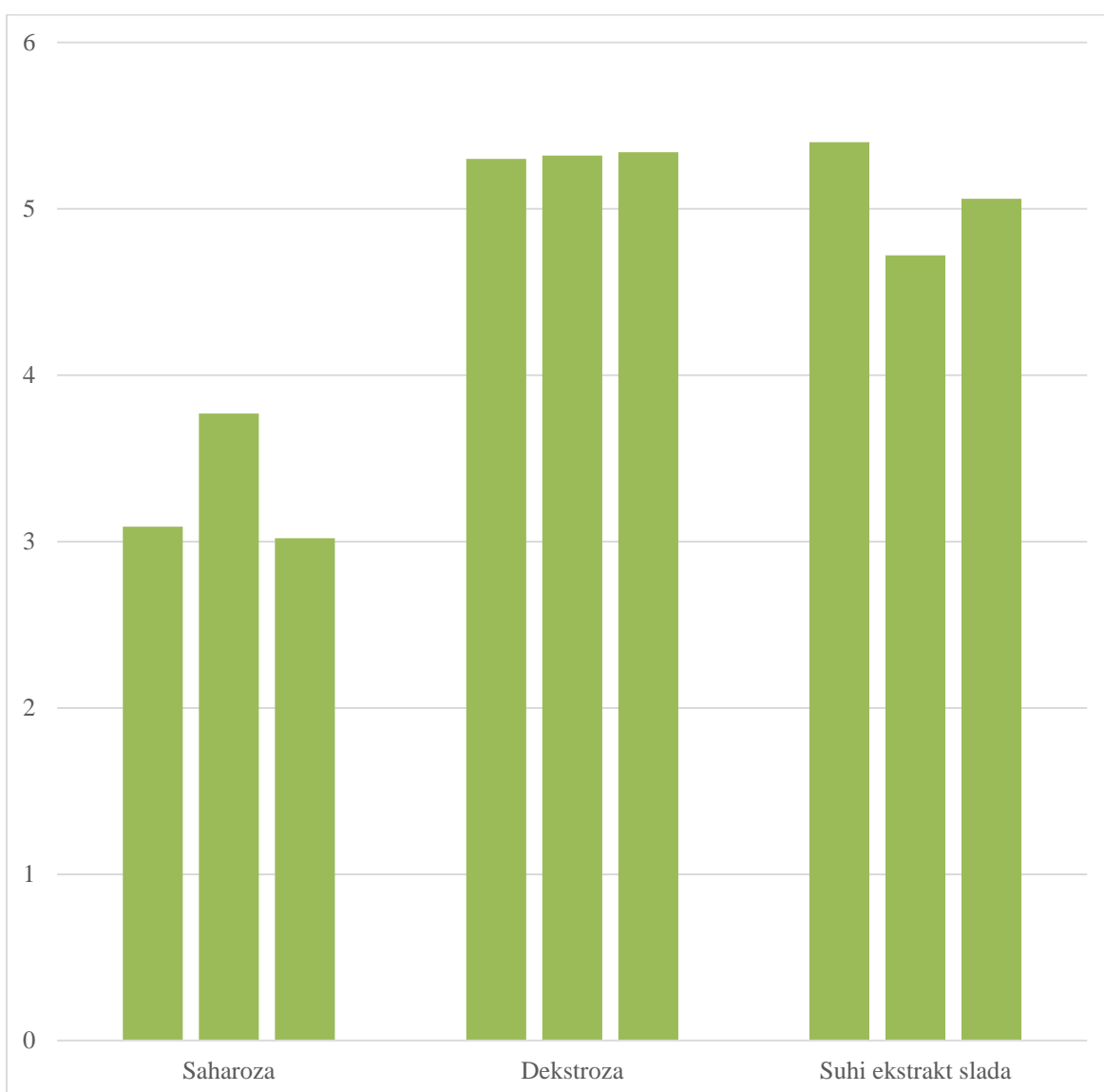
Datum mjerenja:		22.11.2023.		
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
US-05, gornje vrenje	saharoza	3,24	3,04	3,22
US-05, gornje vrenje	dekstroza	3,12	3,26	3,15
US-05, gornje vrenje	suhi ekstrakt slada	3,55	3,88	3,43



**Slika 11.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu gornjeg vrenja nakon 5 dana

**Tablica 11.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem gornjeg vrenja nakon dana 11 refermentacije

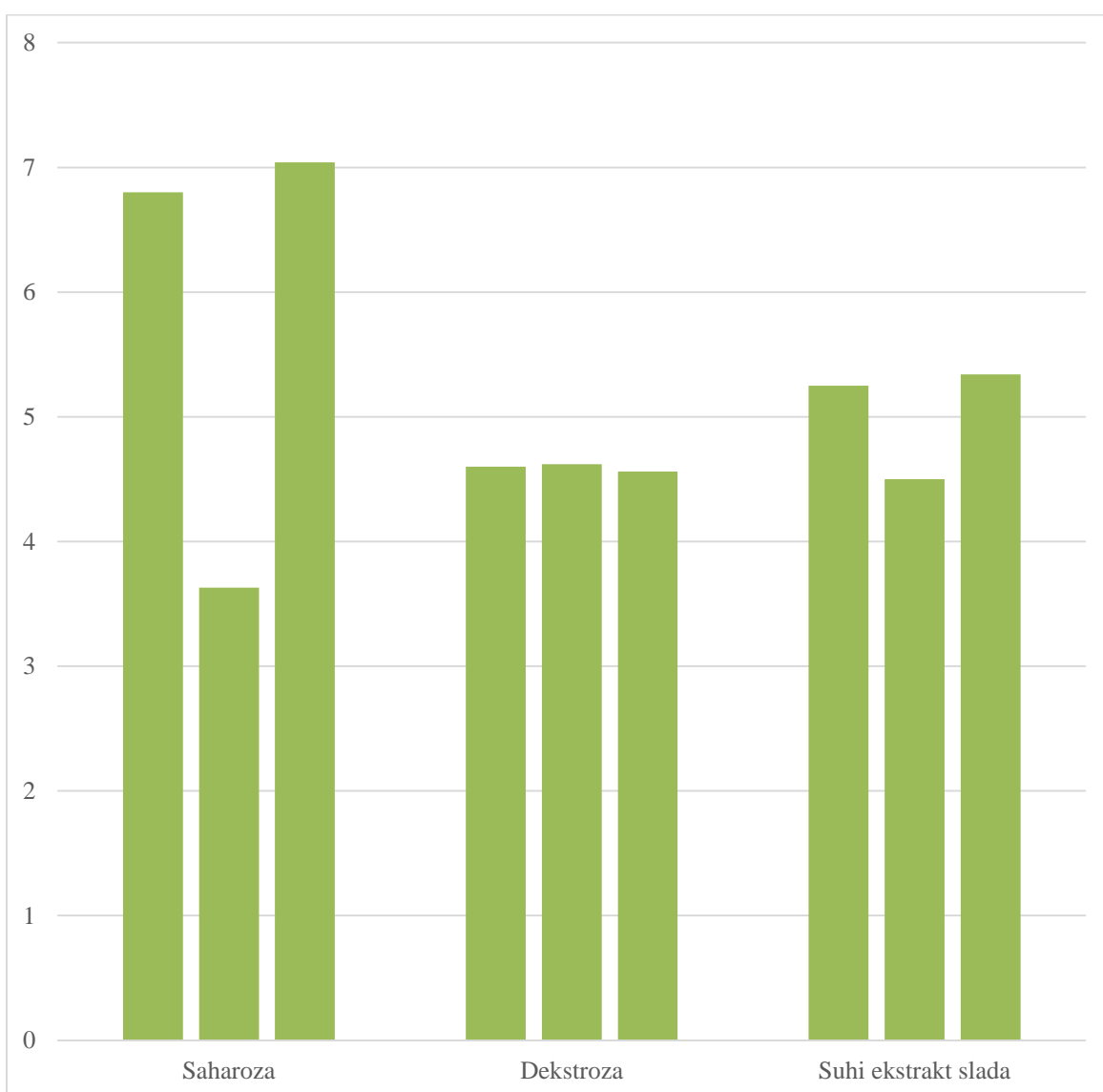
Datum mjerenja:		28.11.2023.		
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
US-05, gornje vrenje	saharoza	3,09	3,77	3,02
US-05, gornje vrenje	dekstroza	5,30	5,32	5,34
US-05, gornje vrenje	suhi ekstrakt slada	5,40	4,72	5,06



**Slika 12.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu gornjeg vrenja nakon 11 dana

**Tablica 12.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem gornjeg vrenja nakon 19 dana refermentacije

Datum mjerenja:		6.12.2023.		
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
US-05, gornje vrenje	saharoza	6,80	3,63	7,04
US-05, gornje vrenje	dekstroza	4,60	4,62	4,56
US-05, gornje vrenje	suhi ekstrakt slada	5,25	4,50	5,34

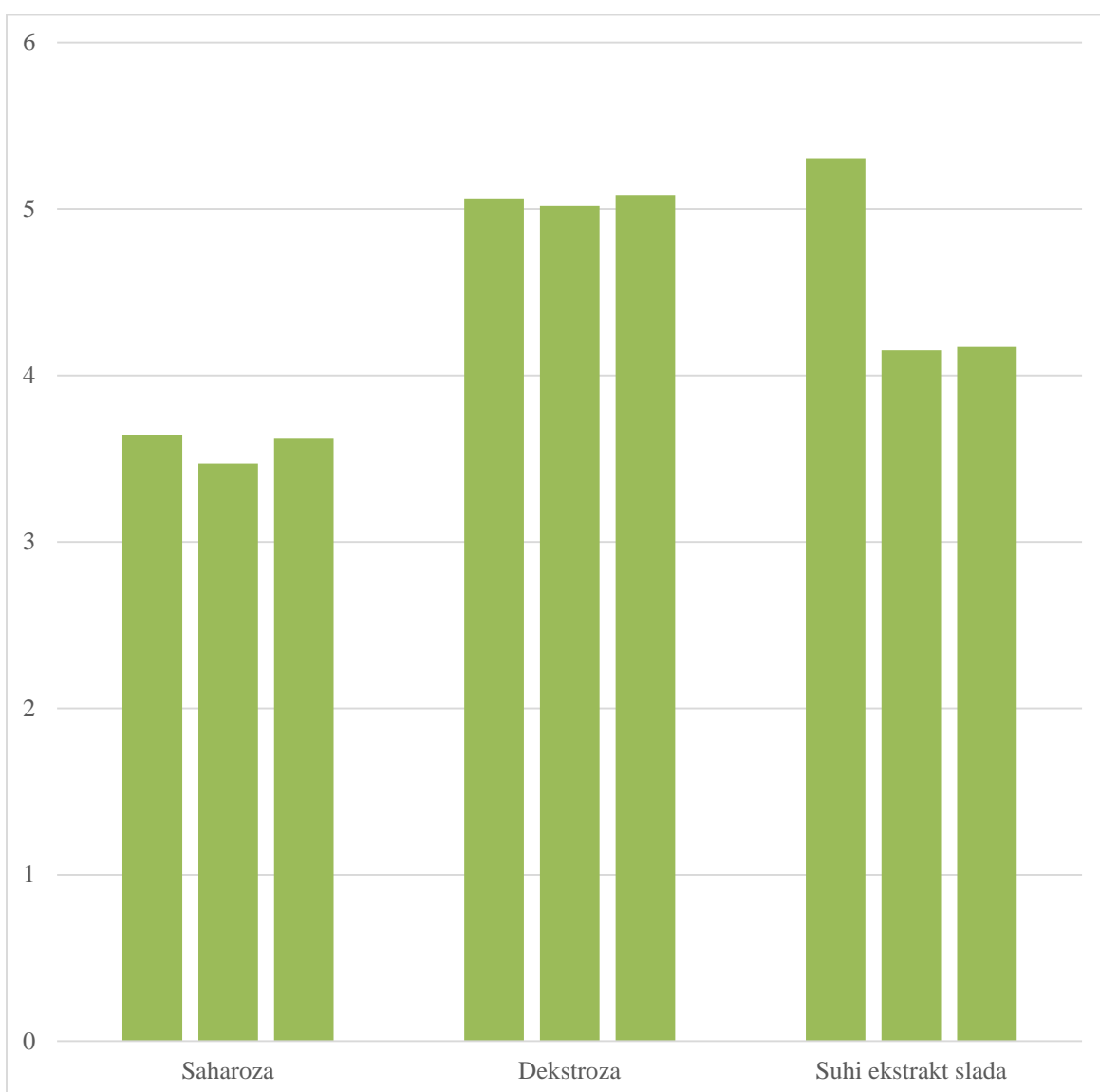


**Slika 13.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu gornjeg vrenja nakon 19 dana



**Tablica 13.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem donjeg vrenja nakon 5 dana refermentacije

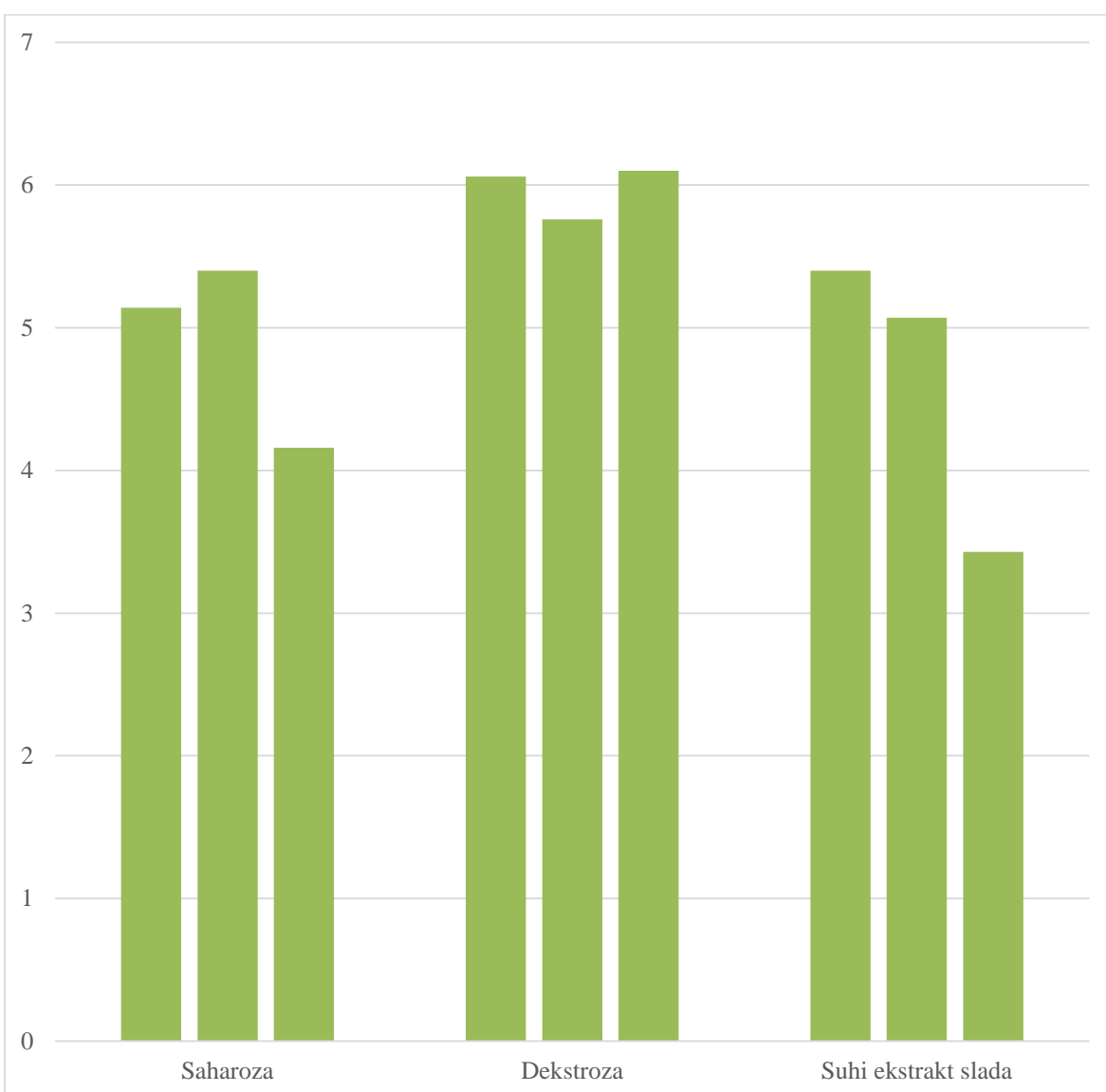
Datum mjerenja: 22.11.2023.				
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
W-34/70, donje vrenje	saharoza	3,64	3,47	3,62
W-34/70, donje vrenje	dekstroza	5,06	5,02	5,08
W-34/70, donje vrenje	suhi ekstrakt slada	5,30	4,15	4,17



**Slika 14.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu donjeg vrenja nakon 5 dana

**Tablica 14.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem donjeg vrenja nakon 11 dana refermentacije

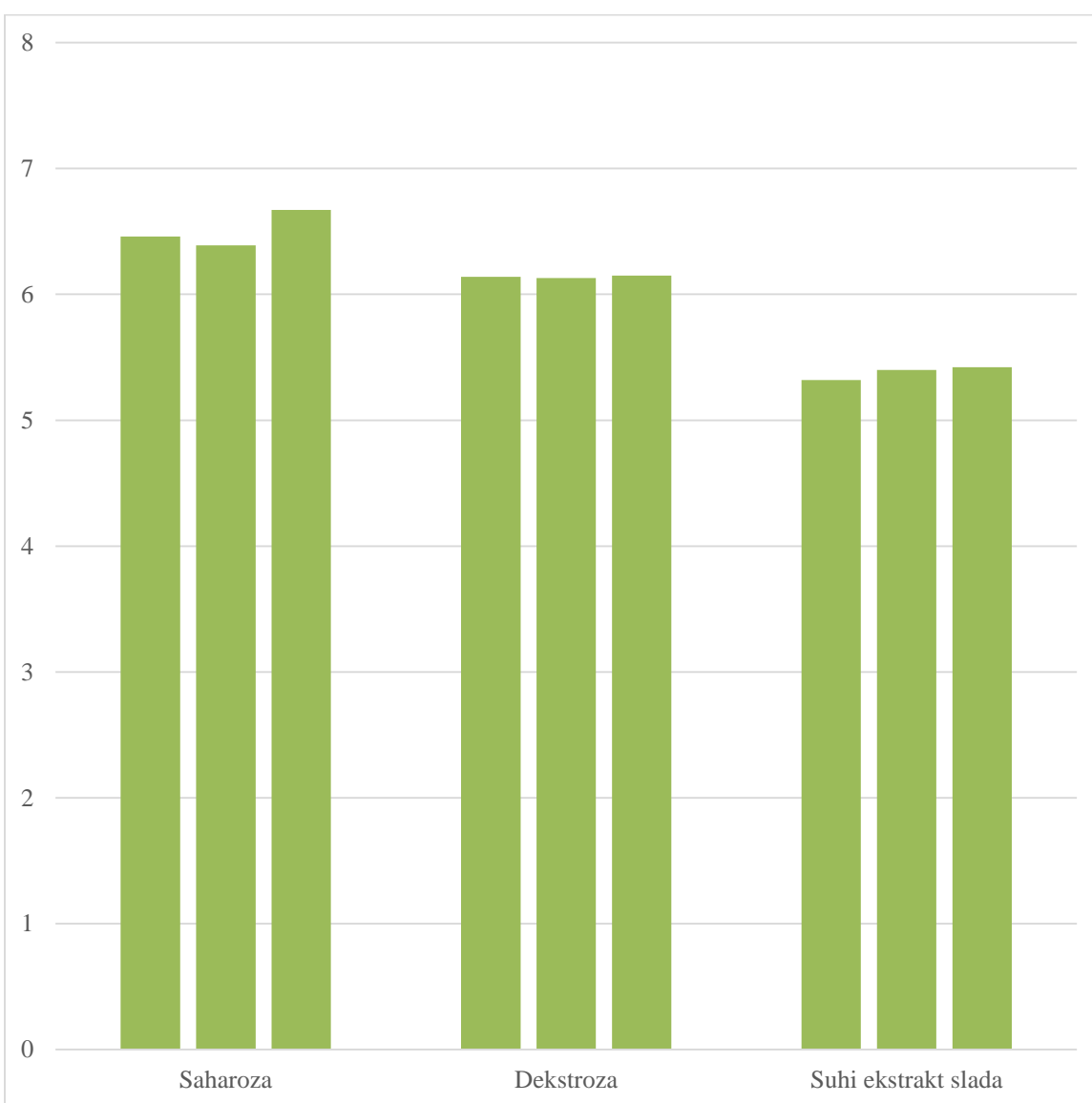
Datum mjerenja:		28.11.2023.		
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
W-34/70, donje vrenje	saharoza	5,14	5,40	4,16
W-34/70, donje vrenje	dekstroza	6,06	5,76	6,10
W-34/70, donje vrenje	suhi ekstrakt slada	5,40	5,07	5,21



**Slika 15.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu donjeg vrenja nakon 11 dana

**Tablica 15.** Rezultati mjerenja nastalog ugljikovog dioksida u uzorcima piva fermentiranih kvascem donjeg vrenja nakon 19 dana refermentacije

Datum mjerenja:		6.12.2023.		
Vrsta kvasca i tip vrenja	Vrsta šećera korištena za refermentaciju	CO <sub>2</sub> (g/L)		
W-34/70, donje vrenje	saharoza	6,46	6,39	6,67
W-34/70, donje vrenje	dekstroza	6,14	6,13	6,15
W-34/70, donje vrenje	suhi ekstrakt slada	5,32	5,40	5,42



**Slika 16.** Grafički prikaz nastale količine ugljikovog dioksida procesom refermentacije u pivu donjeg vrenja nakon 19 dana

## 5. RASPRAVA

Ista sladovina, proizvedena prema dnevniku kuhanja iz Tablice 5., podijeljena je u dva jednaka dijela, u dva različita fermentora. U jedan fermentor je zatim naciijepljen kvasac donjeg vrenja, Fermentis SafLager W-34/70, a u drugi kvasac gornjeg vrenja, Fermentis SafAle US-05. Sladovina s kvascem donjeg vrenja je zatim fermentirala na 12°C, a s kvascem gornjeg vrenja na 18°C u trajanju od 2 tjedna. Nakon 2 tjedna, mlado pivo je stavljeno na odležavanje u hladnjake na temperaturu od 1°C u trajanju od 3 dana kako bi se istaložio višak kvasca i ispustio kroz potpuni ispust na fermentoru. U prazne staklene boce volumena 0,5 L dodano je po 4 g određenog šećera, saharoze, dekstroze i suhog ekstrakta slada, te u njih istočeno mlado pivo. Boce su zatim zatvorene krunskim čepom te ostavljene na sobnoj temperaturi kako bi se provela refermentacija piva u boci. Refermentacija piva je trajala sveukupno 19 dana te je tada na uzorcima izvedena fizikalno-kemijska analiza gdje su mjereni pravi, prividni i ekstrakt u osnovnoj sladovini, volumni i težinski alkohol, pH-vrijednost, boja i gorčina. Ugljikov dioksid nastao tijekom refermentacije piva u boci mjereno je nakon 5, 11 i 19 dana refermentacije.

Ugljikov dioksid, u pivu gornjeg vrenja s dodatkom saharoze za refermentaciju, nakon 5 dana se kretao između 3,04 i 3,24 g/L, nakon 11 dana od 3,02 do 3,77 g/L te nakon 19 dana od 3,63 do 7,04 g/L. U pivu gornjeg vrenja s dodatkom dekstroze za refermentaciju, nakon 5 dana izmjereno je između 3,12 i 3,26 g/L ugljikovog dioksida, nakon 11 dana između 5,30 i 5,34 g/L te nakon 19 dana od 4,56 do 4,62 g/L. U bocama piva gornjeg vrenja u koje je dodan suhi ekstrakt slada nakon 5 dana je izmjereno između 3,43 i 3,88 g/L ugljikovog dioksida, nakon 11 dana 4,72 i 5,40 g/L, a nakon 19 dana između 4,50 i 5,34 g/L. Iz rezultata mjerenja ugljikovog dioksida u pivu gornjeg vrenja vidljivo je kako je kod uzoraka, u koje je dodana saharoza i suhi ekstrakt slada, najviše ugljikovog dioksida nastalo nakon potpune refermentacije, nakon 19 dana, dok u uzorku koji je refermentiran dekstrozom rezultati nisu pokazivali konstantan rast. Najveće vrijednosti ugljikovog dioksida, u pivu gornjeg vrenja nakon s dodatkom dekstroze za refermentaciju, izmjerene su nakon 11. dana refermentacije, a uzrok tome može biti neadekvatna temperatura prilikom mjerenja, prevelika količina kvasca u tim uzorcima piva ili nepreciznost prilikom dodavanja šećera za refermentaciju.

Vrijednosti nastalog ugljikovog dioksida, u pivu donjeg vrenja s dodatkom saharoze, nakon 5 dana refermentacije kretale su se između 3,47 i 3,64 g/L, nakon 11 dana između 4,16 i 5,40 g/L, a nakon 19 dana između 6,39 i 6,67 g/L. U pivu donjeg vrenja s dodatkom dekstroze nastali ugljikov dioksid je nakon 5 dana iznosi između 5,02 i 5,08 g/L, nakon 11 dana između 5,76 i 6,10 g/L, a nakon 19 dana od 6,13 i 6,15 g/L. U pivu donjeg vrenja koje je refermentirano suhim ekstraktom slada nakon 5 dana izmjereno je od 4,15 do 5,30 g/L, nakon 11 dana 5,07 do 5,40 g/L, a nakon 19 dana od 5,32 do 5,42 g/L ugljikovog dioksida. Rezultati mjerenja ugljikovog dioksida u pivu donjeg vrenja pokazuju da je najviše ugljikovog dioksida nastalo u pivu refermentiranom saharozom, dok su piva s dodatkom dekstroze i suhog ekstrakta proizvela nešto manje ugljikovog dioksida, ali dala poprilično konstante rezultate prilikom mjerenja.

Fizikalno-kemijska analiza piva gornjeg vrenja, nakon refermentacije različitim šećerima, nije pokazala značajne razlike u mjerenim parametrima u dobivenim gotovim pivama. Najznačajnije odstupanja su volumni i težinski alkohol koje su najveće vrijednosti kod piva refermentiranog saharozom, dok se boja najviše promijenila u pivu s dodatkom suhog ekstrakta slada. Razlika u boji u tom pivu očekivano je budući da se s suhi ekstrakt slada proizvodi sušenjem sladovine do suhe tvari, a sladovina u sebi sadrži obojene spojeve koji su u ovom slučaju potamnili gotovo pivo.

Fizikalno-kemijskom analizom piva donjeg vrenja, nakon refermentacije različitim šećerima, također su dobiveni poprilično konstantni rezultati. Značajnije razlike su kod piva refermentiranog suhim ekstraktom slada, kod kojeg je zaostalo najviše neprevrelog šećera, a s time i nastalo najmanja količina alkohola. Druge značajnije razlike ovog piva, od onih refermentiranih saharozom i dekstrozom, su nešto veća gorčina i boja koji su proizašli iz dodatka suhog ekstrakta slada.

## 6. ZAKLJUČAK

Postupak refermentacije ili sekundarne fermentacije smatra se poželjnim dijelom procesa prilikom proizvodnje piva. Taj postupak primarno se provodi kako bi se pivo karboniziralo, ali takav proces može imati i brojne druge benefite za proizvedeno pivo, kao na primjer stabilizacija i čišćenje piva od nepoželjnih okusa i mirisa nastali uslijed fermentacije. U industrijskim se pivovarama primjena metode refermentacije omogućava dodatkom sladovine u stadiju burne fermentacije kako bi se već gotovo, mlado pivo, karboniziralo. Refermentacija piva u bačvama, odnosno *caske*, značajna je za tradicionalno pivarstvo Ujedinjenog Kraljevstva gdje se i danas takov pivo proizvodi u popriličnim količinama. Korištenje postupka refermentacije piva u boci ograničeno je na manje craft pivovare, zbog većeg obima posla koji je potreban, i na kućne pivare kojim je ova metoda često jedini način kako bi karbonizirali proizvedeno pivo. Takav proces, uz svoje nedostatke koji se očituju u stvaranju brojnih nepoželjnih senzorskih svojstva, ima i prednost od kojih je možda najvažnija sprječavanje oksidacije piva.

Na osnovu rezultata i provedene analize može se zaključiti sljedeće:

1. Refermentacijom piva u boci, teško je dobiti konstantan proizvod, što je dokazano i eksperimentalnim dijelom ovog završnog rada. Moguće rješenje, za dobivanje konstantnijih parametara unutar jedne šarže, bi bilo korištenje posebnog spremnika u koji bi se u cijelu šaržu mladog piva dodala sveukupna količina šećera za cijelu šaržu. Nakon što bi se šećer otopio i dobro izmiješao sa pivom, pivo bi se zatim punilo u boce te bi se u svakoj boci napunjenog piva nalazila podjednaka količina šećera potrebnog za refermentaciju, a to bi omogućilo sličnija svojstva piva iste šarže.
2. Prilikom korištenja bilo koje od ranije spomenutih metoda refermentacije ili sekundarne fermentacije, važno je napomenuti da svojstva korištenih šećera također imaju bitan utjecaj na karakteristike gotovog piva. Pa tako mogu utjecati na boju, gorčinu, prevrelost i količinu nastalog alkohola u proizvedenom pivu.

## 7. LITERATURA

1. Briggs, D. E., Boulton, C., A., Brookes, P., A. (2004): *Brewing Science and practice*, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambrige CB
2. Fermentis (2024): SafAle US-05, <https://fermentis.com/en/product/safale-us-05/>, (04.05.2024.)
3. Fermentis (2024): SafLager W-34/70, <https://fermentis.com/en/product/saflager-w-34-70/>, (04.05.2024.)
4. Kunze, W. (2004): *Technology Brewing and Malting*, 3. izdanje, VLB Berlin
5. Marić, V. (2009): *Tehnologija piva*, Veleučilište u Karlovcu, Hrvatska
6. Mosher, M., Trantham, K. (2017): *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*, Springer Cham, Švicarska
7. Speidel Braumeister (2024): <https://www.speidels-braumeister.de/en/braumeister/10-20-50-litre-braumeister.html>, (07.05.2024.)
8. Štulíková, K., Novák, J., Vlček, J., Šavel, J., Košin, P., Dostálek, P. (2020): *Bottle Conditioning: Technology and Mechanisms Applied in Refermented Beers*, *Beverages*
9. White, C., Zainasheff, J. (2010): *Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation*, Brewers publications, Boulder, Colorado