



Uvodno predavanje iz modula

Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora
procesa proizvodnje piva

Prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Osnovni pojmovi u pivarstvu

- **Pivo** – pjenušavo, slabo alkoholno piće gorkog okusa i hmeljne arome
- **Sladovina** – vodeni ekstrakt pivskog slada, neslađenih žitarica i hmelja
- **Pivski slad** – osušeno zrno isklijanog pivskog ječma (ponekad pšenice) obogaćenog hidrolitičkim enzimima
- **Neslađene žitarice** – neisklijane žitarice i njihovi proizvodi (krupica, pahuljice, škrob). Prethodno ih treba skuhati (prevesti u škrobni lijepak).
- **Hmelj** – djevičanski, neoplodeni cvat višegodišnje ženske biljke penjačice *Humulus lupulus*, koji se izravno ili nakon prerade u pelete ili ekstrakte koristi za hmeljenje sladovine
- **Pivski kvasac** – vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, razlikuju se po temperaturi vrenja i sposobnosti taloženja nakon vrenja
 - Donje ili hladno vrenje – započinje pri 6-8 °C, a završava na 12-18 °C, kada se najveći dio kvasca istaloži na dno posude. Talog kvasca se ispusti te se nastavlja kratkotrajno doviranje (odležavanje) u istoj ili drugoj posudi (ležnom tanku) pri 0-2 °C. Tako se proizvode *lager* piva, tj. sva piva u hrvatskim pivovarama.
 - Gornje ili toplo vrenje i doviranje – započinje pri temperaturi od 15-20 °C, a završava pri 20-25 °C, kada najveći dio kvasca ispliva na površinu piva. Nakon obiranja kvasca, nastavlja se kratkotrajno doviranje pri 20 °C. Tako se proizvode tradicionalna engleska piva (*ale*) gornjeg vrenja te pšenična piva.

Tipovi i vrste piva

- **Prema vrsti kvasaca:**

- **Lager piva ili piva donjeg vrenja** – dobivaju se vrenjem pivske sladovine različitim sojevima čiste kulture kvasca vrste *S. uvarum*.
 - Pije se ohlađeno na 5-14 °C, daje bogatu i trajnu pjenu, punog je okusa (veliki udjel neprevrelog ekstrakta) s izraženom gorčinom i aromom po hmelju.
 - Svijetlo – *Helles* (Njemačka), *Bière ordinaire* (Nizozemska), *Ožujsko*, *Karlovačko*, *Pan*, *Osječko*, *Staročieško*, *Favorit*, *Zlatorog* (Hrvatska, preko 90 % proizvodnje)
 - Tamno – *Dunkel* ili *Dunkles*, iznimno tamna piva *Schwartz* (Njemačka)
 - Jako lager pivo – *Bock* i *Doppel Bock*
- **Ale piva ili piva gornjeg vrenja** - dobivaju se vrenjem pivske sladovine različitim sojevima čiste kulture kvasca vrste *S. cerevisiae*.
 - Pije se toplo na 20 °C, daje minimalnu i nestabilnu pjenu, praznijeg je okusa (sličnije vinu nego pivu).
 - Najpoznatija piva su *Mild*, *Bitter*, *Pale Ale*, *Brown Ale*, *Old ale*, *Barley wine*, *Scottish ale*, *Irish ale*, *Belgian ale*.
 - Njemački *Altbier* razlikuje se od engleskog *ale*-a po tome što se glavno vrenje vodi pri 18-22 °C, a odležavanje pri 0-8 °C (*Kölch*).
- **Afričko pivo** – proizvodi se od prosenog slada s posebnom vrstom kvasca *Schizosaccharomyces pombe*, prilagođenom ekstremnim klimatskim uvjetima (30-40 °C).
- **Spontano prevrela piva** – proizvode se pomoću divljih, neselekcioniranih sojeva kvasca, koji u sladovinu dospjevaju iz zraka ili sa zidova prostorija i stijenki posuda za vrenje. *Lambic* piva (Belgija) imaju poseban *bouquet* (vinski, voćni, ponekad fenolni): *Gueuze*, *Faro* i voćna piva – *Kriek*. Pakiraju se u male bočice začepljene šampanjskim čepom i umotane u sjajni crveni papir ili aluminijsku foliju.

Tipovi i vrste piva

- **Prema masenom udjelu ekstrakta (suhe tvari) u sladovini:**

- **Slaba ili lagana** – imaju malen udjel alkohola i neprevrelog ekstrakta – pogodna za ljetne vrućine.
- **Standardna** – proizvode se iz sladovine s 10,1-12 % ekstrakta, udjel alkohola je od 3,5-5,5 vol. % (stolna piva, slično stolnim vinima), većina naših piva pripada ovoj skupini.
- **Specijalna** – proizvode se iz sladovine s više od 12 % ekstrakta, nazivaju se još i puna piva (u Njemačkoj: *Vollbier*), slična kvalitetnim vinima, kod nas pod nazivom blagdanska ili zimska piva.
- **Dvostruko sladna** – proizvode se od sladovine s 18-22 % ekstrakta i nazivaju jakim pivima jer sadrže povećani udjel alkohola i neprevrelog ekstrakta. U Njemačkoj i Austriji se nazivaju *Bock*, *Stark* ili *Festbier* i smatraju se čuvenim (poput čuvenih vina), a u nas postoji samo jedna domaća vrsta ovog piva, *Tomislav*.
- **Ječmena vina** – sadrže volumni udjel alkohola kao i vina (7,5 do 10 vol. %), zbog velikog udjela neprevrelog ekstrakta izrazito su punog okusa, prilično “teška” pa se konzumiraju u malim volumenima, često kao desertno piće.

- **Prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine:**

- **Ječmeni slad** – osnovna sirovina za proizvodnju u *lager* i *ale* piva, uz djelomičnu zamjenu neslađenim žitaricama (sirovinama), što mora biti označeno na etiketi piva.
- **Pšenični slad** – zamjenom najmanje 50 % ječmenog slada s pšeničnim dobiva se pšenično ili Bijelo pivo (u njem. nazivlju *Weizenbier* i *Weissbier*). Pšenica daje pivu svjetliju boju nego ječam, pa kad je hladno i nefiltrirano ima mliječno-bijelu boju (visoki udjel mliječne kiseline). Najpoznatije vrste su *Weizenbier* i *Berliner Weisse*, koje se često piju s dodatkom sirupa od maline.
- **Raženi slad** –pivu daje svojstven okus zbog voćnih, pomalo gorkih, pikantnih, uljastih i gotovo ljutih obilježja paprene metvice. U Njemačkoj se nalazi pod imenom *Schierlinger Roggenbier*, a u Austriji *Goldroggen*.

Tipovi i vrste piva

- Prema boji
 - Piva mogu biti: svijetla, crvena, tamna i crna (nijanse)
 - **Češko ili plzensko** - svijetložute do svijetlo-zlatne boje
 - **Bečko** – zlatnožuto
 - **Dortmundsko** – crvenkasto
 - **Bavarsko** – smeđe
 - **Tipična tamna piva (crna)** – *Porter* i *Stout (Guinness)*. Crna su piva zaista crna, praktično neprozirna s okusom gorke čokolade ili “suhog karamela”. Dobro se slažu sa čokoladnim desertima, hranjiva su, vrlo ukusna i preporučljiva u malim volumenima. Najpoznatije vrste su *Köstritzer* (Njemačka) te *Asahi*, *Kirin*, *Sapporo* i *Suntory* (Japan).
- Prema udjelu alkohola
 - Podjela uglavnom služi za određivanje posebnog poreza na pivo (doprinos državnom proračunu).
 - **Bezalkoholna piva** – smiju sadržavati do 0,5 % alkohola (vol. %). Iznimka su islamske zemlje (0 vol.% alk.).
 - **Lagana piva** – sadrže ispod 3,5 vol. % alkohola.
 - **Standardna lager piva i piva gornjeg vrenja (ale)** – sadrže od 3,5 do 5,5 vol. % alkohola.
 - **Jaka piva** – imaju više od 5,5 vol. % alkohola.
 - **Ječmena vina** – udjel alkohola kao vina (7,5 do 10 vol. % alkohola).

Prema udjelu alkohola u pivu određuje se visina posebnog poreza na pivo, koji u nas iznosi 0,8 kn/L *bezalkoholnog* i 2,0 kn/L *standardnog* (alkoholnog) piva.

Prehrambena vrijednost piva

- **Sastojci piva** - pivo sadrži preko 600 sastojaka, a po udjelu su, ovisno vrsti, najvažniji voda, alkohol i neprevreli ekstrakt, odnosno anorganske i organske tvari otopljene u smjesi alkohola i vode.
 - **Voda** – udjel iznosi od 89 do 93 %. Mikrobiološki i kemijski sastav vode za proizvodnju piva strogo je nadziran i usklađen sa zakonskim i zdravstvenim normativima (flaširane izvorske vode).
 - **Alkohol, ekstrakt i energetska vrijednost** – u pivu nema masti i kolesterola, a sadrži tek manju količinu ugljikohidrata. Energetska vrijednost piva uglavnom potječe od alkohola. Sadrži manje kalorija nego druga pića, ali se često konzumira u većim volumenima.
 - Energetska vrijednost 1 g etanola iznosi 7 kcal ili 29 kJ
 - Iako pivo sadrži 1,5 do 3 puta manje alkohola, a puno više ekstrakta nego vino, energetska vrijednost mu je slična energetskej vrijednosti vina.
 - Preporučena potrošnja je 0,5 L na dan, ovisno o energetskej vrijednosti drugih namirnica koje su konzumirane tijekom dana.
 - Pivo izaziva lučenje želučanih sokova pa ga, stoga, kulturni svijet često koristi kao aperitiv umjesto pjenušca ili šampanjca!
 - **Ostali sastojci i njihovi utjecaji na fiziologiju prehrane i zdravlje** – glicerol (sastojak punoće okusa), β -glukan (dijetetsko vlakno korisno za probavu), antocijanogeni (fenolni spojevi iz slada i hmelja) mogu poboljšati zdravlje ljudi koji konzumiraju pivo.
 - Posebno je bogat izvor vitamina B skupine i mineralima (Tablica 1)

Tablica 1. Mineralni sastojci piva (Kunze, 1996)

Sastojak	Udjel (mg/L)	Fiziološki učinak na čovjeka
Natrij	30 – 32	Što manje to bolje (tlak)
Kalij	500 – 600	250 mg/dan = sprječava infarkt Djeluje diuretički
Kalcij	35 – 40	Prevenција srčanih oboljenja
Magnezij	100 – 110	Smanjuje udjel kolesterola Pozitivni učinak na rad srca
Fosfati	300 – 400	Sastojci kostiju i zuba; rezerve energije (ATP)
Sulfati	150 – 200	Bez značajne uloge
Kloridi	150 – 200	Dnevna potreba = 2500 mg
Nitrati	20 – 30	Štetni (redukcija u nitrate!); izazivaju širenje krvnih žila, razaraju vitamin A; ipak taj je udjel niži od onog u pitkoj vodi (50 mg/L)

Pivski trbuh

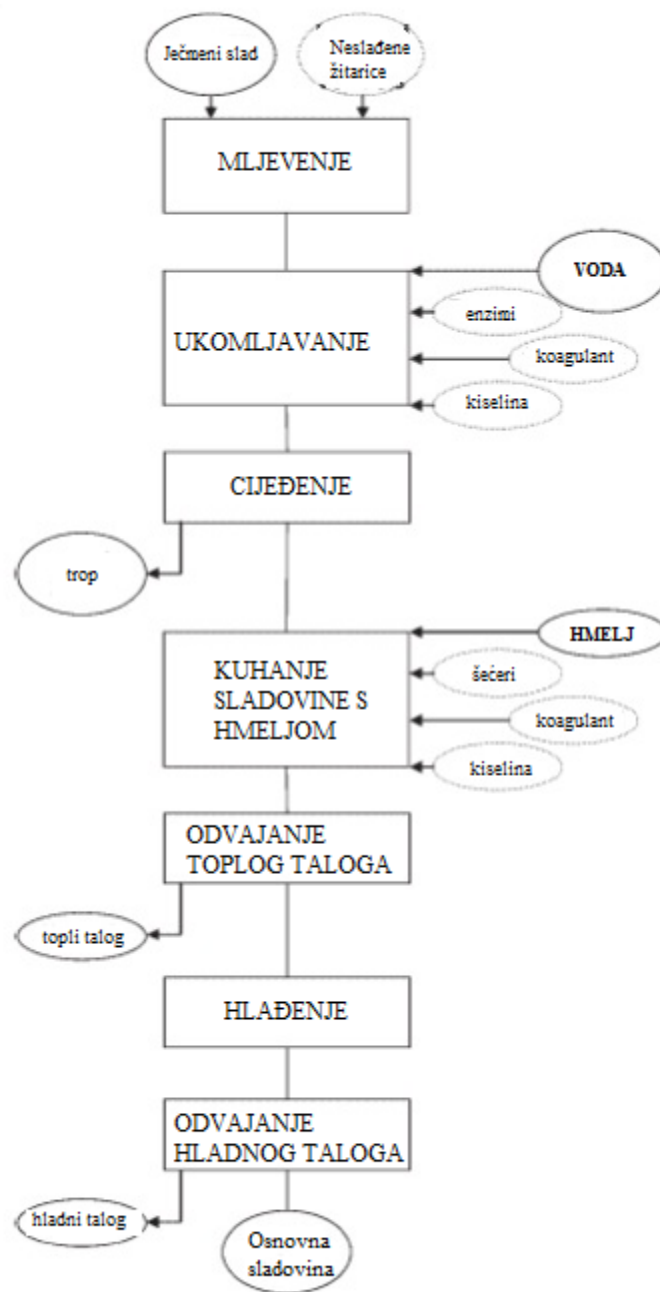
- Izraz je povezan s debljinom pivopija, ali se ne odnosi na pivo nego na vanjska obilježja pivopija.
- Provode se istraživanja povezanosti konzumiranja piva i loše prehrane, a vjerojatno je pivski trbuh posljedica konzumiranja hrane bogate kalorijama i mastima (Tablica 2).
- Istraživanja su pokazala da je malo vjerojatno da se konzumiranje piva može povezati s parametrima kojima se određuje pretilnost (indeks tjelesne mase (ITM) ili opseg struka.
- Umjereno konzumiranje alkohola kod žena povezano je sa smanjenjem tjelesne mase.

Tablica 2. Prosječna energetska vrijednost piva i drugih pića i jela koja se često konzumiraju uz pivo

Vrsta pića	Energetska vrijednost (kcal/100 ml)	Standardni obrok (ml)	Energetska vrijednost standardnog obroka (kcal)
Lager pivo (4,6% vol./vol etanola)	41	250	107
Bezalkoholno pivo	15	250	38
Stolno vino (12% vol./vol etanola)	77	150	115
Žestoka pića (40% vol./vol etanola)	250	25	62
Likeri (40% vol./vol etanola)	320	25	80
Punomasno mlijeko	64	244	156
Gazirani sokovi (cola)	42	370	155
Jabučni sok bez dodatka šećera	47	263	123
Juice od naranče bez dodatka šećera	42	263	110
Sok od rajčice	17	242	53

Vrsta hrane	kcal/100 g)	Standardna porcija (g)	Standardni obrok (kcal)
Ploške prženog krumpira (Čips)	500	50	250
Oraščići (soljeni/prženi)	600	50	300
Obični hamburger	250	110	275
Veliki hamburger	309	176	543
Srednje velika pica	270	150	420
Prženi krumpirići	342	134	458
Kobasica	300	60	70
Sendvič	240	140	350
Rolani kolač	275	100	375

Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje sladovine



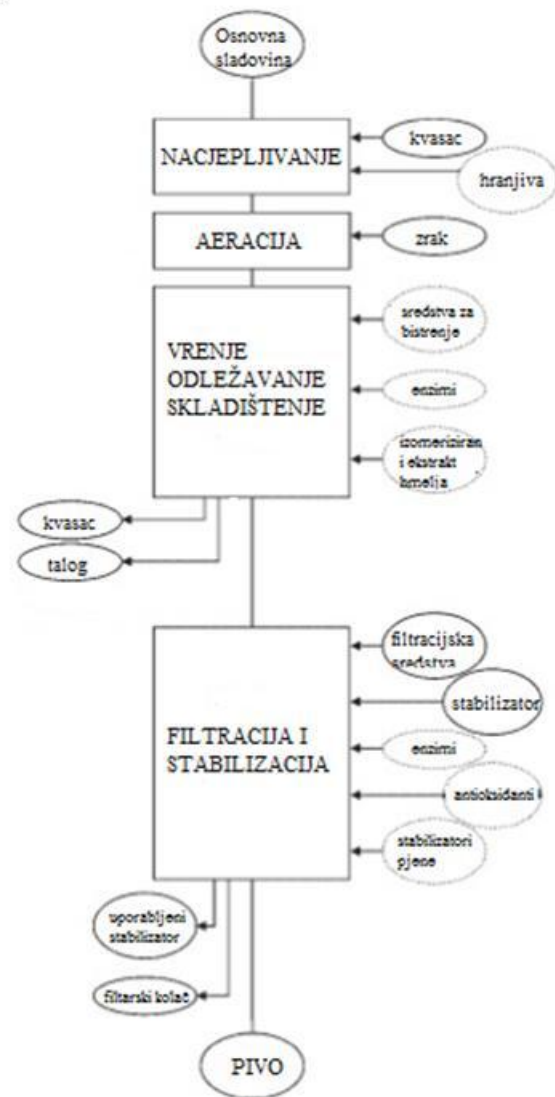
Varionica i proizvodnja sladovine

- Tehnološke operacije:
 - drobljenje ili meljava slada i neslađenih žitarica (mlin; suho ili mokro mljevenje)
 - ukomljavanje sladne prekrupe i usitnjenih neslađenih žitarica (komovnjak; sladna prekrupa, kotao komine; neslađene žitarice)
 - hidroliza (proteoliza i ošećerenje) usitnjenih sirovina i ekstrakcija proizvoda hidrolize (komovnjak; miješanje sladne komine i komine neslađenih žitarica)
 - Filtracija ili cijedenje sladovine iz ošećerene komine (cijednjak ili kominski filter)
 - Kuhanje i hmeljenje sladovine (kotao za sladovinu, whirlpool za izdvajanje toplog ili grubog taloga)
 - Bistrenje, hlađenje i aeriranje sladovine (pločasti hladnjak za hlađenje na temperaturu vrenja, bistrenje kroz filter ili centrifugalni separator; izdvajanje hladnog ili finog taloga, aeriranje i zasićivanje sladovine kisikom iz zraka).

Trajanje i nadzor procesa

- Važno je tijekom procesa ukomljavanja osigurati optimalan dodir između enzima i sastojaka komine (bez utjecaja na male čestice – deformiranje pod utjecaja sila smicanja – turbulencija)
- sile smicanja izazivaju nastajanje β -glukanskog gela – pogoršavanje filtrabilnosti sladovine.
- povišenje ili sniženje temperature, kao i produženo vrijeme trajanja ukomljavanja utječe na udjel fermentabilnih šećera te stupanj prevrenja sladovine, a time i na okus i pjenjivost piva
- na kraju hidrolize, u ekstraktu ne smije biti škroba ni visokomolekulskih dekstrina (jodna proba; ostaci škroba mogu izazvati tzv. škrobnu mutnoću piva)
- za jodnu probu se koristi 0,2 M otopina škroba

Slika 2. Shematski prikaz vrenja i odležavanja piva



Vrenje sladovine – glavno vrenje

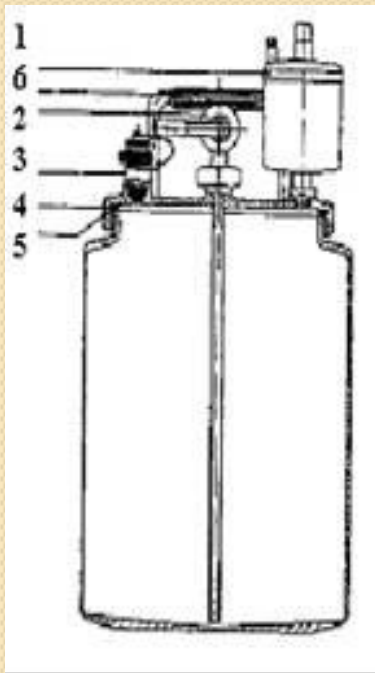
- Ohlađena i aerirana sladovina se nacjepljuje čistom kulturom pivskog kvasca tijekom prebacivanja u posude za vrenje, odnosno cilindrično-konusne tankove.
- U pivarskoj se praksi koriste dva postupka vrenja:
 - klasični postupak – glavno vrenje započinje u jednom tanku u posebnom odjelu pivovare, zvanom vrioni podrum, a nastavlja se kao naknadno vrenje, dozrijevanje ili odležavanje mladog piva u drugom tanku koji se nalazi u ležnom podrumu
 - suvremeni postupak – započinje kao glavno vrenje u jednoj posudi, cilindrično-konusnom fermentoru, smještenom najčešće na otvorenom prostoru, u kojem se nastavlja naknadno vrenje nakon ispuštanja glavnine kvasca
 - za nacjepljivanje sladovine koristi se čista kultura pivskog kvasca, koja se počinje umnožavati u laboratoriju od jedne stanice, a nastavlja se u pogonu da bi se dobio potreban broj (masa) stanica za nacjepljivanje sladovine u fermentorima za glavno vrenje.

Umnožavanje kvasca (dvije faze)

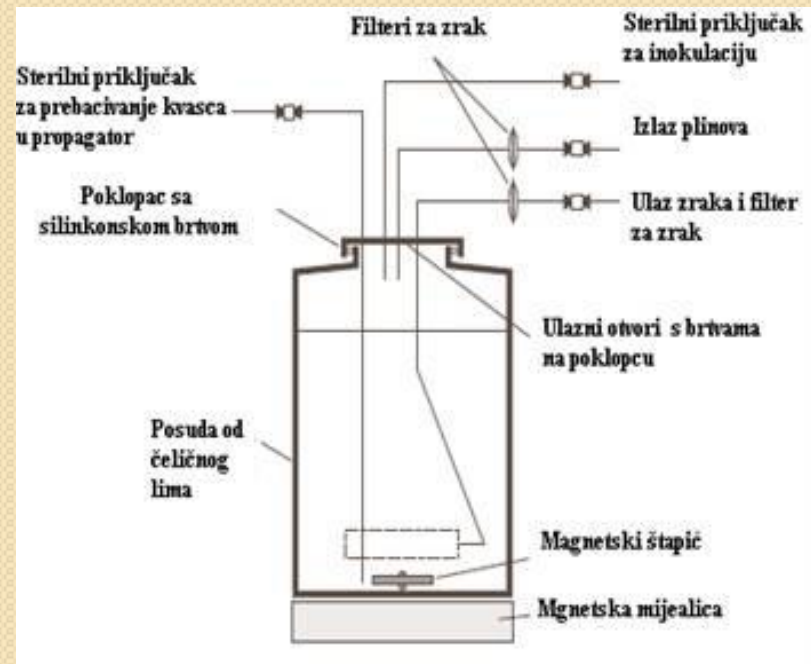
1. Priprema laboratorijske kulture – započinje prenošenjem čiste kulture izrasle na kosom agaru u 10 ml sladovine, nastavlja se sukcesivnim precjepljivanjem u tikvice sa sve većim volumenom sladovine (omjer precjepljivanja 1:5 do 1:10).
 2. Propagacija u pogonu – započinje prebacivanjem laboratorijske kulture u Carlsberšku posudu (Slika 3) ili njenu modernu varijantu (Slika 4), prenošenjem posude u pogon, gdje se kvasac kratkotrajno umnožava prije nacjepljivanja u posude za propagaciju većeg volumena.
- Pri umnožavanju treba optimizirati temperaturu u svakom stupnju povećanja volumena, a to znači smanjenje temperature za 2 °C, kako bi se izbjegao toplinski šok.
 - Nužno je aerirati kulturu!
 - Prebacivanje kulture iz manje u veću posudu provodi se aseptičnom tehnikom, uz otvoreni plamenik ili pneumatski.
 - Zrak za predtlačivanje, odnosno aeriranje kulture mora biti mikrobiološki čist!

Slika 3. Carlsberška posuda (Kunze, 1996)

1-filtar za sterilizaciju zraka; 2- slavina za uzorkovanje; 3- otvor s gumenom membranom za nacjepljivanje; 4 + 5- navojnice za zatvaranje; 6- ručica za nošenje

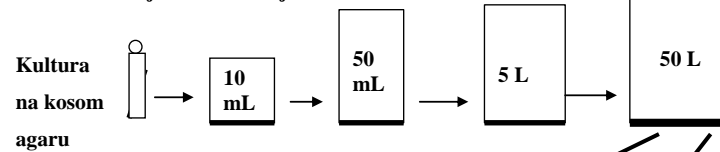


Slika 4. Suvremena posuda za prijenos laboratorijske kulture u pogon (Briggs i sur., 2004)



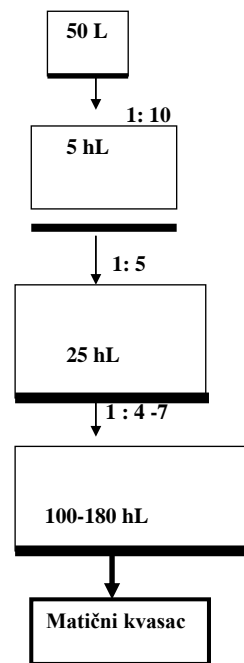
Slika 5. Shematski prikaz umnožavanja čiste kulture kvasca

1. Umnožavanje u laboratoriju

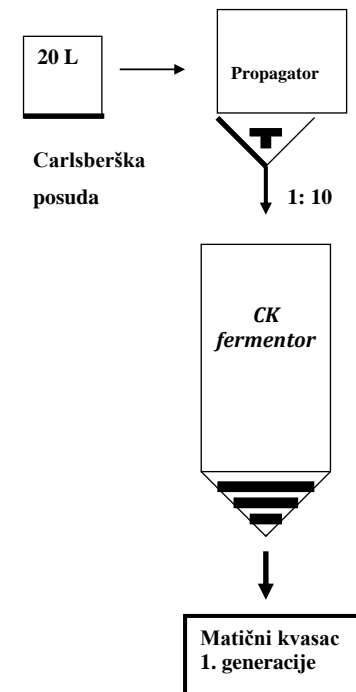


2. Umnožavanje u pogonu

a) Klasični ("otvoreni") anaerobni postupak

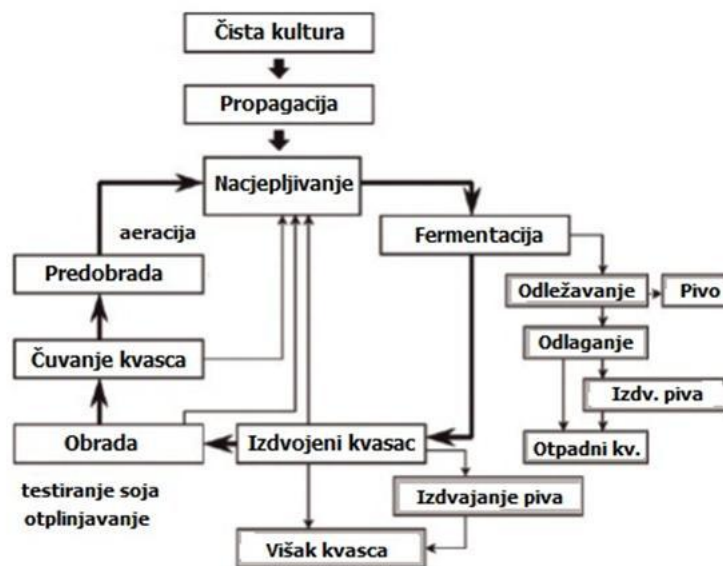


b) Savremeni ("zatvoreni") aerobni postupak



Održavanje i čuvanje anaerobno uzgojenog matičnog kvasca

- Za reciklaciju u proces vrenja, tj. naciepljivanje slijedećeg uvarka, uzima se srednji sloj istaloženog kvasca s dna vrionika ili iz konusa CKF-a jer sadrži najmlađe i najaktivnije stanice.
- Prije prebacivanja u posude za čuvanje, gusta suspenzija kvasca se obrađuje na vibracijskom situ da se uklone druge čvrste čestice: ostaci tropa, listići hmelja i koagulirani proteini.
- Ovakva biomasa kvasca može se koristiti kao matični kvasac ako je: fiziološki aktivan (>95 % živih stanica), genetski nepromijenjen (broj mutiranih stanica je zanemariv) i mikrobiološki čist.
- Fiziološka aktivnost stanica se može sačuvati 7 ili više dana tako da se gusta suspenzija kvasca čuva pri 2-5 °C (ili 0 °C) pod pivom, sladovinom ili vodom.



Slika 6. Reciklacija i čuvanje biomase matičnog kvasca

Izdvajanje kvasca i dorada piva

- Nekada:
 - bistrenje spontanim prirodnim taloženjem (do 3 mjeseca odležavanja)
 - veće čestice su se taložile brže nego manje (Stokesov zakon)
- Danas:
 - odležavanje piva skraćeno na 2 tjedna
 - glavni postupci izdvajanja kvasca i drugih čestica putem filtracije (naplavni ramski ili svijećasti filtri, slojni te mikro- i ultra-filtri) i centrifugiranja (separacija)

Tablica 3. Tip i učinak filtracije u ovisnosti o vrsti slojnica za filtraciju

Tip filtracije	Vrsta ploča	Učinak (%)	Kapacitet (hl/m ² /h)
Sterilna ili mikrobiološka	Sterilne ili bakteriološke	100 %-tno izdvajanje kvasca i bakterija	1,0
Fina	Visoko učinkovite	100 %-tno zadržavanje kvasca	1,2
Zadovoljavajuće fina	Za bistrenje	85 – 100 %-tno izdvajanje kvasca	1,5

Stabilizacija piva

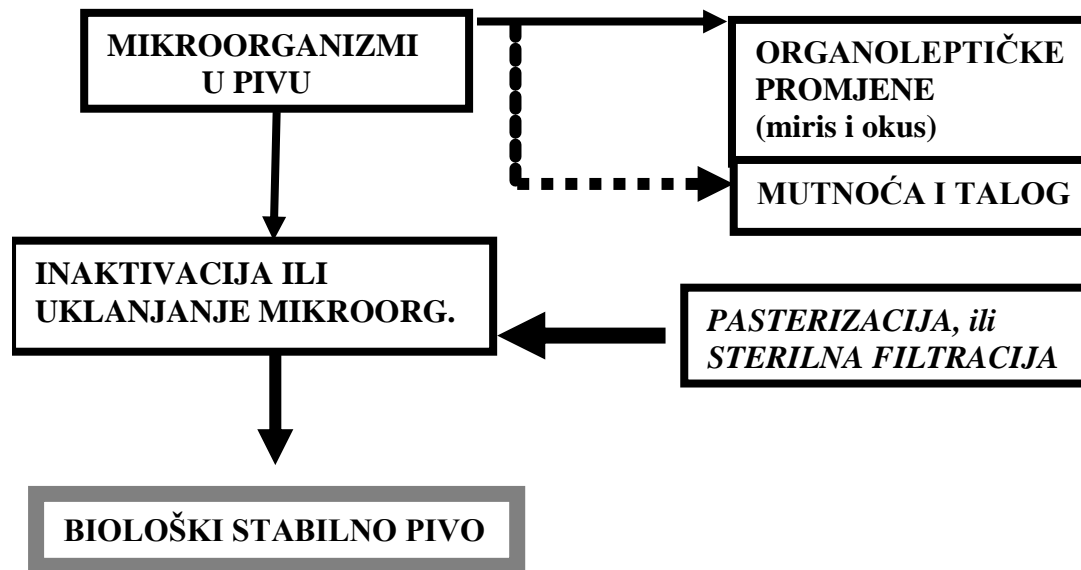
- gostioničke pivovare toče nefiltrirano pivo iz ležnih tankova u svojim pivnicama (ne stabiliziraju ga)
- trajnost takvog piva je mala (najviše 72 sata) pa pivo treba istočiti iz bačve u najkraćem mogućem vremenu
- Za transportiranje piva na veće udaljenosti nužna je stabilizacija
- Uzroci kvarenja, odnosno zamućenja ili neupotrebljivosti piva mogu biti:
 - mikroorganizmi – zbog razmnožavanja i tvorbe primarnih i sekundarnih metabolita izazivaju zamućenje piva, promjenu njegova okusa i mirisa – **BIOLOŠKA NESTABILNOST**
 - čestice koloida (proteini i polifenoli) koje se povećavaju s vremenom (starenjem) i izazivaju **KOLOIDNU NESTABILNOST**
 - ostali prirodni sastojci piva – djelovanjem kisika (ako je prisutan) ili svjetlosti mogu se oksidirati te tako izazvati kemijske promjene što se naziva **NESTABILNOST OKUSA**.

Biološka nestabilnost i stabilizacija

- Mikroorganizmi u pivu mogu biti štetni za:
 - potrošače – regulirano Pravilnikom o mikrobiološkim standardima za namirnice
 - pivo – regulirano internim proizvođačkim standardom
- Pravilnik o mikrobiološkim standardima jamči da je pivo zdravstveno ispravno, tj. proizvedeno i otopčeno u primjerenim higijenskim uvjetima, jer sadrži samo vrlo ograničen broj živih stanica kvasca, aerobnih mezofilnih bakterija i enterobakterija.
- Biološka stabilnost piva se smanjuje s:
 - neodržavanjem besprijekorne čistoće pogona i opreme
 - povećanjem razlike između graničnog i stupnja prevrenja prodajnog piva
 - preopterećenjem uređaja za filtraciju (proboj filtara)
 - ulaskom zraka (kisika) u pivo, naročito pri otakanju u ambalažu
 - čuvanjem piva pri povišenoj temperaturi
 - učestalim mućkanjem piva u ambalaži.

Biološki se stabilnim smatra samo pivo koje ne sadrži žive mikrobne stanice, ima visoki stupanj prevrenja (razlika $Sp'gp$ i $Sp'pp$ do 2 %), sadrži malo otopljenog kisika (ispod 0,5 mg/l) i nije sekundarno zagađeno prilikom otakanja u ambalažu (punjač, boce, čepovi).

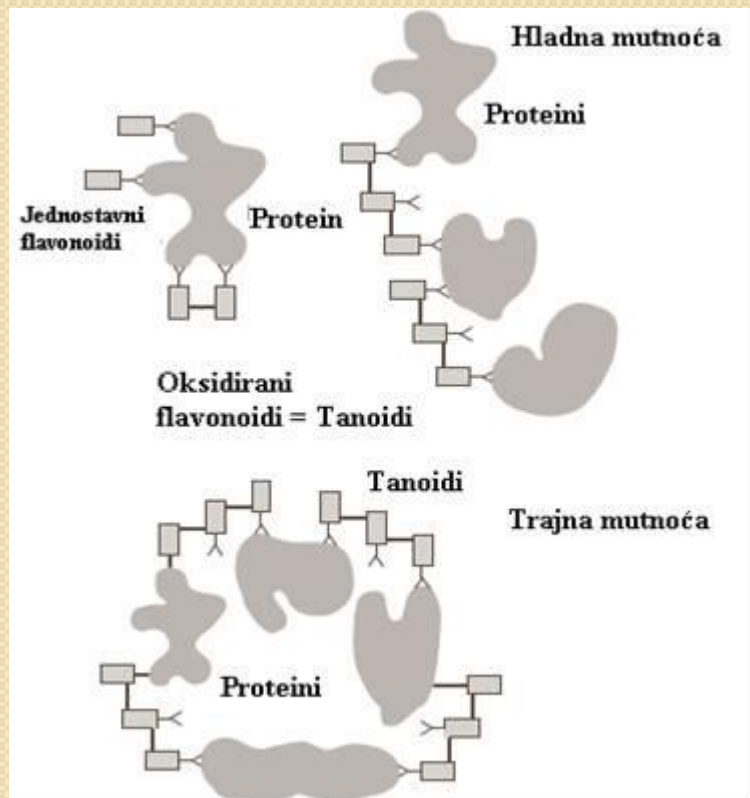
Slika 7. Negativni učinak mikroorganizama na pivo i postupci njihova uklanjanja



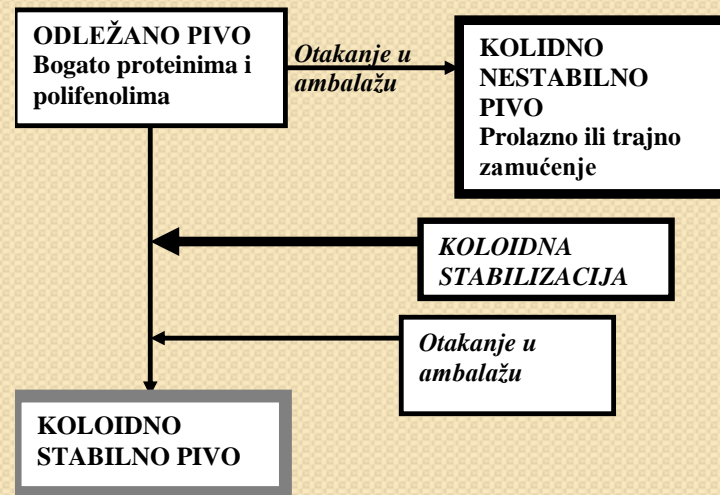
Koloidna nestabilnost

- koloidne čestice – prirodni sastojci piva – izazivaju zamućenje tijekom čuvanja u ambalaži, nakon dužeg vremena skladištenja
- razlikujemo dvije vrste zamućenja:
 - **hladno ili prolazno** – događa se tijekom čuvanja piva u hladnjaku (2-5 °C), kada se molekule koloidnih sastojaka piva (proteina i polifenola) zbog Brownovog gibanja međusobno povezuju vodikovim mostovima, tvoreći labilne veze, te se povećavaju. Na njih se veže i mali udjel ugljikohidrata i mineralnih sastojaka, pa se pivo zamuti.
 - kad se pivo izvadi iz hladnjaka i zagrije na sobnu temperaturu, labilne veze pucaju i pivo se izbistri
 - nažalost, ova vrsta zamućenja s vremenom prelazi u trajno zamućenje, koje se ne gubi nakon zagrijavanja i naziva se *starosna mutnoća*.
 - **trajno ili starosno** – utječe niz faktora:
 - *pasterizacijska mutnoća* – javlja se u pasteriziranom pivu koje nije bilo prije koloidno stabilizirano
 - *oksidacijska mutnoća* – javlja se ako je pivo tijekom otakanja u ambalažu došlo u dodir sa zrakom
 - *metalna mutnoća* – ako su u pivu prisutni ioni teških metala
 - *protresna mutnoća* – mućkanje/protresanje piva uz svjetlost tijekom skladištenja stimuliraju sudaranje molekula i oksidacijske reakcije.

Slika 8. Siebertov model nastajanja zamućenja piva (Gopal i Rehmanji, 2000)



Slika 9. Postupak uklanjanja viška proteina i polifenola iz piva koloidnom stabilizacijom



Koloidna stabilizacija piva

- Za postizanje duge koloidne stabilnosti – pivo treba stabilizirati bentonitima (prirodni alumosilikati), silikagelima ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Na}$ -vodeno staklo \rightarrow hidrogel, sadrži 50% vode ili u obliku kserogela, $<5\%$ vode) i PVPP (polivinilpolipirolidon).
- **Silikageli** – promjer pora $3.0 - 3,5 \mu\text{m}$ se doziraju u pivo u pufer tanku (50-150 g/hl) u kojem se provodi stabilizacija prije doziranja pomoćnog filtracijskog sredstva (kieselgura). Na sebe vežu proteinske sastojke mutnoće koji ostaju na filtru.
- **PVPP** – nije topljiv niti u jednom poznatom otapalu, a u vodi bubri te na sebe selektivno apsorbira sve taninske (polifenolne) sastojke. Najčešće se koristi u kombinaciji sa silikagelom u koncentraciji od 50 g/hl piva.
- Procjena koloidne stabilnosti piva uključuje kvalitativno određivanje udjela proteina i polifenola u odležanom pivu.
- Najčešća metoda je “forcing test”, test ubrzanog starenja prema broju toplih dana, a temelji se na zadržavanju nestabiliziranog piva na $40\text{ }^\circ\text{C}$, a stabiliziranog na $60\text{ }^\circ\text{C}$ dok se pivo ne zamuti za dvije EBC jedinice mutnoće.

Biološka stabilnost nakon bistrenja/filtracije - pasterizacija

- Prije pasterizacije je preporučljivo pivo koloidno stabilizirati (temperatura pasterizacije ubrzava starenje koloida prisutnih u pivu)
- Praktično trajanje pasterizacije ovisi o temperaturi zadržavanja, a njena uspješnost ovisi o primijenjenim pasterizacijskim jedinicama (P_j).
- P_j = potrebno vrijeme zadržavanja piva na određenoj temperaturi, izraženo u minutama, kojim se postiže isti učinak termičke destrukcije mikroorganizama kao pri 60 °C u trajanju od 1 minute:

$$P_j = \text{vrijeme} \times 1,393^{(\text{temperatura u grijaču} - 60^\circ \text{C})}$$

- Za pasterizaciju treba 10 do 15 P_j , odnosno 12,5 P_j (prosječno). Prema tome, pri:
61 °C; $12,5 P_j / 1,393 = 8,97$ minuta
65 °C; $12,5 P_j / 5,24 = 2,38$ minuta.
- Viša temperatura skraćuje vrijeme pasterizacije! Oprez sa sekundarnim mikrobnim zagađenjima piva!

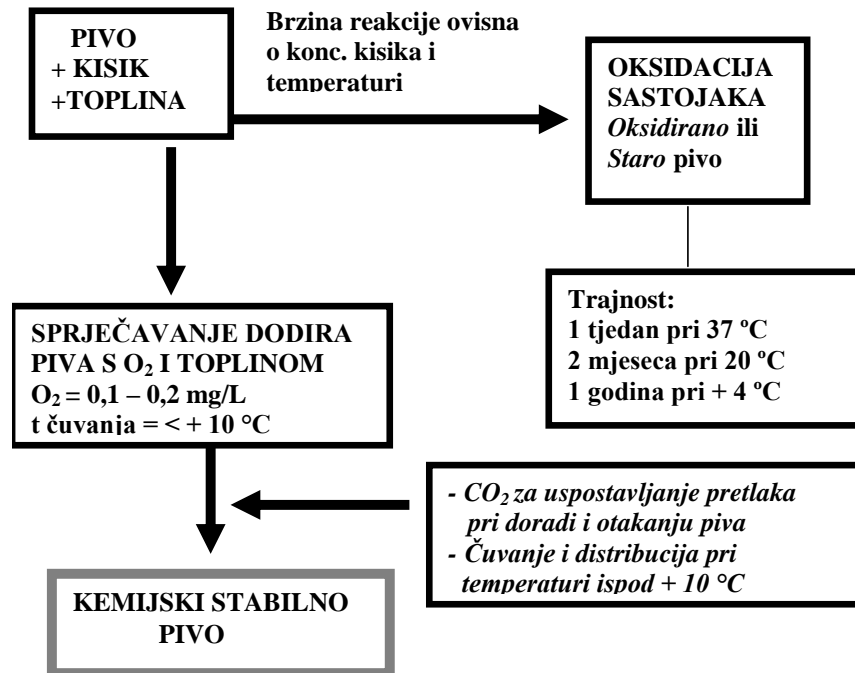
Biološka stabilnost nakon otakanja u ambalažu

- potpuna biološka stabilnost postiže se pasterizacijom napunjenih staklenih boca ili limenki šaržnim postupkom u tunelskom pasterizatoru
- Postupak:
 - pivo u staklenim bocama se polagano zagrijava na 60-62 °C (staklo je loš vodič topline) tijekom 20-25 minuta da se zagrije hladna jezgra piva koja se nalazi 1,5 cm iznad sredine dna boce.
 - nakon toga započinje hlađenje (20-25 minuta)
 - ukupno vrijeme prolaza piva kroz pasterizator traje oko 1 sat – posljedice su pojačanje boje piva, eventualno pojava taloga i okusa po kruhu (pasterizacijski okus).
 - Da bi se to izbjeglo, pivo je prije potrebno koloidno stabilizirati, otakati ga u boce bez prisustva kisika ili mu dodati reduktone (askorbinsku kiselinu).

Nestabilnost okusa piva

- senzorska ocjena piva je najbolja 2-3 dana nakon filtracije i otakanja u ambalažu
- kisik je najveći neprijatelj pivu, ambalažno pivo treba čuvati u tamnim i hladnim prostorima ($< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- tijekom čuvanja pivo postaje sve starije, pa se povećava udjel karbonilnih spojeva u njemu.

Slika 10. Negativni učinak kisika i topline na pivo s mogućnostima ublažavanja posljedica



Otakanje (punjenje) piva u ambalažu

- početkom 60-tih godina prošlog st. trajnost piva je bila ograničena, nije ju trebalo deklarirati, no u *Pravilniku o pivu* je navedeno da se nepasterizirano pivo u bocama ne smije zamutiti tijekom 10-dnevnog čuvanja pri 10 °C, a pasterizirano tijekom 25-30 dana pri 25 °C.
- danas je obvezna deklaracija na etiketi, a za boce i limenke se kreće od 3 do 18 mjeseci. Razlog ovako širokom rasponu trajnosti je u “pomalo” šaljivoj konstataciji: ***“Suvremenom je pivaru potrebno 20 dana da proizvede kvalitetno pivo koje se može upropastiti za 20 minuta tijekom punjenja u ambalažu”***.
- Osnovna pravila punjenja piva:
 - spriječiti dodir piva s kisikom (0,02-0,04 mg O₂/L tijekom punjenja), zbog nepoželjne oksidacije njegovih sastojaka
 - spriječiti pad tlaka piva, zbog sprječavanja gubitka CO₂
 - učestalo prati dijelove uređaja koji dolaze u dodir s pivom, kao i čitavo postrojenje za punjenje, radi sprječavanja sekundarnog zagađenja
 - redovito i potpuno nadzirati proces punjenja

Nadzor proizvodnje i gotovog piva

- Nadzor proizvodnje piva se sastoji od:
 - mikrobiološkog nadzora
 - uklanjanja nepoželjnih mikroorganizama čišćenjem i dezinfekcijom
 - kemijsko-tehnološkog nadzora i organoleptike gotovog proizvoda
 - praćenja gubitaka tijekom tehnološkog procesa
 - ocjene uspješnosti tehnološkog procesa

Mikrobiološki nadzor

- U proizvodnji piva mogu se pojaviti specifični mikroorganizmi podijeljeni u 3 grupe:
 - **Neškodljivi**, tzv. prateći mikroorganizmi, koji se ne mogu razmnožavati u pivu pa s vremenom odumiru (plijesni, različite vrste bakterija i kvasaca), no njihova prisutnost je indikator prisustva i štetnih mikroorganizama.
 - **Potencijalno štetni** mikroorganizmi, razmnožavaju se samo u za njih povoljnim uvjetima (povećan udjel kisika u pivu, rel. visoka pH vrijednost piva – 4,7-4,8, mali udjel gorkih sastojaka hmelja i visoka koncentracija neprevrelog ekstrakta). Predstavnici su bakterije *L. casei*, *S. lactis*, *P. cerevisiophilus*, *M. cerevisiae* i *Enterobacteriaceae*. Posljedice njihova rasta u pivu su: promjena pH vrijednosti zbog nastajanja mliječne kiseline i loš okus te potpuno kvarenje piva (*P. cerevisiophilus* i *M. cerevisiae*).
 - **Obligatno štetni** mikroorganizmi, imuni su na odsustvo kisika i niske pH vrijednosti. Izazivaju promjenu okusa i mirisa piva, mogu tvoriti talog i zamućuju pivo. Najčešće su to mliječno-kisele bakterije *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. frigidus* i *P. damnosus*. Među njima se mogu naći i stanice kvasaca koje izazivaju promjenu okusa, zamućenje i talog: radni kvasac, divlji kvasci iz roda *Saccharomyces*, te sojevi iz rodova *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Hansenula* i *Candida*.

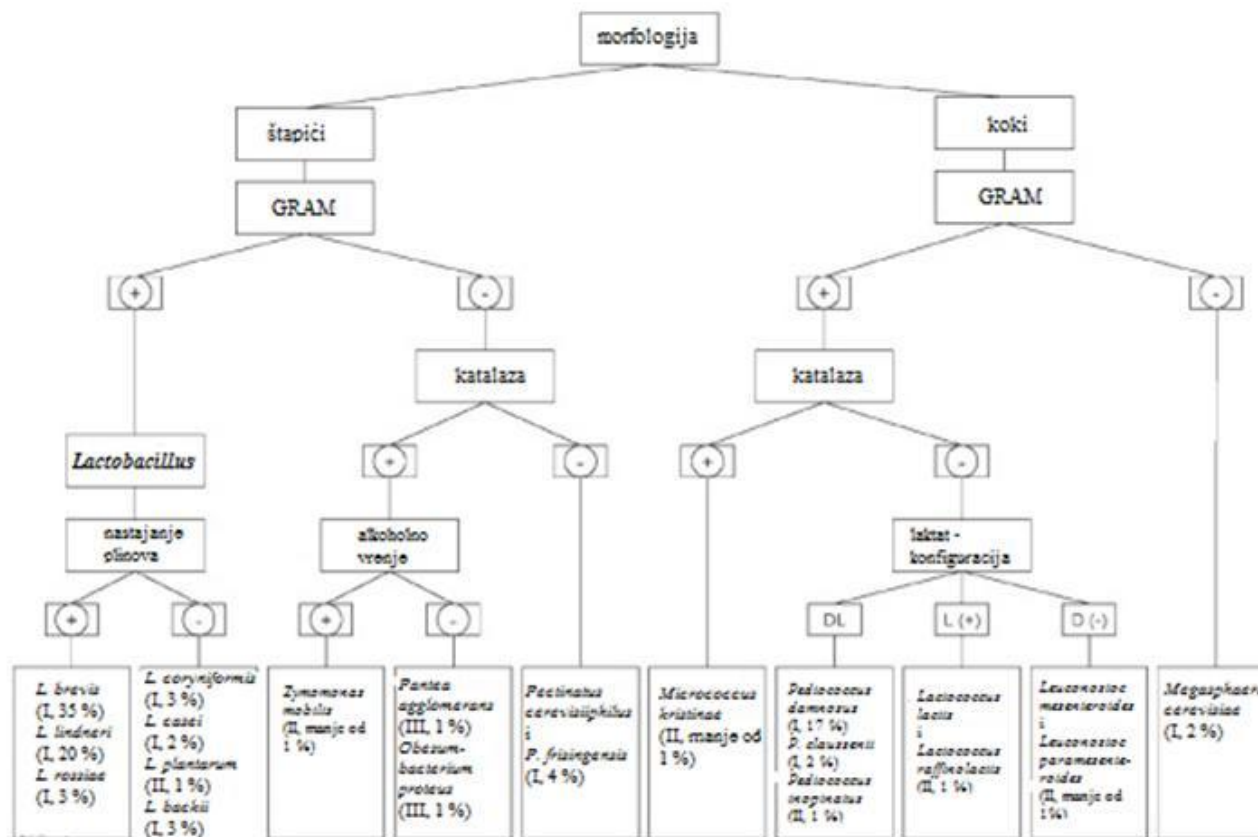
Tablica 4. Rodovi bakterija i divljih kvasaca pronađeni u pivovarama

Gram + bakterije	Gram - bakterije	Divlji kvasci
<i>Bacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Brettanomyces</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Acinebacter</i>	<i>Candida</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Endomyces</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Hansenula</i>
	<i>Gluconobacter</i>	<i>Kloeckera</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>Pichia</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>Rhodotorula</i>
	<i>Megasphaera</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Torulopsis</i>
	<i>Pectinatus</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
	<i>Proteus</i>	
	<i>Pseudomonas</i>	
	<i>Zymomonas</i>	

Divlji kvasci

- Podijeljeni u četiri skupine:
 - 1) Fermentativni kvasci – rodovi *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces* – imaju slične biokemijske osobine i mogu rasti zajedno s kultiviranim sojem kvasca *S. cerevisiae*.
 - 2) Kvasci ubojice (*killer* kvasci) – ekstremni oblici bioloških zagađivača jer u okoliš izlučuju različite zimocine (proteine) koji ubijaju osjetljivi radni soj kultiviranog kvasca, pa nakon nekog vremena postanu dominantni u mladom pivu.
 - 3) Različiti kultivirani kvasci – u proizvodnji piva se koristi jedan ili više specifičnih sojeva čiste kulture pivskog kvasca. Kod proizvodnje više vrsta piva postoji opasnost od pogreške nacjepljivanja krivog soja kvasca! Nužno je provjeravanje svakog soja pomoću brzih testova ili genskih proba, da bi se ustanovio njihov identitet.
 - 4) Aerobni kvasci – kvasci iz roda *Pichia*, posebice vrsta *P. membranaefaciens*, najčešći su nefermentativni kvasci koji zagađuju pivo. Iako se smatraju aerobnim mikroorganizmima, u sladovini mogu rasti u potpuno anaerobnim uvjetima.
 - proizvodnja *lambic* piva – rodovi *Brettanomyces* i *Dekkera*, proizvode octenu kiselinu i izazivaju zamucenje piva, važan su sastojak kvašćeve flore pri vrenju
 - pripadnici rodova *Debaromyces*, *Filobasidium* i *Pichia*, te *Candida* rastu u aerobnim uvjetima u pivu, izazivaju zamucenje, ponekad stvaraju pokožicu ili biofilm na površini, te pahuljice i talog.

Slika 11. Klasifikacija bakterija zagađivača u pivovarama



Cilj, kritične nadzorne točke i provedba mikrobiološkog nadzora

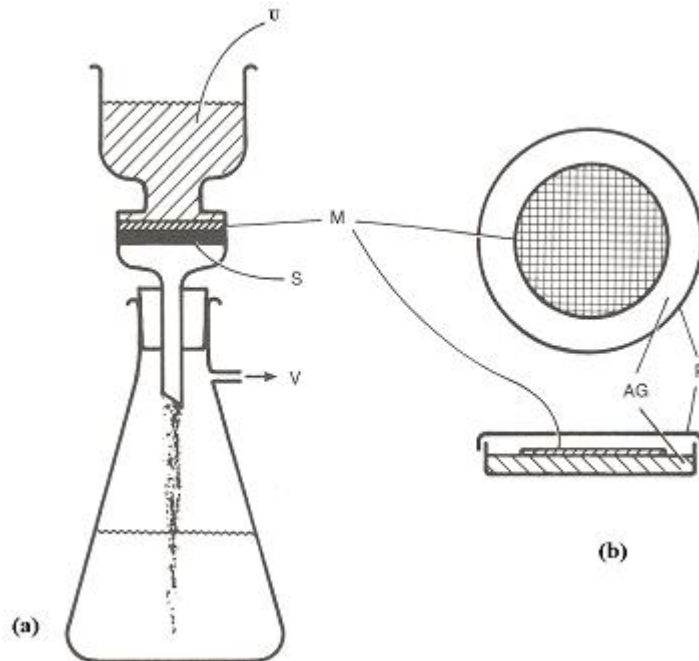
- Cilj – ustanoviti gdje i kako nepoželjni mikroorganizmi dopijevaju u sladinu i pivo. Prema tome, uspješna mikrobiološka kontrola svodi se na:
 - često uzimanje uzoraka
 - učestali nadzor mjesta koja se nepouzdanu peru i dezinficiraju, kao što su: mjerni uređaji i cjevovodi za njihovo povezivanje, pumpe, ventili s čepovima i poklopcima za blindiranje te ventili za uzorkovanje, gumena crijeva i ostali cjevovodi, perilica boca i inspektor boca, punilica boca sa čepilicom
 - stalni mikrobiološki nadzor čiste kulture kvasca (prije nacjepljivanja i nakon vrenja), vode za pranje i ispiranje te zraka za aeraciju sladinine.

U pivarskoj se praksi razlikuje 6 tipova uzoraka za mikrobiološku analizu, koji se obrađuju na različite načine kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati (Tablica 5)

Tablica 5. Tipovi uzoraka i njihova obrada (Kunze, 1996).

Tip uzorka	Naziv i svojstvo	Postupak obrade
I.	Bistri uzorci piva i vode za ispiranje	Membranska filtracija + inkubacija na hranjivom agaru ili hranjivom bujonu
II	Uzorci kvasca	Proba vrenja u amonijakalnoj sladovini ili nacjepljivanje na agar ili bujon
III	Mutni uzorci piva s kvascem	Metoda koncentriranja u hranjivoj podlozi za dokazivanje štetnih bakterija ili test stabilnosti
IV.	Uzorci sladovine	Membranska filtracija ili metoda koncentriranja u hranjivoj podlozi za dokazivanje štetnih bakterija
V	Uzorci zraka	Otklopljene petrijevke
VI.	Uzorci briseva	Obogaćivanje u tekućoj fazi ili membranska filtracija

Slika 12. Membranska filtracija



- a) boca sisaljka spojena s vakuumom (V), i nuča za filtraciju sa sinteriranim dnom (S) na koje se stavlja mikroporozna membrana (M) za određivanje broja mikroorganizama iz tekućeg uzorka (U) koji se filtrira. Nuča za filtraciju i boca sisaljka su međusobno pričvršćene odgovarajućom štipaljkom.
- b) nakon filtracije, mikroporozna membrana (M) postavlja se na površinu čvrste hranjive podloge (AG) u petrijevki i inkubira dok ne izrastu kolonije vidljive mikroskopom.

Metode brzog određivanja mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje piva

- koriste se nove i stare poboljšane metode za određivanje i identifikaciju m. o.
- sretna okolnost: mnogi patogeni za ljude ne preživljavaju u pivu: alkohol (4-5,5 %), pH vrijednost ispod fiziološke, antimikrobni sastojci hmelja, anaerobni uvjeti
- starije tehnike se temelje na praćenju mikrobnog rasta, modernije bez praćenja rasta
- kod metoda koje se temelje na praćenju rasta važno je inhibirati rast radnog m. o. da bi se odredili mogući zagađivači

Tablica 6. Tehnike brzog otkrivanja mikroorganizama

Metoda	Tehnike
Fizičke	Mjerenje vodljivosti Mikrokalorimetrija Turbidometrija Protočna citometrija Metoda s mikrokolonijama
Biokemijske	Izravna epifluorescencija filterske tehnike ATP bioluminiscencija Uzimanje proteinskih otisaka Imunoanaliza (ELISA)
Molekularne	Molekularne probe (DNK / RNK) Kariotipija (CHEF) Polimerazna lančana reakcija Slučajnim odabirom pojačana polimorfna DNK PCR

Slika 13. Cjelokupni postupak proizvodnje piva

