

Praćenje pokazatelja kvalitete različitih tipova piva gornjeg vrenja tijekom proizvodnje i skladištenja

Govedarica, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:305083>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019. godine

Darija Govedarica

949/BPI

**PRAĆENJE POKAZATELJA
KVALITETE RAZLIČITIH
TIPOVA PIVA GORNJEG VRENJA
TIJEKOM PROIZVODNJE I
SKLADIŠTENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Zmajskoj pivovari d.o.o., pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Antonije Trontel.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**PRAĆENJE POKAZATELJA KVALITETE RAZLIČITIH TIPOVA PIVA GORNJEG
VRENJA TIJEKOM PROIZVODNJE I SKLADIŠTENJA**

Darija Govedarica, 949/BPI

Sažetak: U ovom istraživanju proučavan je proces proizvodnje tri tipa ale piva u industrijskom mjerilu. Sladovina za sve tri vrste piva proizvedena je infuzijskim postupkom. Za proizvodnju ale piva (Pale ale i Pozoj - IPA) korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (tip SafAle™ US-05) odnosno *Saccharomyces cerevisiae* (tip SafAle™ S-04) za ale pivo Porter. Tijekom procesa glavnog i naknadnog vrenja praćena je promjena koncentracije sastojaka sladovine kao i nastajanje glavnih proizvoda (etanol i glicerol), a tijekom odležavanja praćena je promjena koncentracije sporednih (esteri, viši alkoholi, acetaldehid) proizvoda alkoholnog vrenja. Na osnovi rezultata može se zaključiti da pivo dobiveno u ovom istraživanju odgovara standardima kvalitete zahtijevane za sva tri tipa ale piva.

Ključne riječi: pivo gornjeg vrenja, promjena sastojaka piva, glavno i naknadno vrenje, skladištenje

Rad sadrži: 46 stranica, 16 slika, 4 tablice, 54 literaturnih referenci, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
3. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
4. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjena)

Datum obrane: 27. rujna 2019. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

MONITORING OF QUALITY INDICATORS FOR DIFFERENT TYPES OF TOP FERMENTED BEER DURING PRODUCTION AND STORAGE

Darija Govedarica, 949/BPI

Abstract: In this work industrial scale production of three types of ale beer was studied. For all three beer types, wort was prepared by infusion process. For ale (Pale ale and Pozoj - IPA) production yeast *Saccharomyces cerevisiae* (type SafAle™ US-05) was used and *Saccharomyces cerevisiae* (type SafAle™ S-04) for Porter ale production, respectively. During the process of fermentation and maturation, changes in concentration of wort constituents and main products (ethanol and glycerol) of fermentation were monitored. Additionally, byproducts (esters, higher alcohols and acetaldehyde) of alcoholic fermentation were also quantified. On the basis of this research it can be concluded that beer produced in this study satisfies quality standards required for all three different types of beer.

Keywords: top fermented beer, changes of beer constituents, fermentation and maturation, storage

Thesis contains: 46 pages, 16 figures, 4 tables, 54 references, 0 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: PhD Antonija Trontel, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
4. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

Paper defended: September 27th, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE PIVA	2
2.1.1 Proizvodnja pivske sladovine	2
2.1.2. Glavno i naknadno vrenje sladovine	4
2.1.3. Dozrijevanje i dorada mladog piva	5
2.2. PIVSKI KVASAC	6
2.2.1. Metabolizam ugljikohidrata	7
2.2.2. Svojstva ale kvasca	9
2.3. GLAVNI SASTOJCI PIVA.....	11
2.3.1. Voda	11
2.3.2. Alkoholi	11
2.3.3. Esteri	14
2.3.4. Diacetil, aldehidi i sumporni spojevi	14
2.3.5. Organske kiseline	16
2.4. METODE ANALIZE SASTOJAKA PIVA	16
2.4.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti	17
2.4.2. Plinska kromatografija.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI	20
3.1.1. Radni mikroorganizmi	20
3.1.2. Ječmeni slad	20
3.1.3. Hmelj	20
3.1.4. Voda	20
3.1.5. Kemikalije i reagensi korišteni u istraživanju	20
3.1.6. Aparatura i pribor	21
3.1.7. Informatički programi i obrada rezultata	21
3.2. METODE	23
3.2.1. Postupci u proizvodnji ale piva	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa Pale ale)	32
4.2. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (Pozoj - IPA)	34
4.3. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa Porter)	36

5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Pivska sladovina je poluproizvod dobiven toplinskom i enzimskom razgradnjom osnovnih sirovina odnosno ječmenog i/ili pšeničnog slada koji se može djelomično nadomjestiti s drugim žitaricama ili proizvodima od žitarica, šećerom i ostalim saharidima te šećernim i škrobnim sirupima, pod uvjetom da je jodna reakcija na škrob u pivu negativna, a koje sadrže ekstrakt za fermentaciju (Pravilnik o pivu, 2011).

Podjela piva prema vrsti kvasca je najraširenija i najpoznatija podjela, kojom piva dijelimo na piva gornjeg vrenja (ale) i piva donjeg vrenja (lager). Glavna tehnološka razlika ale i lager kvasaca je temperatura fermentacije koja posljedično dovodi do drugačijeg profila arome i okusa piva (Pavlečić i sur., 2012). Neki sojevi ale kvasaca na kraju glavnog vrenja isplivaju na površinu mladog piva dok se lager kvasci istalože na dno fermentora. Piva gornjeg vrenja (ale) dobivaju se toplim vrenjem, praznijeg su okusa u usporedbi s lager pivom te okusom podsjećaju više na vino nego na pivo (Marić, 2009).

Tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine kao i u procesu glavnog i naknadnog vrenja nastaju tvari koje su odgovorne za karakterističnu aromu i okus piva. Nusproizvodi koji nastaju tijekom alkoholnog vrenja su: viši alkoholi, diacetil, esteri, aldehidi i sumporni spojevi. Pri tome sastojci arome mladog piva (diacetil, aldehidi, sumporni spojevi) uzrokuju pojavu nečistog, neharmoničnog, nezrelog okusa mladog piva, a u povećanim koncentracijama negativno utječu na kvalitetu piva. Poželjni sastojci arome dozrelog piva (viši alkoholi i esteri) imaju odlučujući utjecaj na aromu gotovog piva. Njihova prisutnost u odgovarajućim koncentracijama je preduvjet za visoku kakvoću piva, a udio im se povećava tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva (Baxter i Hughes, 2001).

Cilj istraživanja u ovom radu bio je pratiti pokazatelje kvalitete tijekom glavne i naknadne fermentacije i skladištenja te aromatski profil tijekom odležavanja za tri vrste ale piva (piva gornjeg vrenja) dobivenih u ovom istraživanju. Tijekom istraživanja praćene su promjene pH i specifične gustoće te koncentracija hlapivih komponenti odnosno ostalih sastojaka piva (ugljikohidrata, etanola, acetaldehida, glicerola, viših alkohola i estera).

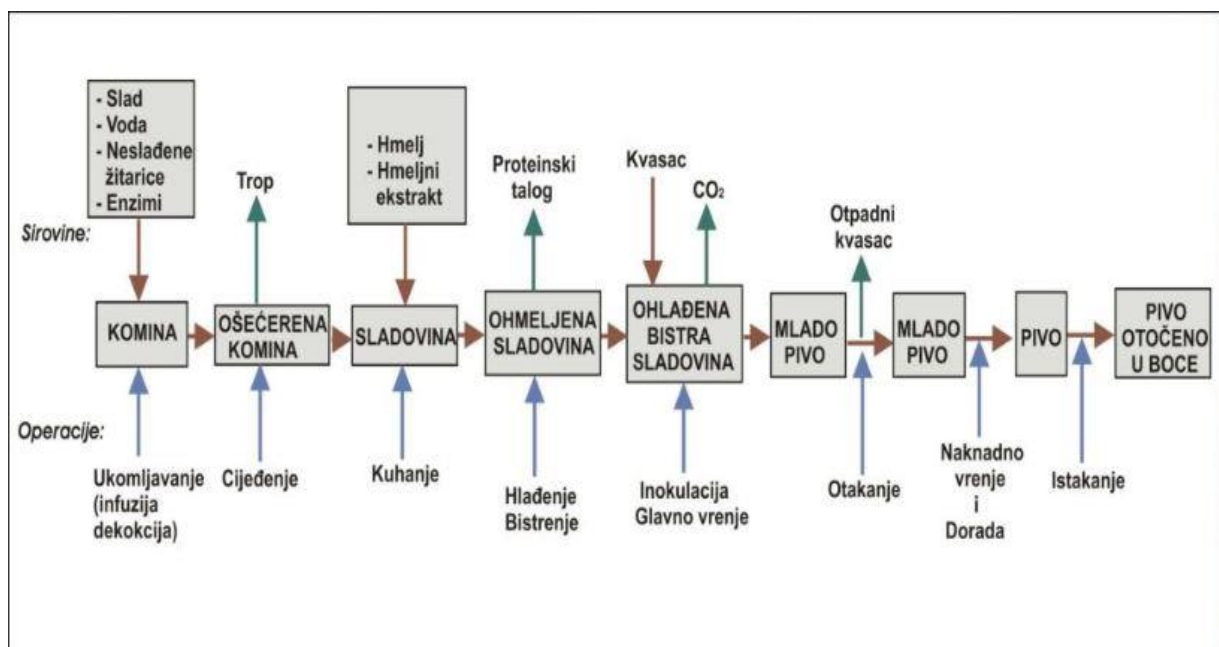
2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE PIVA

Proizvodnja piva je kompleksan tehnološki proces koji uključuje niz tehnoloških operacija (Slika 1) koje se mogu obuhvatiti u tri glavne faze:

1. proizvodnja pивske sladovine od pivskog slada, neslađenih sirovina, hmelja i vode različite tvrdoće primjenom različitih tehnoloških postupaka (Schuster i sur., 1998)
2. vrenje sladovine s čistim kulturama različitih sojeva kvasca gornjeg i donjeg vrenja te „divljih kvasaca“
3. različiti postupci dozrijevanja i dorade mladog piva.

Podjela piva na tipove i vrste definirana je pravilnicima (Pravilnik o pivu, 2011) o kvaliteti piva koji su proizašli iz pivarske prakse (Marić, 2009).



Slika 1. Blok shema procesa proizvodnje piva (Anonymus 1, 2019)

2.1.1 Proizvodnja pивske sladovine

Proizvodnja pивske sladovine se sastoji od tehnoloških postupaka drobljenja slada, ukomljavanja ili ekstrakcije sladne prekrupe, filtracije komine (cijedenje), kuhanja i hmeljenja sladovine te bistrenja, hlađenja i aeriranja sladovine.

Drobljenje slada predstavlja mehaničku pripremu slada za ekstrakciju. Glavni zadatak drobljenja slada je olakšavanje i ubrzavanje fizičkih i biokemijskih procesa rastvaranja sadržaja zrna da bi u toku ukomljavanja došlo do maksimalno mogućeg prijelaza ekstraktivnih tvari u sladovinu. Drobljenje slada se obavlja kako bi voda lakše prodrla do zrna slada i

izvršila ekstrakciju topljivih komponenti i enzimsku razgradnju makromolekularnih sastojaka (Parker,2012).

Ukomljavanje ili ekstrakcija sladne prekrupe predstavlja intenzivno miješanje prekrupe (dobiva se drobljenjem slada) i vode, gdje se vrši kontroliranje enzimske razgradnje razgradivih komponenti sirovina. Cilj ukomljavanja je prevođenje što više netopljivih sastojaka sladne prekrupe u topljiv oblik i njihovo ekstrahiranje s vodom čime se dobiva sladovina. Različite temperature ukomljavanja rezultiraju sladovinom veće ili manje fermentabilnosti (udjelom šećera koje će kvasci fermentirati u CO₂ i alkohol). Sukladno tome, niže temperature unutar raspona djelovanja enzima za konverziju škroba stvaraju više fermentabilnih šećera, dok više temperature stvaraju manje fermentabilnih, a više nefermentabilnih šećera.

Filtracija komine odnosno cijedenje komine je slijedeći tehnološki postupak u proizvodnji sladovine kojim se izdvaja trop (neotopljeni čvrsti sastojci komine) od otopljenih sastojaka komine koji čine pivsku sladovinu. Cijedenje se odvija kroz trop kao filtracijsko sredstvo u cijednjaku nakon čega se vrši ispiranje tropa naljevima vruće vode čiji volumen ovisi o koncentraciji prvijenca i očekivanoj koncentraciji sladovine nakon završetka ispiranja. Ispiranje sa većim volumenima vode uzrokuje bolje ispiranje i iskorištenje ekstrakta u varionici, ali i više vode za otparavanje tijekom tehnološke operacije kuhanja sladovine koji slijedi proces cijedenja (Zarknow, 2014).

Tijekom kuhanja sladovine odvijaju se slijedeći procesi i operacije: upravljanje viškom vode i regulacija sadržaja ekstrakta, inaktivacija enzima i mikroorganizama, koagulacija proteina, uklanjanje nepoželjnih sastojaka (isparavanje dimetil sulfida) i dodavanje hmelja. Hmeljenjem dolazi do ekstrakcije gorkih komponenti i njihove termičke izomerizacije koja daje karakterističnu gorčinu. Kuhanje se obavlja u kotlovima na atmosferskom ili povišenom tlaku. Kod kuhanja sladovine s hmeljom, tvari koje daje gorčinu i aromu prelaze u sladovinu, a proteini se izdvajaju u krupne pahuljice koje se postepeno talože i sladovina se bistri.

Kuhanje sladovine traje obično 1,5 – 2 sata. Predugo kuhanje uzrokuje pojačanje boje sladovine, a prekratko kuhanje djeluje nepovoljno jer ne može dovesti do izdvajanja visokomolekularnih proteina koje izazivaju slabo bistrenje sladovine i zamućenje piva. Kraj kuhanja se praktično određuje prema koncentraciji ekstrakta u sladovini, prema izdvajanju proteina u obliku pahuljica i prozirnosti vruće sladovine. Kuhanjem se također uništavaju i svi enzimi u sladovini čime se osigurava stabilnost kemijskog sastava sladovine prije vrenja. U sladovini i u pivu nalaze se tvari koje se vežu s kisikom i stvaraju netopljivi oblik taninsko-proteinskog kompleksa koji su uzročnici zamućenja piva uslijed dugotrajnog skladištenja.

Prije prebacivanja sladovine u taložnjak (virpul) kontrolira se: bistrina (kristalno bistra sladovina s grubim pahuljastim talogom od proteinskog "loma"), ošećerenost (jodna proba), volumen vruće sladovine pomoću mjerne letve ili protočnog brojila te udio ekstrakta pomoću areometra. Nakon toga slijedi obrada sladovine. Prvo se vrši izdvajanje toplog taloga, koji se sastoji od čestica veličine 30 do 80 μm , u virpulu. Topli (grubi) talog je potrebno izdvojiti jer bi takve čestice ometale bistrenje sladovine tako što bi se lijepile za kvaščeve stanice, povećavale udio taloga u pivu i sukladno tome otežavale filtraciju piva. Nakon toga slijedi snižavanje temperature na početnu temperaturu vrenja pomoću pločastog hladnjaka te zasićivanje sladovine kisikom iz zraka u cilju postizanja vrenja. Osim toga treba se izdvojiti fini ili hladni talog kako bi se dobila bistra sladovina. U sladovini koja dolazi na hlađenje nalaze se proteini i tanini koje čine fini talog koji se teško taloži, ali ima sposobnost vezanja na stanice kvasca ili mjehuriće zraka. Hladni talog se uspješno uklanja flotacijom (pomoću Venturijeve cijevi kojom se ubrizgava zrak u obliku sitnih mjehurića te se na taj način vrši i aeracija sladovine) i filtracijom što je neprimjenjivo za topli talog (Marić, 2009).

2.1.2 Glavno i naknadno vrenje sladovine

Proces vrenja pivske sladovine se odvija na relativno niskim temperaturama pomoću pivskog kvasca. Ohlađena sladovina se cjevovodom transportira u posebne uređaje za vrenje (cilindrično-konusne fermentore) gdje se dodaje kvasac. Proces vrenja odvija se u određenim temperaturnim uvjetima ovisno o vrsti piva koja se proizvodi. Piva se dijele na piva gornjeg (ale) i piva donjeg vrenja (lager) kao što je i prethodno navedeno. Lager piva se dobivaju vrenjem pivske sladovine pomoću različitih sojeva čiste kulture kvasca vrste *Saccharomyces pastorianus*. Vrenje započinje pri temperaturi od 6 - 8 °C, a završava na 9 - 18 °C te se zbog toga naziva hladnim vrenjem. Kad se mlado pivo krene hladiti, kvasac se istaloži na dno spremnika. Nakon izdvajanja istaloženog kvasca mlado pivo odležava u ležnim spremnicima pri 0 - 1 °C nekoliko tjedana. Vrste lager piva se razlikuju prema tvrdoći vode, razgrađenosti i boji slada za pripremu sladovine. Primjerice, plzensko lager pivo se proizvodi od vrlo mekane vode i vrlo svjetlog slada, a dortmundsko od tamnog slada i tvrde vode. Upravo iz tog razloga se vrste lager piva razlikuju po nijansi boje, punoći okusa i aromi (Marić, 2009).

Drugi tip piva je ale pivo. Pri proizvodnji ovog tipa piva vrenje započinje na temperaturi sladovine od 10 °C, a završava na 25 °C kada kvasac ispliva na površinu mladog piva. Za alkoholno vrenje ove vrste piva rabi se čista kultura pivskog kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Ovakav tip vrenja se još naziva toplo vrenje, a proizvod pivom gornjeg vrenja. Nakon izdvajanja kvasca, mlado pivo odležava i dozrijeva pri 20 °C tijekom kraćeg vremenskog perioda nego lager piva.

Postoje različite vrste ale piva, a ovise o kakvoći vode, slada, boji slada, gorčini, koncentraciji alkohola i izvornosti tehnološkog procesa (Parker, 2012).

Proizvode se još i spontano prevrela piva koja se dobivaju uz pomoć sojeva divljih odnosno neselekcioniranih kvasaca. Proizvođači takve vrste piva se nalaze u Belgiji (dolina Zenne) i proizvode čuvena Lambic piva. Lambic piva su bitno drugačija od lager i ale piva jer imaju više neprevrelog ekstrakta i hlapljivih sastojaka (estera), poseban bouquet (voćni, vinski, fenolni), pakirana su u male bočice začepljene šampanjskim čepom te umotane u crveni papir ili aluminijsku foliju (Marić i sur., 1995).

U procesu glavnog i naknadnog vrenja kvasac prevodi šećere u alkohol, ugljikov dioksid i ostale komponente koje pridonose okusu i aromi piva. Na početku vrenja pivski kvasac previre heksoze prvenstveno glukozu pa ostale monosaharide (ili disaharide saharozu/invertazu i to samo ako je prisutna u sladovini). Tijekom glavnog vrenja dolazi do previranja maltoze pa maltotrioze tijekom naknadnog vrenja. Tijekom vrenja oslobađa se velika količina topline koja je rezultat aktivnosti kvasca, pa se radi toga provodi hlađenje pred kraj procesa na temperaturu od 4 - 5 °C. Također, tijekom vrenja kvasac se razmnožava te se njegova količina poveća 2 - 4 puta u odnosu na početnu količinu. Pivo nakon vrenja još nije zrelo, još je mutno, sadrži malu količinu CO₂, te ima poseban okus i aromu mladog piva (White i Zainasheff, 2010).

2.1.3. Dozrijevanje i dorada mladog piva

Nakon glavnog i naknadnog vrenja, pivo mora odležavati u tankovima (ležnim ili cilindrično-konusnim fermentorima). Proces odležavanja piva se provodi pri temperaturi od 1 do 3 °C pod tlakom CO₂ od 0,3 do 0,7 bar. Za vrijeme odležavanja dolazi do laganog previranja preostale količine šećera te nastajanja CO₂. Trajanje procesa odležavanja ovisi o vrsti piva. Vrste piva sa većim udjelom alkohola zahtijevaju duži period odležavanja (Veselov, 1966.). Dozrijevanje piva je vrlo važan korak prilikom proizvodnje jer se time poboljšava razina kvalitete piva. Pokazatelji kvalitete odležanog piva moraju ulaziti u granice prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Pokazatelji kvalitete odležanog piva (Marić, 2009)

Pokazatelj	Vrijednost
Temperatura	-1 do -2 °C
Udio CO ₂	min. 0,5 % (ili dodatna karbonizacija)
pH	4,2 do 4,4 (iznimno 4,6)
Broj kvašćevih stanica	2x10 ⁶ do 5x10 ⁶
Udio diacetila	0 do 0,10 mgL ⁻¹
Udio kisika	0 mgL ⁻¹
Koloidna stabilnost	stabilno (ili stabilizacija tijekom filtracije)
Mikrobiološka čistoća	bez prisutstva stranih mikroorganizama

2.2. PIVSKI KVASAC

Pivski kvasac je radni mikroorganizam na kojem se temelji proizvodnja piva. Karakteriziran je kao jednostanični eukariot te kemorganotrofni, fakultativno aerobni mikroorganizam. Oksidativnom razgradnjom supstrata pridobiva energiju te određene izvore ugljika može koristiti u aerobnim i anaerobnim uvjetima, a ostale samo u aerobnim uvjetima (Maaheimo i sur., 2001). Prvenstveno kao izvor ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima koristi glukozu. No, u tim uvjetima može razgrađivati i fruktozu, manozu, galaktozu, maltozu i α -metil glukozide jer posjeduje transportne sustave za navedene ugljikohidrate, ali i saharozu, maltotriozu, trehalozu, melibiozu i rafinozu za koje je potrebna prethodna razgradnja do monosaharida da bi ih stanica pivskog kvasca mogla transportirati i pridobiti energiju (Käppeli, 1986). Također, ale kvasci, za razliku od lager kvasaca, ne mogu previrati melibiozu jer nemaju enzim melibiazu te iskorištavaju samo trećinu rafinoze iz sladovine (Naumov i sur., 1996). Najčešće se u proizvodnji piva rabe sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* i *Saccharomyces carlsbergensis*. Za navedene vrste kvasca karakteristične su dvije pojave: Pasteur-ov i Crabtree-ev efekt. Oba efekta su posljedica globalnog mehanizma regulacije metabolizma ugljikohidrata i proizlaze iz činjenice da korišteni pivski kvasci mogu rasti aerobno i anaerobno (Rodrigues i sur., 2006).

Kvasac potreban za alkoholno vrenje sladovine dobiva se razmnožavanjem čiste kulture (jedne jedine stanice). Takav kvasac mora biti sposoban da brzo i visoko specifično previre sladovinu do etanola uz poželjnu koncentraciju nusproizvoda vrenja (kiseline, aldehidi, viši alkoholi, itd.). Također, brzina redukcije diacetila, sposobnost flokulacije stanica odnosno izdvajanje stanica iz mladog/zrelog piva mora biti visoka uz osiguravanje uvijek iste arome i okusa piva ukoliko su ostvareni isti uvjeti vrenja, sastav sladovine te uvjeti odležavanja.

Kvasac se prije nacjepljivanja u sladovinu propagira do potrebnog broja stanica kvasca koje su važne za provođenje i održavanje tijekom brze alkoholne fermentacije iz laboratorijski čiste kulture ili se uzima matični kvasac reciklacijom iz cilindrično-konusnih fermentora u kojima se nalazi mlado pivo prije odležavanja. Matični kvasac izuzet na takav način mora biti mikrobiološki čist (što se osigurava mikrobiološkom kontrolom kvasca u laboratoriju i dezinfekcijom opreme), genetski uniforman (ima zanemariv broj mutiranih stanica) i fiziološki aktivan (broja aktivnih stanica kvasca mora biti veća od 95 %). Takav kvasac se može čuvati do 7 dana pri 2 - 5 °C pod pivom, sladovinom ili vodom, a aktivacija matičnog kvasca prije svake reciklacije uključuje dobru aeraciju (Marić, 2009).

2.2.1. Metabolizam ugljikohidrata

U stanici kvasca, pri aerobnim uvjetima, odvija se potpuna oksidacija ugljikohidrata i nastaju voda, CO₂, značajna količina biomase te se oslobađa toplina. U anaerobnim uvjetima kvasac konvertira ugljikohidrate uglavnom do etanola i CO₂ prilikom čega nastaje relativno mala količina biomase. Taj fenomen naziva se Pasteur-ov efekt. To je pojava metaboličke regulacije koja je zapravo inhibicija alkoholnog vrenja u prisustvu kisika čime kvasac optimizira brzinu razgradnje glukoze kako bi stanice imale dovoljno energije i međuspojeva za biosintezu. U aerobnim uvjetima stanica kvasca proizvodi više ATP-a po molekuli glukoze što znači da može sintetizirati stanični materijal uz manji utrošak glukoze. Tijekom vrenja u proizvodnji piva dolazi do pojave da kvasac prelazi s oksidacijskog na fermentacijski metabolizam nakon što potroši sav dostupan kisik iz hmeljene sladovine što posljedično dovodi do niza promjena na razini enzimske aktivnosti u stanici kvasca. Promjene koje se odvijaju su smanjenje aktivnosti enzima Krebsovog ciklusa i pentoza fosfatnog ciklusa što proizlazi iz toga da u aerobnim uvjetima se 30 - 35 % supstrata razgradi ovim putem dok u anaerobnim uvjetima samo 5 - 10 % supstrata ide u ciklus pentoza-fosfata (Passonneau i Lowry, 1962). Također u aerobnim uvjetima, kvasac koji se uzgaja na podlozi s relativno visokom koncentracijom ugljikohidrata (između 2 - 5 gL⁻¹) proizvodi etanol. Ovakva pojava se naziva Crabtree-ev efekt i očituje se na velikom broju enzimskih reakcija. U prvom redu se očituje na aktivnost enzima Krebsovog ciklusa i respiratornog lanca. Pretpostavka je da dolazi do kataboličke inhibicije određenih prethodno sintetiziranih enzima i kataboličke represije sinteze novih enzima (Phaweni i sur., 1992).

Razgradnja ugljikohidrata, u stanici kvasca, odvija se glikolizom, pentoza-monofosfatnim putem i Krebsovim ciklusom (Maaheimo i sur., 2001). Da bi kvasac mogao koristiti određeni izvor ugljikohidrata potreban mu je funkcionalni sustav za transport supstrata u stanicu i odgovarajući enzimi za konverziju tog ugljikohidrata u glukoza-6-fosfat ili u neki drugi međuprodukt glikolize.

Kvasci roda *Saccharomyces* posjeduju dva osnovna tipa transporta otopljenih tvari kroz citoplazmatsku membranu. Pasivna difuzija je prvi mehanizam transporta tvari, a drugi je pomoću transmembranskih prijenosnika. Transport otopljenih tvari kod drugog navedenog mehanizma transporta može se odvijati niz gradijent koncentracije (olakšana difuzija) i uz gradijent koncentracije. Takav način transporta se naziva aktivni transport jer mu je za odvijanje potrebna metabolička energija koju kvasac dobiva hidrolizom ATP-a ili elektrokemijskim gradijentom (simport i antiport mehanizmi). Enzim odgovoran za taj tip aktivnog transporta nalazi se u citoplazmatskoj membrani i naziva se specifična ATP-aza. Djeluje kao protonska pumpa odnosno uz utrošak ATP-a izbacuje vodikove ione iz stanice u okolinu i na taj način stvara gradijent protona i membranski potencijal na staničnoj membrani koji omogućavaju ulazak tvari u stanicu proton-simport mehanizmom.

Transportni sustavi ugljikohidrata kod roda *Saccharomyces* su: konstitutivni sustav za transport heksoza te inducibilni sustavi za transport maltoze, galaktoze i α -metil glukozyda. Neki se disaharidi razgrađuju na monosaharide unutar stanice kvasca (maltoza koja se cijepa na dvije glukoze), a neki izvan stanice (saharoza koja se cijepa na glukozu i fruktozu u periplazmatskom prostoru).

Transport heksoza (glukoze, fruktoze i manoze) odvija se olakšanom difuzijom uz pomoć istog transmembranskog prijenosnika. Postoje dva transportna sustava koji su dominantni u različitim uvjetima tj. pri različitim koncentracijama glukoze u okolini stanice. Sustav I je dominantan pri višim koncentracijama glukoze, niskog je afiniteta prema supstratu i neovisan o kinazama, dok sustav II dominira pri niskim koncentracijama glukoze i kod rasta na galaktozi te je visokog afiniteta za supstrat i ovisan o kinazama. Sustav II je također podložan kataboličkoj represiji glukozom i kataboličkoj inaktivaciji. Dokazana je biološka interakcija između transportnog sustava II i fosforilacijske aktivnosti pri čemu gubitak te aktivnosti dovodi do inaktivnosti transportnog sustava II. Nakon transporta glukoze, manoze i fruktoze u stanicu slijedi fosforilacija kinazama (heksokinaza A, heksokinaza B i glukokinaza) pri čemu nastaju međuprodukti glikolize (glukoza-6-fosfat i fruktoza-6-fosfat) te nastaje manozna-6-fosfat koja izomerizira u fruktozu-6-fosfat i na taj način ulazi u glikolizu. Sva tri šećera inhibiraju transport jedan drugoga pri čemu su im konstante inhibicije gotovo jednake što pokazuje da se radi o jednostavnoj kompetitivnoj inhibiciji. Ukoliko se istovremeno u hranjivoj podlozi nalaze samo glukoza i fruktoza, potrošnja oba šećera se odvija simultano, ali se glukoza ipak troši brže (Novak i Marić, 1995).

Transport maltoze započinje ulaskom u stanicu pomoću specifičnog transmembranskog proteina maltoza-permeaze. Maltoza se zatim cijepa pomoću enzima maltaze na dvije molekule glukoze koje se prvo fosforiliraju pa tek tada ulaze u glikolizu (Fraenkel, 1982).

Dva karakteristična transportna sustava kojim se odvija transport maltoze su: konstitutivno ekspresivan sustav niskog afiniteta i inducibilno ekspresivan sustav visokog afiniteta (Crumplen i sur., 1996). Metabolizam maltoze je pod kontrolom tri regulacijska mehanizma: indukcije, kataboličke represije i kataboličke inaktivacije.

Do indukcije sinteze proteina za metabolizam maltoze dolazi kada je maltoza prisutna u okolini stanice. Maltoza inducira transkripciju gena *MAL63* koji kodira za protein Mal63. To je pozitivan regulatorni protein i djeluje kao aktivator transkripcije gena koji kodiraju za maltoza-permeazu i maltazu (Wang i sur., 2002). Biosintezom potrebnih spojeva omogućen je ulazak maltoze u stanicu, njeno cijepanje, fosforilacija i ulazak u glikolizu. Ukoliko se u okolini stanice uz maltozu nalazi i glukoza dolazi do kataboličke inaktivacije. Prisutna glukoza reprimira sintezu maltaze i transportnog sustava za maltozu te trenutno inaktivira maltoza-permeazu. Katabolička represija glukozom se očituje na način da dolazi do nastajanja Mig1 kompleksa koji je represor transkripcije svih *MAL* gena, a pogotovo *MAL63* čime se onemogućava aktivacija transportnog sustava za maltozu (Hu i sur., 2000).

Transport i metabolizam maltotrioze odvija se transportnim sustavom za maltozu pri čemu je potrošnja maltotrioze sporija pa često tijekom vrenja piva jedan dio maltotrioze ostane neprevreo. Pretpostavlja se da je glavni razlog sporijoj potrošnji maltotrioze niži afinitet transportnih proteina za maltotriozu te od sedam transportnih proteina za maltozu (manje specifične α -glukozid permeaze) samo tri proteina (za koje kodiraju geni: *AGT1*, *MPH2* i *MPH3*) mogu transportirati maltotriozu u stanicu (Day i sur., 2002). Ulaskom maltotrioze u stanicu dolazi do cijepanja maltotrioze na tri jedinice glukoze što katalizira intercelularna α -glukozidaza (maltaza) koja također katalizira i cijepanje maltoze na dvije glukozne jedinice te cijepanje još nekih glukozida. Nastale glukozne jedinice zatim ulaze u glikolizu (Chang i sur., 1989).

2.2.2. Svojstva ale kvasca

Dvije glavne vrste kvasaca gornjeg vrenja odnosno ale kvasaca koji se danas koriste u proizvodnji piva su sojevi vrste *Saccharomyces cerevisiae* i kvasci roda *Brettanomyces*. Treba napomenuti da su kvasci iz roda *Brettanomyces* puno manje zastupljeni od tipičnih pivskih kvasaca *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* i *S. carlsbergensis*. Oni su dugo vremena bili sastavni dio skoro svakog piva, sve dok se u pivovare nisu uveli visoki standardi čistoće.

Kroz povijest su sustavnom selekcijom kvasca nastali pivski sojevi kvasca koji su za razliku od laboratorijskih sojeva s puno većim genomom i brojem mutacija pa tako *Saccharomyces cerevisiae* može postojati kao haploid i kao diploid. No, puno su češći diploidni sojevi koji su elipsoidnog oblika i promjera 5 - 6 μm za razliku od haploida koji su sferični i promjera 4 μm .

Bolje poznavanje načina razmnožavanja kvasca dovelo je u pitanje mogućnost genetskog usavršavanja i samo porijeklo pivskih sojeva *Saccharomyces cerevisiae*. Upravo se porijeklom pivskih, vinskih, pekarskih, alkoholnih, sake i divljih sojeva bavilo višegodišnje istraživanje objavljeno u rujnu 2016. godine (Gallone i sur., 2016). U tom istraživanju je sekvencioniran genom 157 različitih sojeva industrijski korištenih sojeva kvasca *S. cerevisiae* te su im određena fenotipska svojstva. Istraživanje je pokazalo da svi istraživani sojevi potječu od samo par pripitomljenih predaka. Izraz domestikacija (pripitomljavanje) je definiran kao selekcija i uzgoj divljih vrsta kako bi se dobile kultivirane vrste koje uspijevaju u kontroliranim uvjetima te je u prirodi njihov rast usporeniji. Tipični znakovi domestikacije su: propadanje genoma, poliploidija, preslagivanje kromosoma, duplikacija gena i fenotip koji je rezultat selekcije, a vidljivi su kod kultiviranih biljaka, stoke i kućnih ljubimaca (Driscoll i sur., 2009). Podaci istraživanja otkrivaju da se industrijski sojevi genotipski i fenotipski razlikuju od divljih sojeva te su podijeljeni u pet grupa: grupa pivskih ale kvasaca 1, miješana grupa, grupa pivskih ale kvasaca 2, vinski kvasci te divlji sojevi kvasca. U grupi 1 uočena je genetska i fenotipska sličnost na temelju geografskog podrijetla pa se ta grupa dijeli na 3 podgrupe: Ujedinjeno Kraljevstvo, Njemačka/Belgija i SAD koja je vrlo slična britanskoj što dokazuje da su britanski kolonizatori donijeli europski pivski kvasac u Sjevernu Ameriku i njime započeli tamošnju proizvodnju piva. Ova grupa kvasaca pokazuje najizraženije znakove domestikacije (propadanje genoma, aneuploidija, nedostatak seksualnog životnog ciklusa) od svih proučavanih grupa, a pretpostavlja se da su se razvile iz zajedničkog pretka između 1573. i 1604. godine što se poklapa s početkom industrijske proizvodnje piva u Europi. Grupa pivskih ale kvasaca 2 je genetski i fenotipski puno sličnija vinskim sojevima *S. cerevisiae* i ne pokazuje sličnosti na temelju geografskog podrijetla, a razvila se iz zajedničkog pretka između 1645. i 1671. godine (Gallone i sur., 2016). Još jedan od dokaza selekcije i pripitomljavanja pivskog kvasca su sposobnost kvasca da previre maltotriozu i mutacije gena *PADI* i *FDC1* koji sudjeluju u proizvodnji 4-vinil-guaikola (4-VG), faktora većinom nepoželjnog fenolnog okusa u pivu karakterističnog za neke sojeve pivskih kvasaca i divlje sojeve (White i sur., 2015). Istraživanje je pokazalo da se prije dosta vremena došlo do mutacije i nastanka mutanata što pokazuje na nepoželjnost fenolnog okusa i selekcije kvasaca kroz vrijeme koji nisu proizvodili pivo s aromom fenola.

Prvi klasificirani kvasac roda *Brettanomyces* je bio *Brettanomyces claussenii*, klasificiran 1904. u pivovari Carlsberg kao uzročnik kvarenja britanskih piva. Do današnjeg dana se saznalo da je rod *Brettanomyces* gotovo identičan rodu *Dekkera* gdje je jedina razlika što *Brettanomyces* ne sporulira. Iako je većina vrsti ovog roda nepoželjan kontaminant piva zbog svog jakog utjecaja na aromu i okus piva, postoje pivski stilovi u kojima je *Brettanomyces* neizostavan.

Najčešće vrste *Brettanomyces* kvasca koje se koriste u proizvodnji kiselih stilova piva su: *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis* i *Brettanomyces claussenii*. Te vrste su glavni radni mikroorganizmi koji se rabe za proizvodnju Gueze, Lambic, Oud Ruin i Flanders red ale piva (Tonsmeire, 2014). Ovi kvasci se jako rijetko koriste za glavno vrenje. Najčešće se koriste u kombinaciji sa *S. cerevisiae* koji odradi primarno vrenje, a *Brettanomyces* se zatim naciepljuje u fermentirano pivo i započinje sekundarnu fermentaciju i to najčešće u drvenim bačvama. *Brettanomyces* kvasci na podlozi bogatoj glukozom proizvode acetat što nepovoljno utječe na pivo ukoliko nastane previše octene kiseline. Uz acetat, ovi kvasci značajno utječu na specifičnu kompleksnu aromu gdje se pojavljuju arome i okusi kao što su: gorka trešnja, borovnice, zemlja, mokro sijeno, povrće, cvijeće, agrumi i pikantnost (Gilliland i sur., 1961).

2.3. GLAVNI SASTOJCI PIVA

2.3.1. Voda

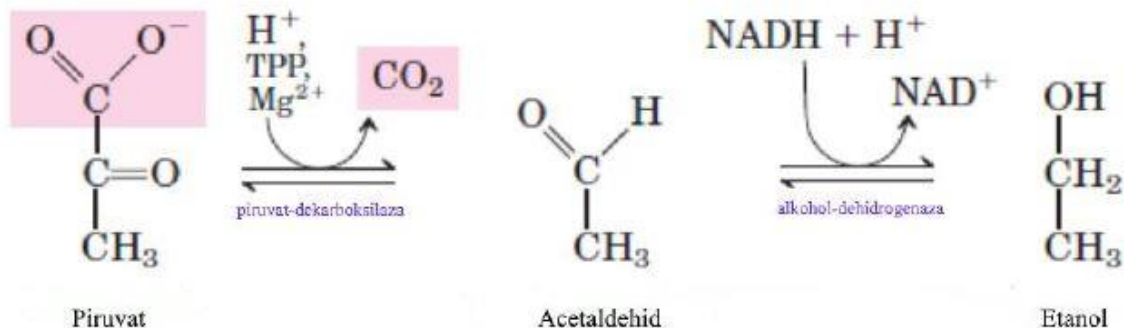
Voda je glavni dio svih napitaka i ujedno jedna od osnovnih sirovina za proizvodnju piva jer je najviše po količini zastupljena u finalnom proizvodu. Sastav vode koja se upotrebljava za proizvodnju sladovine utječe na kvalitetu piva. U prirodnoj vodi uvijek postoji manja ili veća količina soli. Soli iz vode predstavljaju tek neznatan dio ekstrakta piva ($0,3 - 0,5 \text{ gL}^{-1}$), ali izrazito utječu na okus piva. Mineralne tvari u vodi ne utječu toliko neposredno na okus piva, koliko posredno, svojim utjecajem na enzimske i koloidno-kemijske reakcije, do kojih dolazi u toku procesa proizvodnje piva. Kvaliteta pivarske vode je jedan od najvažnijih faktora dobre kvalitete piva. Voda mora biti mikrobiološki ispravna, mora ispunjavati određena mineralna svojstva te biti bistra, bezbojna i bez mirisa.

2.3.2. Alkoholi

Etanol, glicerol i viši alkoholi nastaju tijekom proizvodnje piva u različitim koncentracijama.

Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), poznat kao i etilni alkohol, je primarni alkohol s dva C atoma. Pri sobnoj temperaturi etanol je lako hlapiva, zapaljiva i bezbojna tekućina ugodnog mirisa. Miješa se s vodom u svim omjerima i stvara azeotropne smjese. Etanol koji se nalazi u alkoholnim pićima nastaje procesom alkoholnog vrenja. Kvasac u anaerobnim uvjetima konvertira piruvat nastao glikolizom u etanol. Biokemijska reakcija sastoji se od dva koraka (Slika 2). Prvi korak je dekarboksilacija piruvata pri čemu nastaje acetaldehid i CO_2 , a reakciju katalizira piruvat-dekarboksilaza. Drugi korak je redukcija acetaldehida u etanol prilikom čega dolazi do regeneracije koenzima (NADH se oksidira u NAD^+), a reakciju katalizira enzim alkohol-

dehidrogenaza. Etanol se ne mora nužno dobivati samo alkoholnim vrenjem već se može dobivati i kemijskim putem i to adicijom vode na eten pri visokom tlaku i temperaturi. No, takvi kemijski procesi su skupi pa je stoga biotehnološki način proizvodnje najčešći. Za potrebe dobivanja medicinskog ili apsolutnog etanola, prevrela podloga se nakon alkoholne fermentacije odvodi na destilaciju i dodatno pročišćavanje (rektifikaciju).



Slika 2. Biokemijska reakcija nastajanja etanola (Anonymus 2, 2019)

Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) je alkohol triol s tri hidroksilne skupine. Pri sobnoj temperaturi je viskozna, bezbojna tekućina slatkastog okusa bez mirisa. Glicerol može nastati biokemijskim putem iz dihidroksiaceton-fosfata (DHAP) koji je intermedijer glikolize. U uvjetima nižeg aktiviteta vode (a_w) okoliša od a_w citoplazme, stanice kvasca preusmjeravaju glikolitički fluks iz smjera nastajanja piruvata u nastajanje glicerola. Biokemijska reakcija se odvija u dva koraka od koji je prvi redukcija dihidroksiaceton-fosfata u glicerol-3-fosfat (GAP) prilikom čega dolazi do regeneracije koenzima (oksidacija NADH u NAD^+), a katalizira je enzim glicerol-3-fosfat dehidrogenaza. U drugom koraku se nastali glicerol-3-fosfat defosforilira u glicerol uz otpuštanje fosfata, a reakciju katalizira enzim glicerol kinaza (Norbeck i sur., 1996). Drugi metabolički put kojim nastaje glicerol je razgradnjom triglicerida prilikom čega nastaje glicerol i tri masne kiseline, a reakciju katalizira enzim lipaza. Tako nastali glicerol se prevodi do dihidroksiaceton-fosfata (DHAP) te ulazi u glikolizu.

U skupinu viših alkohola spadaju 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol i 2-feniletanol. Geraniol je također viši alkohol koji daje pivu aromu po ruži, ali ne nastaje metabolizmom pivskog kvasca već ulazi u pivo kao jedna od sastavnica hmeljnih ulja (Palmer, 2006b). Nastajanje viših alkohola vezano je uz metabolizam aminokiselina odnosno Ehrlichov put. Ovim putem kvasac za vrijeme glavnog vrenja asimilira aminokiseline: treonin, valin, leucin, izoleucin, metionin i fenilalanin. Nakon toga reakcijom transaminacije ih prevodi u odgovarajuće α -ketokiseline koje se ne mogu preusmjeriti u neki od puteva razgradnje ugljikohidrata (Jones i Pierce, 1964). Treonin je prekursor za 1-propanol, valin za 2-metil-1-propanol, leucin za 3-metil-1-butanol, izoleucin za 2-metil-1-butanol, a fenilalanin za 2-

feniletanol (Hazellwod i sur., 2008). Za razliku od navedenih spojeva 2-butanol proizvode određene bakterije mliječne kiseline te je pokazatelj kontaminacije piva.

Ehrlichovim putem se α -ketokiselina dekarboksilira u odgovarajući aldehid uz oslobađanje molekule CO₂, a reakciju katalizira odgovarajuća tiamin difosfat (TPP) ovisna α -ketokiselinska dekarboksilaza. Postoji pet dekarboksilaza koje kodiraju geni: *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10*, i *THI3* (Dickinson i sur., 1997). U reakcijama katabolizma leucina sudjeluju dekarboksilaze za koje kodira *THI3*, a u reakcijama katabolizma valina dekarboksilaciju provode tri izoenzima: Pdc1p, Pdc5p i Pdc6p koji kataliziraju dekarboksilaciju α -ketoizovalerata (Dickinson i sur., 1998). U reakcijama sinteze 3-metil-1-butanola iz izoleucina dekarboksilaciju katalizira svih pet dekarboksilaza dok u kataboličkim reakcijama fenilalanina dekarboksilaciju 2-fenilacetaldehida kataliziraju sve dekarboksilaze osim Thi3p (Dickinson i sur., 2003). Dobiveni aldehidi se zatim reduciraju u odgovarajuće više alkohole reakcijom koju kataliziraju izoenzimi alkohol dehidrogenaze. Reakcije oksidacije aldehida u organske kiseline su jako rijetke u procesu vrenja odnosno proizvodnje piva (Dickinson i sur., 2000). Najveći utjecaj na omjer nastalih viših alkohola i kiselina imaju uvjeti kultivacije. U uvjetima aerobnog rasta s limitirajućom koncentracijom glukoze pri čemu su aminokiseline glavni izvor dušika primarno će konverzijom aminokiselina nastajati više viših alkohola nego kiselina. Na ovaj način prinos biomase je samo 40 % što ukazuje na povezanost visoke potrošnje stanične energije i sinteze kiselina (Boer i sur., 2007).

U procesu proizvodnje piva gotovo 90 % aminokiselina se tijekom vrenja konvertira u više alkohole dok u potpuno anaerobnim uvjetima kvasac *Saccharomyces cerevisiae* gotovo sve aminokiseline konvertira u više alkohole (Vuralhan i sur., 2005). Upravo u anaerobnim uvjetima uzgoja, reakcije redukcije u kojima nastaju viši alkoholi ima bitan utjecaj na cjeloviti stanični redoks potencijal. Anaerobnom fermentacijom, dio NADH se oksidira u reakcijama sinteze glicerola, ali je to za stanicu energetski nepovoljno jer se troši ATP (Overkamp i sur., 2000). S druge strane reakcijom redukcije aldehida u više alkohole dolazi do oksidacije NADH na energetski efikasniji način. Iako ova uloga Ehrlichovog puta nije u potpunosti istražena pokazalo se da tijekom fermentacije *Saccharomyces cerevisiae* proizvodi manje glicerola kada mu je glavni izvor dušika valin za razliku kada je glavni izvor dušika amonijak (Derrick i Large, 1993). *Saccharomyces cerevisiae* koristi 16 alkohol dehidrogenaza, 6 aldehid reduktaza i barem dvije specifične pirimidin ovisne reduktaze. Najbitnije alkohol dehidrogenaze su Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh4p, i Adh5p i Sfa1p koje mogu katalizirati redukciju svih aldehida u više alkohole (Dickinson i sur., 2003). Nastali viši alkoholi izlaze iz stanice i pretpostavlja se da se transport odvija pasivnom difuzijom kroz fosfolipidni dvosloj jer još nisu pronađene transportne molekule za više alkohole (Lipinski i sur., 2001).

2.3.3. Esteri

Esteri su jedan od poželjnih sastojaka piva te njihova poželjnost ovisi o aromi kojom pridonose aromi piva. Najveći dio estera nastaje tijekom glavnog vrenja piva reakcijom kondenzacije alkohola i aktiviranih masnih kiselina koju kataliziraju različiti enzimi pri čemu se troši stanična energija. Najproučavanija su dva enzima: alkohol acetil transferaza 1 i alkohol acetil transferaza 2 koji kataliziraju nastajanje svih acetatnih estera (npr. etil-acetat i izoamil-acetat). Kod sinteze etilnih estera najbitniji enzim je etanol *O*-aciltransferaza. Do sinteze estera dolazi pri dva uvjeta. Masne kiseline veličine C₈-C₁₄ su toksične za stanicu u velikim koncentracijama i esterifikacija je jedan od načina uklanjanja viška tih masnih kiselina (Saerens i sur., 2006). Drugi razlog je potreba stanice za balansom između acetil-CoA i CoA-SH (ishodnog spoja za većinu acil-CoA koji nastaje procesom acilacije, a reakciju katalizira acil-CoA sintetaza) pa se suvišna koncentracija acetil-CoA koristi za sintezu acetatnih estera (Thurston i sur., 1982).

Pivski kvasac proizvodi acetatne estere u puno većoj koncentraciji od etilnih estera. Esteri su topivi u mastima i kao takvi izlaze u okoliš stanice. Acetatni esteri brzo izlaze iz stanice difuzijom, a brzina difuzije etilnih estera ovisi o veličini lanca masne kiseline (što je masna kiselina duža odnosno ima veći broj ugljikovih atoma u svojoj strukturi, sporija je difuzija izvan stanice (Nykanen i Nykanen, 1977).

Izoamil-acetat je ester 3-metil-1-butanola i octene kiseline, a pivu daje aromu i okus koji podsjeća na bananu. Poželjan i vrlo često se nalazi u njemačkim pšeničnim pivima dok u nekim stilovima ukazuje na previsoku temperaturu vrenja. Prilikom starenja piva dolazi do spontane hidrolize ovog estera (Palmer, 2006b). Etil butirat je ester etanola i butanske (maslačne) kiseline, a pivu daje okus i aromu po tropskom voću, ananasu i mangu. Najčešće ga proizvodi kvasac, a može nastati i zbog loše higijene pogona ukoliko se u sladovini nalazi maslačna kiselina te je nepoželjan u previsokim koncentracijama. Etil heksanoat je ester etanola i kaproične kiseline, a pivu daje aromu crvene jabuke. Često je sastojak lager piva, a najčešće ga proizvodi kvasac. Nepoželjan je u koncentracijama višim od 1 mgL⁻¹). Etil oktanoat je ester kaprilne kiseline i etanola, a pivu također daje aromu po jabukama (Peddie, 1990).

2.3.4. Diacetil, aldehidi i sumporni spojevi

Ale piva mogu sadržavati mnoge nepoželjne arome, okuse i karakteristike od kojih su najčešći sumporni spojevi, acetaldehid, diacetil, dimetilsulfid i etil acetat. Sumporovodik (H₂S) je najznačajniji sumporni spoj koji daje neugodnu aromu trulih jaja, a nastaje kao nusprodukt metabolizma metionina. Pivo odležava određen period kako bi se smanjila koncentracija sumporovodika (Saerens i sur., 2010).

Acetaldehid se očituje kao miris zelene jabuke te je čest u mladim pivima dok je u odležanim indikator kontaminacije. Nakuplja se u prva tri dana vrenja te je odgovoran za okus po mladom pivu (koji može biti opisan podrumskim ili pljesnivim). Nakupljanju pridonose brzo vrenje, porast temperature, ubrzano doziranje kvasca, povećanje tlaka, mikrobnog zagađenje i nedovoljna aeracija sladovine. Uklanjanje acetaldehida pospješuje toplije odležavanje, dobra aeracija sladovine te povećana koncentracija kvasca u fazi dozrijevanja piva.

Diacetil odnosno vicinalni diketoni daju okus i miris po maslacu. Najčešće se javlja zbog preniske temperature vrenja ili zbog kontaminacije bakterijama vrste *Pediococcus*. Mehanizam nastajanja se odvija tako da kvasac izlučuje u pivo acetohidroksi-kiseline koje su bez okusa i mirisa, a njihova količina će ovisiti o soju kvasca, masi stanica (više stanica uzrokuje više hidroksi-kiselina) i koncentraciji kisika (povećana koncentracija kisika je u korelaciji s povećanom koncentracijom diacetila). Nakon toga dolazi do konverzije tih prekursora odnosno do oksidativne dekarboksilacije hidroksi-kiselina u acetoin i butandiol neovisno o kvascu. Takvoj reakciji pogoduje smanjenje pH, porast temperature te uvođenje kisika. Redukcija tj. uklanjanje diacetila se odvija pomoću kvasca tako da kvasac konvertira diacetil u acetoin pa u butandiol za koji ima visok prag osjetljivosti. Udio ukupnog diacetila (vicinalnih diketona i prekursora) u zreloom odležanom pivu je $0,1 \text{ mgL}^{-1}$.

Dimetil sulfid nastaje u pivu ukoliko se prilikom kuhanja sladovine nije omogućio odvod pare, a korišten je pšenični slad. Daje vrlo specifičan okus i miris po kuhanom kukuruzu. Etil acetat je ester etanola i octene kiseline koji daje miris i okus po acetonu. Sastavni je dio svih piva, a nepoželjan u koncentracijama višim od 10 mgL^{-1} .

Ostale nepoželjne arome i karakteristike koje piva može sadržavati su: određena otapala koja daju okus i miris po ljepilu (nastaje kada sladovina nema dovoljno otopljenog kisika za rast kvasca ili kada se fermentacija odvija na previsokoj temperaturi), kiselost (očituje se okusom po octu te upućuje na nedovoljnu čistoću pogona ili kontaminaciju piva, ali može biti i posljedica vrenja piva s *Brettanomyces* kvascem), trans-2-nonenal koji se očituje okusom i mirisom po kartonu (nastaje prilikom oksidacije vrele sladovine ili prilikom predugog odležavanja piva s visokim udjelom alkohola i glavni je pokazatelj oksidiranosti piva), 3-metil-2-buten-1-tiol (okus i miris po tvorcu i nastaje zbog izloženosti gotovog piva svjetlu), 2,6-diklorofenol (okus i miris po medicinskim kemikalijama te se javlja ukoliko se sredstva za pranje na bazi klora dobro ne isperu ili ako voda za kuhanje piva sadrži previše klorida) i 4-vinil-guaiakol koji daje okus i aromu po povrću i klinčiću, a proizvodi ga sam pivski kvasac (Palmer, 2006b).

2.3.5. Organske kiseline

U pivu se mogu nalaziti i organske kiseline od kojih je najčešća mliječna kiselina. Mliječnu kiselinu većinom proizvode bakterije mliječne kiseline: homofermentativno i heterofermentativno. Homofermentativnim putem piruvat se reducira u laktat uz oksidaciju NADH u NAD⁺, a reakciju katalizira laktat dehidrogenaza. Heterofermentativnim putem uz mliječnu kiselinu nastaju acetat i/ili etanol i CO₂ uz nastanak jedne ATP molekule. Mliječna kiselina se često koristi za korekciju pH vrijednosti komine radi bolje aktivnosti enzima α -amilaze i β -amilaze koji kataliziraju razgradnju škroba.

Optimalan pH za α -amilazu je 5,7 odnosno za β -amilazu 5,0, a iskustveno je dokazano da je optimalni pH komine za dobru aktivnost ovih enzima oko 5,3. Druge organske kiseline koje mogu biti prisutne u pivu su butandionska kiselina, pirogroždana kiselina te limunska, jabučna i vinska kiselina (Palmer, 2006a).

2.4. METODE ANALIZE SASTOJAKA PIVA

Tijekom i nakon proizvodnje piva potrebno je zadovoljiti brojne standarde za osiguranje kvalitete proizvoda. Bitni parametri koje valja držati pod kontrolom su boja, gorčina piva (IBU, eng, International Bittering Units) i volumni udio alkohola u pivu. Boju, gorčinu i udjel CO₂ u pivu moguće je odrediti spektrofotometrijski dok se za određivanje alkohola u pivu mogu koristiti denzitometrijska metoda, plinska kromatografija (GC) uz detekciju FID-om (plameno-ionizacijskim detektorom) te HPLC ili UPLC (tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti) metoda uz detekciju RID-om (detektor indeksa refrakcije).

Osim navedenih osnovnih analiza piva, provode se i analize sirovina radi zadovoljavanja standarda i osiguravanja konstantne kvalitete proizvoda. Voda je jedna od najvažnijih sirovina u proizvodnji piva jer njena kvaliteta značajno utječe na kvalitetu i okus piva, a sastav joj se može odrediti kemijskom metodom (ekstrakcija s amonij-acetatom), ICP metodom (induktivno spregnuta plazma) i ICP-MS metodom (induktivno spregnuta masena spektrometrija).

Nadalje, određivanje koncentracije vicinalnih diketona (2,3-butandiona i 2,3-pentandiona) moguće je provesti GC "head-space" tehnikom s ECD detektorom (detektor zarobljavanja elektrona) te se određivanje ovih spojeva koristi kao indikator određivanja trajanja odležavanja. Slično tome, praćenje koncentracije ugljikohidrata (monosaharida, disaharida, oligosaharida i polisaharida) koristi se za praćenje tijeka glavnog i naknadnog vrenja. Određivanje glukoze i oligosaharida sa stupnjem polimerizacije do 10 moguće je provesti HPLC-om ili UPLC-om s RID detektorom. Istom metodom moguće je odrediti koncentraciju organskih kiselina kao što su octena i mliječna kiselina te glicerol. Hmelj, kao jedan od četiri glavna sastojka piva, sadrži alfa i beta kiseline, tj. humulone i lupulone.

Tijekom procesa proizvodnje piva alfa kiseline se prevode u izo-alfakiseline (izohumulon) koje pivu daju gorčinu. Ove spojeve u hmelju i pivu moguće je također odrediti prethodno navedenom metodom.

Mikotoksini koji se često nalaze kao kontaminanti u žitaricama mogu se odrediti UPLC-MS/MS sustavom (kombinacija masene spektrometrije i tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti). Estere, aldehide, alkohole i druge hlapive komponente piva koji nastaju tijekom proizvodnje moguće je odrediti GC-om ("head-space" tehnika plinske kromatografije) pomoću FID detektora. Na koncentraciju ovih spojeva u pivu najviše utječu odabir vrste kvasca koji se koristi za vrenje, temperatura pri kojoj se provodi vrenje i koncentracija otopljenog kisika (Shimadzu Scientific Instruments, 2015).

2.4.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti određene smjese. Princip rada UPLC i HPLC sustava zasniva se na prolasku tekuće (mobilne) faze u koju je dodan mali volumen uzorka (analita) kroz kolonu koja je ispunjena stacionarnom fazom (obično silikati ili neki polimeri). Izbor pogodnog otapala, odnosno smjese otapala, provodi se s obzirom na sposobnost otapala da stvaraju vodikove veze (odjeljivanje hidrofilnih, odnosno hidrofobnih spojeva). Otapala moraju biti kromatografski čista, što znači da ne smiju sadržavati nečistoće koje mogu smetati kromatografskom određivanju.

Ako je stacionarna faza polarna, a mobilna nepolarna tada tehniku nazivamo UPLC ili HPLC s normalnim fazama dok u suprotnom slučaju tehniku nazivamo UPLC ili HPLC s obrnutim fazama. Odjeljivanje smjese spojeva metodom UPLC-a s normalnim fazama ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom stacionarnom fazom. Kod kromatografije obrnutih faza mehanizam razdvajanje temelji se na hidrofobnosti analita.

Vrijeme zadržavanja komponenta smjese ovisi o prirodi tvari, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze, a vrijeme potrebno za eluciju naziva se retencijsko vrijeme (t_R) i karakteristično je za svaku komponentu. Korištenje relativno visokog tlaka povećava linearnu brzinu čime se smanjuje vrijeme zadržavanja analiziranih komponenti u koloni što poboljšava učinkovitost i rezoluciju kromatograma. Na učinkovitost UPLC-a i HPLC-a utječu i duljina kolone te je glavna razlika između navedenih metoda ta da UPLC sustav koristi specijalizirane pumpe i kolone kraće duljine ispunjene sa mnogo sitnijim česticama (kuglicama) stacionarne faze ($2 \mu\text{m}$ u promjeru) što takvom sustavu omogućava upotrebu viših tlakova, a samim time i puno bržu analizu. Promjer čestica punjenja (stacionarne faze) i temperatura koja reducira viskoznost mobilne faze i poboljšava difuznost uzorka također utječu na učinkovitost tih metoda.

Uređaj za UPLC sastoji se od: spremnika mobilne faze, pumpe, injektora, kolone i detektora. Detektor ima važnu ulogu u detekciji eluiranih komponenti jer generira električni signal koji je razmjeran intenzitetu eluirane tvari. Najčešće korišteni detektori su: UV-VIS, fluorescentni, elektrokemijski, maseni i detektor indeksa loma (RID).

Metode tekućinske kromatografije koju rabe takvi sustavi mogu se podijeliti na adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbens i radijalnu kromatografiju pri čemu je nepokretna faza tekućine nanosena na čvrsti inertni nosač. Uz navedene postoji još i ionsko-izmjenjivačka i kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica.

2.4.2. Plinska kromatografija

Plinska "head-space" kromatografija (HS-GC) je metoda koja se koristi za ispitivanje čistoće uzorka, odjeljivanje te kvantitativnu i kvalitativnu analizu hlapivih komponenti u tekućim uzorcima. Za razliku od tekućinske kromatografije, u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s mobilnom fazom te zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi kemijskoj strukturi mobilne faze. Mobilna faza plinske kromatografije je inertni plin koji eluira smjese u koloni napunjenoj stacionarnom fazom.

Princip rada HS-GC-a se temelji na analizi parne faze koja je u ravnoteži s tekućom fazom. Uzorak se uvodi u spremnik gdje se grije i održava na određenoj temperaturi kako bi se ostvarila ravnoteža između tekuće i plinovite faze. Nakon toga se u spremnik uvodi mobilna faza (inertni plin) koja zatim ekspandira i odvodi uzorak prema kromatografskoj koloni. Faze metode plinske kromatografije su: injektiranje uzorka na vrh kolone, transport uzorka mobilnom fazom kroz kolonu, adsorpcija sastojaka na stacionarnu fazu i detekcija eluiranih sastojaka. HS-GC metoda razdvaja komponente smjese na temelju temperaturnog programa, odnosno postupnim podizanjem temperature kolone što zahtijeva da je kolona termostatisana.

Uređaj za plinsku kromatografiju sastoji se od: spremnika s plinom nosiocem, regulatora tlaka i protoka, injektora kolone i detektora. Najčešći detektori su: plameno-ionizacijski, foto-ionizacijski, detektor termalne provodljivosti i detektor zarobljavanja elektrona. Kolone za plinsku kromatografiju mogu biti punjene ili kapilarne koje se još dijele na kolone s prevlakom na stijenci i kolone s prevlakom na nosaču. Punjene kolone su od nehrđajućeg čelika, stakla ili bakra, promjera 1 - 4 mm, punjene fino usitnjenim materijalom (100 - 300 μm) presvučenim stacionarnom fazom te je nepokretna faza adsorbirana na inertnom čvrstom nosaču. Kapilarne kolone su kvarcne i presvučene su poliamidnim filmom s ciljem povećanja čvrstoće kolone, a stacionarna faza je imobilizirana na stijenci kapilare. Kolone s prevlakom na stijenci karakterizira debljina tekuće prevlake unutar kolone čija je debljina $<1 \mu\text{m}$. Kolone s prevlakom na nosaču imaju 30 μm premaz na tekućem nosaču unutar kolone. Najzastupljenija "head-space" tehnika uzorkovanja je statičko uzorkovanje.

To je najjednostavnija tehnika kojom se uzorak stavlja u vijalu koja se termostatira. Kada se dostigne stanje ravnoteže plinoviti dio uzorka se brzo prenosi na kolonu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Pri izradi diplomskog rada korištena su dva pivska kvasca. Za proizvodnju ale piva (Pozoj i Pale ale) korišten je komercijalno dostupan pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (tipa SafAle™ US-05 odnosno SafAle™ S-04) za proizvodnju ale piva Porter proizvođača Fermentis (Francuska).

3.1.2. Ječmeni slad

Za ale pivo (Pale ale) koristila su se dva tipa slada: bazni Pale ale slad i specijalni Caraaroma slad proizvođača Weyerman (Njemačka). Za proizvodnju Porter ale piva su se koristili prethodno navedeni sladovi uz dodatak Caramunich, Caffé Light, Carafa I i Carafa III slada istog proizvođača te rižine ljuske lokalnog dobavljača, a za ale pivo pozoj je rabljen slad dobiven tradicionalnim podnim slađenjem te slad Carahell i Munch II proizvođača Weyerman (Njemačka). Sve navedene vrste slada su usitnjene mlinom za suho mljevenje s razmakom valjaka od 0,5 - 4 mm u Zmajskoj pivovari d.o.o. u Zagrebu.

3.1.3. Hmelj

Za proizvodnju piva Pale ale korištene su sljedeće sorte hmelja: „Columbus“ (16,2% α -kiselina i 5,1% β -kiselina) za gorčinu, a za gorčinu i aromu: „Citra®“ (12,1% α -kiselina i 3,6% β -kiselina), „Chinook“ (13,6% α -kiselina i 3,3% β -kiselina) i „Cascade“ (5,6% α -kiselina i 7,1% β -kiselina), svi proizvedeni 2019. godine. Za ale pivo Pozoj rabljene su prethodno navedene sorte hmelja (Chinook i Columbus) uz „Mosaic“ sortu hmelja za gorčinu i aromu (13,5% α -kiselina i 3,5% β -kiselina), a za ale pivo Porter je rabljena samo jedna sorta hmelja u obliku peleta tip 90 sorte „Styrian Golding“ proizveden 2019. godine koji je sadržavao 4,7% α -kiselina i 2,6% β -kiselina za aromu. Prethodno navedene sorte hmelja su američkog podrijetla i proizvodi ih tvrtka Yakima Chief – Hopunion.

3.1.4. Voda

Za pripravu uvaraka sve tri vrste ale piva koristila se vodovodna voda iz vodocrpilišta Strmec u Zagrebu kojoj je korigiran omjer otopljenih klorida i sulfata.

3.1.5. Kemikalije i reagensi korišteni u istraživanju:

- Kloridna kiselina (65 %)
- Sumporna kiselina (76 %)
- Mliječna kiselina (88 %)

- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (10 %)
- 1-butanol (standard za HS-GC)
- Spindasol® SB-01 (silikagel)
- Star San (sredstvo na kiselinskoj bazi za sanitaciju i dezinfekciju pogona)

3.1.6. Aparatura i pribor

3.1.6.1. Vaga

Za vaganje slada korištena je elektronska vaga G&G modela PSB-150 maksimalne nosivosti 150 kg.

3.1.6.2. Mlin i elevator

Za mljevenje slada korišten je mlin s valjcima marke Engl modela 30-18-950, a za prebacivanje slada u komovnjak korišten je pužni elevator marke Čalopek.

3.1.6.3. Kuhaona i vrioni podrum

Za procese ukomljavaanja, cijedenja, kuhanja sladovine te odvajanja toplog i hladnog taloga korištena je kuhaona Zmajске pivovare d.o.o. Kuhaona (eng. brewhouse) je model „B-20“ proizvođača Letina (Čakovec, Hrvatska), kapaciteta uvarka 2000 L (Slika 3).



Slika 3. Kuhaona Zmajске pivovare d.o.o., model B-20 (Stegnjaić, 2017)

Sastoji se od 3 posude: komovnjaka koji je ujedno i kotao za kuhanje sladovine, cijednjaka s perforiranim dnom i vrtložnog taložnika (whirlpool), 2 centrifugalne pumpe pri čemu jedna

služi za prebacivanje sladne komine u cijednjak dok druga služi za recirkulaciju sladne komine, prebacivanje kuhane sladovine u vrtložni taložnjak i prepumpavanje ohmeljene sladovine iz taložnjaka u protustrujni izmjenjivač topline i dalje u cilindrično-konusni fermentor (CKF; Slika 4). U cilindrično-konusnom fermentoru korisnog volumena 4000 L odvijalo se glavno i naknadno vrenje piva. Fermentor je opremljen plaštom za hlađenje s mogućnošću odvojenog hlađenja konusa i ostatka fermentora, temperaturnom sondom koja regulira elektroventile za cirkulaciju rashladnog medija, vakuum ventilom, sigurnosnim ventilom, vreljnjačom sa špund ventilom i ventilima za ispušt.



Slika 4. Cilindrično-konusni fermentor (zapremnine 4000 L), Zmajška pivovara d.o.o. (Stegnjaić, 2017)

3.1.6.4. Refraktometar

Koncentracija nastalog ekstrakta tijekom pripreme sladovine za sve vrste ale piva pratila se digitalnim refraktometrom modela MA884, proizvođača Milwaukee Instruments (Rocky Mount, USA).

3.1.6.5. Mikroskop i Thoma-ova komorica

Broj stanica kvasca i njihova aktivnost praćene su tijekom glavnog i naknadnog vrenja pomoću brojanja u Thoma-ovoj komorici proizvođača BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Njemačka) pod svjetlosnim mikroskopom.

3.1.6.6. Centrifuga

Centrifuga „Harrier 18/80 Sanyo“ (Watford, Engleska) korištena je za izdvajanje kvasca i proteina iz piva pri 10000 o/min.

3.1.6.7. UPLC uređaj (Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD), sastoji se od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7.8 mm s odgovarajućim predkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0.0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μ L, a protok mobilne faze (0,0025M H₂SO₄) 1 mL min⁻¹. UPLC se koristio za određivanje koncentracije ugljikohidrata, glicerola i etanola.

3.1.6.8. HS-GC

Plinski kromatograf Perkin Elmer Autosystems XL GC (Perkin-Elmer, SAD) sastoji se od „headspace“ sustava za uzorkovanje Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD), uređaja za grijanje kolone (ZB-5MS, Zebron, Phenomenex 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50 μ m df), FID detektora i računalnog progama TotalChrom. HS-GC se koristio za određivanje viših alkohola i estera prilikom odležavanja piva.

3.1.6.9. Informatički programi i obrada rezultata

Za obradu dobivenih rezultata i podataka te određivanje koncentracije analiziranih spojeva: maltoze, maltotrioze, glukoze, etanola, glicerola, acetaldehida, 1-propanola, 2-butanola, etil-acetata, 2-metil-1-propanola, 2-metil-1-butanola, 3-metil-1-butanola, etil-butirata, izoamil-acetata, etil-heksanoata, etil-oktanoata i 2-feniletanola koristio se računalni program „Microsoft Excel 2010“.

3.2. METODE

3.2.1. Postupci u proizvodnji ale piva

3.2.1.1. Mljevenje i ukomljavanje slada za ale pivo

Za proizvodnju ale piva bilo je potrebno pripremiti dva uvarka od 2000 L. Izvagana količina slada se prebacila u mlin s valjcima gdje se slad samljeo i usipak se pužnim elevatorom prebacio u komovnjak u koji je prebačeno prethodno zagrijanih 1200 L vodovodne vode na 70

°C te 155 mL HCl i 93 mL H₂SO₄ za Pale ale odnosno 190 mL HCl i 120 mL H₂SO₄ za Pozoj radi dobivanja željenog omjera kloridnih i sulfatnih iona. Za ale pivo Porter se ne vrši dodatak kiselina u ovom koraku. Omjer kloridnih i sulfatnih iona je bitan za organoleptička svojstva piva pri čemu veća koncentracija kloridnih iona pojačava slatnu aromu dok veća koncentracija sulfatnih iona intenzivira hmeljnu aromu piva (Palmer i Kaminski, 2013). Ukomljavanje se odvijalo jednostupanjskim infuzijskim postupkom. Usipak je ubačen u komovnjak na 70 °C, kako bi na kraju prebacivanja komina završila na željenih 65 °C, temperaturi na kojoj se 1 sat odvijalo ukomljavanje. Miješalo je bilo namješteno na 50 % ukupne brzine miješanja tijekom prebacivanja usipka i ukomljavanja na 65 °C. Nakon prebacivanja usipka u komovnjak je ubačeno 200 mL mliječne kiseline (za Pale ale), 350 mL za Pozoj i 50 mL za ale pivo Porter kako bi se dobio optimalni pH za enzime koji sudjeluju u reakcijama razgradnje škroba u jednostavnije šećere (glukoza, maltoza i maltotrioza).

Nakon sat vremena započinje proces inaktivacije enzima razgradnje škroba. Temperatura se namjestila na 76 °C, upalilo se grijanje preko podnice kotla te se brzina miješanja prebacila na veću brzinu rotacije. Kada se dostigla željena temperatura komina je ostavljena 10 minuta kako bi se inaktivirali svi enzimi koji sudjeluju u razgradnji škroba. Za vrijeme inaktivacije enzima pripremio se cijednjak na način da se vodom zagrijanom na 83 °C potopila pumpa za prebacivanje komine, zagrijao cijednjak preko CIP sustava i potopilo lažno dno (prostor ispod perforirane ploče u cijednjaku) da ne dođe do začepljenja cijedenja i stvaranja vakuuma. Tijekom ukomljavanja spremnik tople vode (HLT) nadopunjen je do 1800 L i zagrijan na 83 °C te je dodano 235 mL HCl i 140 mL H₂SO₄ za dobivanje Pale ale piva, 230 mL HCl te ista količina H₂SO₄ (kao za Pale ale) za Pozoj pivo. Na taj način se dobiva omjer klorida i sulfata identičan onome u vodi za ukomljavanje. Po završetku inaktivacije enzima upalilo se mješalo (Segnerovo kolo) u cijednjaku na 10 % skale brzine vrtnje da ne dođe do začepljenja cijedenja, ugasilo se mješalo u komovnjaku da se ne stvori vrtlog, otvorio se potpuni ispuh iz komovnjaka i pumpom se prebacila kompletna komina u cijednjak. Zatim se brzina rotacije mješala smanjila na pola početne, a komovnjak se ispiru hladnom vodom preko CIP sustava. Prije početka cijedenja prebačena komina se recirkulirala preko pumpe za prebacivanje hmeljne kuhane sladovine odnosno sladovine nakon taložnjaka. Komina se recirkulira 5 min što je dovoljno za pročišćavanje komine i nastanak finog filtracijskog kolača. Brzina cijedenja je bitan faktor za postizanje dobrog aromatskog profila piva jer predugim cijedenjem previše tanina završava u sladovini, a zatim i u konačnom pivu što nepovoljno utječe na okus piva. Kada je recirkulacija završila otvorio se ventil prema kotlu za kuhanje sladovine (u ovoj varijanti to je ista posuda u kojoj se ukomljava; komovnjak) i ugasila pumpa za recirkulaciju čime je počelo cijedenje koje je trajalo 1 sat i 15 min za Pale ale, 2 sata i 45 min za Pozoj te 2

sata za Porter. Cijedenje se odvijalo pomoću gravitacijske sile s početkom ispiranja nakon prebačenih 500 L tj. kada su se počeli pojavljivati „suhi otoci“ u cijednjaku. Komina se ispiru da bi se povećalo iskorištenje ukomljavanja odnosno prebacio zaostali sladni ekstrakt. Komina se ispirala s 1800 L, a količina vode za ispiranje se regulirala protočnim ventilom za toplu vodu prema CIP sustavu pri čemu se nakon ocijedenih 1000 L postupno počela povećavati količina vode za ispiranje. Paralelno s povećanom količinom vode za ispiranje otvarao se i protočni ventil za ispušt ocijedene sladovine s 40 % propusnosti prema potpunom otvaranju odnosno maksimalnom protoku. Nakon ocijedenih 1000 L upali se podnica kotla koja je zagrijavala i dogrijavala ocijedenu sladovinu na 90 °C da bi se skratilo vrijeme potrebno za sljedeći korak – kuhanje sladovine.

3.2.1.2. Kuhanje i hmeljenje sladovine za ale pivo

Cijedenje je zaustavljeno kada se u kotao za kuhanje sladovine prebacilo 2400 L te se ocijedena sladovina stavila dogrijavati do 97 °C grijanjem preko donje podnice i plašta kotla. Za vrijeme dogrijavanja izvagalo se 200 g (za Pale ale) odnosno 1,5 kg hmelja za gorčinu „Columbus“ i 1,5 kg hmelja „Chinook“ (za Pozoj), a za ale pivo Porter se dodaje 4 kg hmelja „Styrian Golding“ te se oprao cijednjak i spremnik tople vode u koji je prebačeno novih 1200 L potrebnih za sljedeće ukomljavanje. Nakon dosegnutih 97 °C komina se dogrije do vrenja pri čemu se nastala pjena suzbila hladnom vodom preko glava CIP sustava u komovnjaku/kotlu za kuhanje komine. Poslije razbijanja pjene ugasilo se grijanje preko plašta te se smanjio protok pare u donju podnicu kotla kako bi se namjestilo optimalno strujanje sladovine tijekom kuhanja te se dodao hmelj za gorčinu. Kuhanje sladovine trajalo je 60 minuta za sve tri vrste ale piva. Za vrijeme kuhanja ventilator na dimnjaku kotla za kuhanje sladovine je bio upaljen da bi se uklonio ispareni dimetil sulfid (DMS).

3.2.1.3. Hladenje sladovine

Taložnjak služi za uklanjanje finog proteinsko-taninskog taloga i iskorištenog hmelja iz sladovine. Po završetku kuhanja, vrela sladovina se prebaci u taložnjak. Prethodno se pumpa za prebacivanje sladovine i cjevovod tretiraju parom te se u taložnjak dodaje hmelj za aromu i gorčinu: 5 kg „Cascade“, 2,5 kg „Citra“ i 1,25 kg „Chinook“ za Pale ale pivo, 3 kg „Mosaic“ i 3 kg „Chinook“ za Pozoj, a za Porter pivo se dodaje 1 kg „Styrian Golding“. Dodavanje hmelja u taložnjak je tehnika kojom se uspijeva ekstrahirati i očuvati više hmeljnih ulja koja direktno utječu na aromu i okus piva. Prebacivanje kuhane sladovine je trajalo 15 minuta kao i zadržavanje sladovine u taložnjaku. Za vrijeme taloženja postavila su se crijeva koja spajaju

taložnjak i CKF, a koja su se tretirala parom zajedno s izmjenjivačem topline i posudom za dodavanje kvasca *S. cerevisiae* u kojem je prethodno dodano 3 kg suhog kvasca u 30 L vode na 30 °C. Osim zaparivanja, za vrijeme taloženja se dotok kisika spojio na postavljenu sinteriranu cijev na izlazu iz hladnjaka koja služi za *in situ* aeraciju sladovine. Manometar na boci kisika se namjestio na 5 bara i dodavan je tijekom cijelog hlađenja prvog uvarka. Kada se sva vreća sladovina prebacila u taložnjak, komovnjak se oprao i pripremio za novo ukomljavanje. Hlađenje u protustrujnom izmjenjivaču topline odvija se hladnom vodovodnom vodom i rashladnom smjesom vode i glikola koja se koristi za hlađenje CKF-a. Minutu prije početka hlađenja otvara se dotok rashladnog sredstva i vode. Rashladno sredstvo cirkulira iz hladnjaka nazad u tank ledene vode gdje se ponovo hladi dok se zagrijana voda prebacuje u spremnik tople vode te se koristi za ispiranje sljedećeg uvarka. Nakon 15-minutnog taloženja počinje prebacivanje sladovine u CKF kroz hladnjak pri čemu se temperatura sladovine namješta na 18 °C što je ujedno i početna temperatura glavnog vrenja. Kada se temperatura sladovine ustalila inokuliran je kvasac *in situ* sustavom (samousisni efekt) iz posude u cjevovod kojim ohlađena sladovina ide u CKF. Hlađenje je trajalo između 42 – 47 minuta. Duljina trajanja ima bitan utjecaj na konačan aromatski profil piva jer se predugim hlađenjem većina hmeljnih ulja degradira.

3.2.1.4. Glavno i naknadno vrenje ale piva

Glavno i naknadno vrenje ale piva odvijalo se u opranom i dezinficiranom CKF-u korisnog volumena 4000 L, a za njegovo punjenje bila su potrebna 2 uvarka od 2000 L. Glavno vrenje je započelo na 18 °C i kroz jedan dan temperatura je narasla do namještenih 20,2°C. Treći dan nakon inokulacije temperatura se namjestila na 21,5 °C kako bi se snizila koncentracija diacetila i lakše prevreo zaostali ekstrakt. Dva dana prije kraja glavnog vrenja pritisnut je tlačni ventil kako bi se postigao nadtlak u fermentoru od 0,8 bara. Neprevreli ekstrakt se mjerio svaki dan fermentacije i nakon što je mjerenje specifične gustoće areometrom tri dana zaredom pokazalo istu vrijednost (SG (Pale ale) = 1,011; SG (Pozoj) = 1,015; SG (Porter) = 1,016) temperatura je spuštena na 5 °C pri čemu je započelo odležavanje koje je trajalo 26 dana za Pale ale, 30 dana za Pozoj te 10 dana za Porter. Nekoliko dana prije centrifugiranja te punjenja piva Pozoj, radi se suho hmeljenje piva (eng. dry hopping) tako da se dodaje hmelj (20 kg „Chinook“, 15 kg „Mosaic“ i 5 kg „Citra“) u CKF u kojem pivo odležava.

3.2.3. Analitičke metode

Tijekom glavnog vrenja uzorci su uzimati približno svaka 24 sata, a za vrijeme odležavanja uzorci su uzimati približno svakih 110 - 140 sati, osim kod ale piva Porter zbog

kratkog razdoblja odležavanja su izuzimani svakih 48 sati. Uzorci ale piva uzimani su preko bočnog ventila na koji je montirana ispusna slavina. Za dezinfekciju aparature prilikom uzimanja uzorka koristilo se dezinfekcijsko sredstvo Star San koje proizvodi tvrtka Five Star Chemicals.

3.2.3.1. Temperatura

Temperatura je praćena tijekom ukomljavanja, cijedenja, kuhanja sladovine, pripreme vode, hlađenja, glavnog i naknadnog vrenja, a mjerena je pomoću temperaturnih sondi (Pt-100) koje su ugrađene u kotlove varionice, spremnik tople vode i cilindrično-konusne fermentore (CKF-ove).

3.2.3.2. pH

pH se mjerio pH-metrom za vrijeme ukomljavanja radi podešavanja optimalnog pH i tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva zbog praćenja uvjeta i tijeka vrenja.

3.2.3.3. Ukupni broj i aktivnost (broj živih) stanica kvasca

Broj stanica kvasca i njihova aktivnost se pratila tijekom glavnog i naknadnog vrenja sva tri tipa ale piva. Broj stanica se određivao brojanjem u Thoma-ovoj komorici nakon razrijeđivanja izuzetog uzorka iz cilindrično-konusnog fermentora. Aktivnost stanica kvasca (vijabilnost) se određivala bojanjem stanica kvasca metilenskim modrilom i to na način da se nakon razrijeđivanja uzorka dodalo 2 – 3 kapi metilenskog modrila, dobro se promiješalo te se ostavilo da odstoji do 2 minute. Nakon toga se brojanjem obojenih (mrtvih) i neobojenih (živih) stanica kvasca ustanovio postotak živih stanica koji izračunat na ukupni broj stanica kvasca u tom uzorku.

3.2.3.4. Koncentracija ekstrakta u sladovini i mladom pivu

Koncentracija ekstrakta u sladovini pratila se mjerenjem optičke gustoće digitalnim refraktometrom, a koncentracija ekstrakta u mladom pivu pratila se mjerenjem specifične gustoće areometrom.

3.2.3.5. Određivanje supstrata i produkata glavnog i naknadnog vrenja ale piva tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti (UPLC)

Za određivanje koncentracije supstrata i produkata glavnog i naknadnog vrenja sva tri tipa ale piva koristio se uređaj UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II (Santa Clara, SAD). Iz uzoraka izuzetih tijekom glavnog i naknadnog vrenja sva tri tipa ale piva centrifugiranjem

(10000 g, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) je izdvojena biomasa kvasca. Dobivenim supernatantima uzoraka dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru volumena 1:1 ($V = 750 \mu\text{L}$).

Dobivena otopina intenzivno je izmješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 10 minuta pri sobnoj temperaturi da se istalože proteini. Centrifugiranjem (10000 g, 10 min, 4 °C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je razrijeđen 10 puta u odmjernim tikvicama te zatim profiltriran pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine $0,20 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Za pripremu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost manja od $1 \mu\text{S}$. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II sustava koji se sastoji od pumpe (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija $150 \times 7,8 \text{ mm}$ s odgovarajućim predkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID). Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je $0,0025 \text{ M}$ otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je $10 \mu\text{L}$, a protok mobilne faze ($0,0025 \text{ M H}_2\text{SO}_4$) 1 mL min^{-1} . Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 2).

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca i njihova retencijska vremena

Spoj	t_R^* (min)	jednadžba baždarnog pravca	R^2 (-)
glukoza	$4,8 \pm 0,08496$	$1376240\gamma_{\text{glukoza}} + 3347,6$	1,000
fruktoza	$5,1 \pm 0,07706$	$1365280\gamma_{\text{fruktoza}} + 2583,1$	0,99
maltoza	$4,0 \pm 0,00673$	$1393360\gamma_{\text{maltoza}} + 1284,1$	0,9999
maltotrioza	$3,6 \pm 0,02802$	$1459260\gamma_{\text{maltotrioza}} + 4306,7$	1,000
glicerol	$7,0 \pm 0,00074$	$1210940\gamma_{\text{glicerol}} + 4337,5$	0,99
etanol	$10,8 \pm 0,00547$	$4854430\varphi_{\text{etanol}} + 4099,7$	0,9999

* t_R izraženo kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija; A, površina

3.2.3.6. Određivanje hlapivih komponenti ale piva plinskom „headspace“ kromatografijom (HS-GC_FID)

Analiza sastojaka lako hlapljivih spojeva (aldehida, estera i viših alkohola.) u pivu provedena je na plinskom kromatografu Perkin Elmer Autosystems XL GC opremljenom detektorom FID (Perkin-Elmer, SAD) i sustavom za uzimanje uzoraka Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD).

Za održavanje plamena na FID-u upotrijebljeni su vodik i zrak. Uzorak piva za analizu pripremljen je na slijedeći način: centrifugiranjem (10000 g, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) je izdvojena biomasa kvasca. Sadržaj je dobro izmješšan i 10 mL tako pripremljenog uzorka stavljeno je u vijalu volumena 22 mL uz dodatak 1 μ L internog standarda (1-butanol). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 3).

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca i njihova retencijska vremena

Spoj	t_R (min)	jednadžba baždarnog pravca	R^2 (-)
acetaldehid	4,10	$0,0171\gamma_{\text{acetaldehid}} - 0,0004$	1,000
1-propanol	6,40	$0,0056\gamma_{1\text{-propanol}} - 0,0012$	0,9989
etil-acetat	7,71	$0,0397\gamma_{\text{etil-acetat}} - 0,0055$	0,9999
2-metil-1-propanol	8,23	$0,0133\gamma_{2\text{-metil-1-propanol}} + 0,0144$	0,99
3-metil-1-butanol	12,26	$0,0151\gamma_{3\text{-metil-1-butanol}} - 0,0039$	0,999
2-metil-1-butanol	12,43	$0,0179\gamma_{2\text{-metil-1-butanol}} - 0,0057$	0,9999
etil-butirat	14,49	$0,1365\gamma_{\text{etil-butirat}} - 0,0231$	1,000
izoamil-acetat	16,80	$0,1658\gamma_{\text{izoamil-acetat}} - 0,0472$	0,989
etil-heksanoat	19,95	$0,1731\gamma_{\text{etil-heksanoat}} - 0,0276$	1,000
etil-oktanoat	24,25	$0,1637\gamma_{\text{etil-oktanoat}} + 0,0385$	1,000

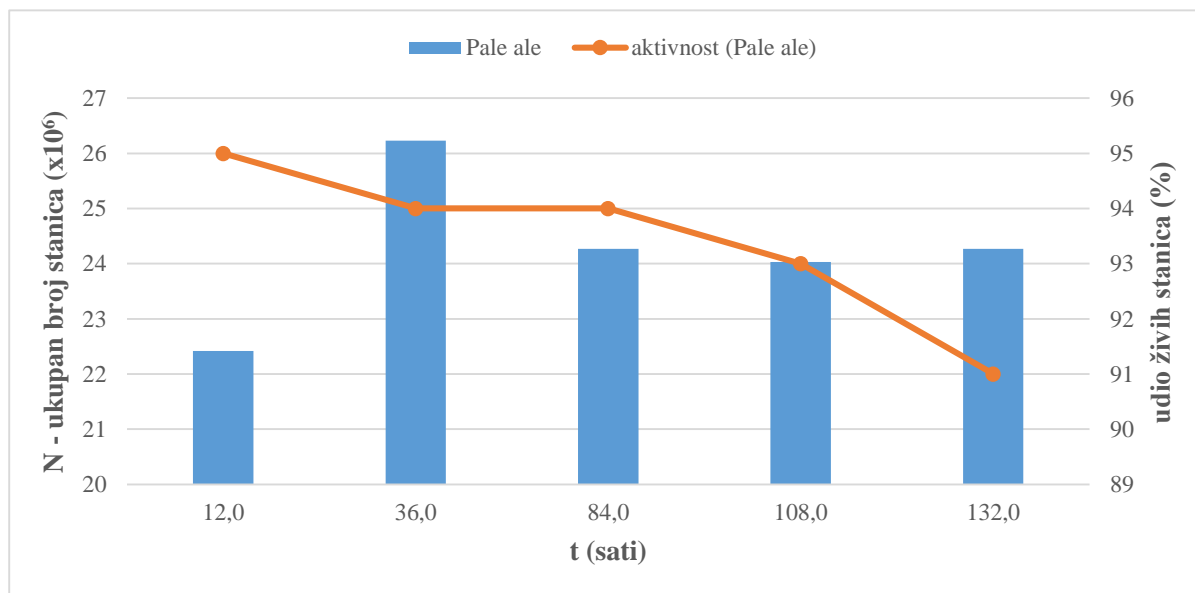
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proučavana je proizvodnja tri vrste ale piva (Pale ale, Pozoj, Porter) te je provedena analiza (supstrata, etanola i glicerola) tijekom glavnog i naknadnog vrenja te nakon skladištenja u hladnom skladištu u trajanju od mjesec dana, ali i lako hlapivih spojeva (estera, acetaldehida i viših alkohola) tijekom odležavanja za sva tri tipa piva.

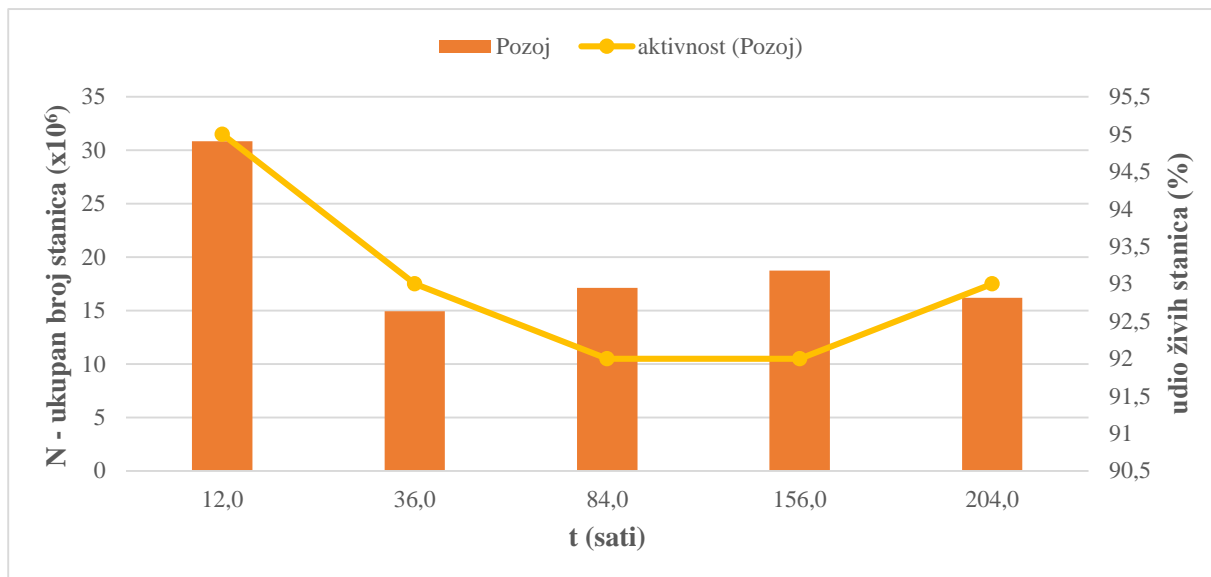
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati analize ale piva (tipa Pale ale), u poglavlju 4.2. prikazani rezultati analize ale piva (Pozoj - IPA), dok su u poglavlju 4.3. prikazani rezultati analize ale piva tipa Porter.

Tijekom procesa glavnog i naknadnog vrenja praćen je ukupan broj kvasaca i njihova aktivnost (Slika 5, 6 i 7). Uočeno je da je najveća aktivnost kvasca u početnih nekoliko sati fermentacije te da kako odmiče vrenje tako ukupan broj stanica kvasca i njihova aktivnost opada. Prema rezultatima aktivnosti stanica kvasca vidljivo je da kvasac korišten u Pale ale i Pozoj pivu ne opada ispod 90 %, dok na primjeru Porter piva vrijednost opada čak do 85 %.

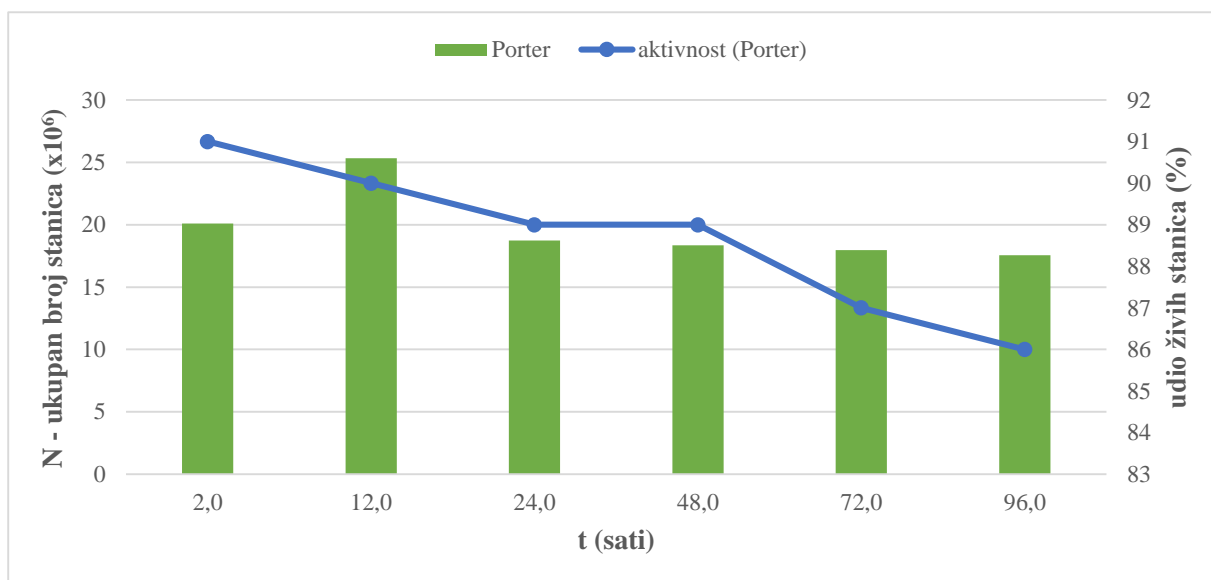
Koncentracija fermentabilnog šećera glukoze za Pale ale i Porter piva već nakon jednog dana fermentacije pada ispod limita kvantifikacije (analitičke metode) dok za pivo Pozoj se to događa nakon nešto više od 48 sati što upućuje na povoljne uvjete vrenja i visoku metaboličku aktivnost kvasca. Nadalje, koncentracije ostalih fermentabilnih šećera su vidljive na slikama 8, 11 i 14 za svaku vrstu piva.



Slika 5. Ukupan broj i udio živih (aktivnost) stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja kod Pale ale piva



Slika 6. Ukupan broj i udio živih (aktivnost) stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja kod Pozoj (IPA) piva



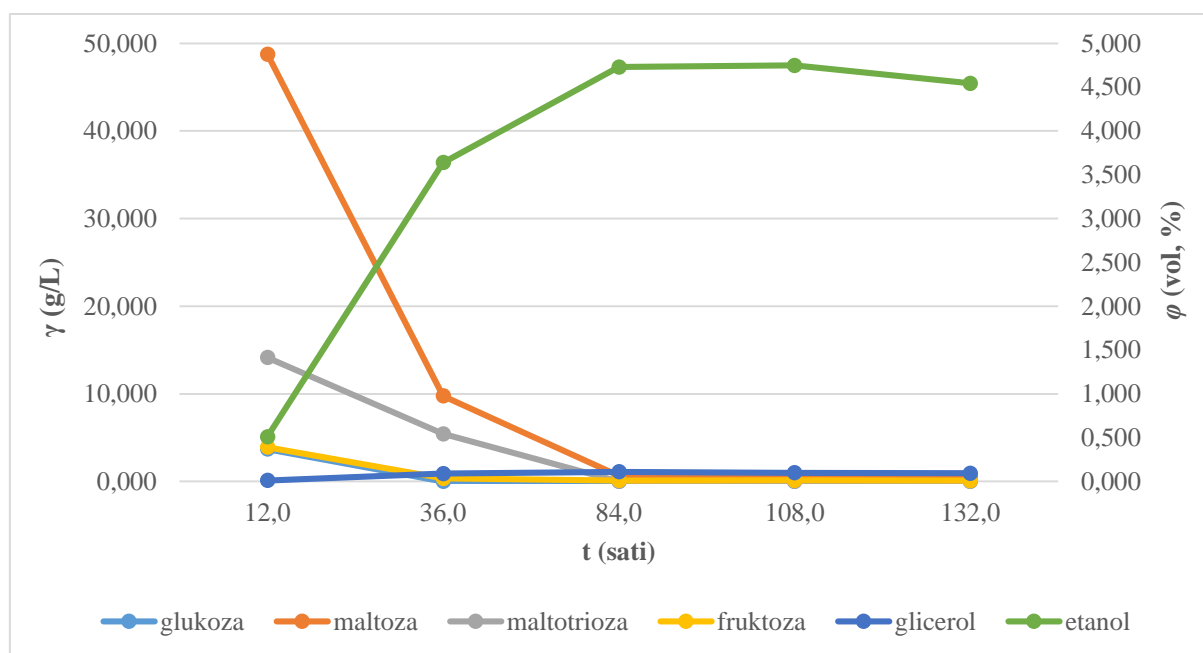
Slika 7. Ukupan broj i udio živih (aktivnost) stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja kod Porter piva

Tijekom vrenja kvasac iz sladovine prvo troši monosaharide, a zatim disaharide i trisaharide. S obzirom da kvasac ne može previrati dekstrine, kraj glavnog vrenja je vidljiv kroz činjenicu da su koncentracije ekstrakta, glicerola i etanola poprimile približno konstantnu vrijednost (Marić, 2009). Međutim, potrebno je istaknuti da su zabilježene određene oscilacije koncentracije etanola, glicerola i fruktoze kao posljedica analitičkih pogrešaka, ali i zbog činjenice da cilindrično-konusni fermentori u kojima se odvijala fermentacija piva nemaju ugrađeno miješalo čime bi se dobio homogeni uzorak, a oscilacije ostvarenih rezultata.

Volumni udio etanola na kraju glavnog vrenja je bio 4,53 % vol/vol za Pale ale pivo, 6,69 % vol/vol za Porter pivo i 6,26 % vol/vol za Pozoj pivo dok je koncentracija glicerola iznosila 1,63 – 1,64 gL⁻¹ za Porter i Pozoj pivo, a za Pale ale pivo 0,935 gL⁻¹ što se poklapa s prosječnom koncentracijom glicerola u gotovom ale pivu (Klopper i sur., 1986). Prisutnost mliječne kiseline u ale pivu nije registrirana tijekom cijelog procesa glavnog i naknadnog vrenja.

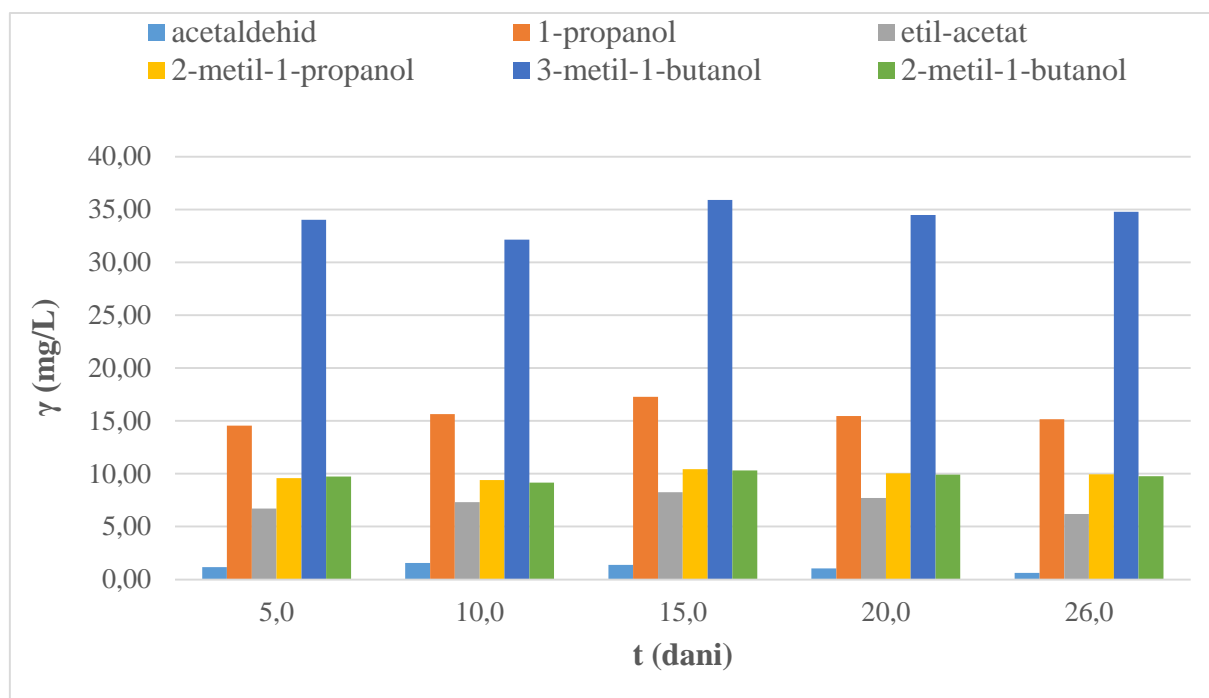
4.1. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa Pale Ale)

U ovom dijelu istraživanja proučavan je proces glavnog i naknadnog vrenja ale piva te odležavanja piva i analizirani su sastojci arome i kvalitete piva tijekom tih procesa te proizvedenog piva i nakon skladištenja piva u odgovarajućim uvjetima (u hladnom skladištu na 5 °C) u razdoblju od mjesec dana. Istraživanje Pale ale piva započelo je pripremom sladovine koje se sastoji od 5 glavnih koraka: ukomljavanje, cijedenje, kuhanje hmeljene sladovine, taloženje i hlađenje. Ohlađena sladovina je zatim pumpom prebačena u CKF na glavno i naknadno vrenje pri čemu je nacijepljena ale kvascem *S. cerevisiae* SafAle™ US-05 na putu do CKF-a. Parametri kojima se pratio proces ukomljavanja su temperatura, vrijeme i pH (Kühlbeck i sur., 2005). Ukomljavanje je trajalo sat vremena na 65 °C, a pH je podešen na 5,35 s 200 mL mliječne kiseline radi postizanja optimalnog pH za aktivnost amilolitičkih enzima (β i α amilaze). Proces fermentacije praćen je kontrolom temperature i specifične gustoće mladog piva te analitičkim određivanjem ispitivanih supstrata, alkohola i glicerola, a proces odležavanja je praćen analizom lakohlapivih komponenti piva (Slika 8).



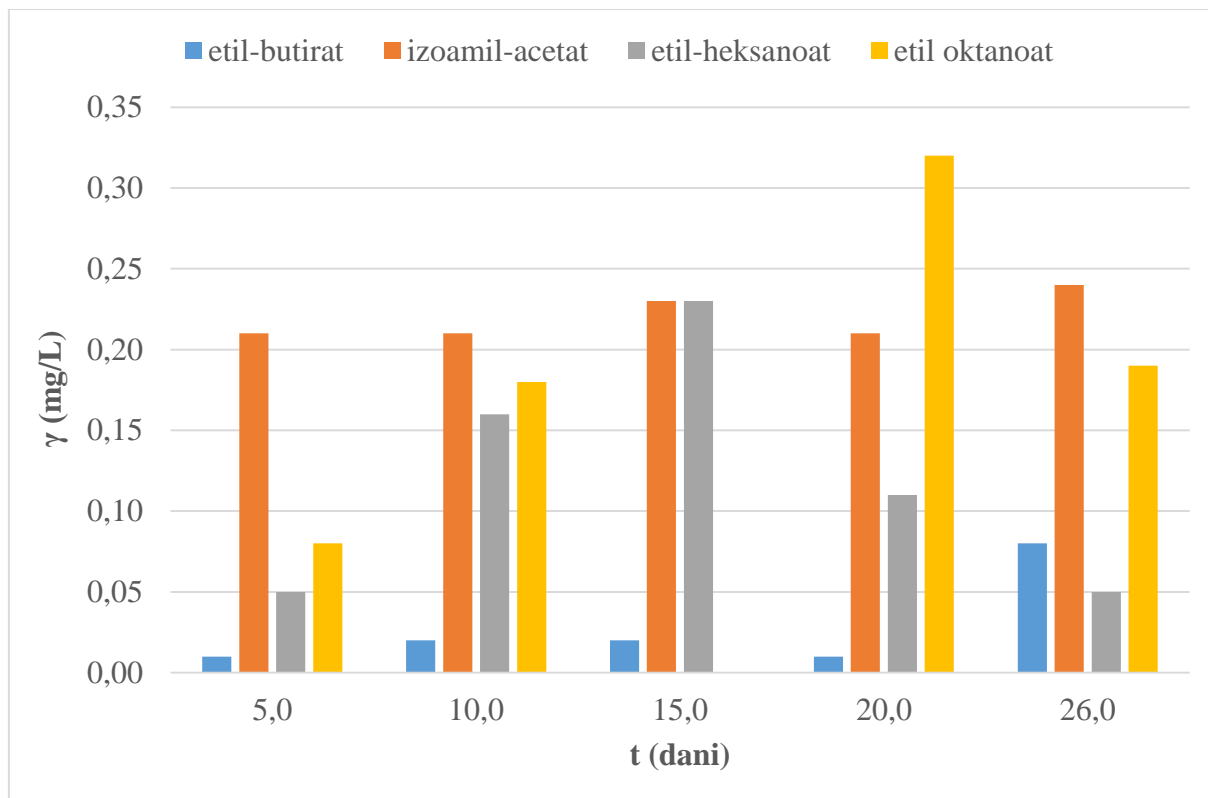
Slika 8. Promjena koncentracije fermentabilnih šećera, alkohola i glicerola tijekom glavnog i naknadnog vrenja Pale ale piva

Fermentabilni šećeri, poput glukoze i disaharida maltozotrioze, potroše se u prvih 48 sati izrazite fermentacije, dok fruktoza i maltoza već nakon 36 sati dostižu vrijednost koja se do kraja vrenja ostaje približno konstantna (Slika 8).



Slika 9. Promjena koncentracije acetaldehida, viših alkohola i estera tijekom odležavanja Pale ale piva

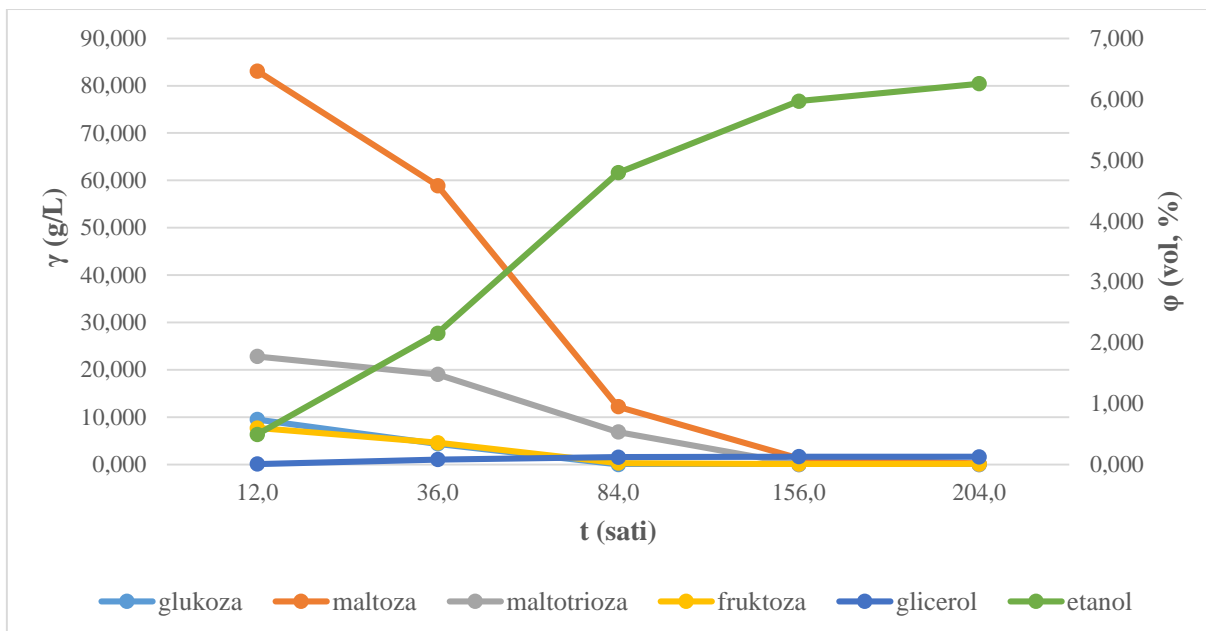
Iz slike 9 je vidljivo da u Pale ale pivu tijekom odležavanja koncentracija acetaldehida s vremenom opada te da koncentracije nekih estera i viših alkohola ostaju približno konstantne. Međutim, na slici 10 se vidi da koncentracija etil-butirata i izoamil-acetata s vremenom je u porastu, dok etil-heksanoat 15 dan odležavanja dostiže najvišu vrijednost od $0,23 \text{ mgL}^{-1}$ koja pred kraj odležavanja pada na $0,05 \text{ mgL}^{-1}$.



Slika 10. Promjena koncentracije estera tijekom odležavanja Pale ale piva

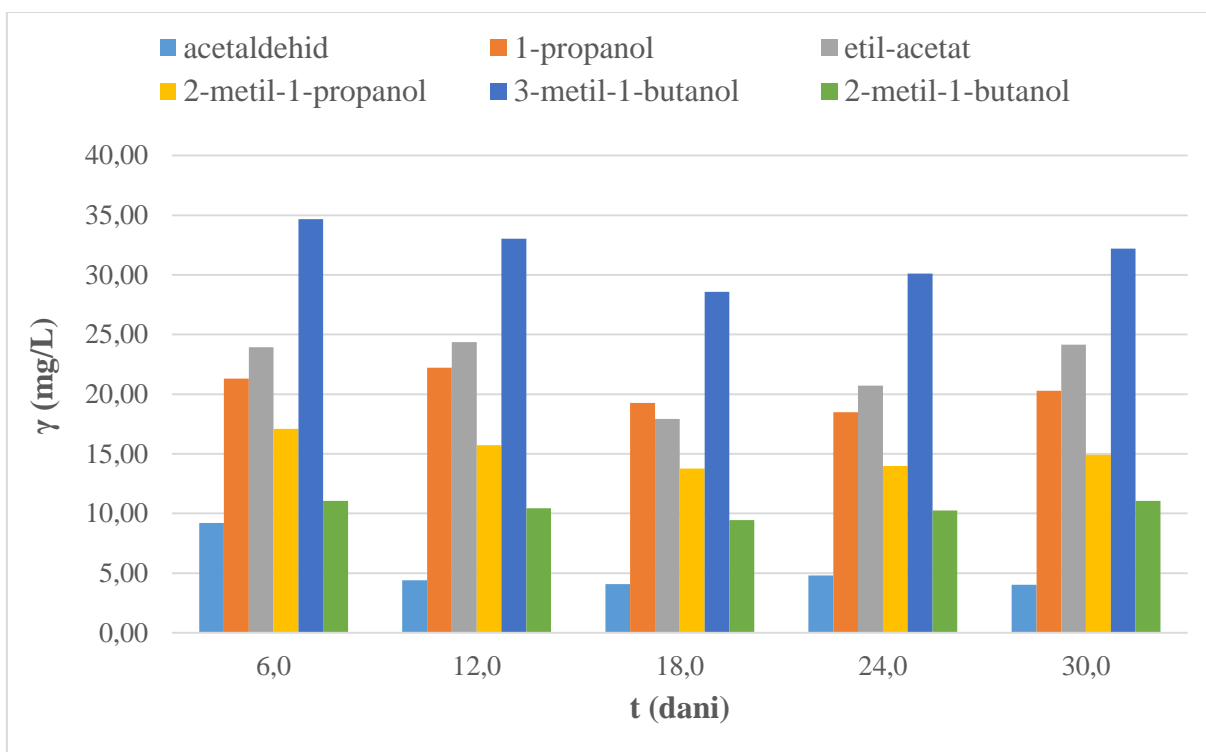
4.2. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (Pozoj - IPA)

U ovom dijelu istraživanja proučavan je proces glavnog i naknadnog vrenja ale piva te odležavanja piva i analizirani su sastojci arome i kvalitete piva tijekom tih procesa te proizvedenog piva i nakon skladištenja piva u odgovarajućim uvjetima (u hladnom skladištu na 5 °C) . Proces proizvodnje sladovine Pozoj – IPA piva opisana je u poglavlju 3.2.1., a proces vrenja praćen je kontrolom temperature i specifične gustoće mladog piva te analitičkim određivanjem ispitivanih supstrata, alkohola i glicerola, a proces odležavanja je praćen analizom lakohlapivih komponenti piva.



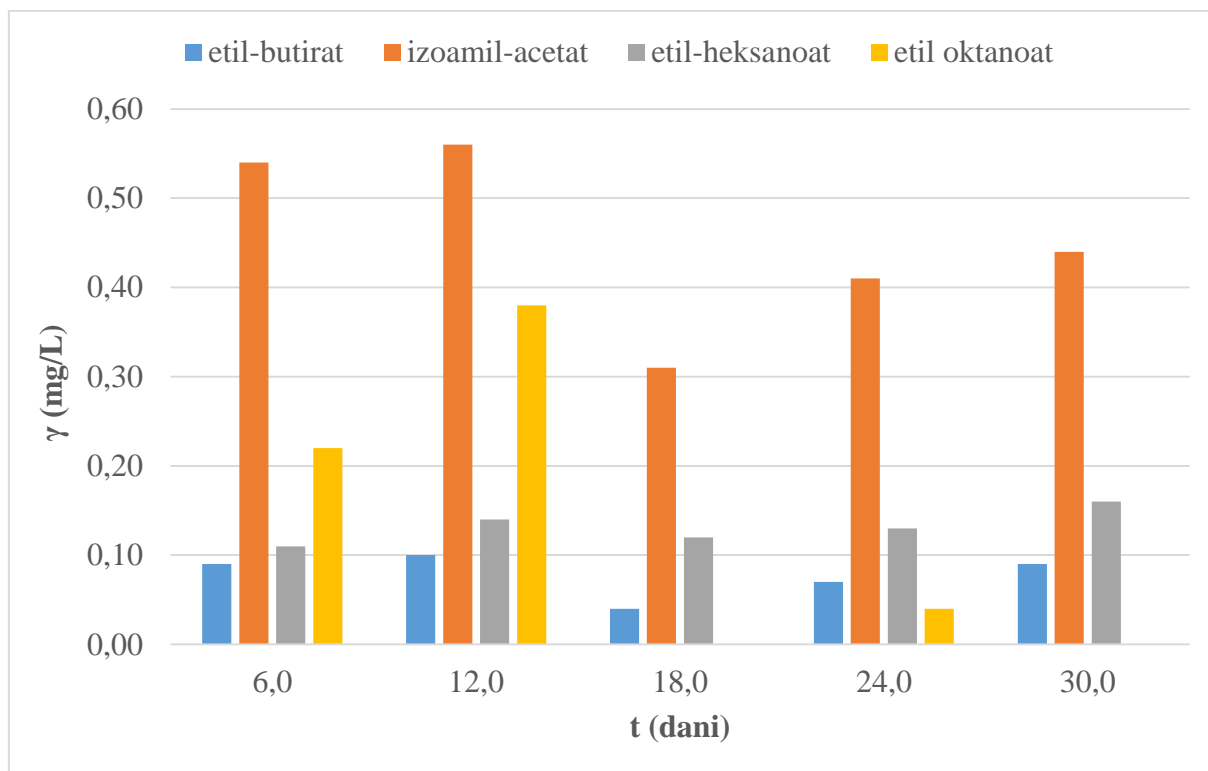
Slika 11. Promjena koncentracije fermentabilnih šećera, alkohola i glicerola tijekom glavnog i naknadnog vrenja Pozoj piva (IPA)

Fermentabilni šećeri tijekom vrenja Pozoj piva se troše sporije nego na primjeru Pale ale piva što je vidljivo iz slike 11. Naime, glukoza se kompletno potroši nakon 48 sati, a maltotrioza tek nakon nešto više od 100 sati vrenja. Fruktoza i maltoza se također ne potroše u potpunosti, ali nakon približno 150 sati fermentacije postižu konstantnu vrijednost.



Slika 12. Promjena koncentracije acetaldehida, viših alkohola i estera tijekom odležavanja Pozoj piva (IPA)

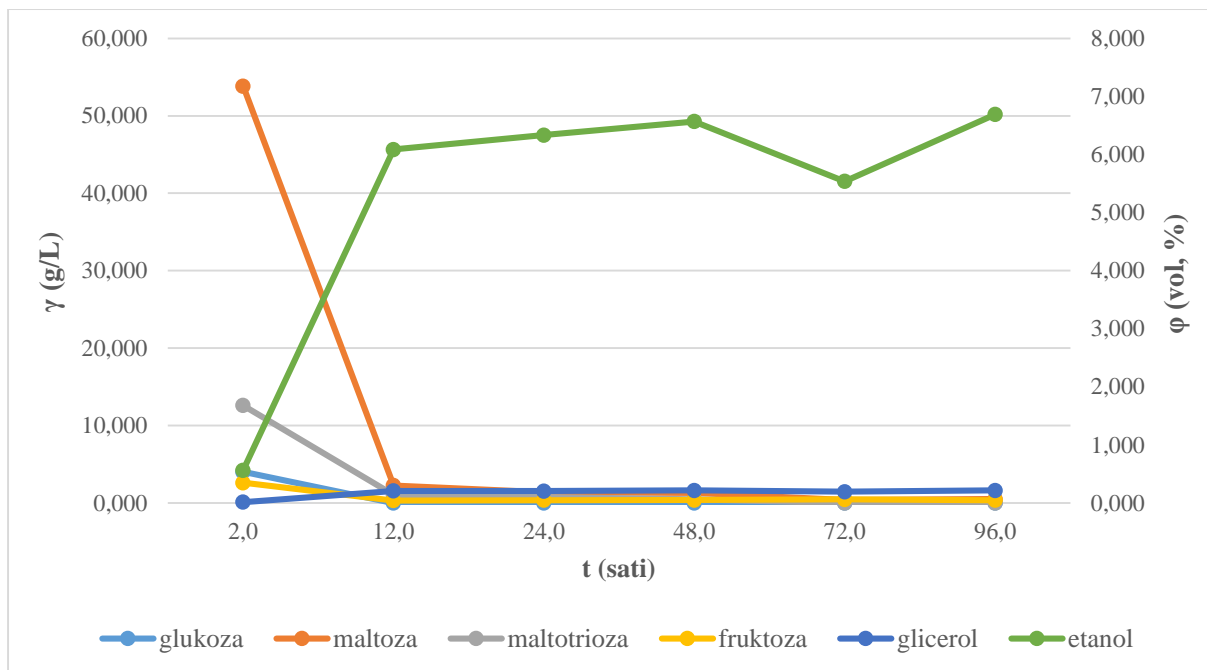
U Pozoj pivu tijekom odležavanja opada koncentracija acetaldehida koja je nastala tijekom vrenja te je viša nego u Pale ale pivu. Koncentracija poželjnih estera je vidljiva na slici 12 te je uočljivo da u Pozoj pivu ima više estera koji utječu na aromu i okus Pozoj piva što je posljedično vezano uz dodatni postupak suhog hmeljenja (eng. dry hopping) pri kraju odležavanja IPA piva. Koncentracija etil-butirata i etil-heksanoata ostaje tokom cijelog procesa odležavanja približno konstantna, dok koncentracija etil-oktanoata opada ispod limita detekcije analitičke metode (Slika 13).



Slika 13. Promjena koncentracije estera tijekom odležavanja Pozoj piva (IPA)

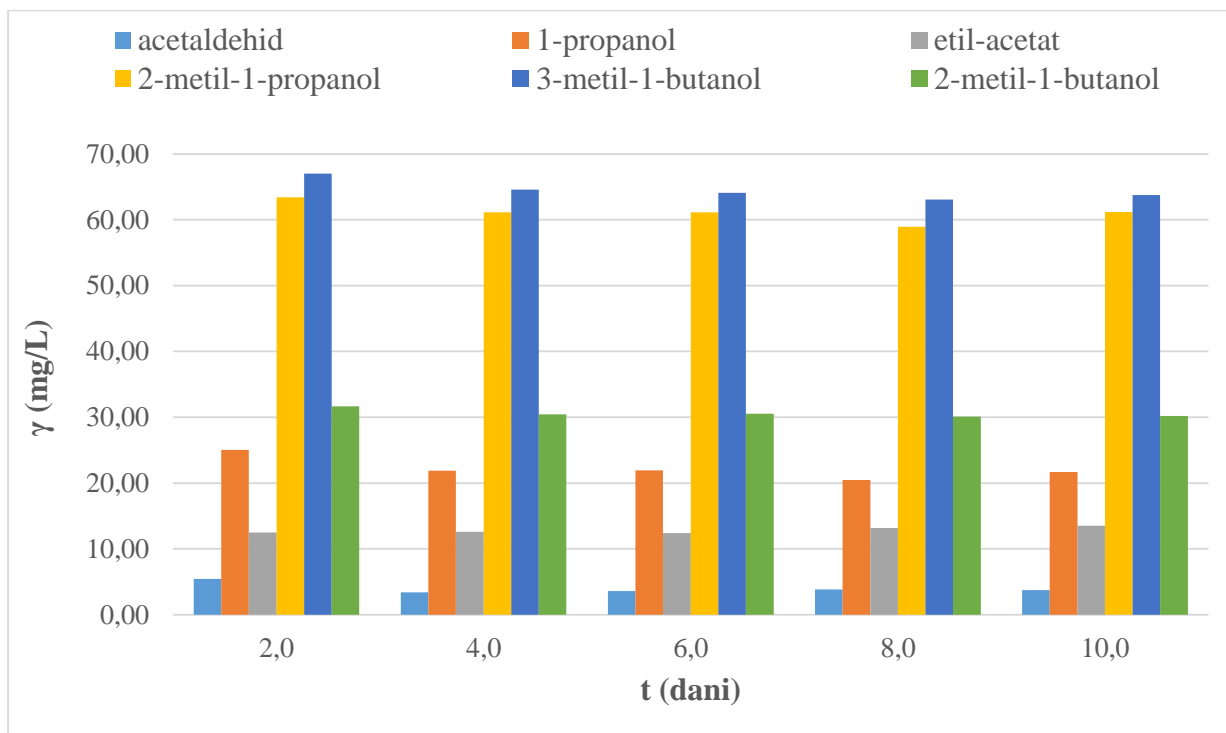
4.3. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa Porter)

U ovom dijelu istraživanja proučavan je proces glavnog i naknadnog vrenja ale piva te odležavanja piva i analizirani su sastojci arome i kvalitete piva tijekom tih procesa te proizvedenog piva i nakon skladištenja piva u odgovarajućim uvjetima (u hladnom skladištu na 5 °C). Proces proizvodnje sladovine za Porter pivo opisan je u poglavlju 3.2.1. a proces vrenja praćen je kontrolom temperature i specifične gustoće mladog piva te analitičkim određivanjem ispitivanih supstrata, alkohola i glicerola, a proces odležavanja je praćen analizom lakohlapivih komponenti piva.



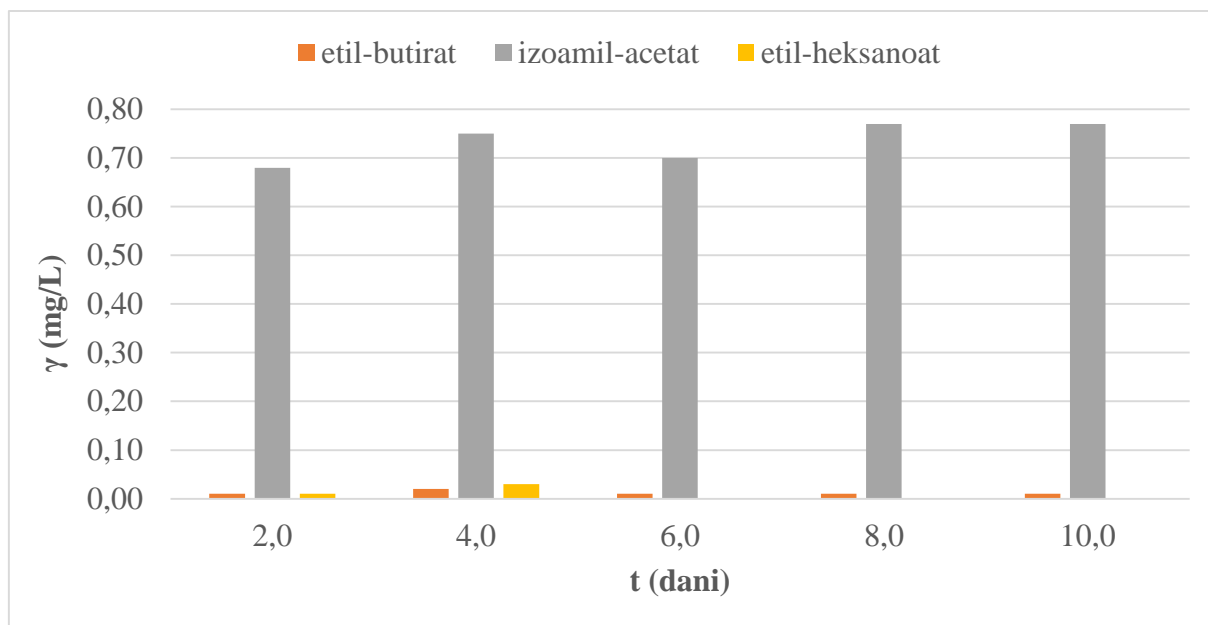
Slika 14. Promjena koncentracije fermentabilnih šećera, alkohola i glicerola tijekom glavnog i naknadnog vrenja Porter piva

Kod Porter piva, s obzirom da se za njegovu proizvodnju rabi drugi soj kvasca, glavno i naknadno vrenje se odvija relativno brže i vremenski je kraće od fermentacije Pale ale i Pozoj piva. Koncentracija glukoze već nekoliko sati nakon početka fermentacije opada na nulu dok koncentracije ostalih fermentabilnih šećera već nakon 1 dana dostižu konstantne vrijednosti. Maltotrioza se potroši u prva dva dana vrenja (Slika 14).



Slika 15. Promjena koncentracije acetaldehida, viših alkohola i estera tijekom odležavanja Porter piva

Na slici 15 je vidljivo da koncentracija acetaldehida zbog kratkog vremena odležavanja Porter piva ostaje približno konstantna te se koncentracija ostalih estera također značajno ne mijenja. Esteri poput etil-butirata i etil-heksanoata su prisutni u vrlo malim koncentracijama te je jedini značajno prisutni ester izoamil-acetat (Slika 16).



Slika 16. Promjena koncentracije estera tijekom odležavanja Porter piva

Na osnovi rezultata analiza (Slika 9, 12 i 15) vidljivo je da je najveća koncentracija acetaldehida zabilježena u prvih nekoliko dana odležavanja te da se njegova koncentracija tijekom prethodno navedenog procesa smanjuje. Smanjenje koncentracije acetaldehida je pokazatelj starenja mladog piva i u skladu je s literaturom (Otter i Taylor, 1971).

Na kraju odležavanja piva sastav viših alkohola prikazan je na slikama 9, 12 i 15, a sastav estera na slikama 10, 13 i 16. Rezultati prikazani na navedenim slikama u skladu su s literaturnim podacima (Hughes i Baxter, 2001).

Spoj 2-butanol nije detektiran u ale pivima što je očekivano jer je pokazatelj kontaminacija piva bakterijama roda *Lactobacillus*, najčešće vrste *Lactobacillus brevis* (Makarova i sur., 2006).

Prisutnost etil-oktanoata nije registrirana u Porter pivu (Slika 16), dok u pivu Pozoj je detektirana (Slika 13), ali pri samom kraju procesa odležavanja koncentracija navedenog estera pada ispod limita kvantifikacije. U Pale ale pivu koncentracija etil-oktanoata (Slika 10) s vremenom odležavanja opada, ali je i dalje prisutna. Također, prisutnost 2-feniletil-acetata i 2-feniletanola nisu registrirane u sva tri tipa piva. Ovi podaci su u skladu s literaturnim podacima (Hughes i Baxter, 2001). Koncentracije fermentabilnih šećera, glicerola i etanola u sva tri tipa piva nakon skladištenja u bocama u razdoblju od mjesec dana vidljive su u Tablici 4.

Navedeni dobiveni podaci odgovaraju rezultatima dobivenim u pivima nakon odležavanja te također odgovaraju postavljenim standardima kvalitete Zmajске pivovare d.o.o.

Tablica 4. Koncentracije fermentabilnih šećera, glicerola i etanola u pivu nakon skladištenja

	glukoza (g/L)	maltoza (g/L)	maltotrioza (g/L)	glicerol (g/L)	etanol (%)
Pale ale	/	0,4967	0,0111	1,1240	4,8287
Pozoj	/	0,1910	0,1023	1,5834	6,3626
Porter	/	0,3639	0,4168	1,4189	5,7250

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Tijekom glavnog vrenja Pale ale piva, kvasac je proizveo 4,7 % vol/vol etanola i 1,11 gL⁻¹ glicerola za 36 sati pri temperaturi od 20 °C. Nakon naknadnog vrenja pri temperaturi od 21,5 °C došlo je smanjenja koncentracije glicerola na 0,935 gL⁻¹ i etanola na 4,54 % vol/vol zbog hlapljenja.
2. Tijekom glavnog vrenja Porter piva, kvasac je proizveo je 6,0 % vol/vol etanola i 1,56 gL⁻¹ glicerola u prvih 12 sati izrazite fermentacije pri temperaturi od 20 °C te je kroz to vrijeme kompletno potrošio svu prisutnu glikozu. Nakon 96 sati od početka glavnog vrenja te naknadnog vrenja kvasac je potrošio svu dostupnu maltotriozu i proizveo glicerol u koncentraciji od 1,63 gL⁻¹ i etanol od 6,69 % vol/vol.
3. Nakon glavnog i naknadnog vrenja Pozoj piva, kvasac je proizveo je 6,260 % vol/vol etanola i 1,64 gL⁻¹ glicerola. Glukozu je kompletno potrošio nakon 48 sati izrazite fermentacije, a maltotriozu nakon više od 100 sati od početka glavnog i naknadnog vrenja. Koncentracije etanola i glicerola poprimaju konstantne vrijednosti nakon 204 sata odnosno 8,5 dana.
4. Koncentracija svih viših alkohola i estera u sva tri tipa piva tijekom odležavanja ostaje približno konstantna. Ale kvasac nije sintetizirao 2-feniletanol niti 2-feniletetil-acetat. Etil-oktanoat nije registriran u Porter pivu, ali je detektiran u Pale ale pivu u iznosu od 0,19 mgL⁻¹ na kraju procesa odležavanja. U Pozoj pivu, etil-oktanoat je detektiran na početku odležavanja, a na kraju njegova koncentracija pada ispod granice detekcije analitičke metode.
5. U sva tri tipa ale piva koncentracije dobivenih estera (etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksanoata i etil-butirata) i viših alkohola (1-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metanol-1-butanola, 2-metil-1-butanola) su u očekivanim koncentracijama. Kvasac SafAle™ US-05 korišten za proizvodnju Pozoj i Pale ale piva je proizveo više etil-butirata, etil heksanoata od kvasca SafAle™ S-04 koji je korišten za proizvodnju Porter piva. Međutim, kvasac SafAle™ S-04 je tijekom odležavanja proizveo više viših alkohola i estera poput: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol i izomil-acetat. Ovakav različiti sastav nastalih lakohlapivih spojeva utječe na različiti profil arome i okusa proizvedenih tipova ale piva.

6. Pravilnim vođenjem procesa glavnog i naknadnog vrenja, osiguravanjem visoke metaboličke aktivnosti i korištenjem kvasca visoke aktivnosti i vitalnosti te održavanjem uvjeta za proces odležavanja kroz adekvatno vremensko razdoblje ale kvasci proizvode pivo visoke kvalitete u vremenskom razdoblju od 10 do 30 dana.

7. Skladištenjem piva u razdoblju u mjesec dana (30 dana) u hladnom skladištu pri 5 °C dobivene su vrijednosti koncentracija etanola, glicerola i fermentabilnih šećera koje odgovaraju vrijednostima zrelog piva dobivenog odležavanjem što upućuje da pivo ima biološku i koloidnu stabilnost.

6. LITERATURA

Anonymus 1 (2019) Blok shema procesa proizvodnje piva, <<https://www.slideserve.com/clay/karakteristike-pojedinih-biotehnolo-kih-procesa-pivo-vino>>. Pristupljeno 20. srpnja 2019.

Anonymus 2 (2019) Biokemijska reakcija nastajanja etanola, <https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/GLIKOLIZA.pdf>. Pristupljeno 21. srpnja 2019.

Boer, V. M., Tai, S. L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M. C., Piper, M. D., de Winde, J. H., Pronk, J. T., Daran, J. M. (2007) Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* **7**, 604-620.

Chang, Y. S., Dubin, R. A., Perkins, E., Michels, C. A., Needleman, R. B. (1989) Identification and characterization of the maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. Bacteriol.* **171**, 6148-6154.

Crumplen, R. M., Slaughter, J. C., Stewart, G. G. (1996) Characteristics of maltose transporter activity in an ale and large strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **231**, 448-452

Day, R. E., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Dawes I. W. (2002) Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast* **19**(12), 1015-1027.

Derrick, S., Large, P. J. (1993) Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2783-2792.

Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., Hewlins, M. J. (1997) A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 26871-26878.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Hewlins, M. J. (1998) An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 25751-25756.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., Hewlins, M. J. (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10937-10942.

- Dickinson, J. R., Salgado, L. E., Hewlins, M. J. (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 8028-8034.
- Driscoll, C. A., Macdonald, D. W., O'Brien, S. J. (2009) From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc. Natl. Acad.* **106**, 9971–9978.
- Fraenkel, D. G. (1982) Carbohydrate Metabolism. U: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: The Metabolism and Gene Expression (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R., ured.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 1–37.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K. J. (2016) Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* **166**(6), 1397-1410.
- Gilliland, R. B., B.Sc., F.R.I.C. (1961) *Brettanomyces*: I. Occurrence, characteristics and effects on beer flavour. *J. I. Brewing* **67**(3), 257-261.
- Hazelwood L. A., Daran, J., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(8), 2259-2266.
- Hu, Z., Yue, Y., Jiang, H., Zhang, B., Sherwood, P. W., Michels, C. A. (2000) Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of MAL gene expression in *Saccharomyces*. *Genetics* **154**, 121–132.
- Hughes, P. S., Baxter, E. D. (2001) Flavour Determinants of Beer Quality. U: Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects (Hughes, P. S., Baxter, E. D. ured.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 40-73.
- Jones, M., Pierce J. S. (1964) Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. I. Brewing* **70**, 307-315.
- Käppeli, O. (1986) Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **28**, 181-209.
- Klopper, W. J., Angelino, S. A. G. F., Tuning, B., Vermeire, H. A. (1986) Organic Acids and Glycerol in Beer. *J. I. Brewing* **92**, 225-228.
- Kühbeck, F., Dickel, T., Krottenthaler, M., Back, W., Mitzcherling, M., Delgado, A., Becker, T. (2005) Effects of Mashing Parameters on Mash β - Glucan, FAN and Soluble Extract Levels. *J. I. Brewing* **111**(3), 316-327.

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3-26.
- Maaheimo, H., Fiaux, J., Cakar, Z. P., Bailey, J. E., Sauer, U., Szyperski, T. (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* **26**(8), 2464-2479.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(42), 15611-15616.
- Marić, V. (2009) Tehnologija piva. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
- Marić, V., Nadvornik, Z. (1995) Pivo – tekuća hrana. Prehrambeno – tehnološki inženjering, Zagreb.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Turakainen, H., Korhola, M. (1996) Identification of the alpha-galactosidase MEL genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*: a new gene MEL11. *Genet. Res.* **67**(2), 101-108.
- Norbeck J. Pahlman A., Akhtar N., Blomberg A., Adler L. (1996) Purification and characterisation of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **3**, 13875-13881.
- Novak, S., Marić, V. (1995) Transport i regulacija metabolizma ugljikohidrata kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: I. Glukoza, fruktoza i manoza. *Kemija u industriji* **44**, 341-353.
- Nykänen L., Nykänen I. (1977) Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. I. Brewing* **83**(1), 30-31.
- Otter, G. E., Taylor, L. (1971) Estimation and Occurrence of Acetaldehyde in Beer. *J. I. Brewing* **77**, 467-472.
- Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., van Tuijl, A., de Vries, S., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2000) In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.* **182**, 2823-2830.

Palmer, J. J. (2006a) Chapter 14: How the mash works. **U: How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time** (Palmer J., ured.). Brewers publications, Boulder, str. 129-136.

Palmer J. J. (2006b) Chapter 21: Common off flavours. **U: How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time** (Palmer J., ured.). Brewers publications, Boulder, str. 212-219.

Parker D.K (2012) Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. **U: Alcoholic Beverages**, str. 133 -158, Woodhead Elsevier, Cambridge.

Passonneau, J. V., Lowry, O. H. (1962) Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**(1), 10-15.

Pavlečić M, Tepalović D, Ivančić Šantek M, Rezić T, Šantek B (2012) Utjecaj ukupne koncentracije kisika u boci na kakvoću piva tijekom skladištenja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**: 118-125.

Peddie, H. A. B. (1990) Ester formation in brewery fermentations. *J. I. Brewing* **96**, 327-331.

Phaweni, M., O'Connor-Cox, E. S. C, Pickerell, A. T. W., Axcell, B. (1992) The Effects of Glucose Adjunct in High Gravity Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* 2036. *J. I. Brewing* **98**(3), 179-185.

Pravilnik o pivu (2011) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Narodne novine* **142**, Zagreb.

Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006) Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. **U: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts** (Gábor, P., Rosa, C., ured.). Springer, Berlin/Heidelberg, str. 101-121.

Saerens, S. M., Duong, C. T., Nevoigt, E. (2010) Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1195–1212.

Schuster K, Weinfurtner F, Narzis L (1998) Tehnologija proizvodnje sladovine. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.

Shimatzu's Total Support for Beer Analysis (2015) Shimatzu Scientific Instruments, Maryland.

Stegnjaić, U. (2017) Usporedba pokazatelja kvalitete piva gornjeg i donjeg vrenja, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

- Thurston, P. A., Quain, D. E., Tubb, R. S. (1982) Lipid-metabolism and the regulation of volatile ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. I. Brewing* **88**, 90-94.
- Tonsmeire, M. (2014) *American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations*. 1. izdanje. Boulder, Brewers Publications.
- Veselov I.J, Čukmasova M.A (1966) *Tehnologija piva*. Poslovno udruženje industrije piva, Beograd.
- Vuralhan, Z., Luttik, M. A., Tai, S. L., Boer, V. M., Morais, M. A., Schipper, D., Almering, M. J., Kotter, P., Dickinson, J. R., Daran, J. M., Pronk, J. T. (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3276-3284.
- Wang, X., Bali, M., Medintz, I., Michels, C. A. (2002) Intracellular maltose is sufficient to induce MAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **1**, 696–703.
- White, C., Zainasheff, J. (2010) *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Publication, Boulder, Colorado.
- White, M. D., Payne, K. A. P., Fisher, K., Marshall, S. A., Parker, D., Rattray, N. J. W., Trivedi, D. K., Goodacre, R., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S. (2015) UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis. *Nature* **522**, 502–506.
- Zarnkow M. (2014.) *U: Beer*, Technische Universitat Munchen, Freising, Germany, str. 209-215.