

# PARAMETRI KVALITETE PIVA TIJEKOM FERMENTACIJE I DOZRIJEVANJA

---

**Milina, Adriana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:672978>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

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



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**  
**PIVARSTVO**

**ADRIANA MILINA**

**PARAMETRI KVALITETE PIVA TIJEKOM FERMENTACIJE**  
**I DOZRIJEVANJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2023.**



**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Pivarstvo

Adriana Milina

**Parametri kvalitete piva tijekom fermentacije i dozrijevanja**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić, v. pred.

Broj indeksa studenta: 0314617007

Karlovac, 20. rujan 2023.

## **IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA**

Ja, **Adriana Milina** ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **PARAMETRI KVALITETE PIVA TIJEKOM FERMENTACIJE I DOZRIJEVANJA** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

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

Karlovac, 20. rujan 2023.

Adriana Milina

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## PARAMETRI KVALITETE PIVA TIJEKOM FERMENTACIJE I DOZRIJEVANJA

*Adriana Milina*

Rad je izrađen na Veleučilištu u Karlovcu

Mentor: Dr.sc. Goran Šarić v. pred

### Sažetak

Proizvodnja modernih stilova ale piva je sve popularnija. Tokom proizvodnje ale-a (piva gornjeg vrenja) u stilu american pale ale i session india pale ale postoje razlike u regulaciji temperature i metodama rada tokom fermentacije. India pale ale stilovi uključuju i suho hmeljenje nakon primarnog procesa fermentacije, dok kod american pale ale-a mnoge pivovare ovaj postupak ne provode. Iz ovog razloga je provedena analiza procesa fermentacije te promjena koje de događaju tokom tog procesa kod ova dva stila piva. Uzorci su uzimani svaki dan od početka do kraja fermentacije. Uzimani su sa *pigtail* ventila te su praćeni određeni parametri poput broja stanica kvasca u otopini. Uređajem Anton Paar je mjereno stvarni ekstrakt, prividni ekstrakt i ekstrakt u osnovnoj sladovini, pH, boja, mutnoća, postotak alkohola te energija. Spektrofotometrom je mjerena gorčina. Analizom rezultata utvrđene su sličnosti u procesu fermentacije, ali i razlike između uzoraka uzetih u kasnijim fazama procesa, zbog različitih metoda rada.

**Broj stranica: 43**

**Broj slika: 23**

**Broj tablica: 9**

**Broj literaturnih navoda: 14**

**Broj priloga: -**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi:** Alkohol, ekstrakt, fermentacija, kvasac, pivo.

**Datum obrane:** 20. rujan 2023.

### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Jasna Halambek*, v. pred.
2. dr. sc. *Ines Cindrić*, prof. struč. stud.
3. dr. sc. *Goran Šarić*, v. pred
4. dr. sc. *Bojan Matijević* prof. struč. stud. (zamjena)

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

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional undergraduate study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### **PARAMETERS OF BEER QUALITY DURING FERMENTATION AND MATURATION**

*Adriana Milina*

**Final paper performed at Karlovac University of Applied Sciences**

**Supervisor:** Ph.D. *Goran Šarić*, sen. lecturer

#### **Abstract**

The production of modern styles of ale beer has become popular in recent times. During the production of an ale (top fermented beer) in the styles of american pale ale and session india pale ale, there are differences in temperature regulation and methods of production during fermentation, The production of an india pale ale includes dry-hopping after the primary fermentation, while many breweries don't apply this procedure for pale ales. For this reason, an analysis of the fermentation process and the changes which occur during that process has been performed. Samples have been taken daily from the start to the end of the fermentation. They have been taken from the *pigtail* valve and certain parameters like the number of cells were observed. Real extract, apparent extract, original extract, pH, color, haze, alcohol by volume and energy content were measured using an Anton Paar device. Bitterness was measured using a spectrofotometer. By analyzing the results some similarities were noticed in two fermentation processes, but also some differences in the later stages of the process, due tu different production methods.

**Number of pages: 43**

**Number of figures: 23**

**Number of tables: 9**

**Number of references: 14**

**Original in:** Croatian

**Key words:** Alcohol, beer, extract, fermentation,, yeast.

**Date of the final paper defense:** 20 September 2023

#### **Reviewers:**

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

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

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. OSNOVNO O PROIZVODNJI PIVA.....	2
2.2. KVASAC .....	3
2.2.1. Razmnožavanje kvasca .....	4
2.2.2. Metabolizam kvasca.....	6
2.2.3. Potrebe kvasca za provođenje uspješne fermentacije .....	8
2.3. FERMENTACIJA .....	11
2.3.1. Latentna (indukcijska) faza .....	11
2.3.2. Faza eksponencijalnog rasta.....	11
2.3.3. Stacionarna faza i faza opadanja .....	12
2.4. PROMJENE TIJEKOM FERMENTACIJE .....	13
2.4.1. Promjena pH.....	13
2.4.2. Promjena gorčine .....	13
2.4.3. Promjena boje .....	13
2.5. PRODUKTI FERMENTACIJE.....	14
2.5.1. Esteri .....	14
2.5.2. Viši alkoholi .....	14
2.5.3. Organske kiseline .....	15
2.5.4. Sumporni spojevi.....	15
2.5.5. Fenoli .....	15
2.5.6. Acetaldehid.....	15
2.5.7. Diacetil.....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. MATERIJALI .....	17
3.1.1. Analizirani uzorci .....	17
3.1.2. Oprema i kemikalije korištenje za brojanje kvasca .....	17
3.1.3. Oprema i kemikalije korištene za određivanje alkohola, ekstrakta, energije, mutnoće, pH i boje .....	18
3.1.4. Oprema i kemikalije korištene za određivanje gorčine .....	18
3.2. METODE RADA .....	20
3.2.1. Brojanje kvasca.....	20



3.2.2. Određivanje parametara piva pomoću Anton Paar analizatora .....	20
3.2.2.1 Razlike između prividnog ekstrakta, pravog ekstrakta i ekstrakta u osnovnoj sladovini.....	21
3.2.3. Određivanje gorčine spektrofotometrom koristeći izo oktan metodu .....	21
3.2.4. Prilagodbe temperature tokom fermentacije .....	22
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
4.1. REZULTATI BROJANJA KVASCA .....	23
4.2. REZULTATI MJERENJA UREĐAJEM ANTON PAAR I SPEKTROFOTOMETROM.....	25
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>41</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>42</b>

## 1. UVOD

Među alkoholnim pićima koja su najpopularnija u svijetu pivo se nalazi pri samome vrhu. Rasprostranjeno je po cijelom svijetu, a zadnjih godina se vidi i značajan porast zanatskih pivovara. Samo u Hrvatskoj u zadnjih 10-ak godina otvoreno ih je već blizu stotinu i može se očekivati da će broj nastaviti rasti kako u Hrvatskoj tako i u svijetu. Dok je još nedavno najpopularniji stil piva bio relativno čist i aromatično slabije izražajan lager (pivo donjeg vrenja), danas se vidi porast popularnosti ale piva (pivo gornjeg vrenja) koje krasi veća aromatičnost i bogatstvo okusa. Kultura ispijanja piva je u porastu i u zemljama koje su tradicionalno više orijentirane na vina te druge alkoholne proizvode.

Kao i kod većine alkoholnih pića, kod piva glavnu ulogu u njegovoj proizvodnji igra kvasac. Osim kvasca, bitne su i ostale sirovine. Voda, slad, neslađene žitarice te hmelj značajni su u oblikovanju arome i stvaranja hranjive podloge za kvasac. Ipak, kvasac je taj koji omogućuje dobivanje finalnog proizvoda pretvaranjem jednostavnih molekula iz sladovine u veliki spektar drugih spojeva. Kvasac je mikroskopska gljiva koja hranjivu podlogu pretvara u pivo koristeći ugljikohidrate i ostale sastojke sladovine te aerobnim i anaerobnim staničnim disanjem proizvodeći alkohol te niz drugih spojeva koji će kasnije biti zaslužni za aromu i organoleptička svojstva piva. Iz ovog razloga možemo reći da je kvasac pivarev najbitniji partner.

Cilj ovog rada je usporediti dva moderna stila piva dobivena fermentacijom ale kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) - american pale ale-a i session india pale ale-a. Za to je bilo potrebno pratiti parametre i promjene tijekom fermentacije brojeći stanice kvasca u suspenziji, mjerenjem ekstrakta, pH i promjene u gorčini te time dobiti bolji uvid u procese kroz koje prolazi kvasac i pivo tokom fermentacije od sladovine do gotovog proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OSNOVNO O PROIZVODNJI PIVA

Osnovni i najbitniji dijelovi pivovare su varionica, sustavi hlađenja, sustavi za punjenje i pakiranje proizvoda te spremnici u kojima će se vršiti sama fermentacija i odležavanje. U moderno doba su to najčešće cilindrično konusni fermentori. Osim toga koriste se i razne metode filtriranja, centrifugiranja i bistrenja. Proizvodni pogoni najčešće imaju i laboratorije za analizu proizvoda, metode i sustave za propagaciju kvasca, čišćenje pogona i sl.

Za proizvodnju piva potrebni su hmelj za aromu, voda i kvasac te sirovine poput slađenih ili neslađenih žitarica čiji će topivi sastojci ostati u hranjivoj podlozi za kvasce. Taj osnovni supstrat za naciepljivanje kvasca u pivovari je sladovina. Sladovina se može proizvoditi od slađenih i neslađenih žitarica dok je osnova velike većine piva ječmeni slad.

Proizvodnja sladovine započinje procesom ukomljavanja. Najčešće korišteni procesi su infuzijski i dekokcijski. Tokom ukomljavanja komina se drži na određenim temperaturama za djelovanje proteolitičkih enzima za razgradnju proteina, zatim na temperaturama pogodnim za likvefakciju kojom se pomoću enzima  $\alpha$ -amilaze smanjuje viskoznost komine te šećerenje tokom kojeg se pomoću enzima  $\beta$ -amilaze cijepaju dekstrini na glukozu, maltozu i maltotriozu. Različiti postupci ukomljavanja omogućuju različiti udio fermentabilnih šećera i dekstrina. Što je više dekstrina to je niži stupanj prevrelosti sladovine (pivo sa nižim udjelom alkohola), dok veći udjel jednostavnijih, fermentabilnih šećera daje pivo sa većim udjelom alkohola. (Palmer, 2006) Sladovina se cijedi kroz cijednjak te se potom tokom kuhanja odvija otapanje i izomerizacija hmeljnih sastojaka, nastajanje i taloženje proteinsko-taninskih spojeva, sterilizacija sladovine, isparavanje, uništavanje enzima, povećanje kiselosti, nastajanje reducirajućih spojeva i isparavanje nepoželjnih spojeva arome. Nakon kuhanja, u taložnjaku se odvaja većina toplog taloga, a potom se sladovina hladi u izmjenjivaču topline pomoću hladne vode i nekog rashladnog sredstva (npr. glikola) te se prebacuje u fermentor. U tom trenu sladovina je spremna postati hranjiva podloga na koju će se naciepiti kvasac.

Nakon što je kvasac naciepljen počinje proces fermentacije. Kada završi primarna fermentacija provodi se proces odležavanja koji omogućuje gaziranje piva, dodatno taloženje suspendiranih čestica te uklanjanje nepoželjnih elemenata arome. Kada je odležavanje gotovo pivo se pakira

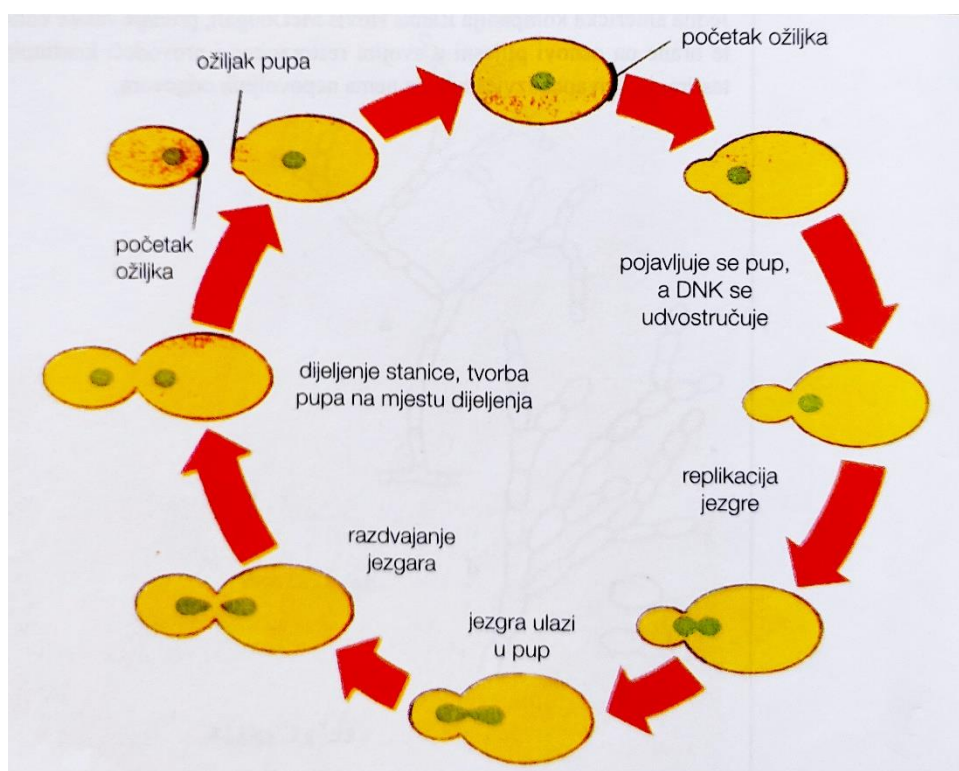
u željenu ambalažu. Prije pakiranja je moguće provesti razne postupke bistrenja, centrifugiranja, pasterizacije ili filtracije da bi se dobio stabilniji i bistriji proizvod koji će biti poželjniji na tržištu.

## 2.2. KVASAC

Kvasci su jednostanične mikroskopske nemicelijske gljive. Morfološki gledano, kvasci su kudikamo jednostavniji od građe drugih mikroskopskih gljiva kao što su plijesni. Usprkos tome što ne proizvode micelij, neki rodovi kvasca u tijeku rasta u specifičnim uvjetima ipak proizvode tvorevine koje su izgledom slične miceliju i nazivaju se *pseudomiceliji*. Stanice kvasca su kugličaste, elipsoidne ili izdužene, te je promjer 5-8 mikrometara. Osnovni tip stanice naziva se blastospora, a kvasci su fakultativni anaerobi. Imaju sposobnost da kao konačni akceptor elektrona upotrijebe kisik, ali i neki drugi organski spoj. Kada kvasci raspoložu dovoljnom količinom kisika, u hranjivoj podlozi u kojoj rastu, dolazi do aerobnih procesa staničnog disanja koji rezultiraju razgradnjom ugljikohidrata te proizvodnjom ugljičnog dioksida, vode i energije. Ako je udio šećera veći od 0.2 g/L može doći do pojave “Crabtree efekta” tokom kojeg kvasac istovremeno provodi i aeroban i anaeroban proces staničnog disanja te usprkos prisustva kisika proizvodi i alkohol (Zandycke, 2023). Uslijed pomanjkanja kisika dolazi do alkoholnog vrenja tokom kojeg se vrši fermentacija ugljikohidrata i dolazi do stvaranja etanola i ugljičnog dioksida. Iz ovog razloga kvasci su od interesa prehrambenim industrijama koje se bave proizvodnjom piva, vina te kruha. Pogotovo vrste iz roda *Saccharomyces* (Duraković i Redžepović, 2002).

### 2.2.1. Razmnožavanje kvasca

Blastospora se razmnožava nespolnim putem, pupanjem pri čemu na njoj izrasta pup koji raste dok ne dostigne veličinu osnovne stanice te se potom otkida. Tokom rasta pupa jezgra roditeljske stanice se dijeli i jedna od jezgri odlazi u pup. Stanični materijal se dijeli između novonastale i roditeljske stanice, a nakon odvajanja na roditeljskoj stanici, na mjestu otkidanja pupa, ostaje okrugli ožiljak.



**Slika 1.** Nespolno razmnožavanje kvasca pupanjem (Izvor: Duraković S., Redžepović S. (2002.): Uvod u Opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb).

Pregled rodova kvasca koji su podrijetlom iz namirnica:

Razdjel: Ascomycotina

Obitelj: *Saccharomycetaceae*

Podobitelj: *Nadsonioideae*

Rod: *Debaryomyces*

*Issatchenkia*

*Kluyveromyces*

*Pichia*

*Saccharomyces*

*Torulaspota*

*Zygosaccharomyces*

Podobitelj: *Schizosaccharomycetoideae*

Rod: *Schizosaccharomyces*

Razdjel: *Deuteromycotina*

Obitelj: *Cryptococcaceae*

Rod: *Brettanomyces*

*Candida*

*Cryptococcus*

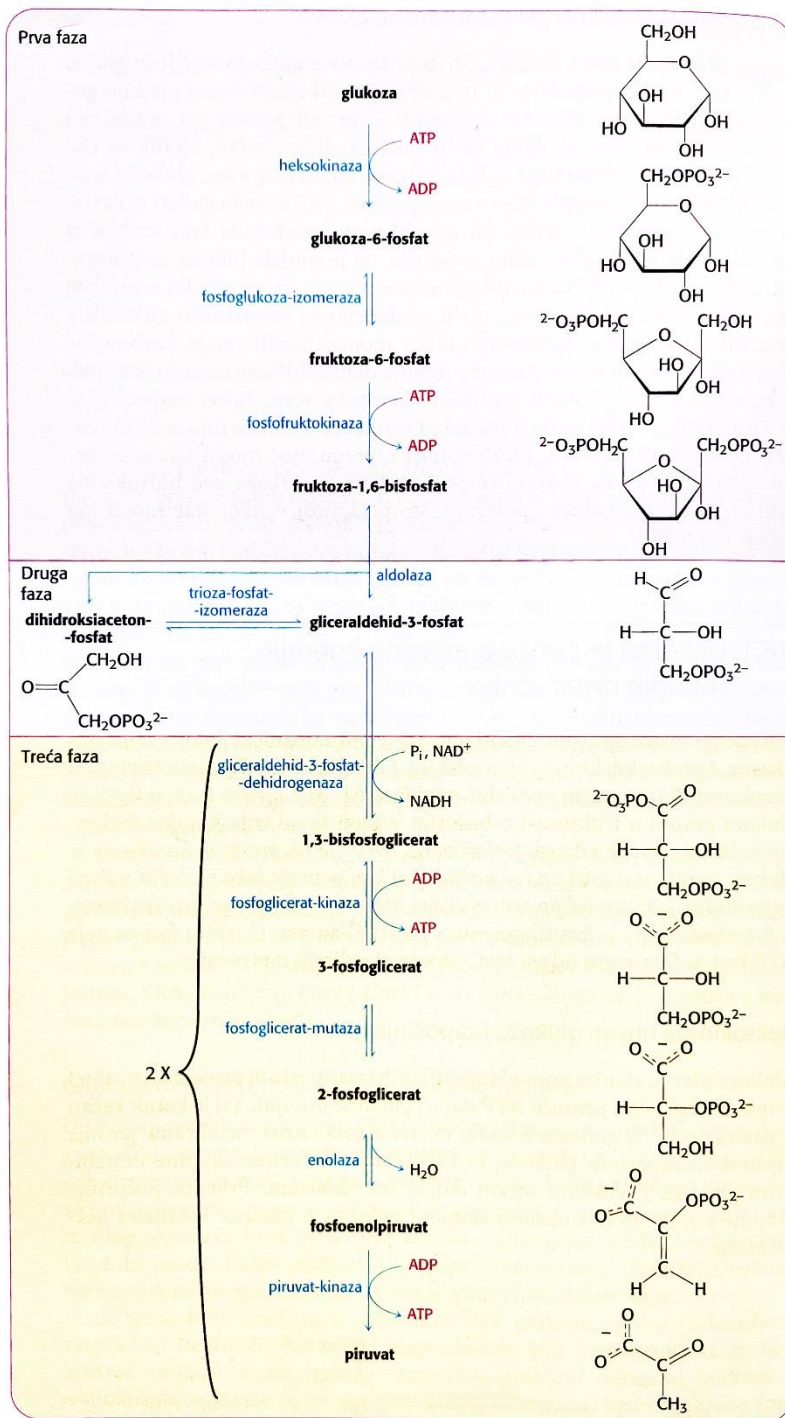
*Rhodotorula*

*Trichosporon*

Rod koji se koristi u proizvodnji pekarskih, vinskih i pivskih proizvoda je *Saccharomyces*. A najčešće se radi o *Saccharomyces cerevisiae* (Duraković i Redžepović, 2002).

### **2.2.2. Metabolizam kvasca**

Nakon što je kvasac inokuliran u sladovinu prvo koristi svoje rezerve glikogena. Koristeći rezerve glikogena kvasac se navikava na novu sredinu te zapravo revitalizira stanične membrane i priprema ih za optimalno iskorištavanje i apsorpiranje nutrijenata iz sladovine. Stanice prvo kreću sa apsorpcijom kisika, a potom šećera i drugih hranjivih sastojaka. Kvasac rapidno troši kisik koji mu služi za izgradnju sterola potrebnih za izgradnju staničnih membrana. Kvasac prvo koristi jednostavnije šećere poput glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze, a potom i maltotrioze. Kisik se također koristi tokom aerobnog procesa staničnog disanja koje kvascima omogućuje dostatnu količinu energije tokom dijeljenja stanica, rasta i razvoja (White i Zainasheff, 2010). Proces aerobnog staničnog disanja započinje glikolizom u citoplazmi, zatim Krebsovim ciklusom u mitohondriju te završava oksidativnom fosforilacijom koja se odvija na membrani mitohondrija i rezultira proizvodnjom 36 ATP molekula (Stryer i sur. 2013).



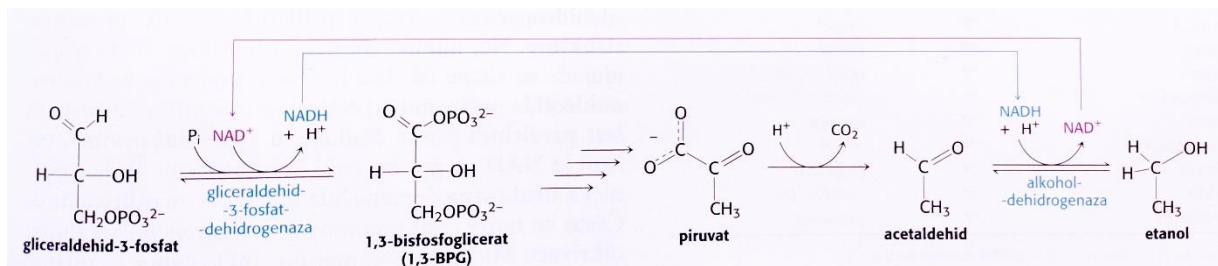
**Slika 2.** Proces glikolize sa svim koracima.

(izvor: Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. (2013.): Biokemija, Školska Knjiga, Zagreb)

Anaerobno stanično disanje započinje kada kvasac potroši zalihe kisika u sladovini. Ovaj proces je poznat pod nazivom alkoholna fermentacija. Svrha alkoholne fermentacije je da kvasac nastavi proizvoditi energiju usprkos toga što kisik više nije na raspolaganju. Alkoholna fermentacija se provodi na način da proces glikolize ostaje isti, ali piruvat ne ulazi u mitohondrij



nego se pomoću *piruvat dekarboksilaze* pretvara u acetaldehid te pomoću *alkohol dehidrogenaze* u etanol. Etanol je otrov za kvasac pa ga on nakon sinteze izlučuje iz stanice. Ipak, kvasac stvara etanol jer alkoholnom fermentacijom uspijeva regenerirati  $\text{NAD}^+$  (Stryer i sur. 2013).  $\text{NADH}$  u svom reduciranom stanju nije u mogućnosti sudjelovati u daljnjem tijeku procesa glikolize koji je ključan za stvaranje energije koju kvasac koristi za svoje biokemijske puteve. Vodik, tokom alkoholne fermentacije, sa  $\text{NADH}$  prelazi na acetaldehid koji, uz još jedan slobodan vodik, postaje etanol. Ovaj postupak je puno manje učinkovit od aerobne respiracije, ali i dalje generira 2 ATP molekule tokom glikolize. Nakon nekog vremena postotak alkohola počinje štetiti kvascu te ga to dodatno oslabljuje. Iz ovog razloga je imati kvasac koji je u dobrom stanju i visoke vitalnosti ključno za uspješnu fermentaciju. Što je kvasac vitalniji, bolje će podnijeti vlastite otrove koje proizvodi kao nusprodukt biokemijskih puteva stvaranja energije (White i Zainasheff, 2010).



**Slika 3.** Alkoholna fermentacija te povezanost glikolize sa fermentacijom preko iskorištavanja reduciranog oblika  $\text{NADH}$  za fermentaciju i regeneriranog oblika  $\text{NAD}^+$  za daljnje odvijanje treće faze glikolize.

(izvor: Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. (2013.): Biokemija, Školska Knjiga, Zagreb)

### 2.2.3. Potrebe kvasca za provođenje uspješne fermentacije

Sladovina dobivena od slada ima sve potrebne sastojke za optimalan rast i razvoj kvasca osim kisika i u nekim slučajevima cinka (npr. kada se umjesto ječmenog slada koriste neslađene žitarice ili proizvodi od šećera). Glavni izvor energije koji kvasac koristi su ugljikohidrati. To su spojevi koji se nalaze u prirodi, a sadrže jednu ili više ( $-\text{OH}$ ) skupina i svrstavaju se u *aldehyde* ili *ketone*. Također se može raditi i o tvarima koje hidrolizom daju takve *polihidroksilne aldehyde* ili *polihidroksilne ketone* (Amić, 2008). Za kvasac su od interesa krajnji produkti hidrolize škroba, tj. fermentabilni šećeri poput onih koji sadrže jednu saharidnu jedinicu poput glukoze, fruktoze, manoze i galaktoze. Disaharidi sadrže dvije monosaharidne jedinice poput maltoze i saharoze te trisaharidi, odnosno oligosaharidi poput rafinoze i

maltotrioze. Neki kvasci koji se koriste u proizvodnji tradicionalnih belgijskih stilova piva, poput saisona, imaju sposobnost razgradnje i dekstrina zbog posebnih mutacija na genima, ali oni se smatraju iznimkom (Krogerus i Gibson, 2020). Mutacija (STA1) gena omogućuje da kvasci proizvode izvanstanični enzim koji razgrađuje oligosaharide (Krogerus i sur, 2019). Aminokiseline i amonijeve soli iz sladovine su izvor dušika za kvasce. Aminokiseline su karboksilne kiseline koje sadrže *amino* (-NH<sub>2</sub>) funkcijsku skupinu. U sladovini ima najviše aminokiseline prolin, ali ovu aminokiselinu kvasac ne može iskoristiti. Kvasac najbrže iskoristi aminokiseline tako da provodi transaminaciju. Tokom transaminacije  $\alpha$ -amino-skupina se prenosi sa  $\alpha$ -aminokiseline na  $\alpha$ -ketokiselinu te se na taj način dobiva željena aminokiselina (Stryer i sur. 2013). To je razlog zbog kojeg kvasci ne mogu iskoristiti prolin, jer je njegova amino skupina u prstenu, vezana za dva ugljika te se proces transaminacije ne može provesti (White i Zainasheff, 2010).

Nužni minerali su kalij, željezo, magnezij, mangan, cink, bakar fosfor, kalcij i mnogi drugi elementi u tragovima. U biokemijskim reakcijama u kojima sudjeluju enzimi, pojedini minerali imaju funkciju kofaktora. Kalcij je potreban za dobru flokulaciju kvasca. Fosfor je potreban za sintezu DNA, a također se nalazi i u fosforolipidnom dvosloju stanične membrane te čini 3 do 5 % težine sušenih stanica kvasca. Magnezij omogućuje veću otpornost stanice na etanol, a također je ključan u biokemijskim putevima razgradnje šećera. Biotin je jedan od najpotrebnijih vitamina jer je uključen u većinu enzimatskih reakcija koje omogućuju stvaranje ključnih sastojaka poput proteina, DNA, ugljikohidrata i masnih kiselina. Cink je kofaktor alkohol dehidrogenaze, nužan je za reprodukciju stanica te ga je potrebno 0.1 do 0.15 miligrama po litri. Bez biotina rast kvasaca je usporen i fermentacija teče sporije. Vitamini B kompleksa: pantotenska kiselina, nikotinska kiselina, tiamin i piridoksin služe kao kofaktori enzimske aktivnosti.

Temperatura je također bitan čimbenik u rastu i razvoju kvasca. Postoje razlike u temperaturi fermentacije za ale i lager kvasce. Najučinkovitiji način provođenja uspješne fermentacije je praćenje uputa proizvođača kvasca za odabir prikladne temperature za fermentaciju određenog soja koji se koristi. Potrebno je voditi računa i o činjenici da se toplina oslobađa tijekom metabolizma šećera. U slučaju da se temperatura tokom fermentacije ne kontrolira može doći do nepoželjne mutacije kvasaca, razvoja negativnih komponenata arome ili umiranja stanica. Poželjno je da je tokom inokulacije kvasca temperatura za 2°C niža od željene temperature na kojoj će kvasac vršiti fermentaciju. Nakon inokulacije se pušta rast temperature na željenu kroz 18 do 36h. Ale kvasci okvirno fermentiraju na oko 20°C dok su za lager kvasce poželjne niže

temperature oko 10°C. Nakon što temperatura poraste do željene, na toj temperaturi se zadržava sve dok kvasac ne provede bar jednu četvrtinu do jednu trećinu fermentacije, što se može pratiti mjerenjem udjela zaostalog ekstrakta. Tada je manja opasnost od proizvodnje nepoželjnih komponenata arome te se temperatura može povisiti za dodatnih dva do četiri stupnja kroz sljedeća dva dana da bi se fermentacija uspješno provela do kraja. Nakon toga se temperatura spušta i kreće razdoblje odležavanja.

Kisik je potreban za aerobno stanično disanje koje omogućuje dovoljno energije za sve metaboličke procese. Razgradnja glukoze i dobivanje energije se vrši procesima glikolize, Krebsovog ciklusa te oksidativne fosforilacije za koju je kisik potreban. Kisik se također koristi za izgradnju stanica kvasca tako što izgrađuje sterole koji služe u izgradnji staničnih membrana. Prosječna potreba za kisikom je oko 8 do 10 mg/L (White i Zainasheff, 2010).

## **2.3. FERMENTACIJA**

Nakon naciepljivanja kvasca u sladovinu, on prolazi kroz nekoliko faza tokom kojih se odvijaju različiti procesi bitni za dobivanje konačnog proizvoda. Ove faze nisu strogo odijeljene već se preklapaju. Okvirno se može reći da latentna tzv. “lag” faza traje od početka do prvih 15h nakon inokulacije, faza eksponencijalnog rasta traje od jedan do četiri dana, a stacionarna faza od tri do deset dana.

### **2.3.1. Latentna (indukcijska) faza**

U ovoj fazi dolazi do aktivacije metabolizma. Faza vremenski varira i završava prvim dijeljenjem stanice. Kvasac tokom ove faze počinje uzimati kisik, minerale i aminokiseline iz sladovine. Iako nije vidljiva nikakva aktivnost, kvasac u ovoj fazi gradi proteine. Kisik je potreban kako bi stanice kvasca stvorile sterole, potrebne za izgradnju staničnih membrana. Bitno je točno odrediti koncentraciju i količinu stanica za inokulaciju. Previše stanica rezultira time da je latentna faza kraća, ali je stanica previše i neće biti dobre vitalnosti pri kraju fermentacije. Ako se pak inokulira premali broj stanica proces fermentacije bi mogao biti sporiji i rezultirati kvascem koji je u lošem stanju (White i Zainasheff, 2010).

### **2.3.2. Faza eksponencijalnog rasta**

Nakon latentne faze dolazi do faze akceleracije umnožavanja stanica kvasca. Na kraju dolazi do logaritamskog rasta. Zato se ova faza i naziva faza logaritamskog rasta, skraćeno “log” faza. Kvasac je u ovoj fazi najvitalniji te je stopa rasta maksimalna. To znači da je vrijeme tokom kojeg se broj stanica udvostruči minimalno tijekom ove faze. Tokom ove faze se proizvodi etanol i komponente arome i okusa. Također, tokom ove faze dolazi do opadanja udjela kisika u sladovini kao posljedica izgradnje staničnih membrana i aerobnih procesa staničnog disanja. Kod sladovina koje imaju veći udio šećera dolazi do pojave “Crabtree efekta” odnosno, stvaranja alkohola usprkos tome što je kisik još prisutan u sladovini. Ovaj proces se odvija ako je udio šećera veći od 0.2 g/L. Proizvodi se ugljični dioksid, a površinu mladog piva prekriva bogata pijena sa brazdama i smeđim kapama.

### 2.3.3. Stacionarna faza i faza opadanja

Ova faza započinje fazom deceleracije, odnosno usporavanja. Kvasac je potrošio kisik i dio hranjivih tvari te se zbog toga, kao i zbog porasta količine tvari koje inhibiraju njegov metabolizam usporava njegov rast. U stacionarnoj fazi broj novostvorenih stanica je izjednačen sa brojem umrlih stanica tako da broj stanica kvasaca ostaje konstantan. U ovoj fazi dobiva se „mlado/zeleno pivo“ koje je proizvelo većinu komponenata arome i okusa. Ovo pivo nije još postiglo zadovoljavajući balans okusa. U ovoj fazi dozrijevanja kvasac reapsorbira većinu diacetila, pretvara acetaldehid u etanol, a spojevi sa sumporom hlape kroz vrenjaču. Bogata pjena na površini mladog piva opada i počinje flokulacija kvasca.

Odležavanje bi trebalo provesti najmanje sedam dana da kvasac uspije ukloniti neželjene komponente arome, odnosno svesti ih na minimum. Temperatura se na kraju spušta da bi se postiglo što bolje taloženje čestica te da bi se ugljični dioksid što bolje otopio u pivu.

Faza opadanja je period tokom kojeg se broj stanica kvasca smanjuje. Veći je broj umrlih nego što je novonastalih stanica. Hranjive tvari su iscrpljene, a ugljični dioksid i alkohol na kvasce djeluju kao otrovi. U pivo se sve više otpušta proteinaza A (enzim koji ima negativan utjecaj na stabilnost pjene) te se kvasci počinju autolizirati. Iz ovog razloga je kvasac potrebno ukloniti iz piva.

## **2.4. PROMJENE TIJEKOM FERMENTACIJE**

Proces fermentacije obilježen je mnoštvom promjena koje od sladovine čine gotov proizvod, pivo. Glavne razlike se vide u udjelu ekstrakta i alkohola zbog sposobnosti kvasca da provodi alkoholnu fermentaciju. Dolazi i do blagih promjena u boji, gorčini, pH i drugim parametrima. Također, tokom metabolizma kvasac stvara mnoge druge spojeve koji utječu na svojstva finalnog proizvoda te na njegovu organoleptičku kvalitetu.

### **2.4.1. Promjena pH**

Tokom fermentacije dolazi do pada pH. Pad je rapidniji na samom početku fermentacije, a kasnije se usporava. Značajni čimbenici pada pH su povezani sa činjenicom da kvasac apsorbira bazične aminokiseline i amonijeve ione te oslobađa organske kiseline i ugljični dioksid tokom procesa fermentacije (Coote i Kirsop, 1976).

### **2.4.2. Promjena gorčine**

Tijekom procesa fermentacije također dolazi i do opadanja percipirane gorčine. Glavni razlog je opadanje koncentracije iso- $\alpha$ -kiselina uslijed njihove adsorpcije na površini stanica kvasca. Dio se gubi i preko pjene te sama percepcija gorčine opada opadanjem pH. Kod piva kojima je značajan dio hmelja dodan na samom kraju kuhanja dolazi do većeg opadanja gorčine. Glavno opadanje gorčine se pojavljuje na samom početku fermentacije, a nakon što prođe prvih dva do tri dana fermentacije ona se stabilizira. Dodavanje suhog hmelja utječe na povišenje jedinica gorčine IBU te i na samu percepciju gorčine (Klimczaki i Cioch-Skoneczny, 2022).

### **2.4.3. Promjena boje**

Promjena boje se odvija uslijed promjene pH tokom fermentacije. Kako se mijenja pH neke komponente piva koje mu daju boju pri nižim pH vrijednostima mijenjaju ili gube svoja svojstva te reflektiraju različite valne duljine svjetla što rezultira i različitom percepcijom nijanse (Bible, 2007).

## **2.5. PRODUKTI FERMENTACIJE**

Kvasac tokom fermentacije proizvodi veliki raspon spojeva koji kasnije utječu na organoleptička svojstva piva. Tokom početka fermentacije i eksponencijalne faze kvasac proizvodi aminokiseline, proteine i druge spojeve koji čine građevne komponente stanice. Većina ovih spojeva neće utjecati na okus, ali metabolički putevi koji se odvijaju tokom stvaranja istih rezultiraju i stvaranjem mnogih drugih spojeva koji utječu na kasniju aromu piva. Najznačajniji spojevi su esteri, viši alkoholi koji daju intenzivniji miris koji može podsjećati i na razrjeđivač, spojevi koji sadrže sumpor te karbonilni spojevi kao što su acetaldehid i ketoni poput diacetila. Mnogi od ovih spojeva imaju pozitivnu ulogu u organoleptičkom doživljaju piva, no ipak nužno je da ne prelaze gornju dopuštenu granicu prihvatljivosti jer nakon toga postaju očito osjetni i smanjuju kvalitetu proizvoda (White i Zainasheff, 2010).

### **2.5.1. Esteri**

Esteri nastaju reakcijom organske kiseline s alkoholom. Esterska skupina sastoji se od karbonilne skupine i kisika povezanih jednostrukom vezom između C-atoma koja povezuje kiselinski dio i alkoholni dio estera, a zove se esterska veza. Esterske kiseline sa manjim brojem ugljikovih atoma nalaze se u cvijeću i voću te su ugodnog mirisa (Amić, 2008).

Iz ovog razloga se tokom organoleptičkih procjena piva arome voća i cvjetne arome redovito pripisuju esterima. Stvaranje estera značajnije je za aromatična piva gornjeg vrenja. Svako pivo sadrži određenu količinu estera.

### **2.5.2. Viši alkoholi**

Viši alkoholi poput izobutanola ili izoamil-alkohola imaju sličan okus kao etanol, ali mogu dati dodatni osjećaj topline ili čak aromu razrjeđivača tokom ispijanja piva. Ovi doživljaji značajno ovise o koncentraciji tih spojeva. Male koncentracije mogu poboljšati aromu dok prevelike mogu značajno naštetiti kvaliteti finalnog proizvoda. Povišenjem temperature fermentacije se povećava i mogućnost razvoja viših alkohola (White i Zainasheff, 2010).

### **2.5.3. Organske kiseline**

Tokom fermentacije kvasac proizvodi organske kiseline. Ovi spojevi su od značaja u proizvodnji piva jer omogućuju formiranje estera. Ipak, poželjno je da ih nema previše jer su neugodnog okusa (White i Zainasheff, 2010).

### **2.5.4. Sumporni spojevi**

Sumporni spojevi su još jedan od produkata fermentacije. Ipak, hlapljivost ovih spojeva omogućuje da se daljnjim procesom fermentacije uklone do te razine da su organoleptički neprimjetni. Kod piva gornje fermentacije je uklanjanje sumpora potpunije nego kod piva donje fermentacije. Ovo možemo pripisati intenzitetu fermentacije te temperaturi. Intenzivno stvaranje i oslobađanje ugljičnog dioksida potpomaže ovim hlapljivim spojevima da se uklone iz proizvoda.

Najčešći spojevi su dimetil-sulfid (DMS), sumporov dioksid, sumporovodik i merkaptani. Neki od ovih spojeva dolaze iz slada, a neki su produkt metaboličkih reakcija kvasca (White i Zainasheff, 2010).

### **2.5.5. Fenoli**

Spojevi kojima je hidroksilna skupina vezana za aromatski prsten (Amić, 2008). Ovi spojevi se mogu naći u pivu iz sastojaka ili kao produkt fermentacije. Arome fenola se često asociraju sa medicinskim mirisom, mirisom flastera i začinicima. U većini stilova fenoli su nepoželjna komponenta piva, ipak kod nekih belgijskih stilova se određena količina tolerira te je čak i poželjna.

### **2.5.6. Acetaldehid**

Acetaldehid je međuprodukt fermentacije. Nastaje kada piruvat prelazi u etanol. Pivu daje specifičnu aromu zelene jabuke te je česti pokazatelj da je pivo kratko odležavano te je ubrzan sam proces fermentacije. Ako se proces odvija prema pravilima struke i kvasac je dobre vitalnosti acetaldehid bi trebao biti metaboliziran u etanol. Primjetna aroma zelene jabuke može sugerirati probleme tokom procesa fermentacije ili nedostatke kod korištenog kvasca.



Nedostatak cinka ili prisutnost kisika tokom kasnijih faza fermentacije mogu također utjecati na prisutnost acetaldehida (Hammond, 1993).

### **2.5.7. Diacetil**

Aroma maslaca se redovito povezuje sa prisutnošću diacetila u pivu. U nekim stilovima je ova aroma poželjna, ali u većini slučajeva se gleda kao mana. Diacetil je spoj koji pripada ketonima. Diacetil je vicinalni diketon poput 2,3-pentadiona koji je zaslužan za aromu sličnu medu. Kada je kvasac inokulira u sladovinu kreće sa fazom prilagodbe te ubrzo zatim u proizvodnju aminokiselina i ostalih staničnih struktura. Tokom proizvodnje aminokiselina proizvodi i aminokiselinu valin. Prekursor ove aminokiseline je  $\alpha$ -acetolaktat. Dio  $\alpha$ -acetolaktata ne postaje valin već izlazi iz stanice te postaje vicinalni diketon, odnosno diacetil. Ako u sladovini nema dovoljno slobodnih aminokiselina kvasac će nastojati proizvesti više aminokiselina te posljedično i više  $\alpha$ -acetolaktata i rezultat toga će biti i veća šansa za stvaranje diacetila. Kako se fermentacija usporava i kvasac ulazi u stacionarnu fazu diacetil ponovno ulazi u stanicu kvasca u kojoj se pretvara u acetoin te posljedično u 2,3-butandiol. Prag osjetljivosti na ove spojeve je puno veći nego kod diacetila pa se oni ne smatraju štetnima za organoleptička svojstva piva (Anonymus, 2022).

Prag tolerancije diacetila u finalnom proizvodu je 0.1 mg/L. Snižavanje temperature prerano tokom fermentacije može rezultirati smanjenim uklanjanjem diacetila iz piva (Hammond, 1993).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Analizirani uzorci**

- Uzorak A: American Pale Ale (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Uzorak B: Session India Pale Ale (*Saccharomyces cerevisiae*).

##### **3.1.2. Oprema i kemikalije korištenje za brojanje kvasca**

###### Oprema:

- Mikroskop (Carl Zeiss Jena, 220/6 V)
- Pipeta
- Boca štrcaljka
- Thomaova komorica (W. Schreck, Hofheim/TS)
- Pokrovnica (TLOS d. d.)
- Odmjerna tikvica 100 mL
- Magnetska miješalica
- Magnet za miješanje uzorka

###### Kemikalije:

- Metilensko modriilo 1%-tna otopina u vodi (T.T.T. d.o.o.)
- Destilirana voda (H<sub>2</sub>O)

### **3.1.3. Oprema i kemikalije korištene za određivanje alkohola, ekstrakta, energije, mutnoće, pH i boje**

#### Oprema:

- Anton Paar analizator (*Alcolyzer*)
- Lijevak
- Erlenmayerova tikvica
- Žlica
- Čaša
- Laboratorijska boca
- Viale za analizator

#### Kemikalije i potrošni materijal:

- Filtar papir
- Diatomejska zemlja
- Destilirana voda (H<sub>2</sub>O)

### **3.1.4. Oprema i kemikalije korištene za određivanje gorčine**

#### Oprema:

- UV-1280 višenamjenski UV-Vidljivi spektrofotometar (Shimadzu)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich)
- Kivete za centrifugu
- Pipeta 10 mL
- Gumena propipeta
- Graduirana tikvica
- Menzura
- Klipna pipeta
- Kvarcna kiveta

Kemikalije:

- Izo-oktan za UV spektroskopiju (2,2,4-Trimethylpentane, Macron fine chemicals)
- 1-Oktanol ( $C_8H_{18}O$ )
- 6M klorovodična kiselina (HCl)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Brojanje kvasca

*Pigtail* ventil se nalazi iznad konusa fermentora i služi za uzimanje uzoraka piva. Iz ovog ventila se uzima uzorak iz kojeg se broji broj stanica kvasca koji se u nekom trenu fermentacije nalazi u suspenziji. Broj slobodno plutajućih stanica u suspenziji je dovoljno nizak da je jedno razrjeđivanje dovoljno što nije slučaj ako se uzorak uzima sa potpunog ventila zbog taloženja stanica na dnu konusa fermentora. Pipetom se prebacuje 1 mL uzorka u odmjernu tikvicu od 100 mL. Ona se dopunjava destiliranom vodom do crte te se dodaje tri kapi metilenskog modrila. Tikvica se stavlja na magnetsku miješalicu i ostavlja tri minute. Pipetom se iz sredine tikvice uzima uzorak te se kapljica stavlja na Thomaovu komoricu i pokriva pokrovnicom. Komorica se stavlja na mikroskop sa uvećanjem 400 puta. Na komorici je iscrtano 16 kvadrata unutar kojih su manji kvadrati. Od 16 kvadrata kvasac se broji u pet kvadrata. Izbroje se mrtve stanice koje su obojane plavo, žive stanice koje su bez obojenja te stanice koje se dijele. Stanice tokom dijeljenja znaju imati plavo obojenje poput mrtvih, ali je to normalna pojava tokom dijeljenja pa se računaju pod žive. Ako je stanica kćer manja od stanice majke, računa se samo stanica majka. Neke pivovare ne primjenjuju ovo pravilo nego broje i stanicu kćer bez obzira na veličinu. Uzorak se sa miješalice pipetom uzima pet puta i svaki puta se broji po pet (od 16) kvadrata. Između svakog uzorkovanja se pokrovnica i komorica ispiru destiliranom vodom iz boce štrcaljke. Nakon svakog ispiranja se komorica posuši. Ako se komorica ne posuši, kvasci ne stoje unutar kvadrata nego se miču što onemogućava brojanje. Kasnije se zbroje svi dobiveni rezultati te se izračunava broj stanica u mililitru tekućine prema navedenoj formuli.

Jednadžba za izračun dobivenih podataka:

$$\text{Broj stanica kvasca / mL} = \text{izbrojane stanice} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \cdot 10000$$

### 3.2.2. Određivanje parametara piva pomoću Anton Paar analizatora

Anton Paar analizator (*Alcolyzer*) se primjenjuje za određivanje alkohola, prividnog ekstrakta, pravog ekstrakta, ekstrakta u osnovnoj sladovini, energije, mutnoće, pH i boje. Analize gustoće se provode pomoću ugrađenog densitometra. Boja i mutnoća se analiziraju te određuju pomoću nadograđenih modula. Na uređaj je nadograđena i elektroda koja određuje pH. Alkohol se mjeri

infra-crvenim spektroskopom, a primijenjene valne duljine su 1150 do 1200 nm. Nakon dobivanja ovih podataka uređaj pomoću podataka mjerenja alkohola i gustoće (specifične težine) određuje parametre ekstrakta te kalorije.

Uzorci se uzimaju sa *pigtaila* istom metodom kao što su uzimani uzorci za brojanje kvasca. Uzorak je potrebno temperirati na 20°C, prebaciti u laboratorijsku bocu te degazirati. Degazira se na način da se boca poklopi, protrese te otvori. Ovaj postupak se ponavlja dok se više ne čuje karakterističan zvuk oslobađanja tlaka kada se boca otvori. U 150 mL uzorka se dodaje 1.5 g diatomejske zemlje. Dobro se promiješa i ulije u postavljeni filter papir. Filtrat se skuplja u Erlenmeyerovu tikvicu. Filtrat se puni u suhe čašice i postavlja u uređaj. Uređaj se pokreće i vrši se analiza uzoraka. Poželjno je uzorke analizirati u duplikatu radi veće sigurnosti dobivenih podataka. Nakon korištenja uređaja uređaj se ispire destiliranom vodom pomoću programa “rinse”. Rezultati se spremaju u memoriju, a mogu se dobiti putem zaslona na prednjoj strani uređaja.

### **3.2.2.1 Razlike između prividnog ekstrakta, pravog ekstrakta i ekstrakta u osnovnoj sladovini**

Udio ekstrakta je maseni udio otopljene krute tvari u sladovini ili pivu. Izražava se u stupnjevima Plato (°P). Jedan stupanj označava 1% krute tvari u tekućini. Te krute tvari podrazumijevaju sve otopljene spojeve poput šećera, proteina itd. Ekstrakt u osnovnoj sladovini se inače mjeri refraktometrom ili areometrom te predstavlja otopljene tvari u vodi prije inokulacije kvasca. U uređaju je ovaj ekstrakt označen kao “original extract”. Tokom fermentacije nastaje alkohol. Alkohol ima manju gustoću od vode te stoga mjerenje ukupne gustoće sladovine pomoću areometra daje iznos ekstrakta sa greškom koji se stoga naziva prividnim ekstraktom. Ovaj ekstrakt se u uređaju naziva “apparent extract”. Pravi ekstrakt se izračunava iz ekstrakta u osnovnoj sladovini (original extract) i prividnog ekstrakta (apparent extract) koristeći formulu koja kompenzira navedenu grešku. Pravi ekstrakt se u uređaju naziva “real extract” (Chlup, 2023).

### **3.2.3. Određivanje gorčine spektrofotometrom koristeći izo oktan metodu**

Određivanje gorkih tvari se provodi primjenom spektrofotometra. UV-128 višenamjenski spektrofotometar provodi skeniranje valnih duljina između 190-1100 nm, a omogućuje

spremanje podataka na USB-uređaj.

Prije provođenja analize mutne uzorke je potrebno izbistriti u centrifugi. Centrifuga mora biti operativne brzine od 3000 rpm, a centrifugira se 15 minuta. Princip rada je da se gorke tvari ekstrahiraju iz zakiseljenog uzorka pomoću izo-okтана. Prvo se vrši analiza slijepa probe koja se sastoji od čistog izo-okтана te se potom mjeri i uzorak. Apsorbancija uzorka se mjeri pri 275 nm. Izo-oktan koji se koristi mora imati apsorbciju ispod 0.010 mjereno pri 275 nm u kvarcnoj kivetu od 10 mm prema slijepoj probi.

Uzorke je prije analize potrebno temperirati na 20°C te degazirati. Treba paziti da ne dođe do gubitka pjene tokom degaziranja jer se komponente gorčine koncentriraju u pjenu. Degazira se istom metodom kao i kod pripreme uzorka za analizu Anton Paar analizatorom. Prije uzorkovanja je potrebno dodati jednu kap 1-Oktanola na 100 mL uzorka da bi se izbjeglo pjenjenje, a posljedično i gubitak gorkih komponenti, tokom uzorkovanja.

Odpipetira se 10 mL uzorka u graduiranu tikvicu. Dodaje se 0.5 mL 6M klorovodične kiseline (HCl).

Dodaje se 20 mL izo-okтана. Uzorak se potom trese 90 sekundi da izo-oktan otopi komponente gorčine. Graduirana tikvica se nakon tog ostavlja da stoji 20 minuta da se emulzija smiri te da bi se otapalo razdvojilo od uzorka. Klipnom pipetom se odpipetira ekstrakt (gornji sloj) u 10 mm kvarcnu kivetu. Kiveta se stavlja u uređaj te se uređaj pokreće. Podaci se mogu iščitati na zaslonu uređaja i izraženi su u BU jedinicama gorčine.

### **3.2.4. Prilagodbe temperature tokom fermentacije**

Tokom procesa fermentacije dolazi do prilagodbe temperature tokom različitih faza. Prilagodbe temperature se razlikuju ovisno da li se radi o stilu american pale ale ili session india pale ale. Kod uzorka A (american pale ale) 7. dan je temperatura povišena na 21°C u svrhu uklanjanja nepoželjnih aroma, a 9. dan je temperatura spuštena na nulu u svrhu taloženja suspendiranih čestica. Uzorak B (session india pale ale) se dodatno suho hmelji. To je proces tokom kojeg se, pri samom kraju fermentacije, dodaje dodatni hmelj za aromu. Uzorku B se povisila temperatura tokom četvrtog dana fermentacije. Dvanaesti dan fermentacije se temperatura spustila na 15°C te je petnaesti dan dodan hmelj. Osamnaesti dan je pivo ohlađeno na nulu. Oba proizvoda su centrifugirana prije pakiranja u boce.

## 4. REZULTATI

Kod rezultata mjerenja je potrebno napomenuti da uzorci nisu uzimani tokom vikenda, praznika i blagdana te su ti dani fermentacije u tablicama ostavljeni prazni.

### 4.1. REZULTATI BROJANJA KVASCA

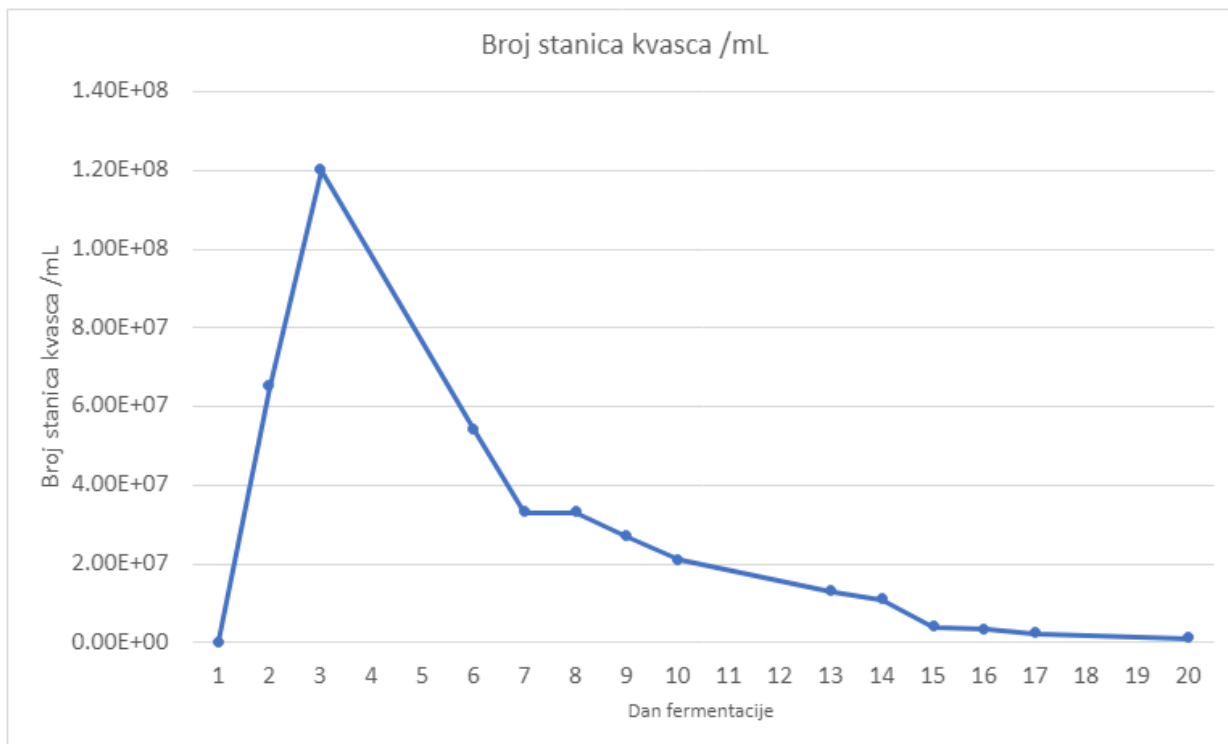
Uzorak A je inokuliran sa  $9,96 \times 10^6$  stanica kvasca/mL.

Uzorak B je inokuliran sa  $4,7 \times 10^6$  stanica kvasca/mL.

Tablica 1. Rezultati brojanja kvasca tokom fermentacije.

Dan fermentacije	Naziv uzorka	Broj stanica kvasca / mL	Naziv uzorka	Broj stanica kvasca / mL
1	2A	$1,038 \times 10^4$	2B	$1,9 \times 10^6$
2	3A	$6,4 \times 10^7$		
3	4A	$1,2 \times 10^8$		
4			3B	$4,4 \times 10^7$
5			4B	$6,8 \times 10^7$
6	5A	$5,4 \times 10^7$	5B	$4,5 \times 10^7$
7	6A	$3,3 \times 10^7$	6B	$4,4 \times 10^7$
8	7A	$3,3 \times 10^7$	7B	$4,1 \times 10^7$
9	8A	$2,7 \times 10^7$		
10	9A	$2,1 \times 10^7$		
11			8B	$2,6 \times 10^7$
12			9B	$3,6 \times 10^7$
13	10A	$1,3 \times 10^7$	10B	$2,2 \times 10^7$
14	11A	$1,1 \times 10^7$	11B	$1,2 \times 10^7$
15	12A	$4 \times 10^6$	12B	$2,4 \times 10^7$
16	13A	$3,3 \times 10^6$		
17	14A	$2,4 \times 10^6$		
18			13B	$2,4 \times 10^7$
19				
20	15A	$1,12 \times 10^6$	14B	$1,6 \times 10^7$
21			15B	$1,2 \times 10^7$
22			16B	$8 \times 10^6$





**Slika 4.** Promjena broja stanica kvasca tokom fermentacije za uzorak A.



**Slika 5.** Promjena broja stanica kvasca tokom fermentacije za uzorak B.

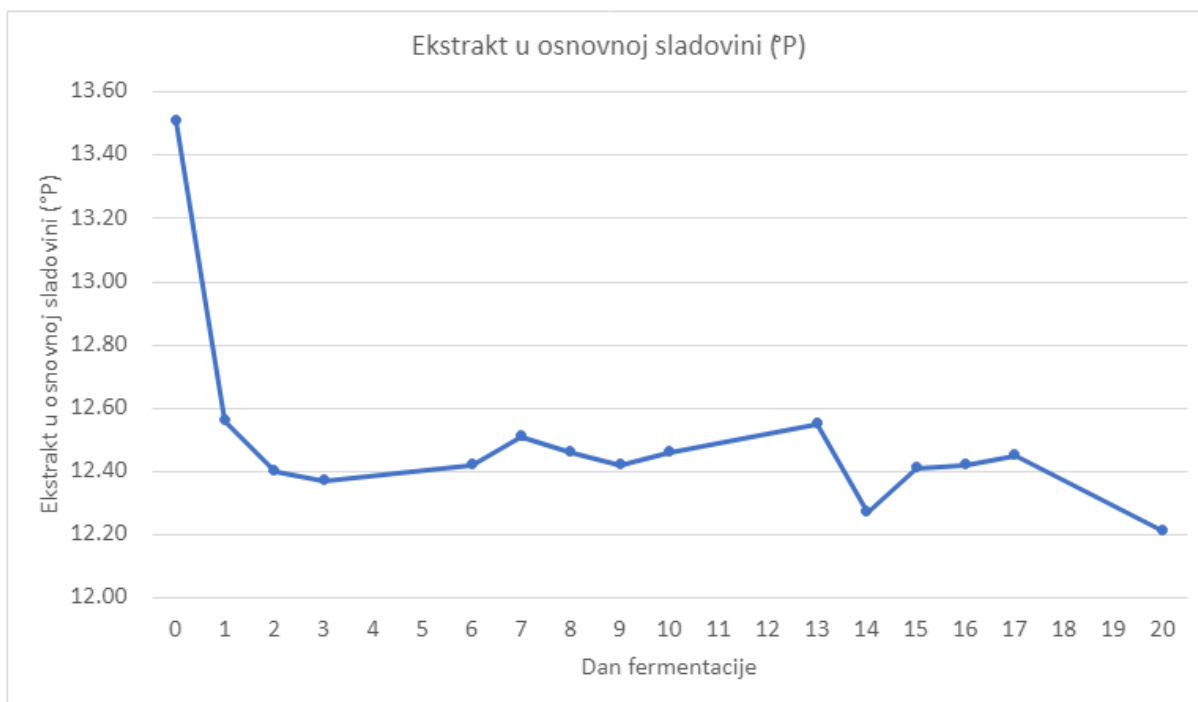
## 4.2. REZULTATI MJERENJA UREĐAJEM ANTON PAAR I SPEKTROFOTOMETROM

Tablica 2. Rezultati analize ekstrakta i alkohola uređajem Anton Paar za uzorak A.

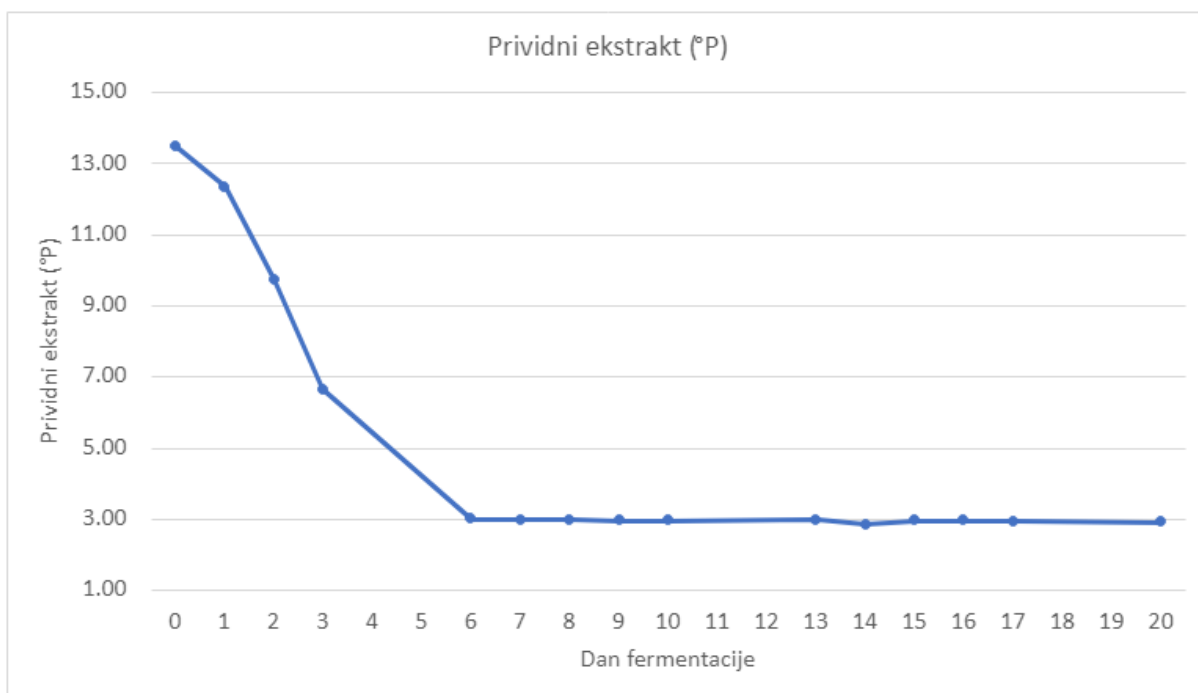
Dan fermentacije	UZORAK	OE/°P	AE/ % w/w	RE/% w/w	ABV/ml/100ml
0	A1	13,51	13,50	13,50	0,00
1	A2	12,56	12,35	12,39	0,09
2	A3	12,40	9,75	10,27	1,45
3	A4	12,37	6,64	7,76	3,10
4					
5					
6	A5	12,42	3,00	4,81	5,03
7	A6	12,51	2,98	4,82	5,09
8	A7	12,46	2,98	4,81	5,06
9	A8	12,42	2,95	4,78	5,06
10	A9	12,46	2,97	4,80	5,07
11					
12					
13	A10	12,55	2,99	4,83	5,11
14	A11	12,27	2,84	4,66	5,03
15	A12	12,41	2,96	4,78	5,04
16	A13	12,42	2,96	4,78	5,05
17	A14	12,45	2,94	4,77	5,08
18					
19					
20	A15	12,21	2,91	4,70	4,96
21	A16	12,18	2,93	4,71	4,93

Tablica 3. Izmjerene vrijednosti u gotovom proizvodu za uzorak A.

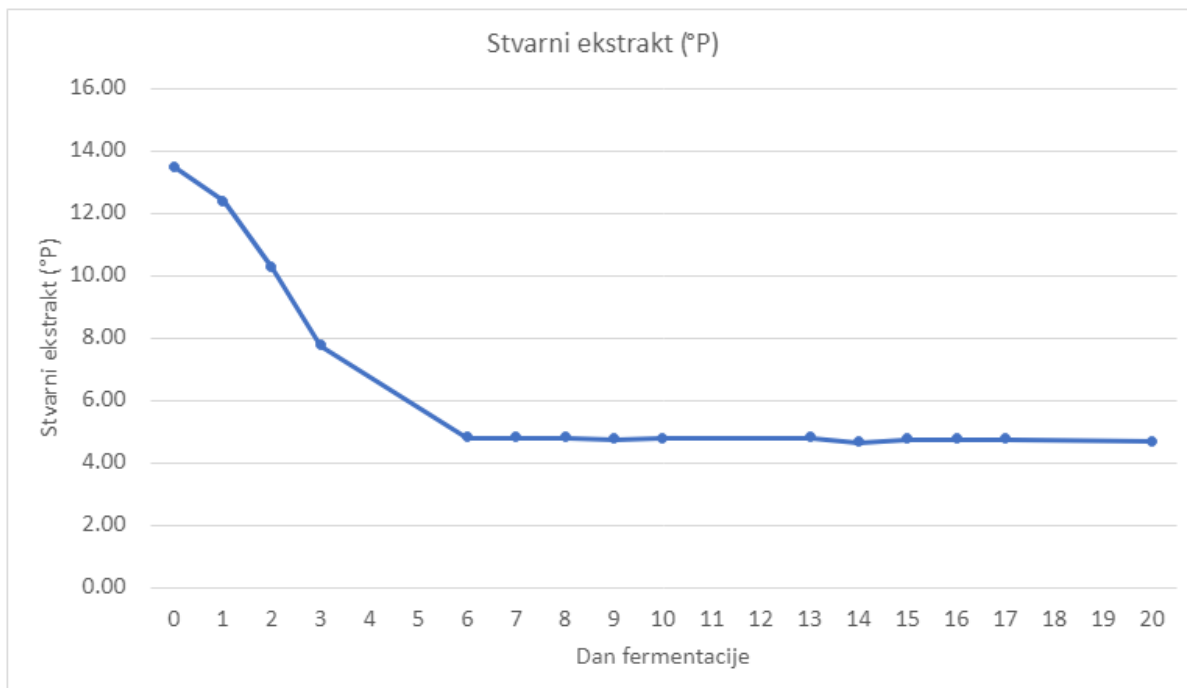
UZORAK	OE/°P	AE/ % w/w	RE/% w/w	ABV/ml/100ml
A16	12,18	2,93	4,71	4,93



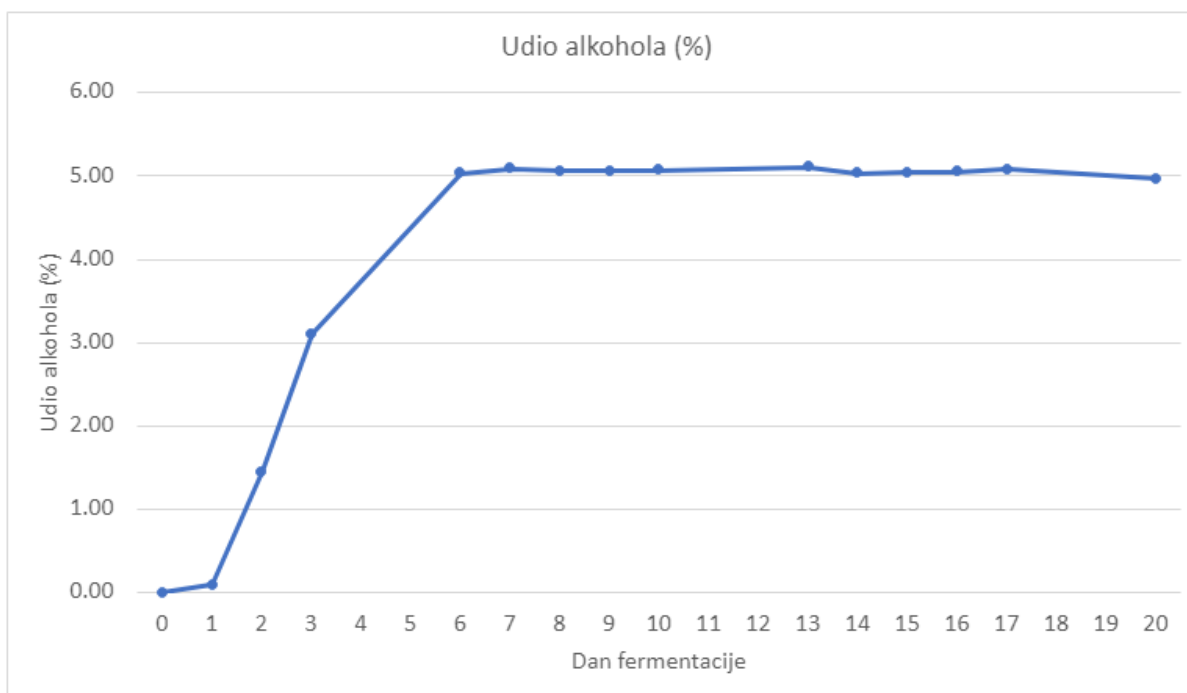
**Slika 6.** Promjena ekstrakta u osnovnoj sladovini tokom fermentacije za uzorak A.



**Slika 7.** Promjena prividnog ekstrakta tokom fermentacije za uzorak A.



**Slika 8.** Promjena stvarnog ekstrakta tokom fermentacije za uzorak A.



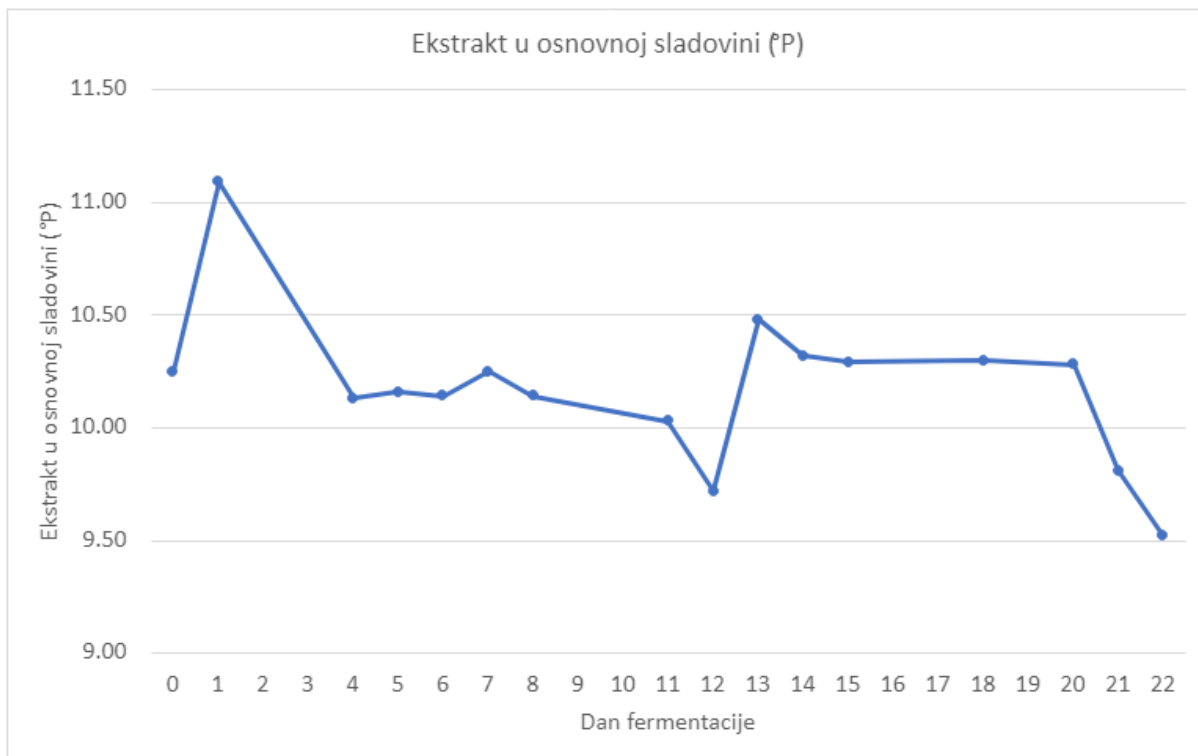
**Slika 9.** Promjena udjela alkohola tokom fermentacije za uzorak A.

**Tablica 4.** Rezultati analize ekstrakta i alkohola uređajem Anton Paar za uzorak B.

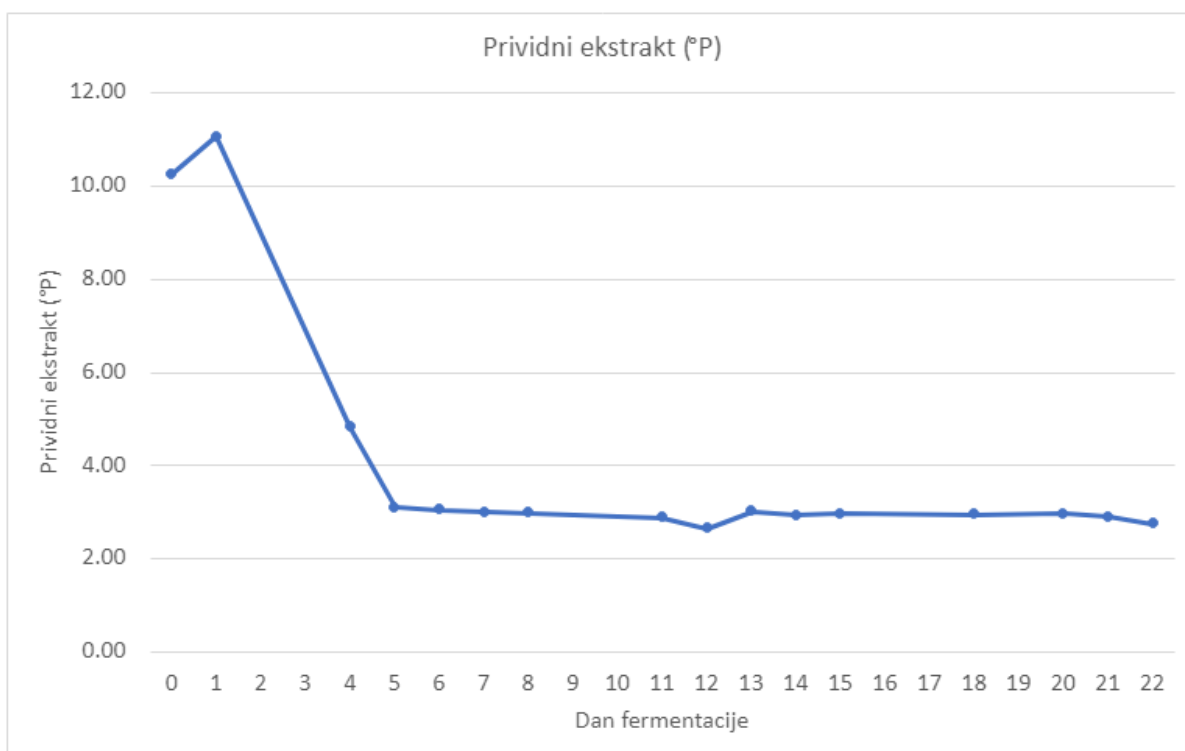
Dan fermentacije	UZORAK	OE/°P	AE/ % w/w	RE/'% w/w	ABV/ml/100ml
0	B1	10,25	10,26	10,26	0,00
1	B2	11,09	11,07	11,07	0,01
2					
3					
4	B3	10,13	4,83	5,86	2,81
5	B4	10,16	3,10	4,47	3,72
6	B5	10,14	3,05	4,42	3,74
7	B6	10,25	3,00	4,4	3,83
8	B7	10,14	2,99	4,37	3,77
9					
10					
11	B8	10,03	2,88	4,26	3,77
12	B9	9,72	2,66	4,03	3,70
13	B10	10,48	3,02	4,46	3,94
14	B11	10,32	2,93	4,36	3,90
15	B12	10,29	2,97	4,38	3,86
16					
17					
18	B13	10,30	2,95	4,37	3,87
19					
20	B14	10,28	2,97	4,39	3,85
21	B15	9,81	2,90	4,24	3,64
22	B16	9,52	2,75	4,06	3,55

**Tablica 5.** Izmjerene vrijednosti u gotovom proizvodu za uzorak B.

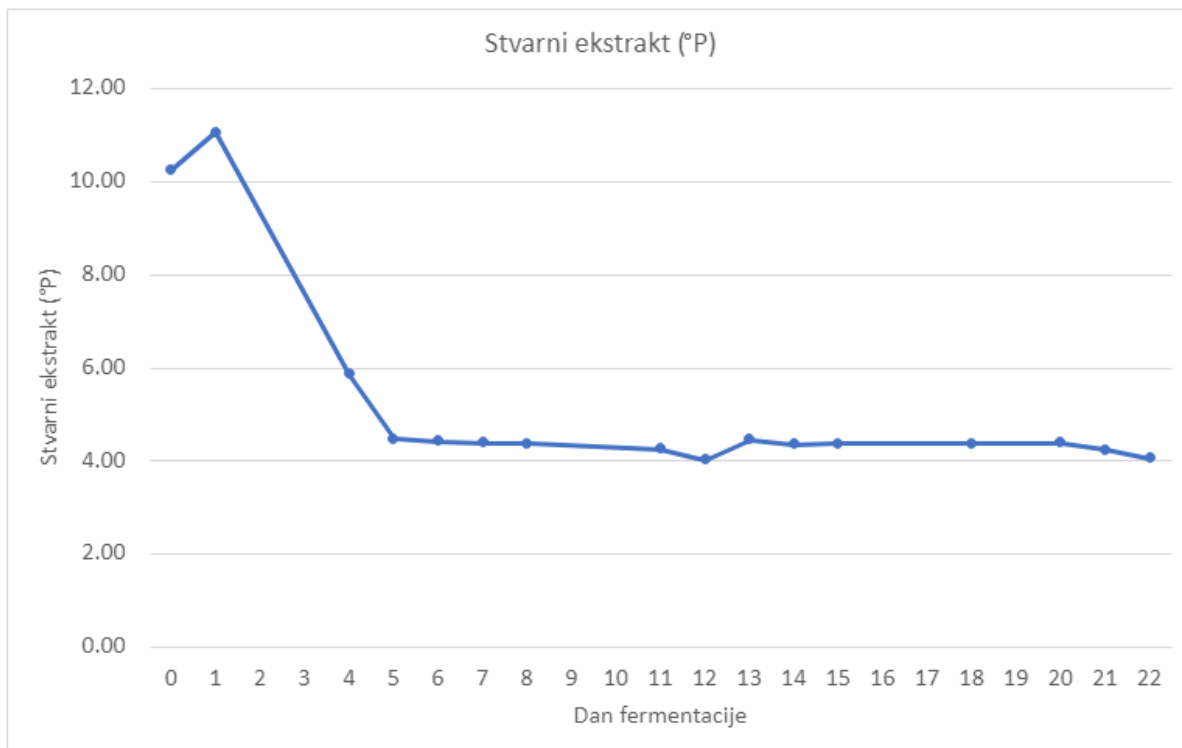
UZORAK	OE/°P	AE/ % w/w	RE/% w/w	ABV/ml/100ml
B17	10,30	2,96	4,38	3,87



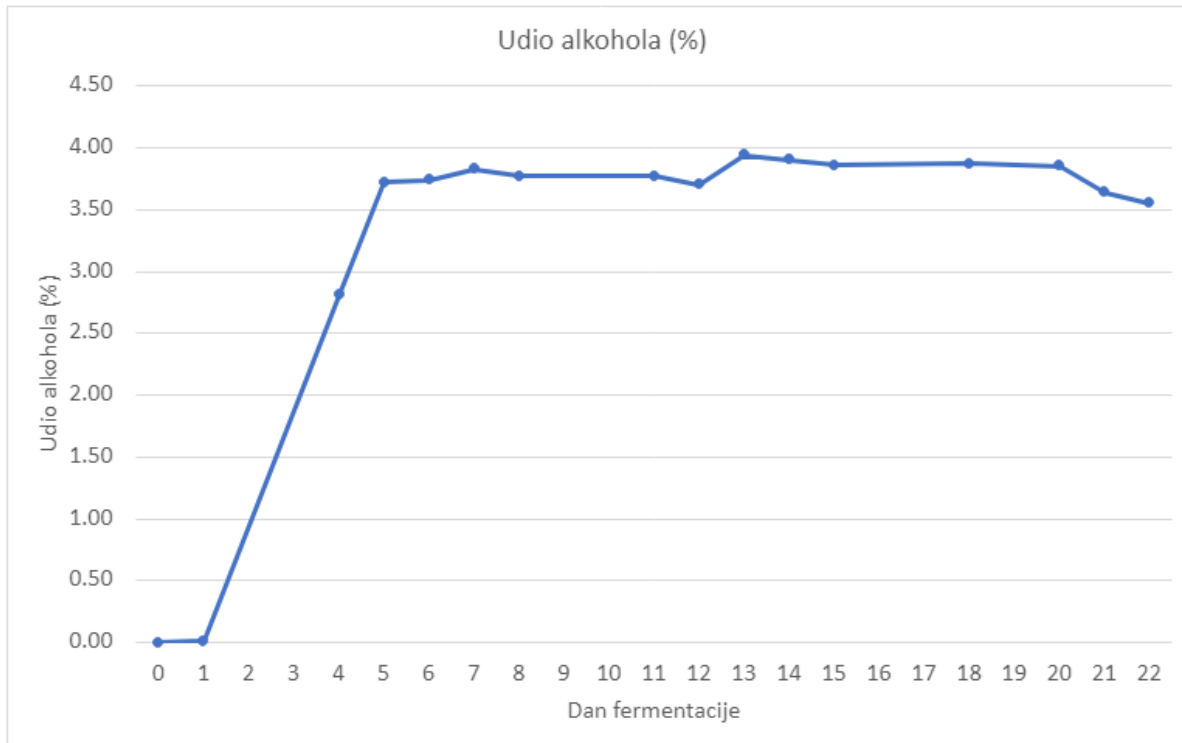
**Slika 10.** Promjena ekstrakta u osnovnoj sladovini tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 11.** Promjena prividnog ekstrakta tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 12.** Promjena stvarnog ekstrakta tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 13.** Promjena udjela alkohola tokom fermentacije za uzorak B.

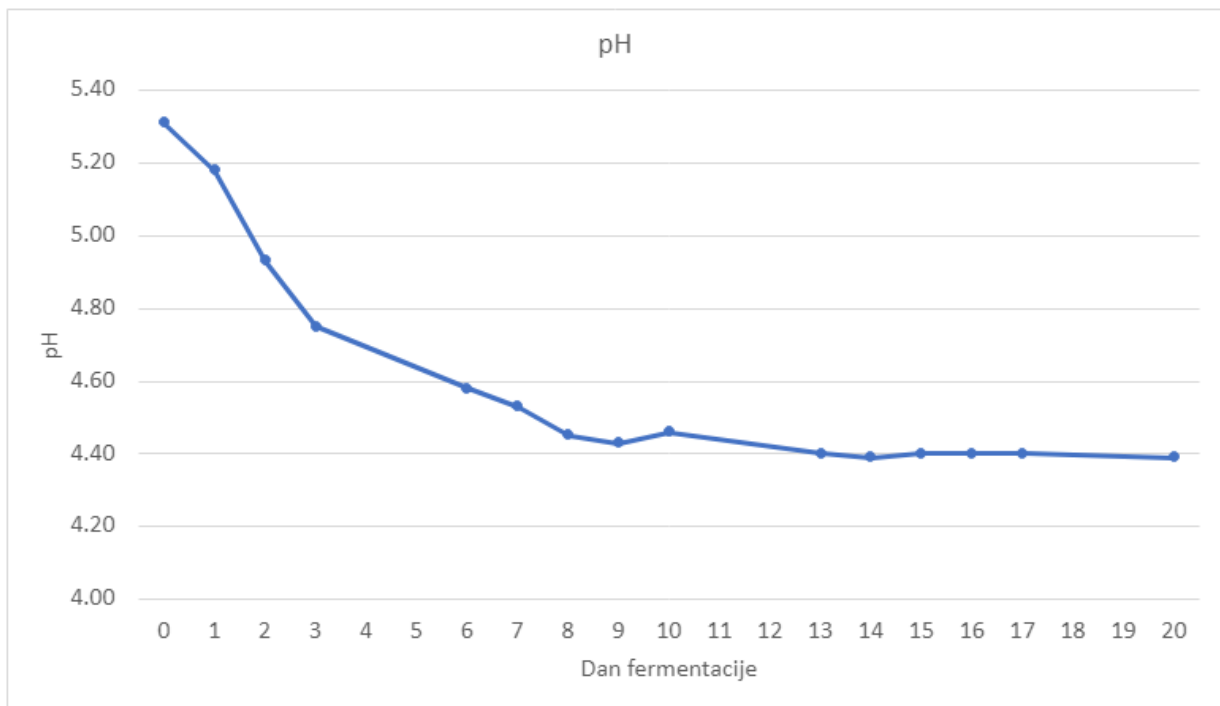
**Tablica 6.** Rezultati analize pH, boje, mutnoće, energije i gorčine uređajem Anton Paar i spektrofotometrom za uzorak A.

Dan fermentacije	UZORAK	pH/-	MUTNOĆA/ EBC	E/kJ/100 ml	Boja/EBC	Gorčina/BU
1	A1	5,31	0,65	213,31	27,02	33,01
2	A2	5,18	0,67	197,50	24,95	
3	A3	4,93	0,54	192,90	23,48	
4	A4	4,75	0,8	190,11	23,06	40,43
5						
6						
7	A5	4,58	1,22	188,07	22,23	
8	A6	4,53	1,26	189,48	22,57	
9	A7	4,45	1,43	188,70	22,52	
10	A8	4,43	1,27	188,08	22,25	36,49
11	A9	4,46	1,35	188,65	22,38	
12						
13						
14	A10	4,40	1,28	190,12	22,77	37,16
15	A11	4,39	0,94	185,66	21,14	
16	A12	4,40	1,05	187,85	22,47	42,47
17	A13	4,40	1,48	188,02	22,51	
18	A14	4,40	1,23	188,52	22,38	
19						
20						
21	A15	4,39	1,15	184,72	22,06	

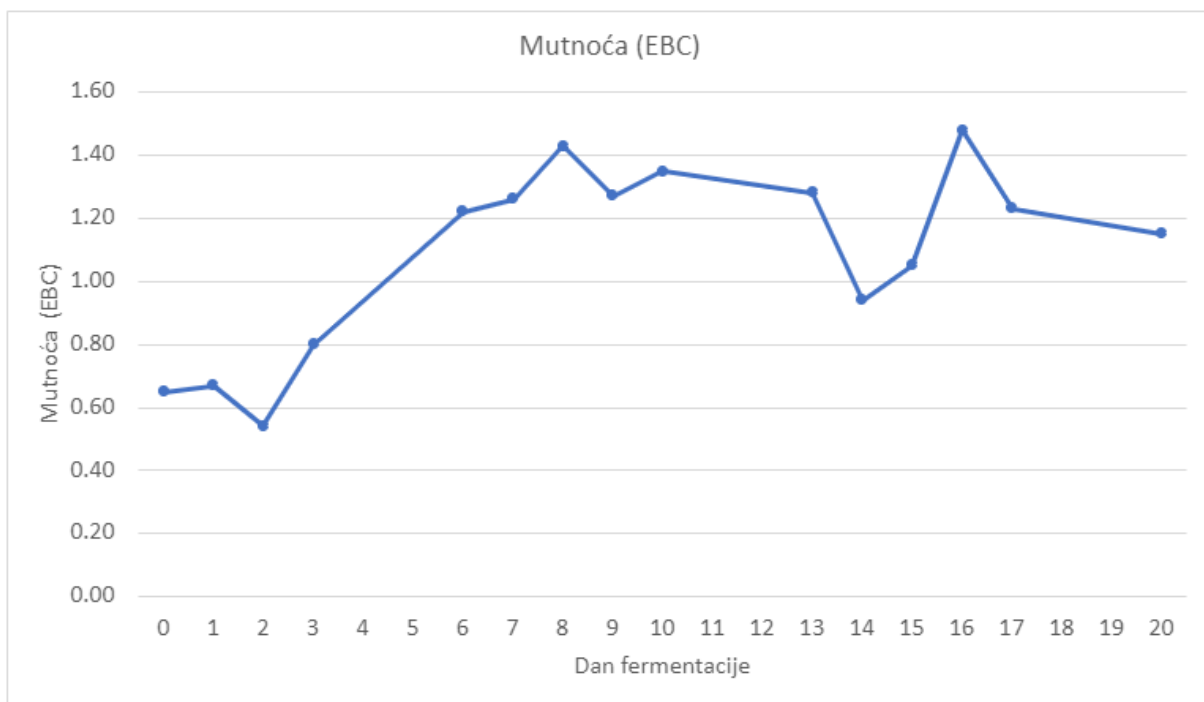
**Tablica 7.** Izmjerene vrijednosti u gotovom proizvodu za uzorak A.

UZORAK	pH/-	MUTNOĆA/ EBC	E/kJ/100 ml	Boja/EBC	Gorčina/BU
A16	4,41	0,94	184,25	21,15	41,18

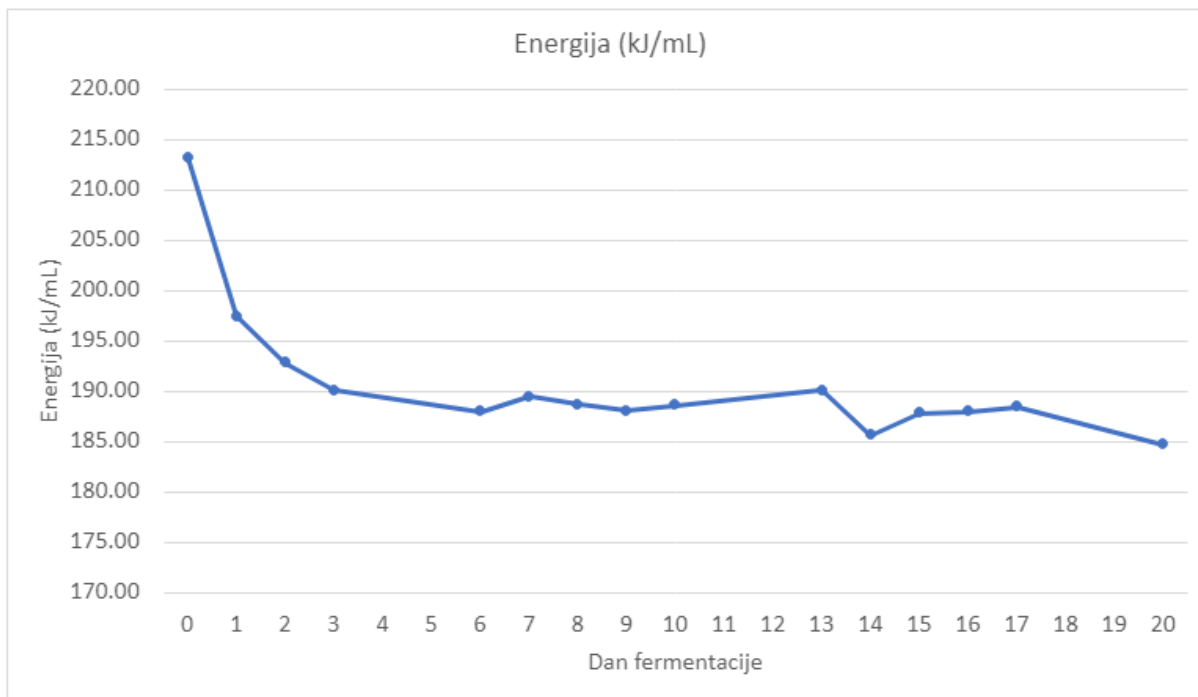




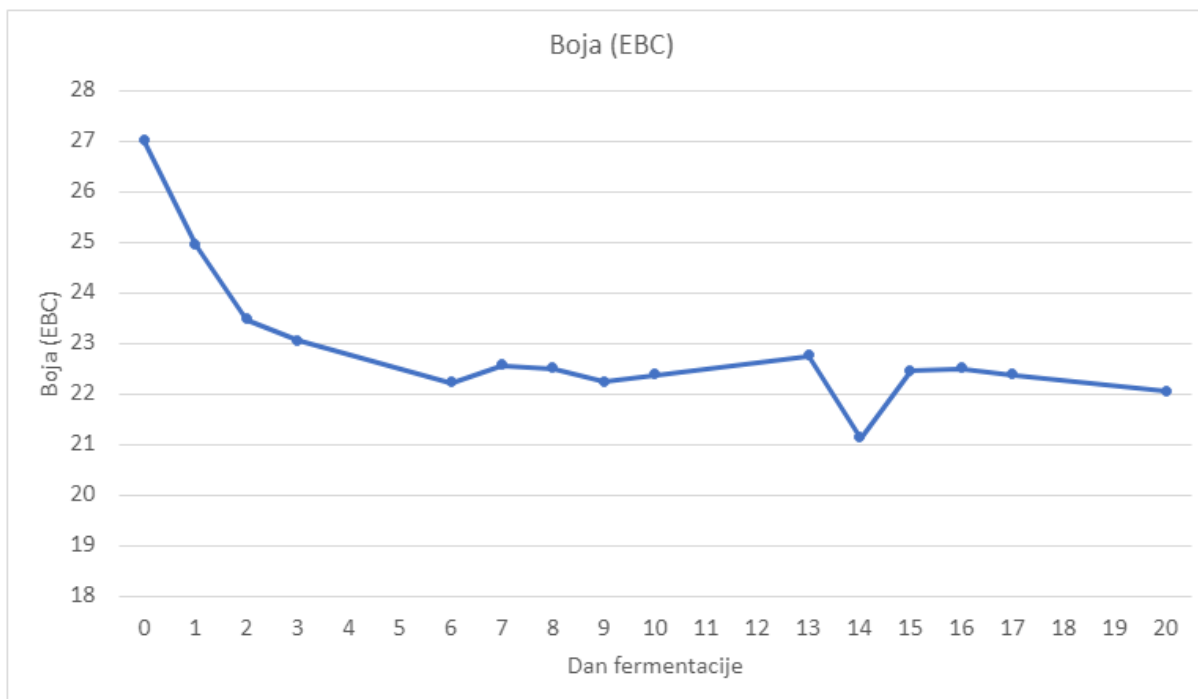
**Slika 14.** Promjena pH tokom fermentacije za uzorak A.



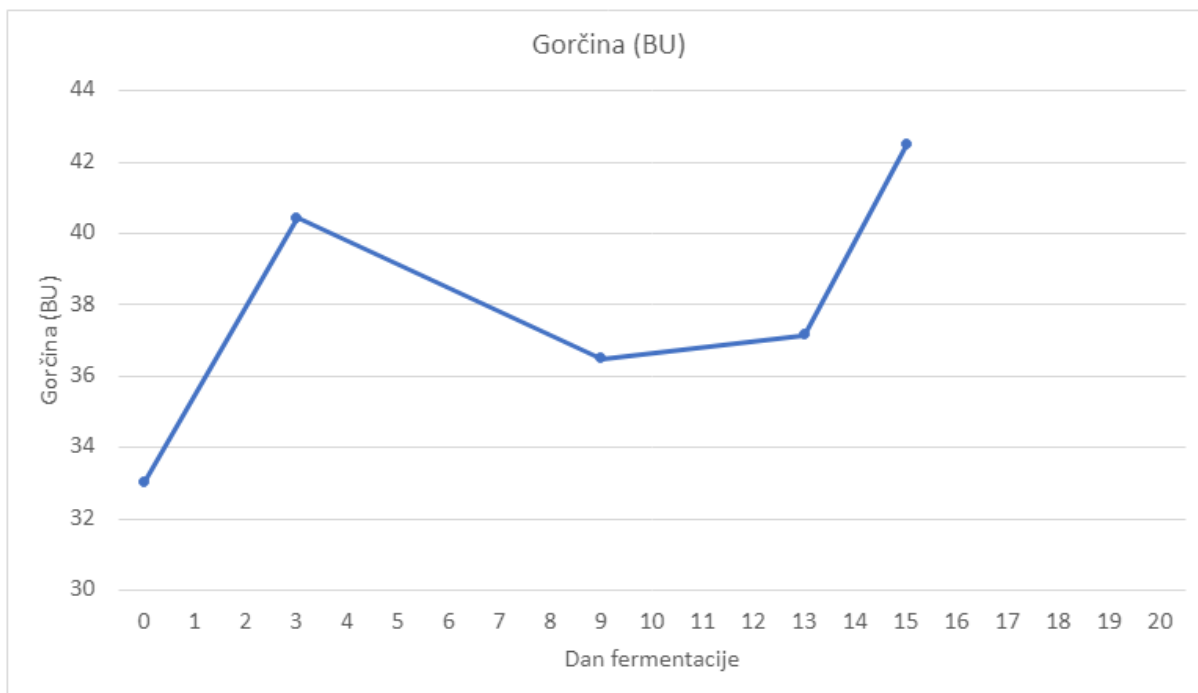
**Slika 15.** Promjena mutnoće tokom fermentacije za uzorak A.



**Slika 16.** Promjena energije tokom fermentacije za uzorak A.



**Slika 17.** Promjena boje tokom fermentacije za uzorak A.



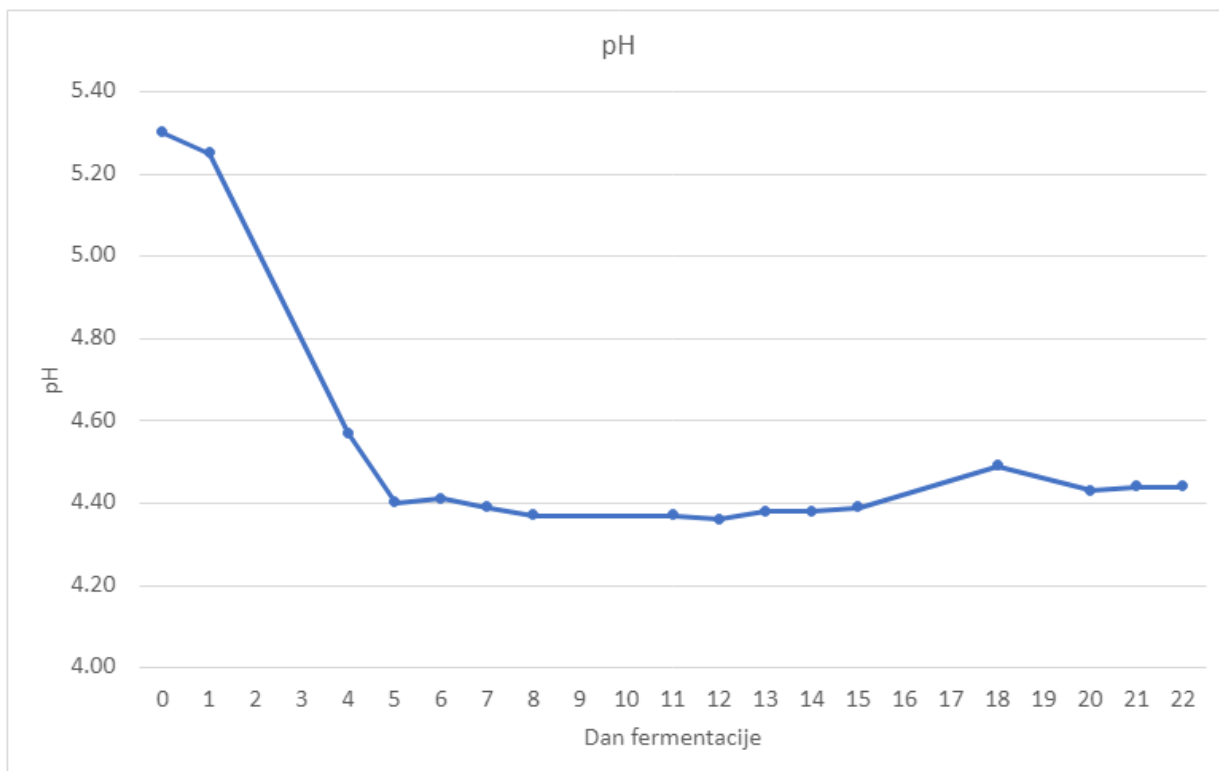
**Slika 18.** Promjena gorčine tokom fermentacije za uzorak A.

**Tablica 8.** Rezultati analize pH, boje, mutnoće, energije i gorčine uređajem Anton Paar i spektrofotometrom za uzorak B.

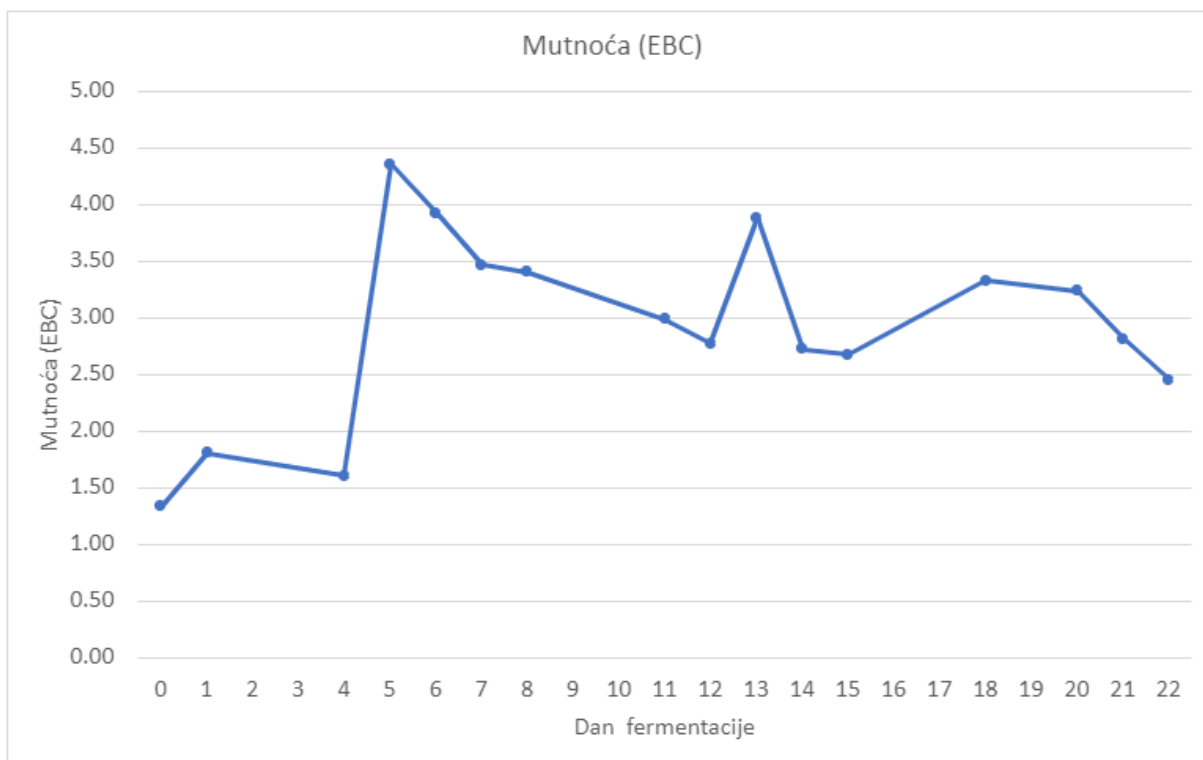
Dan fermentacije	UZORAK	pH/-	MUTNOĆA/ EBC	E/kJ/100 ml	Boja/EBC	Gorčina/BU
0	B1	5,3	1,34	159,81	14,65	27,90
1	B2	5,25	1,81	173,38	15,60	
2						
3						
4	B3	4,57	1,61	153,69	12,55	26,88
5	B4	4,40	4,36	152,94	12,83	
6	B5	4,41	3,93	152,59	12,78	23,52
7	B6	4,39	3,47	154,27	12,71	
8	B7	4,37	3,41	152,52	12,57	
9						
10						
11	B8	4,37	2,99	150,71	12,26	
12	B9	4,36	2,78	145,71	11,30	
13	B10	4,38	3,89	157,80	13,13	23,16
14	B11	4,38	2,73	155,26	12,49	
15	B12	4,39	2,68	154,75	12,69	
16						
17						
18	B13	4,49	3,33	154,91	12,88	31,37
19						
20	B14	4,43	3,24	154,70	12,91	
21	B15	4,44	2,82	147,44	12,41	
22	B16	4,44	2,46	142,69	11,67	

**Tablica 9.** Izmjerene vrijednosti u gotovom proizvodu za uzorak B.

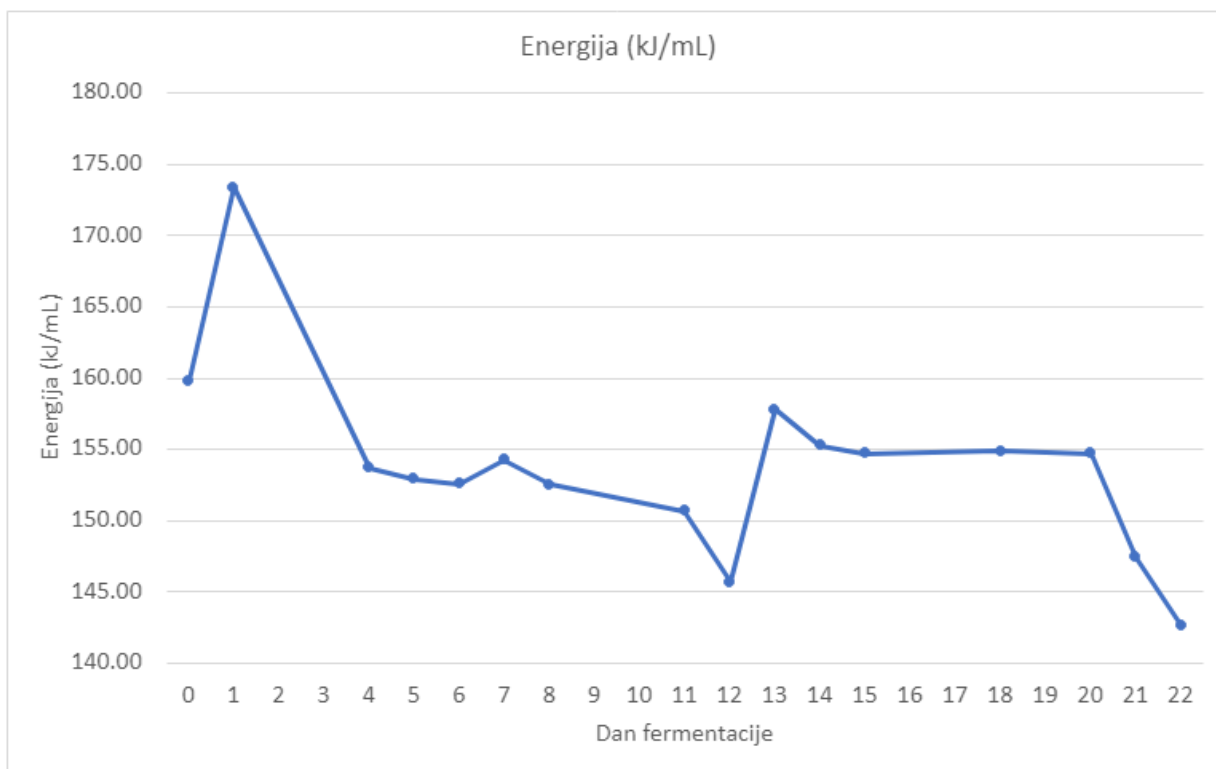
UZORAK	pH/-	MUTNOĆA/ EBC	E/kJ/100 ml	Boja/EBC	Gorčina/BU
B17	4,43	3,65	154,94	12,79	28,60



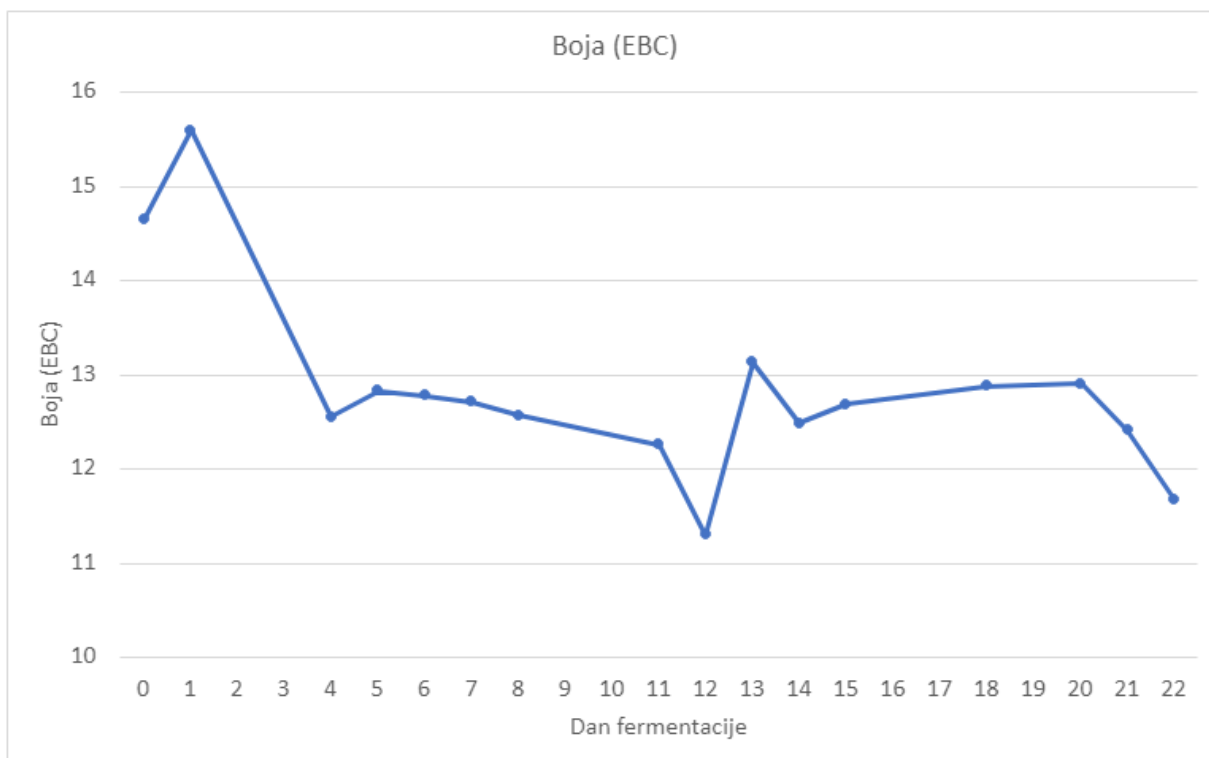
**Slika 19.** Promjena pH tokom fermentacije za uzorak B.



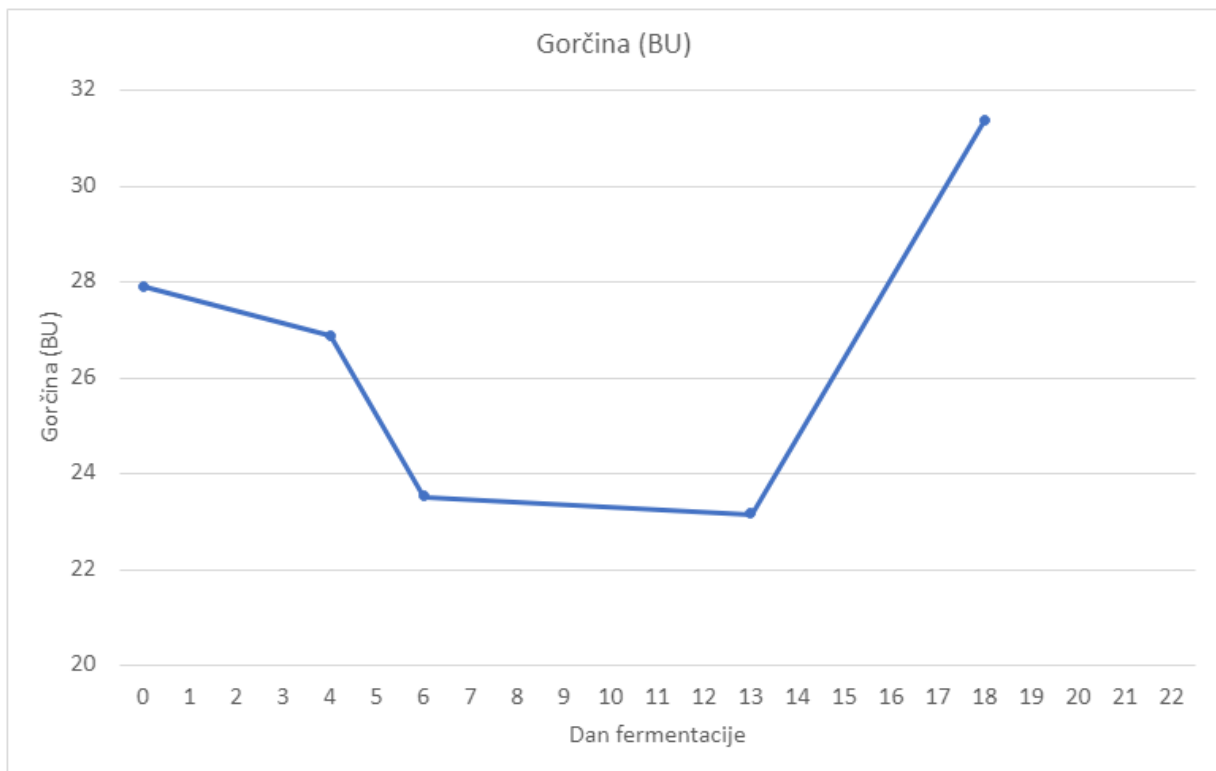
**Slika 20.** Promjena mutnoće tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 21.** Promjena energije tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 22.** Promjena boje tokom fermentacije za uzorak B.



**Slika 23.** Promjena gorčine tokom fermentacije za uzorak B.

## 5. RASPRAVA

Jednakim metodama analizirani su uzorci dva različita stila piva koji su izuzimani iz fermentora tijekom cijelog procesa fermentacije i odležavanja. Uzorak american pale ale je označen slovom A, a uzorak session india pale ale je označen slovom B. Uzorak B naknadno je suho hmeljen, dok uzorak A nije prošao ovaj postupak. Finalni proizvodi predstavljaju uzorke iz ambalaže koji su prošli postupak centrifugiranja u proizvodnom pogonu te pakiranje u staklenu ambalažu.

Kod oba analizirana uzorka je vidljiv jasan skok u broju stanica kvasaca na početku same fermentacije te postepeno opadanje i smirivanje krivulje. Početni porast broja stanica kvasca može se pripisati eksponencijalnoj fazi rasta tokom koje kvasac ima na raspolaganju najviše hranjivih sastojaka, kisika i ostalih potrebnih tvari koje mu omogućuju ovaj intenzivan rast. Kod uzorka A može se primijetiti maksimalan broj stanica kvasca oko trećeg dana, a kod uzorka B oko petog dana fermentacije. Nakon toga na oba uzorka slijedi faza opadanja. Uzorak A pokazuje kratko zaustavljanje opadanja broja stanica kvasca sedmi dan kada se povisila temperatura. Uzorak B pokazuje blagi pad broja stanica kvasca nakon dvanaestog dana kada je snižena temperatura te blagi porast broja stanica kvasca petnaesti dan kada je dodan hmelj u svrhu suhog hmeljenja. Porast broja stanica kvasca zbog suhog hmeljenja može se pripisati uzburkavanju piva uslijed oslobađanja ugljičnog dioksida na hrapavoj površini hmeljnih peleta ili zbog pojave efekta „*hop creep*“ kod kojeg se zbog enzima prisutnih u hmelju složeni šećeri razgrađuju na jednostavnije koje onda kvasac može iskoristiti. Kod oba uzorka broj stanica kvasca opada kada je pivo ohlađeno na nulu. Vidljivo je da viša temperatura pozitivno utječe na aktivnost kvasca i broj stanica u suspenziji dok niže temperature zaustavljaju aktivnost i potiču taloženje, kako kvasca tako i drugih čestica.

Kod uzorka A, kao i kod uzorka B, vidimo jasan pad sva tri mjerena ekstrakta (stvarni ekstrakt, prividni ekstrakt i ekstrakt u osnovnoj sladovini) na početku fermentacije kada se i po broju stanica kvasca može vidjeti najveća aktivnost. Također obrnuto proporcionalan trend prati i krivulja stvaranja alkohola. Dok je uočen jasan pad ekstrakta prvih dana fermentacije uočen je i jasan porast postotka alkohola u otopini tokom prvih nekoliko dana kada je fermentacija najburnija. Jasan obrnuto proporcionalan trend porasta alkohola i opadanja ekstrakta prati i broj stanica kvasca. Pojačana aktivnost kvasca rezultira time da kvasac iskorištava ekstrakt i proizvodi alkohol. Kako je ekstrakt sve više iskorišten te kvasac ima sve siromašniju hranjivu



podlogu, tako i njegov broj opada te se aktivnost smanjuje.

Oba uzorka bilježe pad vrijednosti za energiju, boju i pH. Kvasac je dio jednostavnih ugljikohidrata (koji se mogu izraziti i kao energija) potrošio tokom metaboličkih aktivnosti koje mogu objasniti i promjenu vrijednosti pH kao i promjenu boje. Jedan od razloga promjene boje je upravo snižavanje pH. Kvasac iskorištavajući bazične aminokiseline i proizvodeći organske kiseline snižava pH što ima i dodatnu korist jer štiti proizvod od infekcije drugim mikroorganizmima. Završni pH u oba uzorka je skoro isti, pa tako uzorak A ima 4,41 pH, dok uzorak B ima 4,43 pH. Kod uzorka B se iza petnaestog dana vidi porast vrijednosti boje i mutnoće, a uzrok ovih očitavanja može biti uzburkavanje piva tokom dodavanja hmelja, te sama prisutnost hmelja nakon suhog hmeljenja.

Mutnoća kod oba uzorka pokazuje prevelike oscilacije u rezultatima te kod gotovog proizvoda ima veću vrijednost nego kod početnog uzorka sladovine, što bi moglo sugerirati probleme sa mjernim uređajem ili u načinu pripreme uzorka.

Kod gorčine se prvo vidi blagi pad te pri kraju fermentacije rast vrijednosti. Rast je izražen kod uzorka B nakon suhog hmeljenja. Zbog rjeđe frekvencije analiziranja gorčine može se uzeti u obzir mogućnost greške tokom analize.

## 6. ZAKLJUČCI

Zadnjih godina vidi se sve veći interes tržišta za moderne pivske stilove te ale piva rađena sa kvascima gornjeg vrenja. Izuzetnu popularnost imaju i piva bogata hmeljem koja prolaze dodatni proces suhog hmeljenja radi obogaćivanja arome. Cilj ovog rada je bio mjerenjem različitih parametara pratiti razlike u fermentaciji tokom proizvodnje tih modernih stilova. Analizirani stilovi su bili američki tip pale ale-a koji, u ovom slučaju, nije bio suho hmeljen te session india pale ale-a koji je bio suho hmeljen. Također, session india pale ale je alkoholno slabije pivo što je dio njegove popularnosti.

U uvjetima industrijske proizvodnje primjenjuju se postupci poput ciljanje promjene temperature ili dodavanja dodatnih sastojaka (hmelja) tokom fermentacije. Navedeni postupci omogućavaju kontroliranje vremena potrebnog za dobivanje krajnjeg proizvoda te utječu na njegove organoleptičke značajke (temperaturom se može utjecati na količinu estera te potaknuti aktivnost kvasca kako bi uklonio diacetil iz piva itd.). Ti postupci, naravno, ovise o stilu piva koji se proizvodi, sastojcima koji se koriste te dostupnoj opremi.

Većina modernih pivovara ima mogućnosti kontrole temperature kojom se može utjecati na aktivnost kvasca tokom različitih faza fermentacije. Također, hlađenjem se može ubrzati proces taloženja kvasca, što ubrzava proces proizvodnje.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da suho hmeljenje utječe na gorčinu, te je potrebno paziti na taj parametar prilikom kreiranja recepta za pojedino pivo.

Analizom dobivenih podataka se može zaključiti da oba navedena piva prolaze vrlo slične procese tokom fermentacije te da osnovni metabolički putevi kvasca ostaju isti. Glavne razlike se javljaju zbog dodavanja suhog hmelja te različitih regulacija temperature tokom procesa proizvodnje. Temperatura se, kod uzorka A, spustila na nulu deveti dan te je time dobivena ujednačena krivulja opadanja broja stanica kvasca, vrijednosti energije te boje dok se kod Uzorka B, kojemu je dvanaesti dan temperatura spuštana na 15°C, a petnaesti dan se proveo proces suhog hmeljenja, vidi manja ujednačenost u krivuljama kod vrijednosti energije, boje, mutnoće te broja stanica kvasca. Vrijednosti ostalih promatranih parametara pokazuju sličan trend kod oba uzorka.

## 7. LITERATURA

1. Krogerus K., Magalhães F., Kuivanen J., Gibson B. (2019): A deletion in the STA1 promoter determines maltotriose and starch utilization in STA1+ *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103** (18), 7597-7615.
2. Krogerus K., Gibson B. (2020): A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104** (9), 3745-3756.
3. Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. (2013.): Biokemija, Bukan G., ur. Školska Knjiga, Zagreb, Hrvatska.
4. Cioch-Skoneczny M., Klimczaki K. (2022): Changes in beer bitterness level during the beer production process. *European Food Research and Technology*. **249** (1), 1-10.
5. Anonymus (2022): Compound Spotlight: Diacetyl, <https://www.whitelabs.com/news-update-detail?id=54&type=NEWS> (05.7.2023.)
6. Cotte N., Kirsop B. H. (1976): Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations, *Journal of the Institute of Brewing*. **82** (3), 143-194.
7. Palmer, J. J., (2006.): How to brew, Brewers publications, Boulder, Colorado.
8. Amić D. (2008.): Organska kemija – za studente agronomske struke, Bukan G., ur. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
9. Chlup P. H. (2023): The Oxford Companion to Beer definition of real extract, <https://beerandbrewing.com/dictionary/ewOeMFnY4x/> (05.7.2023.)
10. Zandycke S. V. (2023): The Oxford Companion to Beer definition of yeast, <https://beerandbrewing.com/dictionary/HtGj9zO5b8> (17.8.2023.)

11. Bible C. (2007): The principles of pH,  
<https://byo.com/article/the-principles-of-ph/> (05.7.2023.)
12. Hammond J. R. M., Kunkee R. E., Bisson L. F., Kodama K., Beech F. W., Watson D. C., Ingledew W. M., Lyons T. P., Jacques K. A., Dawson K. A., Hinchliffe E., Kenny E., Rose A. H., Vijayalakshmi G., Harrison J.S., Tudor E.A., Bord R. G., Thomas D. S. (1993.): The Yeasts Volume 5, Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
13. Duraković S., Redžepović S. (2003.): Uvod u opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb, Hrvatska.
14. White C., Zainasheff J. (2010.): Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation, Brewers publications, Boulder, Colorado.