

Veleučilište u Karlovcu

Stručni studij prehrambene tehnologije

Pivarstvo

Tina Zrinski

**Usporedba kveik kvasca s kvascem T-58 kod proizvodnje
Amber ale-a na homebrew sistemu**

Završni rad

Karlovac, rujan 2019.

Veleučilište u Karlovcu

Stručni studij prehrambene tehnologije

Pivarstvo

Tina Zrinski

**Usporedba kveik kvasca s kvascem T-58 kod proizvodnje
Amber ale-a na homebrew sistemu**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Šarić, viši predavač

Broj indeksa: 0314616075

Karlovac, rujan 2019.

SAŽETAK

Proizvodnja piva bazira se na dobivanju pivske sladovine koja u procesu alkoholne fermentacije prelazi u pivo uz pomoć pivskog kvasca. Pedeset litara sladovine dobiveno je na Speidels Braumeister sustav za kuhanje piva uz korištenje tradicionalnih sirovina (voda, ječam, hmelj i slad). Volumen sladovine podijelio se na pola. Upotrebljavala su se dva različita soja kvasca za fermentaciju (kveik kvasac i kvasac T - 58), po jedan za svaku polovicu volumena sladovine. Fizikalno - kemijske analize pomogle su kod određivanja razlika i sličnosti u fermentaciji i u gotovom pivu proizvedenom sa prije spomenutim kvascima. Tijekom fermentacije, provodile su se osnovne kemijske analize ključne za praćenje procesa. Fizikalno - kemijske analize obuhvaćaju mjerenje ekstrakta, pH-vrijednosti, boje, gorčine te praćenje temperature. Iako postoje određene razlike u metabolizmu kveik kvasca i kvasca T - 58, kroz fermentaciju su proizveli vrlo slično pivo.

Ključne riječi: fermentacija, fizikalno - kemijska analiza, kvasac T – 58, kveik kvasac, pivo

ABSTRACT

The production of beer is based on the production of beer wort, in which wort is converted into beer by alcoholic fermentation with the help of brewer's yeast. Fifty liters of wort was made on the Speidels Braumeister brewing system using traditional raw materials (water, barley, hops and malt). The volume of the wort was divided in half. Two different types of yeast were used for fermentation (Kveik yeast and yeast T - 58), one for each half volume of wort. Physicochemical analyzes helped to determine the differences and similarities in the fermentation and in the finished beer produced from these yeasts. During fermentation, basic physicochemical analyzes were carried out, crucial for monitoring the process. Physicochemical analyzes include extract measurement, pH, color, bitterness and temperature monitoring. Although there are some differences in the metabolism of kveik yeast and T - 58 yeast, through fermentation they produced a very similar beer.

Key words: beer, fermentation, kveik yeast, physicochemical analysis, yeast T - 58

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CILJ I SVRHA ZAVRŠNOG RADA	2
2. OPĆENITO O PIVU	3
2.1. OSNOVNE SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA	3
2.1.1. Slad	3
2.1.2. Voda.....	4
2.1.3. Hmelj.....	4
2.1.4. Kvasac	5
2.2. PODJELA PIVA PREMA VRSTI KVASCA ZA VRENJE SLADOVINE.....	6
2.3. PODJELA PIVA PREMA MASENOM UDJELU EKSTRAKTA U SLADOVINI.....	7
2.4. PODJELA PIVA PREMA GLAVNOJ SIROVINI.....	7
2.5. PODJELA PIVA PREMA BOJI	8
2.6. PODJELA PIVA PREMA VOLUMNOM UDJELU ALKOHOLA U PIVU	9
3. OPĆENITO O KVASCIMA	10
3.1. BIOLOGIJA KVASACA	10
3.1.1. Struktura stanice kvasca.....	11
3.1.2. Metabolizam kvasca.....	14
3.1.3. Korištenje nutrijenata.....	16
3.1.4. Flokulacija.....	18
3.1.5. Komponente arome	21
3.2. SOJEVI KVASACA.....	24
3.2.1. Norveški kveik kvasci.....	25
3.3. DIVLJI KVASCI.....	26
3.4. OSNOVE ZA DOBRU FERMENTACIJU	27
4. HOMEBREWING SISTEM KUHANJA	29

5. EKSPERIMENTALNI DIO.....	33
5.1. MATERIJALI RADA	33
5.1.1. Tehnološka oprema za Homebrew proizvodnju piva	33
5.1.2. Receptura za proizvodnju Amber Ale piva.....	34
5.1.3. Uređaji i kemikalije za provođenje fizikalno – kemijskih analiza i kemikalije u proizvodnji	36
5.2. METODE RADA	37
5.2.1. Proces proizvodnje piva na Speidels Braumeister sistemu.....	37
5.2.2. Fizikalno – kemijska analiza.....	38
6. REZULTATI.....	40
7. RASPRAVA.....	45
8. ZAKLJUČAK	47
9. LITERATURA.....	48
10. POPIS PRILOGA.....	50

1. UVOD

Pivo je pjenušavo alkoholno piće koje se svakodnevno konzumira po cijelome svijetu. Proizvodnja piva prisutna je već tisućama godina, a kroz stoljeća je doživjela velike promjene te postala jedna od najinovativnijih sektora u prehrambenoj industriji. Bavarski Zakon o čistoći piva (Reinheitsgebot) koji je izdan 1516. godine, naglasio je kako bi se pivo trebalo proizvoditi samo od tri osnovne sirovine – vode, ječmenog slada i hmelja. Međutim, u novom zakonu o pivu, iz 1993. godine, dopustilo se i korištenje kvasca.

Proces proizvodnje piva možemo jednostavno podijeliti u dvije faze. Prva faza odvija se u varionici i uključuje osmišljanje recepta, mljevenje slada ili neke neslađene žitarice, ukomljavanje te kuhanje sladovine. Dobiveni proizvod iz varione, sladovina, služi kao hrana kvascima u drugoj fazi. Druga faza ili fermentacija započinje hlađenjem sladovine i njenog transporta u fermentor u kojem se nalazi kvasac.

Kvasac je bitan aspekt u procesu proizvodnje. Svaki soj je specifičan te daje drugačije nusprodukte tijekom alkoholne fermentacije što posljedično utječe i na senzorske karakteristike krajnjeg proizvoda. Tijekom godina, pivari su počeli shvaćati da su neki sojevi kvasaca sposobni proizvesti pivo veće kvalitete od drugih sojeva, a da su se pri tome koristile iste sirovine za proizvodnju. Prema tome, ističu se dvije vrste roda *Saccharomyces* – *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces uvarum*, koji su izrazito važni za proces proizvodnje piva, a odabir vrste kvasca ovisi o stilu piva koji se želi dobiti.

Zadnjih godina, u Hrvatskoj se sve češće može čuti za izraz "Kućno pivarstvo" (tzv. Homebrewing). Velike industrijske pivovare poznate su po svojoj efikasnosti zbog upotrebe minimalne količine sirovina u usporedbi s dobitkom, zbog zamjene tradicionalnih sirovina onim jeftinijim (neslađene žitarice, hmeljni ekstrakti), kako bi smanjile trošak. Također, posjeduju dobro uhodan sustav proizvodnje, ali vrlo malu fleksibilnost. Kućno pivarstvo u usporedbi s industrijskim pivovarama omogućava veću fleksibilnost i kreativnost te zbog znatno manjih količina proizvedenog piva, lakše korištenje tradicionalnih sirovina, uz mogućnost eksperimentiranja s različitim recepturama.

1.1. CILJ I SVRHA ZAVRŠNOG RADA

Cilj i svrha završnog rada jest određivanje glavnih razlika dviju vrsti kvasaca koji se u teoriji, po genetičkim osobinama poprilično razlikuju. Proces fermentacije se provodio u sladovini iz jedne šarže, a koja je zbog lakšeg praćenja razlika i sličnosti dva odabrana soja kvasca bila podijeljena na dva jednaka volumena. Oprema korištena za dobivanje sladovine i odvijanje procesa fermentacije namijenjena je za potrebe kućnog pivarstva, manjeg kapaciteta. Rezultati istraživanja dobiveni su korištenjem osnovnih fizikalno - kemijskih analiza koje se redovno provode u proizvodnji piva za lakše praćenje cijelog procesa.

2. OPĆENITO O PIVU

Za proizvodnju piva mogu se koristiti različite sirovine i procesi. Generalno, pivo se može definirati kao kompleksno alkoholno piće, poznato po širokom spektru aroma, za što su većim dijelom zaslužni kvasci, a koje se mogu nalaziti u različitim koncentracijama. Pojedina piva posjeduju slične karakteristike što omogućava njihovo grupiranje po stilovima.

2.1. OSNOVNE SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA

2.1.1. Slad

Pivo se uglavnom proizvodi od dvorednog pljevičastog pivskog ječma, vrste *Hordeum sativum*. Takav ječam sadržava veći udio škroba koji je iznimno važan za dobivanje kvalitetne sladovine, a manji udio pljevice u kojoj se nalaze manje poželjni polifenoli i gorki sastojci. Škrob čini 63% suhe tvari zrna ječma. Škrob kao takav biljka ne može iskoristiti za rast i razvoj, ali uz pomoć enzima u zrnu dolazi do pretvorbe škroba u šećere koji su biljci od koristi. Slad se može definirati kao prokljalo i osušeno zrno ječma.

Sladenje je proces koji započinje čišćenjem zrna ječma, a ono podrazumijevanja izdvajanje prašine, stranih tijela i oštećenih zrna. Dio nečistoća s površine zrna ukloni se i u sljedećoj fazi, fazi močenja. Tijekom tog procesa, dolazi do upijanja vode i povećanja volumena zrna. Veći udio vode u zrnu naposljetku dovodi do aktivacije enzima i snažnijeg unutarstaničnog disanja što kao posljedicu ima nakupljanje CO₂ i oslobađanje topline. Da bi se izbjegla degradacija zrna ječma te da bi klijanje moglo započeti brzo i odvijati se bez problema, važna je intenzivna aeracija.

U trenutku kada se udio vode u zrnu povećao na iznad 30%, započinje klijanje. Zrno tijekom procesa klijanja razvija korjenčić i lisnu klicu. Korjenčić izbija na bazi zrna i postaje vidljiv, a nakon završetka procesa klijanja uklanja se sa zrna. Razvoj lisne klice preduvjet je za lakše razlikovanje ječma od slada. Ona probija samo kroz testu pa je na zrnu vidljivo ispupčenje koje ječam ne posjeduje. Aktivni enzimi u zrnu (najznačajniji α -amilaza, β -amilaza, granična dekstrinaza) tijekom klijanja razgrađuju škrob na jednostavnije šećere važne za rast i razvoj korjenčića i lisne klice. Šećeri koje je biljka iskoristila više nisu dostupni u procesu proizvodnje piva, zbog čega je iznimno važno ograničiti njihovo stvaranje. Ovisno o vrsti slada koji se želi dobiti, vrijeme provođenja

modifikacije ječma varira. Naime, previše razgrađeni ili nedovoljno razgrađeni slad može dovesti do problema u varionici i fermentaciji.

Dobiveni zeleni slad potrebno je sušiti kako bi udio vode pao na ispod 5%, nakon čega je spreman za skladištenje. Procesom sušenja želi se prekinuti klijanje, modifikacija i enzimska aktivnost, no, važno je paziti da enzimski potencijal ostane sačuvan. Također, sušenje je trenutak kada dolazi do stvaranja spojeva koji pivu daju okus i boju, a nazivaju se Maillardovi spojevi. Omjer i količina nastanka Maillardovih spojeva ovisi o nekoliko čimbenika - temperaturi, vremenu zadržavanja na toj temperaturi, pH-vrijednosti te udjelu vode u zelenom sladu. Proces hlađenja slada nastupa nakon sušenja. Još uvijek prisutni korjenčići odstranjuju se nakon čega se slad skladišti, u posebnim slučajevima polira nakon skladištenja, te priprema za isporuku. (Kunze, 2014.)

2.1.2. Voda

Voda ima veliku važnost u proizvodnji piva, prvenstveno jer je u pivu prisutna u volumnom udjelu koji varira između 91-98%. Neka mjesta u svijetu poznata su po svojoj vodi (Pilsen, Burton upon Trent, Dublin i dr.). Svaka od tih voda doprinose proizvodnji jedinstvenog piva zbog karakteristične tvrdoće. Tvrda voda nastaje kada se mekana kišnica, prolaskom kroz zemlju, obogati solima magnezija i kalcija. Spomenute soli s ugljičnom kiselinom stvaraju karbonatnu tvrdoću, dok sa sumpornom i solnom kiselinom stvaraju nekarbonatnu tvrdoću. Kod proizvodnje piva, iznimno je važna karbonatna tvrdoća. Svijetla piva s većim udjelom hmelja puno su više osjetljivija na tvrdoću vode, pa se tako pilsner proizvodi od mekane vode, čija karbonatna tvrdoća mora biti manja od 1,3 °nj, dok se za tamnija piva s manjim udjelom hmelja može koristiti voda karbonatne tvrdoće od 14 °nj. (Vogel, 1999.) Pošto se na tvrdoću vode u prošlosti nije moglo utjecati, pomoću raspoložive vode moglo se dobiti pivo samo određenog stila. Tehnologija koja je razvijena u zadnjih pedesetak godina omogućava modernim pivovarama svuda po svijetu da prilagode svoju lokalnu vodu stilu piva koji žele proizvesti.

2.1.3. Hmelj

Hmelj se u pivarstvu koristi već više od tisuću godina. Najraniji poznati uzgoj hmelja započeo je u Srednjoj Europi, od kuda se, na početku 16. stoljeća proširio na Zapadnu Europu i Veliku Britaniju. Danas, postoji više od sto vrsti hmelja korištenih u pivarstvu.

Cilj uzgoja temelji se na održavanju poželjnih karakteristika hmelja, uz poboljšanje prinosa i otpornosti na bolesti. Hmelj je prirodni konzervans, a njegova je uloga od samih početaka bila da produži trajnost piva. Nakon fermentacije, hmelj se dodavao izravno u bačve kako bi pivo ostalo svježije tijekom transporta. Tako je i jedan od danas najpoznatijih stilova piva, Indian pale ale, razvijen. (Palmer, 2006.) Ženska biljka hmelja razvija cvat – šišaricu. Unutar šišarice nalazi se lupulin, ljepljivi žuti prah s dna listića, koji se stvara u žlijezdama u kojim se izlučuju smole i eterična ulja. Lupulinske žlijezde zaslužne su za gorčinu (gorke hmeljne smole) i spojeve arome (aromatična eterična ulja) koja su važna u proizvodnji piva. Razlikuje se gorki hmelj, koji je bogat α -kiselinama i daje gorčinu u pivu, i aromatični hmelj, bogat eteričnim uljima koja daju hmeljnu aromu. Kako bi pivo postalo gorko, α -kisljine iz hmelja moraju izomerizirati na visokim temperaturama prilikom kuhanja sladovine. Gorčina iz hmelja balansira slatkoću sladnog šećera te pruža osvježavajuću notu tijekom ispijanja. Nelson Sauvin, Zatec, Cascade, Fuggles, Amarillo su samo neki od najznačajnijih vrsta hmeljeva u današnjem pivarstvu. Hmelj na tržište odlazi u obliku šišarica, peleta ili ekstrakta hmelja.

2.1.4. Kvasac

Kvasac je najvažniji, a ujedno i najzanimljiviji sastojak koji se koristi za proizvodnju piva. Postoji tisuće različitih vrsti kvasaca koji nas okružuju, ali većina je pivara zainteresirana jedino za kvasce roda *Saccharomyces*, koji od šećera iz sladovine, u anaerobnim uvjetima proizvodi alkohol i CO₂, zbog čega su se pokazali najbolji za upotrebu u proizvodnji piva. Pivari su zaduženi osigurati da temperatura, kisik i količina prisutnog šećera zadovoljavaju potrebe kvasca. Kvasac pivo obogaćuje i širokim rasponom aroma, od kojih se neke smatraju dobrima za pivo, dok se druge žele izbjeći. (McFarland i Sandham, 2009.) Neki belgijski sojevi proizvode voćne estere (koji daju aromu na bananu, trešnju i sl.), dok neki njemački sojevi fenolne estere (koji daju aromu na klinčić). Ipak, većina kvasac ne proizvodi toliko dominantne arome kao prethodno navedeni sojevi. Veliki dio industrijskih pivovara ima vlastite sojeve. Kvasci se lagano prilagode na specifične uvjete pivovare, pa će tako dvije pivovare koje proizvode isto pivo, od istog soja kvasca, dobiti jedinstvena piva. Neke pivovare dobavile su više različitih sojeva kvasaca iz različitih dijelova svijeta, te ih ponudili za prodaju kućnim pivarima. Generalna podjela kvasaca je na kvasce gornjeg i kvasce donjeg vrenja. Kvasci se na tržištu nalaze u dva glavna oblika – suhi i tekući kvasac. Dostupne su i čiste kulture kvasca koje dolaze u petrijevim zdjelicama. S takvim

kvascem postupa se isto kao i s tekućim. Suhi kvasci su odabrani, otporni sojevi koji su dehidrirani kako bi se olakšalo skladištenje i transport. Za najbolje rezultate, potrebno je takav kvasac rehidrirati neposredno prije ubacivanja u fermentor i početka fermentacije.

2.2. PODJELA PIVA PREMA VRSTI KVASCA ZA VRENJE SLADOVINE

Industrijske pivovare u Hrvatskoj i diljem svijeta, sklone su proizvodnji lager piva. Lager pivo dobiva se od pivskog kvasca vrste *Saccharomyces uvarum*, takozvani kvasac donjeg vrenja. Naziv je dobio po tome što nakon završetka primarne fermentacije, kvasac pada na dno fermentora. Vrenje se odvija pri niskim temperaturama (10 °C – 13 °C), a proces odležavanja potrebno je provoditi do tri ili više tjedana (0 °C – 1 °C). Lager pivo zahtjeva duže odležavanje od Ale piva, međutim, zbog velikih poreznih troškova na alkohol, pivovarama je u interesu da pivo što prije stave na tržište pa se odležavanje ograničilo na dva do tri tjedna. Lager je kategorija piva sa širokim rasponom podstilova. Oni se kreću od niskokaloričnih, slabo hmeljenih američkih lager piva do bogatih, aromatičnih dortmundskih tamnijih piva. Jaka lager piva dobila su naziv "Bock", a iznimno jaka "Doppel Bock".

Ale piva uglavnom proizvode craft pivovare i kućni pivari, kojima je ova vrsta piva zanimljivija, a ujedno i jednostavnija za proizvodnju prvenstveno zbog temperature fermentacije. Ale pivo dobiva se pomoću pivskog kvasca vrste *Saccharoyces cerevisiae* ili kvasca gornjeg vrenja. Spomenuti kvasac nakon završetka primarne fermentacije ispliva na površinu, što može biti problem kod sakupljanja kvasca ako se koriste hermetički zatvoreni fermentori, međutim, izrađeni su novi sojevi spomenutog kvasca koji na početku ispliva na površinu, ali s vremenom flokulira i pada na dno. Vrenje se provodi pri višim temperaturama nego kod kvasca donjeg vrenja, a kreće se između 18 °C – 21 °C. Najpoznatijim predstavnikom grupe Ale piva može se smatrati Pale ale. Pale ale je pivo koje ima izraženi okus i aromu, ali ne i puno alkohola te uravnoteženu hmeljnu gorčinu. Osim Pale ale-a, ovisno o vrsti slada, sastavu vode, boji, gorčini i koncentraciji alkohola ističu se i Brown ale, Scottish i Irisch ale, Barley wine, Altbier, Kölsch, Porter, Stout i drugi. (Marić, 2009.)

2.3. PODJELA PIVA PREMA MASENOM UDJELU EKSTRAKTA U SLADOVINI

Sladovina dobivena u varionici sadržava određeni udio ekstrakta koji pivaru naznačava koliko jako pivo će dobiti. Udio ekstrakta kod "Slabih piva" kreće se između 6 - 9 %. Takva piva zbog malog udjela ekstrakt, nakon fermentacije sadržavaju i mali udio alkohola. Piva koja se u svijetu najčešće proizvode i najviše konzumiraju nazivamo "Standardna piva" s 10 - 12 % ekstrakta. Piva s masenim udjelom suhe tvari, od 12,5 - 14 % nazivaju se "Specijalna piva" ili "Full beer" i poznata su po izraženoj sladnoj aromi, te su skuplja od većine standardnih piva. U Njemačkoj i Austriji - Bock, Stark ili Festbier piva ("Dvostruko sladna piva") smatraju se izrazito snažnim vrstama piva zbog 18 - 22 % ekstrakta u sladovini, te ona nakon fermentacije daju proizvod s velikim udjelom neprevrelog ekstrakta i alkohola. Kao piva s najvećim postotkom ekstrakta ističu se "Ječmena vina" (16 - 26 %). Može ih se uspoređivati s vinima jer posjeduju sličan volumni udio alkohola. (Marić, 2009.)

2.4. PODJELA PIVA PREMA GLAVNOJ SIROVINI

Ječmeni slad je osnovna žitarica za proizvodnju piva. Svaka pivovara koja proizvodi pivo prema Zakonu o čistoći piva (Reinheitsgebot) koristi slad dobiven od ječma. Razlog zbog kojeg je ova sirovina toliko važna je velika količina enzima prisutnih u sladu koji omogućavaju brzu i snažnu pretvorbu škroba u šećer, te prisutnost drugih elemenata i elemenata u tragovima (npr. cink) koji su ključni kako bi kvasci mogli rasti i razvijati se te konačno proizvesti točno onakvo pivo kakvo je pivar želio. Sirovina koja često zamjenjuje 50 % usipka ječmenog slada je pšenica, tj. pšenični slad. On se koristi za proizvodnju pšeničnog piva (Weissbier), koje spada u piva gornjeg vrenja. Odabiru se zimске sorte pšenice koje sadrže manji udio proteina i veći udio ekstrakta. Karakterističan sastojak pšenice je protein gluten. Gluten može proizvesti probleme u proizvodnji piva pa se u pivarstvu koriste sorte koje imaju njegov što manji udio. Pšenično pivo razlikuje se od ostalih piva po svojoj mliječno - bijeloj boji. Za proizvodnju afričkog piva, koristi se sirak (proso). Afričke zemlje nisu pogodne za uzgoj ječmenog slada, zbog čega ga se ni ne koristi. Sirak sadrži enzime koji razgrađuju škrob, međutim, njihov je enzimski potencijal slabiji od onog u ječmu. U Austriji i Njemačkoj kao sirovina za proizvodnju piva koristi se raženi slad, iako nije prihvaćen kao sirovina za proizvodnju piva. Raž pivu daje specifičan ljutkasti, voćni i pomalo gorkasti okus. (Marić, 2009.)

2.5. PODJELA PIVA PREMA BOJI

Boja piva koje je natočeno u čašu može imati utjecaj na način procjene proizvoda kod potrošača. Ukoliko se pivo ispija iz limenke ili boce ovo svojstvo će imati manji utjecaj na potrošača. Boja piva je uglavnom posljedica prisutnosti melanoida i karamela u sladu ili upotrebljenih pomoćnih tvari. Boji pridonose i oksidirani polifenoli, posebno kada su prisutni metali u tragovima (željezo, bakar). U svijetlim pivima žuti vitaminom riboflavin može značajno doprinijeti boji. Generalno, osnovne boje po kojima se piva razvrstavaju su žuta, crvena, smeđa i crna boja.



Slika 1. Boje piva prikazane kroz EBC (European Brewery Convention) i SRM (Standard Reference Method) vrijednost (Izvor: <https://depositphotos.com/186562472/stock-illustration-beer-color-chart.html>, 26.8.2019.)

2.6. PODJELA PIVA PREMA VOLUMNOM UDJELU ALKOHOLA U PIVU

“Ova podjela uglavnom služi za određivanje posebnog poreza na pivo. Porez je veći što je viši volumni udio alkohola u pivu. Volumni udio alkohola u pivima može biti od 0,5 do 10 % (tež./tež.)

1. **Bezalkoholna piva** – mogu sadržavati do 0,5 vol.% alkohola. Iznimka su islamske zemlje, gdje bezalkoholno pivo ne smije sadržavati nimalo alkohola.
2. **Piva s malim udjelom alkohola**- tzv.lagana piva, jer im je udjel alkohola ispod 3,5 vol. % alkohola.
3. **Standardna ili jednostavna piva** – standardna lager piva i piva gornjeg vrenja (ale) sadrže preko 3,5 vol. %.
4. **Jaka piva** – proizvode se iz sladovine s preko 12,5 % ekstrakta i sadrže preko 5 vol.%.
5. **Ječmena vina** – udjel alkohola kao u vinu (> 10 vol. %).“ (Marić, 2009.)

3. OPĆENITO O KVASCIMA

3.1. BIOLOGIJA KVASACA

Kvasci su nemicelijske gljive, kuglastog ili jajolikog oblika. Većina organizama iz carstva gljiva spada u višestanične organizme, za razliku od njih, kvasci su jednostanični. Veličina stanice kvasca kreće se između 5 do 10 mikrona, što je čini 5 puta većom od bakterije, ali je i dalje premala da bi se uočljiva golim okom.

Kvasci se većinom sastoje od vode (75%) dok sastav suhe tvari varira:

- Proteini – 45 do 60%
- Ugljikohidrati – 25 do 35 %
- Lipidi – 4 do 7 %
- Minerali – 6 do 9 %

Mineralni sastav (na 100 g suhe tvari):

- Fosfati – 2000 mg
- Kalij – 2400 mg
- Natrij – 200 mg
- Kalcij – 20 mg
- Cink – 7 mg
- Magnezij – 2 mg
- Željezo, mangan i bakar u tragovima

Stanica kvasca sadrži i nekoliko vitamina (mg/100g suhe tvari kvasca):

- Tiamin (B1) – 8 do 15 mg
- Riboflavin (B2) – 2 do 8 mg
- Nikotinska kiselina (niacin, B3) – 30 do 100 mg
- Folna kiselina (B9) – 2 do 10 mg
- Pantotenska kiselina (B5) – 2 do 20 mg
- Piridoksal (B6) – 3 – 10 mg
- Biotin (H) – 0,1 do 1 mg (Kunze, 2014.)

3.1.1. Struktura stanice kvasca

Osnovni tip stanice je blastospora, a razmnožava se nespolno (pupanjem). Na površini blastospore stvara se pup koji postepeno raste tijekom čega u roditeljskoj stanici dolazi do dijeljenja jezgre, a novonastala jezgra prelazi u pup. Kada pup dosegne veličinu roditeljske stanice, dolazi do razdvajanja staničnog materijala i pup se otkida. Pup se ne pojavljuje slučajno na površini stanice, već na specifičnom mjestu. Na mjestu odvajanja pupa ostaje ožiljak, čiji oblik je karakterističan za pojedinu vrstu. Ožiljak je sastavljen uglavnom od hitina, te se na tom mjestu nikada se ne stvara novi pup. Ožiljci su često vidljivi pod svjetlosnim mikroskopom. Brojanjem ožiljaka može se utvrditi starost pojedine stanice. Tijekom jedne fermentacije, kvasac pupa samo nekoliko puta, dok u laboratorijskim uvjetima mogu pupati i do 50 puta. Prosječni ale kvasac neće pupati više od 30 puta tijekom svog životnog vijeka (višebrojnih fermentacija), dok će lager kvasac pupati tek 20 puta.

Stanična stijenka je debeli zaštitni sloj, uglavnom sastavljen od ugljikohidrata, koji okružuje stanicu. Polisaharidi, proteini i lipidi sačinjavaju 30 % suhe tvari stanične stijenke. Oko 10 % proteina nalazi se u stijenci, oni čine 3 važna sloja. Unutarnji sloj većim se dijelom sastoji od hitina, srednji sloj od manoproteina a vanjski sloj od kombinacije hitina i manoproteina.

Stanična membrana sastoji se od fosfolipidnog dvosloja koji odvaja staničnu stijenku od unutrašnjosti stanice. Molekule fosfolipida dijele se na hidrofobne i hidrofilne molekule. Iako te molekule nisu fizički povezane, one tvore nepropustan dvostruki sloj. Polupropusna membrana određuje što ulazi i što izlazi iz stanice, a propusna je samo za vodu i otopljene plinove. Kombinacija lipida, sterola i proteina daje membrani fluidnost i fleksibilnost, te mogućnost pupanja za stvaranje novih stanica. Apsorpcija otopljenih spojeva kao što su šećeri, aminokiseline i minerali, odvijaju se preko proteina koji su integrirani u membrani i koji su specifični za određene spojeve.

Citoplazma je centralni prostor u kojem se odvijaju procesi sinteze i razgradnje (glikoliza, sinteza masnih kiselina, biosinteza proteina). Unutarstanična tekućina poznata i kao citosol, mješavina je tvari koje su otopljene u vodi. Važno je spomenuti da se u citosolu nalaze enzimi koji su uključeni u anaerobnu fermentaciju. Ti enzimi onemogućavaju stanici da pretvori glukozu u energiju čim ona uđe u stanicu. Citoplazma je ujedno i mjesto skladištenja glikogena te je iznimno bogata molekulama RNA. Pokazalo se da je

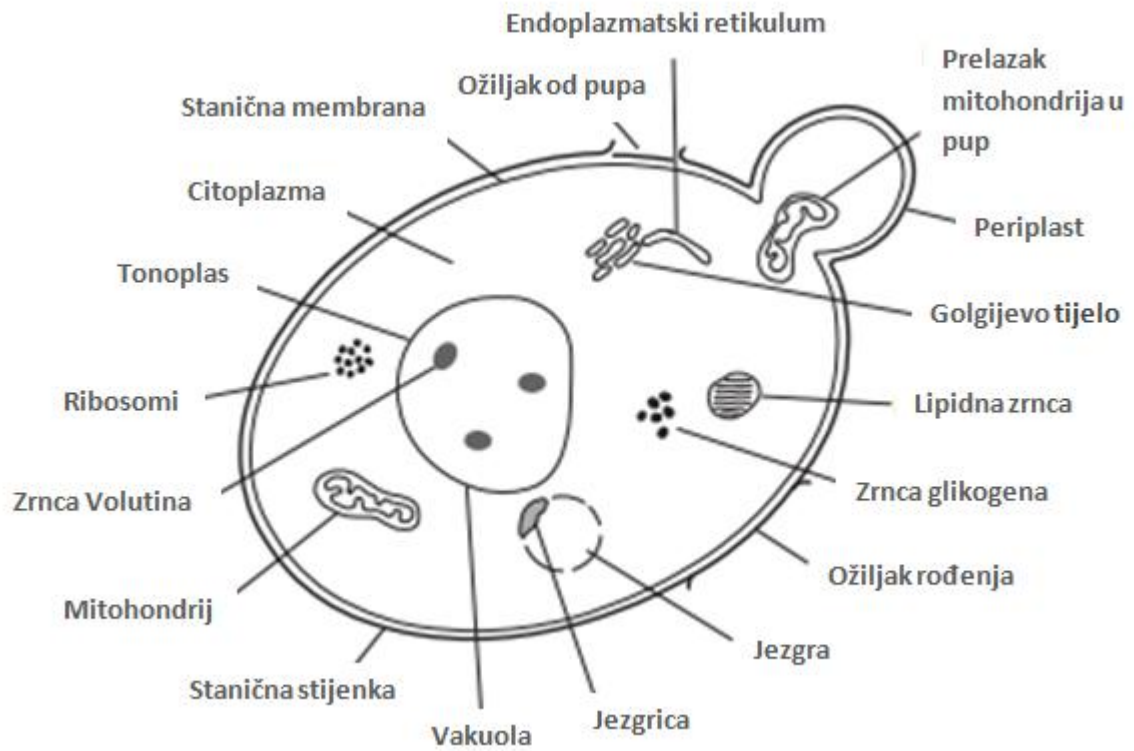
citoplazma kisela, pH-vrijednosti od 5,2, iako zbog mnogih procesa koji se odvijaju, određeni dijelovi citoplazme mogu sadržavati višu ili nižu pH-vrijednost.

Kvasac sadrži veliki broj mitohondrija. Mitohondrij je citoplazmatski organel čija je glavna uloga proizvodnja energije putem oksidacijske fosforilacije. On se sastoji od dvije membrane gdje se odvija pretvorba piruvata u ugljikov dioksid i vodu, a uz to i ATP. Iako se kod kvasca aerobna respiracija vrlo rijetko događa tijekom fermentacije, mitohondriji su i dalje važni za normalnu funkciju stanice, to uključuje provedbu flokulacije, metabolizam aminokiselina i diacetila, biosintezu sterola te fiziološku prilagodnu stresu. U mitohondriju se nalazi i mali dio DNA kodova za pojedine mitohondrijske proteine.

Vakuola je membranom vezana struktura čija je uloga skladištenje hranjivih tvari, a tamo se ujedno odvija i razgradnja proteina. Njihova veličina i broj variraju ovisno o fiziološkom stanju i stupnju staničnog ciklusa. Tijekom rasta kvasca, u početnim fazama fermentacije, vakuole se često ne mogu uočiti svjetlosnim mikroskopom. Izraženo povećanje vakuole povezano je sa stresom kvasca, posebno u fazi gladovanja, pri kraju fermentacije te prilikom skladištenja kvasca.

Jezgra je mjesto gdje je sadržan najveći dio genetskog materijala stanice. Jezgra je okružena duplom membranom koja ima pore. U stacionarnoj fazi, jezgra je često povezana s vakuolom. Tijekom cijelog staničnog procesa, izgled i struktura jezgre se mijenjaju. U jezgri je sadržana i plazma, jezgrina matrica, kromosomi te jezgrica koja se sastoji od ribonukleinske kiseline. Molekule DNA čuvaju informacije bitne za stanicu, koja koristi mRNA kako bi prenijela informaciju u citoplazmu za sintezu proteina. (White and Zainasheff, 2010.)

Golgijevo tijelo sadrži niz membrana i vezikula. Dio je sustava izlučivanja kvasca i stvara vezu između endoplazmatskog retikuluma, tonoplasta i stanične membrane. Naborani endoplazmatski retikulum stanici koristi za sintezu proteina, dok se u glatkom endoplazmatskom retikulumu odvija sinteza lipida i razni detoksikacijski procesi. Proteini koji su nastali u naboranom ER transportiraju se uz pomoć Golgijevog tijela do mjesta u stanici gdje su potrebni. (Briggs i sur., 2004.)



Slika 2. Presjek stanice kvasca s pupom (Briggs i sur., 2004.)

3.1.2. Metabolizam kvasca

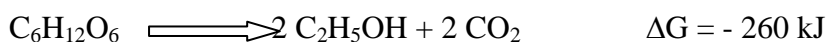
Metabolizam je skup svih reakcija koje se odvijaju u stanici. Za provođenje metaboličnih procesa, kao i stvaranje novih staničnih struktura, stanici kvasca potrebna je energija i hranjive tvari. Kvasci su heterotrofni, fakultativno anaerobni organizmi. Smatra se da imaju razmjerno svestran metabolizam i da se mogu lako prilagoditi na različite uvjete, a sve to ovisi o dostupnosti kisika te količini prisutnog ekstrakta. Kvasci koriste ugljikohidrate kao izvor ugljika i za stvaranje energije koja je sačuvana u obliku ATP-a. Smanjenje udjela hranjivih tvari, formiranje etanola, CO₂ i drugih metabolita koji sudjeluju u kreiranju karaktera piva, posljedica su rasta kvasca. Raspon ugljikohidrata koje kvasac može iskoristiti, te koncentracija etanola koju može tolerirati genetski su određeni te ovise o izabranom soju. (Briggs i sur., 2004.)

Nakon što je kvasac inokuliran u sladinu, počinje stvarati rezerve ugljikohidrata, tj. glikogena, te koristi prisutan kisik kako bi obnovio svoju staničnu membranu za optimalni unos šećera i hranjivih tvari. Neke tvari lako difundiraju kroz staničnu membranu, dok su za neke potrebni specifični transportni mehanizmi. Kvasac pojedine šećere iskorištava lakše od drugih pa ih apsorbira specifičnim redosljedom, počevši od jednostavnijih. Apsorbira monosaharide (glukoza, fruktoza), disaharide (maltoza i malo saharoza) pa trisaharid maltotriozu te ih tim redosljedom i fermentira. Veći ugljikohidrati (maltotetraoza) nisu podložni fermentaciji. Smatra se da se 98% šećera iskoristi za dobivanje alkohola, a ostalih 2% potroši na disanje. Kvasac unosi glukozu bez trošenja energije, putem olakšane difuzije. Zbog vrlo lakog iskorištavanja glukoze od strane kvasca, prisutnost glukoze potiskuje iskorištenje drugih šećera, maltoze i maltotrioze. Kvasac je jedini živi organizam koji u uvjetima bez zraka započinje fermentaciju umjesto energetski snažnije respiracije. S obzirom na to da je dobivena energija disproporcionalno veća kod disanja u odnosu na fermentaciju, u prisutnosti kisika kvasac direktno prelazi na respiraciju.

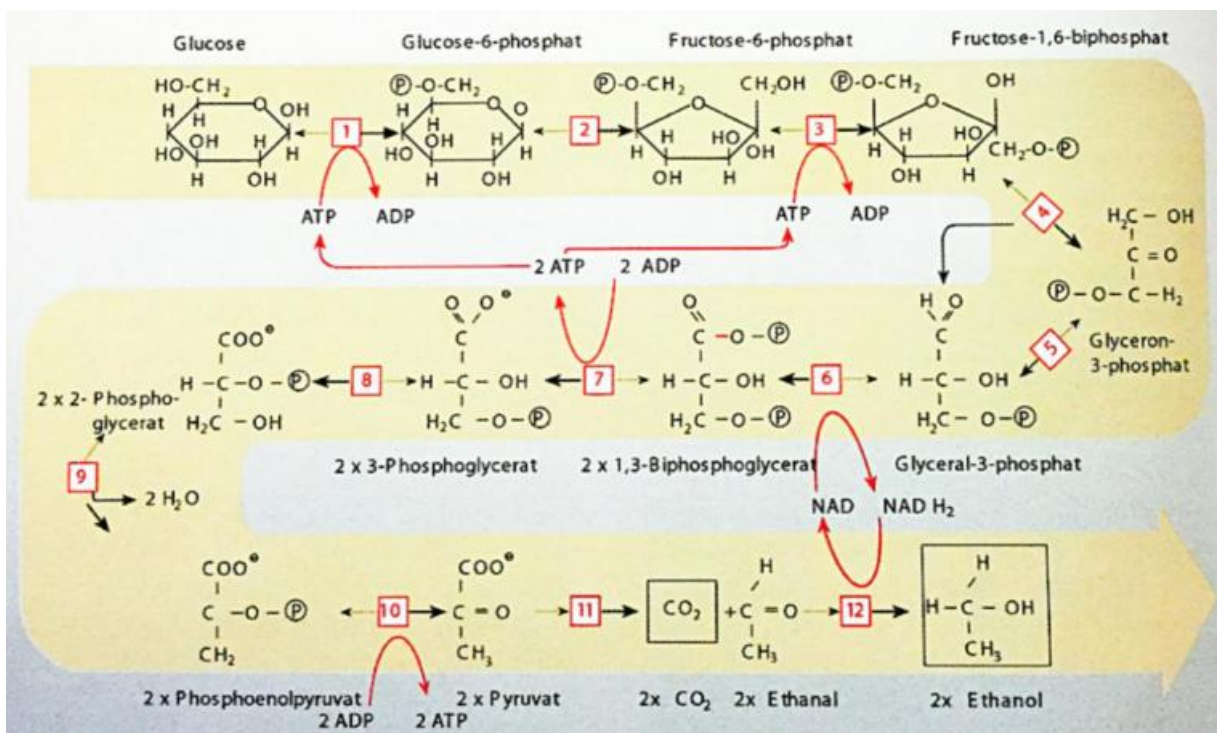
Stanično disanje:



Alkoholna fermentacija:



Potrebnu energiju većina živih organizama može dobiti kroz unutarstanično disanje kod kojeg se piruvat prebacuje do mitohondrija gdje ulazi u Krebsov ciklus i putem respiracije razlaže na CO_2 i vodu uz dobivanje energije (36 ATP-a). Kvasac koristi NAD^+ (Nikotinamid adenin dinukleotid) za početni raspad glukoze. Kod procesa alkoholne fermentacije (anaerobna glikoliza), glikoliza do faze piruvata teče identično kao kod unutarstaničnog disanja. Međutim, bez kisika, piruvat ne odlazi u Krebsov ciklus. Bez NAD^+ ne može dolaziti do stvaranja piruvata niti ATP-a, što upućuje da je kvascu ključno doći do NAD^+ u situacijama bez kisika. Reakcija dobivanja etanola iz piruvata omogućava proizvodnju potrebnog NAD^+ . Prethodno spomenuta reakcija odvija se u citoplazmi gdje se piruvat raspada na CO_2 i etanal (acetalaldehid) uz pomoć enzima piruvat - dekarboksilaze, nakon čega slijedi pretvorba etanala u etanol pomoću enzima alkoholne dehidrogenaze tijekom čega se iz NADH_2 otpušta vodikov ion i nastaje NAD^+ , uz puno manji prinos energije (2 ATP-a).



Slika 3. Reakcija dobivanja etanola u stanici kvasca (Kunze, 2014.)

Postoji još jedan način pri kojem kvasac stvara etanol. Prisutnost visokog udjela šećera u sladovini inhibira kompleks respiracijskih enzima te započinje fermentacija (Crabtree

effect). To je fenomen u kojem kvasac *S. Cerevisiae* proizvodi etanol u prisustvu kisika umjesto da stvara biomasu putem Krebsovog ciklusa.

3.1.3. Korištenje nutrijenata

Kvascu je potreban optimalan udio šećera, dušika, vitamina, fosfora i metala u tragovima. Svi spomenuti elementi sadržani su u sladovini, ili barem većina njih. Međutim, ukoliko se pivo proizvodi od kukuruza, riže ili šećernog sirupa većina nutrijenata neće biti prisutna u dobivenoj sladovini, pa je važno da se oni nadomjeste.

Stanica kvasca sadrži 10 % dušika na suhu tvar. Dušik je u sladovini prisutan u obliku aminokiselina, koje kvasac može apsorbirati, ili ih po potrebi sam sintetizirati. Pošto kvasci ne posjeduju transportne proteine koji bi mogli prenositi makromolekularne komponente, apsorbirati se mogu samo niskomolekularne aminokiseline (s najviše 4 C-atoma). „Pierce je klasificirao aminokiseline u pivu na temelju uzoraka asimilacije tijekom fermentacije (tablica 1.). Oni u prvoj skupini se asimiliraju odmah nakon što kvasac dođe u dodir sa sladovinom. Oni iz klase B se asimiliraju sporije, dok se oni iz klase C ne koriste dok se aminokiseline iz Klase A ne nestanu iz sladovine. Prolin je jedini član klase D i njegova disimilacija zahtijeva prisutnost mitohondrijske oksidaze, koja nije prisutna u potisnutim i anaerobnim uvjetima fermentacije.“ (Wang i Brandriss, 1987.)

Tablica 1. Klasifikacija aminokiselina ovisno o asimilaciji iz sladovine tijekom fermentacije (Pierce, 1987.)

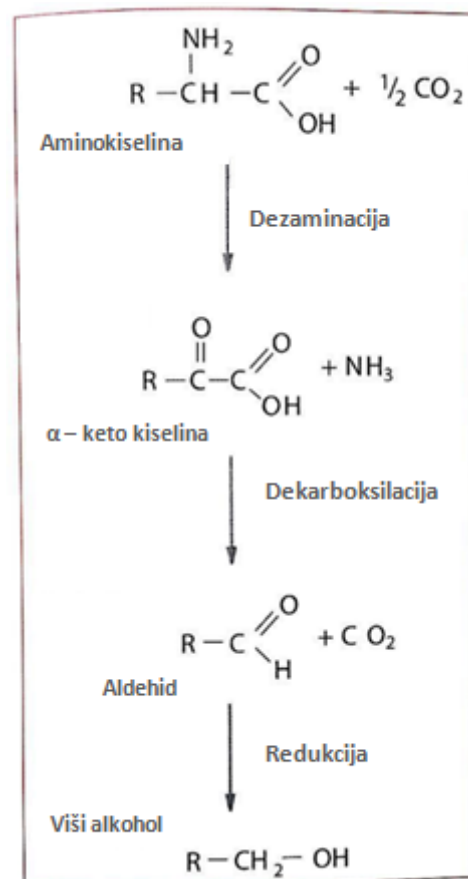
Klasa A	Klasa B	Klasa C	Klasa D
Arginin Asparagin Aspartatna kiselina Glutaminska kiselina Glutamin Lizin Serin Treonin	Histidin Izoleucin Leucin Metionin Valin	Alanin Glicin Fenilalanin Triptofan Tirozin	Prolin

Osim što su aminokiseline, odnosno dušik, kvascima važni za rast i razvoj (stvaranje novih staničnih struktura), važne su i za stvaranje viših alkohola koji se izlučuju kao nusprodukti fermentacije.

Viši alkoholi stvaraju se u tri koraka:

1. Dezaminacija – proces uklanjanja i preslagivanja amino grupe iz aminokiseline i stvaranja α -keto kiseline.
2. Dekarboksilacija – proces uklanjanja CO_2 iz α -keto kiseline i stvaranje aldehida.
3. Redukcija – proces uklanjanja kisika iz aldehida i stvaranja slobodnog alkohola.

Poželjna udio aminokiselina u 12%-tnoj sladovini je od 200 do 230 mg/L slobodnog amino dušika (FAN – free amino nitrogen).



Slika 4. Stvaranje viših alkohola (Kunze, 2014.)

Određena količina kisika u početnoj fazi fermentacije je od velikog značaja. Kako bi se sinteza lipida uspješno provela, potreban je kisik. Kvasac od lipida koristi masne kiseline i sterole iz sladovine. Neki od njih tvore staničnu strukturu, neki su izvor metaboličkih intermedijera za anaboličke i kataboličke reakcije, dok drugi sudjeluju u signalnom sustavu stanice (Briggs i sur., 2004.). Uz izvore lipida iz sladovine, kvasac je sposoban sintetizirati vlastite nezasićene masne kiseline. Sinteza počinje s piruvatom a kao intermedijarni produkt stvara se octena kiselina. Nezasićene masne kiseline utječu na fleksibilnost stanične membrane, ukoliko nisu prisutne, nije dovoljno efikasan prijenos tvari. Masne kiseline ne utječu na stabilnost piva jer su inkorporirane u membrani, ali ako dođe do autolize, doći će i do oslobađanja masnih kiselina koje tada mogu loše utjecati na okus i miris piva.

Sladovina kvasce mora opskrbiti i s određenim rasponom metalnih iona. Odsutnost ovih elemenata ima negativne posljedice na aktivnost cijelog staničnog metabolizma, to se posebno odnosi na veliki broj enzima koji zahtijevaju ko-faktore metalnih iona za svoju potpunu aktivnost. Unošenje metalnih iona može biti pasivan, aktivan ili kombinirani

proces. Tu razlikujemo dva mehanizma – biosorpcija i bioakumulacija. Biosorpcija je brzi, pasivni proces pri kojem se metalni ioni vežu na staničnu stijenku kvasca. Karakteristike ovog procesa su te da proces nije ovisan o temperaturi, ne dolazi do gubitka energije, nije inhibiran upotrebom metaboličkih inhibitora te nije važna vitalnost kvasca. Bioakumulacija posjeduje sve značajke reguliranog, aktivnog procesa jer postoji ovisnost o temperaturi i može biti blokirana uporabom metaboličkih inhibitora. Pomoću bioakumulacije, ioni preko stanične membrane ulaze u stanicu. U stanici se ioni nalaze u vakuolarnom sustavu, a uzimanje i uporaba iona vrlo je precizno regulirana pošto pojedini ioni, već u vrlo niskim koncentracijama mogu biti toksički po kvasce. (Boulton i Quain, 2001.)

Nužni minerali uključuju kalcij, kalij, magnezij, cink i još mnogo metalnih iona u tragovima. Minerali su potrebni u enzimskim reakcija te služe kao ko-faktori. Oni olakšavaju unos materijala u stanicu, te ih kvasac koristi u strukturnim materijalima stanice. Kalcij je važan za flokulaciju kvasca i metabolizam, ali istraživači ne smatraju da je to normalno ograničavajući faktor za rast i fermentaciju u sladovini proizvedenoj od slada. Pivari ponekad dodaju kalcijeve soli tijekom fermentacije kako bi prilagodili pH-vrijednost i poboljšali flokulaciju. Mangan, koji stimulira rast kvasca, često se dodaje mnogim hranjivim formulacijama kvasca. Kalij ima mnogo funkcija unutar stanice i predstavlja do 2 % suhe tvari kvaščeve stanice, što je prilično puno s obzirom na to da su udjeli većine drugih minerala ispod 0,1%. Magnezij je važan u sintezi ATP-a, a to je oblik energije korišten unutar stanice. Kvasac ne može rasti u odsutnosti magnezija. Ukoliko je njegov udio ograničen, stanice kvasca proizvode komponente koje mogu nadoknaditi neke od funkcija magnezija. Istraživači su dokazali da magnezij poboljšava sposobnost stanice da izdrži stres i igra ulogu u sprečavanju stanične smrti kada se etanol nakupi u stanici. (White i Zainasheff, 2010.)

3.1.4. Flokulacija

Flokulacija je sposobnost kvasca da stvara nakupine od nekoliko tisuća stanica. Ova jedinstvena sposobnost ima veliko značenje za pivara, koji želi da se kvasac uzdigne na površinu ili padne na dno kako bi ga mogao izdvojiti iz mladog piva i krenuti u sljedeću fazu. Svaki soj ima određene flokulacijske karakteristike. Neki flokuliraju kroz kraće vrijeme i stvaraju veće i snažnije nakupine, dok drugi slojevi posjeduju upravo suprotne značajke. O potencijalu flokulacije također ovise i karakteristike gotovog piva. Ukoliko kvasac prebrzo flokulira, pivo će sadržavati manji postotak alkohola i bit će slađe. Isto tako, zbog nedovoljne flokulacije i veće prisutnosti stanica kvasca, konačni rezultat je

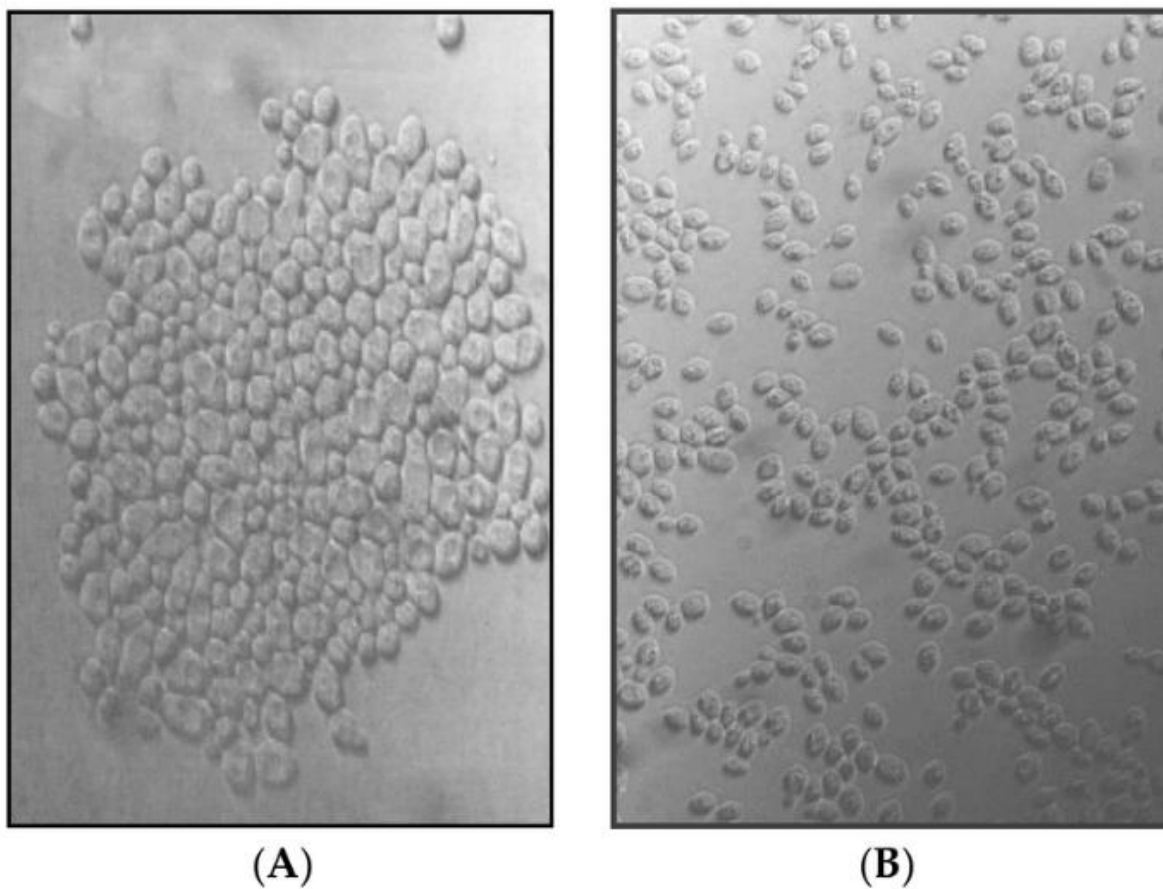
mutno pivo s mirisom na kvasce. Većina divljih kvasaca, kao i ostali kvasci iz prirode ne flokuliraju, već zaostaju u suspenziji duži vremenski period. Razlog tomu je što su im u suspenziji dostupni nutrijenti i šećeri potrebni za rast i razvoj.

Znanstvenici proučavaju biokemiju flokulacije dugi niz godina, ali još uvijek nije poznat cijeli mehanizam. Smatra se da izrazito važnu ulogu u procesu flokulacije ima stanični zid čiji sastav utječe da se susjedne stanice počnu povezivati jedna uz drugu. Stanični zid sastoji se od proteina i polisaharida, a zbog prisutnosti fosfata, površina staničnog zida negativno je nabijena. „Opseg negativnog naboja ovisi o soju kvasca, fazi rasta, dostupnosti kisika, gladovanju, broju generacije, dehidraciji i starosti stanice“ (Smart, 2000).

Ključni čimbenik flokulacije je soj kvasca. Naime, kao i svi živi organizmi, svaki soj kvasca posjeduje jedinstvenu genetsku informaciju koja određuje skup proteina (važna uloga lektina) koji se nalaze na staničnom zidu i koji posljedično utječu na sposobnost flokulacije. Utjecaj na stupanj flokulacije mogu imati i vanjski čimbenici (temperatura, početni sadržaj kisika, pH-vrijednost, kationi, pritisak i dr.). Kalcij je sastojak sladovine koji ima značajni utjecaj na proces flokulacije. Ako ovog elementa nema dovoljno, kvasci ne mogu flokulirati. Sladovina uglavnom sadrži dovoljnu količinu kalcija za potrebe kvasca, međutim ako se radi s vrlo mekom vodom, potrebno je osigurati njegovu minimalnu količinu (50 ppm).

Kvasci se mogu klasificirati kao visoko, srednje i nisko flokulirajući. Visoko flokuliraju kvasci počnu stvarati nakupine nakon tri do pet dana od početka fermentacije. Takvi kvasci stvaraju čvrsti sloj na dnu fermentora. Ukoliko kućni pivari rade pivo sa visokoflokulirajućim kvascima, ponekad je potrebno pomoću vrtložnog strujanja vratiti kvasac u suspenziju. Međutim, kolač s dna samo se djelomično raspada i to na velike nakupine koje se brzo počnu ponovno taložiti. Piva dobivena od visokoflokulirajućih kvasaca sadrže veći udio diacetila i estera. Srednjeflokulirajući kvasci zbog nešto dužeg zadržavanja u suspenziji daju piva s manjim udjelom diacetila i estera, takozvana "čišća piva". Komercijalne pivovare mogu imati dodatne probleme ako rade s prethodno spomenutim kvascima jer je potrebna dodatna filtracija, dok većina kućnih pivara ne filtrira pivo, često zbog brze konzumacije istog. Srednjeflokulirajući kvasci često se koriste za proizvodnju jače hmeljenih piva. Pivari rijetko koriste niskoflokulirajuće kvasce pošto oni duže vremenski zaostaju u suspenziji, tvoreći mutno pivo što može stvarati

velike probleme kod filtracije. Međutim, postoje stilovi piva (hefeweizen, witbier) kod kojih je mutnoća u pivu poželjna. (White i Zainasheff, 2010.)



Slika 5. Razlika između flokulirajućeg kvasca (A) i neflokulirajućeg kvasca (B) (Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Flocculation-characteristics-of-Saccharomyces-cerevisiae-strains-A-Flocculent-culture_fig4_324555072, travanj, 2018.)

3.1.5. Komponente arome

Tijekom primarne fermentacije dolazi do stvaranja važnih komponenata arome – diacetila, aldehida, viših alkohola, estera, sumpornih spojeva, organskih kiselina. Veća ili manja prisutnost pojedinih komponenata arome, na kraju procesa proizvodnje dati će pivo jedinstvenog okusa i mirisa, koje se potom može svrstati u određenu kategoriju piva.

Diacetil je komponenta arome koja je od velikog interesa za pivara jer čak i malo više koncentracije od granične utječe na aromu piva. Ukoliko ga ima u količini većoj od 0,1 mg/L pivu daje slatkasti i odbojan okus i miris po maslacu. Diacetil spada u skupinu vicinalnih diketona, zajedno sa 2,3-pentandionom, čija je aroma slabije istaknuta. Uz to, ovi spojevi spadaju u spojeve arome mladog (zelenog) piva, koji se biokemijskim putem uklanjaju za vrijeme dozrijevanja. Sa smanjenjem udjela diacetila, smanjuje se i udio ostalih spojeva koji su u pivu nepoželjni.

Stvaranje i raspadanje vicinalnih diketona može se podijeliti u tri faze:

1. faza – dolazi do stvaranja prekursora vicinalnih diketona u stanici kvasca koji ne posjeduju miris ni okus. Sinteza započinje stvaranjem pirogroždane kiseline (paralelno sa sintezom aminokiselina) iz koje nastaje 2-acetolaktat. Spomenuti spoj naposljetku izlazi iz stanice.
2. faza – procesom oksidativne dekarboksilacije nastali 2-acetolaktat pretvara se u vicinalne diketone (diacetil, 2,3-pentandion). Sniženje pH-vrijednosti, povišenje temperature i uvođenje kisika potpomaže pretvaranju prekursora.
3. faza – kvasac stvorene vicinalne diketone redukcijom prevodi u spoj 2,3-butandiol, čiji je prag osjetljivosti vrlo visok, pa nema nikakav efekt na gotovo pivo. Kako bi se redukcija (diacetil – acetoin – 2,3-butandiol) mogla provesti u što većoj mjeri, potreban je vrlo aktivan kvasac. (Kunze, 2014.)

Najznačajniji aldehyd u alkoholnoj fermentaciji je acetaldehyd zbog uloge neposrednog prekursora etanola. Formira se u ranijim fazama fermentacije (prva tri dana), nakon čega se njegov udio znatno smanjuje. Dok je prisutan u mladom pivu, izaziva aromu koja asocira na pljesnivo. U početnoj fazi fermentacije, njegov se udio kreće od 20 do 40 mg/L a u gotovom pivu od 8 do 10 mg/L. U nekim okolnostima, može zaostati u pivu i u višim

koncentracijama. Ta pojava najčešće je uzrokovana upotrebom slabog kvasca, prekomjernim uvođenjem kisika u sladovinu ili previsokom temperaturom fermentacije.

Dobivanje viših alkohola omogućava aktivna primarna fermentacija, a stvaranje alkohola prati i nestanak fermentabilnih šećera iz sladovine. Viši alkohola spadaju u spojeve arome gotovog (dozrelog) piva i ne mogu se naknadno ukloniti iz istog. Njihova minimalna koncentracija važna je za dobivanje kvalitetnog krajnjeg proizvoda. Oko 60% viših alkohola sastoji se od izoamil alkohola s udjelima aktivnog amilnog alkohola, izobutilnog alkohola i n-propanola. Viši alkoholi formirani se mogu kvašćevom pretvorbom aminokiselina u više alkohole procesima dezaminacijom, dekarboksilacijom i redukcijom, kao posrednici uz hidroksi- ili keto-kiseline te sintezom iz šećera preko acetata.

Esteri su nedvojbeno najvažniji aromatski spojevi koji doprinose konačnoj aromi piva. Ipak, u previsokim koncentracijama čine pivo neprijatnim. Stvaranje estera u najvećoj mjeri odvija tijekom aktivne faze rasta kvasca (esterifikacijom masnih kiselina s alkoholima), dok slabije tijekom odležavanja piva. Najdominantniji ester je etil-acetat, koji čini malo manje od polovice estera prisutnih u pivu. Voćnom okusu piva maksimalno doprinose etil-acetat (aroma po otapalu), izoamil-acetat (aroma po banani) i β -fenil-acetat (aroma po ruži), međutim ni doprinos ostalih estera ne može se zanemariti. Kvasci gornjeg vrenja proizvode više estera od kvasaca donjeg vrenja, zbog čega je i širi spektar estera poželjniji kod ale i tamnijih piva, nego kod lager piva. (Reed i Nagodawithana, 1991.) Koncentracija estera u pivu gornjeg vrenja kreće se od 40 mg/L do 80 mg/L, a kod piva donjeg vrenja od 10 mg/L do 30 mg/L. Stvaranje estera može se gledati kao vrlo kompleksan proces na koji utječe puno faktora, neki od njih su temperatura, aeracija, količina kvasca pri inokulaciji, koncentracija ekstrakta, visina fermentora i dr. (Marić, 2009.)

Sljedeći spojevi koje treba istaknuti, a također se stvaraju u procesu fermentacije jesu sumporni spojevi. Od hlapivih sumpornih spojeva na aromu piva najviše utječu H_2S , SO_2 i merkaptani. Niski im je prag osjetljivosti, a ukoliko su prisutni u koncentracijama višim od graničnih, pivu daju nezreli, neukusan okus. Kontaminacija piva hlapivim spojevima može se dogoditi i ako je prisutna termobakterija (*Thermococcus*, *Pyrococcus*). Sumpor je važan za rast kvasca, iako ga on apsorbira u vrlo niskim koncentracijama u obliku sulfata, aminokiseline koja sadrži sumpor ili bilo koje druge organske molekule koja sadrži ovaj element. Kvasac proizvodi H_2S u početnoj fazi fermentacije, kada kvasac najviše raste, a

za njegovu proizvodnju važne su aminokiseline koje sadrže sumpor. H_2S je hlapiv spoj, pa u većim količinama ispari uz pomoć ugljikovog dioksida to bolje što je viša temperatura i viša razina tekućine. Korištenjem sulfata iz sladovine, kvasac proizvodi SO_2 . Pozitivan učinak ovog spoja je njegovo trošenje kisika, što posljedično ima utjecaj na stabilnost arome u gotovom pivu. Za razliku od H_2S -a, sinteza sumporovog dioksida snažna je samo u zadnjim fazama rasta kvasca te traje do kraja fermentacije. DMS (dimetil-sulfid) u visokim koncentracijama daje aromu na kuhano povrće. Više DMS-a izbacuje se prilikom tople fermentacije. Udio DMS na početku fermentacije jednak je onom na kraju ako ne dođe do kontaminacije mikroorganizmima ili greške u proizvodnji. Merkaptani su spojevi kod kojih je $-OH$ skupa zamijenjena $-SH$ skupinom. Ukoliko se pivo ne puni u obojene boce, merkaptani mogu prouzročiti veliku štetu u pivu jer postoji velika vjerojatnost da će doći do stvaranja tzv. "Light-struck" arome. (Kunze, 2014.)

Organske kiseline nastale dezaminacijom u stanici kvasca otpuštaju se u pivu te mogu imati utjecaj na aromu piva. Neke od njih su butirična kiselina (aroma po užeglom), izovalerična kiselina (aroma po starom hmelju), dodekanoična kiselina (aroma po sapunu) i dr.

3.2. SOJEVI KVASACA

Kako bi se pojednostavilo razumijevanje i odabir kvasaca za proizvodnju određenog stila piva, nastala je generalna podjela kvasaca na kvasce gornjeg vrenja i kvasce donjeg vrenja.

3.2.1. Generalne karakteristike i razlike kvasaca gornjeg i donjeg vrenja

Kvasci gornjeg vrenja se još nazivaju i ale kvasci (*Saccharomyces cerevisiae*). Pivari razlikuju ale kvasce po njihovom ponašanju i proizvodnji aroma. „Tijekom fermentacije, hidrofobna površina ale kvasca uzrokuje hvatanje stanica kvasca na mjehuriće CO₂ pa tako odlaze na površinu gdje se sakupljaju.“ (Boulton i Quain, F.) Ta pojava pomaže pivarima u sakupljanju kvasaca, a poznata je i pod nazivom "top cropping". Ale kvasci su vrlo raznoliki po pitanju flokulacije. Generalno postoje visoko (English ale), srednje (American ale) i nisko (hefeweizen) flokulirajući ale kvasci. Kvasac koji se uzdigao na površinu još uvijek je vrlo vitalan i sadržava mali udio zaostalih čestica (hmelj, trop), međutim, pivo se tako izlaže kisiku i mogućim kontaminacijama. Iako se u industrijskim pivovarama ovakav način sakupljanja kvasca ne koristi, popularan je među kućnim pivarima jer pri pravim uvjetima može biti vrlo efektivan te kvasci gornjeg vrenja proizvode širi spektar aroma u fermentaciji, a dosta ih može podnijeti temperature i do 35 °C. Idealna temperatura kod proizvodnje piva s kvascem gornjeg vrenja je 18 °C – 21 °C. Prilikom pupanja, ale kvasci se pod mikroskopom mogu prepoznati po stvaranju lanaca pupajućih stanica jer svaki novi pup nastaje prije nego što se stari otkine. Zbog manjeg spektra enzima, ne mogu u potpunosti fermentirati trisaharid rafinozu, već samo trećinu ovog šećera.

Kvasci donjeg vrenja se još nazivaju i lager kvasci (*Saccharomyces uvarum*). Naime, tijekom fermentacije, većina sojeva lager kvasca pada na dno fermentora. Međutim, postoje iznimke, pa se tako pojedini sojevi dižu na površinu fermentora. Lager kvasci slabije flokuliraju. Pošto većina lager kvasaca nije flokulirajuća, ne dižu se na površinu nego ostaju u suspenziji duži period, što im omogućava da reduciraju više nusprodukata koji su se stvorili tijekom fermentacije, nakon čega padaju na dno. Lager kvasac radi sporije od ale kvasca te proizvodi manje estera na nižim temperaturama fermentacije, što rezultira dobivanju manje aromatičnog piva. Idealna temperatura kod proizvodnje piva s kvascem donjeg vrenja je 10°C - 13°C. Prilikom pupanja, lager kvasci su pod mikroskopom prepoznatljivi po tome što dolaze kao jedinične stanice. Za razliku od kvasaca gornjeg vrenja, posjeduju sposobnost da u potpunosti fermentiraju rafinozu. (White i Zainasheff, 2010.)

3.2.1. Norveški kveik kvasci

Kveik kvasci predstavljaju novootkrivenu skupinu genetski različitih i pripitomljenih pivskih kvasaca, sličnih ale kvascima, dobiveni i korišteni od strane domaćih, norveških proizvođača piva. Smatra se da spomenuti kvasci posjeduju obećavajuće karakteristike za korištenje u pivarskoj industriji.

Istraživanja su pokazala da većina kveik kvasaca vrlo brzo metabolizira šećer iz sladovine, učinkovito flokulira, termotolerantni su i otporni na visoke razine etanola u pivu. Kveik kvasci pripitomljeni su na sličan način kao i industrijski ale kvasci. Neki od tih kvasaca djeluju kao pojedine, čiste kulture kvasca, dok drugi kao miješanje kulture kvasca, ovisne jedna o drugoj.

Od ispitivanih kvasaca, jedna trećina nije pokazala snažna flokulirajuća svojstva. Razlog tomu može biti način na koji norveški pivari sakupljaju kvasac namijenjen za ponovno korištenje. To uključuje sakupljanje samo nekih stanica kvasca uzdignutih na površinu, zbog čega je šansa za poboljšanje flokulacijskih karakteristika svih stanica kvasca, kroz dulji vremenski period, puno slabija. Zbog toga, nije neobično da neki sojevi kveik kvasca flokuliraju bolje od drugih. Tijekom fermentacije sladovine, zaključeno je da kveik kvasci proizvode niz voćnih estera s etil-kaproatom, etil-kapilatom, etil-decanoatom i fenetil acetatom koji je prisutan iznad prag osjetljivosti. To ukazuje da su ovi kvasci idealni za korištenje u proizvodnji piva voćnog karaktera.

Dodatan problem koji se javlja u proizvodnji piva je kvaščeva prilagodba na temperaturu medija u koji su stavljeni. Prevelike razlike u temperaturi dovode do temperaturnog šoka, koji posljedično utječe na djelovanje kvasca u sladovini a time i na okus i miris konačnog proizvoda. Međutim, fenotipska provjera kveik kvasaca pokazala je poželjnu termotoleranciju. „Prethodna studija koja je ispitivala prilagodbu kvasca na 40 °C kroz duže vremensko razdoblje, identificirala je SNP (jednonukleotidni polimorfizam) u genima koji se odnose na popravljavanje DNK, replikaciju, sastav membrane i membransku strukturu kao specifične genetske markere termotolerancije.“ (Caspeta i sur., 2014). Takve mutacije mogu biti temelj za razvoj termotolerantnih kvasaca, koji bi mogli biti uvedeni u sladovinu više temperature (30°C) bez promjene okusa i mirisa piva. Ujedno, time bi se smanjili i troškovi za hlađenje sladovine.

Još jedna specifična osobina kveik kvasaca je tolerancija na etanol. To je poligena i genetički složena osobina koja uključuje više alela. Većina ispitivanih kveik kvasaca

mogla je rasti i provoditi normalne funkcije pri udjelu alkohola od 16 %.. Ako se kvasac nalazi u mediju s visokim udjelom etanola, dolazi do narušavanja strukture, savijanja proteina te narušavanja funkcije stanične membrane. Istraživanje je pokazalo da su geni povezani s tolerancijom na etanol, povezani i sa stabiliziranjem staničnih zidova i staničnih membrana, povećanjem kapaciteta sakupljanja proteina, održavanjem elektrokemijskog gradijenta preko plazma membrane, te održavanjem vakuolarne funkcije. (Preiss i sur., 2018.)

3.3. DIVLJI KVASCI

Pojam divljeg kvasca odnosi se na bilo koji kvasac koji je prisutan u fermentaciji nekog piva, a ne odnosi se na soj kvasca kojeg pivar koristi s namjerom da dobije željeno pivo. Vrste kvasca koje mogu nepovoljno utjecati na profil gotovog piva su *Candida*, *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Brettanomyces*, i *Pichia* (Barnett, i sur. 1983.). Divlji kvasci u pivovaru i naknadno u fermentor mogu doći putem zraka, vode, sirovina i sl. Tijekom aktivne fermentacije, kultivirani kvasci toliko narastu da su puno dominantniji od divljih kvasca. Međutim, nakon završetka primarne fermentacije, kad su iskorišteni skoro svi šećeri iz sladovine, može doći do selektivne prednosti za divlje kvasce. Ujedno, pasterizacija može pogodovati kvascima koji su otporniji na visoke temperature.

Stoga je svaku generaciju kvasca potrebno mikrobiološki ispitati kako bi se osigurala njihova čistoća. Lizin agar je najučinkovitija metoda detekcije prisutnosti divljih kvasaca te ju zbog toga koristi veći broj pivovara. To je selektivna podloga koja sadrži lizin kao jedini izvor dušika. Dekstrin agar ili škrob agar učinkoviti je za kontaminante koji koriste dekstrin ili škrob kao jedini izvor ugljika (*S. Diastaticus*). „U novije vrijeme razvijene su visoko osjetljive imunološke metode za identifikaciju divljih kvasaca kada su prisutni čak i u vrlo niskim koncentracijama u kulturi kvasca. Najčešće korištena metoda je imunofluorescencija koju su razvili Richard i Cowland (1967). Ova tehnika koristi molekulu specifičnog antitijela vezanu na fluorescentnu boju (npr. Fluorescein ili rodamin) da bi se identificiralo one kvasce s kojima antitijelo reagira. Nastali kompleks fluorescira pod ultraljubičastim svjetlom i dopušta identifikaciju i lociranje divljeg kvasca. Ova metoda se općenito prakticira za otkrivanje divljih sojeva u fermentacijama. Iako se lager kvasci imunološki razlikuju od divljih kvasaca, razlike su premale da bi se koristile kao pouzdan test za otkrivanje divljih kvasaca u lager fermentacijama.“ (Reed i Nagodawithana, 1991.)

3.4. OSNOVE ZA DOBRU FERMENTACIJU

Da bi se fermentacija kretala u željenom smjeru, važna je kontrola cijelog procesa. Kontrolirana fermentacija obuhvaća dobivanje određenih šećera, korištenje zdravog kvasca, hranjivih tvari, kontroliranje temperature te svakodnevno korištenje opreme za praćenje procesa fermentacije. Kvasac kao najvažniji aspekt u procesu fermentacije omogućava pretvorbu šećera iz sladovine u alkohol, CO₂ i različite nusprodukte. Nevezano koji soj kvasca se koristi za proizvodnju kojeg karakterističnog stila piva, ključno je koristiti onaj koji je vitalan i propagiran u količini koja je potrebna za optimalnu fermentaciju.

Dobavljanje kvasca iz certificiranog laboratorija jamči određenu razinu čistoće. Ako pivar sam propagira kvasac, vrlo je važno obratiti pažnju na njegovu životnu aktivnost, vitalnost te čistoću. Pivari trebaju znati da vrsta šećera prisutna u sladovini pogoduje stvaranju specifičnih aroma. Npr., ako je u sladovini prisutna veća količina glukoze, nakon fermentacije, pivo će sadržavati jaču estersku notu (aromu koja podsjeća na bananu). Korištene sirovine također utječu na gotovo pivo. To se odnosi na slad, umjesto kojeg se mogu koristiti neslađene žitarice koje sadrže drugačiji udio hranjivih tvari i time utječu na karakter piva. Potrebno je nadoknaditi sav manjak nutrijenata u sladovini ukoliko se upotrebljava neka od neslađenih žitarica. Aeracija sladovine nužna je radi povećanja mase kvasca u početnoj fazi fermentacije. Minimalni udio kisika koji se mora uvesti kreće se između 8 mg/L i 10 mg/L kisika. Moguće je sladovinu i pretjerano oksigenirati što dovodi do pretjeranog rasta kvasca i posljedično stvaranje veće količine neželjenih nusprodukata.

Nekad je proces fermentacije tekao u otvorenim fermentorima, kod čega su važnu ulogu imali "divlji kvasci" koji su u sladovinu dospjeli iz zraka, posude ili zida. U tom slučaju, postojala je opasnost da fermentacija ne započne ili da se počne kretati u nepoželjnome smjeru. Također, sladovina je u takvom procesu proizvodnje bila izložena različitim vrstama kontaminacija. Danas, većina pivovara koristi zatvorene, cilindrično - konusne fermentore. Spomenuti fermentori posjeduju CIP (clean – in – place) sistem pranja i preciznu kontrolu temperature. Nedostatak vrlo velikih cilindrično - konusnih fermentora je njihova visina, jer iznimno visoki fermentori mogu uzrokovati dodatan stres za kvasce što može negativno utjecati na aromu piva.

Kontrola temperature krucijalna je za dobivanje ujednačenog i kvalitetnog piva. Visoke ili niske temperature utječu na proizvodnju prekursora koji su odgovorni za stvaranje

nepoželjnih aroma. Velika odstupanja od optimalne temperature otežavaju kvascima redukciju nastalih nepoželjnih spojeva. Metode koje koriste svi pivari kako bi lakše pratili napredovanje procesa fermentacije odnose se na mjerenje temperature, udjela ekstrakta, kisika, ugljikovog dioksida i pH-vrijednosti. Industrijske pivovare, opremljene su sa više sofisticiranim kompjuterskim sistemom praćenja i kontrole procesa. Ujedno, svakodnevno odnošenje uzoraka iz proizvodnje na kemijske i mikrobiološke analize omogućava im precizniji uvid u situaciju u pojedinoj fazi fermentacije. (White i Zainasheff, 2010.)

4. HOMEBREWING SISTEM KUHANJA

Homebrew proizvodnju piva ponajviše karakterizira korištenje manje količine sirovina, što rezultira dobivanju i manjeg volumena piva u usporedbi s komercijalnim pivovarama. Homebrewing omogućava pivaru kreativnost i fleksibilnost tijekom proizvodnje željenog piva. U ovom poglavlju ukratko će se opisati generalni proces proizvodnje piva koji je moguće provesti kod kuće, s minimalno opreme i izdataka.

Sve započinje pripremom recepta, opreme i sirovina. Minimalna oprema uključuje lonac za kuhanje, veliku žlicu za miješanje, običnu žlicu, mjernu posudu, staklenu posudu, fermentor, za što može poslužiti plastična kanta ili staklena boca, potom zračna komora, sredstvo za sanitaciju i termometar po želji. Sirovine je moguće kupiti u homebrew trgovini ili na njihovoj internet stranici. Trgovina sadrži veliki izbor opreme, dijelova za opremu, sirovina i sl. Izbor sirovina ovisi o izabranom receptu. Kućni pivari u početku često koriste ekstrakt slada umjesto žitarice koja ujedno može sadržavati i ekstrakt hmelja pa njega nije potrebno dodatno nabavljati. Čista i sterilizirana oprema vrlo je važna u proizvodnji piva. Pa tako, svu opremu koja se koristi potrebno je dobro oprati s deterdžentom i sterilizirati pogodnim sredstvom. Nakon sterilizacije, oprema se obavezno mora isprati vodom i poklopiti kako bi ostala čista do uporabe. Ukoliko se koristi slad kao sirovina, potrebno ga je samljati. Proizvodnja piva počinje dobivanjem komine. U lonac za kuhanje prelije se željena količina vode i zagrijava. Generalno, postoje dvije varijante ukomljavanja ovisno o temperaturi. Prva varijanta je najjednostavnija i zadovoljava potrebe većine pivarskih stilova. Sav izmljeveni slad prebaci se u zagrijanu vodu, miješa te se postepeno povećava temperatura na 65-70 °C (ovisno o vrsti piva koje se proizvodi) i zadržava kroz sat vremena kako bi enzimi iz slada mogli prevesti škrob u šećere. Druga opcija je ukomljavanje na temperaturama 40 °C – 60 °C – 70 °C s polusatnim zadržavanjem na pojedinoj temperaturi optimalnoj za enzime iz slada. Spomenuto ukomljavanje daje visoke prinose i dobru fermentaciju. (Palmer, 2006.)

Koliko će pojedinih šećera nastati hidrolizom škroba ovisi o:

1. temperaturi na kojoj se komina zadržava

- Duže zadržavanje na 62 – 64 °C – sladovina s puno maltoze koja ima visok stupanj prevrenja (β -amilaza)
- Duže zadržavanje na 72 – 75 °C – sladovina s više dekstrina koji pivu daju punoću

- Završna temperatura hidrolize škroba u praksi je 76 – 78 °C – α -amilaza nastavlja hidrolizu škroba i tijekom cijedenja sladovine iz komine (sprječava se tzv. klajsterizacijska mutnoća piva)

2. trajanju vremena zadržavanja komine pri određenoj temperaturi

3. pH-vrijednosti komine

4. koncentraciji komine (udjelu suhe tvari u vodenoj suspenziji tj. otopini) (Marić. 2009.)

Slijedi mjerenje pH-vrijednost. Ako nije zadovoljavajuća, zakiseljavanje komine može se postići upotrebom mineralnih kiselina (fosfatna kiselina, mliječna kiselina, kloridna kiselina, sumporna kiselina), biološkim zakiseljavanjem (uz pomoć bakterija mliječno-kiselog vrenja), zamjenom dijela klasičnog slada s kiselim sladom ili dekarbonizacijom vode za ukomljavanje (npr. vapno). Nakon što je prošlo vrijeme ukomljavanja, potrebno je povisiti temperaturu na 78 °C što će uzrokovati inaktivaciju enzima. Potom je potrebno proizvedenu sladovinu izdvojiti iz komine. Kada se slad ubacuje u lonac za kuhanje, može se nalaziti u vrećici za slad, dodatnom loncu s poroznim dnom koji omogućuje cijedene sladovine i izdvajanje od slada ili u posudi iz koje je pomoću crijeva potrebno pretočiti sladovinu u novu posudu za kuhanje. Kod veće opreme moguća je recirkulacija sadržaja pomoću crijeva kako bi se zrnje bolje istaložilo i iznad njega dobila bistrija sladovina. Tijekom ovog procesa dodaju se i naknadni naljevi (voda) kako bi se iz zaostalog tropa izdvojio zaostali ekstrakt, a gubici bili što manji. Sljedeći korak je kuhanje. Dobivena sladovina kuha se 50 - 60 minuta uz dodatak hmelja na početku i pri kraju kuhanja (zadnjih 15 minuta). Glavni razlog kuhanja sladovine je otapanje i izomerizacija gorkih i aromatičnih hmeljnih sastojaka u sladovini. Osim toga, za vrijeme kuhanja odvijaju se i drugi važni procesi:

- Nastajanje i taloženje proteinsko – taninskih spojeva (topli talog) iz slada i hmelja koji uzrokuje zamućenje
- Podešavanje udjela ekstrakta isparavanjem vode
- Sterilizacija sladovine da bi se spriječio razvoj mikroorganizama (bakterija, plijesni) koji su do tog trenutka možda bili prisutni
- Uništavanje zaostalih enzima kako ne bi došlo do nekontrolirane promjene sastava sladovine

- Termičko izlaganje sladovine kojim sladovina postaje tamnija i povećanje indeksa TBI (tiobarbiturna kiselina) koji karakterizira stabilnost arome piva
- Povećanje kiselosti sladovine zbog prisutnosti novonastalih spojeva (melanoidi, gorke hmeljne kiseline)
- Stvaranje reducirajućih spojeva koji mogu reagirati s kisikom i povećati antioksidacijski potencijal piva
- Isparavanje nepoželjnih sastojaka arome (produkti razgradnje proteina, produkti Maillardov-ovih i Strecker-ovih reakcija, DMS). (Kunze, 2014.)

Ukoliko se za proizvodnju piva koristi ekstrakt slada s hmeljom, kuhanje može završiti već nakon 15 minuta. Ako se koristi ekstrakt s hmeljom ali želi se dodati i aromatični hmelj, potrebno je kuhati minimalno 30 minuta, a ukoliko u ekstraktu slada nema hmelja i potrebno ga je posebno dodati, kuhanje se mora provoditi sat vremena. Prilikom završetka kuhanja, sladovinu treba ohladiti. Za to se najčešće koristi spirala koja se jednostavno uroni u vruću sladovinu. Na krajevima spirale nalaze se crijeva. Jedno za ulaz hladne vode, a drugo za izlaz ugrijane vode. U slučaju kada se radi s malim posudama, umjesto spirale može se koristiti i vodena kupelj, kada i sl. Kada je sladovina ohlađena na temperaturu poželjnu za korištenje soj kvasca, ista se prebacuje u fermentor u koji se ubaci i kvasac. Prebacivanje sladovine otvaranjem ventila na posudi za kuhanje iz kojeg ona slobodno pada u fermentor omogućava se aeracija. Drugi način je snažno i brzo prelijevanje sadržaja iz jedne posude u drugu. Ako pivar koristi suhi kvasac, potrebno ga je prije ubacivanja u fermentor rehidrirati. Najčešće se to provodi tako da se u sterilnu posudu pretoči određena količina vode, temperature oko 20 °C (kako bi se izbjegao temperaturni šok za kvasce) i poklopi da u posudu ne bi mogli ući nepoželjni mikroorganizmi iz zraka te utjecati na pivo. Posuda se ne miješa, već se ostavi stajati kako bi kvasac samostalno pao na dno. Nakon pola sata, posuda se može lagano promiješati čime se dobije otopina kvasca spremna za ubacivanje u sladovinu. Fermentor se smjesti na sigurno mjesto, s ujednačenom sobnom temperaturom (18 °C – 21 °C) te mu se čvrsto aplicira i vrenjača. Fermentor se ne dira naredna dva tjedna. Za stvaranje dodatnog CO₂, koristi se točno izračunata količina običnog šećera, koji se stavlja u boce prije točenja piva ili se prvo stavlja u posudu s pivom pa potom u boce. Šećer koji se koristi, može biti skuhan s vodom, nakon čega se upotrebljava u tekućem obliku ili se jednostavno može koristiti u krutom stanju. Pivo natočeno u boce stavlja se na toplo mjesto kako bi se refermentacija mogla provesti. Postupak kojim zaostali kvasci u pivu razgrađuje šećer i ponovno stvaraju alkohol i CO₂

naziva se refermentacija. Posljedica refermentacije je stvaranje taloga kvasca na dnu boce piva. Za provođenje refermentacije važno je pivo staviti na toplo mjesto, jer niske temperature ne pogoduju kvascima. (Palmer, 2006.)



Slika 6. Minimalna oprema za proizvodnju piva u kućnom pivarstvu (Palmer, 2006.)



Slika 7. Oprema za flaširanje (Palmer, 2006.)

5. EKSPERIMENTALNI DIO

5.1. MATERIJALI RADA

5.1.1. Tehnološka oprema za Homebrew proizvodnju piva

Za proizvodnju Amber ale-a koristila se Speidels Braumeister oprema od nehrđajućeg čelika, volumena 50 L gotovog piva. Maksimalna količina slada koja se može upotrijebiti je 13 kg. Potpuno automatski upravljački sustav olakšava kuhanje piva za one koji se tek upoznaju s proizvodnim procesom. Nakon postavljanja recepture, kontrolni panel na dnu posude omogućava praćenje svakog koraka u procesu proizvodnje piva te odbrojavanjem pivara obavještava o početku i završetku pojedine faze. Ujedno, temperature navedene u receptu vrlo se precizno održavaju tijekom cijelog procesa. Unutar kotla nalazi se bačva za slad na koju se s gornje i donje strane zašarafi filter ploča. Na dnu kotla pričvršćeni su grijači, te cijeli sustav posjeduje i dvije cirkulacijske pumpe koje cirkuliraju sadržaj "odozdo prema gore" što utječe na optimalno ispiranje slada. Identičan kotao (bez bačve) koristi se za grijanje vode koja služi za naknadne naljeve.

Fermentacija se provodila u Speidels Braumeister fermentorima od nehrđajućeg čelika, volumena 60 L. Fermentacija pod pritiskom nije moguća u spomenutom fermentoru. Oprema posjeduje duplu stijenku što osigurava efikasno hlađenje mrzлом vodom za kontrolirani proces fermentacije. U konusnom dijelu, posjeduje dva ventila za ispuštanje kvasca koji se može jednostavno prikupiti i koristiti za sljedeću fermentaciju.

Za naknadne naljeve koristio se vrč volumena 2 L. PVC bačva volumena 50 L, koristila se za pretok sladovine iz kotla za kuhanje u fermentor.



Slika 8. Speidels Braumeister oprema za proizvodnju piva

5.1.2. Receptura za proizvodnju Amber Ale piva

Tablica 2. Vrste slada korištene za proizvodnju Amber ale-a

Vrsta slada	Količina
Pale ale	8 kg
Munchen	2 kg
Biscuit	2 kg
Crysal Rosewood	0,5 kg
Special B	0,25 kg
Melano 50	0,25 kg

Tablica 3. Vrste hmelja korištene za proizvodnju Amber ale-a

Vrsta hmelja	Količina
Magnum	15 g
Amarillo	100 g

Tablica 4. Vrste kvasca korištene za proizvodnju Amber ale-a

Vrsta kvasca	Količina
Safbrew T-58	11,5 g
Stranda kveik	11,5 g

*Safbrew T-58 kvasac: vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, kvasac gornjeg vrenja, srednjesedimentirajući, koji ne stvara nakupine već se u suspenziji javlja u praškastom obliku. Idealna temperatura naciepljivanja 15-20 °C. Poznat po stvaranju estera koji podsjećaju na papreno, pikantno.

*Stranda kveik: vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, norveški kvasac gornjeg vrenja, srednjeflokulirajući, čija je idealna temperatura naciepljivanja 30 °C, a raste na temperaturama i do 40 °C. Sadržava samo jedan soj kvasca te proizvodi voćne estere.

5.1.3. Uređaji i kemikalije za provođenje fizikalno – kemijskih analiza i kemikalije u proizvodnji

Uređaji korišteni za fizikalno - kemijske analize: analizator (Alcoyser, Density metar) za određivanje alkohola, prividnog i pravog ekstrakta, pH metar (HQ411d pH/mV) za određivanje pH vrijednosti uzorka, spektrofotometar (Hach Lnage DR 6000) za određivanje boje i gorčine.

Korištene kemikalije za fizikalno - kemijske analize: Kieselguhr, oktanol (1-Octanol), HCl (6N), izo - oktan (2,2,4-Trimethylpentane).

Korištene kemikalije u proizvodnji: Kalcij klorid (CaCl), fosforna kiselina (H₃PO₄), jod (I₂).

5.2. METODE RADA

5.2.1. Proces proizvodnje piva na Speidels Braumeister sistemu

Proizvodnja piva započinje mljevenjem pripremljenog slada. U kotao se ulije 53 L vruće vode, dok se na kontrolnom panelu kao željena temperatura unese 65 °C, nakon čega grijač automatski kreće sa zagrijavanjem. 10 g kalcij klorida otopljenog u 100 mL vode doda se u vodu. Kada se voda zagrije, samljeveni sadržaj pažljivo se usipava uz lagano miješanje kako ne bi došlo do stvaranja većih gruda slada. U drugi kotao (bez bačve) ulije se 30 L vode i podesi zagrijavanje do 78 °C. Na panelu se odabere tipka za početak procesa ukomljavaanja. Nakon toga, važno je zašarafiti filter ploču na usipani slad, kako krute čestice tijekom rada cirkulacijskih pumpi ne bi prelazile u vanjske dijelove kotla, već ostale samo u bačvi za slad. Ukomljavaanje započinje na 65 °C kroz sat vremena, nakon čega se temperatura diže na 72 °C, zadržava narednih 10 minuta, a na samom kraju potrebno je dosegnuti 78 °C i održavati temperaturu 1 minutu. Kada je ukomljavaanje završilo, bačva sa slalom diže se na pomoćne ljestve kako bi kroz filter ploču, koja čini dno bačve, moglo početi cijedenje sladovine. Tijekom cijedenja, zagrijana voda iz drugog kotla služi za naknadne naljeve. Naknadnim naljevima dodano je 14 L vode (7 puta po 2 L vode). Za vrijeme cijedenja, izmjerena pH-vrijednost iznosila je 5,39, zbog čega je na kraju tog procesa dodano 4 mL fosforne kiseline kako bi se dobila pH-vrijednost od 5,2. Provedeno je mjerenje ekstrakta pomoću mjernog cilindra i areometra, a dobivena vrijednost iznosila je 13,7 °P. Također, jodna proba, namijenjena dokazivanju prisutnosti škroba u sladovini dala je negativnu reakciju. Kada je cijedenje završilo, bačva sa zaostalim tropom ukloni se na stranu, i kreće sljedeća faza proizvodnje piva - kuhanje sladovine. Kuhanje traje sat vremena. Na samom početku, ubacuje se 15 g Magnum hmelja i zadnjih 15 minuta kuhanja 100 g Amarillo hmelja. Tijekom kuhanja sladovine, mjeri se udio ekstrakta, koji je iznosio 14,4 °P. Po završetku kuhanja, u sladovinu se spusti spirala koja je priključena na dovod hladne vode. Otvaranjem ventila za hladnu vodu prati se postepeni pad temperature na panelu. Kada je postignuta temperatura od 35 °C, zaustavlja se hlađenje, a pola volumena izlije se kroz ventil u posudu od 50 L. Sadržaj iz posude ubaci se u fermentor u kojem se već nalazi kvasac. Drugi dio volumena hladi se na 25°C, nakon čega se na isti način prebacuje u drugi fermentor. Kvasac je prije ubacivanja u fermentor potrebno rehidrirati. 11,5 g suhoga kvasca usipa se u sterilnu posudu s 550 mL vode i ostavi neko vrijeme da se spusti na dno, nakon čega se lagano promiješa. Vrh posude potrebno je pokriti kako ne bi došlo do kontaminacije kvasca. Na kontrolnom

panelu za temperaturu, podese se 20 °C za kvasac T-58, a u drugome fermentoru, za kveik kvasac, 30 °C. Nakon tjedan dana, iz fermentora se izdvaja kvasac a time kreće proces odležavanja (pri temperaturi od 1 °C), koji traje isto koliko i fermentacija. Po završetku odležavanja, pivo je potrebno napuniti u boce. Kako bi se povećao udio CO₂ u boci, tj. pivu, pomoću mjerne žličice, stavlja se ista količina šećera u svaku od boca, a potom se one napune pivom. Pivo natočeno u boce stavlja se na toplo mjesto kako bi se refermentacija mogla provesti. Kada je na dnu boce vidljiv talog kvasca, pivo je nužno staviti na hladno kako se ne bi počelo kvariti. Prethodno spomenuti postupak refermentacije i ponovnog odležavanja odvija se kroz dva tjedna, nakon čega je pivo spremno za konzumaciju.

5.2.2. Fizikalno – kemijska analiza

Za lakši uvid u napredovanje procesa proizvodnje piva i dobivanje piva ujednačene kvalitete, uzorci iz pogona odnose se na analize u fizikalno-kemijski laboratorij. Sve korištene analize provode se prema propisanim analitičkim metodama sadržane u EBC analitici i publikacijama MEBAK-a.

5.2.2.1. Određivanje udjela alkohola, prividnog i pravog ekstrakta

Udio alkohola, prividnog i pravog ekstrakta određuje se pomoću analizatora. Za provođenje ove metode potrebno je uzeti čisti uzorak koji se prethodno zagrije na 20 °C pa potom degazira. Uzorak se pomoću lijevka i filter papira filtrira u čistu bocu. Tako profiltrirani uzorak ulije se u vialu, stavi na bilo koje prazno mjesto na analizatoru, te se pritisne tipka „Start”. Ukoliko se analiza provodi na mutnom pivu, u uzorak je potrebno dodati jednu čajnu žličicu dijatomejske zemlje (Kieselguhr). Kako bi se dobila što točnija vrijednost na analizatoru, uzorak je potrebno duplirati. Analizator radi na princip da se preko igle za uzorkovanje povuče uzorak i izmjeri sve zadane parametre.

5.2.2.2. pH - vrijednost

Zagrijani, degazirani i profiltrirani uzorak koji se koristi za analizator, koristi se i za mjerenje pH-vrijednosti. pH piva mjeri se pomoću pH-metra, tako da se u uzorak uroni sonda i pritisne tipka „Read”, nakon čega je potrebno navedeni uzorak lagano promiješati i ostaviti da se stabilizira. Rezultat (na dvije decimale) je vidljiv na ekranu. Kada je završeno mjerenje pH-vrijednosti, sondu je potrebno isprati destiliranom vodom i uroniti u KCl.

5.2.2.3. Boja

Zagrijani, degazirani i profiltrirani uzorak koji se koristi za analizator, koristi se i za određivanje boje. Upotrebljava se spektrofotometar za analizu spektra elektromagnetskog zračenja, koji radi na principu skeniranja valnih duljina na programu BOJA 430 nm. Ako se radi s mutnim pivom, koristi se BOJA 430 nm i BOJA 700 nm. Za provođenje postupka potrebne su dvije kivete (staklene, žute, 10,00 mm). Jedna za slijepu probu, a druga za uzorak. Kivete je prije korištenja potrebno nulirati pomoću destilirane vode. Na prvo mjesto u spektrofotometru stavlja se kiveta za slijepu probu (destilirana voda), a na drugo mjesto uzorak koji se želi ispitati. Pritisne se tipka „Čitaj vrtuljak“, te se očita rezultati i zaokružuje na jednu decimalu. Ako se koristi uzorak koji ima mjerenu bistroću veću od 1 EBC jedinice, boja se mjeri upotrebnom BOJA 430 nm (valna duljina boje) – BOJA 700 nm (valna duljina kompenzacije mutnoće), a rezultat boje izračunava se iz te dvije vrijednosti apsorpcije.

5.2.2.4. Gorčina

Za određivanje gorčine, važno je da uzorak ima temperaturu od 20 °C, da se degazira, te da mu se doda kap oktanola (1 kap na 100 ml), kako bi se spriječilo pjenjenje piva. Uzorak ne smije biti mutan i imati miris po pivu, te ne smije sadržavati ni malu količinu pjene. Ključno je da je uzorak bistar, ukoliko se radi s bistrim pivom, te da ima miris po oktanolu. Postupak započinje pripremanjem menzure s uskim grlom u koju se otpipetira 10 ml uzorka piva, 0,5 ml HCl-a i 20 mL izo-oktana. Tako pripremljen uzorak se začepi i mučka bez prestanka 1 minutu. Nakon mućkanja, otopinu treba ostaviti 20 minuta da odstoji, kako bi se odijelili slojevi (pivo –žuti, HCl- bijeli, izo-oktan – proziran sloj). Mjerenje gorčine provodi se na spektrofotometru na programu GORČINA 50, uz pomoć dvije kvarcne kivete (plava 10,00 mm) u koje se ulije izo-oktan iz menzure. Prva kiveta s čepom, služi kao slijepa proba. Kiveta za slijepu probu koristi se s čepom kako bi se lakše razlikovale kivete pošto se u obadvjema nalazi proziran sadržaj. Druga kiveta, koristi se za ispitivani uzorak. Kada prođe 20 minuta, uzorak se otpipetira u kivetu (prije mjerenja, kivetu je potrebno isprati s uzorkom). Na prvo mjesto u spektrofotometru stavlja se slijepa proba, a na drugo uzorak, nakon čega slijedi zatvaranje prozorčića i stiskanje tipke „Čitaj vrtuljak“. Očitani rezultat gorčine zaokružuje se na jednu decimalu.

6. REZULTATI

Tablica 5. Faze u proizvodnji sladovine na Speidels Braumeister sistemu za kuhanje piva

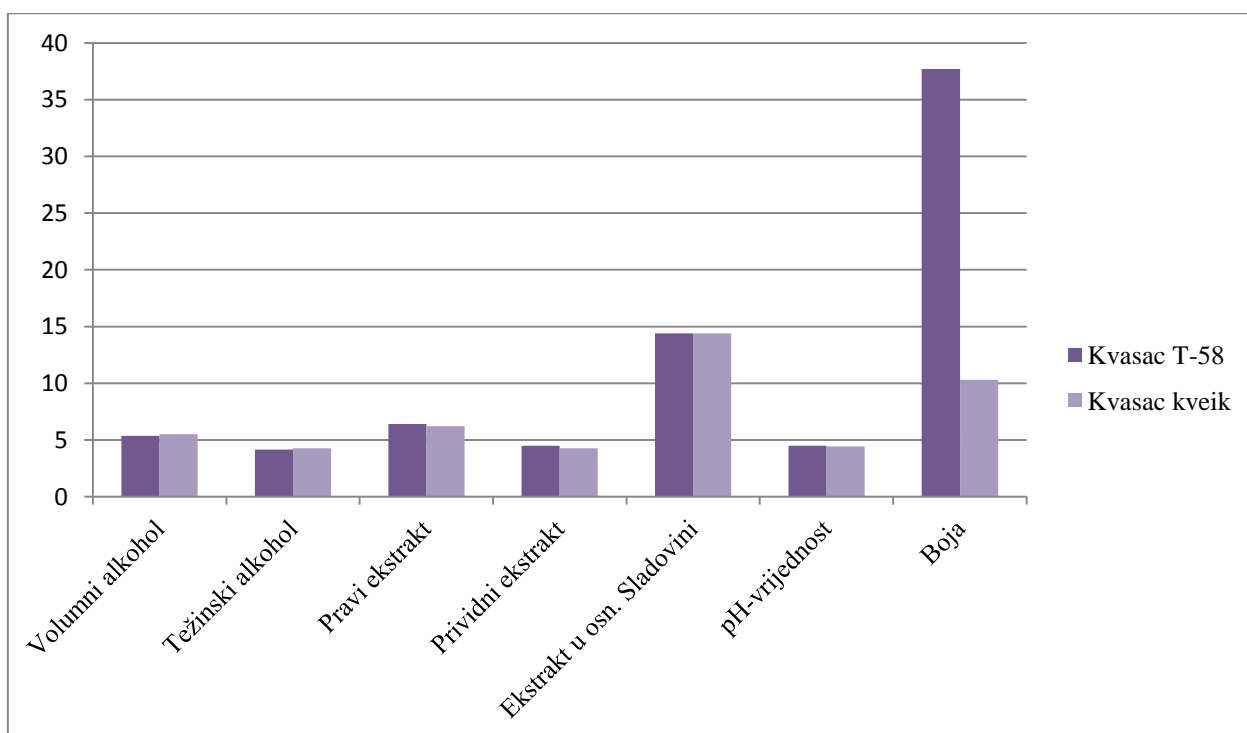
Postupak	Početna temperatura (°C)	Ciljana temperatura (°C)	Trajanje postupka (min)
Zagrijavanje vode za početak ukomljavanja	51	65	15
Djelovanje β-amilaze	65	-	60
Zagrijavanje	65	72	15
Djelovanje α-amilaze	72	-	10
Zagrijavanje	72	78	15
Denaturacija enzima	78	-	1
Zagrijavanje	75	100	30
Kuhanje sladovine	100	-	60
Hlađenje sladovine	100	35	25
1. pretok sladovine u fermentor	35	30	10
Hlađenje sladovine	35	25	2
2. pretok sladovine u fermentor	25	20	10

Tablica 6. Mjerenje parametara provedeno u pogonu za lakše praćenje procesa fermentacije

Parametar	Mjerenje (19.4.)
Ekstrakt (kvasac T -58) / °P	5,7
pH-vrijednost (kvasac T-58)	4,1
Temperatura (kvasac T- 58) / °C	20
Ekstrakt (Kveik kvasac) / °P	9,5
pH-vrijednost (Kveik kvasac)	4,45
Temperatura (Kveik kvasac) / °C	30

Tablica 7. Laboratorijski izmjereni parametri tijekom fermentacije

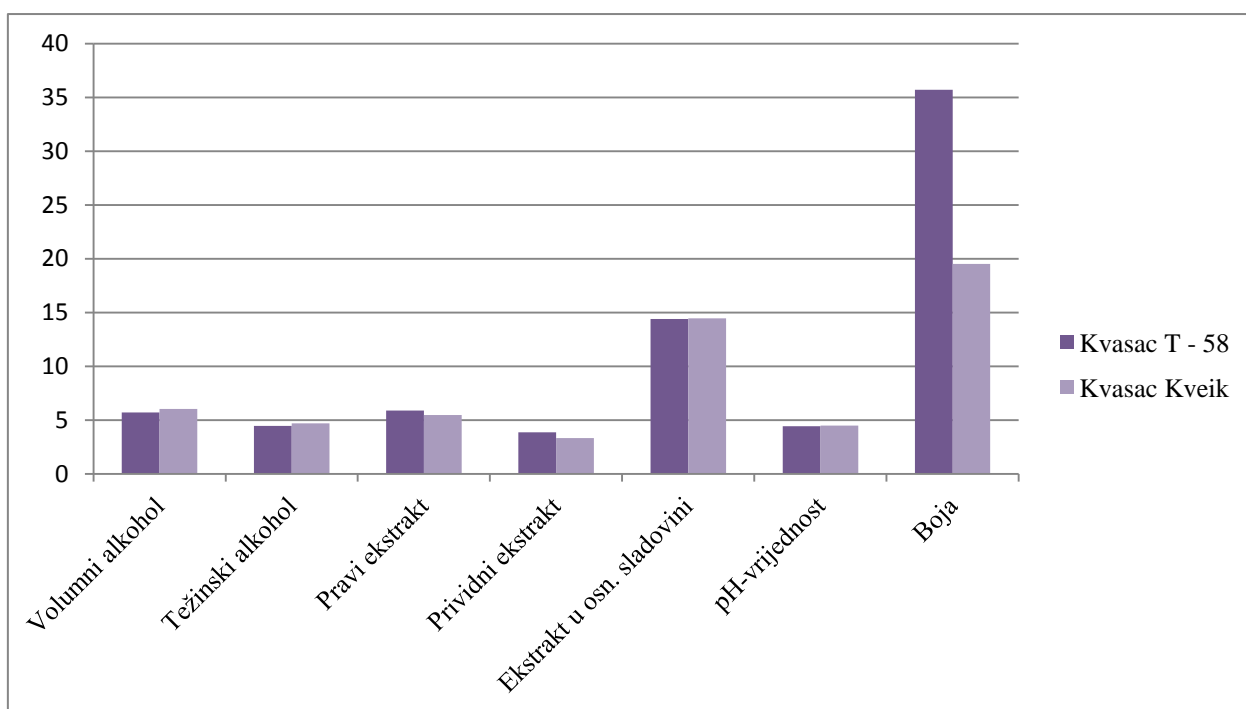
Datum analize		24.04.2019.	
Parametar		Kvasac T – 58	Kvasac Kveik
Volumni alkohol	% v/v	5,37	5,51
Težinski alkohol	% w/w	4,17	4,28
Pravi ekstrakt	% w/w	6,41	6,22
Prividni ekstrakt	% w/w	4,5	4,26
Ekstrakt u osn. sladovini	% w/w	14,39	14,41
pH-vrijednost	-	4,49	4,44
Boja	EBC	37,7	10,3



Slika 9. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara tijekom fermentacije

Tablica 8. Laboratorijski izmjereni parametri tijekom odležavanja

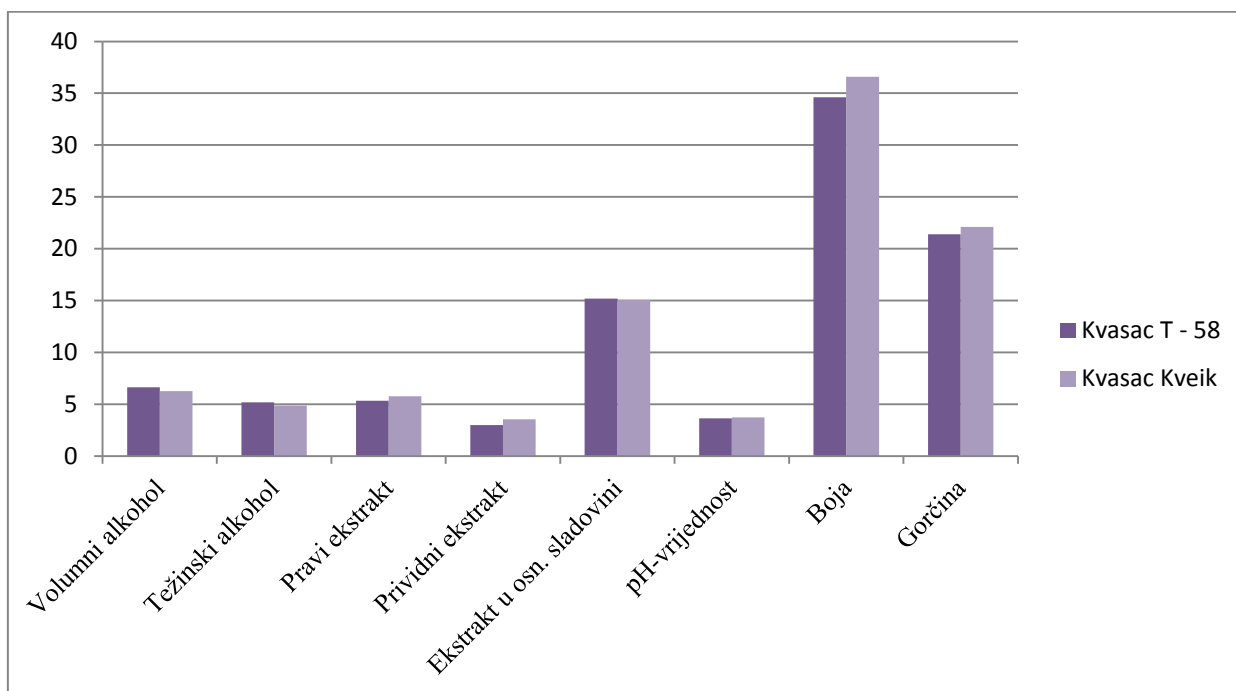
Datum analize		29.04.2019.	
Parametar		Kvasac T – 58	Kvasac Kveik
Volumni alkohol	% v/v	5,71	6,02
Težinski alkohol	% w/w	4,45	4,70
Pravi ekstrakt	% w/w	5,88	5,47
Prividni ekstrakt	% w/w	3,85	3,32
Ekstrakt u osn. sladovini	% w/w	14,39	14,46
pH-vrijednost	-	4,41	4,47
Boja	EBC	35,7	19,5



Slika 10. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara tijekom odležavanja

Tablica 9. Laboratorijski izmjereni parametri za gotovo pivo

Datum analize		15.05.2019.	
Parametar		Kvasac T – 58	Kvasac Kveik
Volumni alkohol	% v/v	6,62	6,25
Težinski alkohol	% w/w	5,17	4,87
Pravi ekstrakt	% w/w	5,33	5,76
Prividni ekstrakt	% w/w	2,99	3,55
Ekstrakt u osn. sladovini	% w/w	15,19	15,06
pH-vrijednost	-	3,65	3,73
Boja	EBC	34,6	36,6
Gorčina	IBU	21,4	22,1



Slika 11. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara za gotovo pivo

7. RASPRAVA

U tablici 5, navedeni je svaki pojedini korak proveden tijekom procesa proizvodnje sladovine i pretoka za početak fermentacije, vremenski period potreban za pojedinu operaciju te promjena temperature pri napredovanju procesa. Prije početka procesa ukomljavanja, u vodu se dodaje kalcij klorid sa svrhom snižavanja pH-vrijednosti vode. Tijekom procesa ukomljavanja, pH-vrijednost bila je 5,39, zbog čega se dodaje i fosforna kiselina kako bi pH-vrijednost pala na 5,2, što je optimalno za pivo. Pri nižem pH mnogi se procesi i promjene odvijaju brže i bolje. Npr., više spojeva koji potiču rast kvasaca prelazi u otopinu, povećava se prinos ekstrakta, cijedenje komine je brže. Također, smanjena je biološka osjetljivost sladovine (kontaminacija mikroorganizmima). Prva značajna ciljana temperatura, koja se zadržava kroz jedan sat, temelji se na djelovanju β -amilaze, enzima koji dolazi iz slada. β -amilaza ima sposobnost razgradnje dekstrina s nereducirajućeg kraja molekule, pri čemu dolazi do odcjepljivanja maltoze (2 glukoze jedinice). Drugi važan enzim, α -amilaza, u komini intenzivnije djeluje pri 72 °C. Uloga α -amilaza je cijepanje dugačkih škrobnih lanaca do dekstrina koji posjeduju 7 – 12 glukoze jedinica. Nakon završenog šećerenja, potrebno je povisiti temperaturu na 78 °C, da bi se još uvijek aktivni enzimi inaktivirali. Kuhanje sladovine potrebno je provesti zbog više razloga, međutim jedan od najvažnijih je sprječavanje enzimskog djelovanja u kasnijim fazama proizvodnje, gdje bi mogli utjecati na senzorska svojstva i stabilnost proizvoda. Dodavanje hmelja provodi se u dva navrata, na samom početku kuhanja i zadnjih 15 minuta kuhanja. Magnum je hmelj koji sadržava veću količinu α -kiselina zbog čega se koristi za gorčinu u početku kuhanja. Drugi korišteni hmelj, Amarillo, u sladovinu se dodaje na kraju kuhanja kako bi se što bolje zadržala njegova citrusna aroma. Kako bi se izbjeglo šokiranje kvasaca visokom temperaturom, što posljedično može dovesti do spore fermentacije zbog inhibicije kvasaca, sladovina se hladi na optimalnu temperaturu kvasca.

Dva dana nakon kuhanja i prebacivanja sladovine u fermentor na fermentaciju, provedeno je prvo mjerenje parametara iz fermentacije u prostoru pogona, što je prikazano u tablici 6. Ekstrakt, kao najvažniji pokazatelj napretka fermentacije, mjeri se pomoću mjernog cilindra i areometra, a pH-vrijednost pomoću pH metra. Očitava se i temperatura u svakom fermentoru. Iz rezultata je vidljivo da kvasac T – 58 napreduje brže od kveik-a (razlika od 3,8 °P).

Prvi uzorci poslani su u laboratorij tjedan dana nakon kuhanja, kada je iz piva uklonjen kvasac i ono stavljeno na odležavanje, a čiji su rezultati prikazani u tablici 7. Druga analiza (tablica 8) provedena je 5 dana nakon početka odležavanja i 2 dana prije flaširanja piva. U prva dva mjerenja se pokazalo da je postotak alkohola veći kod piva proizvedenog sa kveik kvascem, koje je ujedno imalo i niži udio ekstrakta. Boja je parametar kod koje se primjećuje najveća razlika. Pivo dobiveno sa kvascem T – 58 je bilo puno svjetlije od piva proizvedenog sa kveik kvascem.

Rezultati mjerenih parametara posljednje analize jasno su prikazani u tablici 9. Mjerenja su vršena na gotovom pivu (dva tjedna nakon dodatka šećera i punjena piva u boce). Za razliku od prva dva mjerenja, zadnje mjerenje pokazuje da pivo napravljeno sa kvascem T -58 sadržava veći postotak alkohola i manji udio ekstrakta od onog napravljenog s kveik kvascem. Vrijednosti za boju su za oba uzorka gotovog piva bile vrlo slične.

8. ZAKLJUČAK

Fizikalno - kemijskim analizama dobiveni su rezultati dvaju Amber ale piva proizvedenih na Speidels Braumeister sistemu od 50 L. Nakon provedenih kemijskih analiza pokazalo se da su rezultati mjerenih parametara kvasca T – 58 i kveik kvasca vrlo slični, iako im se u teoriji karakteristike metabolizma poprilično razlikuju. Potvrđeno je da kveik kvasac može normalno provoditi sve funkcije u fermentaciji potrebne za dobivanje gotovog piva pri višim temperaturama. Tijekom uvođenja sladovine pri temperaturi od 30 °C, nije došlo do temperaturnog šoka kod kveik kvasaca, što bi bio problem kod kvasca T-58, i drugih industrijskih ale ili lager kvasaca. Zbog velike razlike u boji u ranijim fazama fermentacije, može se pretpostaviti da je kvasac T – 58 bolje raspoređen u suspenziji, te da u njoj duže zaostaje, tj. slabije flokulira. Sposobnost duljeg zadržavanja u suspenziji može biti posljedica većeg postotka alkohola i manjeg udjela ekstrakta kod piva proizvedenog s prethodno navedenim kvascem. Time se može pretpostaviti da je kveik snažnije i brže previrao sladovinu, dok je kvasac T - 58 zaostao u većoj količini u mladom pivu, te tijekom refermentacije lakše fermentirao dodani šećer i time postigao veće iskorištenje.

9. LITERATURA

1. BARNETT J., A., PAYNE R., W., YARROW D. (1983.): Yeasts: characteristics and identification, Cambridge, New York, Melbourne: Cambridge University Press.
2. BOULTON C., QUAIN D. (2001.): Brewing Yeast and Fermentation, Blackwell Science Ltd., str 80.str.
3. BRIGGS, D. E., BOULTON, C., A., BROOKES, P., A. (2004.): Brewing: Science and Practice, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England.
4. CASPETA, L., CHEN, Y., GHIACI, P., FEIZI, A., BUSKOV, S., PETRANOVIC, D., i sur. (2013.): Altered sterol composition renders yeast thermotolerant., *Science*, **944**, 1-5.
5. Farmhouse yeast registry (2019.):
<http://www.garshol.priv.no/download/farmhouse/kveik.html> pristupljeno 04.08.2019.
6. Fermentis (2018.): SafAle T - 58, <https://fermentis.com/wp-content/uploads/2017/10/SafAle-T-58.pdf> pristupljeno 04.08.2019.
7. Interni materijali laboratorija Zagrebačke pivovare (2019.): Postupci analiza.
8. KUNZE, W. (2014.): Technology Brewing and Malting, VLB Berlin, 5. izd.
9. MARIĆ, V. (2009.): Tehnologija piva, Veleučilište u Karlovcu.
10. MCFARLAND B., SANDHAM T. (2009.): World's Best Beers, Jacqui Small, London, str. 15.
11. PALMER J.J. (2006.): How To Brew, Brewers Publications; 3. izd.
12. PREISS R., TYRAWA C., KROGERUS K., GARSHOL L., M., VAN DER MERWE G. (2018.): Traditional Norwegian Kveik Are a Genetically Distinct Group of Domesticated *Saccharomyces cerevisiae* Brewing Yeasts, *Frontiers in Microbiology*, **2137** (9), 1-18.
13. REED G., NAGODAWITHANA T. W. (1991.): Yeast Technology: Brewer's Yeast, Van Nostrand Reinhold, New York, 2. izd., str. 121-136.

14. SMART, K., A. (2000.): Flocculation and Adhesion, *European Brewery Convention 1999 Monograph 28*, str. 16-29.
15. Speidels Braumeister (2019.): <https://www.speidels-braumeister.de/en/braumeister/10-20-50-litre-braumeister.html> pristupljeno 20.07.2019.
16. VOGEL W. (2006.): Pivo iz vlastitog podruma, ITD Gaudeamus za djelo prevedeno na hrvatski jezik, Požega.
17. WANG, S., S., BRANDRISS, M., C. (1987.): Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: sequence, regulation, and mitochondrial localization of the PUT1 gene product., *Molecular and Cellular Biochemistry*, **7**, 431-440.
18. WHITE C., ZAINASHEFF J. (2010.): Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation, A Division of the Brewers Association, Colorado, str. 11-50.

10. POPIS PRILOGA

Slika 1. Boje piva prikazane kroz EBC (European Brewery Convention) i SRM (Standard Reference Method) vrijednost	8
Slika 2. Presjek stanice kvasca s pupom	13
Slika 3. Reakcija dobivanja etanola u stanici kvasca	15
Slika 4. Stvaranje viših alkohola	17
Slika 5. Razlika između flokulirajućeg kvasca (A) i neflokulirajućeg kvasca (B).....	20
Slika 6. Minimalna oprema za proizvodnju piva u kućnom pivarstvu	32
Slika 7. Oprema za flaširanje.....	32
Slika 8. Speidels Braumeister oprema za proizvodnju piva	33
Slika 9. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara tijekom fermentacije	42
Slika 10. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara tijekom odležavanja	43
Slika 11. Dijagram laboratorijski izmjerenih parametara za gotovo pivo	44
Tablica 1. Klasifikacija aminokiselina ovisno o asimilaciji iz sladovine tijekom fermentacije	16
Tablica 2. Vrste slada korištene za proizvodnju Amber ale-a.....	34
Tablica 3. Vrste hmelja korištene za proizvodnju Amber ale-a	34
Tablica 4. Vrste kvasca korištene za proizvodnju Amber ale-a	35
Tablica 5. Faze u proizvodnji sladovine na Speidels Braumeister sistemu za kuhanje piva....	40
Tablica 6. Mjerenje parametara provedeno u pogonu za lakše praćenje procesa fermentacije	41
Tablica 7. Laboratorijski izmjereni parametri tijekom fermentacije.....	42
Tablica 8. Laboratorijski izmjereni parametri tijekom odležavanja.....	43
Tablica 9. Laboratorijski izmjereni parametri za gotovo pivo	44