

# Fermentacijska aktivnost komercijalnog kvasca SafAle™ US-05 pri različitim temperaturama i utjecaj na pokazatelje kakvoće piva

---

Žilić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:840447>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
**PREHRAMBENO–TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ana Žilić

**FERMENTACIJSKA AKTIVNOST KOMERCIJALNOG KVASCA  
SAFALE™ US-05 PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I UTJECAJ NA  
POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za bioproceno inženjerstvo

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Nastavni predmet:** Osnove biotehnologije

**Tema rada** je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj dana 31. ožujka 2022.

**Mentor:** prof. dr. sc. Natalija Velić

**Komentor:** dr. sc. Goran Šarić, znan. sur.

**Fermentacijska aktivnost komercijalnog kvasca Safale™ US-05 pri različitim temperaturama i utjecaj na pokazatelje kakvoće piva**

Ana Žilić, 0113144113

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj temperature fermentacije na fermentacijsku aktivnost komercijalno dostupnog kvasca SafAle™ US-05 te na osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće piva. Optimalna temperatura fermentacije ovog kvasca kreće se u rasponu od 18 °C do 25 °C. U tu svrhu provedene su mikrofermentacije sladovine ( $V_{\text{sladovine}} = 1,5 \text{ L}$ ) u Erlenmeyerovim tikvicama zatvorenim vrenjačama, pri temperaturama fermentacije 18 °C, 23 °C i 35 °C. Fermentacijska aktivnost praćena je određivanjem mase oslobođenog CO<sub>2</sub>. Mikrofermentacije su trajale 12 dana (18 °C i 23 °C), odnosno 6 dana (35 °C). U dobivenim uzorcima piva određeni su osnovni pokazatelji kakvoće: ekstrakt osnovne sladovine, prividni ekstrakt, stvarni ekstrakt, udio alkohola, pH, energetska vrijednost i ukupni polifenoli. Iz rezultata je vidljivo kako je kvasac SafAle™ US-05 pokazao dobru fermentacijsku aktivnost pri 18 °C i 23 °C, dok je pri 35 °C nakon trećeg dana došlo do inhibicije fermentacije. Vrijednosti promjene specifične brzine fermentacije su značajno veće pri temperaturama 18 °C i 23 °C u odnosu na one pri temperaturi 35 °C. Analiza osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće piva pokazala je kako temperatura fermentacije nije imala utjecaja na pH vrijednost i koncentraciju ukupnih polifenola dobivenih uzoraka piva. Prividni ekstrakt, stvarni ekstrakt i volumni udio alkohola bili su direktno ovisni o temperaturi fermentacije, pri čemu je pri temperaturama fermentacije 18 °C i 23 °C volumni udio alkohola iznosio 6,01% i 6,18%, dok je pri temperaturi fermentacije od 35 °C volumni udio alkohola iznosio 1,79%. Temperature fermentacije značajno veće od optimalnih temperatura za odabrani kvasac rezultirale su konačnim proizvodom nezadovoljavajuće kakvoće.

**Ključne riječi:** temperatura fermentacije, brzina fermentacije, kvasac Safale™ US-05, fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće piva

**Rad sadrži:** 37 stranica

8 slika

2 tablice

35 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

1. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović      predsjednik
2. prof. dr. sc. Natalija Velić      član-mentor
3. dr. sc. Goran Šarić, znan. sur.      član-komentor
4. izv. prof. dr. sc. Ante Lončarić      zamjena člana

**Datum obrane:** 26. rujan 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATION THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process engineering  
Subdepartment of Bioprocess engineering  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Graduation program:** Food engineering  
**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Biotechnology  
**Course title:** Basics of Biotechnology  
**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VI. in the academic year 2021/2022 held on March 31<sup>st</sup>, 2022  
**Supervisor:** Natalija Velić, PhD, full prof.  
**Co-supervisor:** Goran Šarić, PhD, scientific associate

### Fermentation Activity of the Commercial Yeast Safale™ US-05 at Different Temperatures and the Effect on Beer Quality Indicators

Ana Žilić, 0113144113

**Summary:** The aim of this work was to investigate the influence of fermentation temperature on the fermentation activity of the commercial yeast SafAle™ US-05 and on the basic physicochemical indicators of beer quality. The optimal fermentation temperature for this yeast is between 18 °C and 25 °C. For this purpose, microfermentations of wort ( $V_{\text{wort}} = 1.5$  L) were carried out in Erlenmeyer flasks closed with airlocks at fermentation temperatures of 18 °C, 23 °C and 35 °C. Fermentation activity was monitored by determining the mass of CO<sub>2</sub> released. The microfermentations lasted 12 days (18 °C and 23 °C) and 6 days (35 °C). Basic quality indicators were determined in the obtained beer samples: original extract, apparent extract, real extract, alcohol content, pH, energy value and total polyphenols. The results show that SafAle™ US-05 yeast showed good fermentation activity at 18 °C and 23 °C, while at 35 °C fermentation inhibition occurred after the third day. The values of the change in specific fermentation rate are significantly higher at 18 °C and 23 °C than at 35 °C. The analysis of the basic physicochemical indicators of beer quality showed that the fermentation temperature had no effect on the pH and the concentration of total polyphenols in the obtained beer samples. The apparent extract, actual extract, and alcohol content were directly dependent on the fermentation temperature, with the alcohol by volume at fermentation temperatures of 18 °C and 23 °C being 6.01% and 6.18%, respectively, while at a fermentation temperature of 35 °C it was 1.79%. Fermentation temperatures significantly higher than the optimum temperatures for the selected yeast result in a final product of unsatisfactory quality.

**Key words:** fermentation temperature, fermentation activity, Safale™ US-05 yeasts, beer quality indicators

**Thesis contains:** 37 pages  
8 figures  
2 tables  
35 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. Hrvoje Pavlović, PhD, full prof     | chairperson   |
| 2. Natalija Velić, PhD, full prof.     | supervisor    |
| 3. Goran Šarić, PhD, sci. associate    | co-supervisor |
| 4. Ante Lončarić, PhD, associate prof. | stand-in      |

**Defense date:** September 26<sup>th</sup>, 2023

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** the Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## Zahvale

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Nataliji Velić što je omogućila da svoj diplomski rad odradim upravo kod nje, unatoč spoznaji da ima gust raspored. Hvala joj na njezinoj srdačnosti, stručnosti, pomoći i svim savjetima tijekom provođenja ovog istraživanja.

Hvala mom komentoru dr. sc. Goranu Šariću, znan. sur. na pomoći oko analiza uzoraka piva, koje su važan dio ovog diplomskog rada.

Hvala i svim ostalim profesorima koji su mi tijekom mog fakultetskog obrazovanja pružili ono najvažnije, a to je znanje.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima, jer su me oduvijek usmjeravali i vjerovali da sve što želim mogu i ostvariti.

Hvala mojoj braći, Ivici i Niki, jer sam ih prije svakog ispita maltretirala s pitanjima poput „*hoću li proći*“, a vjerujte nekad sam s pitanjima zaista znala pretjerati.

Hvala mojoj sestri Andrei, jer mi je uvijek znala dati koristan savjet, saslušati me i biti tu kad je najviše trebam.

Hvala i mojoj maloj preslatkoj nećakinji Ivi, jer je kad je god teta morala učiti sjedila pored mene i crtala, samo kako bi bila uz mene.

Zapravo, hvala mojoj obitelji najviše na zagrljajima, jer ja zaista volim zagrljaje prije ispita. Iako sam u većini slučajeva išla spremna na ispite, uvijek je tu bila prisutna određena količina treme koju su oni na ovaj način u velikoj mjeri reducirali.

Hvala mom dečku Renatu, jer je uvijek bio uz mene i vjerovao u mene.

Hvala i mojim prijateljima iz studentskih klupa, osobito mojoj Maji i Matei, jer su mi olakšale studentske dane i učinile ih nezaboravnim.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. DEFINICIJA I PODJELA PIVA .....	4
2.2. SIROVINE I TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA .....	5
2.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA .....	7
2.3. KVASCI U PROIZVODNJI PIVA .....	10
2.3.1. SAFALE™ US-05 .....	12
2.4. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KVASCA I KAKVOĆU PIVA .....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. ZADATAK .....	16
3.2. MATERIJALI I APARATURE .....	16
3.2.1. MATERIJALI .....	16
3.2.2. APARATURE .....	17
3.3. METODE .....	18
3.3.1. Priprema sladovine i provođenje mikrofermentacija .....	18
3.3.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca–određivanje mase CO <sub>2</sub> oslobođenog tijekom mikrofermentacija sladovine .....	20
3.3.3. Standardne fizikalno–kemijske analize .....	21
3.3.3.1. Određivanje ekstrakta osnovne sladovine, prividnog i stvarnog ekstrakta, alkohola i energetske vrijednosti .....	21
3.3.3.2. Određivanje pH (MEBAK 2.17) .....	22
3.3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola (MEBAK 2.21.2) .....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KOMERCIJALNOG KVASCA SAFALE™ US-05 .....	24
4.2. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA .....	27
5. ZAKLJUČCI .....	30
6. LITERATURA .....	32
7. IZVORI SLIKA .....	36

## **1.UVOD**

Pivo je alkoholno ili bezalkoholno gazirano osvježavajuće piće s karakterističnom aromom po hmelju, dobiveno fermentacijom sladovine uz pomoć posebno odabranih sojeva pivskih kvasaca.

Prema vrsti kvasca korištenog za fermentaciju sva se piva mogu podijeliti na piva gornjeg vrenja ili ale piva, proizvedena korištenjem sojeva vrste *Saccharomyces cerevisiae*; piva donjeg vrenja tzv. lager piva dobivena korištenjem sojeva vrste *Saccharomyces pastorianus*; afrička piva (proizvodi od prosenog slada pomoću kvasca *Schizosaccharomyces pombe*) te spontano prevrela piva (dobivena pomoću divljih kvasaca).

Tijekom fermentacije kvasci transformiraju šećere u alkohol i druge spojeve, doprinoseći okusu, mirisu i karakteristikama piva. S tehnološkog aspekta, neophodno je poznavati osnovna svojstva kvasca kao što su fermentacijska aktivnost i flokulacijska sposobnost, potreba za kisikom, osmotska i alkoholna tolerancija i sl., jer utječu na tijek fermentacije. Važan čimbenik koji utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca, odnosno brzinu fermentacije je temperatura. S obzirom na to da temperatura utječe na reprodukciju kvasca, na početku fermentacije ključan je pravilan odabir temperature fermentacije, zbog čega je važno poznavati koji je optimalni raspon temperature fermentacije za odabrani kvasac koji mu omogućuje najbolje performanse i proizvodnju piva željenih karakteristika. Temperature veće od optimalnih predstavljaju stres za stanice kvasca i uzrokuju smanjenje njihove vijabilnosti, što posljedično dovodi do smanjenja fermentacijske aktivnosti, a može imati i negativan utjecaj na aromu i okus piva.

Jedan od često korištenih komercijalno dostupnih kvasca u pivarstvu je kvasac gornjeg vrenja SafAle™ US-05 koji je korišten u ovom radu, kako bi se istražio utjecaj temperature fermentacije na fermentacijsku aktivnost kvasca te na osnovne fizikalno-kemijske karakteristike piva.



## **2. TEORIJSKI DIO**

### 2.1. DEFINICIJA I PODJELA PIVA

Pivo je osvježavajuće piće koje može biti alkoholno i bezalkoholno s posebno izraženom aromom hmelja, dobiva se fermentacijom pivske sladovine uz pomoć određenih sojeva pivskih kvasaca, a volumni udio alkohola ovisi o vrsti piva (Mašek, 2010).

Definicija piva prema Pravilniku o pivu (Narodne novine 142/11) glasi: *“pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca Saccharomyces cerevisiae, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura”*.

Marić i Nadvornik (2010) navode da ovisno o vrsti kvasca te načinu provođenja samog postupka vrenja, pivo možemo podijeliti na: lager piva također poznata kao piva donjeg vrenja, ale piva ili piva gornjeg vrenja, spontana prevrela piva te afrička piva. Prilikom proizvodnje piva najčešće su u upotrebi dvije vrste kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnju piva gornjeg vrenja te *Saccharomyces pastorianus* za dobivanje piva donjeg vrenja (Graham i sur., 2017). Spontana prevrela piva proizvode se inokuliranjem pivske sladovine s divljim, neselekcioniranim kvascima iz zraka. Iako spontana fermentacija piva seže u daleku prošlost obrtničkog pivarstva, ovaj način proizvodnje piva koristi se i danas za proizvodnju čuvenih Lambic piva u dolini rijeke Zenne u Belgiji (Carriglio i sur, 2022). Afričko pivo proizvodi se upotrebom kvasca *Schizosaccharomyces pombe* koji podnosi ekstremne temperaturne uvjete od 30 °C do 40 °C. Ovaj tip piva za razliku od prethodno navedenih zahtjeva proseni, a ne ječmeni slad (Grba, 2010).

Tipovi piva mogu biti definirani masenim udjelom ekstrakta u sladovini prije započinjanja postupka fermentacije, a ovisno o tome imamo: slaba tj. laka piva, standardna piva, specijalna piva, dvostruko sladna piva i ječmena vina. Laka piva djeluju osvježavajuće tijekom vrućih ljetnih mjeseci, te sadrže malu količinu alkohola i neprevrelog ekstrakta. Standardna piva sadrže od 10% do 12% ekstrakta, te im se koncentracija alkohola kreće od 3,5% do 5,5%. Puna piva poznata i pod nazivom „specijalna piva“, proizvode se od sladovine s više od 12% suhe tvari te sadržavaju veću količinu neprevrelog ekstrakta. Dvostruko sladna piva tzv. „jaka piva“ dobivena su iz sladovine koja ima od 18% do 22% ekstrakta. Ječmena vina sadrže istu količinu alkohola kao i vina to jest od 7,5% do 10%. Ova piva su zbog velike koncentracije neprevrelog ekstrakta izraženog

bogatog okusa, stoga je česta konzumacija u manjim količinama u vidu desertnog pića (Marić, 2009).

S obzirom na volumni udio alkohola u pivu, ono se može podijeliti na: bezalkoholno pivo, pivo s malim udjelom alkohola, standardno ili jednostavno pivo, jako pivo i ječmena vina. Iako često nosi naziv „bezalkoholno pivo“, ono može sadržavati i do 0,5% alkohola, ali postoje izuzeci poput islamskih zemalja gdje zbog vjerskih uvjerenja ta koncentracija mora biti jednaka nuli. Piva s niskom količinom alkohola imaju manje od 3,5% alkohola. Standardna piva sadrže više od 3,5% alkohola, dok jaka piva sadrže iznad 5% alkohola. Ječmena vina sadrže kao i vino, više od 8% alkohola. Ovisno o korištenoj glavnoj sirovini, pivo može biti: ječmeno, pšenično, raženo i afričko koje se proizvodi od prosa kao osnovne sirovine (Nadvornik i Marić, 1995).

Prema boji pivo može biti: svijetlo, crveno, tamno i crno, ali zapravo je riječ o raznolikim nijansama žute, crvene, crveno-smeđe i crne boje (Beazly, 1994).

### 2.2. SIROVINE I TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA

Temeljne četiri sirovine potrebne za proces proizvodnje piva su: voda, hmelj, kvasac i fermentabilni šećeri (najčešće sladni ječam) (Papazian, 2014). Kvaliteta ovih sirovina kao i poznavanje njihovih fizikalno-kemijskih karakteristika te utjecaja na sam tehnološki proces, predstavlja osnovu za njihovu preradu, te igra ključnu ulogu u proizvodnji kvalitetnog piva (Šakić, 2005).

**Slad (slika 1)** u pivu predstavlja glavni izvor fermentabilnih šećera (Alworth, 2015). Najčešće se dobiva iz ječma, ali se može proizvesti i od svih ostalih žitarica (Vogel, 2006). Osnovni sastojak ječma je škrob koji je ujedno i glavni izvor ekstrakta u proizvodnji piva. Neposredna primjena ječma u proizvodnji piva onemogućena je zbog zarobljenosti škroba u stanicama ječma i njegovoj netopljivosti u vodi. Cilj procesa slađenja je nakupljanje enzima u zrnu ječma kako bi se škrob i ostali sastojci zrna mogli prevesti u topiv oblik, te narušavanje stanične strukture ječmenog zrna kako bi sastojci stanica bili lakše izloženi djelovanju enzima. Ovaj cilj se ostvaruje klijanjem zrna

ječma u strogo kontroliranim uvjetima te se ono prekida u određenom trenutku sušenjem kako bi se sačuvali enzimi i da ne bi došlo do prekomjernog utroška rezervnih hranjivih sastojaka. Prema prije navedenom, slad se može ukratko definirati kao proklijalo i zatim osušeno zrno ječma (Gaćeša, 1979).



**Slika 1.** Slad (web 1)

**Hmelj (slika 2)** je višegodišnja dvospolna puzajuća biljka, odnosno jedna biljka ima ženske cvjetove, a druga muške prašničke cvjetove. U pivarstvu se koriste samo neoplođeni cvjetovi hmelja, nositelji osebujnog gorkog okusa piva. Muški prašnički cvjetovi se ne koriste u proizvodnji piva zbog neugodnog gorkog okusa. Da bi očuvali organoleptička svojstva hmelja do njegove upotrebe, potrebno je početni udio vlage (od 60% do 70%) smanjiti na 12% do 15% (Šakić, 2005). S obzirom na to da se hmelj dodaje u vrlo maloj količini u pivo (najčešće od 150 g/hl do 300 g/hl sladovine) naziva se i začinom za pivo. Ova sirovina zbog svoje prepoznatljive gorčine i arome, kao i pozitivnog utjecaja na stabilnost pjene i samog piva, te fizioloških i terapijskih svojstava, uvelike doprinosi kvaliteti piva (Čukalović, 2002).



Slika 2. Hmelj (web 2)

**Voda** je kvantitativno najzastupljeniji sastojak u proizvodnji piva. Samo mali udio sveukupne utrošene vode završava u pivu, dok se najveća količina troši na pranje, ispiranje i u druge svrhe (Kunze, 2004). Voda svojim mineralnim sastavom utječe na senzorska svojstva, a time i na tip piva. Ona mora biti: mikrobiološki ispravna, bistra, bezbojna, bez mirisa i bez suspendiranih čestica, odnosno mora ispunjavati sve norme kvalitete vode za piće (Čukalović, 2002).

**Kvasci** predstavljaju nezamjenjiv sastojak piva, te će biti opisani zasebno u daljnjem tekstu.

### 2.2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA

Proces proizvodnje piva odvija se u varionicama i može se klasificirati u šest tehnoloških operacija: drobljenje slada i drugih neslađenih sirovina, ukomljavanje sladne prekrupe i samljevenih neslađenih žitarica, enzimska hidroliza usitnjenih sastojaka, filtriranje sladovine, kuhanje hmeljne sladovine, te bistenje, hlađenje i prozračivanje sladovine (Schuster i sur., 1988).

Ovaj složeni proces prikazan je na Slici 3. Enzimska hidroliza sastojaka slada tijekom ukomljavanja uvjetovana je dostupnošću enzima tim sastojcima. Iz ovog razloga, slad se prvo mora usitniti (Kunze, 1998). Usitnjavanje slada provodi se u mlinu, mokrim ili suhim postupkom prilikom čega nastaje sladna prekrupa. Ona omogućuje adekvatnu kontaktnu površinu, bolje iskorištenje ekstrakta i veću filtracijsku površinu kojom se osigurava brže cijeđenje sladovine (Marić, 2009).

Ovako pripremljena sladna prekrupa i druge usitnjene neslađene žitarice se miješaju s toplom vodom u postupku ukomljavanja prilikom čega dolazi do enzimske hidrolize proteina i škroba, te nastajanja topljivog sladnog ekstrakta tj. nehmeljne sladovine (Eaton, 2017).

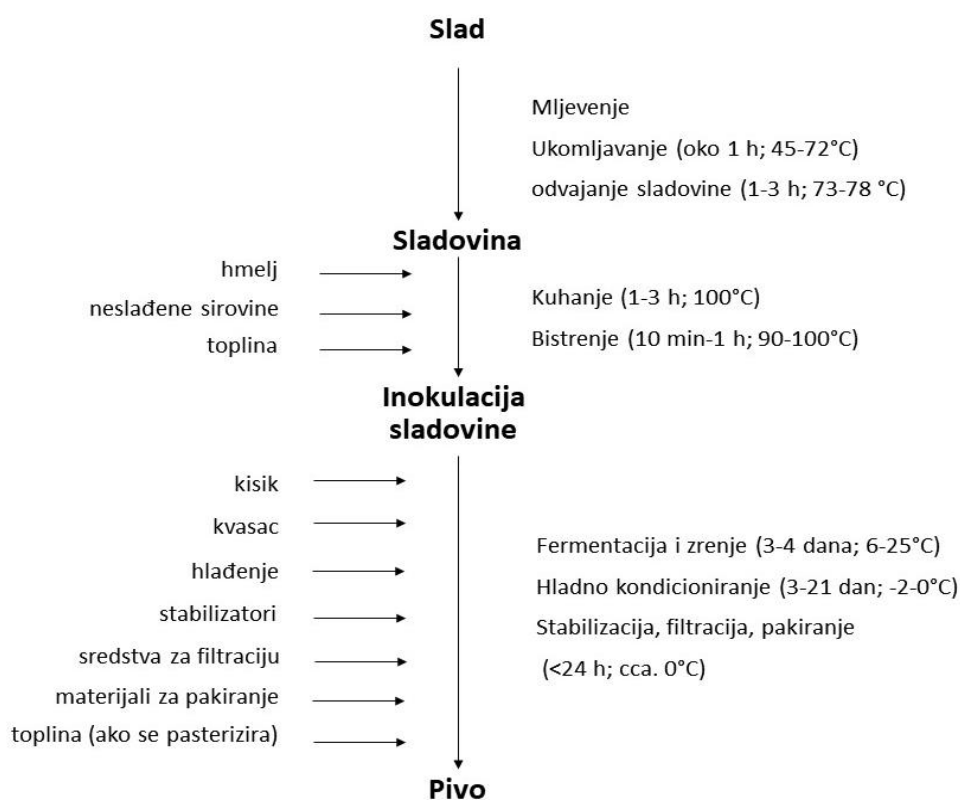
S obzirom na to da se škrob i proteini razgrađuju s različitim enzimima koji imaju drugačije optimalne temperature, ukomljavanje se može provoditi u rasponu od 35 °C do 76 °C prilikom čega je zagrijavanje potrebno provoditi postupno. Ovim putem se netopljivi škrob razgrađuje na fermentabilne šećere (glukoza, maltoza, maltotrioza) i topljive dekstrine. Razgradnju provode amilolitički enzimi ( $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza) iz slada (Marić i Nadvornik, 2010). Proteolitički enzimi hidroliziraju velike proteinske molekule na aminokiselinske frakcije koje poslije kvascima služe kao izvor energije. Ovako razgrađene proteinske frakcije sudjeluju u definiranju arome i pjene piva. Sam proces ukomljavanja je izrazito osjetljiv na temperaturne promjene pa stoga male temperaturne razlike mogu bitno utjecati na promjenu okusa i sastava piva.

Završetkom hidrolize, slatka komina se sastoji od tekuće faze (sladovine) i čvrstog netopivog ostatka slada (tropa) (Marić i Nadvornik, 2010). S obzirom na to da se za proizvodnju piva koristi samo sladovina, potrebno ju je što bolje izdvojiti od tropa u postupku cijedenja (Kunze, 1998). Tako pročišćena sladovina doprema se u kotao gdje se podvrgava toplinskoj obradi. Prema Bavarskom Zakonu o čistoći piva, samo se hmelj smije dodavati u sladovinu i kuhati. Međutim, to nije slučaj s drugim zemljama gdje se osim hmelja mogu dodavati i drugi izvori fermentabilnih šećera u obliku tekućih dodataka (Boulton i Quain, 2001).

Svrha toplinske obrade (kuhanja) sladovine je: isparavanje sladovine na zadanu koncentraciju ekstrakta, povećanje koncentracije hmeljne sladovine, izomerizacija hmelja, sterilizacija sladovine, koagulacija bjelančevina i tanina te njihovo taloženje, inaktivacija enzima i isparavanje nepoželjnih komponenti (Šakić, 2005). Izdvajanjem toplog taloga omogućeno je bistrenje prokuhane sladovine. Ovako izbistrenu sladovinu potrebno je ohladiti na odgovarajuću temperaturu fermentacije te prebaciti u fermentor, pri čemu se sladovina također i aerira, odnosno obogaćuje kisikom. U fermentoru se sladovina inokulira s kvascem. Kvasac prevodi glukozu u etanol, CO<sub>2</sub> i nusproizvode alkoholnog vrenja. Nakon završetka glavne fermentacije, veću količinu kvasaca je potrebno izuzeti iz fermentora kako bi kasnije mogli biti upotrebljavani

za naciepljivanje drugih fermentora, a preostali dio kvasaca služi za naknadnu fermentaciju. Mlado pivo dozrijeva i zasićuje s CO<sub>2</sub> tijekom naknadne fermentacije pri nižim temperaturama.

Po završetku naknadne fermentacije potrebno je pivo stabilizirati te profiltrirati. Ovisno o izabranom načinu provođenja pasterizacije u postrojenju, pasterizacija ambalažnog piva se provodi u tunelskim pasterizatorima, dok se protočni pasterizator koristiti za pasterizaciju piva prije njegovog pretakanja u ambalažni materijal. Nakon pasterizacije, pivo je potrebno uskladištiti (Grba, 2010).



Slika 3. Prikaz proizvodnje piva (web 3)

### 2.3. KVASCI U PROIZVODNJI PIVA

Proizvodnja alkoholnih pića iz fermentabilnih izvora ugljika pomoću kvasaca je najstariji i ekonomski najvažniji proces u biotehnologiji. Kvasac ima ključnu ulogu u proizvodnji svih alkoholnih pića i odabir adekvatnog soja kvasca važan je ne samo kako bi se maksimalno povećao prinos alkohola, već i kako bi se očuvala senzorska kvaliteta pića (Walker i Stewart, 2016). Okus i miris svakog piva uvelike je determiniran korištenim sojem kvasca kao i samim sastavom sladovine.

Osim toga, svojstva kvasca kao što su: fermentacijska sposobnost, flokulacija, osmotski tlak, tolerancija na etanol i potreba za kisikom imaju kritičan utjecaj na sam tijek fermentacije. Pojedine pivovare imaju svoje sojeve kvasaca koje obnavljaju i drže kao tajnu kako bi ih koristili kao komparativnu prednost naspram konkurencije, ali to nije uvijek slučaj. U Njemačkoj, primjerice, većina piva se proizvodi od samo četiri pojedinačna soja kvasca i prilikom čega čak 65% čini jedan soj čije porijeklo potječe iz Instituta Weihenstephan, kao sastavnog djela Tehničkog sveučilišta u Münchenu (Stewart, 2016).

Sojevi pivskih kvasaca pri proizvodnji piva moraju imati sposobnost brzog i visokog previranja sladovine prethodno obogaćene kisikom do etanola i odgovarajuće koncentracije nusprodukata fermentacije (viši alkoholi, aldehidi, ketoni). Osim toga, moraju reducirati diacetil, imati dobru flokulacijsku sposobnost, taložiti se i biti stabilni tijekom svake sljedeće uporabe, što rezultira dobivanjem piva s uvijek istim mirisom i okusom na kraju svakog proizvodnog procesa (Marić, 2009).

Pivski kvasci pripadaju rodu *Saccharomyces*, ali se za proizvodnju ale i lager piva koriste različite vrste ovog roda. Tradicionalno se za proizvodnju ale piva, tzv. piva gornjeg vrenja koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji se nakuplja na površini sladovine koju previre, dok se za proizvodnju lager piva koristi *Saccharomyces pastorianus* koji provodi donje vrenje na dnu fermentora (Walker i Stewart, 2016). Razlike između *Saccharomyces cerevisiae* (ale kvasaca) i *Saccharomyces pastorianusa* (lager kvasaca) prikazane su u tablici 1.



**Tablica 1.** Razlike između *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* (adaptirano prema Stewart, 2016)

<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ale kvasci)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• „gornje“ vrenje – kvasci po završetku vrenja isplivavaju na površinu piva</li> <li>• optimalna temperatura fermentacije od 18 °C do 25 °C</li> <li>• maksimalna temperatura rasta je jednaka ili manja od 37 °C</li> <li>• nema sposobnost razgradnje melibioze</li> <li>• veća koncentracija estera u pivu</li> </ul>
<b><i>Saccharomyces pastorianus</i> (Lager kvasci)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• „donje“ vrenje - na kraju fermentacije kvasci se talože na dnu fermentora</li> <li>• optimalna temperatura fermentacije od 8 °C do 15 °C</li> <li>• maksimalna temperatura rasta je 34 °C</li> <li>• razgrađuje melibiozu</li> </ul>

Na globalnoj razini 90% piva je lager, 5% ale, a ostatak čine piva dobivena spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima i bakterijama (Iorizzo i sur., 2021). Do prije nekoliko godina izbor starter kulture u proizvodnji piva bazirao se isključivo na sojevima koji pripadaju rodu *Saccharomyces* zbog toga što ovi kvasci prevladavaju tijekom spontanog vrenja. Nasuprot tome, kvasci koji nisu iz roda *Saccharomyces* često su zanemarivani zbog njihove male zastupljenosti tijekom fermentacije kao i zbog proizvodnje spojeva (octena kiselina, diacetila i 2,3-butandiol) koji pivu daju nepoželjan okus.

Usprkos tome, rastuća potražnja za novim specijalnim pivima potaknula je istraživače da ponovo istraže potencijalni utjecaj *ne-Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji piva. Ovo ponovno istraživanje opravdala je činjenica da *ne-Saccharomyces* kvasci za razliku od *Saccharomyces* kvasaca posjeduju mnoge druge enzimске aktivnosti koje mogu dovesti do proizvodnje metabolita koji doprinose većoj aromatskoj složenosti alkoholnih pića (Iorizzo i sur., 2021).

### 2.3.1. SAFALE™ US-05

SafAle™ US-05 (American Ale) je komercijalni pivski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) često korišten tijekom procesa proizvodnje za dobivanje dobro izbalansiranih piva i u proizvodnji velikog broja stilova. SafAle™ US-05 je blisko povezan s mnogim drugim sojevima kvasca koji se koriste za proizvodnju stilova poput American Pale Ale, India Pale Ale, Amber i Brown Ale piva, te se pretpostavlja da vjerojatno potječe od popularnog Chico soja iz Ujedinjenog Kraljevstva.

Ovi sojevi američkog kvasca u općoj su upotrebi i posjeduju veliki broj poželjnih karakteristika za komercijalnu proizvodnju napitaka od fermentiranih žitarica. SafAle™ US-05 pokazuje umjereno visoku prevrelost (od 78% do 82%), ima visoku toleranciju na alkohol (od 9% do 11%), umjerenu flokulacijsku sposobnost, širok temperaturni raspon fermentacije (od 18 °C do 28 °C), te proizvodi malu količinu estera (Kits i Garshol, 2017.).

### 2.4. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KVASCA I KAKVOĆU PIVA

Temperatura vrenja i soj kvasca ima velik utjecaj na aromatski profil i stil piva. Upravo iz ovog razloga se može zadovoljiti rastuća potražnja za craft pivima jer primjena različitih kvasaca kao i vođenje fermentacije na različitim temperaturama, omogućava proizvodnju piva s različitim senzorskim karakteristikama (Lasanta i sur., 2020). Količina hlapljivih spojeva ovisi o sastavu sladovine, stupnju aeracije, načinu primjene kvasca, procesnoj temperaturi i režimu punjenja spremnika (Kucharczyk i Tuszyński, 2018).

Brzina biokemijskih promjena utječe na brzinu vrenja i samu kvalitetu piva, a definirana je sljedećim čimbenicima: sojem kvasca, fiziološkim stanjem kvašćevih stanica, volumenom inokuluma, raspodjelom kvasca u sladovini, raspoloživosti otopljenog kisika u sladovini, sastavom i vrijednosti pH sladovine te temperaturom vrenja (Marić, 2009.). Opće je poznato da temperatura vrenja utječe na aromu piva. Fermentacija vođena na niskim temperaturama rezultira

proizvodnjom piva s poboljšanim okusom i mirisom, kao i visokim udjelom etanola (Kucharczyk i Tuszyński, 2018).

Iako vođenje fermentacije na nižim temperaturama rezultira boljim krajnjim proizvodom, pivovare često za proizvodnju koriste sladovinu s visokim udjelom suhe tvari i provode fermentacijske procese na većim temperaturama radi uštede energije, prostora i vremena. Po završetku fermentacijskog procesa, dobiveni proizvod se razrjeđuje s deaeriranom vodom kako bi se proizvelo pivo željene koncentracije alkohola (Blieck i sur., 2007).

Adekvatan izbor temperature, osobito na početku fermentacije ključan je za brzu proliferaciju kvasca. Nadalje, nekontrolirano povećanje temperature može uzrokovati naglo povećanje aktivnost kvasaca, što je nepoželjno jer ta promjena može dovesti do narušavanja stabilnosti pjene i boje piva, pada pH vrijednosti i većeg gubitak gorkih spojeva. Regulacija temperature predstavlja jedan od najefikasnijih faktora za modifikaciju brzine fermentacije (Solgajová i sur., 2013).

Izrazito niska temperatura prilikom dodavanja kvasca u sladovinu može usporiti brzinu fermentacije, a time i pospješiti nastajanje nepoželjnih spojeva kao što su vicinalni diketoni i acetaldehidi. Proces redukcije ovih spojeva ovisi o temperaturi fermentacije, koncentraciji etanola i dozrijevanju piva (Dziuba, 2001). Najznačajniji predstavnici nepoželjne arome u nezrelom pivu su diacetil (2,3 - butandiol) i acetoin (2,3 - pentandion) (Marić, 2009). Oni su produkti kvašćeva metabolizma te nastaju tijekom vođenja procesa fermentacije. Željena koncentracija ovih spojeva u pivu ovisit će o određenoj aromi kojoj se teži, međutim diacetil u većini slučajeva daje lošu aromu pa bi većina proizvođača piva bila sretna kada bi mogli proizvesti pivo bez njega (Inoue, 1992). Diacetil daje aromu poput maslaca, a 2,3 - pentandion aromu poput meda (Searens i sur, 2008).

Povećanje temperature fermentacije dovodi do smanjenja koncentracije vicinalnih diketona (Masschelein, 1986; Narzis, 1987; Mudura i sur., 2006). Saerens i suradnici (2008.) utvrdili su da je porast temperature od 12 °C do 15 °C prouzročio smanjenje koncentracije diacetila za približno 20%. Nadalje, u dozrelom pivu su prisutni i drugi neželjeni sastojci poput aldehida čiji je najznačajniji predstavnik acetaldehid. On nastaje dekarboksilacijom pirogroždane kiseline, a

akumulira se u mladom pivu tijekom prva tri dana fermentacije zbog toga što ga kvasci ne mogu reducirati do etanola. Acetaldehid daje "podrumsku" ili pljesnivu aromu mladom pivu (Marić, 2009).

Istraživanjem koje su proveli Roustan i Sablayrolles (2002) utvrđeno je da se koncentracija acetaldehida povećava tijekom primjene viših temperatura fermentacije odnosno u temperaturnom rasponu od 5 °C do 20 °C. Međutim, prolongirani ciklus može uzrokovati nastanak visoke koncentracije acetaldehida na niskoj temperaturi fermentacije (6 °C) (Perpete i Collin, 1999).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj temperature fermentacije na fermentacijsku aktivnost komercijalnog kvasca SafAle™ US-05, kao i utjecaj na osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće piva.

### 3.2. MATERIJALI I APARATURE

#### 3.2.1. MATERIJALI

Tijekom proizvodnje i analize piva korištene su sljedeće sirovine, kemikalije i materijali:

- svijetli bazni ječmeni slad Pale Ale Best, boja 4,5-6,5 EBC (Simpsons Malt, Velika Britanija)
- ječmeni slad CaraMunich® type 1, boja 80 – 100 EBC (WEYERMANN®, Njemačka)
- hmelj Columbus, 15,4% alfa kiselina (SAD)
- hmelj Centenial, 10,5% alfa kiselina (SAD)
- hmelj Cascade, 8% alfa kiselina (SAD)
- komercijalni suhi kvasac gornjeg vrenja *S. cerevisiae* SafAle™ US-05 (Fermentis, Francuska)
- Protafloc, sredstvo za bistrenje na bazi irske mahovine (Neil's Brewing Supplies, Velika Britanija)
- mliječna kiselina (80%) (Lactol, Vinfoferm, Belgija)
- CaSO<sub>4</sub>, p.a (Sigma Aldrich, SAD)
- CaCl<sub>2</sub>, p.a (Kemika, Hrvatska)
- MgSO<sub>4</sub>, p.a (Kemika, Hrvatska)
- Na-karboksi metil celuloza (Sigma Aldrich, SAD)
- željezov(III) citrat (Fluka, SAD)
- dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma Aldrich, SAD)

- koncentrirana HNO<sub>3</sub> (Kemika, Hrvatska)

#### 3.2.2. APARATURE

- vaga područja mjerenja do 4200 g (PLE 4200-2N, Kern, Njemačka) korištena je prilikom vaganja sirovina, materijala, kemijskih tvari i tikvica po Erlenmeyeru
- analitička vaga (NBL 84i, Nimbus Analytical Balances, Adam Equipment, SAD) korištena je za vaganje kemikalija
- automatizirani sustav Braumeister (Speidl, Njemačka) (slika 4) volumena 20 L koristio se prilikom ukomljavanja te kuhanja sladovine
- ručna pumpa/automatski sifon (Fermtech, Kanada) koristila se po završetku fermentacije za punjenje piva u boce
- rashladna vinska vitrina (Candy, Italija) upotrebljavala se za provođenje fermentacije pri temperaturi od 18 °C
- inkubator s mogućnošću hlađenja (Aqualytic, Dortmund, Njemačka) rabio se za provođenje fermentacije pri temperaturi od 23 °C
- inkubator (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havočić, Hrvatska) se upotrebljavao za provođenje fermentacije pri temperaturi od 35 °C
- digitalni refraktometar (HI96800, Hanna Instruments, SAD) korišten je za određivanje koncentracija suhe tvari sladovine tijekom kuhanja i ukomljavanja
- pH metar (edge® HI2020, Hanna Instruments, SAD) je korišten za praćenje pH tijekom ukomljavanja sladovine i određivanje pH vrijednosti uzoraka piva
- analizator piva (Alcolyzer Beer Analyzing System, Anton Paar, Austrija) korišten je za provedbu standardnih analiza piva
- spektrofotometar (UV-1900, Shimadzu, Japan) je korišten za provođenje standardnih analiza boje piva i ukupnih polifenola u pivu



**Slika 4.** Braumeister (Speidl, Njemačka) sustav za proizvodnju sladovine (web 4)

## 3.3 METODE

### 3.3.1. Priprema sladovine i provođenje mikrofermentacija

Za proizvodnju 20 L sladovine korišteni su sljedeći sladovi: 5 kg svijetlog baznog ječmenog slada Pale Ale Best i 0,12 kg ječmenog slada CaraMunich® type 1. Nakon toga, pripremljena je voda za ukomljavanje odgovarajućeg profila za stil piva American Pale Ale na način da je u 23 L destilirane H<sub>2</sub>O dodano 2,5 g kalcijevog klorida, 3 g kalcijevog sulfata i 3,5 g magnezijevog sulfata. Početak ukomljavanja odvijao se na 60 °C, a ostalih 60 minuta ukomljavanje se provodilo na 67 °C. Kako bi se pH sladovine tijekom ukomljavanja održavao između 5,2 i 5,6 dodano je ukupno 5 mL 80% mliječne kiseline. Po završetku ukomljavanja, pristupilo se cijedenju i ispiranju netopljivog ostatka slada (pivskog tropa) s dodatne 3 L prethodno pripremljene vode za ispiranje temperature 78 °C. Nakon toga uslijedilo je kuhanje sladovine u trajanju od 60 min. Hmeljenje sladovine provedeno je na način da je odmah na početku kuhanja u sladinu dodano 8 g hmelja Columbus, 15 min prije kraja kuhanja dodano je 15 g hmelja Centenial i po završetku kuhanja 32 g hmelja Cascade.



Kao sredstvo za poticanje koagulacije i taloženje proteina, 10 minuta prije kraja kuhanja sladovine dodano je sredstvo za bistrenje piva na bazi irske mahovine (Protafloc) prema preporuci proizvođača. Sladovina je zatim ohlađena do najniže odabrane temperature fermentacije, tj. na 18 °C. Mikrofermentacije su provođene u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 2 L zatvorene vrenjačama. Za svaku od tri ispitivane temperature fermentacije korištene su po dvije Erlenmeyerove tikvice te je u svaku dodano po 1,5 L sladovine, čiji je udio ekstrakta iznosio 13 °P. Nakon termostatiranja tikvica na odabrane temperature fermentacije, provedena je inokulacija tikvica rehidriranim komercijalnim suhim kvascem gornjeg vrenja SafAle™ US-05.

Rehidracija kvasca je provođena na način da je u 35 mL sterilne vode temperature 25 °C suspendirano 3,5 g kvasca. Nakon toga je ova suspenzija ostavljena da odleži tijekom 15 minuta te je po tom korištena za inokulaciju tikvica (po 3,9 mL suspenzije kvasca) u kojima se nalazila sladovina odgovarajuće temperature. Erlenmeyerove tikvice su potom zatvorene vrenjačama i stavljene su u rashladnu vitrinu (18 °C), odnosno u inkubatore (23 °C i 35 °C) radi održavanje temperature fermentacije konstantnom. Fermentacija je trajala 12 dana pri temperaturama 18 °C i 23 °C te 6 dana pri temperaturi 35 °C (dok nije postignuta neznatna promjena mase tikvice, odnosno mase oslobođenog CO<sub>2</sub>). Po završetku fermentacije, tikvice su ohlađene na temperaturu 4 °C, koja omogućuje učinkovitije taloženje i izdvajanje kvasca, te bistrenje mladog piva (slika 5). Pri ovoj temperaturi mlado pivo je odležavalo tri dana te je nakon toga ručnom pumpom pretočeno u boce volumena 0,33 L.

U sve boce dodano je po 2,5 g saharoze, kako bi se osigurala naknadna refermentacija i povećanje koncentracija CO<sub>2</sub> u pivu, te su boce čuvane na sobnoj temperaturi tijekom 14 dana. Naposljetku su boce čuvane pri 4 °C do trenutka provođenja analiza.



Slika 5. Pivo u Erlenmeyerovim tikvicama prije punjenja u boce

#### 3.3.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca–određivanje mase CO<sub>2</sub> oslobođenog tijekom mikrofermentacija sladovine

Fermentacijska aktivnost kvasca tijekom mikrofermentacije sladovine pratila se indirektno pomoću gravimetrijske metode. Ova kvantitativna metoda zasniva se na promjeni mase tikvice uslijed proizvodnje CO<sub>2</sub> do postizanja konstantne mase. Pri tome se kao slijepa proba za svaku od ispitivanih temperatura fermentacija koristila Erlenmeyerova tikvica napunjena s 1,5 L H<sub>2</sub>O i zatvorena vrenjačom.

Masa oslobođenog CO<sub>2</sub> tijekom mikrofermentacija pivske sladovine definirana je kao razlika promjene mase mikrofermentacijske tikvice i promjene mase tikvice napunjene vodom (slijepa proba).

$$m = m_1 - m_2$$

$m$  – masa oslobođenog CO<sub>2</sub> u mikrofermentacijskoj tikvici [g]

$m_1$  – gubitak mase tikvice izračunat između dva mjerenja [g]

$m_2$  – razlika mase tikvice s vodom između dva mjerenja [g]

Brzina nastajanja CO<sub>2</sub> prikazana je kao omjer mase CO<sub>2</sub> oslobođenog u vremenskom intervalu i umnoška volumena podloge i vremenskog intervala između dva mjerenja:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \times \Delta t}$$

$\frac{dCO_2}{dt}$  – brzina stvaranja CO<sub>2</sub> [g/Lh]

$\Delta m$  – masa ugljikovog dioksida oslobođena u vremenskom intervalu  $\Delta t$  [g]

$\Delta t$  – vremenski period između dva mjerenja [h]

$V$  – volumen podloge [L]

#### 3.3.3. Standardne fizikalno–kemijske analize

##### 3.3.3.1 Određivanje ekstrakta osnovne sladovine, prividnog i stvarnog ekstrakta, alkohola i energetske vrijednosti

Prije analize na analizatoru piva, uzorci piva pripremljeni su filtriranjem preko nabranog filter papira te uklanjanjem CO<sub>2</sub>. Nakon toga, uzorci su analizirani pomoću analizatora piva (slika 6) (Alcolyzer Beer Analyzing System).



Slika 6. Analizator piva (web 6)

#### 3.3.3.2 Određivanje pH (MEBAK 2.17)

Određivanje pH provodi se u uzorcima piva iz kojih je uklonjen CO<sub>2</sub>. Ovako otplinjen uzorak prebacuje se u čašu u kojoj se nalazi uronjena elektroda pH metra, te se vrijednost pH očitava na ekranu uređaja.

#### 3.3.3.3 Određivanje ukupnih polifenola (MEBAK 2.21.2)

Metoda određivanja ukupnih polifenola temelji se na reakciji polifenola s Fe<sup>3+</sup> ionima u alkalnom mediju prilikom čega dolazi do stvaranja obojenog kompleksa željeza. Intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrom.

Za potrebe određivanja ukupnih polifenola pripravljena je svježa otopina CMC/EDTA reagensa koncentracije 10 g/L. 10 g karboksimetil celuloze (CMC) i 2 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) otopljeno je uz miješanje u 500 mL destilirane vode. Poslije homogenizacije, otopinu je prenesena u odmjernu tikvicu od 1000 mL i tikvica je nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Otopina željezovog reagensa koncentracije 5,6 g Fe<sup>3+</sup>/L pripravljena je otapanjem 3,5 g zelenog amonijevog željezo citrata u 100 mL destilirane vode. Ovako pripravljena otopina mora biti potpuno bistra, te je stabilna oko 7 dana ako se čuva u tamnim bocama.

Amonijev reagens pripravljen je otapanjem 0,1 L koncentriranog NH<sub>3</sub> u 0,3 L destilirane H<sub>2</sub>O. 10 mL dekarboniziranog uzorka piva dodano je zajedno s 8 mL svježije otopine CMC/EDTA u odmjernu tikvicu volumena 25 mL te izmiješano. Nakon toga u tikvicu je dodano 0,5 mL željezovog reagensa i 0,5 mL amonijeva reagensa te ponovo izmiješano. Odmjerna tikvica je zatim dopunjena do oznake destiliranom H<sub>2</sub>O. Nakon 10 minuta, izmjerena je apsorbancija uzorka piva pri valnoj duljini od 600 nm. Koncentracija ukupnih polifenola izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$P = A \cdot 820 \cdot F$$

P – koncentracija ukupnih polifenola (mg/L)

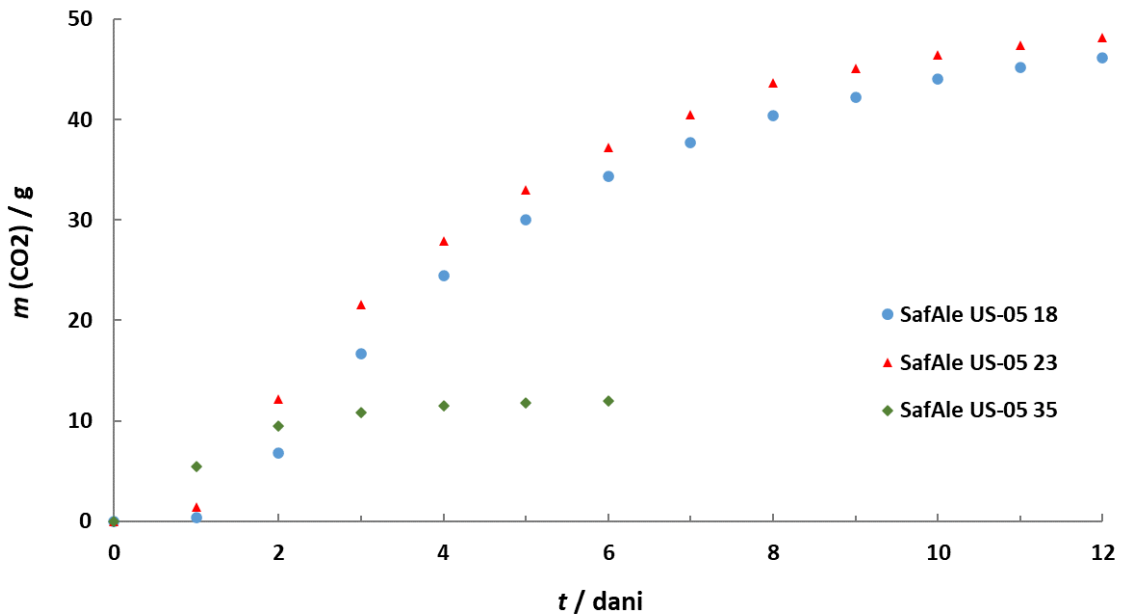
A – apsorbancija uzorka mjerena na 600 nm

F – faktor razrjeđenja

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KOMERCIJALNOG KVASCA SAFALE™ US-05

U ovom radu istraživana je utjecaj različitih temperatura fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na fermentacijsku aktivnost komercijalno dostupnog i široko korištenog suhog kvasca gornjeg vrenja naziva SafAle™ US-05 (soj vrste *S. cerevisiae*). Rezultati su prikazani grafički na slikama 7. i 8., a izraženi su kao srednja vrijednost dviju paralelnih mikrofermentacija ( $SD \leq 1$ ) za svaku odabranu temperaturu fermentacije.



**Slika 7.** Utjecaj temperature fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca gornjeg vrenja SafAle™ US-05

Važan čimbenik koji utječe na fermentacijsku aktivnost kvasca, odnosno brzinu fermentacije je temperatura. S obzirom na to da temperatura utječe na reprodukciju kvasca, na početku fermentacije je jako važan pravilan odabir temperature fermentacije (Kucharczyk i Tuszyński, 2018). Tijek fermentacije, odnosno fermentacijska aktivnost kvasca, može se pratiti posredno

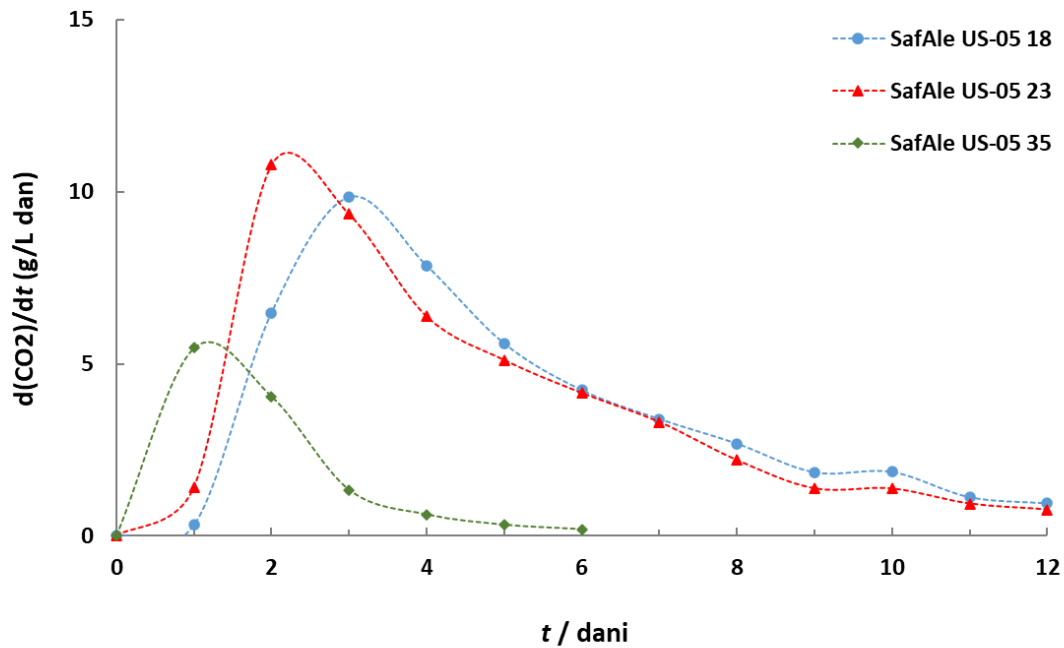
određivanjem mase oslobođenog CO<sub>2</sub> koji nastaje tijekom fermentacije. CO<sub>2</sub> je u stehiometrijskom odnosu s potrošnjom šećera i nastajanjem etanola (Petravić-Tominac i sur., 2013).

Slika 7. prikazuje utjecaj temperature fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na fermentacijsku aktivnost kvasca i vidljivo je kako je fermentacija pri svim temperaturama započela već tijekom prvog dana. Iz profila krivulje za temperaturu 35 °C vidljivo je kako je prvog dana fermentacije masa oslobođenog CO<sub>2</sub>, odnosno fermentacijska aktivnost kvasca, veća nego pri temperaturama 18 °C i 23 °C, ali već od drugog dana dolazi do usporavanja fermentacije pri ovoj temperaturi. Ovo se očituje kroz činjenicu kako je masa oslobođenog CO<sub>2</sub> već od trećeg dana gotovo konstantna (formiranje platoa na krivulji) i vrlo mala.

Profili fermentacijskih krivulja za temperature 18 °C i 23 °C vrlo su slični i odlikuju ih oštri nagibi u prvih šest dana fermentacije, što ukazuje na dobru fermentacijsku aktivnost kvasca pri ovim temperaturama. Nakon šestog dana nagib fermentacijskih krivulja se smanjuje, odnosno dolazi do usporavanja fermentacije.

Dobiveni rezultati su očekivani, budući da se optimalne temperature fermentacije za ovaj kvasac, navedene od strane proizvođača, kreću u rasponu od 18 °C do 26 °C. Temperatura 35 °C je daleko veća od deklariranog optimuma i ima negativan utjecaj na fermentacijsku aktivnost kvasca, odnosno dovodi do inhibicije fermentacije. Ovo je djelomično u skladu s istraživanjima koje su proveli Kits i Garshol (2021). Navedeni autori istraživali su utjecaj osam različitih temperatura fermentacije (20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33,5 °C, 37 °C, 40 °C i 42 °C) na aktivnost kvasca SafAle™ US-05 u standardnoj sladovini (od 12,1 °P do 12,5 °P). Rezultati istraživanja pokazali su kako je temperaturni raspon pri kojem je ovaj kvasac pokazao dobru fermentacijsku aktivnost širi od onog kojeg navodi proizvođač i kreće se u rasponu od 20 °C do 33,5 °C. Nadalje, temperatura 37 °C ili veća dovela je do snažne inhibicije rasta kvasca i zaustavljanja fermentacije. U ovom radu do inhibicije kvasca i zaustavljanja fermentacije došlo je već pri temperaturi 35 °C.

Slika 8. prikazuje utjecaj temperature fermentacije na promjenu specifične brzine fermentacije sladovine komercijalnim pivskim kvascem SafeAle™ US-05.



**Slika 8.** Utjecaj temperature fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na promjenu specifične brzine fermentacije sladovine komercijalnim pivskim kvascem SafeAle™ US-05

Iz Slike 8. se može uočiti kako faza burne fermentacije pri temperaturi 35 °C počinje već prvog dana fermentacije, a završava drugog dana fermentacije. Tiha fermentacija nastavlja se još trećeg dana, dok do snažne inhibicije fermentacije dolazi već od četvrtog dana fermentacije. Pri temperaturama fermentacije 18 °C i 23 °C faza burne fermentacije traje od drugog do petog dana te se zatim nastavlja tiha fermentacija sve do dvanaestog dana. Vrijednosti promjene specifične brzine fermentacije su značajno veće pri temperaturama 18 °C i 23 °C u odnosu na one pri temperaturama 35 °C.

Iz krivulja je također vidljivo kako je najveća promjena specifične brzine fermentacije postignuta drugog dana fermentacije pri temperaturi 23 °C.



## 4.2. UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA

Po završenim mikrofermentacijama sladovine u trajanju od šest (pri temperaturi fermentacije od 35 °C), odnosno dvanaest dana (pri temperaturama fermentacije od 18 °C i 23 °C) pomoću kvasca gornjeg vrenja SafAle™ US-05 provedene su osnovne fizikalno-kemijske analize uzoraka piva: određivanje ekstrakta osnovne sladovine te prividnog i stvarnog ekstrakta, udio alkohola, pH te ukupnih polifenola.

Rezultati analiza prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Fizikalno–kemijske karakteristike uzoraka piva dobivenog nakon mikrofermentacije sladovine pomoću komercijalnog kvasca SafAle™ US-05 pri različitim temperaturama fermentacije

	18 °C		23 °C		35 °C	
	Prosječna vrijednost	SD	Prosječna vrijednost	SD	Prosječna vrijednost	SD
<b>Ekstrakt osnovne sladovine OG [% m/m]</b>	13,83	0,05	13,94	0,01	13,68	0,02
<b>Prividni ekstrakt AE [% w/w]</b>	2,67	0,22	2,46	0,04	10,43	0,62
<b>Stvarni ekstrakt RE [% w/w]</b>	4,81	0,18	4,67	0,04	11,07	0,49
<b>Alkohol [ABV mL/100 mL]</b>	6,01	0,09	6,18	0,01	1,79	0,34
<b>pH</b>	4,27	0,03	4,17	0,00	4,28	0,04
<b>Energetska vrijednost [kJ/100mL]</b>	210,28	0,88	211,86	0,24	213,54	0,17
<b>Ukupni polifenoli [mg/L]</b>	220	4,95	196	2,83	230	3,18

Kako je za mikrofermentacijske eksperimente pri različitim temperaturama fermentacije korištena ista sladovina, vrijednosti ekstrakta osnovne sladovine su ujednačene za sve tri skupine uzoraka (ovisno o temperaturi fermentacije). Nadalje, na osnovu rezultata može se zaključiti kako temperatura fermentacije nije imala utjecaja na pH vrijednost dobivenih uzoraka piva. Razlike u

koncentraciji ukupnih polifenola također nisu bile značajne. U odnosu na početne udjele fenolnih spojeva u sladovini, tijekom alkoholne fermentacije može doći do promjene njihovih udjela u konačnom proizvodu, odnosno do njihova smanjenja. Naime, stanice kvasca mogu apsorbirati fenolne spojeve, što se očituje u njihovoj povećanoj koncentraciji u kvaščevoj biomasi nakon završene fermentacije. S druge strane, koncentracija ukupnih polifenola u gotovom pivu može biti manja od koncentracije u sladovini (Kawa-Rygielska i sur., 2021).

Prividni ekstrakt, stvarni ekstrakt i volumni udio alkohola direktno su ovisni o temperaturi fermentacije, odnosno o fermentacijskoj aktivnosti kvasca. Kako je ta aktivnost bila ujednačena pri temperaturama fermentacije 18 °C i 23 °C, vrijednosti navedenih fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće piva bile su podjednake – kvasac je u većoj mjeri potrošio (metabolizirao) fermentabilne šećere te je nastalo više alkohola i CO<sub>2</sub>. Osim etanola i CO<sub>2</sub> tijekom fermentacije nastaju i drugi metaboliti koji utječu na okus piva, poput organskih kiselina, aldehida, estera, fenolnih spojeva, ketona, viših alkohola i hlapljivih spojeva sa sumporom (Stewart, 2017).

Nešto veća fermentacijska aktivnost kvasca zabilježena je pri temperaturi 23 °C u odnosu na temperaturu 18 °C, pa je u uzorcima piva dobivenim nakon fermentacije pri 23 °C zaostalo manje ekstrakta i nastalo je nešto više alkohola.

Kako je već navedeno u prethodnom poglavlju, fermentacijska aktivnost kvasca SafAle™ US-05 pri temperaturi 35 °C bila je značajno manja od aktivnosti pri temperaturama 18 °C i 23 °C te je već nakon četiri dana došlo do inhibicije fermentacije. Ovo je rezultiralo vrlo malom potrošnjom fermentabilnih šećera te posljedično značajno većim vrijednostima zaostalog ekstrakta te nastankom značajno manje alkohola u odnosu na uzorke piva dobivene provođenjem mikrofermentacija pri 18 °C i 23 °C. Kako je optimalni temperaturni raspon za kvasce gornjeg vrenja (ale kvasce) od 15 °C do 25 °C (Foster i sur., 2022), temperature veće od optimalnih predstavljaju stres za stanice kvasca i uzrokuju smanjenje njihove vijabilnosti, što posljedično dovodi do smanjenja fermentacijske aktivnosti, a može imati i negativan utjecaj na aromu i okus piva, jer temperaturni stres dovodi do nastajanja neželjenih tvari, poput primjerice hlapljivih spojeva sumpora.

Kits i Garshol (2021) navode kako pri uobičajenim temperaturama fermentacije, odnosno pri temperaturama unutar optimalnog raspona, kvasac SafAle™ US-05 daje pivo dobro uravnoteženog aromatskog profila, kojim dominiraju voćni esteri. Povećanjem temperature fermentacije uočen je snažan trend porasta nepoželjnih tvari arome.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih rezultata u eksperimentalnom dijelu ovog rada, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

Praćenjem tijeka fermentacije sladovine korištenjem komercijalnog suhog kvasca gornjeg vrenja SafAle™ US-05 pri različitim temperaturama (18 °C, 23 °C i 35 °C) vidljivo je kako je kvasac pokazao dobru fermentacijsku aktivnost pri 18 °C i 23 °C, dok je pri 35 °C nakon trećeg dana došlo do inhibicije fermentacije.

Vrijednosti promjene specifične brzine fermentacije su značajno veće pri temperaturama 18 °C i 23 °C u odnosu na one pri temperaturi 35 °C. Najveća promjena specifične brzine fermentacije uočena je drugog dana fermentacije pri temperaturi 23 °C.

Analiza osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće piva pokazala je kako temperatura fermentacije nije imala utjecaja na pH vrijednost i koncentraciju ukupnih polifenola dobivenih uzoraka piva.

Prividni ekstrakt, stvarni ekstrakt i volumni udio alkohola bili su direktno ovisni o temperaturi fermentacije, pri čemu je pri temperaturama fermentacije 18 °C i 23 °C volumni udio alkohola iznosio 6,01% i 6,18%, dok je pri temperaturi fermentacije od 35 °C volumni udio alkohola iznosio 1,79%.

Temperature fermentacije značajno veće od optimalnih temperatura za odabrani kvasac rezultirat će konačnim proizvodom nezadovoljavajuće kakvoće.

## **6. LITERATURA**

- Beazly M: Michael Jackson's beer companion. *A DBP book, Duncan Baird publishers*, London, 1994.
- Blieck L, Toye G, Dumortier F, Verstrepn K J, Delvaux F R, Thevelein J M, Van Dijck, P: Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73(3): 815–824, 2007.
- Boulton C, Quain D: *Brewing Yeast and Fermentation. Blackweel Science*, Oxford, 2001.
- Carriglio J, Budner D, Thompson-Witrick K A: Comparison review of the production, microbiology, and sensory profile of lambic and American coolship ales. *Food Science and Human Nutrition Department* 8(11): 646, 2022.
- Dziuba E: The role of yeast in organoleptic properties formation. *VI School of Fermentation Technology*, str. 50–74, Poland, 2001.
- Eaton B: *Handbook of Brewing: An Overview of Brewing. CRC Press*, Boca Raton, 2017.
- Foster B, Tyrawa C, Ozsahin E, Lubberts M, Krogerus K, Preiss R, van der Merwe G: Kveik Brewing Yeasts Demonstrate Wide Flexibility in Beer Fermentation Temperature Tolerance and Exhibit Enhanced Trehalose Accumulation. *Frontiers in microbiology*, 13, 2022.
- Graham G, Stewart G G, Russell I, Anstruther A: *Handbook of Brewing. Journal of the Institute of Brewing*, Boca Raton, 2017.
- Grba S: *Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji. Plejada*, Zagreb, 2010.
- Inoue T: A review of diacetyl control technology. *In Proceedings of the 22nd Convention of the Institute of Brewing*, str. 76–79, Melbourne, 1992.
- Kawa-Rygielska J, Adamenko K, Pietrzak W, Paszkot J, Głowacki A, Gasiński A, Leszczyński P.: The Potential of Traditional Norwegian KVEIK Yeast for Brewing Novel Beer on the Example of Foreign Extra Stout. *Biomolecules* 11(12):1778, 2021.
- Kits D, Garshol L M: Norwegian Kveik brewing yeasts are adapted to higher temperatures and produce fewer off-flavours under heat stress than commercial *Saccharomyces cerevisiae* American Ale yeast. *BioRxiv*, 2021.
- Kucharczyk K, Tuszyński T: The effect of temperature on fermentation and beer volatiles at an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing* 124:230-235, 2018.

- Kunze W: Technology brewing and malting. *Die Deutsche Bibliothek*, Berlin, 2004.
- Kunze W: Tehnologija sladarstva i pivarstva (7. njemačko izdanje preveo Gaćeša S). *Jugoslavensko udruženje pivara*, Beograd, 1998.
- Lasanta C, Duran – Guerrero E, Diaz A B, Castro R: Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020.
- Leskošek-Čukalović I: Tehnologija piva (I deo) - Slad i nesladovane sirovine. *Poljoprivredni fakultet*, Beograd, 2002.
- Marić V, Nadvornik Z: Pivo tekuća hrana, *Prehrambeno-tehnološki inženjering*. Zagreb, 1995.
- Mašek A: Pivarstvo u Hrvatskoj. *Studio HS internet d.o.o.*, Osijek, 2010.
- Masschelein C A: The biochemistry of maturation. *Journal of the Institute of Brewing* 92:213–219, 1986.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o pivu*. Narodne novine 09/12, 2011.
- Mudura E, Muste S, Murešan C: Risk management of beer fermentation – diacetyl control. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine* 62:303-307, Cluj-Napoca, 2006.
- Narzis L: Fermentation and maturation – State of the art. *Brauwelt* 127:745–749, 1987.
- Papazian C: The complete joy of home brewing. *William Morrow Paperbacks*, New York, 2014.
- Perpete, P, Collin S: Fate of warty flavours in a cold contact fermentation. *Food Chemistry* 66:359–363, 1999.
- Petravić-Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Velić D, Velić N, Srečec S: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge® and Fermol Mediterranee®. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78(1):49-55, 2013.
- Roustan J L, Sablayrolles J M: Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93:367–375, 2002.
- Saerens S., Verbelen P, Vanbeneden N: Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 80:1039–1051, 2008.



Šakić N: Tehnologija proizvodnje piva. *Privredna/Gospodarska komora Federacije Bosne i Hercegovine*, Sarajevo, 2005.

Schuster K, Weinfurtner F, Narzis L: Tehnologija proizvodnje sladovine. *Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije*, Beograd, 1988.

Solgajová M., Francáková H., Dráb S., Tóth Ž.: Effect of temperature on the process of primary fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2:1791-1799, 2013.

Stewart G G: Saccharomyces species in the Production of Beer. *Beverages* 2(4):34, 2016.

Stewart, G.: The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation* 3(4):63, 2017.

Vogel W: Pivo iz vlastitog podruma. *ITD Gaudeamus d.o.o.*, Požega, 2006.

Walker G M, Stewart G G: Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* 2(4):30, 2016.

## **7. IZVORI SLIKA**

web 1: <https://www.beerstyle.rs/saveti/469-osnova-za-proizvodnju-piva/> - preuzeto 01.08.2023.

web 2: <https://www.futunatura.hr/hmelj> - preuzeto 01.08.2023.

web 3: [https://www.hdki.hr/images/50012542/Reaktor\\_ideja\\_3\\_7\\_2019.pdf](https://www.hdki.hr/images/50012542/Reaktor_ideja_3_7_2019.pdf) - preuzeto 08.08.2023.

web 4: <https://www.speidelbraumeister.com/> - preuzeto 17.08.2023.

web 5: Autorski rad

web 6: <https://www.anton-paar.com/my-en/products/details/alcolyzer-analyzing-system/> - preuzeto 18.08.2023.