

# Utjecaj temperature fermentacije na aktivnost komercijalnog kvasca LalBrew Voss Kveik Ale i pokazatelje kakvoće piva

---

Nikolić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:940733>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**

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**

Maja Nikolić

**UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA AKTIVNOST  
KOMERCIJALNOG KVASCA LALBREW® VOSS KVEIK ALE I POKAZATELJE  
KAKVOĆE PIVA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, prosinac 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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. godine

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

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Goran Šarić, znan. sur.

**Utjecaj temperature fermentacije na aktivnost komercijalnog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale i pokazatelje kakvoće piva**

*Maja Nikolić, 0113141980*

**Sažetak:** Karakterističan okus i aroma piva određeni su kako sastavom sladovine, tako i vrstom, odnosno sojem kvasca korištenim za fermentaciju sladovine. Za proizvodnju ale piva koriste se različiti sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (kvasac gornjeg vrenja) pri temperaturama fermentacije od 18 °C do 25 °C. U novije vrijeme pažnju istraživača i pivara privlače Kveik ale kvasci, tradicionalne kulture kvasca karakteristične za zapadnu Norvešku. Ovi kvasci učinkovito provode fermentaciju i pri temperaturama većim od 30 °C, pri čemu fermentacija traje vrlo kratko (2-3 dana, ovisno o temperaturi), a da pri tom ne nastaju nepoželjni spojevi arome. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj temperature fermentacije na fermentacijsku aktivnost komercijalnog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale te na osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće piva. Provedeni su mikrofermentacijski eksperimenti (Vsladovine = 1,5 L) pri odabranim temperaturama fermentacije 18 °C, 23 °C i 35 °C, pri čemu je fermentacijska aktivnost praćena određivanjem mase oslobođenog CO<sub>2</sub>. U dobivenim uzorcima piva određeni su sljedeći osnovni pokazatelji kakvoće: ekstrakt osnovne sladovine, prividni ekstrakt, stvarni ekstrakt, udio alkohola, pH, energetska vrijednost i ukupni polifenoli. Rezultati su pokazali kako se fermentacijska aktivnost kvasca, specifična brzina fermentacije te vrijednosti prividnog i stvarnog ekstrakta smanjuju u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C. Posljedično, u istom nizu se povećava volumni udio alkohola u dobivenim pivima. Utjecaj temperature fermentacije na ostale pokazatelje kakvoće piva nije bio značajan.

**Ključne riječi:** kveik kvasci, temperatura fermentacije, fermentacijska aktivnost, pokazatelji kakvoće piva

**Rad sadrži:** 25 stranica

8 slika

2 tablice

2 priloga

13 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 | član-zamjena  |

**Datum obrane:** 21. prosinca 2022. godine

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE 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

**Graduate 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. 6 in academic year 2021./2022., held on March 31 2022.

**Mentor:** Natalija Velić, PhD, full prof.

**Technical assistance:** Goran Šarić, PhD, scientific associate

### **The influence of fermentation temperature on the activity of the commercial yeast LalBrew® Voss Kveik Ale and the beer quality indicators**

*Maja Nikolić, 0113141980*

**Summary:** The characteristic flavour and aroma of beer are determined by both the composition of the wort and the type or strain of yeast used to ferment the wort. Various strains of *Saccharomyces cerevisiae* (top-fermenting yeast) yeast are used to produce ale beers at fermentation temperatures ranging from 18 °C to 25 °C. Recently, researchers and brewers have become aware of Kveik ale yeasts, traditional yeast cultures characteristic of western Norway. These yeasts perform fermentation efficiently even at temperatures above 30 °C and with a very short fermentation time (2-4 days, depending on the temperature), without the formation of undesirable aroma compounds. The aim of this work was to investigate the influence of fermentation temperature on the fermentation activity of the commercial yeast LalBrew® Voss Kveik Ale and on the basic physicochemical indicators of beer quality. Microfermentation experiments ( $V_{\text{wort}} = 1.5 \text{ L}$ ) were conducted at selected fermentation temperatures of 18 °C, 23 °C, and 35 °C, and fermentation activity was monitored by determining the mass of CO<sub>2</sub> released. The following 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 the fermentation activity of yeast, the specific fermentation rate and the values of apparent and real extract decrease in the order 35 °C > 23 °C > 18 °C. Consequently, in the same order, the volume fraction of alcohol in the obtained beers increases. The influence of fermentation temperature on other indicators of beer quality was not significant.

**Key words:** kveik yeasts, fermentation temperature, fermentation activity, beer quality indicators

**Thesis contains:** 25 pages  
8 figures  
2 tables  
2 supplements  
13 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

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

**Date of defense:** 21st December 2022.

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

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici, prof. dr. sc. Nataliji Velić, na pomoći, trudu, angažiranosti, strpljenju i brojnim savjetima tijekom formiranja ovog rada, kao i na znanju koje mi je pružila tijekom studiranja.

Zahvaljujem se i svom dragom komentoru, dr. sc. Goranu Šariću, koji je odradio sve potrebne analize, čime je uvelike doprinjeo izradi ovog diplomskog rada.

Također, željela bih se zahvaliti i svojim prijateljima, kolegama "iz klupe", a posebno mojoj najdražoj Ani te dragoj Milici koje su mi olakšale moje razdoblje studiranja.

Na kraju, veliko hvala dugujem svojim roditeljima koji mi nikad nisu dali da odustanem, koji su vjerovali u mene i bili mi podrška i potpora. Bez Vas ovo sve ne bi bilo moguće.

# Sadržaj

1.	UVOD.....	
2.	TEORIJSKI DIO.....	
2.1	DEFINICIJA I PODJELA PIVA .....	2
2.2	SIROVINE I TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA .....	3
2.3	KVASCI U PROIZVODNJI PIVA .....	7
2.3.1	Kveik kvasci .....	9
2.4	UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KVASCA.....	11
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	
3.1	ZADATAK .....	12
3.2	MATERIJALI I APARATURE .....	12
3.2.1	Materijali.....	12
3.2.2	Aparature .....	13
3.3	METODE .....	14
3.3.1	Priprema sladovine i provođenje mikrofermentacija .....	14
3.3.2	Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca - određivanje mase CO <sub>2</sub> oslobođenog tijekom mikrofermentacija sladovine .....	15
3.3.3	Standardne fizikalno-kemijske analize piva .....	16
3.3.3.1	Određivanje ekstrakta osnovne sladovine, prividnog i stvarnog ekstrakta, alkohola i energetske vrijednosti .....	16

3.3.3.2	Određivanje pH .....	17
3.3.3.3	Određivanje ukupnih polifenola .....	17
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	
4.1	UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KOMERCIJALNOG KVASCA LALBREW® VOSS KVEIK ALE .....	18
4.2	UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA.....	21
5.	ZAKLJUČCI .....	
6.	LITERATURA .....	

## **1. UVOD**



Pivo je osvježavajuće, blago gazirano piće koje može sadržavati mali, srednji ili visoki udio alkohola, a karakterizira ga specifična aroma po hmelju te izražena gorčina. Osnovne pivarske sirovine uključuju vodu, ječmeni slad, hmelj i kvasac. Proizvodnja piva uključuje postupak pripreme sladovine koja se dobije postupkom ukomljavanja slada, inokulacije sladovine odabranom vrstom kvasca te fermentacije, dozrijevanja, stabilizacije, filtracije i pakiranja gotovog piva.

Karakterističan okus i aroma svakog piva određena je sastavom sladovine, ali također u velikoj mjeri i vrstom, odnosno sojem kvasca korištenim za fermentaciju sladovine. Pažljiv odabira kvasca u proizvodnji piva važan je sa stajališta njegovih tehnoloških i fizioloških karakteristika, kao što su flokulacija i brzina izdvajanja iz mladog ili zrelog piva, sposobnost fermentacije sladovine, etanolna, temperaturna i osmotska tolerancija, potreba za kisikom i dr. Sve ove karakteristike, kao i temperatura fermentacije utječu na učinkovitost provedbe fermentacije i kvalitetu gotovog proizvoda. U pivarstvu se najčešće koriste vrste kvasaca koje pripadaju rodu *Saccharomyces*, jer brzo fermentiraju šećere u etanol u prisutnosti ili odsutnosti kisika. Za proizvodnju ale piva koriste se različiti sojevi vrste *Saccharomyces cerevisiae* (kvasac gornjeg vrenja), dok se za proizvodnju lagera koriste sojevi vrste *Saccharomyces pastorianus* (kvasac donjeg vrenja).

U novije vrijeme posebnu pažnju istraživača i pivara privlače Kveik kvasci. Radi se o ale kvascima i to tradicionalnim kulturama karakterističnim za zapadnu Norvešku, koji se koriste za proizvodnju tradicionalnih piva na farmama. Radi se o vrlo robusnim kvascima koji učinkovito provode fermentaciju i pri temperaturama većim od 30 °C, pri čemu fermentacija traje vrlo kratko (2-3 dana, ovisno o temperaturi), a da pri tom ne nastaju nepoželjni spojevi arome. U ovom radu istraživana je utjecaj različitih temperatura fermentacije na aktivnost komercijalnog kvasca Lalbrew® Voss Kveik Ale i pokazatelje kakvoće piva dobivenog fermentacijom s istraživanim kvascem.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1 DEFINICIJA I PODJELA PIVA

Pivo je osvježavajuće, blago gazirano piće koje može sadržavati mali, srednji ili visoki udio alkohola, a karakterizira ga specifična aroma po hmelju te izražena gorčina. Prema Pravilniku o pivu (Narodne novine 142/11 i 141/13) pivo je proizvod dobiven alkoholnim vrenjem pivske sladovine upotrebom čistih kultura pivskih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a iznimno spontanom vrenjem ili uporabom mješovitih mikrobnih kultura. Prema vrsti kvasca i načinu fermentacije (ovisno o vrsti glavnog vrenja) piva možemo podijeliti na piva donjeg vrenja ili lager piva (za pivo se na deklaraciji može koristiti oznaka: "lager"), piva gornjeg vrenja ili ale piva (za pivo se na deklaraciji mogu koristiti oznake: "ale" ili "alt bier"), afrička piva te spontano prevrela piva (Marić i Nadvornik, 1995). Dvije osnovne vrste kvasca koji se koriste su *Saccharomyces cerevisiae* za piva gornjeg vrenja i *Saccharomyces pastorianus* (prije poznat i kao *S. uvarum* ili *S. carlsbergensis*) za piva donjeg vrenja (Bamforth, 2017). Afrička piva proizvode se pomoću kvasca *Schizosaccharomyces pombe* i koristi se slad od prosa, dok se spontano prevrela piva dobivaju pomoću tzv. „divljih“ kvasaca koji u sladovinu dospijevaju iz okoliša, odnosno iz zraka ili sa zidova prostorija i posuda. Do izolacije i korištenja čistih kultura kvasaca u proizvodnji, sva su piva bila spontano prevrela. Danas se takav način proizvodnje koristi u Belgiji za proizvodnju Lambic piva (Grba, 2010) te u novije vrijeme neke zanatske pivovare također ponekad koriste ovaj način proizvodnje za dobivanja specijalnih vrsta piva.

S obzirom na maseni udio suhe tvari u sladovini prije samog vrenja, razlikujemo slaba ili laka piva, standardna piva, specijalna piva, dvostruko sladna piva te ječmena vina. Slaba ili laka piva sadrže manji udio alkohola i neprevreli ekstrakt. Standardna piva sadrže obično 10-12 % ekstrakta u sladovini pa je i udio alkohola u njima veći odnosno 3,5-5,5 %. Specijalna piva su piva koja se proizvode iz sladovine i sadrže više od 12 % suhe tvari, a također sadrže i više neprevrelog ekstrakta te se iz tog razloga nazivaju i "puna piva". Piva koja se proizvode od pivske sladovine s 18-22 % suhe tvari su dvostruko sladna piva. Upravo zbog povećanog masenog udjela ekstrakta u sladovini, ova piva se nazivaju "jakim" pivima (Grba, 2010)

Prema volumnom udjelu alkohola piva se dijele na bezalkoholna (manje od 0,5 vol.% alkohola), piva s malim udjelom alkohola ili tzv. lagana piva (manje od 3,5 vol.% alkohola), standardna piva

(preko 3,5 vol.% alkohola), jaka piva (više od 5,5 vol.% alkohola) te ječmena vina (više od 10 vol.% alkohola).

S obzirom na upotrijebljenu glavnu sirovinu, piva možemo podijeliti na ječmena, ražena i pšenična, iako se u Africi koristi i proso kao glavna sirovina za dobivanje piva. Piva također možemo podijeliti s obzirom na boju, pa razlikujemo svijetla, žuta, crvena, tamna i crna piva (Marić, 2009.).

## 2.2 SIROVINE I TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE PIVA

Osnovne sirovine koje se tradicionalno koriste za proizvodnju piva su voda, slad (najčešće ječmeni), hmelj i kvasac. Svaka od navedenih osnovnih sirovina značajno doprinosi kvaliteti konačnog proizvoda, odnosno piva. Pravilnici o pivu u svakoj zemlji definiraju što se još kao sirovina, odnosno izvor fermentabilnih šećera, može koristiti u proizvodnji piva osim slada, a neki od tih izvora su neslađene žitarice i proizvodi od žitarica, šećerni i škrobni sirupi, ekstrakti voća, voćne kaše i pulpe i dr. (Bamforth, 2017).

**Voda** je najzastupljenija pivarska sirovina. Ima vrlo značajan utjecaj na tijek biokemijskih reakcija, boju i punoću okusa piva. Posebno je važna tvrdoća vode za proizvodnju pojedinih stilova piva. Tvrdoća vode se, najčešće, izražava u njemačkim stupnjevima. Jedan njemački stupanj iznosi 10 mg CaO/L, odnosno 7,19 mg MgO/L. Voda za proizvodnju piva može biti jako mekana (0-5), mekana (5-9), srednje mekana (9-13), prilično tvrda (13-19), tvrda (19-30) i jako tvrda (>30). Za proizvodnju piva najvažnija je karbonatna tvrdoća vode (Marić, 2000).

**Slad (slika 1)** je osnovna sirovina za proizvodnju sladovine. Dobiva se postupkom slađenja ječma i pšenice, iako se i ostale žitarice (čak i pseudo-žitarice) mogu sladiti (Gaćeša, 1979; Leskošek, 2002). Slađenje se sastoji od procesa čišćenja i sortiranja zrna žitarice koja se sladi, zatim močenja zrna, klijanja namočenog zrna te u konačnici sušenja zelenog slada (ovisno o temperaturi sušenja, dobiva više ili manje tamnu boju) i dorade osušenog slada (Marić, 2000). Slađenjem se, u kontroliranim uvjetima, simulira početak rasta biljke (klijanje), a pažljivim podešavanjem procesnih uvjeta iniciraju se i usmjeravaju fiziološki i biokemijski procesi u zrnu. Cilj ovog postupka je sinteza enzima koji će djelomično razgraditi zrno i omogućiti njegovo lakše mljevenje,

a sintetizirani amilolitički enzimi osigurat će razgradnju škroba do fermentabilnih šećera za vrijeme procesa ukomljavanja, odnosno proizvodnje sladovine (Bamforth, 2017).



**Slika 1** Slad (web 1)

**Hmelj (slika 2)** je višegodišnja dvodomna biljka penjačica. Neoplođeni cvat ženske biljke hmelja se naziva hmeljna šišarica te se prerađena (najčešće u obliku hmeljnih peleta ili hmeljnog ekstrakta) koristi za hmeljenje pивske sladovine.

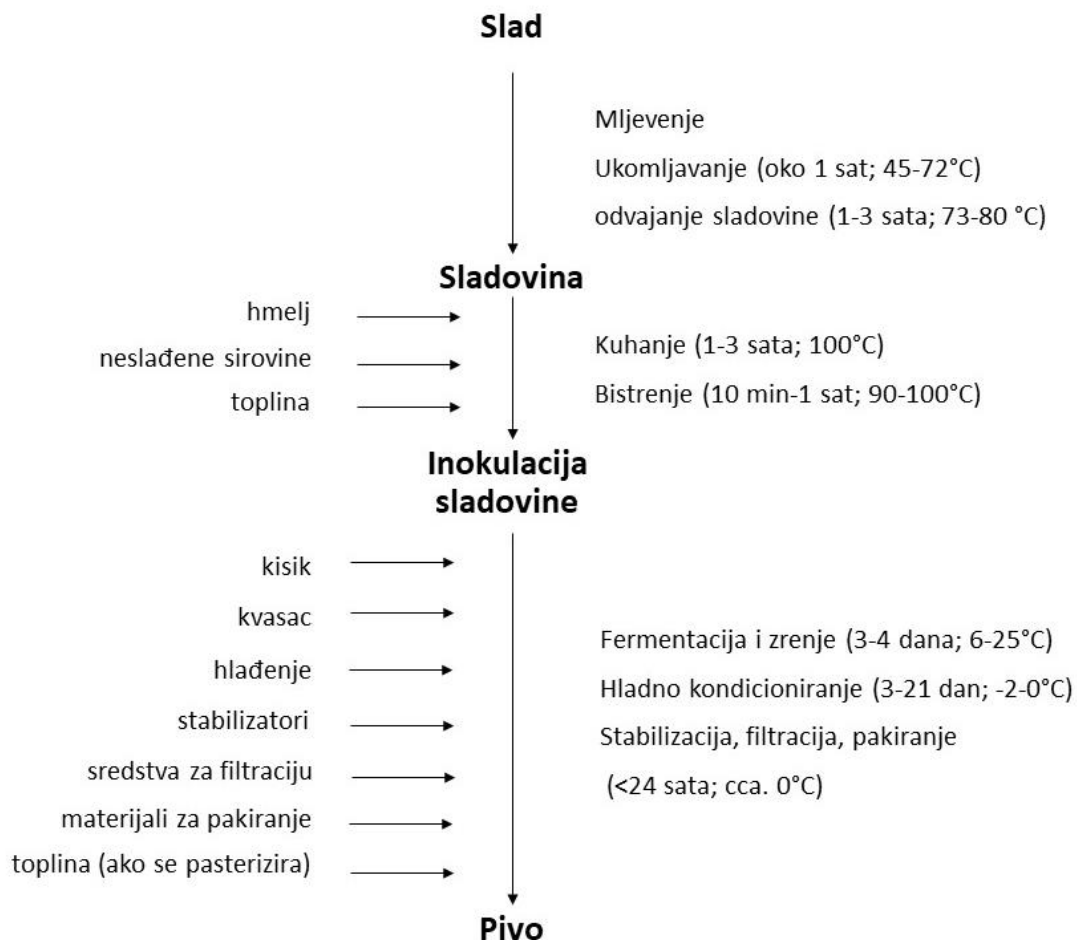


**Slika 2** Hmelj (web 2)

U proizvodnji sladovine, uloga hmelja je višestruka. Osim što ima zaštitni učinak kao konzervans te produžava biološku stabilnost (trajnost) piva, ubrzava taloženje proteina sladovine i doprinosi bistrenju piva, pospješuje stvaranje pjene i daje mu ugodan goraki okus. Kemijski sastav hmelja ovisi o kultivaru odnosno sorti hmelja. Iz hmeljnih pripravaka se tijekom kuhanja sladovine ekstrahiraju hmeljne smole ili goraki sastojci ( $\alpha$ - i  $\beta$ - kiseline koje daju gorčinu i djeluju kao antiseptici), hmeljna ulja (daju aromu piva), te taninski sastojci (koaguliraju s proteinima i talože ih). Sorte hmelja možemo podijeliti na aromatične i gorke, ovisno o udjelu  $\alpha$ - i  $\beta$ - kiselina (Marić, 2000).

O pivskim **kvascima** bit će više riječi u nastavku rada.

**Tehnologija proizvodnje piva.** Proizvodnja piva je složen proces prikazan na **slici 3**, koji uključuje prijem i skladištenje sirovina, proizvodnju sladovine, bistrenje sladovine i prozračivanje, glavno vrenje sladovine, naknadno vrenje (dozrijevanje) mladog piva, bistrenje, doradu i punjenje piva u ambalažu te pasterizaciju i skladištenje (Bamforth, 2017). Proizvodnja sladovine odvija se u varionici te kreće s usitnjavanjem odnosno drobljenjem ili meljavom slada (i neslađenih žitarica, kada se koriste u proizvodnji piva). Ovako pripremljen slad, odnosno sladna prekrupa, miješa se s toplom vodom i postupno zagrijava do odabranih temperatura ukomljavanja. Ukomljavanje se, uglavnom, provodi u temperaturnom rasponu od 45 do 72 °C, pri čemu se komina zadržava određeno vrijeme pri odabranim temperaturama. Temperatura ukomljavanja značajno utječe na biokemijske reakcije koje se događaju tijekom ukomljavanja te posljedično i na sastav sladovine i kvalitetu piva (Marić i Nadvornik, 1995). Tijekom procesa ukomljavanja hidrolitički enzimi (amilolitički i proteolitički) prisutni u sladu kataliziraju razgradnju netopljivog škroba do topljivih nefermentabilnih dekstrina i fermentabilnih šećera poput glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i maltotrioze (tzv. ošećerenje) te razgradnju proteina do peptona, polipeptida i slobodnih aminokiselina, a gore navedeni temperaturni raspon pokriva različite temperaturne optimume za djelovanje ovih enzima. Predominatni šećeri u većini sladovina su glukoza, maltoza i maltotrioza (Stewart, 2016). Ako u komini osim slada ima i neslađenih sirovina, za učinkovito provođenje ošećerenja mogu se dodati i komercijalni enzimski pripravci (najčešće termostabilna  $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -amilaza te glukoamilaza).



**Slika 3** Pregled tehnologije piva ( Velić, 2019)

Ošeećerena komina se potom filtrira, kako bi se odvojila tekuća faza (sladovina) od netopljivog čvrstog ostatka slada (pivskog tropa) i zatim kuha uz dodatak hmelja. Cilj kuhanja sladovine je koagulacija proteina, inaktivacija enzima i uparavanje sladovine do željenog udjela suhe tvari za određeni stil piva. Nadalje, kuhanjem se ekstrahiraju gorke i aromatične tvari hmelja, što utječe na okus i aromu piva te se provodi sterilizacija sladovine. Nakon završetka kuhanja, sladovina se bistri (izdvajaju se koagulirani proteini i ekstrahirani hmelj u obliku toplog taloga), hladi na temperaturu fermentacije, aerira (prozračuje) i prepumpa u fermentor gdje se inokulira s kvascem. Suvremeni postupci fermentacije sladovine uključuju provođenje glavnog vrenja i naknadnog vrenja (doviranja, dozrijevanja) piva nakon ispuštanja glavnine kvasca u istoj

fermentorskoj posudi, koja se, prema svom obliku, naziva cilindrično konusni fermentor (CKF) (Grba, 2010). Tijekom fermentacije kvasac fermentabilne šećere prevodi u glavne produkte vrenja etanol i CO<sub>2</sub> te ostale produkte, koji nastaju u manjim količinama, ali značajno utječu na formiranje arome i okusa (organske kiseline, viši alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni) piva. Vrijeme doviranja, odnosno dozrijevanja piva razlikuje se ovisno o vrsti piva, pri čemu se povećava udio estera, razvija aroma i okus piva, ali uglavnom ne dolazi do povećanja udjel etanola. Završne tehnološke faze u proizvodnji piva uključuju koloidnu i biološku stabilizaciju piva, filtraciju te punjenje piva u ambalažu (Marić, 2000).

### 2.3 KVASCI U PROIZVODNJI PIVA

Kako je već spomenuto, karakterističan okus i aroma svakog piva određena je sastavom sladovine, ali također u velikoj mjeri vrstom, odnosno sojem kvasca korištenim za fermentaciju sladovine. Važnost odabira kvasca u proizvodnji piva očituje se i u utjecaju njegovih tehnoloških i fizioloških karakteristika, kao što su sposobnost flokulacije i brzina izdvajanja iz mladog ili zrelog piva, sposobnost fermentacije sladovine (korištenje šećera, aminokiselina i peptida iz sladovine i proizvodnja metabolita), etanolna, temperaturna i osmotska tolerancija, potreba za kisikom i dr. na učinkovitost procesa fermentacije (Stewart, 2016; Grba, 2010). Sojevi koji su vlasništvo pojedinih pivovara obično se pažljivo održavaju i ljubomorno čuvaju, iako to nije uvijek pravilo. Tako se, primjerice, u Njemačkoj proizvodnja većine piva temelji na primjeni samo 4 soja kvasca, pri čemu 65 % čini jedan soj koji se čuva i vlasništvo je Instituta Weihenstephan, koji djeluje u sklopu Tehničkog sveučilišta u Münchenu (Stewart, 2016).

Vrste kvasaca koji se koriste u pivarstvu uglavnom pripadaju rodu *Saccharomyces*. Fiziološke karakteristike kvasaca iz roda *Saccharomyces* omogućuju njihovu primjenu u biotehnološkim procesima, jer brzo fermentiraju šećere u prisustvu i odsustvu kisika (fakultativni su anaerobi), kako bi proizveli etanol. To svojstvo im omogućuje prilagodbu na supstrate bogate šećerom i provođenje alkoholne fermentacije (Grba, 2010). Kako je već navedeno, najviše se koriste različiti sojevi vrste *Saccharomyces cerevisiae* (ale kvasac gornjeg vrenja) i sojevi vrste *Saccharomyces*



*pastorianus* (lager kvasac donjeg vrenja). Potonji je hibrid (međuvrsta) između *S. cerevisiae* i *Saccharomyces eubayanus* (Stewart, 2016).

Vođenje fermentacije korištenjem ale ili lager kvasaca razlikuje se u tehnološkom smislu, odnosno u primijenjenim procesnim uvjetima, poglavito temperaturama fermentacije. Razlike između ale i lager kvasac prikazane su u **tablici 1**.

**Tablica 1** Razlike između ale i lager kvasaca (adaptirano prema Stewartu, 2016)

<b>Ale kvasci</b>
<p><b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>            karakteristična temperatura fermentacije: 18 – 25 °C            maksimalna temperatura pri kojoj raste: (≥) 37 °C            nema sposobnost fermentacije melibioze            „gornje“ vrenje (kvasci nakon fermentacije isplivaju na površinu mladog piva)            pivo s većim udjelom estera</p>
<b>Lager kvasci</b>
<p><b><i>Saccharomyces pastorianus</i></b>            karakteristična temperatura fermentacije 8 – 15 °C            maksimalna temperatura pri kojoj raste: 34 °C            ima sposobnost fermentacije melibioze            „donje“ vrenje (kvasci se talože na dno fermentora nakon fermentacije)</p>

Tijekom fermentacije stanice kvasca apsorbiraju otopljene šećere, spojeve s dušikom (aminokiseline, amonijeve ione i male peptide), vitamine i ione kroz staničnu membranu. Nakon što su navedeni spojevi uneseni u stanicu, slijedom kemijskih reakcija, odnosno metaboličkih putova (glikoliza, biosinteza staničnih sastojaka, itd.) stanice ih kao izvor ugljika, energije i hranjivih tvari koriste za rast, odnosno izgradnju mikrobne biomase. Primarni produkti alkoholne fermentacije su etanol, CO<sub>2</sub> i glicerol. Ale kvasac *S. cerevisiae* ima sposobnost korištenja (previranja) velikog broja jednostavnih šećera, kao što su primjerice glukoza, fruktoza, manosa, galaktoza, saharoza, maltoza, maltotrioza i (djelomično) rafinoza. Lager kvasac *S. pastorianus* također previre sve navedene šećere, uz dodatak disaharida melibioze (glukoza-galaktoza), što

se može koristiti u dijagnostičkim testovima za razlikovanje ale i lager vrsta kvasaca (Stewart, 2016).

### 2.3.1 Kveik kvasci

Norveški Kveik ale kvasci tradicionalne su kulture kvasca koje generacijama koriste mali proizvođači piva na farmama u zapadnoj Norveškoj za proizvodnju tradicionalnih piva, kao što su konnjøl, stjørdalsøl ili maltøl. Kveik je skupina hibridnih *Saccharomyces cerevisiae* kvasaca koji su genetički odvojeni od ostalih ale kvasaca (Kits i Garshol, 2021). Mogu se podijeliti u dvije skupine prema njihovom geografskom podrijetlu, tj. sjeverno ili južno od ledenjaka Jostedal. Prva skupina potječe iz regija Voss, Stranda, Granvin i Laedal, dok druga skupina potječe iz regija Hornindal, Stordal i Sykkylven (Kawa-Rygielska i sur., 2021).

Iako u posljednje vrijeme vlada povećani interes za ovu skupinu kvasaca, oni su i dalje nedovoljno istraženi. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako se fenotipski razlikuju od konvencionalnih ale kvasaca, što se pripisuje njihovoj kontinuiranoj ponovnoj upotrebi (uobičajeni način korištenja na farmama). Smatra se kako je tijekom dužeg vremena njihova korištenja došlo do prilagodbe i evolucije Kveik kvasaca („udomaćivanja“) te su se pojavile fenotipske karakteristike koje imaju veliku važnost za komercijalne pivovare. Naime, seoski proizvođači piva kuhali su pivo puno rjeđe od komercijalnih pivovara, obično 1-4 puta godišnje, a između su Kveik kvasci bili čuvani u suhom obliku i do godinu dana (Kits i Garshol, 2021). Tradicionalan način čuvanja uključivao je uranjanje drvenog obruča ovalnog oblika u suspenziju kvasca, nakon toga u pepeo ili brašno te je zatim sušen (**slika 4**). Prve konstrukcije ovog tipa datiraju s početka 17. stoljeća (Kawa-Rygielska i sur., 2021).



**Slika 4** Tradicionalna drvena konstrukcija ovalnog oblika za čuvanje Kveik kvasaca (**web 3**)

Prilikom sljedeće upotrebe suhi Kveik kvasac ne propagira se u tekućem mediju, već se drveni obruč s kvascem direktno stavlja u sladovinu i na taj način se provodi inokulacija (**slika 5**).



**Slika 5** Tradicionalni način inokulacije sladovine Kveik kvascima (**web 4**)

Inokulacija se, također, uobičajeno provodi u sladovinu s vrlo velikim udjelom ekstrakta (> 17 °P) i pri visokim temperaturama (25 – 40 °C). Najčešća temperatura fermentacije koju norveški farmeri- pivari koriste je 35 – 40 °C, što je značajno veća temperatura od one za proizvodnju američkih, britanskih ili njemačkih ale piva. Visoke temperature fermentacije, kao i brza fermentacija rezultiraju vrlo kratkim trajanjem fermentacije, pri čemu većina (> 65%) norveških pivara koji koriste domaće Kveik kvasce navodi kako je vrijeme fermentacije kraće od 50 sati (Kits i Garshol, 2021).

Već spomenute fenotipske razlike koje pokazuju Kveik kvasci u usporedbi s ostalim ale kvascima uključuju vrlo dobru flokulaciju i srednju do visoku atenuaciju/prevrelost (prividna 75 – 85 %), sposobnost previranja maltoze/maltotrioze, veliku toleranciju na etanol (13-16% ABV) i temperature fermentacije veće od 30 °C (velika brzina fermentacije pri tim temperaturama+). Još jedna važna karakteristika je da usprkos visokim temperaturama fermentacije ne nastaju nepoželjne fenolne arome (*phenolic off flavour*, POF), već aromatski profil sadrži dosta estera što za rezultat daje pivo voćnog karaktera (Kits i Garshol, 2021). Iz svega prethodno navedenog može se zaključiti kako su Kveik kvasci vrlo robusni kvasci te ih je, također, vrlo jednostavno osušiti i čuvati.

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

Temperatura fermentacije jedan je od najvažnijih procesnih parametara koji utječu na rast i preživljavanje mikroorganizma koji sudjeluju u procesu proizvodnje alkoholnih pića dobivenih fermentacijom. Za kvasac *S. cerevisiae* promjena temperature fermentacije (posebno kada se radi o temperaturama koje su puno manje ili veće od temperaturnog optimuma) je važan čimbenik stresa i uvelike utječe na brzinu fermentacije i konačnu kvalitetu alkoholnih pića dobivenih fermentacijom. Naime, temperatura fermentacije ima značajan utjecaj na aromu, pa je njezina dobra kontrola tijekom proizvodnje alkoholnih pića dobivenih fermentacijom imperativ (Zhao i sur., 2022 ; Kucharczyk i Tuszynski, 2018). Niže temperature fermentacije (ali i dalje unutar raspona temperaturnog optimuma) kod proizvodnje piva tako rezultiraju pivom poboljšanog okusa i mirisa, pri čemu ne dolazi do značajnog

smanjenja udjela etanola i produktivnosti procesa (Kucharczyk i Tuszyński, 2018 ). Međutim, radi uštede energije, prostora i vremena, mnoge pivovare pripremaju sladovinu s velikim udjelom ekstrakta (high-gravity) i provode fermentaciju pri višim temperaturama. Nakon završetka fermentacije dobiveni proizvod razrjeđuje se deaeriranom vodom do željenog udjela alkohola (Blieck i sur., 2007). Temperatura značajno utječe i na fermentacijsku aktivnost kvasca, odnosno na brzinu fermentacije. Pravilan odabir temperature, posebno na početku fermentacije izrazito je važan, jer osigurava brzo razmnožavanje kvasca. Povećanje temperature dovodi do povećane aktivnosti kvasca, ali istovremeno može dovesti do smanjenja stabilnosti pjene, negativno utjecati na boju piva, dovesti do smanjenja pH vrijednosti piva i većeg gubitka tvari gorčine. Temperatura inokulacije sladovine također je važna, jer ako je značajno manja od optimalne može doći do smanjenja brzine fermentacije, kao i do nastajanja nepoželjnih spojeva poput acetaldehida i vicinalnih diketona. Na kasnije smanjenje udjela ovih spojeva utječu udio etanola, temperatura fermentacije i dozrijevanje piva (Kucharczyk i Tuszyński, 2018 ). Imajući u vidu sve navedeno, prednost korištenja Kveik kvasaca u odnosu na uobičajene ale kvasce je kratko vrijeme fermentacije (2-5 dana, ovisno o temperaturi), zbog velike aktivnosti kvasca pri temperaturama većim od 30 °C, bez negativnog utjecaja temperature na aromu piva.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1 ZADATAK

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj temperature fermentacije na fermentacijsku aktivnost komercijalnog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale te na osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje kakvoće piva.

### 3.2 MATERIJALI I APARATURE

#### 3.2.1 Materijali

Sirovine, kemikalije i materijali korišteni u proizvodnji i analizi piva:

- 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* LalBrew® Voss Kveik Ale (Lallemand, Kanada)
- *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 EDTA (Sigma Aldrich, SAD)

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

### 3.2.2 Aparature

- za vaganje sirovina, kemikalija, materijala i tikvica po Erlenmeyeru u kojima su provođene mikrofermentacije korištena je precizna vaga područja mjerenja do 4200 g (PLE 4200-2N, Kern, Njemačka)
- za vaganje kemikalija korištena je analitička vaga (NBL 84i, Nimbus Analytical Balances, Adam Equipment, SAD)
- automatizirani sustav Braumeister (Speidl, Njemačka) kapaciteta 20 L korišten je za ukomljavanje i kuhanje sladovine (**slika 6.**)
- ručna pumpa/ automatski sifon (Fermtech, Kanada) korištena je za pretakanje piva u boce po završetku fermentacije
- inkubator (Termo medicinski aparat, BTEST, Bodalec Havočić, Hrvatska) korišten je za održavanje konstantne temperature fermentacije (35 °C)
- inkubator s mogućnošću hlađenja (Aqualytic, Dortmund, Njemačka) korišten je za održavanje konstantne temperature fermentacije (23 °C) te za hlađenje i čuvanje uzoraka piva
- rashladna vinska vitrina (Candy, Italija) korištena je za održavanje konstantne temperature fermentacije (18 °C)
- pH metar (edge® HI2020, Hanna Instruments, SAD) je korišten za praćenje pH tijekom ukomljavanja te za određivanje pH piva
- digitalni refraktometar (HI96800, Hanna Instruments, SAD) korišten je za određivanje ekstrakta sladovine tijekom ukomljavanja te kuhanja
- analizator piva (Alcolyzer Beer Analyzing System, Anton Paar, Austrija) korišten je za provođenje standardnih analiza piva
- spektrofotometar (UV-1900, Shimadzu, Japan) korišten je za određivanje boje i ukupnih polifenola u pivu standardnim metodama





**Slika 6** Automatizirani sustav za proizvodnju sladovine Braumeister (Speidl, Njemačka)

### **3.3 METODE**

#### **3.3.1 Priprema sladovine i provođenje mikrofermentacija**

Za proizvodnju 20 L sladovine korišteno je 5 kg svijetlog baznog ječmenog slada *Pale Ale Best* te 0,12 kg ječmenog slada *CaraMunich® type 1*. Za ukomljavanje je korišteno 23 L destilirane vode u koju je dodano 3 g  $\text{CaSO}_4$ , 2,5 g  $\text{CaCl}_2$  te 3,5 g  $\text{MgSO}_4$  kako bi se osigurao odgovarajući profil vode za stil piva *American Pale Ale* koji je odabran za istraživanje. Ukomljavanje je provedeno prema sljedećem programu: 60 °C početak ukomljavanja te 60 min pri 67 °C. pH sladovine tijekom ukomljavanja održavan je u pH području od 5,2 do 5,6 dodatkom 80% mliječne kiseline prema potrebi (ukupno 5 mL tijekom ukomljavanja). Nakon završetka ukomljavanja, pristupilo se cijedenju i ispiranju pivskog tropa s dodatne 3 L prethodno pripremljene vode, temperature 78 °C te zatim kuhanju sladovine u trajanju od 60 min. Tijekom kuhanja dodan je hmelj i to 60 minuta prije kraja kuhanja dodano je 8 g hmelja *Columbus*, 15 minuta prije kraja kuhanja 15 g hmelja *Centennial* te 32 g hmelja *Cascade* na kraju kuhanja. 10 minuta prije kraja kuhanja dodano je i sredstvo za poticanje koagulacije i taloženja proteina, odnosno bistrenje piva na bazi irske mahovine (*Protafloc*), prema uputama proizvođača. Po završetku kuhanja, nakon dodavanja hmelja *Cascade*, sladovina je ostavljena da odstoji 10 minuta te je nakon toga provedeno

hlađenje do najniže odabrane temperature fermentacije (18 °C). Mikrofermentacije su provedene u tikvicama po Erlenmeyeru volumena 2 L sa zatvorenim vrenjačama. Po 1,5 L ohlađene sladovine (udio ekstrakta 13 °P) pretočeno je u Erlenmeyerove tikvice (ukupno 6 tikvica, odnosno po 2 tikvice za svaku od tri odabrane temperature fermentacije) te su tikvice ostavljene da se termostatiraju na temperaturu fermentacije do inokulacije rehidriranim komercijalnim kvascem LalBrew® Voss Kveik Ale. Rehidracija kvasca provedena je tako da je 1,5 g kvasca suspendirano u 15 mL sterilne vodovodne vode temperature 35 °C i ostavljeno 15 min da se rehidrira. Po 2,5 mL dobivene suspenzije temperatura korišteno je za inokulaciju tikvica u kojima se nalazila sladovina odgovarajuće temperature. Pri tome je inokulacija tikvica sa sladovinom temperature manje od 35 °C provedena tako da je inokulum prethodno postupno ohlađen do temperature fermentacije, odnosno inokulacije. Tikvice su zatim zatvorene vrenjačama koje su napunjene s 10 mL vode te stavljene u inkubatore (na 23 °C i 35 °C) i rashladnu vinsku vitrinu (18 °C) radi održavanja temperature fermentacije konstantnom. Fermentacija je vođena 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>), nakon čega su tikvice ohlađene do temperature 4 °C kako bi se što bolje izdvojio kvasac i izbistrilo pivo. Pri navedenoj temperaturi pivo je odležavalo 72 h te je zatim pretočeno u boce volumena 0,33 L. Kako bi se povećao sadržaj CO<sub>2</sub> u pivu, provedena je naknadna refermentacija u bocama tako da je u svaku bocu dodano po 2,5 g saharoze te su boce ostavljene na sobnoj temperaturi još 2 tjedna, nakon čega su čuvane u hladnjaku pri 4 °C do provođenja analiza.

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

Fermentacijska aktivnost kvasca tijekom mikrofermentacija praćena je indirektno gravimetrijskom metodom praćenja promjene mase tikvica (odnosno mase oslobođenog CO<sub>2</sub>) do postizanja konstantne mase. Kao kontrola za svaku od odabranih temperatura fermentacije korištena je tikvica napunjena s 1,5 L vode, također, zatvorena vrenjačom i vagana zajedno s tikvicama u kojima se nalazila inokulirana sladovina.

Masa oslobođenog CO<sub>2</sub> tijekom mikrofermentacija izračunata je kao razlika promjene mase tikvice u kojoj se provodila mikrofermentacija i promjena mase tikvice slijepe probe (tikvica s vodom).

$$m = m_1 - m_2$$

gdje je

$m$  - masa proizvedenog CO<sub>2</sub> u mikrofermentacijskoj tikvici [g]

$m_1$  - gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja) [g]

$m_2$  - razlika mase kontrolne tikvice napunjene vodom između dva mjerenja [g]

Brzina nastajanja CO<sub>2</sub> određena je prema sljedećem izrazu:

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

$dCO_2/dt$  - brzina nastajanja CO<sub>2</sub> [g/Lh]

$\Delta m$  - masa CO<sub>2</sub> oslobođenog u vremenskom intervalu  $\Delta t$  [g]

$\Delta t$  - vremenski interval između dva mjerenja [h]

$V$  - volumen podloge [L]

### **3.3.3 Standardne fizikalno-kemijske analize piva**

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

Uzorci piva pripremljeni su za analizu na analizatoru piva filtracijom preko nabranog filter papira te otplinjavanjem (uklanjanjem CO<sub>2</sub>). Ovako pripremljeni uzorci pune se u kivete i stavljaju u analizator piva (Alcolyzer Beer Analyzing System). Uređaj automatski uzima uzorak po uzorak i vrši mjerenje.

### **3.3.3.2 Određivanje pH (MEBAK 2.17)**

Kod određivanja pH vrijednosti piva, potrebno je ukloniti CO<sub>2</sub> iz uzorka. Otplinjeni uzorak se prebacuje u čašicu s uronjenom elektrodom i očitava se pH vrijednost na zaslonu uređaja.

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

Pripremi se svježa otopina CMC/EDTA reagensa koncentracije 10 g/L. Polagano se dodaje 10 g CMC i 2 g EDTA u 500 mL destilirane vode i izmiješa. Nakon homogenizacije, otopina se prenese u odmjernu tikvicu od litre i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopina željezovog reagensa koncentracije 5,6 g Fe<sup>3+</sup>/L pripremi se otapanjem 3,5 g zelenog amonijevog željezo citrata u 100 mL destilirane vode. Amonijev reagens priprema se otapanjem 100 mL koncentriranog amonijaka u 300 mL destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 25 mL doda se 10 mL uzorka piva i 8 mL CMC/EDTA reagensa te se snažno izmiješa. Zatim se doda 0,5 mL željezovog reagensa i 0,5 mL amonijeva reagensa te ponovo snažno izmiješa. Nakon 10 minuta, očita se apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 600 nm. Koncentracija ukupnih polifenola računa se prema izrazu:

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

gdje je

*P* - koncentracija ukupnih polifenola (mg/L)

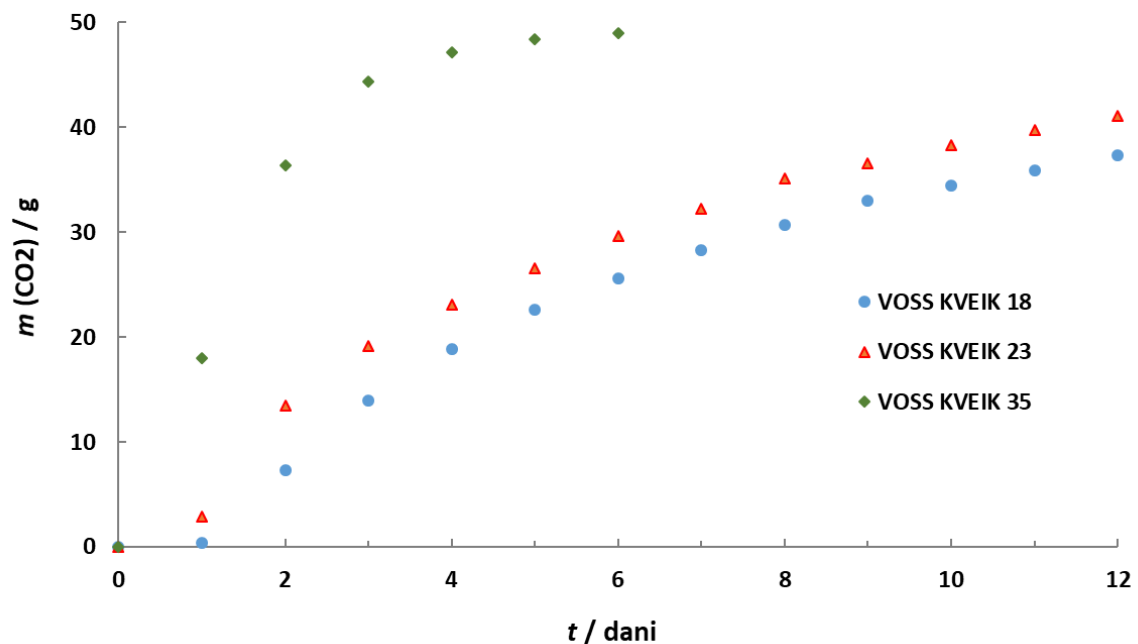
*A* - apsorbancija uzorka mjerena na 600 nm

*F* - faktor razrijeđenja (1 za korištenu odmjernu tikvicu od 25 mL, 2 za tikvicu od 50 mL)

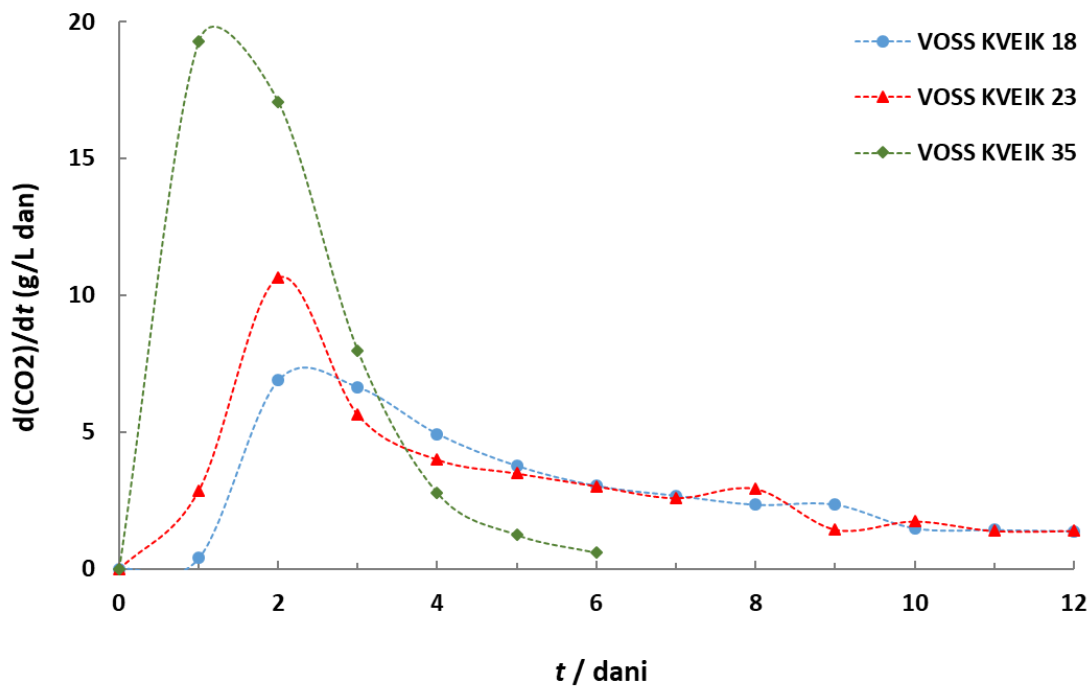
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1 UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST KOMERCIJALNOG KVASCA LALBREW® VOSS KVEIK ALE

U ovom istraživanju za inokulaciju sladovine i mikrofermentacije korišten je komercijalno dostupan suhi kvasac gornjeg vrenja (soj vrste *S. cerevisiae*) naziva LalBrew® Voss Kveik Ale te je praćena njegova fermentacijska aktivnost pri različitim temperaturama fermentacije kako slijedi: 18 °C, 23 °C i 35 °C. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dvije paralelne mikrofermentacije (za sve prikazane vrijednosti  $SD \leq 0,51$ ) pri svakoj od odabranih temperatura te su prikazani na slikama 7 i 8.



Slika 7 Utjecaj temperature fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na fermentacijsku aktivnost komercijalnog pivskog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale



**Slika 8** Utjecaj temperature fermentacije (18 °C, 23 °C i 35 °C) na promjenu specifične brzine fermentacije sladovine komercijalnim pivskim kvascem LalBrew® Voss Kveik Ale

Temperatura je jedan od čimbenika vođenja bioprocesa koji ima značajan utjecaj na fermentacijsku aktivnost kvasca, odnosno na brzinu fermentacije. Pravilan odabir temperature fermentacije osobito je važan u početnim fazama vođenja fermentacije, jer utječe na reprodukciju kvasca (Kucharczyk i Tuszyński, 2018).

Fermentacijska aktivnost kvasca, odnosno tijekom fermentacije, može se posredno pratiti jednostavnim određivanjem mase oslobođenog CO<sub>2</sub>. Naime, CO<sub>2</sub> koji nastaje tijekom fermentacije u stehiometrijskom je odnosu s potrošnjom supstrata (šećera) i nastajanjem proizvoda, odnosno etanola (Petravić-Tominac i sur., 2013).

Iz **slike 7** je vidljivo kako je fermentacija pri svim odabranim temperaturama započela već tijekom prvog dana, ali je iz profila krivulja također vidljivo kako je pri temperaturama 18 °C i 23 °C masa oslobođenog CO<sub>2</sub> u prvih 6 dana provođenja procesa značajno manja u odnosu na masu CO<sub>2</sub>

oslobođenu pri 35 °C, pri čemu je pri toj temperaturi u navedenom vremenskom periodu proces fermentacije već završen. Naime, profil fermentacijske krivulje pri 35 °C pokazuje kako je već nakon 4 dana došlo do usporavanja fermentacije, što se očituje kroz konstantnu masu oslobođenog CO<sub>2</sub> (formiranje platoa na krivulji). Oštar nagib krivulje u prvim danima fermentacije ukazuje na veliku fermentacijsku aktivnost kvasca. Fermentacijske krivulje dobivene pri 18 °C i 23 °C puno su blažeg nagiba te je vidljivo kako se tek nakon 10 dana približava postizanju konstantne vrijednosti (odnosno formiranju platoa), što ukazuje na značajno slabiju fermentacijsku aktivnost kvasca u odnosu na onu pri temperaturi 35 °C. Fermentacijska aktivnost opada u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C.

Iz **slike 8** koja prikazuje utjecaj temperature na promjenu specifične brzine fermentacije može se uočiti kao faza burne fermentacije pri temperaturi 35 °C traje od 1. do 3. dana, nakon čega se nastavlja tiha fermentacija još 3 dana do završetka 6.-og dana. Faza burne fermentacije pri temperaturama 18 i 23 °C traje od 2. do 5. dana te se zatim nastavlja tiha fermentacija sve do 12. dana. Iz krivulja je također vidljivo kako je najveća promjena specifične brzine fermentacije uočena pri temperaturi 35 °C. Promjena specifične brzine fermentacije također opada u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C.

Dobiveni rezultati su očekivani s obzirom da većina sojeva Kveik kvasaca ima temperaturni optimum u rasponu temperatura od 30 °C do 45 °C (Foster i sur., 2022), a također je u skladu s istraživanjem koje su proveli Kits i Garshol (2021) kako bi utvrdili utjecaj različitih temperatura (od 20 °C do 42 °C) na fermentacijsku aktivnost i senzorski profil piva 3 komercijalna Kveik kvasca (uključujući i LalBrew® Voss Kveik Ale) te često korištenog ale komercijalnog kvasca SafAle™ US-05 kao kontrole. Njihovi rezultati pokazali su kako je temperaturni optimum za sva tri komercijalna Kveik kvasca bio veći u odnosu na temperaturni optimum kontrolnog ale kvasca te da su brzine fermentacije Kveik kvasaca pri svim temperaturama, uključujući i temperature karakteristične za uobičajene ale kvasce (20 °C - 25°C) bile veće od brzine fermentacije kontrolnog kvasca. Nadalje, pri svim istraživanim temperaturama Kveik kvasci proizvodili su manje nepoželjnih spojeva arome u odnosu na kontrolni kvasac.



## 4.2 UTJECAJ TEMPERATURE FERMENTACIJE NA OSNOVNE POKAZATELJE KAKVOĆE PIVA

Kako bi se utvrdio utjecaj temperature fermentacije na osnovne pokazatelje kakvoće piva dobivenog nakon mikrofermentacije sladovine pomoću komercijalnog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale u trajanju od 6 dana ( $\theta_{\text{fermentacije}} = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i 12 dana ( $\theta_{\text{fermentacije}} = 18 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), provedene su osnovne fizikalno-kemijske analize uzoraka piva. Osnovne fizikalno-kemijske analize uključivale su određivanje ekstrakta osnovne sladovine te prividnog i stvarnog ekstrakta, udio alkohola, pH te ukupne polifenole. Rezultati analiza prikazani su u **Tablici 2**.

**Tablica 2** Fizikalno-kemijske karakteristike uzoraka piva dobivenog nakon mikrofermentacije sladovine pomoću komercijalnog kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale 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>	<b>13,79</b>	0,00	<b>13,86</b>	0,00	<b>13,99</b>	0,01
<b>Prividni ekstrakt AE [% w/w]</b>	<b>4,58</b>	0,58	<b>3,97</b>	0,01	<b>2,70</b>	0,20
<b>Stvarni ekstrakt RE [% w/w]</b>	<b>6,36</b>	0,47	<b>5,88</b>	0,01	<b>4,87</b>	0,17
<b>Alkohol [ABV mL/100 mL]</b>	<b>4,98</b>	0,31	<b>5,35</b>	0,01	<b>6,08</b>	0,11
<b>Ph</b>	<b>4,49</b>	0,01	<b>4,55</b>	0,10	<b>4,32</b>	0,03
<b>Energetska vrijednost [kJ/100mL]</b>	<b>210,89</b>	0,45	<b>211,68</b>	0,03	<b>212,73</b>	0,24
<b>Ukupni polifenoli [mg/L]</b>	<b>218,75</b>	2,33	<b>230,50</b>	9,60	<b>220,25</b>	13,76

Iz rezultata prikazanih u tablici 2. može se vidjeti da, iako je vrijednost ekstrakta osnovne sladovine ujednačena jer se radi o istoj sladovini korištenoj u svim mikrofermentacijskim eksperimentima, vrijednosti prividnog ekstrakta, stvarnog ekstrakta te volumnog udjela alkohola se mijenjaju u ovisnosti o temperaturi fermentacije. Pri tome se vrijednost prividnog i stvarnog ekstrakta smanjuju u nizu  $35\text{ °C} > 23\text{ °C} > 18\text{ °C}$ . Posljedično, u istom nizu se povećava volumni udio alkohola u dobivenim pivima. S obzirom da je povećanje temperature fermentacije utjecalo na povećanje fermentacijske aktivnosti kvasca LalBrew® Voss Kveik Ale, fermentabilni šećeri prisutni u sladovini bili su u većoj mjeri potrošeni te je nastalo više alkohola i CO<sub>2</sub>. Uobičajena temperatura fermentacije za kvasce gornjeg vrenja (ale kvasce) je od 15 do 25 °C, dok je za kvasce donje vrenja taj raspon od 6 do 14 °C (Foster i sur., 2022). Temperature fermentacije veće od optimalnih predstavljaju stres za stanice kvasca i dovode do smanjenja fermentacijske aktivnosti (uslijed smanjenja vijabilnosti stanica kvasca), kao i do nepoželjnih promjena u aromi i okusu piva. Pri većim temperaturama jače je izražen inhibitorni učinak etanola na ove kvasce, što se pripisuje njegovom povećanom nakupljanju unutar stanice (Kucharczyk i Tuszyński, 2018). Za razliku od standardnih ale kvasaca, Kveik kvasci su bolje prilagođeni na veće temperature (termotoleranti su), metabolički su aktivniji i proizvode manje nepoželjnih aroma pri temperaturnom stresu (Kits i Garshol, 2021). Foster i suradnici (2022) navode kako su standardni ale sojevi kvasca pokazali značajno smanjenje vijabilnosti pri 37 °C, dok za istraživane Kveik kvasce nije došlo do značajnije pojave ugibanja stanica. Nadalje, navode i kako je temperaturni optimum za različite Kveik kvasce između 30 i 37 °C, ali kako su neki sojevi Kveik kvasca učinkoviti i u vrlo širokom temperaturnom intervalu od 15 do 42 °C te, općenito, Kveik kvasci brže previru fermentabilne šećere iz sladovine od standardnih ale kvasaca. Sve navedeno čini ove kvasce prikladne ne samo za brzu proizvodnju piva, već i za druge fermentacijske procese koji se odvijaju pri većim temperaturama, poput proizvodnje biogoriva (Foster i sur., 2022).

Što se tiče ostalih određivanih fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće piva, može se primijetiti nešto niža pH vrijednost piva dobivenog fermentacijom pri 35 °C. Iako se prosječne vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima piva razlikuju, nije moguće izvesti jasan zaključak na koji način je temperatura fermentacije utjecala na njihovu koncentraciju. Općenito,

tijekom alkoholne fermentacije može doći do promjene udjela pojedinih fenolnih spojeva u odnosu na početne udjele u sladovini prije fermentacije. Stanice kvasca apsorbiraju fenolne spojeve, što se očituje u njihovoj povećanoj koncentraciji u kvaščevoj biomasi nakon završene fermentacije, pri čemu koncentracija ukupnih polifenola u gotovom pivu može biti manja od koncentracije u sladovini (Kawa-Rygielska i sur., 2021). Istraživanje koje su proveli Kawa-Rygielska i suradnici (2021) pokazalo je kako su koncentracija ukupnih polifenola te antioksidacijska aktivnost u pivima dobivenim korištenjem 4 vrste Kveik kvasaca pri temperaturi 25 °C (koja je manja od njihove optimalne temperature) bile veće u odnosu na kontrolni uzorak piva dobiven korištenjem standardnog ale kvasca pri istoj temperaturi fermentacije. Autori navode kako se korištenje Kveik kvasaca može smatrati dobrom metodom povećanja koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti piva, što se, u posljednje vrijeme, javlja kao zahtjev tržišta zbog pretpostavke o povećanoj funkcionalnosti takvog proizvoda.

## **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 LalBrew® Voss Kveik Ale pri različitim temperaturama (18 °C, 23 °C i 35 °C) vidljivo je kako je najveću fermentacijsku aktivnost kvasac pokazao pri 35 °C, odnosno fermentacijska aktivnost kvasca opada u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C.

Najveća promjena specifične brzine fermentacije uočena je pri temperaturi 35 °C te promjena specifične brzine fermentacije kvasca također opada u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C. Pri 35 °C faza burne fermentacije počinje već tijekom prvog dana i traje do 3. dana, dok pri temperaturama 18 i 23 °C traje od 2. do 5. dana.

Analiza osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće piva pokazala je kako se vrijednosti prividnog ekstrakta, stvarnog ekstrakta te volumnog udjela alkohola mijenjaju u ovisnosti o temperaturi fermentacije. Pri tome se vrijednost prividnog i stvarnog ekstrakta smanjuju u nizu 35 °C > 23 °C > 18 °C. Posljedično, u istom nizu se povećava volumni udio alkohola u dobivenim pivima. Volumni udio alkohola kretao se u rasponu od 4,98 do 6,08 mL/100 mL.

Iako se prosječne vrijednosti koncentracije ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima piva razlikuju, nije moguće izvesti jasan zaključak na koji način je temperatura fermentacije utjecala na njihovu koncentraciju.

## **6. LITERATURA**

1. Bamforth C W: Progress in Brewing Science and Beer Production, Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 8:8.1-8.16, 2017.
2. 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, 747546, 2022.
3. Gaćeša S: *Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva*, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 1979.
4. 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, 1778, 2021.
5. Kits, Dimitri, Garshol, Lars Marius: Norwegian Kveik brewing yeasts are adapted to higher temperatures and produce fewer off-flavours under heat stress than commercial *Saccharomyces cerevisiae* American Ale yeast. 10.1101/2021.06.15.44850, 2021.
6. 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.
7. Leskošek–Čukalović I: *Tehnologija piva, Prvi dio, Slad i nesladovane sirovine*, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2002.
8. Marić V: *Tehnologija piva*. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009.
9. Marić V, Nadvornik Z: *Pivo – tekuća hrana*, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Znanstveno-stručna biblioteka, Zagreb, 1995.
10. MPRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o pivu*. Narodne novine 142/11 i 141/13, 2008.
11. Petravić-Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Velić D, Velić N, Srećec S: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge® and Fermol Mediterranee®. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1):49-55, 2013.
12. Stewart G G: *Saccharomyces* species in the Production of Beer. *Beverages*, 2, 34, 2016.
13. Velić N: Veličanstveno pivo. *Reaktor ideja*, 3(7):13-15, 2019.

web 1: <https://hocupivo.com/slاد/>

web 2: <https://vitamini.hr/znanost-industrija/znanost/hmelj-pomoc-lijecenju-metabolickog-sindroma-14176/>

web 3: [https://www.brewer-world.com/wp-content/uploads/2021/02/Kveik\\_Ring.jpg](https://www.brewer-world.com/wp-content/uploads/2021/02/Kveik_Ring.jpg)

web 4: <https://www.brewer-world.com/wp-content/uploads/2021/02/yeast-ring-1.jpg>

web 5: <https://winningbeers.com/speidel-braumeister-brewing-system-review>