

# Usporedba parametara kakvoće različitih vrsta piva tijekom vrenja i odležavanja

---

Papaik, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:823349>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Ivana Papaik  
856/BPI

**USPOREDBA PARAMETARA  
KAKVOĆE RAZLIČITIH VRSTA  
PIVA TIJEKOM VRENJA I  
ODLEŽAVANJA**

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

*Neizmjerne se želim zahvaliti izuzetnom profesoru i čovjeku prof.dr.sc. Božidaru Šanteku na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada kao i na svim savjetima tijekom procesa izrade te uvijek ljubaznom pristupu. Također želim zahvaliti doc.dr.sc. Antoniji Trontel na pomoći prilikom provođenja instrumentalnih analiza, kao i na strpljenju i savjetima prilikom pisanja rada. Zahvaljujem i svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada koji su doprinijeli pozitivnoj i ugodnoj atmosferi tijekom izrade rada.*

*Zahvaljujem i Pivovari Medvedgrad d.o.o. koja mi je omogućila pristup i upoznavanje sa industrijskim procesom proizvodnje piva, kao i uzorke istih bez kojih ovaj rad ne bi mogao biti izrađen.*

*Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima i sestrama Petri i Martini koji su mi kroz ovaj period života bili veliki oslonac i jaka podrška u svakom trenutku. Također zahvaljujem se i svim prijateljima koji su ovo poglavlje života učinili nezaboravnim i prekrasnim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### USPOREDBA PARAMETARA KAKVOĆE RAZLIČITIH VRSTA PIVA TIJEKOM VRENJA I ODLEŽAVANJA

*Ivana Papaik, 856/BPI*

**Sažetak:** U ovom radu provedeno je utvrđivanje aromatskog profila piva i kvalitete *lager* i *ale* piva. Utjecaj na aromatski profil piva imaju korištene sirovine (slad, hmelj), vrsta kvasca, voda te sam proces proizvodnje i odležavanja piva. Tijekom istraživanja korišteni su uzorci tri različite vrste piva iz Pivovare Medvedgrad: Indian Pale Ale (IPA), tamnog lagera piva „Grička vještica“ i čokoladnog stout piva „Fantom“. Za proizvodnju piva pivovare Medvedgrad korišten je pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. U navedenim vrstama piva praćeni su različiti pokazatelji tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva kao što su: koncentracija biomase kvasca, osnovnih sastojaka (šećeri, glicerol, alkohol) te koncentracija lakohapivih sastojaka (acetaldehid, esteri, viši alkoholi).

**Ključne riječi:** lager pivo, stout pivo, ale pivo, hlapive komponente, HPLC analiza, HS-GC-FID analiza

**Rad sadrži:** 60 stranica, 21 sliku, 5 tablica, 40 literaturne reference, 1 prilog

**Jezika izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Božidar Šantek

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. izv.prof.dr.sc. Tonči Rezić
4. doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc

**Datum obrane:** 2. srpnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### COMPARISON OF BEER QUALITY PARAMETERS DURING THE FERMENTATION AND MATURATION

*Ivana Papaik 856/BPI*

**Abstract:** In this paper the determination of the aromatic profile of beer and the quality of the lager and ale beers was carried out. The influence on the aromatic profile of the beer have the raw materials used (malt, hops), the yeast species, the water itself and the fermentation and maturation of the beer. During the research samples of three different types of beer from the „Medvedgrad“ Brewery were used: Indian Pale Ale (IPA), dark lager beer "Grička vještica" and chocolate stout beer "Fantom". Yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used for the production of beer in „Medvedgrad“ Brewery. In these types of beers, different indicators of fermentation and maturation of beer were monitored: biomass concentration of the yeast, concentration of basic components (carbohydrates, glycerol, alcohol) and concentration of volatile beer components (acetaldehyde, esters, higher alcohols).

**Keywords:** lager beer, ale, stout, volatile compounds, HPLC analysis, HS-GC-FID analysis

**Thesis contains:** 60 pages, 21 figures, 5 tables, 40 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Božidar Šantek, Full professor

**Technical support and assistance:** PhD Antonija Trontel, Assistant professor

**Reviewers:**

1. PhD Blaženka Kos, Full professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Tonči Rezić, Associate professor
4. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor

**Thesis defended:** 2 July 2018

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. OSNOVNE SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA .....	2
2.2. SASTOJCI PIVA .....	3
2.2.1. Voda .....	3
2.2.2. Ugljikohidrati .....	3
2.2.3. Dušikovi spojevi.....	4
2.2.4. Alkoholi.....	6
2.2.5. Esteri.....	7
2.3. PIVSKI KVASAC <i>Saccharomyces cerevisiae</i> I NJEGOV METABOLIZAM .....	7
2.3.1. Transport glukoze, manoze, fruktoze i galaktoze u stanicu .....	9
2.3.2. Transport maltoze i saharoze u stanicu .....	10
2.4. PROIZVODNJA PIVA .....	12
2.4.1. Indian Pale Ale pivo .....	14
2.4.2. Stout pivo .....	15
2.4.3. Pivo donjeg vrenja (lager) .....	16
2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA PIVA .....	16
2.5.1. Plinska kromatografija (GC) .....	16
2.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	19
3.1.2. Kemikalije i podloge .....	19
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	19
3.1.3.1. Plinska kromatografija s „headspace“ sustavom .....	19
3.1.3.2. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija .....	20
3.1.3.3. Ostala oprema .....	20
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Analitičke metode .....	21
3.2.1.1. Uzorkovanje .....	21
3.2.1.2. Ekstrakt .....	22
3.2.1.3. Temperatura, tlak i pH .....	22
3.2.1.4. Praćenje mase biomase tijekom procesa.....	22



3.2.1.5. Praćenje promjene broja stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva .....	22
3.2.1.6. Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg i gornjeg vrenja plinskom kromatografijom s „headspace“ sustavom .....	22
3.2.1.7. Određivanje sastojaka piva nastalih tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (HPLC).....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
4.1. PARAMETRI KAKVOĆE INDIAN PALE ALE-A „FAKIN IPA“ .....	27
4.2. PARAMETRI KAKVOĆE ČOKOLADNOG STOUT PIVA „FANTOM“ .....	32
4.3. PARAMETRI KAKVOĆE TAMNOG PIVA DONJEG VRENJA (LAGER) „GRIČKA VJEŠTICA“ .....	37
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>43</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>45</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>50</b>

# 1. UVOD

Pivo je slabo alkoholno, pjenušavo piće, hmeljne arome, slabije ili jače izraženije gorčine te karakterističnog okusa po sladu (Marić, 2009), koje se konzumira širom svijeta, a pretpostavka je da se proizvodi više od 5000 godina. Legende o proizvodnji piva datiraju još u vrijeme starog Egipta, a prvi zapisi o proizvodnji piva u Europi pronađeni su u spisima rimskih pisaca. Kako navode, pivo se počelo proizvoditi na sjeveru Europe gdje se nije uzgajala vinova loza. Kroz povijest to je bilo piće većinom za niže pozicionirane članove društva sve do vladavine Karla Velikog koji je proizvodnju i konzumaciju piva doveo do iste razine kao i proizvodnju vina (Beazly, 1994).

Pivo se proizvodi alkoholnim vrenjem pivske sladovine. Pivska sladovina je vodeni ekstrakt slada (osušeno isključivo zrnno ječma obogaćeno hidrolitičkim enzimima) i hmelja. Hmelj je neoplođeni cvat višegodišnje ženske biljke penjačice *Humulus lupulus*. Osim aroma koje potječu iz hmelja, odabir vrste kvasaca koji se koriste za fermentaciju hmeljne sladovine, ključni je faktor za oblikovanje konačnog okusa i stila piva (Marić, 2009).

Do 1800- tih godina, perioda detektiranja prvih mikroorganizama, alkoholno vrenje je bilo spontan proces te se proizvodnja piva nije pratila pomoću produkata metabolizma. Louis Pasteur je sa suradnicima u to vrijeme definirao pojam alkoholne fermentacije kao procesa povezanog sa životom i organizacijom kvašćevih stanica. Uz Pasteura su stali mnogi znanstvenici tog vremena kao Schröder i Dusch. Oni su uočili da nakon filtracije zraka kroz pamučno-vunenu krpu ne dolazi do fermentacije i putrefakcije u organskim tekućinama. Unatoč Pasteurovom doprinosu te doprinosu njegovih suradnika, mnogi ugledni akademici nisu priznavali teoriju o postojanju mikroorganizama. Tek 1861. godine Pasteur je neupitno definirao fermentaciju kao fiziološki fenomen anaerobnog korištenja izvora ugljikohidrata (Barnett, 2000).

Cilj istraživanja ovog rada je utvrđivanje kvalitete aromatskog profila piva gornjeg i donjeg vrenja, odnosno definiranje razlika u metabolizmu kvasaca korištenih u proizvodnji ovih vrsta piva. Tijekom istraživanja korišteni su uzorci tri različite vrste piva iz Pivovare Medvedgrad; „Fakin IPA-e“, „Gričke vještice“ i „Fantoma“. U navedenim vrstama piva praćeni su različiti pokazatelji odvijanja glavnog i naknadnog vrenja piva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OSNOVNE SIROVINE ZA PROIZVODNJU PIVA

Najveći dio pivarskih industrija u svijetu koristi ječmeni slad koji je uz vodu i hmelj, temeljni sastojak piva. Pet stoljeća star Bavarski Zakon o čistoći piva govori kako je za dobivanje najkvalitetnijeg piva potrebno koristiti isključivo slad, jer dodatkom neslađenih žitarica gubi se kvaliteta okusa, pjene i boje. Ječam se ustalio kao primarna žitarica zbog svojstva da nakon vršidbe ne gubi ljusku, koja kasnije tijekom cijedenja odnosno filtracije sladovine stvara kvalitetniji filtracijski kolač. Uz ostatke proteina ljuska čini tanki porozni gornji sloj te na taj način čini proces filtracije učinkovitijim. Na početku procesa slađenja, ječam se sladi kako bi se sintetizirali enzimi koji razgrađuju škrob te enzimi koji razgrađuju proteine stanične stijenke (Bamforth, 2006). Prije početka mehaničke obrade, preporučuje se vlaženje zrna ječma zbog nekoliko razloga: poboljšanje razdvajanja krupice od pljevice, povećanje vlažnosti cjelokupnog zrna za oko 0,7%, povećanje volumena pljevice za oko 10-20%, povećanje iskorištenja sladnog ekstrakta i graničnog stupnja prevrenja piva te bržeg ošećerenja (Marić, 2009).

Ovisno o vrsti piva, udio vode u pivu iznosi 89-93%. Mineralni sastav vode koja ulazi u proizvodnju piva je prepoznat kao glavni parametar kakvoće okusa. Najzastupljeniji ioni u vodi ujedno su i sastojci koji pridonose okusu i kvaliteti konačnog proizvoda, a to su: kalcijevi, magnezijevi, natrijevi, kalijevi i sulfatni ioni. Kalcijeve soli (npr.  $\text{CaSO}_4$ ) pri uvjetima koji se postižu tijekom mokrog mljevenja, reagiraju s anorganskim fosfatima (npr.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) tvoreći kalcijev fosfat (npr.  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) koji nije veoma topljiv u sladovini, no bitno je napomenuti da je topljivost kalcijevog fosfata u sladovini bolja nego u vodi te ga se vrlo malo gubi taloženjem tijekom mljevenja. Rezultat interakcija između iona kalcija i anorganskog fosfata je smanjenje pH vrijednosti piva. Snižavanje pH vrijednosti piva je od presudne važnosti jer omogućava povoljnu okolinu za djelovanje  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze te proteolitičkih enzima. Magnezijevi ioni imaju sličan rezultat na konačni proizvod kao i kalcijevi ioni, no imaju veću topljivost u sladovini. Sudjeluju u formiranju konačnog okusa piva, a kao primjer je magnezijev karbonat koji doprinosi konačnoj gorčini piva (Hopkins i sur., 1939). Magnezij je ključan i za metabolizam kvasca jer sudjeluje u brojnim funkcijama vezanih za kvašćevu fiziologiju uključujući respirofermentativni metabolizam, rast i diobu stanica, strukturu mitohondrija i odgovor stanice na stres. Također može stimulirati proizvodnju etanola te ublažiti štetne učinke istog kao i smanjiti inhibiciju biokemijskih reakcija uzrokovanu povišenom temperaturom (Birch i sur.,

2003). Natrij nema kemijskih efekata na proces nastajanja konačnog proizvoda, ali doprinosi okusu pojačavajući slatkoću. Kalij je potreban za rast kvasca i doprinosi stvaranju „slanog“ okusa piva. Sulfati pokazuju pozitivan efekt na razgradnju škroba i proteina, a veća koncentracija sulfatnih iona intenzivira hmeljnu aromu piva. Mnoge pivovare ne mogu koristiti direktno vodovodnu vodu u proizvodnji pa ona podliježe mikrobiološkoj kontroli, deklorizaciji, redukciji alkaliteta te podešavanju koncentracije minerala.

Hmelj je sastojak piva koji uvelike doprinosi kvaliteti i stabilnosti konačnog proizvoda. Dodaje se tijekom kuhanja sladovine, a u daljnjem procesu proizvodnje otpušta karakteristične spojeve arome. Sadrži  $\alpha$  i  $\beta$  kiseline koje se tijekom proizvodnje prevode u izo-alfakiseline i daju gorčinu konačnom proizvodu. Doprinosi stabilizaciji pjene te ima antimikrobna svojstva (Goldammer, 2008).

## 2.2. SASTOJCI PIVA

Pivo sadrži preko 800 različitih sastojaka, a neki od njih su voda, alkoholi, dušikovi spojevi, vitamini i minerali, organske kiseline, ugljikohidrati te mnogi drugi, a po udjelu su ovisno o vrsti najvažniji voda, neprevreli ekstrakt i alkohol (Norris, 1946).

### 2.2.1. Voda

Kao što je prethodno spomenuto, voda zauzima velik postotak u pivu. Molekule vode su ionizirane u obliku hidroksilnih iona koji nose električni naboj. Ovi ioni u vodi određuju temeljni karakter konačnog proizvoda odnosno određuju kiselost ili lužnatost piva. U prethodnom poglavlju (2.1.) navedeni su najčešći ioni koji se nalaze u vodi i njihova uloga. Tom popisu možemo još dodati fosfate, kloride, karbonate, nitratre i nitrite te mikroelemente kao što su: željezo, bakar, cink i mangan. Svaki od tih elemenata ima važnu biokemijsku i kemijsku ulogu kao i ulogu u stvaranju konačnog okusa proizvoda (Goldammer, 2008).

### 2.2.2. Ugljikohidrati

Esencijalne reakcije koje se događaju tijekom sladovanja ječma su enzimskog karaktera. Škrob iz ječma je od vitalne važnosti jer u najvećoj mjeri osigurava materijal za fermentaciju. Tijekom sladovanja, amilaze i proteolitički enzimi netopljive sastojke slada prevode u topljive koje će tijekom procesa proizvodnje piva kvasac iskoristiti kao izvor nutrijenata. Najčešći

fermentabilni šećeri koji se nalaze u sladovini su: glukoza i fruktoza koja nastaje hidrolizom saharoze, maltoza i oligosaharidi (dekstrini). Dekstrini su polimeri glukoze koji se formiraju degradacijom škroba u procesu sladovanja. Enzimi, amilaze, cijepaju više dekstrine do nižih dekstrina kao što je maltotrioza (koje kvasac može iskoristiti) te do maltoze i glukoze koja je osnovna gradbena jedinica škroba. Pretpostavlja se da je 64-77% ugljikohidrata iz sladovine fermentabilno. U konačnom proizvodu, se mogu naći ostatci fermentabilnih šećera i viši dekstrini koji nisu topljivi u sladovini. U pivu su detektirani i: D-manoza, D-riboza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galaktoza, kao i trisaharidi panoza i izopanoza.

Količina ukupnih šećera u pivu, kreće se ovisno o vrsti piva pa tako lageri sadrže oko 10-30 g/l, a ale piva oko 15-60 g/l ukupnih šećera. Novi stilovi u proizvodnji piva koriste sirovine i metode s kojima smanjuju količinu ugljikohidrata u sladovini na 4-9 g/L. Takva nisko energetska piva se dobivaju na način da se dekstrini gotovo potpuno iskoriste korištenjem specijalnih kvasaca (Ferreira, 2009).

### 2.2.3. Dušikovi spojevi

Dušikovi spojevi imaju vrlo važnu ulogu u određivanju kvalitete i stabilnosti konačnog produkta. Uključuju aminokiseline, peptide, polipeptide, nukleinske kiseline i njihove razgradne produkte. Ove komponente imaju utjecaj na okus, stabilnost pjene, boju i ishranu kvasca. Dušikovi spojevi, u pivu, većinom dolaze iz slada, a nešto manje iz neslađenih žitarica. Količina dušikovitih komponenti u sirovinama ovisi o vrsti žitarice, tlu, vremenskim prilikama, sezoni te količini upotrijebljenog gnojiva. Veoma je bitno da ječam koji se koristi za proizvodnju slada ima koncentraciju proteina nižu od 11,5%. Veća koncentracija proteina od navedene smatra se nepoželjnom zbog manje količine dobivenog fermentabilnog ekstrakta u sladovini. Količina proteina u zrnju, niža od 11,5% će dovesti do povećanja koncentracije ugljikohidrata u ekstraktu. Neki istraživači se ne slažu s postavljenom teorijom i tvrde da viši udio proteina u zrnju dovodi do proizvodnje veće količine enzima, a posljedično tome poboljšava se proces sladovanja.

Na temelju asimilacije aminokiselina u kvascu, aminokiseline su svrstane u četiri skupine (Tablica 1): skupina A, skupina B, skupina C i skupina D. Amino kiseline skupine A, apsorbiraju se u prvim koracima fermentacije i nazivaju se još brzo apsorbirajuće aminokiseline. Aminokiseline skupine B kvasac koristi puno sporije. Skupina C predstavlja aminokiseline koje kvasac koristi tek kad više nema izvora aminokiselina skupine A. Prolin je jedini predstavnik

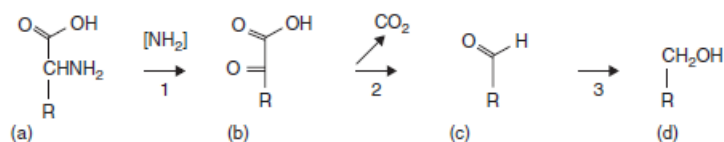
skupine D te ga kvasac slabo ili uopće ne upotrebljava. Naime, prolin nema slobodnih amino skupina u pobočnom lancu i tako ne može direktno sudjelovati u reakcijama transaminacije.

**Tablica 1.** Redoslijed i brzina transporta aminokiselina prisutnih u sladovini u stanici kvasca (Fontana i Buiatti, 2009)

SKUPINA A	SKUPINA B	SKUPINA C	SKUPINA D
visoka brzina transporta	umjerena brzina transporta	usporeni transport	brzina transporta zanemariva
<ul style="list-style-type: none"> <li>• glutaminska kiselina</li> <li>• asparaginska kiselina</li> <li>• asparagin</li> <li>• glutamin</li> <li>• serin</li> <li>• treonin</li> <li>• lizin</li> <li>• arginin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• valin</li> <li>• metionin</li> <li>• leucin</li> <li>• izoleucin</li> <li>• histidin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• glicin</li> <li>• fenilalanin</li> <li>• tirozin</li> <li>• triptofan</li> <li>• alanin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prolin</li> </ul>

Aminokiseline utječu na profil okusa piva jer potiču veću proizvodnju viših alkohola i estera. U općenitom prikazu metaboličkog puta formiranja alkohola iz aminokiselina prikazanog na slici 1, vidljivo je da transaminaza katalizira reakciju stvaranja keto-kiseline pri čemu aminokiselina gubi amino skupinu. Posljedično tome dolazi do dekarboksilacije keto-kiseline katalizirana enzimom iz skupine dekarboksilaza pri čemu nastaje aldehid. Dehidrogenaza naposljetku katalizira nastajanje alkohola iz aldehida.

Samo oko 30% dušikovih spojeva u ječmu nalazi se u konačnom proizvodu, a u najvećoj koncentraciji je prolin jer ga kvasac ne može iskoristiti u potpunosti (Fontana i Buiatti, 2009).



**Slika 1.** Formiranje viših alkohola, aldehida i okso-kiselina iz amino kiselina (a=amino kiselina, b= okso-kiselina, c= aldehid, d= alkohol; 1= transaminaza, 2= dekarboksilaza, 3=dehidrogenaza) (Fontana i Buiatti, 2009)

#### 2.2.4. Alkoholi

Energetska vrijednost piva potječe prvenstveno od alkohola jer u pivu nema masti i kolestrola, a ovisno o vrsti, alkohol čini 0,1-10,0 volumnog udjela piva (Marić, 2009). Alkohol koji se u najvećim količinama nalazi u pivu je etanol. Etanol ( $C_2H_5OH$ ) je primarni alkohol s dva C atoma. Lako je hlapiva, zapaljiva i bezbojna tekućina pri sobnoj temperaturi. Stvara se tijekom metabolizma glukoze u anaerobnim uvjetima, a razlog tomu je potreba za regeneracijom koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Naime, pri oksidaciji gliceraldehid-3-fosfata dolazi do redukcije  $NAD^+$ . Kako bi glikoliza mogla neometano teći nastali NADH se mora oksidirati da bi se obnovio  $NAD^+$  koji će ponovno ući u proces glikolize. U aerobnim uvjetima organizma NADH prenosi svoje elektrone elektron-transportnim lancem, dok se pri anaerobnim uvjetima aktiviraju piruvat dekarboksilaza, laktat dehidrogenaza i alkohol dehidrogenaza. Na taj način mikroorganizmi osiguravaju regeneraciju koenzima za svoj metabolizam, a biotehnološka industrija iskorištava proizvode koji nastaju u tom procesu. Etanol se vrlo lako izlučuje iz stanice jer prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom.

Glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) je važna komponenta piva, klasificirana kao alkohol. Pri sobnoj temperaturi je bezbojna viskozna tekućina slatkastog okusa i bez mirisa. Koncentracija glicerola u pivu varira od 1,5- 3,5 g/l, a njegova prisutnost bitno određuje okus i glatkoću piva (Buiatti, 2009). U radu Kloppera i sur. (1986) najniža koncentracija glicerola uočena je u kiselkastim pivima, a najviša u specijalnim pivima s visokom količinom ekstrakta. U uvjetima nižeg aktiviteta vode okoliša od vode citoplazme, stanice kvasca preusmjeravaju glikolitički fluks iz smjera nastajanja piruvata u nastajanje glicerola. Naime, enzim triozafosfat-izomeraza fluktozu-1,6- difosfat prevodi do dihidroksiacetonfosfata koji se kroz redukcijsko-oksidacijske i defosforilacijske reakcije metabolizira do glicerola. Drugi metabolički put kojim nastaje glicerol je razgradnjom triglicerida. U tom slučaju nastaju tri molekule masnih kiselina i jedna molekula glicerola, a reakciju katalizira enzim lipaza.

Aromatski viši alkoholi koji se mogu naći u pivu i mogu se smatrati kao dijelom mehanizma stanice kvasca su: triptofol, tirozol i feniletanol. Metabolički put nastanka ovih alkohola uključuje metaboličke puteve nastajanja aromatskih aminokiselina i alkohola reakcijama transaminacije, dekarboksilacije i redukcije. Feniletanol se smatra pozitivnim faktorom u vidu okusa piva, dok triptofol i tirozol nisu poželjni u velikim količinama zbog svog kiselkasto kvasnog okusa. Prihvatljive količine ovih viših alkohola koje se nalaze u pivu su: 10, 20 i 75 mg/l triptofola, tirozola i feniletanola (Szlavko, 1973).

### 2.2.5. Esteri

Esteri su najvažnije komponente arome u pivu koje daju konačnom proizvodu voćnu aromu i svježije note. To su organski spojevi koji nastaju reakcijom alkohola i kiseline, a podijeljeni su u dvije grupe: acetatni esteri čije su preteče acetyl-CoA i alkoholi te esteri masnih kiselina koji potječu od masnih kiselina i etanola. Podrijetlo fenolnih supstanci u pivu regulira POC (*eng.* phenolic off-flavour) gen, a posjeduje ga svaki kvasac, no kod kvasaca donjeg vrenja ne dolazi do njegove ekspresije pa je istu potrebno potaknuti. Esteri su topljivi u mastima te kao takvi izlaze u staničnu okolinu. Brzina difuzije estera izvan stanice ovisi o veličini molekule estera.

Na nastajanje estera u pivu utječe nekoliko faktora: temperatura vrenja, sadržaj kisika, početna gustoća sladovine, soj kvasca i količina kvasca dodana u ohmeljenu sladovinu. Ako je količina kvasca puno manja od optimalne, fermentacija će stati, pivo će imati puno voćnih nota, ali i velik broj nepoželjnih produkata, ako je slučaj obrnut tada će fermentacija biti brza, pivo će imati okus na kvasac i puno manje voćnih aroma. Kako se temperatura vrenja *ale* piva kreće od 16-24°C, a lagera od 6-18°C, očekivano je da će *ale* piva imati više estera i viših alkohola, a samim time i jače izraženu aromu (Wunderlich i Back, 2009).

Nykänen i Nykänen (1977) su u svom radu pratili koncentracije estera koji nastaju kod kvasca *S. cerevisiae*. Najveća koncentracija estera, izoamil acetata, određena u tom istraživanju bila je 0,21-0,30 mg/L. Zatim redom slijede: etil butirrat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat i fenil acetat. Senzorika ovih spojeva pokazala je da izoamil acetat daje pivu aromu i okus na bananu, etil butirrat pridonosi stvaranju arome po tropskom voću, etil heksanoat daje aromu crvene jabuke, etil oktanoat ima jak miris na voće i cvijeće dok etil dekanat i fenil acetat ne pokazuju specifičnu aromu (Peddie, 1990).

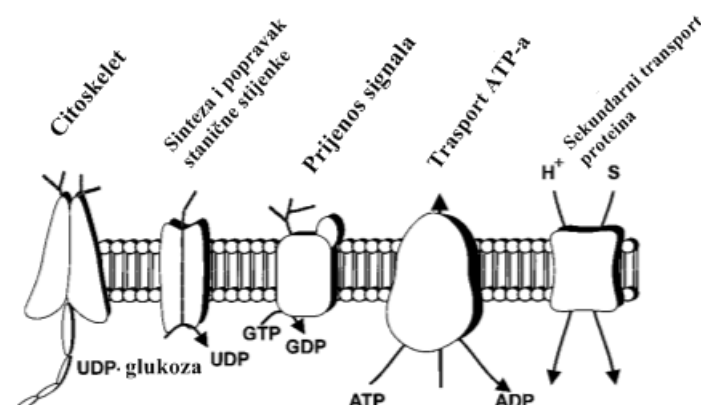
## 2.3. PIVSKI KVASAC *Saccharomyces cerevisiae* I NJEGOV METABOLIZAM

Kvasac, u proizvodnji piva, je odgovoran za metaboličke procese u kojima nastaje etanol, ugljikov dioksid te cijeli niz drugih metabolita koji pridonose konačnom okusu i aromi piva. U začetcima pivske industrije postojala su dva pivska kvasca: *Saccharomyces cerevisiae* za *ale* piva i *Saccharomyces pastorianus* za *lager* piva, a danas u svijetu postoji nebrojeno puno vrsta i sojeva kvasaca za proizvodnju različitih tipova piva. Kvasci gornjeg vrenja proizvode piva s više estera odnosno izraženijim voćnim aromama, dok piva proizvedena kvascima donjeg vrenja zadržavaju karakterističnu sumporastu aromu (Goldammer, 2008). Ovim razlikama u



konačnom proizvodu pridonose uvjeti fermentacije prvenstveno izraženih preko temperaturnog raspona. Kvasci gornjeg vrenja započinju vrenje sladovine pri temperaturi od 18°C, a završavaju na oko 25°C, maksimalno na 37°C. Kvasci donjeg vrenja počinju fermentaciju na 6°C, a završavaju na 18°C, maksimalno na 34°C. Štoviše, kritični utjecaj na učinak fermentacije imaju slijedeća svojstva kvasca: (1) flokulacija (2) potrošnja šećera, aminokiselina, malih peptida i amonijevih iona iz ekstrakta, (3) tolerancija kvasca na visoke osmotske tlakove, (4) tolerancija na etanol i (5) potreba za kisikom (Stewart, 2016).

Kvasac se dodaje u hmeljenu sladovinu gdje započinje apsorpcija otopljenih šećera, jednostavnih dušičnih spojeva (aminokiselina, amonijevih iona i malih peptida), vitamina i iona (Stewart, 2016). Plazmatska membrana kvasca *Saccharomyces cerevisiae* građena je od lipidnog dvosloja prosječne debljine oko 7,5 nm. Sadrži mješavinu fosfolipida, koji se sastoje od polarne glave koju čine glicerol i fosfati i nepolarnog repa koji je građen od masnih kiselina, te proteina čije interakcije čine membranu funkcionalnom cjelinom. Klasični model membrane Singera i Nicolsona (1972) opisuje membranu kao neprekidno „more“ lipida prožeto sa globularnim proteinima koji imaju mogućnost kretati se neometano u ravnini membrane. U istraživanjima koja su provedena uz pomoć fluorescentne lipidne sonde u plazmatskoj membrani, pokazalo se kako je kretanje membranskih proteina u membrani kvasca *Saccharomyces cerevisiae* neobično „sporo“. To se pripisuje činjenici da su proteini ometeni u bočnom kretanju zbog složene strukturne povezanosti s drugim proteinima ili elementima citoskeleta. Proteini stanične membrane uključeni su u transport različitih spojeva u stanicu i iz stanice kvasca, prijenos signala, učvršćivanje citoskeleta i sintezu komponenata membrane (Slika 2) (Van Der Rest i sur., 1995).



**Slika 2.** Razredi membranskih proteina pronađenih u plazmatskoj membrani kvasca *S. cerevisiae* (Van Der Rest i sur., 1995)

Značajka lipida plazmine membrane je njihova raznovrsnost u veličini i kompoziciji. Većina lipida pripada glicerofosfolipidima, sfingolipidima i sterolima. Glicerofosfolipidi sastoje se od dva acilna lanca masnih kiselina vezanih na glicerol 3-fosfat, različitih supstituenata vezanih na fosfatnu skupinu kao što su: kolin, etanolamin, serin, mioinozitol i glicerol. Sfingolipidi imaju ceramidnu okosnicu koja se sastoji od dugog lanca fitosfingozina gdje je dušik aciliran C<sub>26</sub> masnom kiselinom. *S. cerevisiae* sadrži samo tri sfingolipida: inozitol fosfat ceramid, manozil-inozitolfosfat-ceramid i manozil-diinozitolfosfat-ceramid. Steroli su kompaktne krute hidrofobne molekule s polarnim hidroksilnim skupinama. Za razliku od viših eukariota u kojima je najzastupljeniji sterol, kolesterol, kod kvasca je to ergosterol i u manjim količinama zimosterol (Van Der Rest i sur., 1995).

Kvasci koji se koriste u biotehnologiji, izolirani su iz prirodnih staništa s velikom koncentracijom šećera, gdje kvasac velikom brzinom previre dostupne šećere u etanol. U ekosustavu, brzina rasta kvasca *Saccharomyces cerevisiae* može biti limitirana dostupnošću nekih nutrijenata u hranjivoj podlozi. U takvim uvjetima njihova konkurentnost nije određena afinitetom kvasca za šećere ili energetsom učinkovitosti korištenja šećera nego će kvasac isključivo koristiti određeni izvor ugljikohidrata, ako posjeduje funkcionalni sustav za transport tog supstrata u stanicu odnosno enzime za prevođenje određenog ugljikohidrata u glukoza-6-fostat ili u neki drugi međuprodukt glikolize. Kvasci iz roda *Saccharomyces* transportiraju otopljene tvari kroz citoplazmatsku membranu na dva načina: pasivnom difuzijom i pomoću transmembranskih prijenosnika. Prijenos tvari kao što su šećerni alkoholi (manitol, ribitol, sorbitol i sl.) odvija se pasivnom difuzijom (Van Der Rest i sur., 1995).

### 2.3.1. Transport glukoze, manoze, fruktoze i galaktoze u stanicu

Najproučavaniji transportni sustavi u kvascu su sustavi za transport glukoze, fruktoze i manoze. Analize s radioaktivno označenom glukozom indicirale su na to da ovisno o uvjetima rasta, transport se može opisati s dvije kinetičke komponente. Iz toga proizlaze dva operativna transportna sustava; sustav s visokim i niskim afinitetom za glukozu. Ako je konstanta afiniteta oko 1 mM, vrlo je vjerovatno da je unos šećera potaknut nosačima olakšane difuzije koji su u bliskoj vezi s heksokinazama. Sustavi s niskim afinitetom za glukozu su i dalje sporni. Konstanta afiniteta u tim slučajevima se procjenjuje na 20 mM, a računalne analize su pokazale da tada transport ukazuje na pasivnu difuziju jer je neovisan o kinazama (Weusthuis i sur., 1994). Pokusi s mutantima doveli su do nekoliko mutacija za koje se očekuje da opisuju transportni sustav glukoze, a neki od njih su: *snf3*, *hxt1* do *hxt4*, *lgt1*, *glk1* i *cat 1*. Spomenuti mutanti su

podijeljeni u dvije skupine: ne-represibilni koji usporedno troše glukozu i druge izvore ugljika i ne-derepresibilne mutante koji neke metabolizme izvora ugljika imaju pod stalnom represijom iako imaju funkcionalne strukturne gene za definirane izvore ugljika. Hxt1, hxt2 i glk1 su predstavnici mutacija ne-represibilnih mutanata koji se odabiru na temelju rezistencije na 2-deoksi-D glukozu koji je toksičan za stanicu. Zbog sličnosti s molekulom glukoze izaziva represiju metabolizma drugih izvora ugljika. Cat1 i snf3 su primjeri mutacija ne-derepresibilnih mutanata koji se izoliraju testiranjem mutanata koji ne rastu na određenim izvorima ugljika.

Za transportni sustav visokog afiniteta potreban je gen SNF3 i/ili porodica gena HXT2. Ugljikohidrati se fosforiliraju kinazama koje su zajedničke za glukozu, fruktozu i manozu. Heksoze se fosforiliraju na C6 pomoću 3 fosforilizacijska enzima: heksokinaza A, heksokinaza B i glukokinaza (Novak i Marić, 1995).

Za metabolizam galaktoze kod kvasca *S.cerevisiae* neophodni su: fosfoglukomutaza (GAL5), transportni protein za galaktozu (GAL2) i: funkcionalni enzimi Leloirovog biokemijskog puta; galaktokinaza (GAL1), transferaza (GAL7) i epimeraza (GAL9). GAL2 transportni protein za galaktozu uvodi galaktozu u citoplazmu stanice gdje galaktokinaza (GAL1) prevodi galaktozu u galaktozu-1-fosfat uz utrošak molekule ATP-a. Uz djelovanje enzima transferaze (GAL7), galaktoza-1-fosfat metabolizira se do glukoze-1-fosfat uz utrošak molekule UDP glukoze, koja se regenerira epimerazom GAL10. Uz djelovanje fosfoglukomutaze GAL5, glukoza-1-fosfat previre do glukoze-6-fosfat koja je u putu glikolize. Bitno je napomenuti da galaktoza inducira GAL gene, dok glukoza izaziva jaku represiju transkripcije GAL gena čak i u prisutnosti galaktoze (Novak i sur., 2000).

### 2.3.2. Transport maltoze i saharoze u stanicu

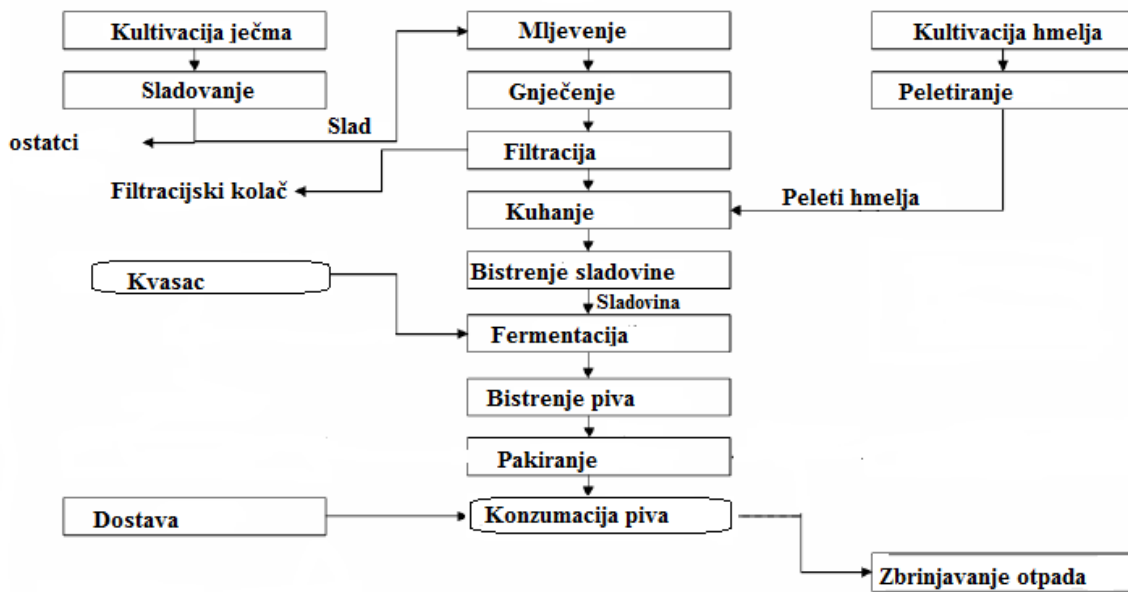
Transport disaharida u kvascu *S. cerevisiae* posredovan je proton simport sustavom. Maltoza je produkt hidrolize škroba koju provode amilaze i može se pronaći u bilo kojem sustavu na zemlji u prisutstvu škroba. Rast kvasca na maltozi inducira sintezu maltoza permeaza transkripcijskom aktivacijom. Transportni sustav za maltozu kodiraju najmanje pet MAL lokusa (MAL1-MAL6), a maltoza se nepromjenjena transportira u stanicu. MAL lokusi nisu povezani međusobno, a najbolje je proučen MAL6 lokus. MAL61 kodira transportni protein za maltozu, MAL62 kodira maltazu koja hidrolizira maltozu unutar stanice na dvije molekule glukoze. Molekule glukoze se fosforiliraju i razgrađuju se putem glikolize. MAL63 je pozitivni regulacijski protein potreban za indukciju transkripcije. Kinetička istraživanja uputila su na to

da za transport maltoze u stanicu postoje dva transportna sustava: sustav niskog afiniteta ( $K_m=70$  mM) i sustav visokog afiniteta ( $K_m=4$  mM). Nedavna istraživanja pokazala su da je sustav niskog afiniteta povezan s nespecifičnim vezanjem maltoze na staničnu stijenu, dok je izolacijom plazmatske membrane dokazano da sustav visokog afiniteta ovisi o transportnim proteinima koje kodiraju MAL61 ili MAL11. Naime, dodatkom glukoze u podlogu s maltozom dolazi do gotovo potpune inaktivacije oba sustava za transport maltoze. Bitno je napomenuti da se aktivnost maltaze ne mijenja s vremenom u bilo kojim uvjetima pa stoga, ako kvasac ponovno dođe u čisti maltozni medij, transportni sustav za maltozu se regenerira i nastavlja s radom (Novak i sur., 2004).

Kvasac ne može direktno koristiti saharozu jer ju ne može transportirati u stanicu, ako ne posjeduje invertaze koja hidrolizira saharozu na fruktozu i glukozu. U ranim radovima Frissa i Ottolenghija (1959) prikazano je da protoplast ne posjeduje ekstracelularnu invertaznu aktivnost za fermentaciju saharoze. Korištenje saharoze u kvascu *S. cerevisiae* zahtijeva ekspresiju strukturnih gena koji kodiraju invertazu: SUC1-SUC5 i SUC7. Direktno korištenje saharoze u kvascu *S. cerevisiae* proučavano je na nekoliko  $Suc^+$  i  $Suc^-$  mutiranih sojeva što je dokazalo prisutnost aktivnog saharoza  $H^+$  simporta. Štoviše ova transportna aktivnost opravdava postojanje konstitutivne intracelularne invertaze koja proizlazi iz kraćeg transkripta gena SUC2 koji kodira invertazu. SUC2 se reprimira u visokim koncentracijama glukoze dok se pri niskim koncentracijama taj isti gen ekspresira do 8 puta više nego na glukogenim supstancama. Smatra se u tom slučaju, da dolazi do indukcije transkripcije koje signalizira Snf3 protein. Nakon provedenih kinetičkih analiza, korištenjem  $^{14}C$ -označene saharoze Eadie-Hofsteeova jednadžba (ovisnost  $V$  o  $V/[S]$ ) nije pokazala uobičajen odziv kao kod drugih šećera, što daje zaključiti da su rezultati posljedica složenog transporta. Kako bi se karakteriziralo koja permeaza pridonosi saharoza- $H^+$  simportu, analizirana je kinetika aktivnog trošenja saharoze sa definiranom  $\alpha$ -glukozid permeazom. Rezultati su pokazali da je transport saharoze uspio uz prisutnost MAL2T i AGT1 gena. AGT1 gen kodira za sustav visokog afiniteta za saharozu ( $K_m=7,9\pm 0,8$  mM), dok MAL2T doprinosi pojavi sustava niskog transportnog afiniteta za saharozu ( $K_m=120\pm 20$  mM) (Stambuk i sur., 2000).

## 2.4. PROIZVODNJA PIVA

U posljednjem desetljeću svjedočimo progresivnom razvoju i promjenama u pivarskoj industriji. Povećanjem broja tzv. „craft“ pivovara, tržište dobiva lepezu novih kvalitetnih proizvoda te na taj način pridobiva nove, različite konzumente piva. O pivu se više ne govori u kontekstu velikih komercijalnih pivovara, nego ispijanje piva postaje kultura, što dokazuje upravo porast broja mikropivovara kao i pivnica koje sve više rastu i s marketinške strane. Na slici 3. prikazana je opća blok shema proizvodnje piva.



**Slika 3.** Opća blok shema proizvodnje piva

Kako bi se osigurala konstantna kvaliteta i konkurentnost na tržištu, neophodna je neprestana provjera kvalitete kroz cijeli proces proizvodnje. Napredak znanosti u proteklom stoljeću omogućio je znanstveni pristup proizvodnji piva, ne samo na kemijskoj razini kroz razvoj instrumentalnih metoda nego i mikrobiološkoj, otkrivanjem metaboličkih puteva i shvaćanjem previranja metabolita u stanicama kvasca. Danas su poznate i objašnjene mnoge kvalitativne i kvantitativne promjene sastojaka mladog i dozrelog piva, a način transporta različitih sastojaka sladovine u stanicu kvasca opisan je u poglavlju 2.3. Kada govorimo o razgradnji primarnog supstrata, glukoze, bitno je napomenuti da se ona u najvećoj mjeri pri proizvodnji piva, metabolizira u stanici glikolitičkim putem u kojem nastaje piruvat, a daljnja

sudbina piruvata određena je prisutstvom kisika i fermentabilnih šećera u okolini (Pasteurov i Crabtree efekt). No u stanici se nikad ne odvijaju samo reakcije katabolizma, nego istovremeno su prisutne i anaboličke reakcije u kojima se putem Krebsovog ciklusa sintetiziraju sastojci mikrobnih stanica i nusproizvoda vrenja te u heksoza monofosfatnom putu nastaje riboza koja je potrebna za sintezu nukleinskih kiselina, ATP-a, NAD-a i NADP-a. Tijekom metabolizma nastaje niz nusproizvoda koji doprinose punoći okusa, stabilnosti pjene, mirisu, boji i sl. Ugodne arome piva posljedica su nakupljanja estera i viših alkohola tijekom glavnog vrenja i dozrijevanja, a suprotno tome dozrijevanjem se smanjuju koncentracije spojeva koji pridonose neugodnim aromama piva kao što su acetaldehid, diacetil i sumporni spojevi.

Kao što je već spomenuto u svijetu postoje različite vrste piva koje su se tijekom vremena razvijale ovisno o geografskoj poziciji. U današnje vrijeme postoji puno podjela piva kao što su podjela prema boji, prema glavnoj sirovini za proizvodnju sladovine, prema masenom udjelu ekstrakta u sladovini, prema volumnom udjelu alkohola, no najčešća podjela koja se može naći u literaturi je ona prema vrsti kvasca. Ovisno o kvascu korištenom u procesu proizvodnje piva se mogu podijeliti na piva proizvedena kvascima gornjeg i donjeg vrenja. Piva dobivena korištenjem kvasaca gornjeg vrenja zauzimaju manji postotak svjetske proizvodnje, a najčešća su u Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Belgiji i SAD-u. Piva proizvedena kvascima donjeg vrenja dominiraju svjetskim pivarskim tržištem te zauzimaju čak 90% proizvodnje (Pavslar i Buiatti, 2009). U tablici 2 prikazana je podjela nekih piva prema vrsti kvasca.

**Tablica 2.** Podjela nekih piva prema vrsti kvasca koji se koriste u proizvodnji (Pavsler i Buiatti, 2009)

<b>TIP PIVA</b>		<b>ZEMLJA</b>
<b>PIVO PROIZVEDENO KVASCIMA GORNJEG VRENJA</b>	Engleski pale ale	Velika Britanija
	Smeđi Porter	Velika Britanija
	Robust Porter	Velika Britanija
	Suhi stout	Irska
	Lambic	Belgija
	Slatki stout	Velika Britanija
	Kolsch	Njemačka
<b>PIVO PROIZVEDENO KVASCIMA DONJEG VRENJA</b>	Njemački Pilsner	Njemačka
	Češki Pilsner	Češka
	Klasični Američki Pilsner	SAD
	Bečki Lager	Austrija
	Tamni Američki Lager	SAD
	Doppelbock	Njemačka
	Eisbock	Njemačka

#### 2.4.1. Indian Pale Ale pivo

Priča o „Indian Pale ale“ pivu seže još od vremena britanskih kolonija 1700-tih godina u Indiji. Naime, pivo koje se proizvodilo u Velikoj Britaniji za vojnike u Indiji, bilo je potrebno očuvati od kvarenja tijekom dugog puta. Antimikrobna aktivnost hmelja bila je poznata i u to vrijeme pa se pivu dodavala veća količina istog radi sprječavanja kvarenja. Jače hmeljenje rezultiralo je novim stilom piva koji je u današnje vrijeme izuzetno prisutan u pivarskom svijetu (Anonymus 1, 2018).

Proces kuhanja ovog stila piva počinje obradom vode. U počecima engleski pivari su koristili prirodno meku londonsku vodu koja je bila lako dostupna, ali nije bila optimalne tvrdoće pa su je prokuhivali. Kuhanjem se taložio kalcij koji se uklanjao ručno (Steele, 2012).

Kako i u prošlosti, tako i u današnje vrijeme proizvodnji IPA-e pogoduje mekša voda s višom koncentracijom sulfata te nižom koncentracijom karbonata (Pavsler i Buiatti, 2009). Mljevenje i miješanje slada s vodom provodilo se u drvenim posudama najčešće od hrasta ili tikovine. Otopina slada i vode miješala se ručno kroz gotovo sat vremena. Zanimljivo je napomenuti da su različita temperatura vode te različit razmak između miješanja i odmaranja otopine, rezultirali različitom alkoholnom jakosti piva. Kuhanje sladovine odvijalo se u bakrenim posudama od tri do osam sati ovisno o jačini vatre. Hmelj je dodavan tijekom kuhanja sladovine 30 minuta prije kraja kuhanja, a vjerovalo se da kuhanje sladovine u kombinaciji s hmeljem, dulje od 30 minuta, dovodi do otpuštanja gorkih i neugodnih spojeva u pivo. Nakon hlađenja, sladovina se prenosila u bačve u kojima se odvijalo glavno vrenje. U zimskim mjesecima aktivnost tadašnjeg pivarskog kvasca bila je nešto niža, pa je IPA od tog vremena sezonsko pivo koje se proizvodilo većinom za toplijih dana. Ako je pak proizvodnja bila potrebna i u zimskim mjesecima, bačve u kojima se odvijalo glavno vrenje, uranjane su u posude s toplom vodom. Odležavanje je trajalo najčešće nekoliko zimskih mjeseci, dok se zagrijavanjem piva u proljeće pojavljivalo naknadno vrenje zbog prisutnosti bakterija i divljih kvasaca koji su koristili preostale ugljikohidrate (Steele, 2012).

#### 2.4.2. Stout pivo

Prvi zapisi o stoutu sežu u 1677-u godinu, a pismo u kojem je spomenut nalazi se u „Egerton Manuscript-u“ i čuva se u Britanskom muzeju. Stout kao stil piva je prvenstveno nastao kao bojom tamnija i okusom jača verzija Portera s oko 7-8 vol% alkohola. Kako je tijekom godina rasla popularnost Portera kao stila piva, pivari su se poigrali s okusima, odnosno alkoholnom jakosti istog te došli do nove verzije piva tzv. „Porter Stouta“ (Lewis, 1995).

Stout je *ale* pivo, produkt kvasaca gornjeg vrenja, izuzetne punoće okusa, sladne arome te guste i stabilne pjene. Do danas je razvijeno nekoliko različitih vrsta Stouta kao što su: „Milk stout“, „Oyster stout“, „Oatmeal stout“, „Imperial Stout“, „Baltic Porter“, „Tropic stout“, „Sweet stout“, „Chocolate stout“ i mnogi drugi. Tako je npr. „Dry stout“ povijesno nastao kako pokušaj kapitaliziranja Londonskih portera, dok je „Milk stout“ nastao kao pokušaj dodavanja mliječne i kremastije arome pivu te je podvrsta „Sweet stouta“. Sladak okus ovog piva dolazi od većeg postotka nefermentabilnih dekstrina, a dodatna slatkoća se postiže naknadnim dodavanjem laktoze. Posebnosti ovog piva pridonose i posebni sladovi koji variraju od čokoladnog preko kristalnog do karamelnog, a voda koja se koristi je uobičajeno zasićena karbonatima. Za „Dry stout“ se koriste kombinacije prženog i neslađenog ječma kako bi do



izražaja došla gorčina okusa karakteristična za ovu vrstu piva. U vodi koja se koristi u proizvodnji je također prisutna visoka koncentracija karbonata (Pavsler i Buiatti, 2009).

### 2.4.3. Pivo donjeg vrenja (lager)

Prvu proizvodnju piva pri relativno niskim temperaturama provodili su redovnici, pri čemu su primijetili da se čuvanjem piva u spiljama tijekom ljetnih mjeseci razvijaju novi kvasci koji proizvode pivo pri nižim temperaturama, a kontaminacija bakterijama je slabija. Štoviše, niža temperatura pridonosi sporijem stvaranju ugljičnog dioksida i nižoj turbulenciji tijekom proizvodnje, a posljedično tome dobivamo proizvod sa slabijom pjenom i kvasac koji se taloži na dnu posude. Godine 1883. dr. Emil Christian Hansen izolirao je ovaj kvasac u čistoj kulturi i nazvao ga *Saccharomyces carlsbergensis* (Anonymus 2, 2018).

Proces proizvodnje piva donjeg vrenja počinje usitnjavanjem slada kojem se nakon usitnjavanja dodaje voda. Priprema slada je najkritičniji korak u proizvodnji piva jer on determinira kemijska svojstva kao što su: sadržaj alkohola, aminokiselinski i peptidni profil i fizikalna svojstva kao što su boja, stabilnost pjene i bistroća. Sladovina se podvrgava filtraciji, a zatim kuhanju, aeraciji i hlađenju. Ohlađena sladovina se naciepljuje kvascem koji započinje vrenje pri nižim temperaturama (8-15°C) te se spušta na dno fermentora. Koncentracija kvasca kojom se uobičajeno naciepljuje fermentor kreće se od 10-25 x 10<sup>6</sup> st/mL. Nakon glavnog vrenja slijedi duži period odležavanja pri temperaturi od -1°C do +4°C. Tijekom odležavanja kvasac nastavlja iskorištavati ostatak fermentabilnog materijala, smanjuje se koncentracija nepoželjnih spojeva kao što su sumporovodik, dimetil sulfat, diacetil, acetaldehid i sl. Nakon glavnog vrenja pivo je izuzetno mutno zbog preostalog kvasca i koloida te ga je potrebno podvrgnuti filtraciji. Filtracija može zamijeniti proces pasterizacije, ovisno o izboru pivovare (Pavsler i Buiatti, 2009).

## 2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA PIVA

### 2.5.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija s „headspace“ tehnikom uzorkovanja je najprimjenjivija tehnika za odjeljivanje i kvantitativno određivanje hlapivih spojeva. Načelo razdvajanja spojeva korištenjem plinske kromatografije temelji se na interakcijama analita s mobilnom i stacionarnom fazom. Što je afinitet spoja za stacionarnu fazu, koji se nalazi u mobilnoj fazi slabiji, prije će se eluirati s kolone. Uzorak se uvodi u spremnik, grije se te održava na određenoj

temperaturi kako bi se ostvarila ravnoteža između tekuće i plinske faze. Nakon uspostavljanja ravnoteže, plin nosilac tj. mobilna faza odvodi plinsku fazu do kolone.

Mobilna faza je uvijek inertni plin, a najčešći plinovi nosioci su: helij, dušik i vodik. Prednost upotrebe helija je u tome što je kompatibilan s većinom detektora, a njegov nedostatak je visoka cijena. Dušik je kao i vodik jeftin, ali uporabom dušika kao mobilne faze produžava se vrijeme trajanja metode. Nedostatak vodika je njegova tendencija za adicijom na dvostruku vezu. Stacionarna faza je tekućina ili kruti adsorbens vezan na čvrsti nosač kemijskom vezom ili adsorpcijom (Skoog i sur., 1999).

Glavne komponente uređaja za plinsku kromatografiju su: injektor, kolona, detektor i termostat. Nakon što uređaj postigne željenu temperaturu te raspline uzorak, odnosno odvoji hlapive komponente od nehlapivih, počinje raspodjela hlapivih komponenti ovisno o njihovom afinitetu za kolonu. Za plinsku kromatografiju temperatura kolone je od presudne važnosti pa se iz tog razloga provodi termostatiranje kolone, a ono može biti izotermno i programirano. Kod izoternog termostatiranja temperatura kolone je konstantna tijekom cijelog procesa odjeljivanja. Smatra se da je temperatura u tom slučaju bliska prosječnom vrelištu uzorka. Ovdje treba voditi računa o komponentama uzorka i njihovim vrelištima jer postoji mogućnost da se neke frakcije koje nisu približnog vrelišta kao postavljena temperatura, ne eluiraju. Kod programiranog termostatiranja temperatura se povisuje kontinuirano kako napreduje separacija. Porastom temperature odjeljuju se manje hlapivi sastojci.

Detektori koji se koriste u plinskoj kromatografiji su: detektor toplinske vodljivosti, plameno-ionizacijski detektor te detektor apsorpcije elektrona. Najčešće korišten detektor je plameno-ionizacijski (FID) koji radi na principu pirolize. Uzorak se nakon izlaska iz kolone miješa sa smjesom zraka i vodika te se zapali. Na taj način se cijepa uzorak, a sabirna elektroda skuplja informacije te ih pretvara u električni signal. Odziv je proporcionalan broju ugljikovih atoma u plamenu (Rouessac i Rouessac, 2007).

### 2.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC analiza je u današnje vrijeme jedna od najčešćih metoda za identifikaciju, kvantifikaciju i pročišćavanje smjese spojeva. Načelo rada HPLC-a je identičan načelu ostalih kromatografskih metoda. Komponente smjese se raspodjeljuju između stacionarne i mobilne faze koje se međusobno ne miješaju. Različite komponente smjese pokazuju različit afinitet za stacionarnu fazu, ovisno o interakcijama s mobilnom fazom. Uspješnost razdvajanja kolone ovisi o broju teoretskih tavana i koeficijentu selektivnosti. Broj tavana karakterizira retencijsko

vrijeme i duljina osnovice trokuta kojeg čine tangente u točkama infleksije s obje strane pika produžene do osnovice kromatograma dok koeficijent selektivnosti karakterizira brzina gibanja analita.

Iako je tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti potrebna velika količina energije za rad kako bi se postigli visoki tlakovi, ona ima bitnih prednosti u usporedbi s konvencionalnim kromatografskim metodama. HPLC analize su automatizirane te na taj način štede energiju i vrijeme analitičaru, a metode su brze i precizne. Analiza je podložna različitim vrstama, a isto tako i velikom rasponu količina uzoraka. Detektirati se mogu tragovi uzorka čak i u nanogramskim količinama.

HPLC za svoj rad treba nekoliko uređaja, a to su: spremnici mobilne faze, pumpe, sustavi za unošenje uzoraka, predkolone, kolone, detektori te uređaju za snimanje i detekciju. Otapala koja se nalaze u spremnicima za čuvanje moraju biti profiltrirana na filterima kako bi se iz njih uklonili tragovi čestica. Pumpe koje se koriste u današnjim HPLC uređajima su: pneumatska, recipročna i ubrizgavajuća. Kolone mogu biti različite veličine, ovisno o namjeni i vrsti analize pa tako postoje mikrokolone, analitičke i preparativne kolone te predkolone koje služe prvenstveno kako bi se produžio vijek trajanja kolone. Detektorski sustav HPLC-a ovisi o prirodi uzorka stoga postoji nekoliko tipova, a to su: UV/VIS detektor-apsorpcijski detektor, fluorescencijski i detektor indeksa loma (Rouessac i Rouessac, 2007).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Za proizvodnju Indian Pale Ale (IPA), tamnog lagera piva „Grička vještica“ i čokoladnog stout piva „Fantom“ pivovare Medvedgrad korišten je pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

##### 3.1.2. Kemikalije i podloge

**Tablica 3.** Čistoća i podrijetlo kemikalija korištenih u eksperimentu za pripremu hranjivih podloga i otopina

<i>Kemikalija</i>	<i>Čistoća</i>	<i>Proizvođač</i>
<i>1-butanol</i>	p.a. 99,5%	Fisher Chemical, Velika Britanija
<i>ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</i>	p.a. 10%	Gram-Mol, Hrvatska
<i>etanol</i>	p.a. 100%	Gram-Mol, Hrvatska
<i>destilirana voda</i>		PBF, Hrvatska
<i>fosfatna kiselina</i>	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
<i>tehnički agar</i>	za upotrebu u biotehnologiji	Biolife, Italija

##### 3.1.3. Laboratorijska oprema

###### 3.1.3.1. Plinska kromatografija s „headspace“ sustavom

Sustav za plinsku kromatografiju sastoji se od dva uređaja: sustava za uzorkovanje Headspace Sampler 40XL (Perkin-Elmer, SAD) i plinskog kromatografa AutoSystem XL (Perkin-Elmer, SAD) koji se sastoji od uređaja za grijanje kolone, kolone (ZB-5MS, Zebron Phenomenex 60 m x i.d. 0,25 mm ID x 0,50 µm d<sub>r</sub>), FID detektora i računalnog programa (TotalChrome). Na slici 4 je prikazan uređaj korišten u ovom istraživanju.



**Slika 4.** Plinski kromatogram „Perkin Elmer Autosystem XL-GC“ (Perkin Elmer, SAD) uz pripadajući sustav za uzorkovanje „Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL“ (Perkin Elmer, SAD)

#### 3.1.3.2. *Visokoučinkovita tekućinska kromatografija*

Uređaj za HPLC analizu u eksperimentu se koristio za određivanje koncentracije fermentabilnih šećera: maltoze, maltotrioze i glukoze, te etanola i glicerola. Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Kyoto, Japan) sastoji se od: pumpe (LC-10AD<sub>vp</sub>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sub>vp</sub>), otplinjača (DGU-14A), automatskog uređaja za uzorkovanje i injektora (SIL-10AD<sub>vp</sub>), predkolone (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; ; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A<sub>vp</sub>) i računalnog programa (CLASS-VP v6.10).

#### 3.1.3.3. *Ostala oprema*

- Centrifuga SL-8R, ThermoFisher scientific, Njemačka
- Centrifuga, Tehnica železniki, Slovenija
- Digitalna analitička vaga, ALC210.4, Acculab, Engleska
- Tehnička vaga ET 1111, Tehnica železniki, Slovenija
- Sušionik ST-06, Instrumentaria, Hrvatska

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Analitičke metode

#### 3.2.1.1. Uzorkovanje

Uzorci piva Medvedgrad pivovare, lager „Grička vještica“, Indian Pale Ale „Fakin IPA“ i čokoladnog stout-a „Fantom“, izuzimani su tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva. Uzorkovanje svake vrste piva počinjalo je drugog dana nakon naciepljivanja kvasca te su uzorci izuzimani kroz 12-14 dana tijekom glavnog vrenja, a za vrijeme odležavanja svakih pet dana.

Uzorci su izuzimani putem ispusne slavine na tanku u sterilne plastične posude od 100 mL te 50 mL, a za sterilizaciju slavine prije i poslije izuzimanja uzoraka korišten je plamen. Na slici 5 prikazan je jedan od fermentora pivovare Medvedgrad.



**Slika 5.** Fermentacijski tank pivovare Medvedgrad

#### 3.2.1.2. *Ekstrakt*

Tijek glavnog vrenja se u fermentoru pratio mjerenjem ekstrakta odnosno specifične gustoće areometrom.

#### 3.2.1.3. *Temperatura, tlak i pH*

Tijekom glavnog i naknadnog vrenja, parametri pH, temperatura i tlak su bili konstantni, ovisno o uvjetima proizvodnje određene vrste piva.

#### 3.2.1.4. *Praćenje mase biomase tijekom procesa*

Tijekom glavnog i naknadnog vrenja praćene su promjene suhe tvari biomase u izuzetim uzorcima piva. Volumen uzorka piva od 10 mL, otpipetiran je u dvije, odnosno četiri prethodno osušene i izvagane kivete s konusnim dnom, te su uzorci centrifugirani (5500 g, 15 min, 4°C, SL-8R, ThermoFisher scientific, Njemačka). Nakon centrifugiranja, supernatant je odkantiran i spremljen za analizu. Biomasa stanica kvasca stavljena je na sušenje na 100°C do konstantne mase koja je određena nakon nekoliko dana.

#### 3.2.1.5. *Praćenje promjene broja stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva*

Na prethodno pripremljene podloge sladnog agara nacijepljeno je treće, četvrto i peto razrjeđenje u količini od 0,1 mL, te su Petrijeve zdjelice s uzorcima kvasca inkubirane kroz 5 dana na 28°C.

#### 3.2.1.6. *Određivanje hlapivih komponenti piva donjeg i gornjeg vrenja plinskom kromatografijom s „headspace“ sustavom*

Prethodno pripremljeni supernatanti uzoraka piva, profiltrirani su kroz mikrofiltre promjera pora 0,22 µm (Labware, Lab Logistic Group, GmbH, Meckenheim, SAD). Volumen od 10 mL supernatanta izdvojen je u pripadajuću vialu plinskog kromatograma. Supernatantu je dodan 1 µL internog standarda (1-butanol) te je sadržaj viala dobro izmiješan.

Analiza lakohlapivih spojeva uzoraka piva (esteri, aldehidi i viši alkoholi) provedena je na plinskom kromatogramu „Perkin Elmer Autosystem XL-GC“ (Perkin Elmer, SAD) uz pripadajući sustav za uzimanje uzoraka „Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL“ (Perkin Elmer, SAD). Uzorkovanje headspace sustavom je provedeno pri sljedećim uvjetima: izotermalni program s temperaturnom granice od 60°C - 325/350°C, vrijeme tremostatiranja uzorka od 20 minuta, vrijeme tlačenja plina nosioca od 0,2 min, vrijeme ubrizgavanja uzorka od 0,05 min te izvlačenje igle iz uzorka od 0,1 min, temperatura pećnice bila je 80°C, temperatura igle za uzimanje uzorka 100°C te prijenosna linija (*engl. transfer line*) 110°C. Tlak plina nosioca iznosio je 172369 Pa.

Uvjeti analize lakohlapivih komponenti piva gornjeg i donjeg vrenja na plinskom kromatogramu „Perkin Elmer Autosystem XL-GC“ (Perkin Elmer, SAD) su bili: temperatura ubrizgavanja od 110°C, temperatura detektora od 250°C, a uvjeti pećnice bili su: 35°C, 5 min; 10°C/min →60°C; 60°C, 2 min; 10°C/min, 180°C; 180°C, 7 min. Kolona korištena u eksperimentu je ZB-5MS (Zebron Phenomenex), 60m x 0,25 mm i.d. x 50 µm df. Računalna obrada podataka provedena je uz korištenje računalnog programa „TotalChrome“.

Retencijska vremena određenih lakohlapivih spojeva piva navedena su u tablici 4.



**Tablica 4.** Retencijska vremena lakohlapivih spojeva piva gornjeg i donjeg vrenja

<i>SPOJ</i>	<i>t<sub>R</sub>/min</i>
<i>acetaldehid</i>	4,14
<i>propan-1-ol</i>	6,37
<i>butan-2-ol</i>	7,46
<i>etil-acetat</i>	7,71
<i>2-metil-propan-1-ol</i>	8,23
<i>N-butanol (IS)</i>	9,51
<i>3-metil-butan-1-ol</i>	12,26
<i>2-metil-butan-1-ol</i>	12,43
<i>etil-butirat</i>	14,49
<i>izoamil-acetat</i>	16,80
<i>etil-heksanoat</i>	19,95
<i>etil-oktanoat</i>	24,25
<i>2-feniletilacetat</i>	26,11

#### 3.2.1.7. *Određivanje sastojaka piva nastalih tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (HPLC)*

Prethodno pripremljen supernatant uzoraka piva dodatno je profiltriran kroz mikrofilter pora 0,22 µL. Volumen od 750 µL profiltriranog uzorka otpipetiran je u plastičnu kivetu, a uzorku je dodana otopina cinkovog sulfata heptahidrata u omjeru 1:1 ( $\gamma = 100$  g/L). Otopina je intenzivno miješana na vortex-u tijekom 20 sekundi, te je nakon 15 minuta izložena djelovanju centrifugalne sile (10000 g, 10 min; Tehnica železniki, Slovenija) kako bi se izdvojili proteini. Supernatant je razrijeđen u omjeru 1:4 s redestiliranom vodom te je ponovno profiltriran kroz mikrofiltere veličine pora 0,22 µm.

Za identifikaciju i kvantifikaciju produkata metabolizma kvasca korišten je sustav uređaja visokotekućinske kromatografije naveden u poglavlju 3.1.3. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. U sustav je injektirano 20 µL uzorka, a protok mobilne faze bio je 0,5 mL/min. Temperatura ionsko-

izmjenjivačke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm i.d., 9µm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9µm) je iznosila 55°C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma dok je obrada rezultata kromatografskom analizom napravljena pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). U tablici 5 prikazana su pripadajuća retencijska vremena analiziranih spojeva te baždarni pravci.

**Tablica 5.** Jednadžbe baždarnih pravaca spojeva određenih metodom i pripadajuća retencijska vremena

<i>SPOJ</i>	<i>JEDNADŽBA</i>	<i>R<sup>2</sup> (-)</i>	<i>t<sub>R</sub> (min)</i>
<i>maltotrioza</i>	Area= 291744 $\gamma_{\text{maltotrioza}}$ + 156198	0,9928	9,811 ± 0,001
<i>maltoza</i>	Area= 329026 $\gamma_{\text{maltoza}}$ + 31658	0,9996	10,883 ± 0,001
<i>glukoza</i>	Area= 383917 $\gamma_{\text{glukoza}}$ + 25027	0,9997	12,905 ± 0,001
<i>fruktoza</i>	Area= 393832 $\gamma_{\text{fruktoza}}$ + 37704	0,9996	13,860 ± 0,001
<i>glicerol</i>	Area= 153046 $\gamma_{\text{glicerol}}$ + 6018,9	0,9999	18,093 ± 0,001
<i>etanol</i>	Area= 172195 $\gamma_{\text{etanol}}$ + 7098	0,9999	27,782 ± 0,001

\**t<sub>R</sub>* izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; A, površina

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu praćeni su parametri kakvoće proizvodnje tri vrste piva (Indian Pale Ale „Fakin IPA“, ćokoladnog stout-a „Fantom“ i tamnog lagera „Grićka vještica“) pivovare Medvedgrad tijekom glavnog i naknadnog vrenja. U navedenim pivima tijekom glavnog vrenja i odležavanja određivana je potrošnja ugljikohidrata (glukoza, fruktoza, matotrioza i maltoza), proizvodnja glicerola i etanola, te promjena koncentracije hlapivih spojeva (viši alkoholi, esteri i acetaldehid).

Rezultati su podijeljeni u 3 poglavlja:

Poglavlje 4.1. Parametri kakvoće Indian Pale Ale piva „Fakin IPA“

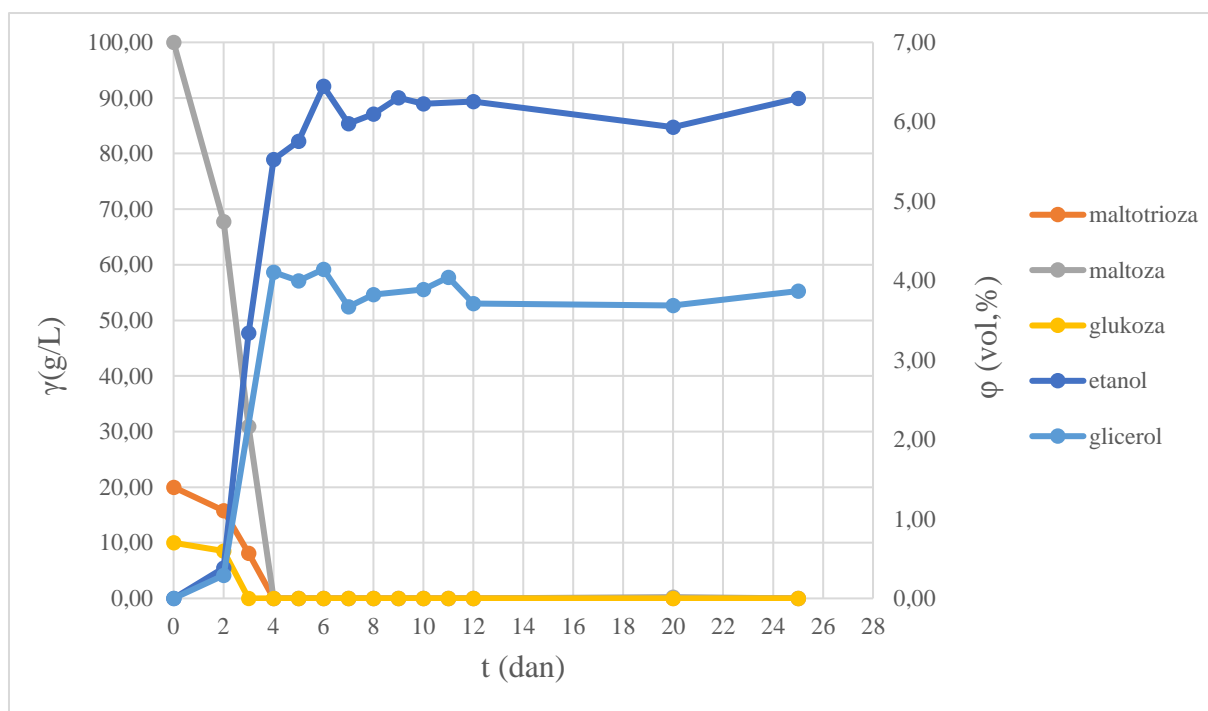
Poglavlje 4.2. Parametri kakvoće ćokoladnog stout piva „Fantom“

Poglavlje 4.3. Parametri kakvoće tamnog piva donjeg vrenja „Grićka vještica“

#### 4.1. PARAMETRI KAKVOĆE INDIAN PALE ALE-A „FAKIN IPA“

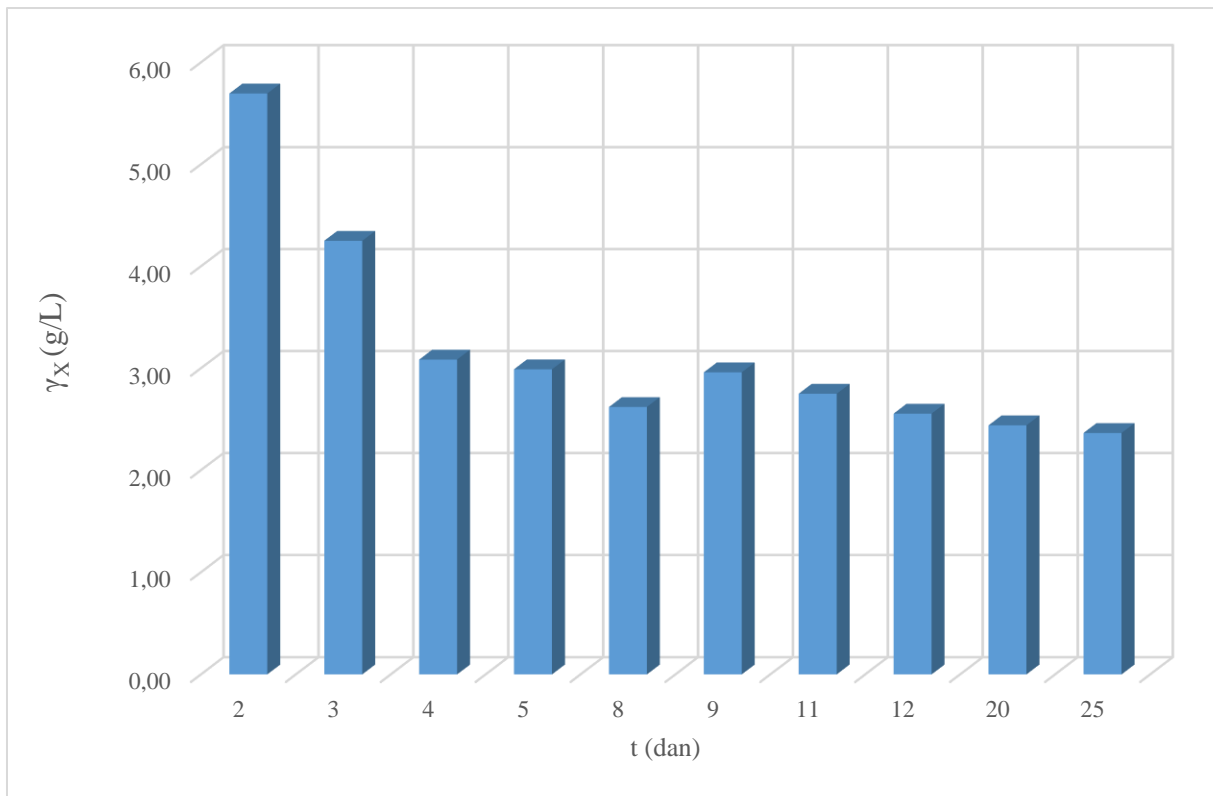
Pivo „Fakin Ipa“ pivovare Medvedgrad je trosladni svijetli ale proizveden s tri vrste hmelja. Prema masenom udjelu ekstrakta spada u specijalna piva s 15% istog u osnovnoj sladovini. Proizvodnja piva je provedena kroz 5 glavnih koraka, a to su: (1) enzimska hidroliza koja je potaknuta miješanjem sladne prekrupe i neslađenih žitarica uz dodatak tople vode, (2) izdvajanje sladovine iz ošećerene komine, (3) kuhanje ohmeljne sladovine, (4) izdvajanje toplog taloga i (5) hlađenje na početnu temperaturu vrenja. Glavno vrenje piva završava na 25°C, a nakon izdvajanja kvasca odležavanje se odvija pri 20°C. Veća količina ekstrakta rezultira naposljetku i većom količinom alkohola na kraju vrenja, točno u ovom slučaju dosegla je vrijednost od 6,294 vol%, što se može vidjeti iz slike 6, a odgovara literaturnim podacima za Indian Pale Ale piva i kreće se od 4,6-6,2 vol% (Buiatti, 2009). Početna koncentracija fermentabilnih šećera u sladovini bila je redom: maltotrioza 20 g/L, maltoza 100 g/L i glukoza 10 g/L. Rezultati HPLC analize pokazali su da je koncentracija analiziranih fermentabilnih šećera nakon 2 dana glavnog vrenja procesa bila: 15,775 g/L maltoze, 67,747 g/L maltotrioze i 8,508 g/L glukoze. Stewart i sur. (2009) odredili su da se koncentracije ugljikohidrata u sladovini tijekom prvih nekoliko dana fermentacije kreću u rasponu od 15-20 g/L za maltotriozu, od 50-60 g/L za maltozu, i 10-15 g/L za glukozu

Iz Slike 6 je vidljiva jaka fermentacijska aktivnost kvasca koji je već nakon dva dana potrošio glukozu, dok su maltoza i maltotrioza očekivano i dalje prisutne. Nakon što je koncentracija glukoze već nakon drugog dana s 10 g/L pala na nulu, kvasac je progresivno počeo trošiti maltozu i maltotriozu. Koncentracije maltoze i maltotrioze su nakon trećeg dana fermentacije pale za više od pola od početne koncentracije (s 100 g/L na 30,90 g/L maltoze i s 20 g/L na 8,10 g/L maltotrioze), dok su nakon četvrtog dana bile potpuno potrošene (0 g/L). Rezultati su dokazali teorijsku podlogu potrošnje supstrata gdje kvasac primarno troši monosaharide, zatim disaharide i trisaharide (Novak i Marić, 1995). Koncentracija glicerola je porasla od početka fermentacije na 3,87 g/L, što je pokazatelj da kvasac ima veću tendenciju stvaranja glicerola jer je u literaturi zabilježena koncentracija glicerola u Pale Ale-u od 1,23 g/L (Castellari i sur., 2001). Nakon glavnog vrenja koncentracije glicerola i etanola su poprimile približno konstantnu vrijednost što je posljedica potrošenih fermentabilnih šećera, a kvasac ne može previrati dekstrine koji zaostaju u sladovini (Marić, 2009).

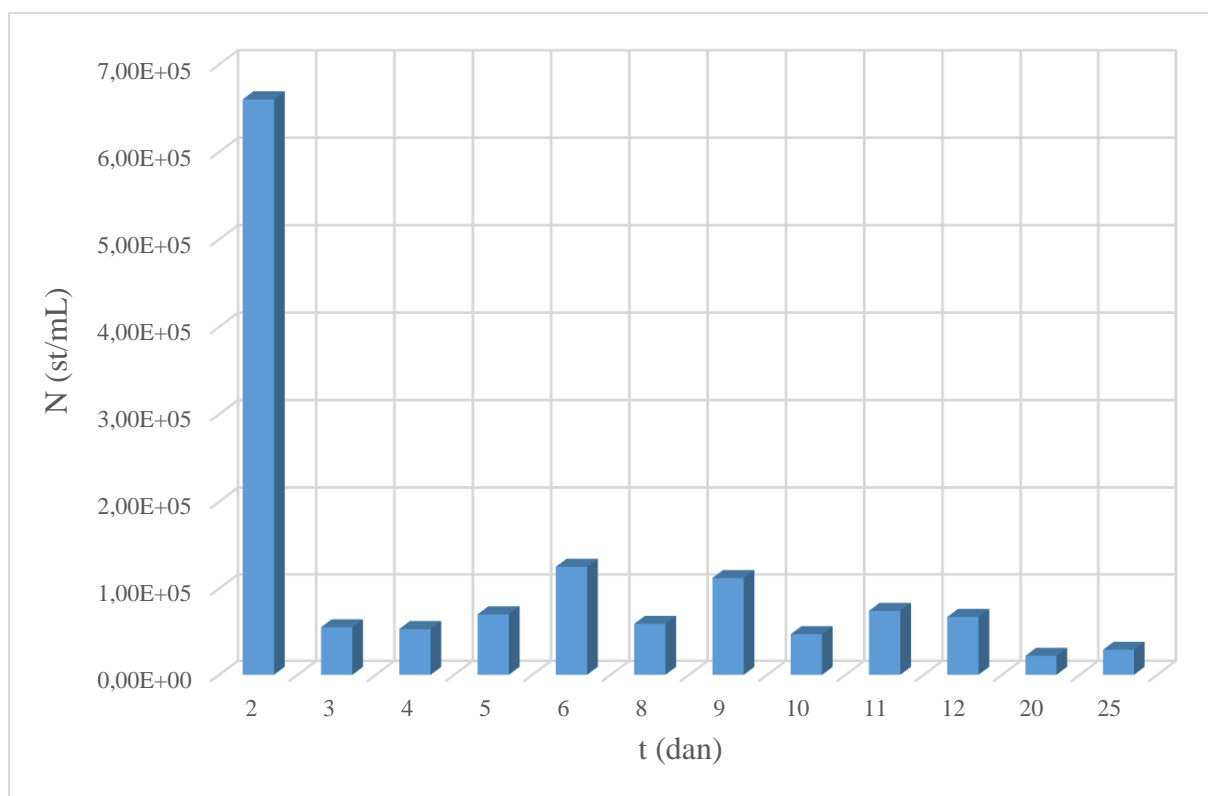


**Slika 6.** Promjena koncentracije različitih sastojaka piva tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Fakin IPA“

Promjena koncentracije suhe tvari biomase prikazana je na slici 7, a na slici 8 prikazana je promjena broja živih stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva. Nakon 4 dana glavnog vrenja određen je značajniji pad u koncentracije biomase ( $\gamma_{X, 2 \text{ dana}} = 5,70 \text{ g/L}$ ,  $\gamma_{X, 4 \text{ dana}} = 3,09 \text{ g/L}$ ) odnosno broja živih stanica kvasca ( $N_{2 \text{ dana}} = 6,6 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$ ,  $N_{4 \text{ dana}} = 5,5 \cdot 10^4 \text{ cfu/mL}$ ). Pad broja stanica nakon 2 dana podudara se s iscrpljivanjem fermentabilnih ugljikohidrata iz podloge (Slika 6). Uzorci za određivanje koncentracije biomase i broja stanica izuzimani su iz slavine smještene na bioreaktoru iznad konusnog dijela bioreaktora. Usporednim praćenjem rasta stanica kvasca na hranjivoj podlozi te određivanjem suhe tvari biomase dobiven je očekivani pad koncentracije biomase i broja stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja.



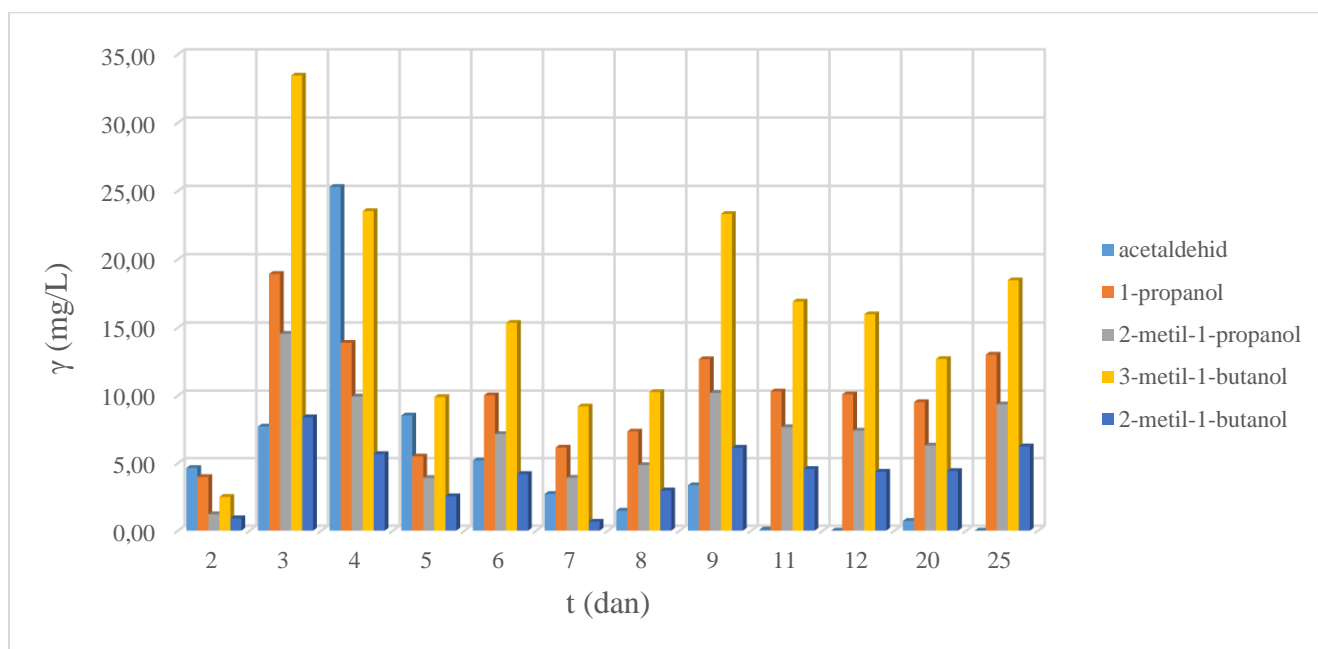
**Slika 7.** Promjena koncentracije suhe tvari biomase kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Fakin IPA“ o vremenu



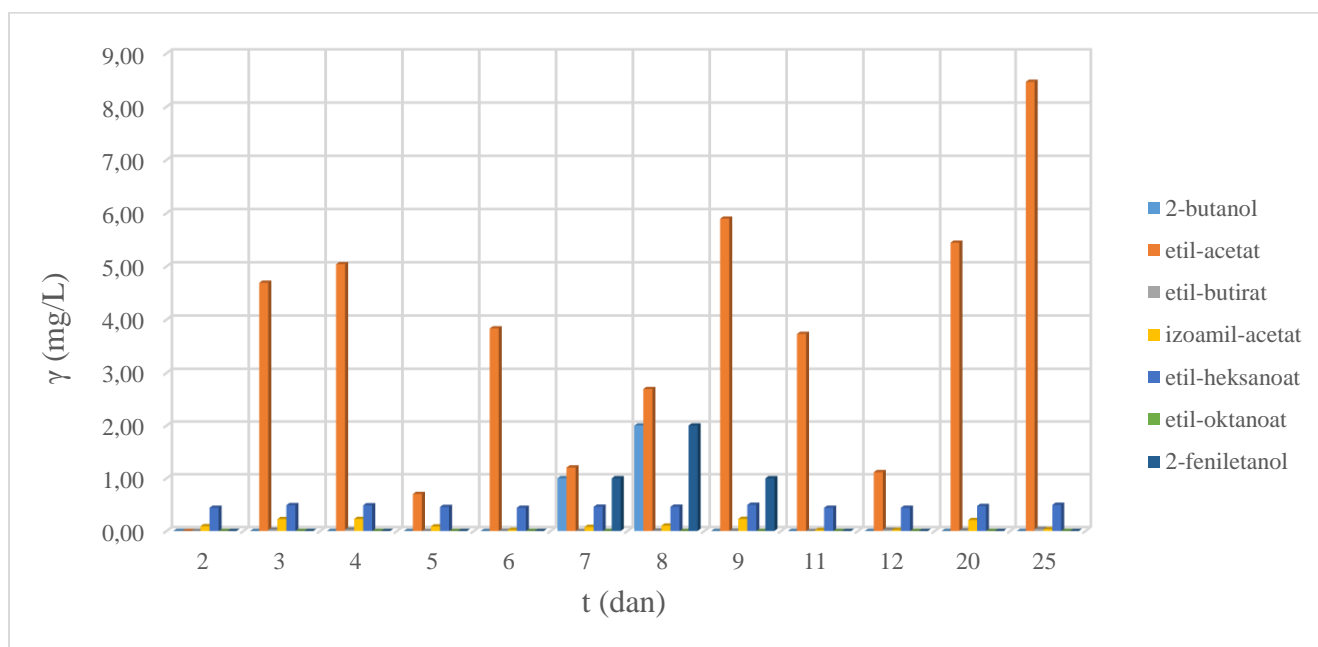
**Slika 8.** Promjena brojčane koncentracije stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Fakin IPA“

Tijekom glavnog vrenja koncentracija acetaldehida očekivano raste u ovom slučaju s 4,64 mg/L-25,29 mg/L nakon čega počinje padati u procesu odležavanja postepeno se razgrađuje, što je rezultat dozrijevanja piva (Marić, 2009). Koncentracije estera u odležanom pivu kreću se od početka do kraja procesa u sljedećem rasponu: 0 mg/L-8,46 mg/L etil acetata, 0 mg/L- 0,03 mg/L izoamil acetata, 0 mg/L- 0,03 mg/L etil butirata i 0,44 mg/L- 0,49 mg/L etil heksanoata dok koncentracija etil oktanoata nije zabilježena tijekom glavnog i naknadnog vrenja. Buiatti (2009) je u svom radu određivao koncentracije određenih estera, a rasponi koncentracija su sljedeći: etil acetat od 10 mg/l- 60 mg/L, izoamil acetat od 0,5 mg/L- 5,0 mg/L, etil heksanoat od 0,1 mg/L-0,5 mg/L i etil oktanoat od 0,1 mg/L-1,5 mg/L. Uspoređujući rezultate vidljiva su mala odstupanja, što se objašnjava razlikama u provođenju analize te u postupku uzorkovanja. Zabilježene koncentracije viših alkohola na početku i kraju procesa, 1-propanola, 2-butanola, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola, 2-metil-1-butanola i 2-feniletanola su redom: 3,96 mg/L- 13,01 mg/L, 0 mg/L tijekom cijele proizvodnje, 1,21 mg/L- 9,34 mg/L, 2,50 mg/L- 18,45 mg/L, 0,92 mg/L- 6,24 mg/L i 0 mg/L tijekom glavnog vrenja i odležavanja piva. Vidljivo je da 2-butanol nije detektiran. Ovaj spoj je pokazatelj kontaminacije piva bakterijama iz roda *Lactobacillus* (Ghiaci i sur., 2014). Kretanje koncentracija navedenih spojeva prikazane su na

slikama 9 i 10. Marić (2009) navodi da standardna piva koja se piju u našim krajevima imaju ukupni udio viših alkohola niži od 60 mg/L, što je slučaj i u ovom istraživanju.



**Slika 9.** Promjena koncentracija acetaldehida, 1-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanol i 2-metil-1-butanol tijekom glavnog i naknadnog vrenja



**Slika 10.** Promjena koncentracije 2-butanola, etil acetata, etil-butarata, izoamil-acetata, etil-heksanoata, etil-oktanoata i 2-feniletanola tijekom glavnog i naknadnog vrenja

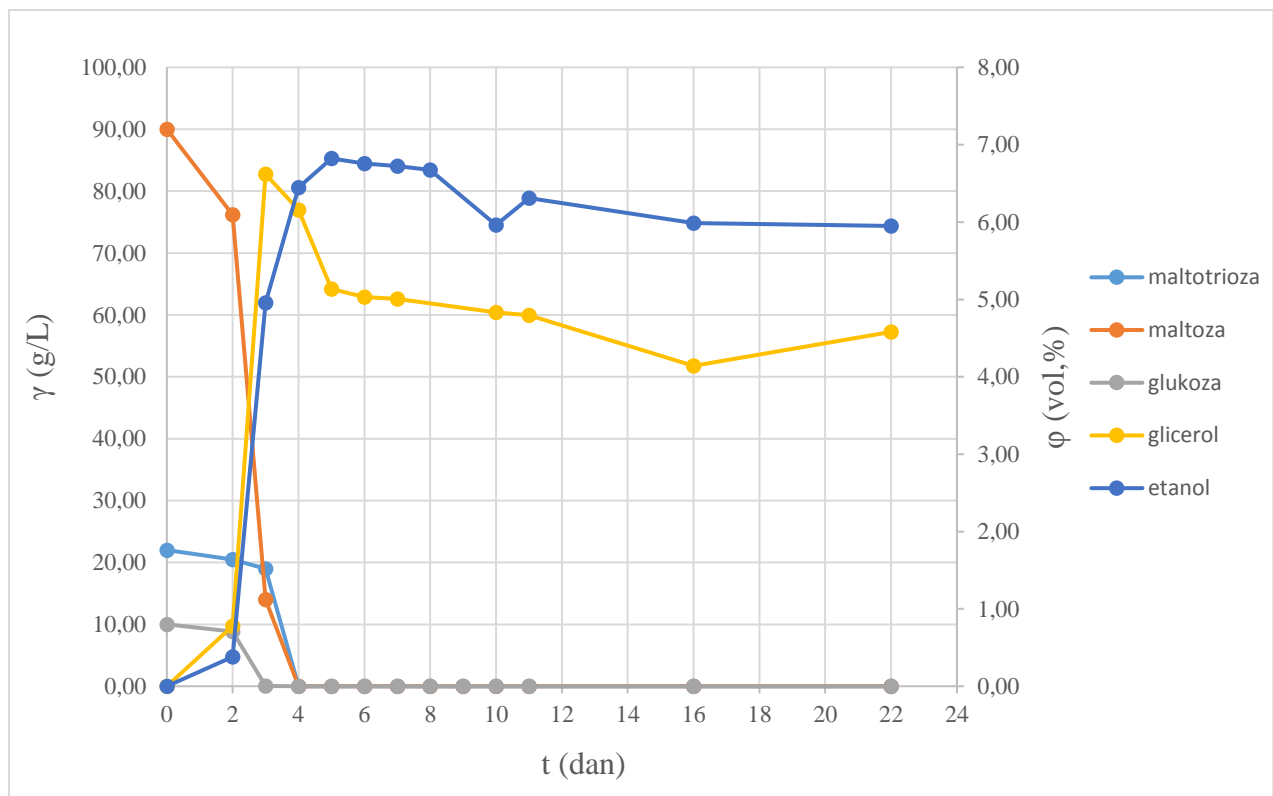


Senzorski gledano, Fakin IPU karakteriziraju jake i bogate arome, prije svega se mogu osjetiti citrusne, cvjetne i voćne arome isprepletene sa sladnim aromama poput kruha, lješnjaka, karamele i žitarica. Ove arome su rezultat ukomljavanja 3 vrste slada te dodatak više vrsta hmelja što naposljetku dovodi do razvoja specifičnih okusa IPA-e. Na IBU (*engl.* International Bitterness Unit scale) Medvedgradova IPA zauzima visoko mjesto, sa 70 IBU (Anonymus 3, 2018), dok se u literaturi navodi da se općenito IPA kreće u rangu 40-60+ IBU jedinica (Pavslar i Buiatti, 2009). Ovaj podatak dovodi do zaključka da hmelj koji je korišten u proizvodnji posjeduje visok udio gorkih kiselina (posebno  $\alpha$ -kiselina) koje su ispuštene u konačni proizvod.

#### 4.2. PARAMETRI KAKVOĆE ČOKOLADNOG STOUT PIVA „FANTOM“

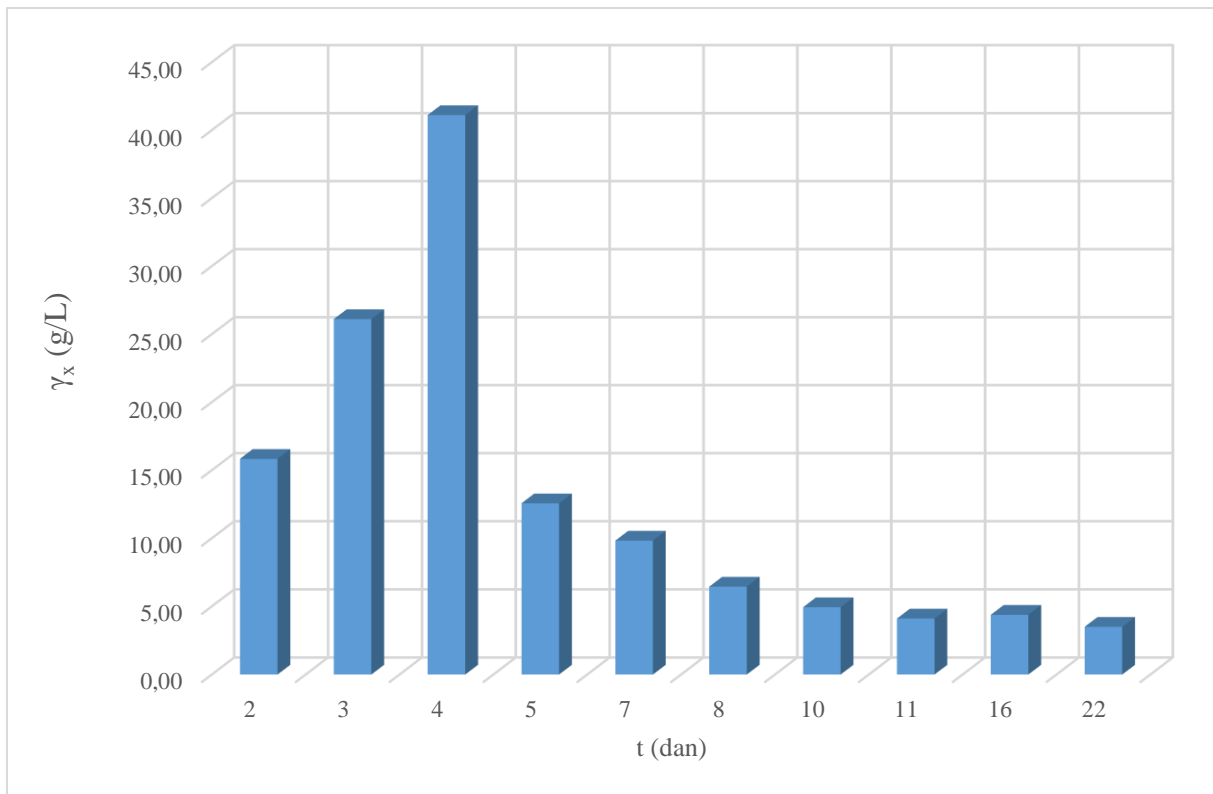
Čokoladni stout pivovare Medvedgrad „Fantom“ s 14% ekstrakta u osnovnoj sladovini pripada specijalnim pivima. Udio alkohola kreće se oko 6 vol%, a osim baznog slada u pivu dominira i čokoladni slad uz dodatke prženog ječma, dva karamelna slada i „Special B“ (IREKS aroma d.o.o.) slada. Kombinacija hmeljeva u pivu je „Syrian Golding“ i „East Kent Godling“. Ovaj spoj sastojaka naposljetku rezultira mješavinom različitih okusa gdje se mogu osjetiti note kave, kakaovca, prženog slada te slatkaste arome koje naposljetku završavaju blagom gorčinom.

Rezultati HPLC analize pokazali su da je koncentracija glukoze s početnih 10 g/L nakon drugog dana pala gotovo na 0 g/L. Također je koncentracija maltotrioze s početnih 22 g/L nakon trećeg dana smanjena na 0 g/L. Maltoza s početnih 90 g/L kao i maltotrioza potpuno su se utrošile nakon trećeg dana što je očekivano i u skladu s teorijom (Marić, 2009 i Stewart, 2009). Na slici 11 se jasno vidi izražen pad koncentracije maltotrioze nakon drugog dana, kao i nagli porast koncentracije glicerola i etanola. Koncentracija etanola je u proizvodnji dosegla 5,94 vol % što se također slaže s literaturnim podacima za ovu vrstu piva koji se kreću u rangu od 4 vol%-6 vol% (Pavslar i Buiatti, 2009).

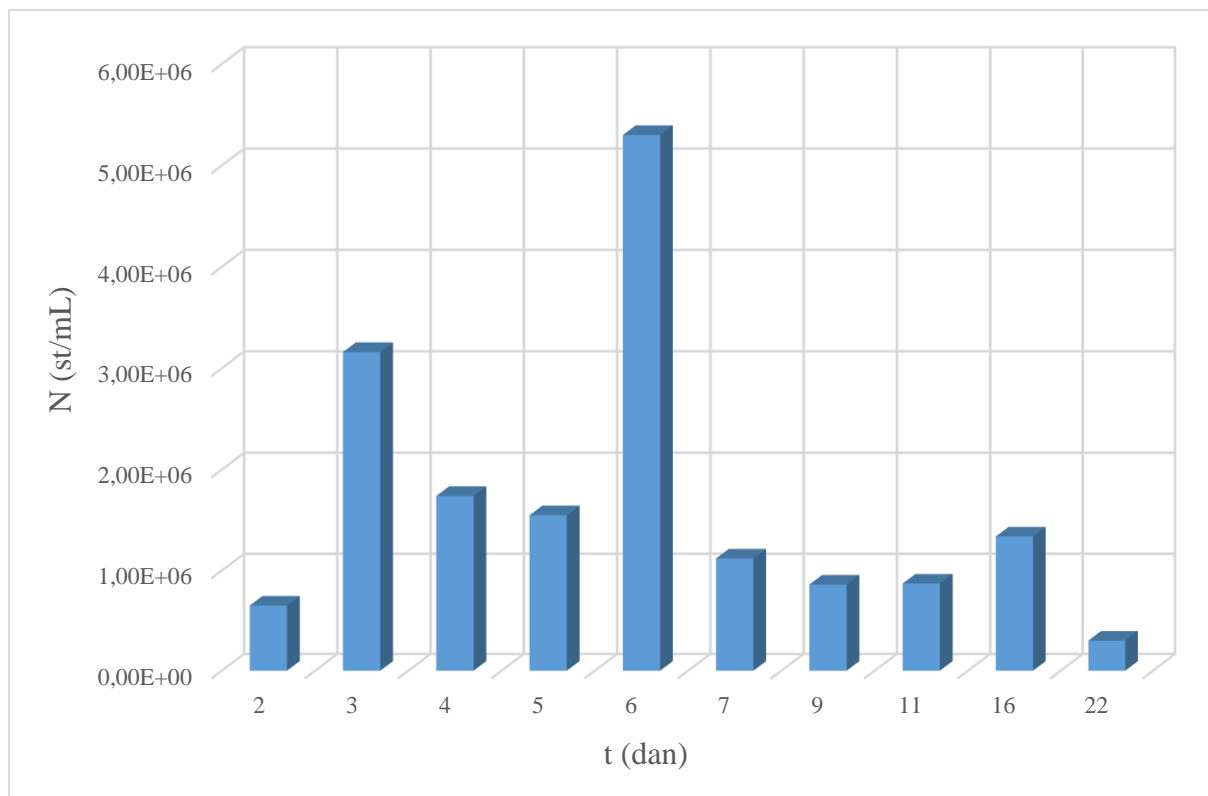


**Slika 11.** Promjene koncentracije različitih sastojaka piva tijekom glavnog i naknadnog vrenja čokoladnog stout piva „Fantom“

Praćenjem brojčane koncentracije stanica kvasca i koncentracije suhe tvari biomase tijekom glavnog i naknadnog vrenja dobiveni su rezultati koji se mogu koristiti za usporedbu potrošnje supstrata i rasta kvasca ovog bioprocasa. Iz slika 12 i 13 jasno se vidi pad koncentracije četvrtog dana suhe tvari biomase kvasca nakon naglog rasta do trećeg dana ( $\gamma_{x, 3 \text{ dana}} = 41,111 \text{ g/L}$ ,  $\gamma_{x, 4 \text{ dana}} = 12,567 \text{ g/L}$ ) odnosno broja živih stanica kvasca ( $N_{3 \text{ dana}} = 1,74 \cdot 10^6 \text{ st/mL}$ ,  $N_{4 \text{ dana}} = 1,55 \cdot 10^6 \text{ st/mL}$ ). Krajnja koncentracija suhe tvari biomase kvasca iznosila je  $3,50 \text{ g/L}$ , a broj stanica  $3,00 \cdot 10^6 \text{ st/mL}$ . Uzorci za određivanje koncentracije suhe tvari biomase i broja stanica kvasca izuzimani su iz slavine smještene na fermentoru iznad konusnog dijela fermentora. Dobiven je očekivani pad koncentracije suhe tvari biomase kvasca i broja stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja.



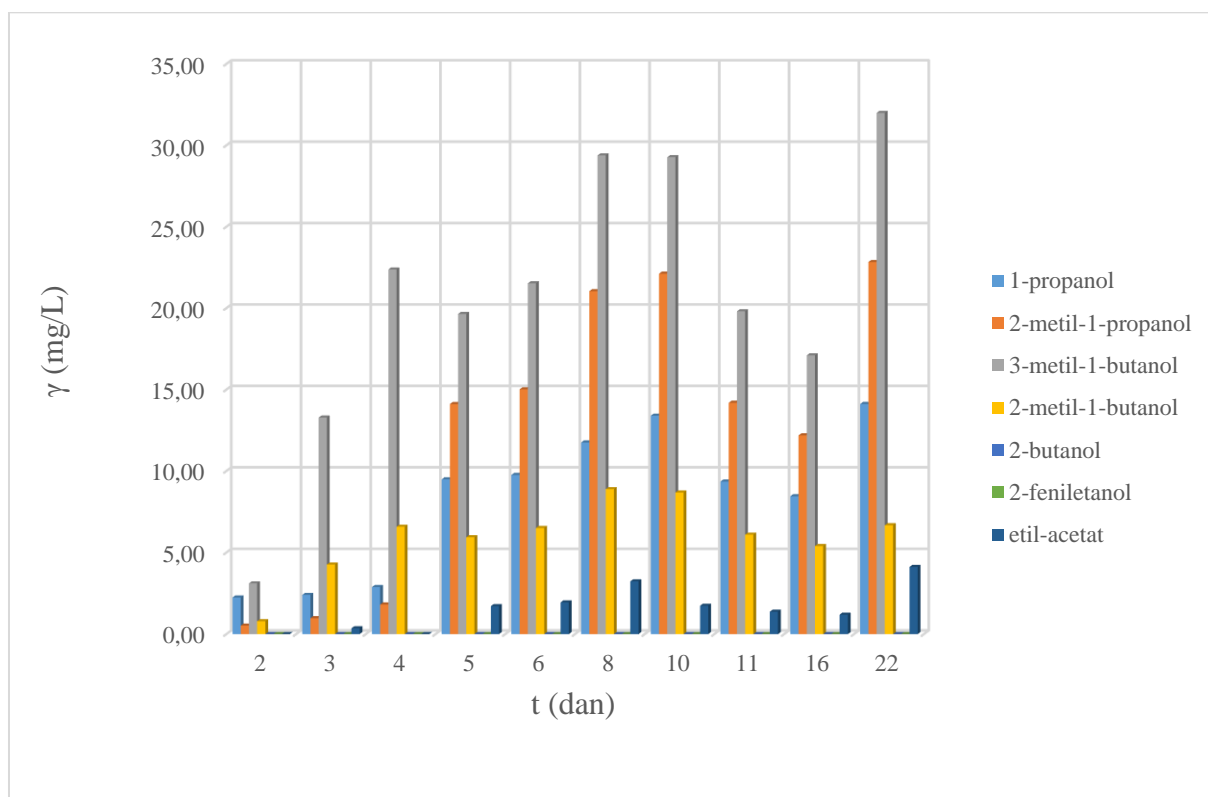
**Slika 12.** Promjena koncentracije suhe tvari biomase kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja čokoladnog stout piva „Fantom“



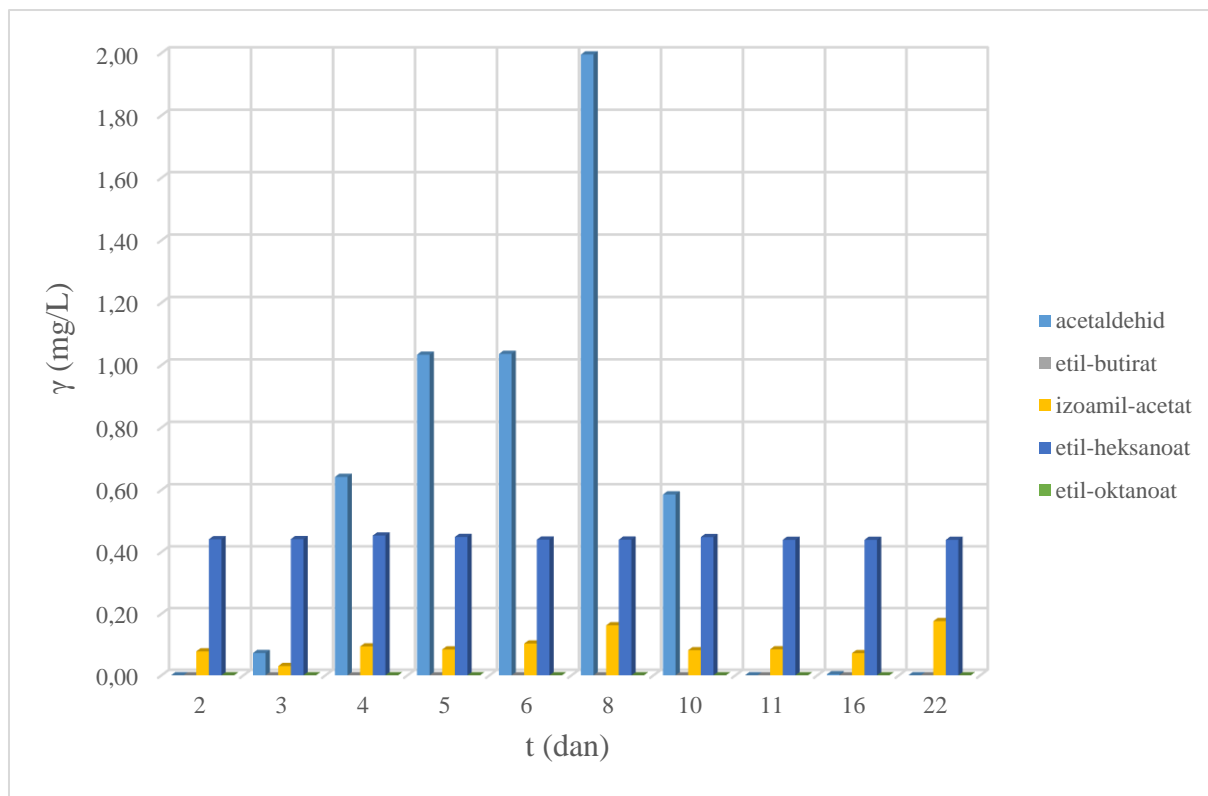
**Slika 13.** Promjena broja stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja čokoladnog stout piva „Fantom“

Na temelju GC analize određena je koncentracija lakohlapivih spojeva, estera, viših alkohola i acetaldehida. Koncentracija acetaldehida tijekom cijele proizvodnje je niska, a najviša je osmog dana, tj. na kraju glavnog vrenja i iznosi 1,99 mg/L. Na kraju odležavanja koncentracija acetaldehida je 0 mg/L što je pokazatelj da je pivo odležano te se sav acetaldehid preveo u etanol, a slaže se s literaturom u kojoj se navodi da je poželjna što niža koncentracija acetaldehida u gotovom pivu (Briggs i sur., 2004). Mala koncentracija acetaldehida tijekom proizvodnje ukazuje na visoku sposobnost oksidacije kvaščeve alkohol dehidrogenaze. Konačne koncentracije viših alkohola detektirane u gotovom pivu su: 14,114 mg/L 1-propanola, 22,83 mg/L 2-metil-propanola, 31,98 mg/L 3-metil-1-butanola, 6,67 mg/L 2-metil-1-butanola, dok koncentracije 2-feniletanola i 2-butanola nisu detektirane. U radu Briggsa i sur. (2004) navedene su koncentracije sljedećih viših alkohola u stoutu: 13-60 mg/L 1-propanola, 11-98 mg/L 2-metil-1-propanola, 9-41 mg/L 2-metil-1-butanola i 33-169 3-metil-1-propanola. Koncentracije estera od početka glavnog vrenja do kraja odležavanja bile se: 0-4,11 mg/L etil-acetata, 0,07-0,17 mg/L izoamil-acetata, 0,44-0,43 mg/L etil-heksanoata, dok koncentracije etil-oktanoata i etil-butirata nisu zabilježene. Briggs i sur. (2004) zabilježili su koncentraciju

etil acetata u stoutu od 11-69 mg/L, a koncentraciju izoamil acetata u rangu od 1,0-4,9 mg/L. Rezultati GC analize chocolate stouta „Fantom“ prikazani su i na slikama 14 i 15.



**Slika 14.** Promjena koncentracije 1-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola, 2-metil-1-butanola, 2-butanola, 2-feniletanola i etil-acetata tijekom glavnog i naknadnog vrenja čokoladnog stout piva „Fantom“



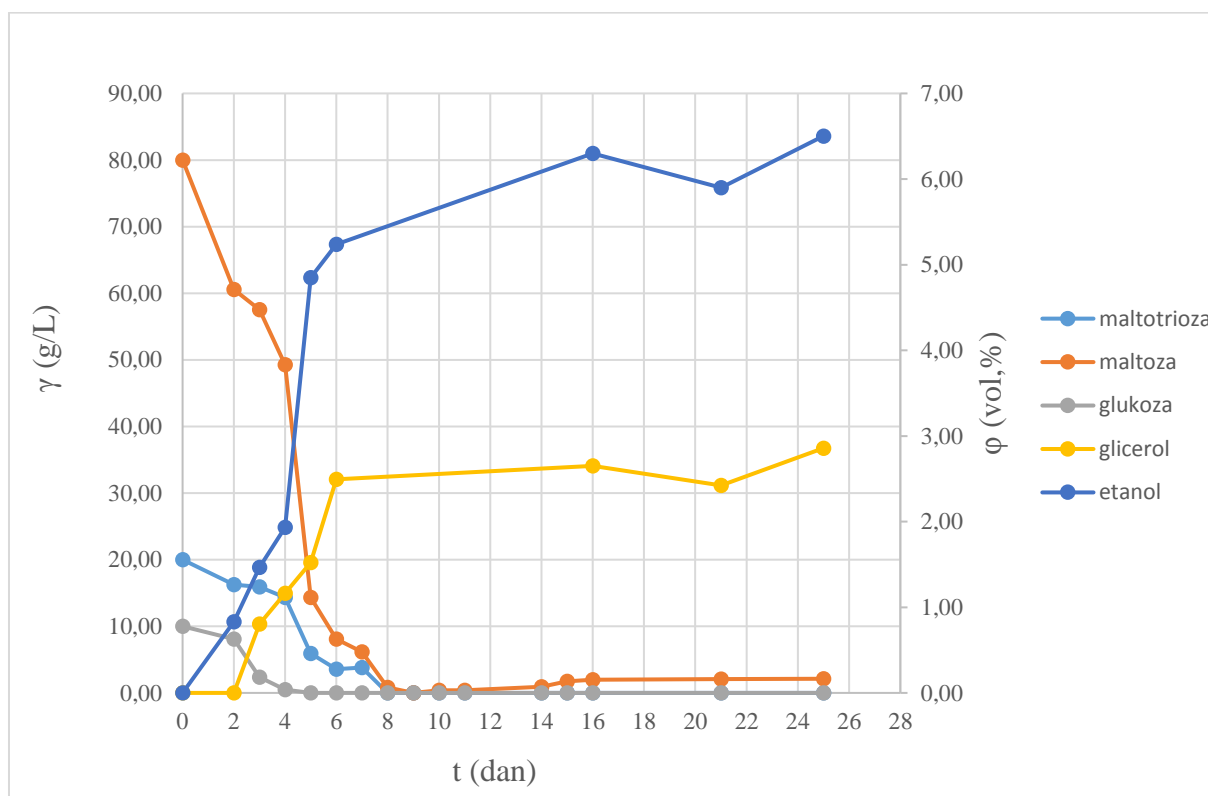
**Slika 15.** Promjena koncentracije acetaldehida i estera tijekom glavnog i naknadnog vrenja čokoladnog stout piva „Fantom“

Kao i Indian Pale ale, stout je vrsta piva proizvedena s kvascem gornjeg vrenja. Dobiveni rezultati ukazuju na određene razlike između ovih vrsta piva. Vidljivo je da stout pivo ima pretežno veće koncentracije viših alkohola od Indian Pale ale-a, dok je s esterima obrnuta situacija. Razlog tomu su razlike u sastojcima koji se koriste za proizvodnju ovih vrsta piva, kao i uvjeti proizvodnje piva.

#### 4.3. PARAMETRI KAKVOĆE TAMNOG PIVA DONJEG VRENJA (LAGER) „GRIČKA VJEŠTICA“

„Grička vještica“ pivovare Medvedgrad spada u skupinu jakih tamnih piva donjeg vrenja. S 13% ekstrakta u osnovnoj sladovini, kao i prethodno spomenuti IPA i stout, može se svrstati u skupinu specijalnih piva koja sadrže više neprevrelog ekstrakta, što im daje konačnu punoću okusa, izraženu gorčinu i aromu po hmelju. Rezultati HPLC analize pokazuju da su svi fermentabilni šećeri potpuno utrošeni na kraju procesa odležavanja što je u skladu s literaturom (Briggs i sur., 2004). Početne koncentracije maltotrioze (20 g/L), maltoze (80 g/L) i glukoze

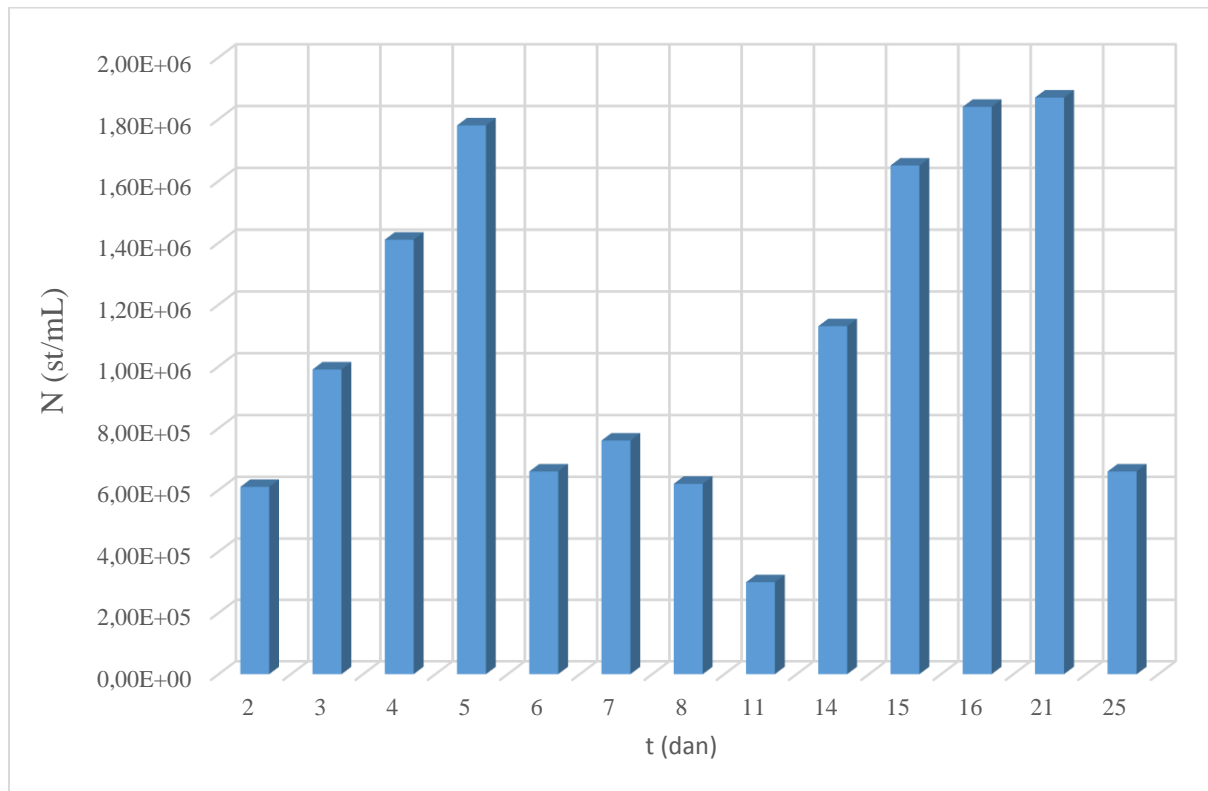
(10 g/L), pretežno se slažu s koncentracijama navedenima u radu Briggsa i sur. (2009) koji su odredili da su koncentracije prvih dana glavnog vrenja u sladovini piva donjeg vrenja: maltotrioza 17,7 g/L, maltoze 60 g/L i glukoze 10,3 g/L. Promjene koncentracija fermentabilnih šećera tijekom proizvodnje vidljive su na slici 16. Volumni postotak etanola na kraju procesa odležavanja iznosi 6,50 vol %, što je nešto više od literaturnog podatka (Pavsler i Buiatti, 2009) za tamni lager koji iznosi 4,2 vol%- 6 vol%. Koncentracija glicerola u ovom slučaju iznosi 3,25 g/L. Potrebno je napomenuti da korišteni kvasac ima nešto veću sposobnost sinteze glicerola jer je prosječna koncentracija glicerola u lager pivima oko 1,50 g/L.



**Slika 16.** Promjena koncentracije različitih sastojaka piva tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Grička vještica“

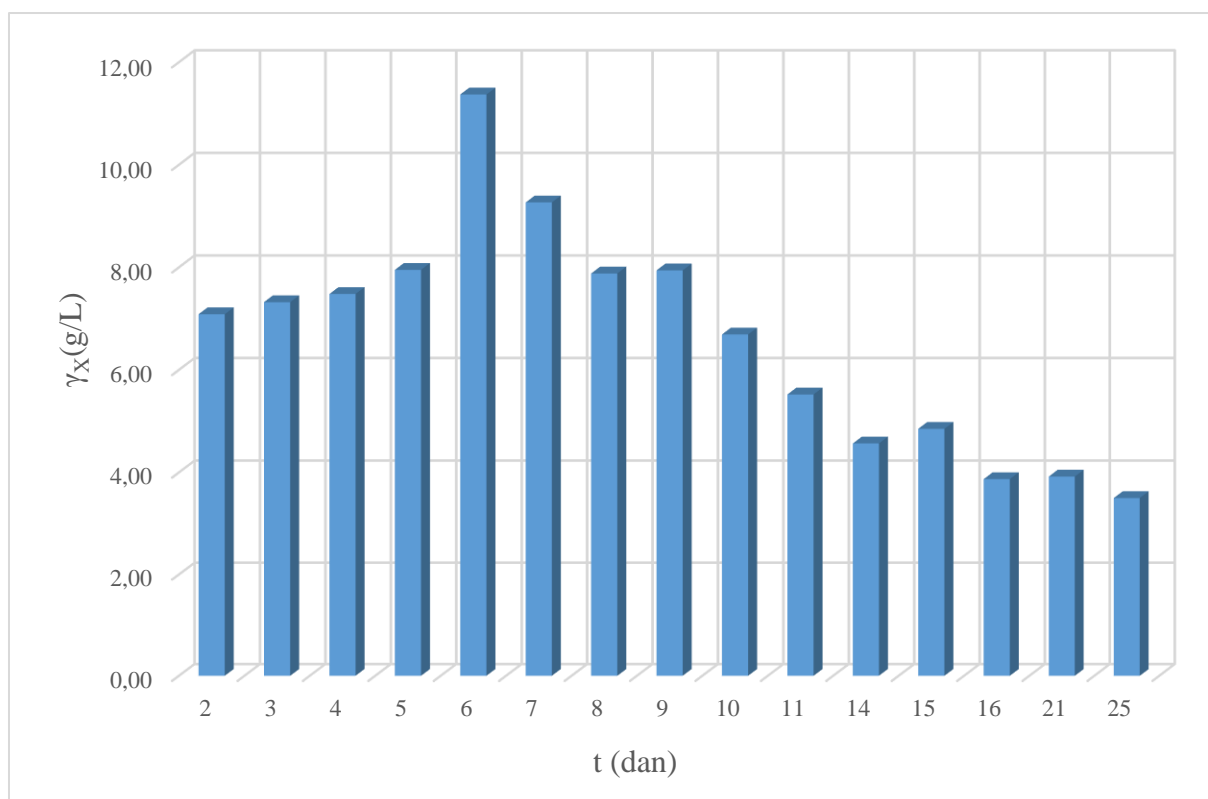
Promjena koncentracije suhe tvari biomase kvasca prikazana je na slici 18, a na slici 17 prikazana je promjena broja živih stanica kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja. Nakon šestog dana glavnog vrenja vidljiv je pad koncentracije biomase ( $\gamma_{X,6. \text{ dana}} = 11,37 \text{ g/L}$ ,  $\gamma_{X,25. \text{ dana}} = 3,50 \text{ g/L}$ ) odnosno broja živih stanica kvasca ( $N_{5 \text{ dana}} = 1,78 \cdot 10^6 \text{ cfu/mL}$ ,  $N_{25 \text{ dana}} = 6,6 \cdot 10^5 \text{ cfu/mL}$ ). Uzorci za određivanje koncentracije biomase i broja stanica izuzimani su iz slavine smještene na fermentoru iznad konusnog dijela fermentora. Usporednim praćenjem rasta

stanica kvasca na hranjivoj podlozi te određivanjem suhe tvari biomase kvasca dobiven je očekivani pad koncentracije suhe tvari biomase kvasca i broja stanica tijekom glavnog i naknadnog vrenja.



**Slika 17.** Promjena broja stanica kvasca tijekom procesa glavnog i naknadnog vrenja piva „Grička vještica“



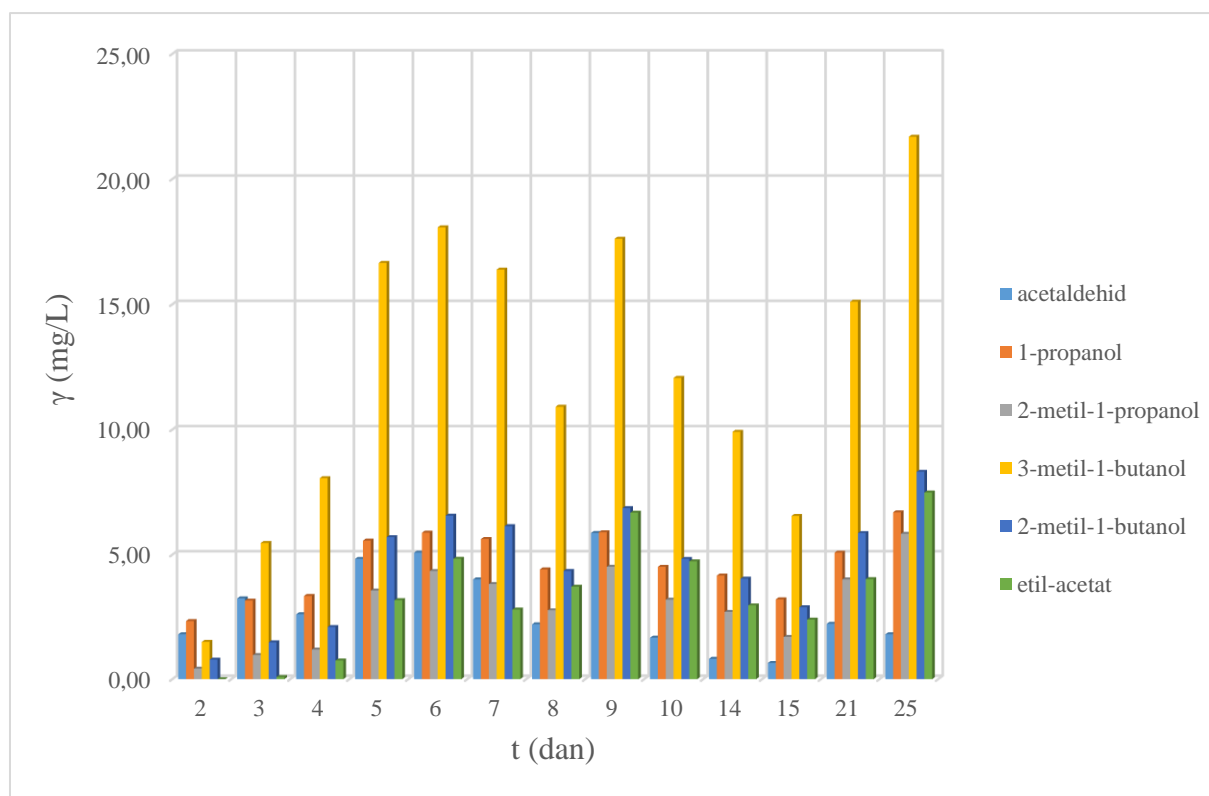


**Slika 18.** Promjena koncentracije suhe tvari biomase kvasca tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Grička vještica“

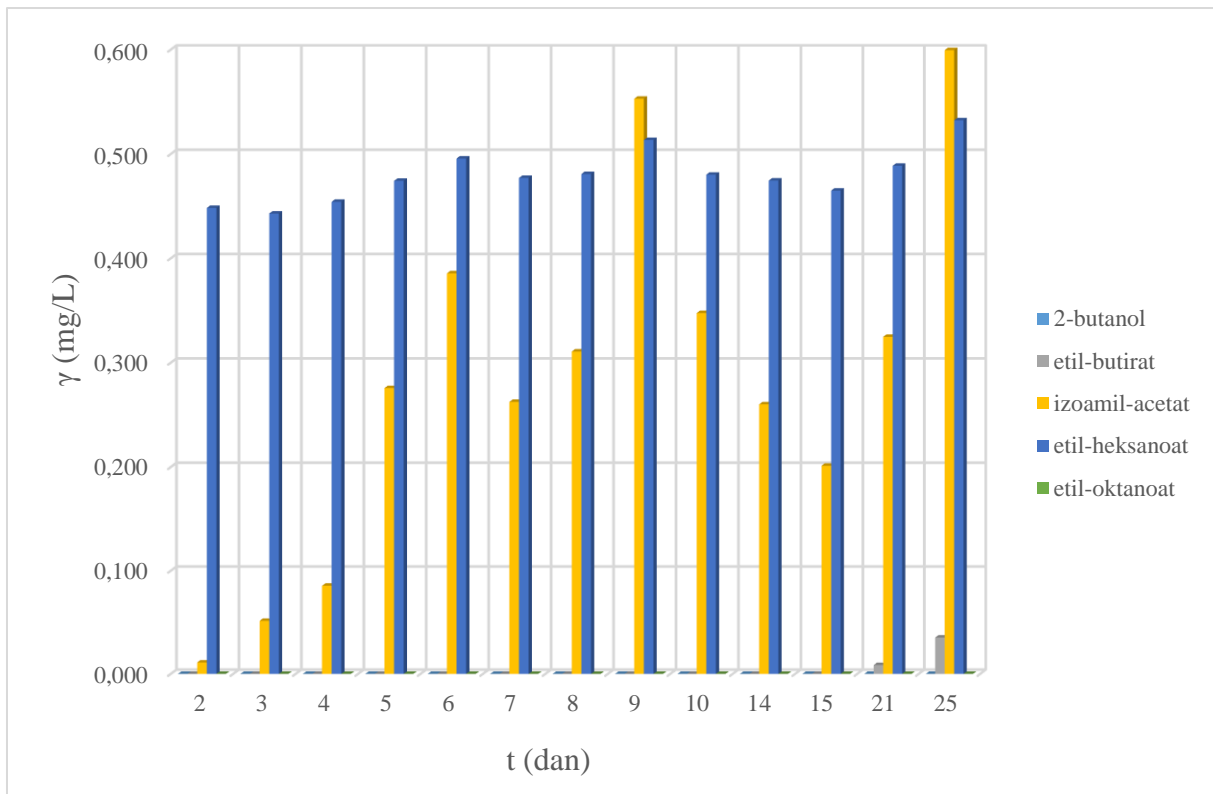
Na osnovi rezultata GC analize tamnog piva donjeg vrenja pivovare Medvedgrad „Grička vještica“ vidljivo je da koncentracija acetaldehida, estera i viših alkohola varira tijekom glavnog i naknadnog vrenja. Koncentracija tih komponenata nakon odležavanja nešto je niža nego u literaturi što se također može pripisati razlikama u sirovinama, postupku uzorkovanja te pripremi samog uzorka. Koncentracija acetaldehida tijekom proizvodnje maksimalna je devetog dana, na kraju glavnog vrenja (5,86 mg/L), no tijekom odležavanja pada na konačnu koncentraciju od 1,80 mg/L što je pokazatelj odležavanja piva. Literaturni podatak u radu Montanari i sur. (2004) je 1,5 mg/L acetaldehida u pivu donjeg vrenja, a utjecaj na taj rezultat ima vrsta sirovine i način vođenja procesa glavnog i naknadnog vrenja. Koncentracije viših alkohola tijekom proizvodnje variraju, ali rastu prema kraju, a njihove koncentracije nakon odležavanja iznose: 6,69 mg/L 1-propanola, 5,83 mg/L 2-metil-1-propanola, 21,68 mg/L 3-metil-1-butanola i 8,31 mg/L 2-metil-1-butanola. Koncentracija 2-feniletanola nije zabilježena tijekom proizvodnje. Dobivene koncentracije viših alkohola su u rangu s literaturnim podacima osim 3-metil-1-butanola koji je nešto niži, a rezultati su uspoređeni s radom Pavslera i Buiattia

(2009). Koncentracije viših alkohola u lager pivima u literaturi su: 5-10 mg/L 1-propanola, 6-11 mg/L 2-metil-1-propanola, 32-57 mg/L 3-metil-butanola i 8-16 mg/L 2-metil-1-butanola.

Koncentracije estera na kraju procesa odležavanja iznosile su: 7,48 mg/L etil acetata, 0,03 mg/L etil butirata, 0,60 mg/L izoamil-acetata i 0,53 mg/L etil heksanoata. Koncentracija etil-oktanoata nije zabilježena tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva. Ester s najvišom koncentracijom je očekivano etil-acetat zbog visoke koncentracije njegovih preteča, etanola i acetil CoA dok koncentracije svih ostalih estera su nešto niže. Koncentracije svih analiziranih estera rastu odležavanjem što je u skladu s literaturom (Briggs i sur., 2009). Tijek promjene koncentracija gore navedenih spojeva može se vidjeti na slikama 19 i 20. Dobivene koncentracije uspoređene su s literaturnim podacima (Morgan, 1965) koji spominju rangove koncentracija u pivu donjeg vrenja: etil acetata 8-14 mg/L i izoamil acetata 1,5-2,0 mg/L te s radovima Jelena i sur. (1998) u kojem je navedena koncentracija 0,04-8,64 mg/L etil butirata i 0,23 mg/L etil heksanoata.



**Slika 19.** Promjena koncentracije acetaldehida, 1-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola i 2-metil-1-butanola i etil-acetata tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Grička vještica“



**Slika 20.** Promjena koncentracije 2-butanola, etil-butirata, izoamil-acetata, etil-heksanoata, etil-oktanoata i 2-feniletanola tijekom glavnog i naknadnog vrenja piva „Grička vještica“

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja zaključujemo sljedeće:

1. Pravilnim vođenjem procesa glavnog i naknadnog vrenja, kvasci gornjeg i donjeg vrenja korišteni u pivovari Medvedgrad proizvode pivo visoke kvalitete u razdoblju od 20-ak dana.
2. Tijekom perioda od 25 dana koncentracija etanola u tamnom pivu donjeg vrenja „Grička vještica“ dosegla je 6,50 vol%, nešto nižu koncentraciju etanola na kraju procesa odležavanja u periodu od 25 dana imala je „Fakin IPA“ od 6,29 vol%. Najnižu koncentraciju etanola nakon odležavanja (kroz 22 dana) imao je čokoladni stout „Fantom“ od 5,94 vol%. Koncentracija glicerola je najviša u stout pivu s 4,57 g/L, zatim u IPA-i sa 3,86 g/L, a najmanju koncentraciju imalo je tamno pivo donjeg vrenja 3,25 g/L.
3. Ukupne koncentracija određenih estera (etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksaonata i etil-butirata) u tamnom pivu donjeg vrenja „Grička vještica“ iznosi 8,65 mg L<sup>-1</sup>. Najzastupljeniji ester u tamnom pivu donjeg vrenja je etil-acetat ( $\gamma = 7,48$  mg L<sup>-1</sup>) koji sačinjava 86,56% od ukupne koncentracije estera.
4. Ukupne koncentracija određenih estera (etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksaonata i etil-butirata) u pivu IPA „Fakin IPA“ iznosi 8,99 mg L<sup>-1</sup>. Najzastupljeniji ester u ovom pivu je etil-acetat ( $\gamma = 8,44$  mg L<sup>-1</sup>) koji sačinjava 93,91% od ukupne koncentracije estera.
5. Ukupne koncentracija određenih estera (etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksaonata i etil-butirata) u pivu čokoladni stout „Fantom“ iznosi 4,72 mg L<sup>-1</sup>. Najzastupljeniji ester u ovom pivu je etil-acetat ( $\gamma = 4,11$  mg L<sup>-1</sup>) koji sačinjava 86,95% od ukupne koncentracije estera.
6. U sva tri piva nakon odležavanja određeni su slijedeći viši alkoholi: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol. Na kraju procesa odležavanja ustanovljeno je da najviša koncentraciju 1-propanola je detektirana u stoutu od 14,11 mg/L, zatim u IPA-i 13,01 mg/L, a najmanja vrijednost određena je u tamnom pivu donjeg vrenja od 6,60 mg/L. Koncentracija 2-metil-1-propanola je bila najviša u stout pivu te iznosi 22,83 mg/L, slijedi ga IPA s 9,34 mg/L te tamno pivo donjeg vrenja s 5,83 mg/L. Koncentracija 3-metil-1-butanol je također najviša u stout pivu te iznosi 31,98 mg/L, 21,68 mg/L ima tamno pivo

donjeg vrenja dok IPA ima koncentraciju od 18,45 mg/L. Najveću koncentraciju 2-metil-1-butanola ima tamno pivo donjeg vrenja od 8,31 mg/L, slijedi ga stout pivo sa 6,67 mg/L te IPA sa 6,24 mg/L.

## 6. LITERATURA

Anonymus 1 (2018) India Pale Ale, <[http://allaboutbeer.com/beer\\_style/india-pale-ale/](http://allaboutbeer.com/beer_style/india-pale-ale/)>.

Pristupljeno 30. travnja 2018.

Anonymus 2 (2018) The Oxford Companion to Beer definition of bottom fermentation, <<https://beerandbrewing.com/dictionary/2Kudv5620R/bottom-fermentation/>>.

Pristupljeno 3. svibnja 2018.

Anonymus 3 (2018) Fakin IPA, <<http://www.pivovara-medvedgrad.hr/beer/fakin-ipa/>>.

Pristupljeno 30. svibnja 2018.

Bamforth, C.W. (2006) New brewing technologies: setting the scene. U: *Brewing New technologies* (Bamforth, C.W., ured), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 1-9.

Barnett, J.A. (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16** (8), 755-771.

Beazly, M., (1994) Michael Jackson's beer companion, A DBP book, Duncan Baird publishers, London, str. 273-284.

Birch, R.M., Ciani, M., Walker, G.M. (2003) Magnesium, Calcium and Fermentative Metabolism in Wine Yeasts. *J. Wine Res.* **14**, 3-15.

Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R. (2004) *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Buiatti, S. (2009) Beer Composition: An Overview. U: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy, V.R., ured), Academic Press, London, str. 213-225.

- Castellari, M., Sartini, E., Spinabelli, U., Riponi, C., Galassi, S. (2001) Determination of Carboxylic Acids, Carbohydrates, Glycerol, Ethanol, and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV-Refractive Indeks Double Detection. *J. Chromatogr. Sci.* **39**, 235-238.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O. (2009) Beer Carbohydrates. U: Beer in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., ured), Academic Press, London, str. 291-298.
- Fontana, M., Buiatti, S. (2009) Amino Acids in Beer. U: Beer in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., ured), Academic Press, London, str. 273-284.
- Friss, J., Ottolenghi, P. (1959) Localization of invertase in a strain of yeast. *Comptes Rendus Trav. Lab. Carlsberg* **31**, 259-271.
- Ghiaci, P., Lameiras, F., Norbeck, J., Larsson, C. (2014) Production of 2-butanol through *meso*-2, 3- butanediol consumption in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **360**, 70-75.
- Goldammer, T. (2008) *The Brewer's Handbook*, Apex Publishers, Centerville.
- Hopkins, R.H., F.I.C., D.S., Amphlett, P.H. (1939) Reactions between the mineral salts of brewing waters and constituents of malt. *J. I. Brewing* **45**, 365-384.
- Jelen, H.H., Wlazly, K., Wasowicz, E., Kaminski, E. (1998) Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. *J.Agric.Food Chem.* **46**, 1469-1473.
- Klopper, W.J., Angelino, S.A.G.F., Tuning, B., Vermeire, H.A. (1986) Organic Acids and Glycerol in Beer. *J. I. Brewing* **92**, 225-228.
- Lewis, M.J. (1995) *Classic Beer Style Series; Stout*, Brewers Publications, Boulder, Colorado.

Marić, V. (2009) Tehnologija piva. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.

Norris, F.,W. (1946) Nutritional value of beer. *Nature* **157**, 430-432.

Novak, S., Marić, V. (1995) Transport i regulacija metabolizma ugljikohidrata kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: I. Glukoza, fruktoza i manoza, *Kemija u industriji* **44**, 341-353.

Novak, S., Zechner-Krpan, V., Marić, V. (2004) Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* **42** (3) 213-218.

Novak, S., Zechner-Krpan, V., Raspor, P., Marić, V. (2000) Transport ugljikohidrata i regulacija metabolizma ugljikohidrata u kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: II. Galaktoza, *Kemija u industriji* **49**, 433-441.

Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H., Fantozzi, P. (2009) Amino Acids in Beer. U: Beer in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., ured), Academic Press, London, str.61-75.

Nykänen L., Nykänen I. (1977) Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. I. Brewing* **83**(1), 30-31.

Pavslar, A., Buiatti, S. (2009) Lager Beer. U: Beer in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., ured), Academic Press, London, str. 31-43.

Pavslar, A., Buiatti, S. (2009) Non-lager Beer. U: Beer in Health and Disease Prevention (Preedy, V. R., ured), Academic Press, London, str. 17-30.

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



Rouessac, F., Rouessac, A. (2007) *Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques*, 2nd Ed, Willey&Sons, New York.

Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1999) *Osnove analitičke kemije* (prijevod: Kujundžić, N., Zivčić-Alegretti, V., Živković, A.), Školska knjiga, Zagreb.

Stambuk, B.U., Batista, A.S., De Araujo, P.S. (2000) Kinetics of Active Sucrose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **89** (2), 212-214.

Steele, M. (2012) *IPA: Brewing Techniques, Recepies and the Evolution of Indian Pale Ale*, Brewers publications, Boulder, Colorado.

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

Stewart, G. G. (2009) The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. *J. I. Brewing* **115**(1), 3-29.

Szlavko C.M. (1973) Tryptophol, Tyrosol and Phenylethanol- The aromatic higher alcohols in beer. *J. I. Brewing*, **79**, str. 283-288.

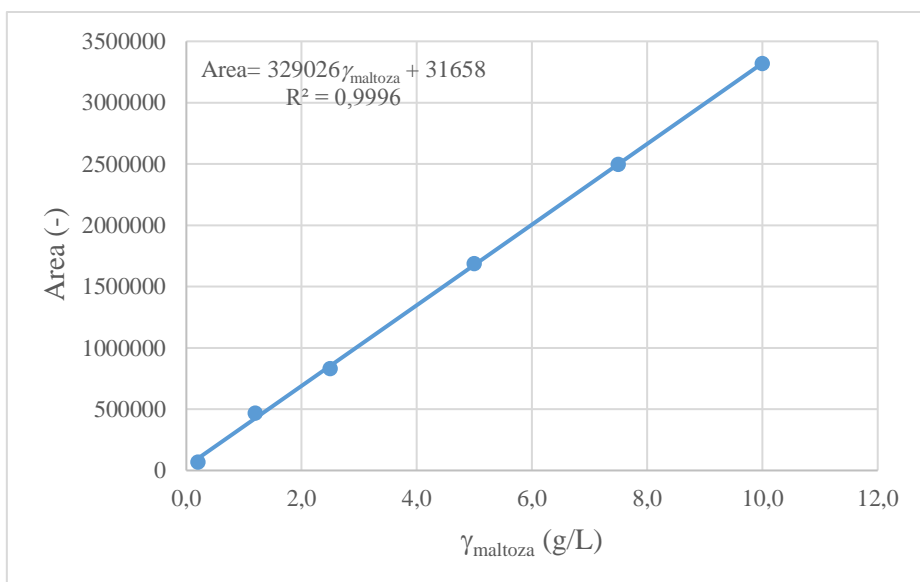
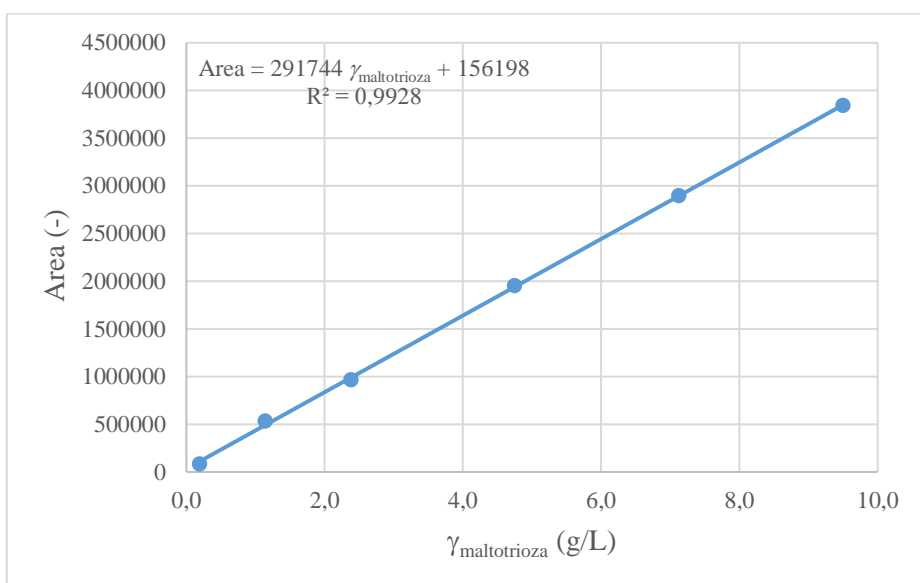
Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., Van Den Broek, P. J. A., Van Dijken, J.P. (1994) Chemostat Cultivation an a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts. *Microbiol. Rev.*, **58** (4), 616-630.

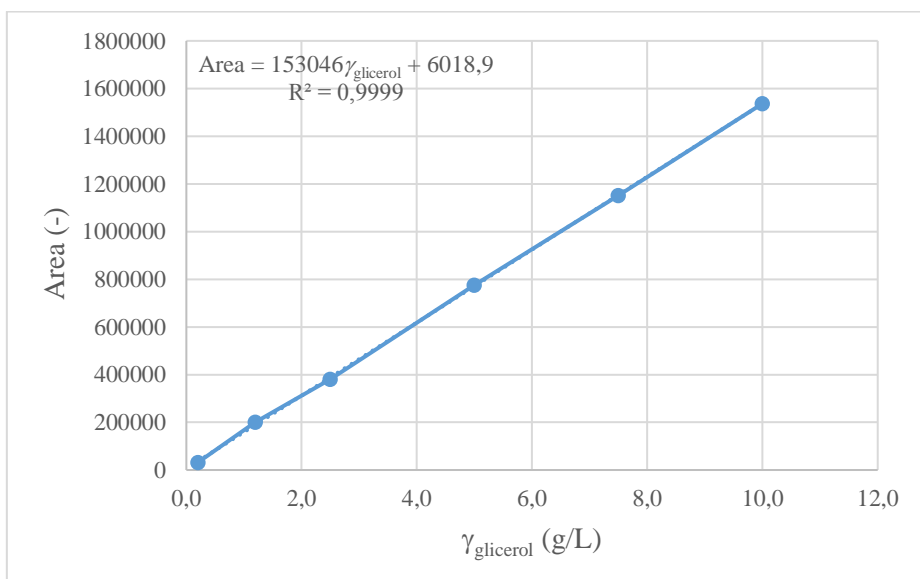
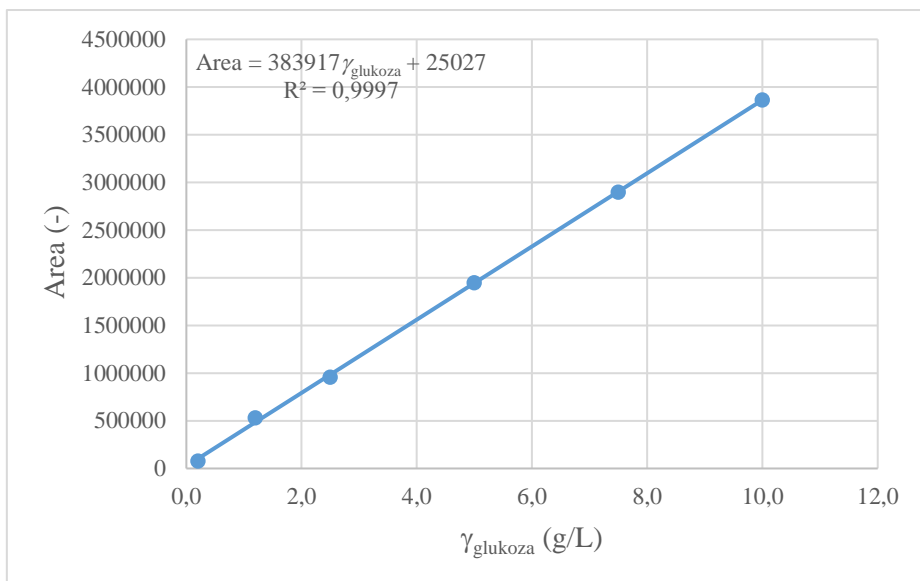
Wunderlich, S., Back, W. (2009) *Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes and Quality Criteria*. U: *Beer in Health and Disease Prevention* (Preedy, V.R., ured), Academic Press, London, str. 3-16.

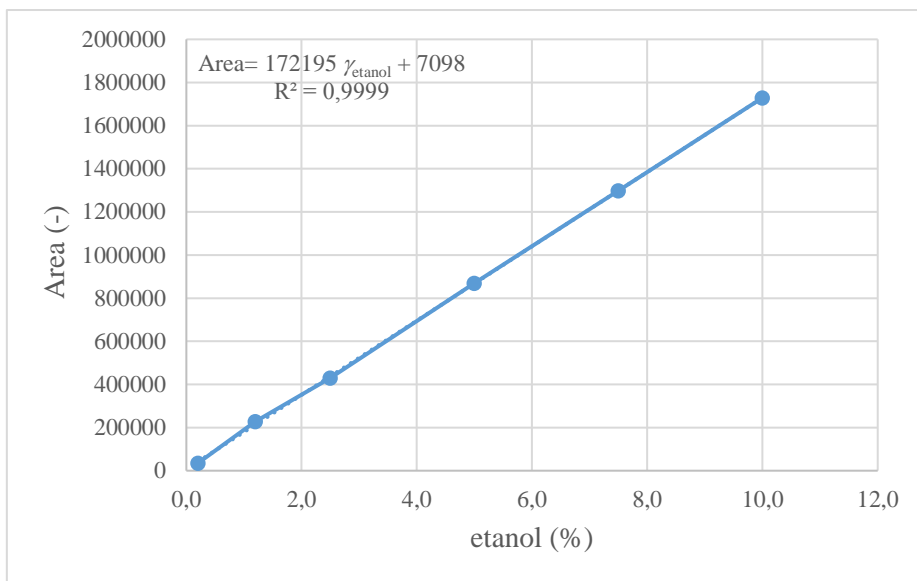
Van Der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W.N. (1995) The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function and Biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **59** (2), 304-322.

## 7. PRILOZI

### 7.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI







**Slika 21.** Baždarni pravci za određivanje fermentabilnih šećera i alkohola u pivu HPLC metodom