Usporedba pokazatelja kvalitete piva gornjeg i donjeg vrenja

Stegnjaić, Uglješa

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:378634

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017. godine

Uglješa Stegnjaić

863/BPI

USPOREDBA POKAZATELJA KVALITETE PIVA GORNJEG I DONJEG VRENJA

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Zmajskoj pivovari d.o.o., pod mentorstvom dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Antonije Trontel, više asistentice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

USPOREDBA POKAZATELJA KVALITETE PIVA GORNJEG I DONJEG VRENJA

Uglješa Stegnjaić, 683/BPI

Sažetak: U ovom istraživanju proučavan je proces proizvodnje ale i lager piva u laboratorijskom i industrijskom mjerilu. Sladovina za obje vrste piva proizvedena je infuzijskim postupkom uz primjenu usipka standardnog sastava. Za proizvodnju ale piva korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (tip SafAle^{TM} US-05) odnosno *Saccharomyces pastorianus* za proizvodnju lager piva. Tijekom procesa glavnog i naknadnog vrenja praćena je promjena koncentracije sastojaka sladovine kao i sinteza glavnih (etanol, CO_2, glicerol) i sporednih (esteri, viši alkoholi, acetaldehid) proizvoda procesa alkoholnog vrenja. Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da oba piva dobivena u ovom istraživanju odgovaraju standardima kvalitete zahtijevane za obje vrste piva.

Ključne riječi: pivo donjeg i gornjeg vrenja, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cerevisiae,* osnovni sastojci piva, komponente arome piva, različite kromatografske tehnike

Rad sadrži: 54 stranice, 15 slika, 5 tablica, 70 literaturnih referenci, 2 priloga
Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek
Pomoć pri izradi: dr. sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Izv.prof.dr.sc. Tonči Rezić
2. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Izv.prof.dr.sc. Damir Stanzer

Datum obrane: 24. srpnja 2017. godine

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 IN BOTTOM AND TOP FERMENTED BEER

Uglješa Stegnjaić, 683/BPI

Abstract: In this study ale and lager beer production was studied in laboratory and industrial scale. For both beer types wort was prepared by infusion process. Standard mash composition for both beer types was used. For ale production yeast *Saccharomyes cerevisiae* (type SafAle™ US-05) was used and for lager production *Saccharomyces pastorianus*, respectively. During fermentation and maturation process changes of wort constituents concentrations as well as synthesis of main (ethanol, CO_2, glycerol) and byproducts (esters, higher alcohols and acetaldehyde) of alcoholic fermentation were monitored. On the basis of this research it can be concluded that both produced beer types in this study satisfy quality standards required for these beer types.

Keywords: bottom and top fermenting beer, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, major beer constituents, beer aroma compounds, different chromatographic tehniques

Thesis contains: 54 pages, 15 figures, 5 tables, 70 references, 2 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

Reviewers:
1. PhD Tonči Rezić, Associate professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Damir Stanzer, Associate professor

Paper defended: July 24th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 2

2.1. PIVSKI KVASAC I METABOLIZAM UGLJIKOHIDRATA ... 2

2.1.1 Ale kvasci ... 6

2.1.2. Lager kvasci ... 9

2.2. LAKOHLAPIVE KOMPONENTE PIVA ... 13

2.2.1. Alkoholi ... 13

2.2.2. Esteri ... 16

2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA PIVA ... 18

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ... 19

2.3.2. Plinska kromatografija ... 20

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 22

3.1. MATERIJALI ... 22

3.1.1. Radni mikroorganizmi ... 22

3.1.2. Ječmeni slad ... 22

3.1.3. Hmelj ... 22

3.1.4. Voda ... 23

3.1.5. Kemikalije i reagensi korišteni u istraživanju ... 23

3.1.6. Aparatura i pribor ... 23

3.1.7. Informatički programi i obrada rezultata ... 26

3.2. METODE ... 27

3.2.1. Postupci u proizvodnji ale piva ... 27

3.2.2. Kuhanje sladovine, glavno i naknadno vrenje lager piva ... 31

3.2.3. Analitičke metode ... 31

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 36

4.1. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa *Pale Ale*) ... 36

4.2. PROIZVODNJA I NADZOR LAGER PIVA (tipa *Doppelbock*) ... 39

5. ZAKLJUČCI ... 42

6. LITERATURA ... 44

7. PRILOZI ... 51

7.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA PLINSKOM „HEAD SPACE“ KROMATOGRAFIJOM ... 51

7.2. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOST ... 53

1. UVOD

Pivo je pjenušavo, osvježavajuće piće koje sadrži mali, srednji ili veliki udio alkohola, može imati jače ili slabije karakterističan okus po sladu, manje ili jače izraženu gorčinu i specifičnu hmeljnu aromu te aromu estera. Dobiva se fermentacijom pivske hmeljene sladovine pomoću pivskog kvasca koji je za mnoge stilove piva krucijalan u dobivanju željnog profila okusa i arome piva (Marić, 2009).

Prvi zapisi o proizvodnji piva datiraju iz vremena Sumerana u Mezopotamiji koji su od većine svojih žitarica pekli pogače dok su ostatke pogača topili u vodu i dobivali proizvod nalik pivu. Ovaj način proizvodnje piva proširio se i na Egipat gdje se ovakva proizvodnja u ruralnim dijelovima Nila zadržala do danas. S vremenom se proizvodnja piva proširila i Europom gdje je brzo stekla popularnost jer je uz sami okus piva, bila dobar način mikrobiološkog pročišćavanja vode (Katz i Maytag, 1991).

U cijelom tom periodu vrenje piva je bilo spontano, odnosno ljudi nisu znali za postojanje kvasca (Kunze, 2004). Tako je i prva verzija Njemačkog zakona o čistoći piva iz 1516. godine glasila da pivo smije sadržavati samo ječmeni slad, hmelj i vodu. Tek je polovicom 19. stoljeća Louis Pasteur otkrio i dokazao da je za fermentaciju odgovoran živi mikroorganizam – kvasac (Barnett, 2000).

Tijekom proizvodnje piva u Europi, pivari su primijetili da se na dnu otvorenih bačvi nakupljao talog koji se mogao iskoristiti kako bi se brže dobilo kvalitetnije pivo. Nakon degustacije su ponovo koristili istaloženi kvasac iz bačava u kojima je nastajalo bolje pivo dok su talog iz bačvi s lošijim pivom bacali. Na taj način vršili su selekciju kvasaca kroz dugi niz godina pri čemu je nastajao veliki broj mutacija u genomu kvasca. Uslijed toga, danas imamo različite sojeve koji različito utječu na profil arome piva pa tako npr. neki sojevi tijekom vrenja proizvode značajnu količinu fenola i tradicionalno se koriste za stilove kao što su njemačka pšenična piva (*Hefeweizen*) i belgijska trapistička piva odnosno sojevi koji gotovo ne proizvode fenole i koriste se u britanske stilove piva kao što su *Pale ale* i *India pale ale* (White i Zainasheff, 2010).

Cilj istraživanja u ovom radu bio je usporedba kvalitete i aromatskog profila piva stila *Pale ale* (kvascac gornjeg vrenja) i piva stila *Doppelbock* (kvasac donjeg vrenja) dobivenih u ovom istraživanju. Tijekom istraživanja praćene su promjene koncentracija hlapivih komponenti odnosno ostalih sastojaka piva (acetaldehida, etanola, glicerola, mliječne kiseline i ugljikohidrata)

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PIVSKI KVASAC I METABOLIZAM UGLJIKOHIDRATA

Pivski kvasac je jednostanični, kemoorganotrofni, fakultativno aerobni eukariot koji energiju pridobiva oksidativnom razgradnjom prvenstveno glukoze, a zatim i ostalih ugljikohidrata te glukogenih supstrata (etanol, glicerol, mliječna i octena kiselina). Razgradnja ugljikohidrata odvija se glikolizom, heksoza-monofosfatnim putem i citratnim ciklusom (Maaheimo i sur., 2001).

U proizvodnji piva najčešće se koriste sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* i *Saccharomyces carlsbergensis* za koje su karakteristične dvije pojave: Pasteur-ov i Crabtree-ev efekt. Oba efekta su posljedica globalnog mehanizma regulacije metabolizma ugljikohidrata i proizlaze iz činjenice da korišteni pivski kvasci mogu rasti aerobno i anaerobno (Rodrigues i sur., 2006).

Glavna tehnološka razlika ale i lager kvasaca je temperatura fermentacije koja posljedično dovodi do drukčijeg profila arome i okusa piva. Ale kvasci najčešće provode vrenje na temperaturama od 15-25°C (neki ale kvasci fermentiraju i do 30°C, npr. za *Saison* stil piva) dok lager kvasci većinom provode vrenje na temperaturama od 7-13°C (neki lager kvasci fermentiraju i do 20°C npr. za *California common* stil piva). Uz samu temperaturu glavnog vrenja, različita je i temperatura odležavanja pa tako lager piva odležavaju na temperaturama oko 0°C dok ale piva odležavaju na višim temperaturama. Neki sojevi ale kvasaca na kraju glavnog vrenja isplivaju na površinu mladog piva dok se lager kvasci istalože na dno fermentora (Marić, 2009). Također, ale kvasci, za razliku od lager kvasaca, ne mogu previrati melibiozu jer nemaju enzim melibiazu te iskorištavaju samo trećinu rafinoze iz sladovine (Naumov i sur., 1996).

U stanici kvasca se, pri aerobnim uvjetima, odvija potpuna oksidacija ugljikohidrata prilikom čega nastaju voda, CO_2, značajna količina biomase i toplina. U anaerobnim uvjetima kvasac konvertira ugljikohidrate uglavnom do etanola i CO_2 prilikom čega nastaje mala količina biomase. Taj se fenomen metaboličke regulacije naziva Pasteur-ov efekt koji je zapravo inhibicija alkoholnog vrenja u prisustvu kisika. Pasteur-ovim efektom kvasac optimira brzinu razgradnje glukoze kako bi stanice imale dovoljno energije i međuspojeva za biosintezu. U aerobnim uvjetima stanica kvasca proizvodi više ATP-a po molekuli glukoze što znači da može sintetizirati stanični materijal uz manji utrošak glukoze. Tijekom vrenja u proizvodnji piva dešava se da kvasac prelazi s oksidacijskog na fermentacijski rast nakon što potroši sav dostupan kisik iz hmeljene sladovine. Tom prilikom na nivou enzimske aktivnosti dolazi do:

- smanjenja aktivnosti enzima citratnog ciklusa
- smanjenja aktivnosti enzima pentoza fosfatnog ciklusa (u aerobnim uvjetima se 30-35% supstrata razgradi ovim putem dok u anaerobnim uvjetima samo 5-10% supstrata ide u ciklus pentoza-fosfata)
- sintetizirani mitohondriji se za vrijeme oksidacijskog rasta počinju degenerirati (Passonneau i Lowry, 1962)

1929. godine Herbert Grace Crabtree je učio da kvasac koji se uzgaja na podlozi s relativno velikom koncentracijom ugljikohidrata (c > 2-5 g/L) proizvodi etanol čak i u potpuno aerobnim uvjetima. Ova se pojava nazvala „reverzni Pasteur-ov efekt″ odnosno Crabtree-ev efekt. Ovaj se efekt očituje na velikom broju enzimskih reakcija, u prvom redu na aktivnost enzima ciklusa limunske kiseline i respiratornog lanca. Točan mehanizam ovog efekta još nije u potpunosti poznat, ali se pretpostavlja da dolazi do kataboličke represije sinteze enzima i kataboličke inhibicije nekih, već prisutnih enzima (Phaweni i sur., 1992).

Da bi kvasac mogao koristiti određeni izvor ugljikohidrata potreban mu je funkcionalni sustav za transport supstrata u stanicu i odgovarajući enzimi za pregradnju tog ugljikohidrata u glukoza-6-fosfat ili u neki drugi međuprodukt glikolize. Pivski kvasci iz roda *Saccharomyces* mogu koristiti ove izvore ugljika:

- aerobno i anaerobno – glukoza, fruktoza, manoza, maltoza i galaktoza
- samo anaerobno – saharoza, maltotrioza, trehaloza, melibioza i rafinoza (potrebna razgradnja do monosaharida da bi ih stanica mogla transportirati; Käppeli, 1986)

Kvasci roda *Saccharomyces* imaju dva osnovna tipa transporta otopljenih tvari kroz citoplazmatsku membranu. Jedan način je pasivnom difuzijom, a drugi je pomoću transmembranskih prijenosnika. Ovim drugim načinom transport se može odvijati niz gradijent koncentracije (olakšana difuzija) i uz gradijent koncentracije (koncentrirajući transport). Taj način transporta je aktivni transport odnosno potrebna mu je metabolička energija koju kvasac dobiva iz hidrolize ATP-a ili elektrokemijskim gradijentom (simport i antiport mehanizmi). U citoplazmatskoj membrani postoji specifična ATP-aza koja djeluje kao protonska pumpa tj. uz utrošak ATP-a tjera vodikove ione iz stanice u okolinu i na taj način stvara gradijent protona i membranski potencijal koji omogućavaju ulazak tvari u stanicu proton-simport mehanizmom..

Kod kvasca roda *Saccharomyces* transportni sustavi ugljikohidrata su: konstitutivni sustav za transport heksoza te inducibilni sustavi za transport maltoze, galaktoze i α-metil

glukozida. Neki se disaharidi razgrađuju na monosaharide u stanici (maltoza koja se cijepa na dvije glukoze), a neki izvan stanice (saharoza koja se cijepa na glukozu i fruktozu u periplazmatskom prostoru).

Transport heksoza (glukoze, fruktoze i manoze) odvija se olakšanom difuzijom uz pomoć istog transmembranskog prijenosnika. Postoje dva transportna sustava gdje je sustav I dominantan pri višim koncentracijama glukoze, niskog afiniteta i neovisan o kinazama. Sustav II je dominantan pri niskim koncentracijama glukoze i kod rasta na galaktozi, visokog je afiniteta i ovisan o kinazama. Ovaj sustav je također podložan kataboličkoj represiji glukozom i kataboličkoj inaktivaciji. Dokazana je biološka interakcija između transportnog sustava II i fosforilacijske aktivnosti pri čemu gubitak te aktivnosti dovodi do inaktivnosti transportnog sustava II. Nakon transporta u stanicu glukoza, manoza i fruktoza se fosforiliraju kinazama (heksokinaza A, heksokinaza B i glukokinaza) pri čemu nastaje glukoza-6-fosfat i fruktoza-6-fosfat koji su intermedijeri glikolize te nastaje manoza-6-fosfat koja izomerizira u fruktozu-6-fosfat i tako ulazi u glikolizu (Novak i Marić, 1995). Afinitet za navedene šećere prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Afinitet transportnih sustava za glukozu, fruktozu i manozu (Novak i Marić, 1995)

Karakteristika	**Sustav I**	**Sustav II**
Afinitet	Niski	Visoki
K_m za glukozu (mmol/L)	20	1-2
K_m za fruktozu (mmol/L)	40	6
K_m za manozu (mmol/L)	Nema podataka	20

Kada se u podlozi nalaze samo glukoza i fruktoza potrošnja oba šećera odvija se istovremeno, ali je potrošnja glukoze brža. Sva tri šećera inhibiraju transport jedan drugoga pri čemu su im konstante inhibicije gotovo jednake što pokazuje da se radi o jednostavnoj kompetitivnoj inhibiciji.

Transport maltoze započinje njenim ulaskom u stanicu pomoću specifičnog transmembranskog prijenosnika maltoza-permeaze. Maltoza se zatim cjepa na dvije molekule glukoze pomoću enzima maltaze koje se fosforiliraju i ulaze u glikolizu (Fraenkel, 1982). Karakteristična su ova dva transportna sustava: konstitutivno ekspresivan sustav niskog

afiniteta i inducibilno ekspresivan sustav visokog afiniteta (Crumplen i sur., 1996). Metabolizam maltoze je pod kontrolom tri regulacijska mehanizma: indukcije, kataboličke represije i kataboličke inaktivacije.

Do indukcije sinteze proteina za metabolizam maltoze dolazi kada je maltoza prisutna u okolini stanice. Maltoza inducira transkripciju gena *MAL63* koji kodira za protein Mal63 koji je pozitivan regulatorni protein i djeluje kao aktivator transkripcije gena koji kodiraju za maltoza-permeazu i maltazu (Wang i sur., 2002). Biosintezom potrebnih spojeva omogućen je ulazak maltoze u stanicu, njeno cijepanje, fosforilacija i ulazak u glikolizu.

Ukoliko se u okolini stanice uz maltozu nalazi i glukoza dolazi do kataboličke inaktivacije. Prisutna glukoza reprimira sintezu maltaze i transportnog sustava za maltozu te trenutno inaktivira maltoza-permeazu. Katabolička represija glukozom se očituje na način da dolazi do nastajanja Mig1 kompleksa koji je represor transkripcije svih *MAL* gena, a pogotovo *MAL63* čime se onemogućava aktivacija transportnog sustava za maltozu (Hu i sur., 2000).

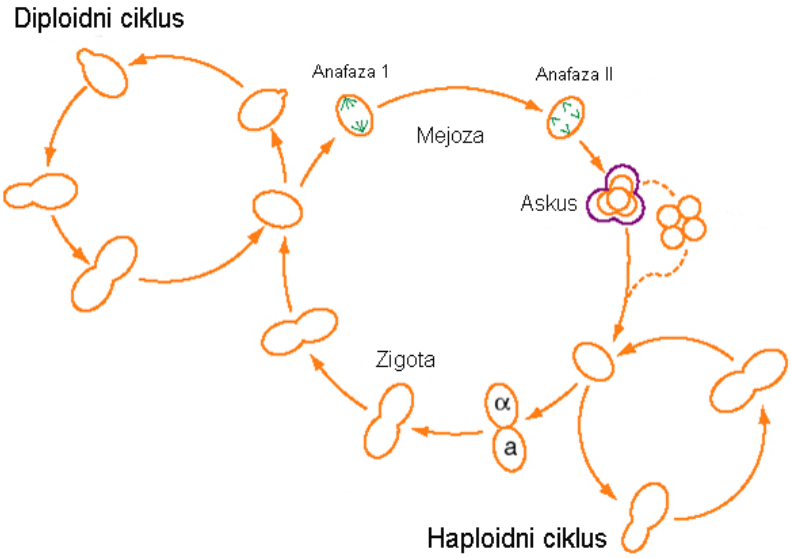
Transport i metabolizam maltotrioze odvija se transportnim sustavom za maltozu pri čemu je potrošnja maltotrioze sporija pa često tijekom vrenja piva jedan dio maltotrioze ostane neprevreo (Zastrow i sur., 2000). Pretpostavlja se da je glavni razlog sporijoj potrošnji maltotrioze manji afinitet transportnih proteina za maltotriozu.

Postoji sedam transportnih proteina za maltozu (Mal21, Mal31, Mal41, Mal61, Agt1, Mph2 i Mph3) od kojih tri mogu transportirati i maltotriozu. To su manje specifične α-glukozid permeaze za koje kodiraju geni: *AGT1*, *MPH2* i *MPH3* (Day i sur., 2002). Svi MAL lokusi sadrže, osim gena koji kodira za Agt1, specifični proton simport i gene *MALx1* koji kodira za Malx1 permeazu, *MALx2* koji kodira za Malx2 α-glukozidazu i *MALx3* koji kodira za Malx3 aktivator transkripcije.

Agt1 je inducibilni α-glukozid proton simport visokog afiniteta za saharozu i trehalozu, nižeg za maltozu i maltotriozu (Km ~ 18 mM) te vrlo niskog za turanozu, izomaltozu, α-metilglukozid, palatinozu i melezitozu (Han i sur., 1995). Malx1 glukozidaza pokazuje visoki afinitet za maltozu (Km ~ 4 mM), a osim maltoze može cijepati i turanozu. Ulaskom maltotrioze u stanicu dolazi do cijepanje maltotrioze na tri jedinice glukoze što katalizira intercelularna α-glukozidaza (maltaza) koja također katalizira i cijepanje maltoze na dvije glukozne jedinice te cijepanje još nekih glukozida (Chang i sur., 1989). Nastale glukozne jedinice zatim ulaze u glikolizu.

2.1.1 Ale kvasci

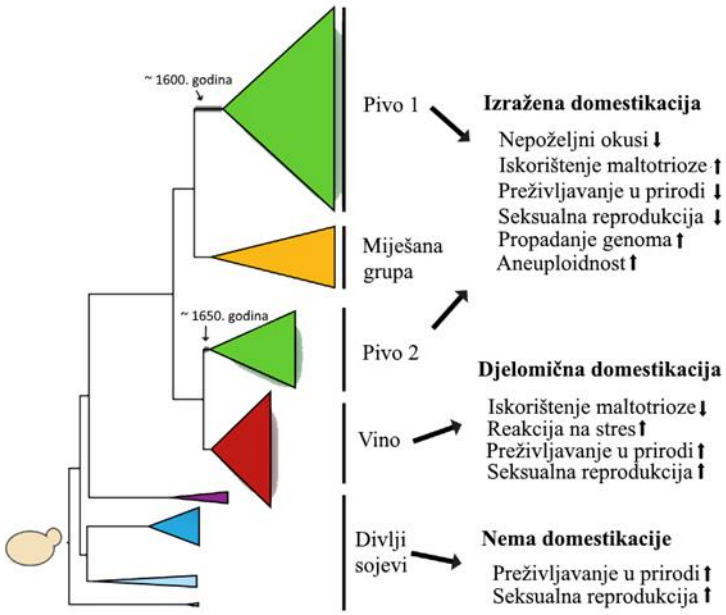
Glavne dvije vrste kvasaca gornjeg vrenja odnosno ale kvasaca koji se danas koriste u proizvodnji piva su sojevi vrste *Saccharomyces cerevisiae* i kvasci iz roda *Brettanomyces*. Sustavnom selekcijom kvasca kroz povijest nastali su pivski sojevi kvasca koji su za razliku od laboratorijskih sojeva s puno većim genomom i brojem mutacija. *S. cerevisiae* može postojati kao haploid i kao diploid, no puno su češći diploidni sojevi koji su elipsoidnog oblika i promjera 5-6 μm za razliku od haploida koji su sferični i promjera 4 μm. Diploidni i haploidni sojevi mogu se razmnožavati aseksulano (pupanjem) gdje kod haploida pupovi nastaju jedan pored drugoga, a kod diploida nastaju jedan nasuprot drugome. Osim pupanja diploidne stanice se mogu razmnožavati i sporulacijom prilikom čega nastaju četiri haploidne spore koje mogu postati a ili α tip sparivanja. Te se spore mogu razmnožavati pupanjem, a mogu se razmnožavati i međusobno prilikom čega nastaje diploidna stanica (Slika 1). Spore nastale sporulacijom koje ne mogu pupati i ne mogu mijenjati svoj tip sparivanja nazivaju se heterotalični spojevi. Kod homotaličnih sojeva prisutnost *HO* gena omogućava promjenu tipa sparivanja tijekom rasta, no prije svake promjene „spola“ stanica mora barem jednom pupati (Herskowitz i sur., 1992). I kod heterotaličnih i homotaličnih spojeva dolazi do spajanja stanica u diploidnu kada se u kontaktu nađu dva suprotna tipa. A tipovi imaju oligopeptid zvan a-faktor dok α tipovi sadrže α-faktor kojim se vežu jedan za drugoga. Dolazi do fuzije citoplazmi, a posljedično i do spajanja jezgri čime nastaje zigota. Budućim dijeljenjem stanica kvasca ulazi u diploidnu fazu životnog ciklusa u kojoj može ostati dugi niz generacija. Do sporulacije će doći samo u slučaju rasta na podlozi s nedostatkom dušika i izvorom nefermentabilnog ugljikohidrata te ako stanica sadrži *MATa* i *MATα* gene (Esposito i Esposito, 1974).



Slika 1. Spolni ciklus kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 1, 2017)

Pivski poliploidni sojevi *S. cerevisiae* jako slabo sporuliraju i gotovo nikad ne tvore spore u tetradama (Fowell, 1969). Spore koje i uspiju nastati u većini slučajeva nisu viabilne čak i u savršenim uvjetima za sporulaciju laboratorijskih kultura. Usporedbom inducirane sporulacije lager i ale kvasca otkrilo se da lager kvasac treba više vremena za sporulaciju prilikom čega nastaju askusi s jednom do dvije spore dok su kod ale kvasaca nastajale 2-3 spore. Nastali sojevi su bili neobični, a mogli su se povezati s oba tipa sparivanja ili su bili sterilni. (Anderson i Martin, 1975).

Bolje upoznavanje načina razmnožavanja kvasca dovelo je u pitanje mogućnost genetskog usavršavanja i samo porijeklo pivskih sojeva *S. cerevisiae*. Upravo se porijeklom pivskih, vinskih, pekarskih, alkoholnih, sake i divljih sojeva bavilo višegodišnje istraživanje objavljeno u rujnu 2016. godine (Gallone i sur., 2016). U tom istraživanju je sekvencioniran genom 157 različitih sojeva industrijski korištenih sojeva kvasca *S. cerevisiae* te su im određena fenotipska svojstva. Istraživanje je pokazalo da svi istraživani sojevi potječu od samo par pripitomljenih predaka. Izraz domestikacija (pripitomljavanje) je definiran kao selekcija i uzgoj divljih vrsta kako bi se dobile kultivirane vrste koje uspijevaju u kontroliranim uvjetima, a u prirodi je njihov rast usporeniji. Tipični znakovi domestikacije su: propadanje genoma, poliploidija, preslagivanje kromosoma, duplikacija gena i fenotip koji je rezultat selekcije, a vidljivi su kod kultiviranih biljaka, stoke i kućnih ljubimaca (Driscoll i sur., 2009). Podaci istraživanja otkrivaju da se industrijski sojevi genotipski i fenotipski razlikuju od divljih sojeva te su podijeljeni u pet grupa (Slika 2).



Slika 2. Domestikacija industrijskih sojeva *S. cerevisiae* (Gallone i sur., 2016)

Pivski kvasci svrstani su u dvije grupe: grupa pivskih ale kvasaca 1 i grupa pivskih ale kvasaca 2. U grupi 1 uočena je genetska i fenotipska sličnost na temelju geografskog podrijetla pa se ta grupa dijeli na 3 podgrupe: Ujedinjeno Kraljevstvo, Njemačka/Belgija i SAD koja je vrlo slična britanskoj što dokazuje da su britanski kolonizatori donijeli europski pivski kvasac u Sjevernu Ameriku i njime započeli tamošnju proizvodnju piva. Ova grupa kvasaca pokazuje najizraženije znakove domestikacije (propadanje genoma, aneuplodija, nedostatak seksualnog životnog ciklusa) od svih proučavanih grupa, a pretpostavlja se da su se razvile iz zajedničkog pretka između 1573. i 1604. godine što se poklapa s početkom industrijske proizvodnje piva u Europi. Grupa 2 je genetski i fenotipski puno sličnija vinskim sojevima *S. cerevisiae* i ne pokazuje sličnosti na temelju geografskog podrijetla, a razvila se iz zajedničkog pretka između 1645. i 1671. godine (Gallone i sur., 2016).

Još jedan od dokaza selekcije i pripitomljavanja pivskog kvasca su sposobnost kvasca da previre maltotriozu i mutacije gena *PAD1* i *FDC1* koji sudjeluju u proizvodnji 4-vinil-guaikola (4-VG), faktora većinom nepoželjnog fenolnog okusa u pivu karakterističnog za neke sojeve pivskih kvasaca i divlje tipove (White i sur., 2015). Sposobnost previranja maltotrioze korelira s postojanjem *MAL11* gena koji kodira za Mal11, transmembranski prijenosnik visokog afiniteta za maltotriozu. Ovaj funkcionalni gen posjeduju samo pivski kvasci iz grupe 1. Kvasci iz grupe 2 imaju mnoge „frameshift“ mutacije *MAL11* gena što upućuje na postojanje još nekog, nepoznatog mehanizma koji sudjeluje u metabolizmu maltotrioze. Istraživanje je pokazalo da

se prije dosta vremena došlo do mutacije i nastanka 4-VG$^-$ mutanata iz 4-VG$^+$ prethodnika što pokazuje na nepoželjnost fenolnog okusa i selekcije kvasaca kroz vrijeme koji nisu proizvodili pivo s aromom fenola. Fenolna aroma danas je ostala kod malog broja kvasca koji sadrže genetska i fenotipska svojstva sve tri podgrupe grupe 1 (najviše iz Njemačka/Belgija podgrupe) te se koriste u *Hefeweizen* pivima gdje daju specifičnu pikantnu, dimljenu aromu specifičnu za ta piva (Coghe i sur., 2004).

Osim *S. cerevisiae* koriste se i *Brettanomyces* kvasci. Oni su dugo vremena bili sastavni dio skoro svakog piva, sve dok se u pivovare nisu uveli visoki standardi čistoće. Prvi klasificirani kvasac roda *Brettanomyces* (*Brett*) je bio *Brettanomyces claussenii,* klasificiran 1904. u pivovari Carlsberg kao uzročnik kvarenja britanskih piva. Danas se zna da je rod *Brettanomyces* gotovo identičan rodu *Dekkera* gdje je jedina razlika što *Brettanomyces* ne sporulira. Iako je većina vrsti ovog roda nepoželjan kontaminant piva zbog svog jakog utjecaja na aromu i okus piva, postoje pivski stilovi u kojima je *Brettanomyces* neizostavan. *Brettanomyces anomalus, Brettanomyces bruxellensis* i *Brettanomyces claussenii* su najkorištenije vrste u proizvodnji kiselih stilova piva: Gueze, Lambic, Oud Ruin i Flanders red ale (Tonsmeire, 2014). Ovi kvasci se jako rijetko koriste za glavno vrenje. Najčešće se koriste u kombinaciji sa *S. cerevisiae* koji odradi primarno vrenje, a *Brettanomyces* se zatim nacijepljuje u fermentirano pivo i započinje sekundarnu fermentaciju, najčešće u drvenim bačvama. *Brettanomyces* kvasci na podlozi bogatoj glukozom proizvode acetat što nepovoljno utječe na pivo ukoliko nastane previše octene kiseline. Uz acetat, ovi kvasci značajno utječu na specifičnu kompleksnu aromu gdje se pojavljuju arome i okusi kao što su: gorka trešnja, borovnice, zemlja, mokro sijeno, povrće, cvijeće, agrumi, pikantnost (Gilliland i sur., 1961) Treba napomenuti da su kvasci iz roda *Brettanomyces* puno manje zastupljeniji od tipičnih pivskih kvasaca *S. cerevisiae, S. pastorianus i S. carlsbergensis.*

2.1.2. Lager kvasci

Lager odnosno kvasci donjeg vrenja prvi su se put opisali u Njemačkoj početkom 14. stoljeća i od tada su postali najpopularniji pivski tip kvasca u Europi. Prvu taksonomsku klasifikaciju ovog kvasca napravio je Max Rees 1870. godine, a kvasac je nazvan

Saccharomyces pastorianus u čast Luisa Pasteura. Dane Emil Hansen je 1883. godine izolirao čistu kulturu pivskog kvasca danskoj pivovari Carlsberg prilikom čega je otkrio da je korišteni soj kvasca identičan onome koji je pivovara dobila 1845. godine od minhenske pivovare Spaten te ga je nazvao „Kvasac donjeg vrenja broj 1“. 1904. godine je Hansen izolirani soj klasificirao kao *S. pastorianus* da bi ga 1908. reklasificirao kao *Saccharomyces carlsbergensis*. U pivovari je identificirao još jedan soj kvasca za koji je mislio da je nova vrsta i nazvao ga *Saccharomyces monacensis*. Nakon tog istraživanja u literaturi se lager kvasac najčešće klasificirao kao *S. carlsbergensis* sve do 1985. godine i primjene tehnike DNA-DNA relokacije. Vaughan-Martini i Kurtzman su svojim istraživanjem reklasificirali *S. carlsbergensis* u *S. pastorianus* (Quain, 1986; Tablica 2). Istraživanje je također pokazalo hibridno porijeklo kvasca *S. pastorianus* što se kasnije i otkrilo. *S. pastorianus* je nastao hibridizacijom *S. cerevisiae* i *S. eubayanus*, vrste izolirane iz područja Patagonije koja je tolerantna na niske temperature (Libkind i sur., 2011). Hibridizacija se očituje u 4 seta kromosoma kod *S. pastorianus* gdje su dva iz ale kvasca, a druga dva iz patagonijskog (Tamai i sur., 1998). Pretpostavlja se da su pivari u nekom trenutku primijetili da su hladne fermentacije, za koje je prije trebalo par tjedana, postale kraće i gotove u tjedan dana. Nakon toga trenutka počelo je intenzivnije korištenje ovog pivskog kvasca jer su vrenja na nižim temperaturama smanjivala mogućnost kontaminacije piva i pozitivno utjecala na okus piva. Daljnja proizvodnja lager piva dovela je do postupne domestikacije *S. pastorianus* koji je danas najkorišteniji tip kvasca u proizvodnji piva. Uz *S. pastorianus* često se koristi i lager kvasac *S. carsbergensis*.

Danas se lager kvasci dijele u dvije grupe: Saaz/Carlsberg (*S. carlsbergensis*) i Frohlberg (*S. pastorianus*). Osim geografskog podrijetla grupe se razlikuju i u mogućnosti fermentacije maltotrioze, proizvodnje etil acetata i optimalne temperature vrenja. Frohlberg grupa slabije previre maltotriozu, proizvodi značajno veće koncentracije etil acetata te joj je optimalna temperatura fermentacije 22°C dok je optimalna temperatura za rast Saaz/Carlsberg grupe 10°C (Gibson i sur., 2013).

Zadnji otkriveni transportni protein za α-glukozide izoliran iz kvasca *Saccharomyces pastorianus* je Mty1 permeaza koja je specifična za lager kvasce i ima veći afinitet za maltotriozu (Km ~ 16-27 mM) od maltoze (Km ~ 61-88 mM), može transportirati i turanozu i trehalozu (Salema-Oom i sur., 2005), a aktivna je pri nižim temperaturama od Agt1 simporta. Gen *AGT1*, koji kodira za transmembranski protein niskog afiniteta za maltozu i maltotriozu, je kod lager kvasaca mutiran i nefunkcionalan zbog preuranjenog stop kodona (Vidgren i sur., 2009).

Tablica 2. Promjene u nomenklaturi pivskih kvasaca (Libkind i sur., 2011)

Lodder i Kreger-vanRij, 1952. godine	**Lodder, 1970. godine**	**Kreger-vanRij 1984. godine**	**Barnett, 1992. godine**
Saccharomyces bayanus →	*Saccharomyces bayanus* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces bayanus*
Saccharomyces pastorianus →	*Saccharomyces bayanus* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces pastorianus*
Saccharomyces oviformis →	*Saccharomyces bayanus* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae*
Saccharomyces willianus →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae*
Saccharomyces cerevisiae →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae*
Saccharomyces carlsbergensis →	*Saccharomyces uvarum* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae*
Saccharomyces uvarum →	*Saccharomyces uvarum* →	*Saccharomyces cerevisiae* →	*Saccharomyces cerevisiae*

Lager pivo se proizvodi svugdje u svijetu. Neki od najpoznatijih tipova lager piva su: Helles, Pilsner, Bock, Dopplebock, Schwarzbier, Wiena lager itd., koji su ujedno i najpopularnije vrste piva u Europi (Marić i Nadvornik, 1995).

Lager kvasci, za razliku od ale kvasaca, proizvode značajno manje voćnih estera tijekom vrenja te mnogo više spojeva sa sumporom od kojih je najznačajniji H_2S koji nastaje kao nusprodukt metabolizma metionina (Saerens i sur., 2010). Kako bi se smanjila koncentracija H_2S (neugodna aroma trulih jaja) lager piva često imaju duže odležavanje za vrijeme kojega se gubi nepoželjna aroma. Lager piva su uglavnom osvježavajuća i pitka te mogu sadržavati male koncentracije H_2S koji se u većini stilova piva smatra nepoželjnim sastojkom. Uz H_2S lager i ale piva mogu sadržavati i neke druge nepoželjne arome, okuse ili karakteristike od kojih su najčešći:

- Acetaldehid (očituje se kao miris zelene jabuke, čest je u mladim dok u odležanim pivima upućuje na kontaminaciju)
- Diacetil odnosno vicinalni diketoni (okus i miris po maslacu, najčešće se javlja zbog preniske temperature vrenja ili zbog kontaminacije bakterijama vrste *Pediococcus*)
- Dimetil sulfid ili DMS (okus i miris po kuhanom kukuruzu, nastaje u pivu koje se kuha od pils tipa slada pri čemu nije omogućen odvod pare nastale kuhanjem sladovine)
- Otapala (okus i miris po ljepilu koji nastaje kada sladovina nema dovoljno otopljenog kisika za rast kvasca ili kada se fermentacija odvija na previsokoj temperaturi)
- Kiselost (okus po octu koji upućuje na nedovoljnu čistoću pogona ili kontaminaciju piva; može biti i posljedica vrenja piva s *Brettanomyces* kvascem)
- Trans-2-nonenal (okus i miris po kartonu, nastaje prilikom oksidacije vrele sladovine ili prilikom predugog odležavanja piva s visokim udjelom alkohola, glavni pokazatelj oksidiranosti piva)
- 3-metil-2-buten-1-tiol (okus i miris po tvoru, nastaje zbog izloženosti gotovog piva svijetlu)
- 2-6-diklorofenol (okus i miris po medicinskim kemikalijama; javlja se ukoliko se sredstva za pranje na bazi klora dobro ne isperu ili ako voda za kuhanje piva sadrži previše klorida)
- 4-vinil-guaiakol (okusi i aroma po povrću i klinčiću, proizvodi ga kvasac)
- Etil acetat (miris i okus po acetonu, sastavni dio svih piva, a nepoželjan u koncentracijama višim od 10 mg/L; Palmer, 2006b)

Osim ovih nepoželjnih aroma i okusa, postoji i čitav niz poželjnih od kojih su najučestaliji:

- Etil butirat (aroma po tropskom voću, najčešće ga proizvodi kvasac, a može nastati i zbog loše higijene pogona ako se u sladovini nađe maslačne kiseline; nepoželjan u prevelikim koncentracijama)
- Etil heksanoat (aroma po crvenoj jabuci, najčešće ga proizvodi kvasac, a može se naći i u pivu čiji se pogon koristi za punjenje bezalkoholnih pića

kojima je etil heksanoat jedna od glavnih sastavnica; nepoželjan u koncentracijama višim od 1 mg/L)

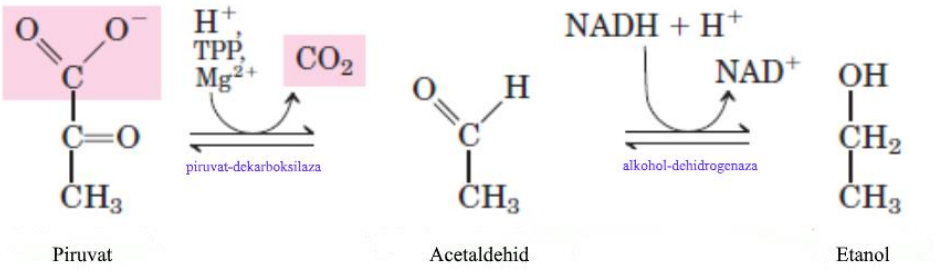
- Geraniol (aroma po ruži, nalazi se kao jedna od sastavnica hmeljnih ulja)
- Isoamil acetat (aroma podsjeća na bananu, čest i poželjan u njemačkim pšeničnim pivima dok u nekim stilovima ukazuje na previsoku temperaturu vrenja; Palmer, 2006b)
-

2.2. LAKOHLAPIVE KOMPONENTE PIVA

Hlapive komponente piva mogu se podijeliti na: alkohole (poglavlje 2.2.1.), estere (poglavlje 2.2.2.). i organske kiseline (poglavlje 2.2.3.).

2.2.1. Alkoholi

Etanol (C_2H_5OH) je primarni alkohol s dva C atoma. Pri sobnoj temperaturi etanol je lako hlapiva, zapaljiva i bezbojna tekućina ugodnog mirisa. Miješa se s vodom u svim omjerima i stvara azeotropne smjese. U alkoholnim pićima etanol nastaje procesom alkoholnog vrenja. U anaerobnim uvjetima kvasac prevodi piruvat nastao glikolizom u etanol. Biokemijska se reakcija sastoji od dva koraka (Slika 3).

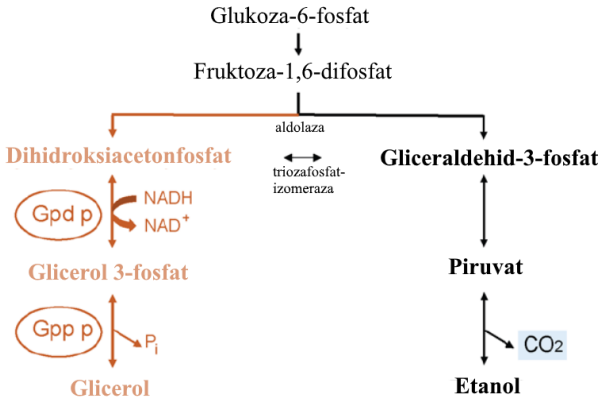


Slika 3. Biokemijska reakcija nastajanja etanola (Anonymus 2, 2017)

Prvi korak je dekarboksilacija piruvata pri čemu nastaje acetaldehid i CO_2, a reakciju katalizira piruvat-dekarboksilaza. Drugi korak je redukcije acetaldehida u etanol prilikom čega dolazi do regeneracija koenzima (NADH se oksidira u NAD^+), a reakciju katalizira enzim

alkohol-dehidrogenaza. Etanol se može dobivati i kemijskim putem kao što je npr. adicija vode na eten pri visokom tlaku i temperaturi, no ovakvi su procesi skupi stoga je biotehnološki način proizvodnje najčešći. Za potrebe dobivanja medicinskog ili apsolutnog etanola, prevrela podloga se nakon fermentacije odvodi na destilaciju i dodatno pročišćavanje.

Glicerol ($C_3H_8O_3$) je najjednostavniji alkohol s tri hidroksilne skupine (triol). Na sobnoj temperaturi je viskozna, bezbojna tekućina slatkastog okusa bez mirisa. Glicerol može nastati biokemijskim putem iz dihidroksiacetonfosfata, intermedijera glikolize. U uvjetima nižeg aktiviteta vode (a_w) okoliša od a_w citoplazme, stanice kvasca preusmjeravaju glikolitički fluks iz smjera nastajanja piruvata u nastajanje glicerola (Slika 4).



Slika 4. Biokemijski put sinteze glicerola (Anonymus 3, 2017)

Biokemijska reakcija se odvija u dva koraka od koji je prvi redukcija dihidroksiaceton-fosfata u glicerol-3-fosfat prilikom čega dolazi do regeneracije koenzima (oksidacija NADH u NAD^+), a katalizira je enzim glicerol 3-fosfat dehidrogenaza (Gpd; Norbeck i sur., 1996). U drugom koraku se nastali glicerol-3-fosfat defosforilira u glicerol uz otpuštanje fosfata, a reakciju katalizira enzim glicerol kinaza (Gpp).

Drugi metabolički put kojim nastaje glicerol je razgradnjom triglicerida prilikom čega nastaje glicerol i tri masne kiseline, a reakciju katalizira enzim lipaza. Tako nastali glicerol se prevodi do dihidroksiacetonfosfata i kao takav ulazi u glikolizu.

1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol i 2-feniletanol spadaju u skupinu viših alkohola. Smjesa ovih alkohola naziva se još i smjesa fosilnih alkohola. Nastajanje viših alkohola vezano je uz metabolizam aminokiselina odnosno Ehrlichov put. Ovim putem kvasac za vrijeme glavnog vrenja asimilira treonin, valin, leucin, izoleucin, metionin i fenilalanin te reakcijom transaminacije prevodi u odgovarajuće α-ketokiseline koje

se ne mogu preusmjeriti u neki od puteva razgradnje ugljikohidrata (Jones i Pierce, 1964). Treonin je prekursor za 1-propanol, valin za 2-metil-1-propanol, leucin za 3-metil-1-butanol, izoleucin za 2-metil-1-butanol, a fenilalanin za 2-feniletanol (Tablica 3; Hazellwod i sur., 2008). Za razliku od navedenih spojeva 2-butanol proizvode neke bakterije mliječne kiseline i pokazatelj je kontaminacije piva.

Ehrlichovim putem se α-ketokiselina dekarboksilira u odgovarajući aldehid uz oslobađanje molekule CO_2, a reakciju katalizira odgovarajuća tiamin difosfat (TPP) ovisna α-ketokiselinska dekarboksilaza. Postoji pet dekarboksilaza koje kodiraju geni: *PDC1, PDC5, PDC6, ARO10,* i *THI3* (Dickinson i sur., 1997). U reakcijama katabolizma leucina sudjeluju dekarboksilaze za koje kodira *THI3,* a u reakcijama katabolizma valina dekarboksilaciju provode tri izoenzima: Pdc1p, Pdc5p i Pdc6p koji kataliziraju dekarboksilaciju α-ketoizovalerata (Dickinson i sur., 1998). U reakcijama sinteze 3-metil-1-butanola iz izoleucina dekarboksilaciju katalizira svih pet dekarboksilaza dok u kataboličkim reakcijama fenilalanina dekarboksilaciju 2-fenilacetaldehida kataliziraju sve dekarboksilaze osim Thi3p (Dickinson i sur., 2003). Dobiveni aldehidi se zatim reduciraju u odgovarajuće više alkohole reakcijom koju kataliziraju izoenzimi alkohol dehidrogenaze. Reakcije oksidacije aldehida u organske kiseline su jako rijetke u procesu vrenja odnosno proizvodnje piva (Dickinson i sur., 2000).

Najveći utjecaj na omjer nastalih viših alkohola i kiselina imaju uvjeti kultivacije. U uvjetima aerobnog rasta s limitirajućom koncentracijom glukoze pri čemu su aminokiseline glavni izvor dušika primarno će konverzijom aminokiselina nastajati više viših alkohola nego kiseline. Na ovaj način prinos biomase je samo 40% što ukazuje na povezanost visoke potrošnje stanične energije i sinteze kiselina (Boer i sur., 2007).

U procesu proizvodnje piva gotovo 90% aminokiselina se tijekom vrenja konvertira u više alkohole dok u potpuno anaerobnom rastu *S. cerevisiae* gotovo sve aminokiseline konvertira u više alkohole (Vuralhan i sur., 2005). Upravo u anaerobnim uvjetima uzgoja reakcije redukcije u kojima nastaju viši alkoholi ima bitan utjecaj na cjeloviti stanični redox potencijal. Anaerobnom fermentacijom dio NADH se oksidira u reakcijama sinteze glicerola, no to je za stanicu energetski nepovoljno jer se troši ATP (Overkamp i sur., 2000). S druge strane reakcijom redukcije aldehida u više alkohole dolazi do oksidacije NADH na energetski efikasniji način. Iako ova uloga Ehrlichovog puta nije u potpunosti istražena pokazalo se da tijekom fermentacije *S. cerevisiae* proizvodi manje glicerola kada mu je glavni izvor dušika valin za razliku kada je glavni izvor dušika amonijak (Derrick i Large, 1993). *S. cerevisiae* sadrži 16 alkohol dehidrogenaza, 6 aldehid reduktaza i barem dvije specifične pirimidin ovisne

reduktaze. Najbitnije alkohol dehidrogenaze su Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh4p, i Adh5p i Sfa1p koje mogu katalizirati redukciju svih aldehida u više alkohole (Dickinson i sur., 2003).

Nastali viši alkoholi izlaze iz stanice, a ovaj proces još nije dovoljno istražen. Pretpostavlja se da se transport vrši pasivnom difuzijom kroz fosfolipidni dvosloj jer još nisu pronađene transportne molekule za više akohole (Lipinski i sur., 2001).

Tablica 3. Intermedijeri Ehrlichovog puta (Hazellwod i sur., 2008)

Aminokiselina	**α-ketokiselina**	**Aldehidi**	**Viši alkoholi**	**Organske kiseline**
leucin	α-ketoisokaproat	3-metilbutanal	3-metilbutanol	3-metilbutanoat
valin	α-ketoizovalerat	2-metilpropanal	2-metilpropanol	2-metilpropanoat
izoleucin	α-ketometilvalerat	2-metilbutanal	2-metilbutanol	2-metilbutanoat
fenilalanin	fenilpiruvat	2-feniletanal	2-feniletanol	2-feniletanoat
tirozin	*p*-hidroksifenil piruvat	2-(4-hidroksifenil) etanal	2-(4-hidroksifenil) etanol	2-(4-hidroksifenil) etanoat
triptofan	3-indol piruvat	2-(indol-3-il)-etanal	2-(indol-3-il) etanol	2-(indol-3-il)etanoat
metionin	α-keto-γ-(metiltio)butirat	3-(metiltio) propanal	3-(metiltio) propanol	3-(metiltio) propanoat

2.2.2. Esteri

Esteri nastaju reakcijom kondenzacije alkohola i aktiviranih masnih kiselina koju kataliziraju različiti enzimi pri čemu se troši stanična energija, a najveći dio estera nastaje tijekom glavnog vrenja piva. Najproučavanija su dva enzima: alkohol acetil transferaza 1 i alkohol acetil transferaza 2 koji kataliziraju nastajanje svih acetatnih estera (npr. etil-acetat i isoamil-acetat). Kod sinteze etilnih estera najbitniji enzim je etanol *O*-aciltransferaza. Do sinteze estera dolazi pri dva uvjeta. Masne kiseline veličine C8-C14 su toksične za stanicu u

velikim koncentracijama i esterifikacija je jedan od načina uklanjanja viška tih masnih kiselina (Saerens i sur., 2006).

Drugi razlog je potreba stanice za balansom između acetil-CoA i CoASH (ishodnog spoja za većinu acil-CoA koji nastaje procesom acilacije, a reakciju katalizira acil-CoA sintetaza) pa se suvišna koncentracija acetil-CoA koristi za sintezu acetatnih estera (Thurston i sur., 1982).

Pivski kvasac proizvodi acetatne estere u puno većoj koncentraciji od etilnih estera. Kod acetatnih estera spojevi koji reagiraju su octena kiselina i etanol ili neki viši alkohol dok kod etilnih estera reagira etanol i masna kiselina srednje dužine lanca. Esteri su topivi u mastima i kao takvi izlaze u okoliš stanice. Acetatni esteri brzo izlaze difuzijom, a brzina difuzije etilnih estera ovisi o veličini lanca masne kiseline (što je masna kiselina duža, sporija je difuzija izvan stanice; Nykanen i Nykanen, 1977)

Etil acetat je ester etanola i octene kiseline, a pivu daje miris laka na nokte. Nalazi se u gotovo svim vrstama piva, no često je teško razlučiv jer se nalazi u vrlo malim koncentracijama.

Izoamil-acetat je ester 3-metil-1-butanola i octene kiseline, a pivu daje aromu i okus nalik na bananu. Prilikom starenja piva dolazi do spontane hidrolize ovog estera.

Etil butirat je ester etanola i maslačne kiseline, a pivu daje okus i aromu po tropskom voću, ananasu i mangu. Rijetko se nalazi u lager pivu.

Etil heksanoat je ester etanola i kaproične kiseline, a pivu daje aromu crvene jabuke. Čest je sastojak lager piva.

Etil oktanoat je ester kaprilne kiseline i etanola, a pivu daje aromu po jabukama (Peddie, 1990).

2.2.3. Organske kiseline

Mliječnu kiselinu većinom proizvode bakterije mliječne kiseline. Postoje dva metabolička puta nastanka mliječne kiseline: homofermentativni i heterofermentativni put. Homofermentativnim procesom piruvat se reducira u laktat uz oksidaciju NADH u NAD^+, a reakciju katalizira laktat dehidrogenaza. Heterofermentativnim procesom yxuz mliječnu kiselinu nastaju acetat i/ili etanol i CO_2 uz nastanak jedne ATP molekule. Mliječna kiselina se

često koristi za korekciju pH vrijednosti komine radi bolje aktivnosti enzima α-amilaze i β-amilaze koji kataliziraju razgradnju škroba. Optimalan pH za α-amilazu je 5,7 odnosno za β-amilazu 5,0, a iskustveno je dokazano da je optimalni pH komine za dobru aktivnost ovih enzima oko 5,3 (Palmer, 2006a).

2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA PIVA

Nakon i tijekom proizvodnje piva potrebno je zadovoljiti brojne standarde za osiguranje kvalitete proizvoda. Bitniji parametri su boja i gorčina piva (IBU, eng, International Bittering Units) odnosno volumni udio alkohola u pivu. Boju, gorčinu i udjel CO_2 u pivu moguće je odrediti spektrofotometrijski dok se za određivanje alkohola u pivu mogu koristit denzitometrijska metoda, GC-om uz detekciju FID-om (plameno-ionizacijskim detektorom) i HPLC-om uz detekciju RID-om (detektor indeksa refrakcije). Osim navedenih osnovnih analiza piva, postoji interes za provođenje analiza sirovina koje se koriste za proizvodnju piva kao što je npr. voda (kvaliteta vode značajno utječe na kvalitetu i okus piva), a njen se sastav može odrediti kemijskom metodom (ekstrakcija s amonij-acetatom), ICP metodom (induktivno spregnuta plazma) i ICP-MS metodom (induktivno spregnuta masena spektometrija).

Nadalje, određivanje koncentracije vicinalnih diketona (2,3-butanediona i 2,3-pentanediona) moguće je provesti GC "head-space" tehnikom s ECD detektorom (detektor zarobljavanja elektrona) te se određivanje ovih spojeva koristi kao indikator određivanja trajanja odležavanja. Slično tome, praćenje koncentracije ugljikohidrata (monosaharida, disaharida, oligosaharida i polisaharida) koristi se za praćenje tijeka fermentacije. Određivanje glukoze i oligosaharida sa stupnjem polimerizacije do 10 moguće je provesti HPLC-om s RID detektorom. Istom metodom moguće je odrediti koncentraciju organskih kiselina kao što su octena i mliječna kiselina te glicerol. Hmelj, kao jedan od četiri glavna sastojka piva, sadrži alfa i beta kiseline, tj. humulone i lupulone. Tijekom procesa proizvodnje piva alfa kiseline se prevode u izo-alfakiseline (izohumulon) koje pivu daju gorčinu. Ove spojeve u hmelju i pivu moguće je odrediti ultra-djelotvornom tekućinskom kromatografijom (UHPLC sustav). Mikotoksine koji se često nalaze kao kontaminanti u žitaricama može se odrediti UHPLC-MS/MS sustavom (kombinacija masene spektometrije i ultra-djelotvorne tekućinske kromatografije). Estere, aldehide, alkohole i druge hlapive komponente piva koji nastaju tijekom proizvodnje moguće je odrediti s HS-GC ("head-space" plinska kromatografija)

tehnikom uz FID detektor. Na koncentraciju ovih spojeva u pivu najviše utječu odabir vrste kvasca koji se koristi za vrenje, temperatura pri kojoj se provodi vrenje i koncentracija otopljenog kisika (Shimatzu Scientific Instruments, 2015).

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenti određene smjese. Princip rada HPLC-a zasniva se na prolasku tekuće mobilne faze u koju je dodan mali volumen uzorka kroz kolonu koja je ispunjena stacionarnom fazom (obično silikati ili neki polimeri). Izbor pogodnog otapala, odnosno smjese otapala, provodi se s obzirom na sposobnost otapala da stvaraju vodikove veze (odjeljivanje hidrofilnih, odnosno hidrofobnih spojeva). Otapala moraju biti kromatografski čista, što znači da ne smiju sadržavati nečistoće koje mogu smetati kromatografskom određivanju.

Ako je stacionarna faza polarna, a mobilna nepolarna tada tehniku nazivamo HPLC s normalnim fazama dok u suprotnom slučaju tehniku nazivamo HPLC s obrnutim fazama. Odjeljivanje smjese spojeva metodom HPLC-a s normalnim fazama ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom stacionarnom fazom. Kod kromatografije obrnutih faza mehanizam razdvajanje temelji se na hidrofobnosti analita.

Vrijeme zadržavanja komponenata smjese ovisi o prirodi tvari, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze, a vrijeme potrebno za eluaciju naziva se retencijsko vrijeme (t_R) i karakteristično je za svaku komponentu. Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu čime se smanjuje vrijeme zadržavanja analiziranih komponenti u koloni što poboljšava učinkovitost i rezoluciju kromatograma. Na učinkovitost HPLC-a utječu i duljina kolone, promjer čestica punjenja i temperatura koja reducira viskoznost mobilne faze i poboljšava difuznost uzorka.

Uređaj za HPLC sastoji se od: spremnika mobilne faze, pumpe, injektora, kolone i detektora. Detektor ima važnu ulogu u detekciji eluiranih komponenti jer generira električni signal koji je razmjeran intenzitetu eluirane tvari. Najčešće korišteni detektori su: UV-VIS, fluorescentni, elektrokemijski, maseni i detektor indeksa loma.

HPLC metode mogu se podijeliti na adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbens i radijalnu kromatografiju pri čemu je nepokretna faza tekućine nanesena na čvrsti inertni nosač. Uz navedene postoji još i ionsko-izmjenjivačka i kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica.

2.3.2. Plinska kromatografija

Plinska "head-space" kromatografija (HS-GC) je metoda koja se koristi za ispitivanje čistoće uzorka, odjeljivanje te kvantitativno i kvalitativno određivanje hlapivih komponenti u tekućim uzorcima. Za razliku od tekućinske kromatografije u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s mobilnom fazom te zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi kemijskoj strukturi mobilne faze. Mobilna faza plinske kromatografije je inertni plin koji eluira smjese u koloni napunjenoj stacionarnom fazom.

Princip rada HS-GC-a se temelji na analizi parne faze koja je u ravnoteži s tekućom fazom. Uzorak se uvodi u spremnik gdje se grije i održava na određenoj temperaturi kako bi se ostvarila ravnoteža između tekuće i plinovite faze. Nakon toga se u spremnik uvodi mobilna faza (inertni plin) koja zatim ekspandira i odvodi uzorak prema kromatografskoj koloni. Faze plinske kromatografije su: unošenje uzorka na vrh kolone, transport uzorka mobilnom fazom kroz kolonu, adsorpcija sastojaka na stacionarnu fazu i detekcija eluiranih sastojaka. HS-GC razdvaja komponente smjese na temelju temperaturnog programa, odnosno postupnim podizanjem temperature kolone.

Kolone za GC mogu biti punjene ili kapilarne koje se još dijele na kolone s prevlakom na stijenci i kolone s prevlakom na nosaču. Punjene kolone su od nehrđajućeg čelika, stakla ili bakra, promjera 1-4 mm, punjene fino usitnjenim materijalom (100-300 μm) prevučenim stacionarnom fazom, nepokretna faza je adsorbirana na inertnom čvrstom nosaču. Kapilarne kolone su kvarcne i presvučene su poliamidnim filmom s ciljem povećanja čvrstoće kolone, a stacionarna faza je imobilizirana na stijenke kapilare. Kolone s prevlakom na stijenci karakterizira debljina tekuće prevlake unutar kolone čija je deblina <1 μm. Kolone s prevlakom na nosaču imaju 30 μm premaz na tekućem nosaču unutar kolone.

Uređaj za plinsku kromatografiju sastoji se od: spremnika s plinom nosiocem, regulatora tlaka i protoka, injektora kolone i detektora. Najčešći detektori su: plameno-ionizacijski, foto-ionizacijski, detektor termalne provodljivosti i detektor zarobljavanja elektrona.

Najzastupljenija "head-space" tehnika uzorkovanja je statičko uzorkovanje. To je najjednostavnije tehnika kojom se uzorak stavlja u vijalu koja se termostatira. Kada se dostigne stanje ravnoteže plinoviti dio uzorka se brzo prenosi na kolonu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Pri izradi diplomskog rada korištena su dva pivska kvasca. Za proizvodnju lager piva korišten je pivski kvasac *Saccharomyces pastorianus* preuzet iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a za proizvodnju ale piva komercijalno dostupan pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* tipa SafAle^{TM} US-05 proizvođača Fermentis (Francuska).

3.1.2. Ječmeni slad

Za ale pivo koristila su se dva tipa slada: bazni Pale ale slad i specijalni Caraaroma slad proizvođača Weyerman (Njemačka) koji su usitnjeni mlinom za suho mljevenje s razmakom valjaka od 0,5-4 mm u Zmajskoj pivovari d.o.o. u Zagrebu. Za proizvodnju lager piva koristila se sladovina dobivena sa standardnim sastavom usipka za lager pivo postupkom infuzijskog ukomljavanja.

3.1.3. Hmelj

U procesu proizvodnje piva donjeg vrenja za aromu i gorčinu korišten je hmelj u obliku peleta tip 90 sorte „Styrian Golding“ proizveden 2016. godine. Hmelj je sadržavao 4,7% α-kiselina i 2,6% β-kiselina. Za proizvodnju piva gornjeg vrenja korištene su sljedeće sorte hmelja: za gorčinu - „Columbus“ (16,2% α-kiselina i 5,1% β-kiselina), za gorčinu i aromu: „Citra®“ (12,1% α-kiselina i 3,6% β-kiselina), „Chinook“ (13,6% α-kiselina i 3,3% β-kiselina) i „Cascade“ (5,6% α-kiselina i 7,1% β-kiselina), svi proizvedeni 2016. godine. Prethodno navedene sorte hmelja su američkog podrijetla, a proizvodi ih tvrtka Yakima Chief – Hopunion.

3.1.4. Voda

Za pripravu uvaraka piva gornjeg vrenja koristila se vodovodna voda iz vodocrpilišta Strmec u Zagrebu kojoj je korigiran omjer otopljenih klorida i sulfata. Za pripravu lager piva korištena je vodovodna voda iz vodocrpilišta Strmec u Zagrebu bez korekcije sastava otopljenih klorida i sulfata.

3.1.5. Kemikalije i reagensi korišteni u istraživanju

- Kloridna kiselina (65%)
- Sumporna kiselina (76%)
- Mliječna kiselina (88%)
- $ZnSO_4 \times 7H_2O$ (10%)
- 1-butanol (standard za HS-GC)
- Spindasol® SB-01 (silikagel)
- Star San (sredstvo na kiselinskoj bazi za sanitaciju pogona)

3.1.6. Aparatura i pribor

3.1.6.1. Vaga

Za vaganje slada korištena je elektronska vaga G&G modela PSB-150 maksimalne nosivosti 150 kg.

3.1.6.2. Mlin i elevator

Za mljevenje slada korišten je mlin s valjcima marke Engl modela 30-18-950, a za prebacivanje slada u komovnjak korišten je pužni elevator marke Čalopek.

3.1.6.3. Kuhaona i vrioni podrum

Za procese ukomljavanja, cijeđenja, kuhanja sladovine te odvajanja toplog i hladnog taloga korištena je kuhaona Zmajske pivovare d.o.o. Kuhaona je model „B-20“ proizvođača

Letina (Čakovec, Hrvatska), kapaciteta uvarka 2000 L (Slika 5). Sastoji se od 3 posude: komovnjaka koji je ujedno i kotao za kuhanje sladovine, cijednjaka s perforiranim dnom i vrtložnog taložnika (whirpool), 2 centrifugalne pumpe pri čemu jedna služi za prebacivanje sladne komine u cijednjak dok druga služi za recirkulaciju sladne komine, prebacivanje kuhane sladovine u vrtložni taložnjak i prepumpavanje ohmeljene sladovine iz taložnjaka u protustrujni izmjenjivač topline i dalje u cilindrično-konusni fermentor (CKF; Slika 6).



Slika 5. Kuhaona Zmajske pivovare d.o.o., model B-20

U cilindrično-konusnom fermentoru korisnog volumena 4000 L odvijalo se glavno i naknadno vrenje piva. Fermentor je opremljen plaštom za hlađenje s mogućnošću odvojenog hlađenja konusa i ostatka fermentora, temperaturnom sondom koja regulira elektroventile za cirkulaciju rashladnog medija, vakuum ventilom, sigurnosnim ventilom, vrenjačom sa špund ventilom i ventilima za ispust.



Slika 6. CKF (4000 L), Zmajska pivovara d.o.o.

3.1.6.4. Refraktometar

Koncentracija nastalog ekstrakta tijekom pripreme sladovine za obje vrste piva pratila se digitalnim refraktometrom modela MA884, proizvođača Milwaukee Instruments (Rocky Mount, USA).

3.1.6.5. Termostatirana komora

Glavno i naknadno vrenje lager piva odvijalo se u termostatiranoj komori pri 9°C odnosno 11°C. Termoregulator posjeduje temperaturnu sondu koja mjeri temperaturu piva te ima dva režima rada (grijanje i hlađenje). Ako temperatura piva poraste 0,5°C iznad zadane termoregulator će uključiti proces hlađenja, odnosno ako pade 0,5°C ispod zadane termoregulator će uključiti proces grijanja kako bi se postigla prethodno podešena temperatura.

3.1.6.6. Centrifuga

Centrifuga „Harrier 18/80 Sanyo“ (Watford, Engleska) korištena je za izdvajanje kvasca iz piva pri 4500 o/min i izdvajanja proteina pri 10000 o/min.

3.1.6.7. HPLC

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10*AVP* (Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10AD*VP*), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 AD*VP*), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A*VP*), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel^{TM} C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel^{TM} H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A*VP*) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Koristio se za određivanje koncentracije ugljikohidrata, glicerola, mliječne kiseline i etanola.

3.1.6.8. HS-GC

Plinski kromatograf Perkin Elmer Autosystems XL GC (Perkin-Elmer, SAD) sastoji se od „headspace“ sustava za uzorkovanje Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD), uređaja za grijanje kolone (ZB-5MS, Zebron, Phenomenex 60 m x 0,25 mm I.D. x 0,50 μm d_f), FID detektora i računalnog progama TotalChrom.

3.1.7. Informatički programi i obrada rezultata

Za obradu podataka i određivanje koncentracije analiziranih spojeva: maltoze, maltotrioze, glukoze, etanola, glicerola, acetaldehida, 1-propanola, 2-butanola, etil-acetata, 2-metil-1-propanola, 2-metil-1-butanola, 3-metil-1-butanola, etil-butirata, izoamil-acetata, etil-heksanoata, etil-oktanoata i 2-feniletanola koristio se računalni program „Microsoft Excel

2010“.

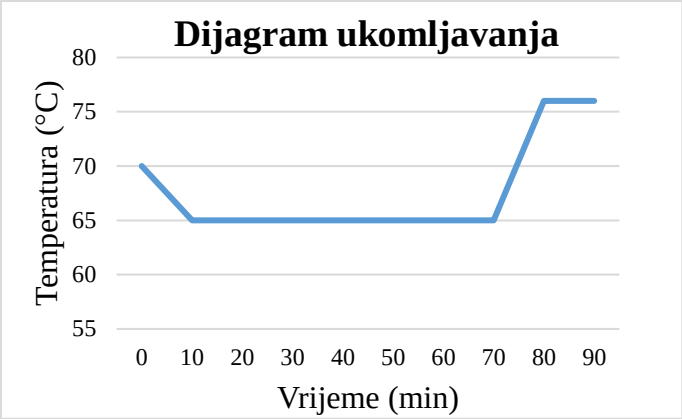
3.2. METODE

3.2.1. Postupci u proizvodnji ale piva

3.2.1.1.Mljevenje i ukomljavanje slada za ale pivo

Za proizvodnju ale piva bilo je potrebno pripremiti dva uvarka od 2000 L. Izvagana količina slada se prebacila u mlin s valjcima gdje se slad samljeo i usipak se pužnim elevatorom prebacio u komovnjak u koji je prebačeno prethodno zagrijanih 1200 L vodovodne vode na 70°C te 155 mL HCl i 93 mL H_2SO_4 radi dobivanja željenog omjera kloridnih i sulfatnih iona. Omjer kloridnih i sulfatnih iona je bitan za organoleptička svojstva piva pri čemu veća koncentracija kloridnih iona intenzivira sladnu aromu dok veća koncentracija sulfatnih iona intenzivira hmeljnu aromu piva (Palmer i Kaminski, 2013). Ukomljavanje se odvijalo jednostupanjskim infuzijskim postupkom. Usipak je ubačen u komovnjak na 70°C kako bi na kraju prebacivanja sladovina završila na željenih 65°C, temperaturi na kojoj se 1h odvijalo ukomljavanje. Miješalo je bilo namješteno na 50% ukupne brzine miješanja tijekom prebacivanja usipka i ukomljavanja na 65°C.

Nakon prebacivanja usipka u komovnjak je ubačeno 150 mL mliječne kiseline kako bi se dobio optimalni pH za enzime koji sudjeluju u reakcijama razgradnje škroba u jednostavnije šećere (glukoza, maltoza, maltotrioza, dekstrini). Nakon sat vremena započinje proces inaktivacije enzima razgradnje škroba. Temperatura se namjestila na 76°C, upalilo se grijanje preko podnice kotla te se brzina miješanja prebacila na veću brzinu rotacije. Kada se dostigla željena temperatura komina je ostavljena 10 minuta kako bi se inaktivirali svi enzimi koji sudjeluju u razgradnji škroba.



Slika 7. Proces ukomljavanja tijekom proizvodnje ale piva

3.2.1.2. Cijeđenje komine ale piva

Za vrijeme inaktivacije enzima pripremio se cijednjak na način da se vodom zagrijanom na 83°C potopila pumpa za prebacivanje sladovine, zagrijao cijednjak preko CIP kugli i potopilo lažno dno (prostor ispod perforirane ploče u cijednjaku) da ne dođe do začepljenja cijeđenja i stvaranja vakuuma. Tijekom ukomljavnja spremnik tople vode (HLT) nadopunjen je do 1800 L i zagrijan na 83°C te je dodano 235 mL HCl i 140 mL H_2SO_4 kako bi se dobio omjer klorida i sulfata identičan onome u vodi za ukomljavanje. Po završetku inaktivacije enzima upalilo se miješalo u obliku noževa u cijednjaku na 10% skale brzine vrtnje da ne dođe do začepljena cijeđenja, ugasi se mješalo u komovnjaku da se ne stvori vrtlog, otvori potpuni ispust iz komovnjaka i pumpom prebaci kompletna komina u cijednjak. Zatim se brzina noževa smanji na pola početne i ispere komovnjak hladnom vodom preko CIP kugli.

Prije početka cijeđenja prebačena komina se recirkulirala preko pumpe za prebacivanje hmeljne kuhane sladovine odnosno sladovine nakon taložnjaka. Komina se recirkulira 5 min što je dovoljno za pročišćavanje komine i nastanak finog filtracijskog kolača. Brzina cijeđenje je bitan faktor za postizanje dobrog aromatskog profila piva jer predugim cijeđenjem previše tanina završava u sladovini, a zatim i u konačnom pivu što nepovoljno utječe na okus piva.

Kada je recirkulacija završila otvorio se ventil prema kotlu za kuhanje sladovine (u ovoj varionici to je ista posuda u kojoj se ukomljava; komovnjak) i ugasila pumpa za recirkulaciju čime je počelo cijeđenje koje je trajalo 1 h i 15 min. Cijeđenje se odvijalo pomoću gravitacijske sile s početkom ispiranja nakon prebačenih 500 L tj. kada su se počeli pojavljivati „suhi otoci“

u cijednjaku. Komina se ispire da bi se povećalo iskorištenje ukomljavanja odnosno prebacio zaostali sladni ekstrakt.

Komina se ispirala s 1800 L, a količina vode za ispiranje se regulirala protočnim ventilom za toplu vodu prema CIP kuglama pri čemu se nakon ocijeđenih 1000 L postupno počela povećavati količina vode za ispiranje. Paralelno sa povećanom količinom vode za ispiranje otvarao se i protočni ventil za ispust ocijeđene sladovine s 40% propusnosti prema potpunom otvaranju odnosnom maksimalnom protoku. Nakon ocijeđenih 1000 L upali se podnica kotla koja je zagrijavala i dogrijavala ocijeđenu sladovinu na 90°C da bi se skratilo vrijeme potrebno za sljedeći korak – kuhanje sladovine.

3.2.1.3. Kuhanje i hmeljenje sladovine za ale pivo

Cijeđenje je zaustavljeno kada se u kotao za kuhanje sladovine prebacilo 2400 L te se ocijeđena sladovina stavila dogrijavati do 97°C grijanjem preko podnice i plašta kotla. Za vrijeme dogrijavanja izvagalo se 200 g hmelja za gorčinu „Columbus“ te se oprao cijednjak i spremnik tople vode u koji je prebačeno novih 1200 L potrebnih za sljedeće ukomljavanje. Nakon dosegnutih 97°C komina se dogrije do vrenja pri čemu se nastala pjena suzbila hladnom vodom preko CIP kugli u komovnjaku/kotlu za kuhanje komine.

Poslije razbijanja pjene ugasilo se grijanje preko plašta te se smanjio protok pare u podnicu kotla kako bi se namjestilo optimalno strujanje sladovine tijekom kuhanja te se dodao hmelj za gorčinu. Kuhanje sladovine trajalo je 60 minuta. Za vrijeme kuhanja ventilator na dimnjaku kotla za kuhanje sladovine je bio upaljen da bi se uklonio ispareni DMS.

3.2.1.4. Hlađenje sladovine

Taložnjak služi za uklanjanje finog proteinsko-taninskog taloga i iskorištenog hmelja iz sladovine. Po završetku kuhanja, vrela sladovina se prebaci u taložnjak. Prethodno se pumpa za prebacivanje sladovine i cjevovod tretiraju parom te se u taložnjak dodao hmelj za aromu i gorčinu: 5 kg „Cascade“, 2,5 kg „Citra“ i 1,25 kg „Chinook“. Dodavanje hmelja u taložnjak je tehnika kojom se uspijeva ekstrahirati i očuvati više hmeljnih ulja koja direktno utječu na aromu

i okus piva. Prebacivanje kuhane sladovine je trajalo 15 minuta kao i zadržavanje sladovine u taložnjaku.

Za vrijeme taloženja postavila su se crijeva koja spajaju taložnjak i CKF te koja su se tretirala parom zajedno s izmjenjivačem topline i posudom za dodavanje kvasca *S. cerevisiae* u kojem je prethodno dodano 3 kg suhog kvasca u 30 L vode na 30°C. Osim zaparivanja, za vrijeme taloženja se dotok kisika spojio na postavljenu sinteriranu cijev na izlazu iz hladnjaka koja služi za *in situ* aeraciju sladovine. Manometar na boci kisika se namjestio na 5 bara i dodavan je tijekom cijelog hlađenja prvog uvarka. Kada se sva vrela sladovina prebacila u taložnjak, komovnjak se oprao i pripremio za novo ukomljavanje.

Hlađenje u protustrujnom izmjenjivaču topline odvija se hladnom vodovodnom vodom i rashladnom smjesom vode i glikola koja se koristi za hlađenje CKF-a. Minutu prije početka hlađenja otvara se dotok rashladnog sredstva i vode. Rashladno sredstvo cirkulira iz hladnjaka nazad u banku leda gdje se ponovo hladi dok se zagrijana voda prebacuje u spremnik tople vode te se koristi za ispiranje sljedećeg uvarka. Nakon 15 minutnog taloženja počinje prebacivanje sladovine u fermentor kroz hladnjak pri čemu se temperatura sladovine namješta na 18°C što je ujedno i početna temperatura glavnog vrenja. Kada se temperatura sladovine ustalila inokuliran je kvasac *in situ* ispuštanjem iz posude u cijevovod kojim ohlađena sladovina ide u CKF. Hlađenje je trajalo 47 minuta. Duljina trajanja ima bitan utjecaj na konačan aromatski profil piva jer se predugim hlađenjem većina hmeljnih ulja degradira.

3.2.1.5. Glavno i naknadno vrenje ale piva

Glavno i naknadno vrenje ale piva odvijalo se u opranom i dezinficiranom CKF-u korisnog volumena 4000 L, a za njegovo punjenje bila su potrebna 2 uvarka od 2000 L. Glavno vrenje je započelo na 18°C i kroz jedan dan temperatura je narasla do namještenih 20,2°C. Treći dan nakon inokulacije temperatura se namjestila na 21°C kako bi se snizila koncentracija diacetila i lakše prevreo zaostali ekstrakt. Dva dana prije kraja glavnog vrenja pritvoren je špund ventil kako bi se postigao nadtlak u fermentoru od 0,8 bara. Neprevreli ekstrakt se mjerio svaki dan fermentacije i nakon što je mjerenje specifične gustoće areometrom tri dana zaredom pokazalo SG = 1.011 temperatura je spuštena na 5°C pri čemu je započelo odležavanje koje je trajalo 26 dana.

3.2.2. Kuhanje sladovine, glavno i naknadno vrenje lager piva

Za pripravu lager piva korišteno je 4 L sladovine pripravljene u laboratoriju. Sladovina je prebačena u 5 litarsku tikvicu, dodano je 10 g hmelja „Styrian Golding“ za gorčinu i autoklavirana na 100°C kroz sat vremena. Nakon autoklaviranja u tikvicu je dodano još 10 g hmelja „Styrian Golding“ za aromu te je tikvica ostavljena da se ohladi na temperaturu vrenja (9°C). Ohlađena i hmeljena sladovina se dobro promiješala kako bi se što bolje aerirala prije inokulacije te zatim inokulirala s 400 mL laboratorijski uzgojene kulture kvasca *S. pastorianus* koncentracije 21×10^6 stanica/mL. Inokulirana tikvica prebačena je u termostatiranu komoru Zmajske pivovare d.o.o.

Glavno vrenje lager piva odvijalo se u steriliziranoj tikvici od 5 L. Temperatura inokulacije je bila jednaka temperaturi vrenja odnosno 9°C. Nakon trećeg dana glavnog vrenja temperatura je podignuta na 11°C kako bi se potaknuo proces razgradnje diacetila i potaknulo previranje zaostalog ekstrakta. Glavno vrenje je trajalo 6 dana odnosno dok tri dana zaredom nije utvrđen SG = 1,015. Nakon trećeg mjerenja spuštena je temperatura na 1°C čime je započelo odležavanje koje je trajalo 14 dana.

3.2.3. Analitičke metode

3.2.3.1. Uzorkovanje

Za vrijeme pripreme sladovine uzimani su uzorci tijekom ukomljavanja, prije kuhanja sladovine i nakon hlađenja. Tijekom glavnog vrenja uzorci su uzimati dva puta dnevno, svakih 12 sati, a za vrijeme odležavanja uzorci su uzimati svakih 48 sati.

Uzorci ale piva uzimani su preko bočnog ventila na koji je montirana ispusna slavina dok su uzorci lager piva uzimati direktno iz tikvice. Za dezinfekciju aparature prilikom uzimanja uzorka koristilo se dezinfekcijsko sredstvo Star San koje proizvodi tvrtka Five Star Chemicals.

3.2.3.2. Temperatura

Temperatura je praćena tijekom ukomljavanja, cijeđenja, kuhanja sladovine, pripreme vode, hlađenja, glavnog i naknadnog vrenja, a mjerena je pomoću temperaturnih sondi koje su ugrađene u kotlove varionice, spremnik tople vode i CKF-e.

3.2.3.3. Tlak

Tijekom procesa glavnog vrenja i odležavanja ale piva tlak se pratio putem ugrađenog manometra na cilindrično - konusnom fermentoru. Kod proizvodnje lager piva procesi glavnog i naknadnog vrenja su provedeni pod atmosferskim tlakom.

3.2.3.4. pH

pH se mjerio pH-metrom za vrijeme ukomljavanja radi podešavanja optimalnog pH.

3.2.3.5. Koncentracija ekstrakta u sladovini i mladom pivu

Koncentracija ekstrakta u sladovini pratila se mjerenjem optičke gustoće digitalnim refraktometrom, a koncentracija ekstrakta u mladom pivu pratila se mjerenjem specifične gustoće areometrom.

3.2.3.6. Određivanje supstrata i produkata glavnog i naknadnog vrenja ale i lager piva visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Za određivanje koncentracije supstrata i produkata glavnog i naknadnog vrenja lager i ale piva koristio se uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10A$_{VP}$ (Japan).

Iz uzoraka izuzetih tijekom glavnog i naknadnog vrenja ale i lager piva centrifugiranjem (4500 *g*, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) je izdvojena biomasa kvasca. Dobivenim supernatantima uzoraka dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata (γ = 100 g L^{-1}) u omjeru volumena 1:1 (V = 700 μL). Dobivena otopina intenzivno je izmješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 20 minuta pri sobnoj temperaturi da se istalože proteini. Centrifugiranjem (10000 *g*, 5 min, 4 °C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je razrijeđen 10 puta u odmjernim tikvicama te zatim profiltriran pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 μm (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Za pripravu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost manja od 1 µS. Ovako pripravljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A*VP* sustava.

Za analizu priređenih uzoraka korištena je modificirana kromatografska metoda opisana u radovima Trontel i sur. (2010, 2011). Kao mobilna faza korištena je 0,1% otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20 µL uzorka u sustav. Protok mobilne faze je 0,5 mL min^{-1}, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel^{TM} C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel^{TM} H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma.

Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 4).

Tablica 4. Jednadžbe baždarnih pravaca i njihova retencijska vremena

Spoj	t_{R*} **(min)**	**jednandžba baždarnog pravca**	R^2 **(-)**
glukoza	14,045 ± 0,040	A = 226208,50 $\gamma_{glukoza}$ - 1433,13	1,0000
maltoza	11,885± 0,038	A = 317570 $\gamma_{maltoza}$ -58302	0,99
maltotrioza	10,525± 0,033	A = 336803 $\gamma_{maltotrioza}$ + 16582	0,99
mliječna kiselina	18,520 ± 0,028	A = 119006 $\gamma_{mliječna\ kiselina}$ + 1369,5	0,9999
octena kiselina	19,825 ± 0,026	A = 112445·$\gamma_{octena\ kiselina}$ + 1276,1	0,9989
glicerol	19,171 ± 0,028	A = 226425$\gamma_{glicerol}$ - 3537,8	0,9996
etanol	25,406 ± 0,014	A = 819297 φ_{etanol} - 1766,9	0,9992

*t_R izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; A, površina

3.2.3.7.Određivanje hlapivih komponenti ale i lager piva plinskom „headspace“ kromatografijom (HS-GC_FID)

Analiza sastojaka lako hlapljivog spojeva (aldehida, estera i viših alkohola, Tablica 5.) u pivu provedena je na plinskom kromatografu Perkin Elmer Autosystems XL GC opremljenom detektorom FID (Perkin-Elmer, SAD) i sustavom za uzimanje uzoraka Perkin Elmer Headspace Sampler 40XL (Perkin Elmer, SAD). Za održavanje plamena na FID-u upotrijebljeni su vodik i zrak. Uvjeti pri kojima je provedeno termostatiranje uzorka kako bi se uspostavila ravnoteža između tekuće i plinske faze, injektiranje uzorka sustavom za uzorkovanje, kromatografsko razdvajanje te detekcija spojeva u uzorcima piva navedeni su u Tablici 5. Baždarni dijagrami prikazani su u poglavlju Prilozi (poglavlje 7.1.).

Uzorak piva za analizu pripremljen je na slijedeći način: u odmjernu tikvicu od 50 mL dodano je 5 μL internog standarda (1-butanol) i tikvica je nadopunjena do oznake s pivom. Sadržaj je dobro izmješan i 10 mL tako pripremljenog uzorka stavljeno je u vialu volumena 22 mL.

Tablica 5. Retencijska vremena određenih lako hlapivih spojeva piva

	Spoj*	**t_R/min**
1	Acetaldehid	4,14
2	Etanol	4,58-5,00
3	1-propanol	6,37
4	2-butanol	7,46
5	Etil-acetat	7,71
6	2-metil-1-propanol (i-propanol)	8,23
7	N-butanol (IS)	9,51
8	3-metil-1-butanol	12,26
9	2-metil-1-butanol	12,43
10	Etil-butirat	14,49
11	Izoamil-acetat	16,80
12	Etil-heksanoat	19,95
13	2-feniletanol	22,98

14	Etil-oktanoat	24,25
15	2-feniletilacetat	26,11

* Baždarni pravci za navedene spojeve prikazani su u poglavlju Prilozi (poglavlje 7.1)

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proučavana je proizvodnja ale i lager piva te je provedena analiza supstrata, etanola, glicerola, mliječne kiseline i lako hlapivih spojeva (estera, acetaldehida i viših alkohola) tijekom glavnog i naknadnog vrenja oba tipa piva.

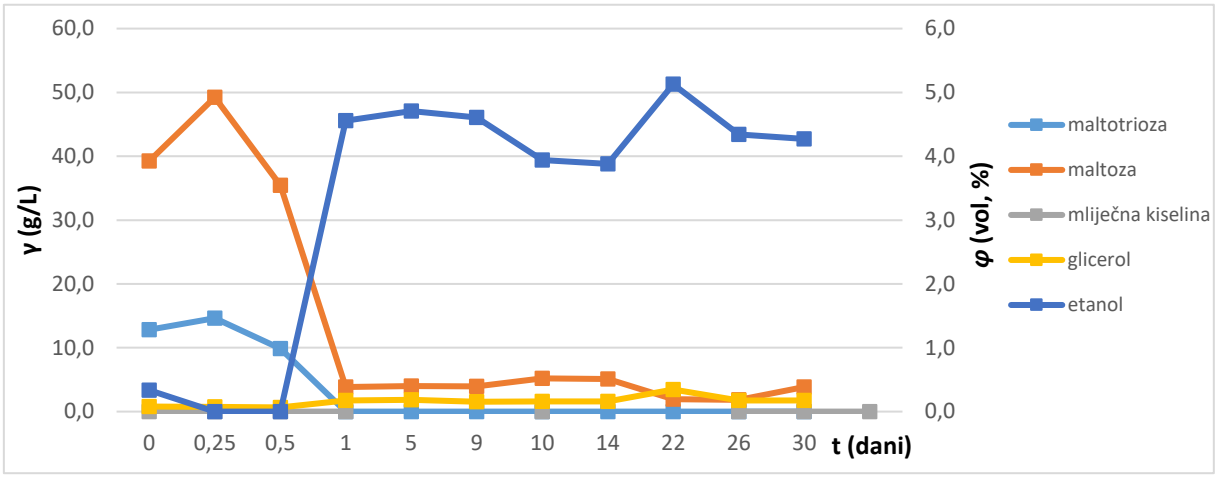
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati analize ale piva (tipa *Pale ale*) dok su u poglavlju 4.2. prikazani rezultati analize lager piva (tipa *Doppelbock*).

4.1. PROIZVODNJA I NADZOR ALE PIVA (tipa *Pale Ale*)

U ovom dijelu istraživanja proučavan je proces glavnog i naknadnog vrenja ale piva te su analizirani sastojci arome i kvalitete proizvedenog piva. Istraživanje *Pale ale* piva je započelo pripremom sladovine koje se sastoji od 5 glavnih koraka: ukomljavanje, cijeđenje, kuhanje hmeljene sladovine, taloženje i hlađenje. Ohlađena sladovina je zatim pumpom prebačena u CKF na glavno i naknadno vrenje pri čemu je nacijepljena ale kvascem *S. cerevisiae* SafAle^{TM} US-0S na putu do CKF-a. Parametri kojima se pratio proces ukomljavanja su temperatura, vrijeme i pH (Kühlbeck i sur., 2005). Ukomljavanje je trajalo sat vremena na 65°C, a pH je podešen na 5,3 s 175 mL mliječne kiseline radi postizanja optimalnog pH za aktivnost amilolitičkih enzima (β i α amilaze). Proces fermentacije i ukomljavanja praćen je kontrolom temperature i specifične gustoće mladog piva te analitičkim određivanjem ispitivanih supstrata, alkohola i lakohlapivih komponenti piva.

Koncentracija analiziranih fermentabilnih šećera ohlađene sladovine je bila: 14,6 g/L maltotrioze, 49,2 g/L maltoze i 8,5 g/L glukoze što je u skladu s literaturnim podacima za prosječni udio fermentabilnih šećera u sladovini (Stewart, 2009).

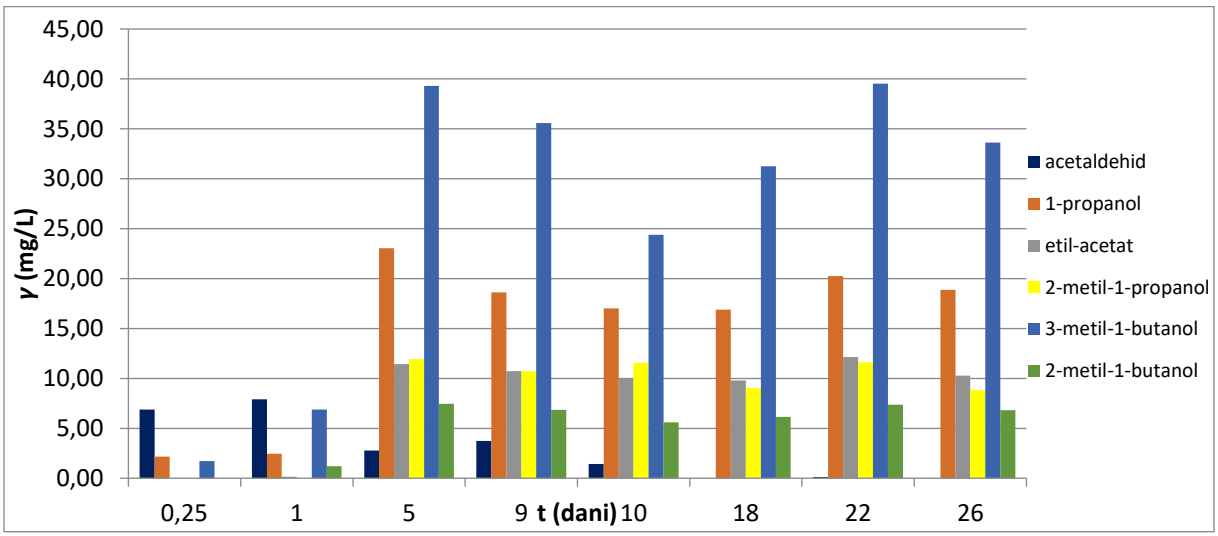
Na kraju odležavanja ovog tipa piva udio fermentabilnih šećera je bio: 0,0% maltotrioze, 3,8% maltoze i 0,7% glukoze. Na Slici 8 jasno je vidljivo da su konačne vrijednosti analiziranih supstrata dosegnute već nakon prvog dana glavnog vrenja što upućuje na povoljne uvjete vrenja i visoku metaboličku aktivnost kvasca. Tijekom vrenja kvasac iz sladovine prvo troši monosaharide, a zatim disaharide i trisaharide. S obzirom da kvasac ne može previrati dekstrine, kraj glavnog vrenja je vidljiv kroz činjenicu da su koncentracije ekstrakta, glicerola i etanola poprimile približno konstantnu vrijednost (Marić, 2009). Međutim, potrebno je istaknuti da su zabilježene određene oscilacije koncentracije etanola kao posljedica analitičkih pogrešaka.



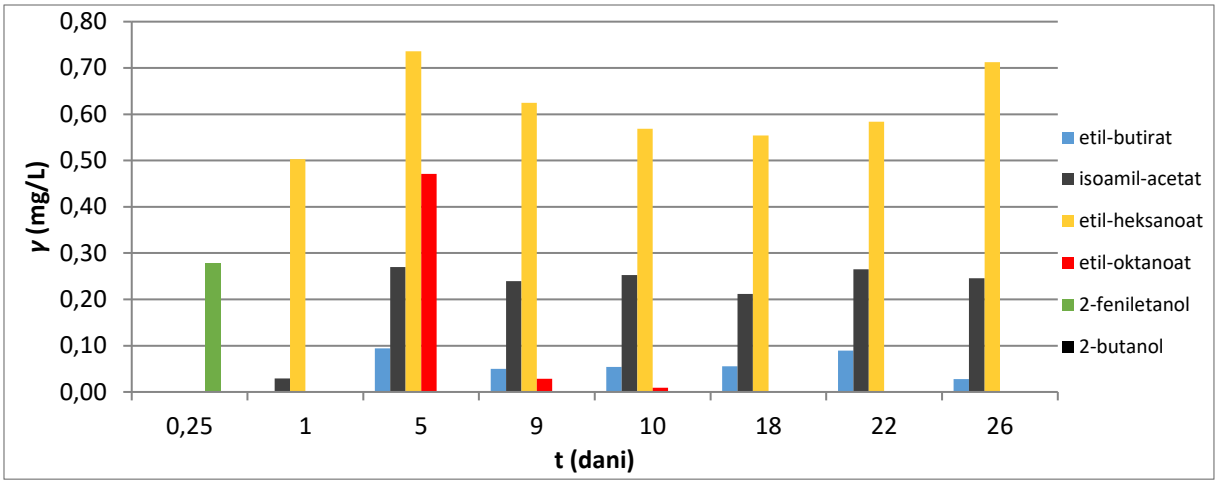
Slika 8. Promjena koncentracije fermentabilnih šećera, alkohola i mliječne kiseline tijekom glavnog i naknadnog vrenja ale piva

Volumni udio etanola na kraju glavnog vrenja je bio 4,7% vol/vol dok je koncentracija glicerola iznosila 1,7 g/L što se poklapa s prosječnom koncentracijom glicerola u gotovom ale pivu (Klopper i sur., 1986). Prisutnost mliječne kiseline u ale pivu nije registrirana tijekom cijelog procesa glavnog i naknadnog vrenja.

Rezultati analize lakohlapivih spojeva ale piva prikazani su na slikama 9. i 10.



Slika 9. Promjena koncentracije acetaldehida, viših alkohola i estera tijekom glavnog i naknadnog vrenja ale piva



Slika 10. Promjena koncentracije estera, 2- butanola u 2-feniletanola tijekom glavnog i naknadnog vrenja ale piva

Na osnovi rezultata analiza vidljivo je da je najveća koncentracija acetaldehida zabilježena na kraju glavnog vrenja (7,90 mg/L) te da se njegova koncentracija tijekom procesa odležavanja smanjuje. Na kraju naknadnog vrenja prisutnost acetaldehida nije registrirana. Smanjenje koncentracije acetaldehida je pokazatelj starenja mladog piva i u skladu je s literaturom (Otter i Taylor, 1971).

Na kraju odležavanja piva sastav viših alkohola je iznosio: 18,89 mg/L 1-propanola, 8,25 mg/L 2-metil-1-propanola, 33,65 mg/L 3-metil-1-butanola, 6,82 mg/L 2-metil-1-butanola dok prisutnost 2-feniletanola nije detektirana. Rezultati prikazani na slici 9. u skladu su s literaturnim podacima (Hughes i Baxter, 2001).

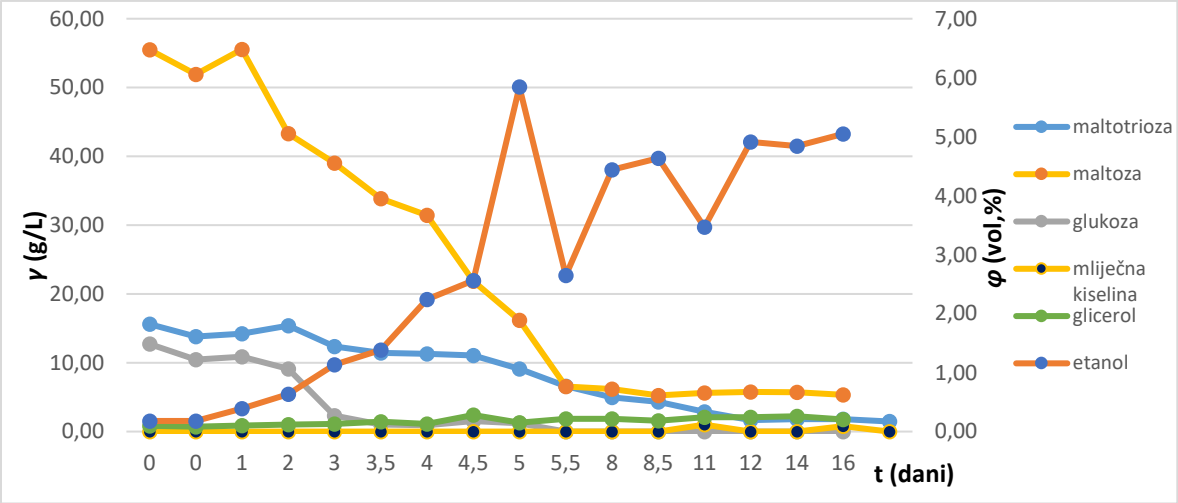
Nadalje, potrebno je istaknuti da su najveće koncentracije viših alkohola zabilježene peti dan odnosno zadnji dan glavnog vrenja dok se za vrijeme doviranja koncentracija viših alkohola smanjila uglavnom zbog njihove lake hlapivosti što je u skladu s literaturom (Hughes i Baxter, 2001).

2-butanol nije detektiran u ale pivu što je očekivano jer je pokazatelj kontaminacija piva bakterijama roda *Lactobacillus*, najčešće vrste *Lactobacillus brevis* (Makarova i sur., 2006).

Koncentracije estera u gotovom ale pivu su: 10,26 mg/L etil-acetata, 0,25 mg/L izoamil-acetata, 0,71 mg/L etil-heksaonata, 0,03 mg/L etil-butirata, a prisutnost etil-oktanoata nije registrirana u pivu. Ovi podaci su u skladu s literaturnim podacima (Hughes i Baxter, 2001).

4.2. PROIZVODNJA I NADZOR LAGER PIVA (tipa *Doppelbock*)

Za pripremu lager piva koristila se sladovina pripremljena infuzijskim postupkom u koju je dodan hmelj te je autoklavirana umjesto kuhanja. Ohlađena sladovina je inokulirana lager kvascem čime je započeo proces glavnog vrenja. Rezultati nadzora procesa proizvodnje lager piva prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Promjena koncentracije fermentabilnih šećera, alkohola i mliječne kiseline tijekom glavnog i naknadnog vrenja lager piva

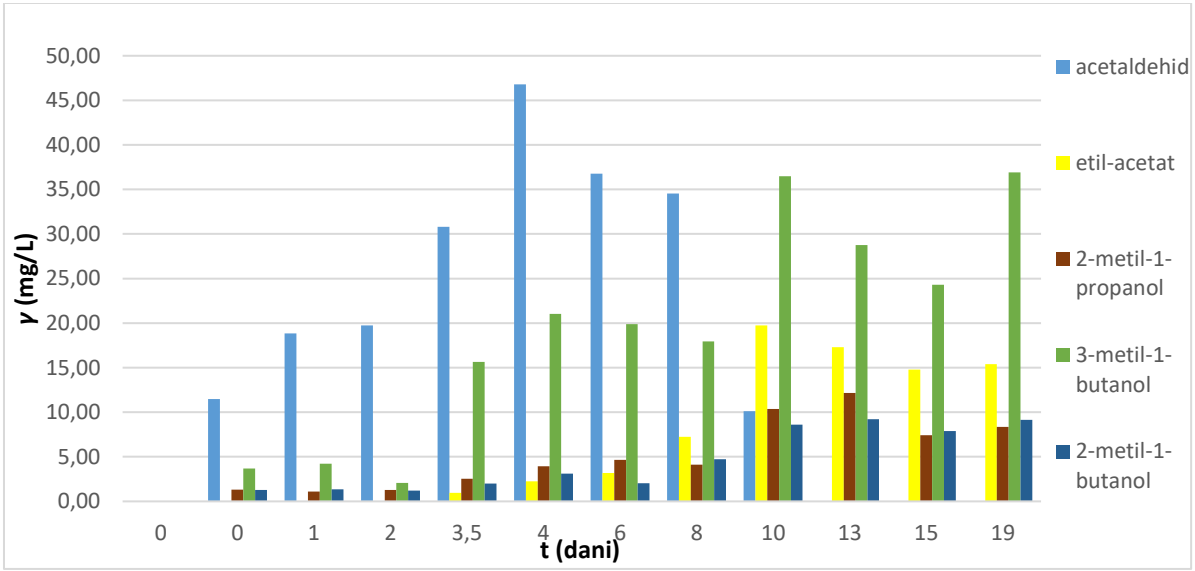
Rezultati analiza pokazuju da je početna koncentracija analiziranih fermentabilnih šećera iznosila: 15,61 g/L maltotrioze, 55,45 g/L maltoze i 12,72 g/L glukoze što je u skladu s literaturom (Stewart, 2009). Nadalje, iz rezultata je vidljivo da su konačne koncentracije šećera: 1,46 g/L maltotrioze, 5,35 g/L maltoze i 0,0 g/L glukoze te je jasno da je nakon potrošnje većine glukoze lager kvasac počeo previrati maltozu i potom maltotriozu što se poklapa s literaturom (Marić, 2009). Konačne koncentracije šećera u pivu su u skladu s literaturom (Hughes i Baxter, 2001).

Volumni udio etanola na kraju procesa odležavanja je iznosio 5,04% vol/vol dok je koncentracija glicerola iznosila 2,21 g/L. Prosječna koncentracija glicerola u lager pivima iznosi oko 1,5 g/L što znači da korišteni lager kvasac ima sposobnost sinteze veće količine

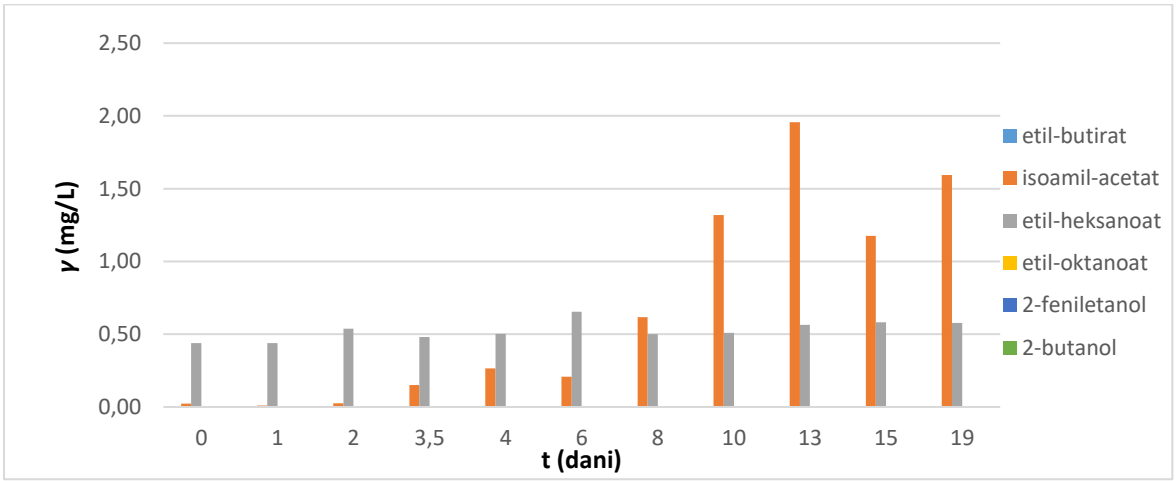
glicerola od uobičajne za kvasce donjeg vrenja (Klopper i sur., 1986). Ovdje je također potrebno istaknuti da su zabilježene oscilacije koncentracije etanola kao posljedica analitičkih pogrešaka.

Tijekom cijelog procesa vrenja i doviranja nije nastala mliječna kiselina. Osim laktata u lager pivu nema ni 2-butanola čime je potvrđeno da nije došlo do kontaminacije piva bakterijama mliječne kiseline (Slika 11).

Najveća koncentracija acetaldehida registrirana je četvrtog dana vrenja i iznosila je 46,79 mg/L da bi odležavanjem kvasac asimilirao sav acetaldehid i uklonio ga iz piva (Slika 12). Promjena koncentracije estera i viših alkohola tijekom glavnom i naknadnog vrenja piva prikazana je na Slikama 12 i 13.



Slika 12. Promjena koncentracije acetaldehida, viših alkohola i estera tijekom glavnog i naknadnog vrenja lager piva



Slika 13. Promjena koncentracije estera, 2- butanola u 2-feniletanola tijekom glavnog i naknadnog vrenja lager piva

Koncentracija viših alkohola u gotovom lager pivu iznosila je: 11,12 mg/L 1-propanola, 8,36 mg/L 2-metil-1-propanol, 36,90 mg/L 3-metanol-1-butanol, 9,13 mg/L 2-metil-1-butanol dok 2-feniletanola nije bilo u pivu. Dobiveni rezultati odgovaraju prosječnim koncentracijama viših alkohola te su sukladni s literaturnim (Hughes i Baxter, 2001). Iz podataka je vidljivo da koncentracija viših alkohola raste za vrijeme odležavanja što se slaže s literaturom (Grba, 2010).

Nastala koncentracija estera na kraju odležavanja iznosila je: 15,41 mg/L etil-acetata, 1,59 mg/L izoamil-acetata, 0,58 mg/L etil-heksanoata dok etil-oktanoata i etil-butirata nije bilo u pivu. Prethodno navedeni podaci u skladu su s literaturom (Hughes i Baxter, 2001).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Procesom ukomljavanja za proizvodnju ale piva u industrijskom mjerilu nastalo je 14,6 g/L maltotrioze, 49,2 g/L maltoze i 8,5 g/L glukoze, a korištena sladovina za lager pivo u laboratorijskom mjerilu sadržavala je 15,61 g/L maltotrioze, 55,49 g/L maltoze i 12,72 g/L glukoze odnosno 6,47% više maltotrioze, 11,34% više maltoze i 45,55% više glukoze prema ale pivu. Sumarno, sladovina za lager pivo sadržavala je 13,74% više fermentabilnih šećera u odnosu na sladovinu za ale pivo jer se radi o *Doppelbock* vrsti piva za koju je potrebna veća količina fermentabilnih šećera.

2. Pravilnim vođenjem procesa glavnog i naknadnog vrenja lager i ale kvasci proizvode pivo visoke kvalitete u vremenskom razdoblju od 20 odnosno 30 dana.

3. Tijekom glavnog vrenja ale kvasac *Saccharomyces cerevisiae* proizveo je 4,30 vol/vol etanola i 1,70 g/L glicerola za 24 sata pri T_{ferm}=20°C dok je lager kvasac *Saccharomyces pastorianus* proizveo 5,04 vol/vol etanola i 2,21 g/L glicerola što je 14,68% više etanola odnosno 23,08% više glicerola od ale kvasca u vremenu od 16 dana pri T_{ferm}=9°C. Međutim, kod oba kvasca konačna atenuacija je bila približno jednaka.

4. Svi viši alkoholi i esteri u ale pivu proizvedeni su za vrijeme glavnog vrenja, a tijekom odležavanja koncentracija im ostaje približno konstantna. Ale kvasac nije sintetizirao 2-feniletanol i etil-oktanoat. U lager pivu lakohlapivi spojevi nastaju za vrijeme glavnog i naknadnog vrenja pri čemu viši lakohlapivi spojevi nastaju za vrijeme odležavanja. Lager kvasac nije sintetizirao 2-feniletanol, etil-butirat i etil-oktanoat.

5. U lager i ale pivu koncentracije dobivenih estera (etil-acetata, izoamil-acetata, etil-heksaonata i etil-butirata) i viših alkohola (1-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metanol-1-butanola, 2-metil-1-butanola) su u očekivanim koncentracijama. Lager kvasac je proizveo 1,32% više 2-metil-1-propanola, 8,81% više 3-metanol-1-butanola, 25,30% više 2-metil-1-butanola, 33,42% više etil-acetata i 84,28% više izoamil-acetata dok je ale kvasac proizveo 18,31% više etil-heksanoata i 41,13% više 1-propanola. Ale

kvasac je također proizveo 0,03 g/L etil-butirata kojeg nije bilo u lager pivu. Ovakav različiti sastav nastalih lakohlapivih spojeva utječe na različiti profil arome i okusa proizvedenog lager i ale piva.

6. LITERATURA

Anderson, E., Martin, P. A. (1975) The sporulation and mating of brewing yeasts. *J. I. Brewing* **81**, 242-247.

Anonymus 1 (2017) Spolni ciklus *S. cerevisiae*, <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl7>. Pristupljeno 15. lipnja 2017.

Anonymus 2 (2017) Pyruvate decarboxylase, <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyruvate_decarboxylase>. Pristupljeno 17. lipnja 2017.

Anonymus 3 (2017) Glycerol biosynthesis, <https://www.researchgate.net/figure/273460036_fig1_Fig-1-Glycerol-biosynthesis-and-CO-2-production-Glycerol-biosynthesis-from>. Pristupljeno 18. lipnja 2017.

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

Boer, V. M., Tai, S. L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M. C., Piper, M. D., de Winde, J. H., Pronk, J. T., Daran, J. M. (2007) Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* **7**, 604-620.

Chang, Y. S., Dubin, R. A., Perkins, E., Michels, C. A., Needleman, R. B. (1989) Identification and characterization of the maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. Bacteriol*. **171**, 6148-6154.

Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., Delvaux F R. (2004) Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(3), 602–608.

Crumplen, R. M., Slaughter, J. C., Stewart, G. G. (1996) Characteristics of maltose transporter activity in an ale and large strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **231**, 448–452

Day, R. E., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Dawes I. W. (2002) Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast* **19**(12), 1015-1027.

Derrick, S., Large, P. J. (1993) Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2783–2792.

Dickinson, J. R., Salgado, L. E., Hewlins, M. J. (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. **278**, 8028-8034.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., Hewlins, M. J. (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **275**, 10937-10942.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Hewlins, M. J. (1998) An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 25751-25756.

Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., Hewlins, M. J. (1997) A ^{13}C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **272**, 26871-26878.

Driscoll, C. A., Macdonald, D. W., O'Brien, S. J. (2009) From wild animals todomestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proc. Natl. Acad*. **106**, 9971–9978.

Esposito, R. E., Esposito, M. S. (1974) Genetic recombination and commitment to meiosis in *Saccharomyces. Proc. Natl. Acad. Sci*. **71**(8), 3172–3176.

Fowell, R. R. (1969) Biology Of Yeasts Vol. I. **U:** The Yeasts (Rose, A. H., Harrison, J., ured.). Academic Press, New York, str. 303.

Fraenkel, D. G. (1982) Carbohydrate Metabolism. **U**: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: The Metabolism and Gene Expression (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R., ured.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str. 1–37.

Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K. J. (2016) Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* **166**(6), 1397-1410.

Gibson, B. R., Storgards, E., Krogerus, K., Vidgren, V. (2013) Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Frohberg lager yeast strains and the parental species Saccharomyces eubayanus. *Yeast* **30**, 255–266.

Gilliland, R. B., B.Sc., F.R.I.C. (1961) *Brettanomyces*: I. Occurrence, characteristics and effects on beer flavour. *J. I. Brewing* **67**(3), 257-261.

Grba, S. (2010) Proizvodnja piva. **U**: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji (Grba, S. ured.) Plejada, Zagreb, str. 41-94.

Han, E. K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., Michels, C. A. (1995) Characterization of AGT1 encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* **17**(6), 1093-1107.

Hazelwood L. A., Daran, J., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. (2008) The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(8), 2259-2266.

Herskowitz, I., Rine, J., Strathern, J. (1992) Mating-type Determination and Mating-type Interconversion in *Saccharomyces cerevisiae.* **U**: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression (Jones, E. W., ured.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, str: 583-656.

Hu, Z., Yue, Y., Jiang, H., Zhang, B., Sherwood, P. W., Michels, C. A. (2000) Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of *MAL* gene expression in *Saccharomyces*. *Genetics* **154**, 121–132.

Hughes, P. S., Baxter, E. D. (2001) Flavour Determinants of Beer Quality. **U**: Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects (Hughes, P. S., Baxter, E. D. ured.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 40-73.

Jones, M., Pierce J. S. (1964) Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. I. Brewing* **70**, 307-315.

Käppeli, O. (1986) Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **28**, 181-209.

Katz, S. H., Maytag, F. (1991) Brewing an ancient beer. *Archaeology* **44**, 24–27.

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.

Kühbeck, F., Dickel , T., Krottenthaler , M., Back , W., Mitzcherling, M., Delgado, A., Becker, T. (2005) Effects of Mashing Parameters on Mash ß - Glucan, FAN and Soluble Extract Levels. *J. I. Brewing* **111**(3), 316-327.

Kunze, W. (2004) Technology brewing and malting, 3. izd., VLB, Berlin.

Libkind, D., Hittinger, C. T., Velério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Jonhston, M., Gonçalves, P., Sampalio, J. P. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**(35), 14539–14544.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney. P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **46**, 3-26.

Maaheimo, H., Fiaux, J., Cakar, Z. P., Bailey, J. E., Sauer, U., Szyperski, T. (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ^{13}C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* **26**(8), 2464-2479.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(42), 15611-15616.

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

Marić, V., Nadvornik, Z. (1995) Pivo – tekuća hrana. Prehrambeno – tehnološki inženjering, Zagreb.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., Turakainen, H., Korhola, M. (1996) Identification of the alpha-galactosidase *MEL* genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*: a new gene *MEL11*. *Genet. Res.* **67**(2), 101-108.

Norbeck J. Pahlman A., Akhtar N., Blomberg A., Adler L. (1996) Purification and characterisation of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem*. **3**, 13875-13881.

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.

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

Otter, G. E., Taylor, L. (1971) Estimation and Occurrence of Acetaldehyde in Beer. *J. I. Brewing* **77**, 467-472.

Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., van Tuijl, A., de Vries, S., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2000) In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.* **182**, 2823-2830.

Palmer, J. J. (2006a) Chaper 14: How the mash works. **U**: How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time (Palmer J., ured.). Brewers publications, Boulder, str. 129-136.

Palmer J. J. (2006b) Chaper 21: Common off flavours. **U**: How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time (Palmer J., ured.). Brewers publications, Boulder, str. 212-219.

Palmer, J. J., Kamisnki, C. (2013) 7. Adjusting Water for Style. **U**: Water: A Comprehensive Guide For Brewers (deLange, A. J., Brungard, M., ured.). Brewers publications, Boulder, str. 186-219.

Passonneau, J. V., Lowry, O. H. (1962) Phosphofructokinase and the Pasteur effect, *Biochem. Biophys. Ress. Commun*. **7**(1), 10-15.

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

Phaweni, M., O'Connor-Cox, E. S. C, Pickerell, A. T. W., Axcell, B. (1992) The Effects of Glucose Adjunct in High Gravity Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* 2036. *J. I. Brewing* **98**(3), 179-185.

Quain D. E. (1986) Differentiation of brewer yeast. *J. I. Brewing* **92**(5), 435-438.

Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006) Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. **U**: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Gábor, P., Rosa, C., ured.). Springer, Berlin/Heidelberg, str. 101-121.

Saerens, S. M., Duong, C. T., Nevoigt, E. (2010) Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **86**, 1195–1212.

Saerens S. M., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.* **281**(7), 4446-4456.

Salema-Oo, M., Valãdao Pinto, V., Gonçalves, P., Spencer-Martins, I. (2005) Maltotriose Utilization by Industrial *Saccharomyces* Strains: Characterization of a New Member of the α-Glucoside Transporter Family. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9), 5044-5049.

Shimatzu's Total Support for Beer Analysis (2015) Shimatzu Scientific Instruments, Maryland.

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

Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y. (1998) Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus. Yeast* **14**, 923–933.

Thurston, P. A., Quain, D. E., Tubb, R. S. (1982) Lipid-metabolism and the regulation of volatile ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. I. Brewing* **88**, 90-94.

Tonsmeire, M. (2014) American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations. 1. izdanje. Boulder, Brewers Publications.

Trontel, A., Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2011) Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol*. **49**(1), 75-82.

Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010) Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^{T} in batch process. *Food Technol. Biotechnol*. **48**(3), 352-361.

Vidgren, V., Huuskonen, A., Virtanen, H., Ruohonen, L., Londesborough, J. (2009) Improved fermentation performance of a lager yeast after repair of its *AGT1* maltose and maltotriose transporter genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2333–2345.

Vuralhan, Z., Luttik, M. A., Tai, S. L., Boer, V. M., Morais, M. A., Schipper, D., Almering, M. J., Kotter, P., Dickinson, J. R., Daran, J. M., Pronk, J. T. (2005) Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol*. **71**, 3276-3284.

Wang, X., Bali, M., Medintz, I., Michels, C. A. (2002) Intracellular maltose is sufficient to induce MAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **1**, 696–703.

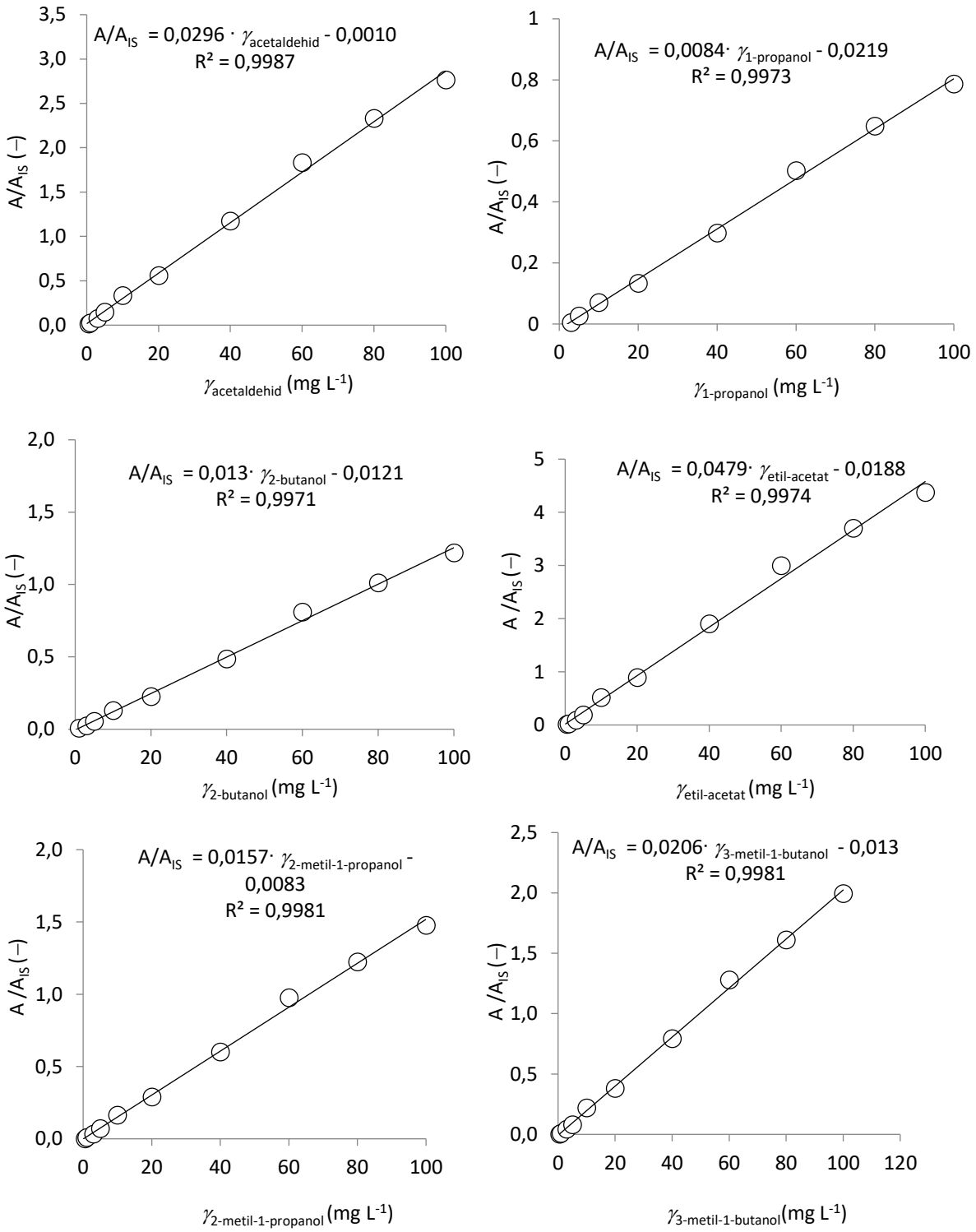
White, C., Zainasheff, J. (2010) Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Publication, Boulder, Colorado.

White, M. D., Payne, K. A. P., Fisher, K., Marshall, S. A., Parker, D., Rattray, N. J. W., Trivedi, D. K., Goodacre, R., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S. (2015) UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis. *Nature* **522**, 502–506.

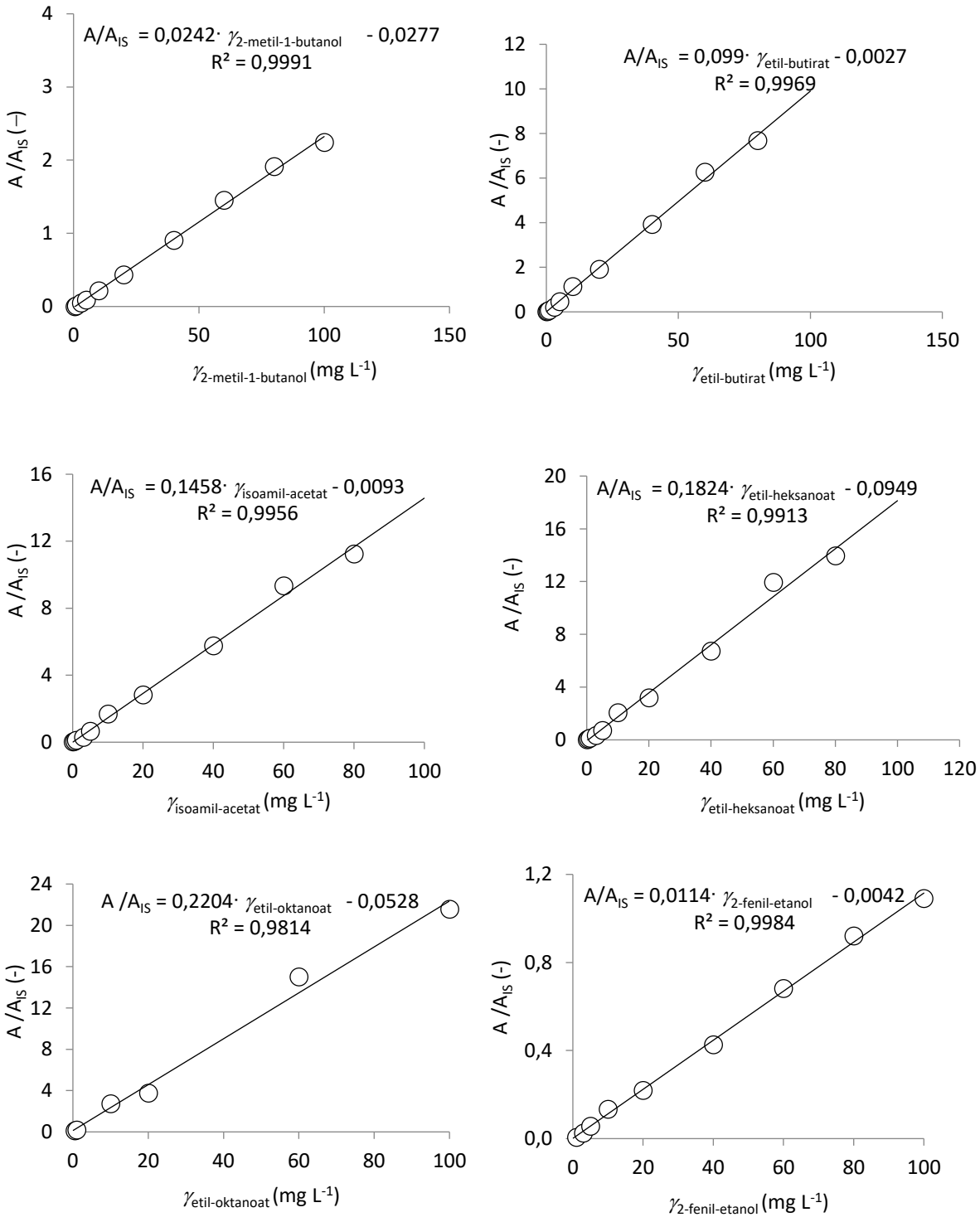
Zastrow, C. R., Mattos, M. A., Hollatz, C., Stambuk, B. (2000) Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 455-459.

7. PRILOZI

7.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA PLINSKOM „HEAD SPACE“ KROMATOGRAFIJOM

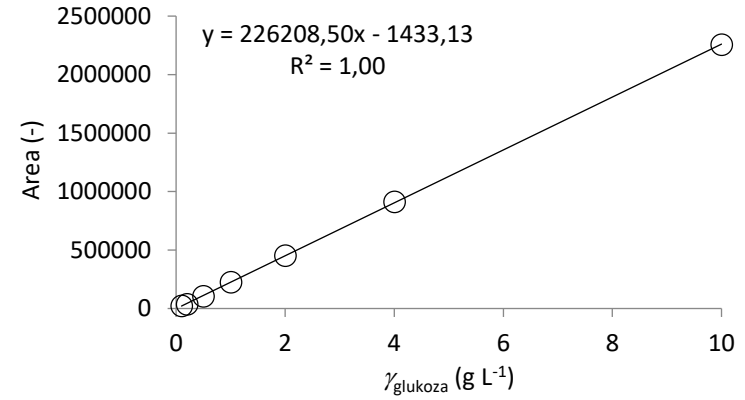


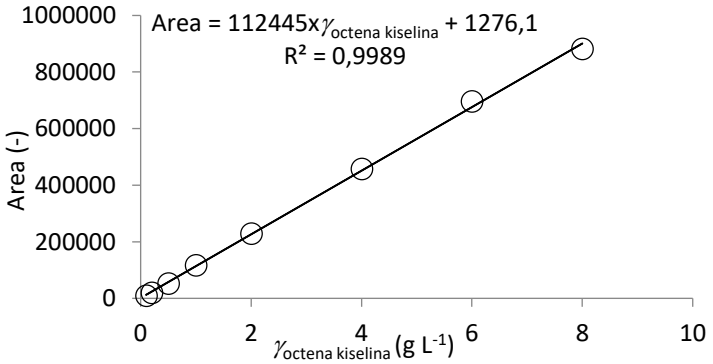
Slika 14.a Baždarni pravci za određivanje hlapivih komponenti piva HS-GC-FID metodom

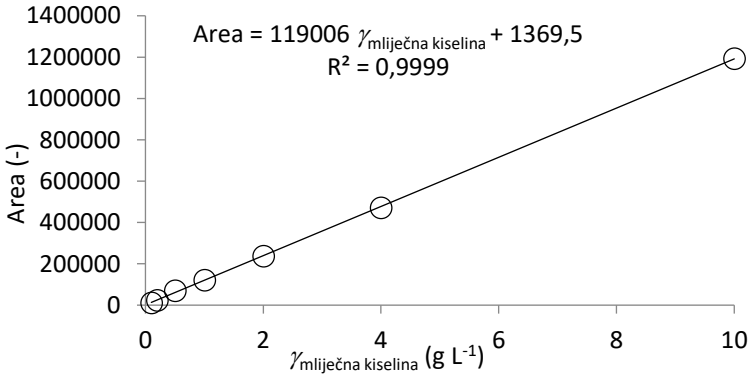


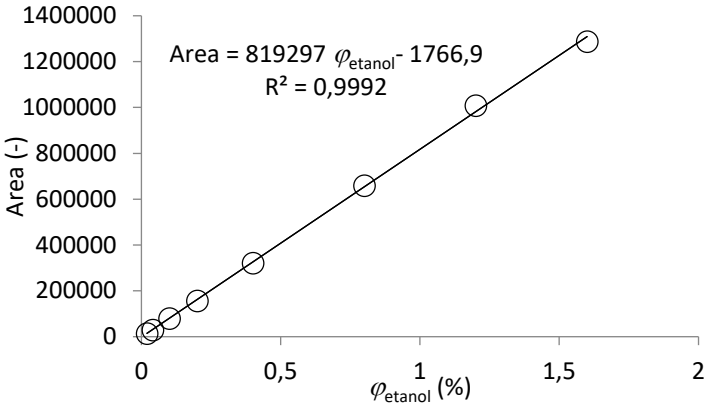
Slika 14.b Baždarni pravci za određivanje hlapivih komponenti piva HS-GC-FID metodom

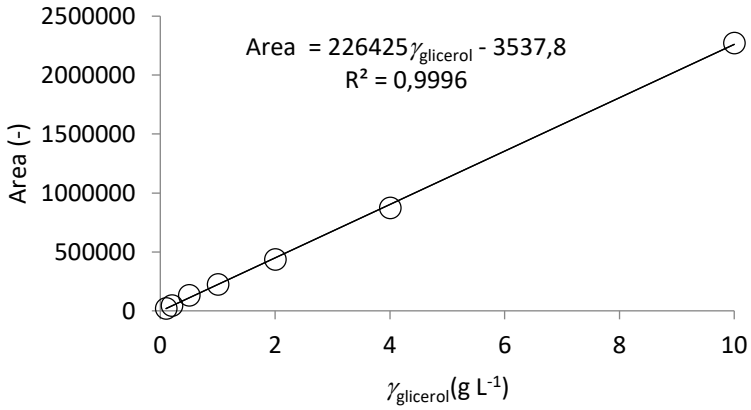
7.2. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SUPSTRATA I PRODUKATA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOST











Slika 15 Baždarni pravci za određivanje ugljikohidrata, alkohola i kiselina prisutnih u pivu HPLC metodom.