

# Kvasci u pivarstvu

---

**Mendaš, Ozren**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:130903>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK



# Kvasci u pivarstvu Yeasts in beer brewing Seminarski rad

Ozren Mendaš  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
Mentor: doc. dr. sc. Marin Ježić

Zagreb, 2020.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
Općenito o kvascima.....	2
Kratka povijest fermentacije.....	2
2. PIVARSKI KVASCI.....	3
3. PROIZVODNJA PIVA: FERMENTACIJA.....	4
Metabolizam ugljikohidrata.....	4
Metabolizam dušičnih spojeva.....	5
Metabolizam lipida.....	6
Formiranje aromatskih spojeva.....	6
Esencijalni minerali i vitamini.....	9
Faze rasta kvasca.....	13
Temperatura.....	13
Inokulacija i preživljavanje.....	14
pH.....	14
4. FERMENTACIJA PIVA VISOKOG SADRŽAJA ŠEĆERA.....	14
5. UTJECAJ INOKULACIJE NA UČINAK FERMENTACIJE I OKUS PIVA.....	15
6. FORMIRANJE I ANALIZA SASTAVA PJENE PIVA.....	17
7. UTJECAJI MAGNEZIJEVIH I KALCIJEVIH IONA NA FERMENTACIJU.....	18
8. SAHTI: FINSKI STIL PIVA FERMENTIRAN PEKARSKIM KVASCEM.....	22
9. LITERATURA.....	23

## Uvod

### Općenito o kvascima

Kvasac je jednostanična gljiva ključna u modernoj fermentaciji alkoholnih pića. Od 700 otkrivenih vrsta najviše sojeva sadrži vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, od kojih se tisuće upotrebljavaju u industrijskoj proizvodnji. Prva posebnost kvasca *S. cerevisiae* je da se vegetativno razmnožava isključivo pupanjem, a ne binarnom diobom. Druga posebnost kvasca je njegova mogućnost prelaska s aerobnog disanja na anaerobnu fermentaciju. U tom procesu je najbitnije glukoza, koja usmjerava prelazak na fermentacijski metabolizam. Taj proces naziva se Crabtreeov efekt, te on opisuje utjecaj visoke koncentracije glukoze na prelazak s aerobnog oksidativnog metabolizma na anaerobni fermentacijski metabolizam, bez obzira na prisutnost kisika u okolišu (Russel i sur., 2003.). Fermentacijom kao nusprodukti nastaju etanol i ugljikov dioksid. Različiti sojevi kvasca mogu podnijeti različite koncentracije etanola. Raspon seže od 5% do 21%, nakon kojeg stanice kvasca počnu odumirati (Alba-Lois i sur., 2010.). Životni ciklus kvasca se ne mjeri kronološkom starošću stanice nego brojem dioba te stanice. Svaka stanica kvasca koja se podijelila (propupala) ima ožiljke na površini stanice koji odražavaju njezinu starost. Maksimalni broj dioba naziva se Hayflickov limit koji može biti od 10 do 33 pupanja, a što ovisi o soju kvasca (Russel i sur., 2003.). Kod industrijskih sojeva nema spolnog razmnožavanja jer su ti sojevi poliploidni. Iz toga proizlazi da industrijski sojevi nemaju 2 tipa jedinki za parenje, ne sporuliraju, a i ako sporuliraju te spore nisu vijabilne (Verbelen i Delvaux, 2009.). Spolno razmnožavanje kvasca ovisi o dva idiomorfa *MATa* i *MATα*. Svaka haploidna generacija ima jednu vrstu alela, te se konjugacijom i fuzijom različitih haploidnih jedinki stvara diploidna *MATa/MATα* jedinka (Haber i sur., 2012.).

### Kratka povijest fermentacije

Proizvodnja piva pomoću fermentacije ekstrakta slada je jedna od najstarijih biotehnoloških metoda poznatih čovjeku. Prvi dokazi o proizvodnji fermentiranog alkoholnog pića sežu još u stari Egipt, gdje su stanovnici te zemlje još prije 6000 godina proizvodili jedan tip kiselog piva. Iako su kvasci bili neophodni za taj proces, njihova uloga u fermentaciji nije razjašnjena sve do 1876. kada je Louis Pasteur u svojoj knjizi *Etudes sur la Bière* dokazao kako su za vrenje zaslužni mikroorganizmi. Moralo

je proći još nekoliko godina, sve dok Emil Christian Hansen nije izolirao pivarski kvasac i uzgojio ga u čistoj kulturi 1883 (Verbelen i Delvaux, 2009.). Pivo najčešće dijelimo na nekoliko različitih vrsta: lager, ale i pšenično. Lager pivo nastaje fermentacijom s lager kvascima, dok ale i pšenično nastaju fermentacijom ale kvascem. Ale piva postoje još od srednjeg vijeka, dok je lager pivo, nastalo u Bavarskoj tijekom 15. stoljeća, postalo vrlo popularno od 19. stoljeća do danas (Wendland 2014.). Uzrok nastanka lager piva je tzv. Reinheitsgebot. To je bavarski zakon kojim se određuje cijena i dopušteni sastojci u pivu, uz predodređenu kaznu ako se zakon ne poštuje. Jedan od razloga nastanka tog zakona je sprječavanje korištenja pšenice i raži u proizvodnji piva kako bi te žitarice bile dostupne u proizvodnji kruha, i kako bi kruh bio što jeftiniji i što dostupniji ljudima (Wikipedia: Reinheitsgebot).

## Pivarski kvasci

U samim počecima pivarstva kao industrije karakterizirana su dva soja kvasca na temelju međusobnog prijanjanja i agregiranja u nakupine (flokulacije): kvasci gornjeg vrenja (ale i weiss kvasci), te kvasci donjeg vrenja (lager kvasci). Ale kvasac genski je raznolikiji i, slično weiss kvascima, fermentira na višim temperaturama (18-24°C), dok lager kvasac ima manju gensku raznolikost i fermentira na nižim temperaturama (8-14°C). Weiss kvasci su specifični po proizvodnji začinskih aroma klinčića, muškato oraščića i vanilije zbog prisustva gena POF (PAD1). Također imaju poseban izgled pod mikroskopom jer formiraju lančane strukture, te zajedno s ale kvascima imaju mogućnost rasta pri 37°C. S druge strane lager kvasci su jedini koji mogu kao izvor energije koristiti melibiozu ( $\alpha$ -D-galaktoza-(1-6)- $\alpha$ -D-glukoza). Ove posebne karakteristike omogućuju znanstvenicima preciznu karakterizaciju sojeva. *Saccharomyces sensu stricto* kompleks vrsta sadrži neke od najbitnijih vrsta u prehrambenoj industriji. Prvi član *S. cerevisiae*, koristi se u fermentaciji vina, ale i weiss piva, sakea, te u proizvodnji kruha. Drugi član *Saccharomyces bayanus* koristi se u fermentaciji jabukovače i vina. Treći član *Saccharomyces pastorianus* sudjeluje u fermentaciji lager piva. *Saccharomyces pastorianus* je zanimljiva vrsta jer je nastao prirodnom hibridizacijom između *S. cerevisiae* soja i ne-*S. cerevisiae* soja, najvjerojatnije *S. bayanus* soja. To pokazuje genetička analiza koja je pokazala 2 tipa genoma u soju *S. pastorianus* (Lodolo i sur., 2008.).

## Proizvodnja piva: fermentacija

Fermentacija, uz ukomljavanje, kuhanje, hmeljenje i odležavanje, je najbitniji proces u lancu stvaranja piva. To je kumulativni proces rasta kvasca u sladovini (ekstraktu šećera iz slada nastalog ukomljavanjem). Unatoč tome što je znanost razjasnila generalne biokemijske procese, upravljanje fermentacijom i dalje ostaje umjetnost balansiranja rasta kvasca uz proizvodnju željenih okusa u unaprijed određenom vremenskom roku. Uspješan rezultat ovisi o korištenju čistog soja kvasca visokog postotka preživljavanja, dovoljne količine makro- i mikronutrijenata, pravilna inokulacija sladovine, optimizacija otopljenog kisika i pravilna kontrola temperature (Lodolo i sur., 2008.).

Flokulacija kvasca važan je fenomen u fermentaciji. Ale kvasci prilikom procesa zarobe mjehuriće CO<sub>2</sub> i time nakupine stanica kvasca plutaju na površini mladog piva, dok lager kvasci stvaraju nakupine koje tonu na dno fermentora. Posebni FLO geni reguliraju taj proces, iako on ovisi i o vanjskim faktorima poput temperature, dostupnih nutrijenata, koncentracije etanola, pH, koncentracije Ca<sup>2+</sup> i ostalih. Promjene u flokulaciji mogu na dva načina negativno djelovati na proces fermentacija. Loša flokulacija uzrokuje povećani broj slobodnih stanica što utječe na čistoću piva nakon filtracije. Dok prerana flokulacija uzrokovana visokim koncentracijama šećera kao rezultat daje mlado pivo s puno preostalih šećera, niske koncentracije etanola i upitne kvalitete (Lodolo i sur., 2008.).

## Metabolizam ugljikohidrata

Ugljikohidrati čine više od 90-92% suhog sadržaja sladovine. Udijeli različitih ugljikohidrata u sladovini mogu jako varirati, ali gledajući prosječne vrijednosti 25% čini nefermentabilni dio (većinom dekstrin) a 75% fermentabilni dio (saharoza, glukoza, maltoza, maltotrioza). Dekstrini, iako ih kvasac ne može koristiti, čine bitan sastojak jer poboljšavaju kvalitetu tako da pojačavaju tijelo piva (dajući mu gustoću i puninu). Maltoza čini najveći udio fermentabilnog dijela: 65%, maltotrioza 20-25%, glukoza 10-15%, dok su fruktoza i saharoza prisutne u tragovima. Kvasac prvo koristi glukozu i saharozu, nakon njih maltozu, te naposljetku maltotrioza. Ovakva lančana apsorpcija uvjetovana je glukoznim represijskim putem. Taj put vrši represiju gena uključenih u metabolizam drugih ugljikohidrata, te je povezan s represijom gena glukoneogeneze i respiracije. To se na kraju može povezati s Crabtreeovim efektom

koji opisuje fenomen glukozne represije respiracije čak i prisustvu kisika (Verbelen i Delvaux, 2009.).

Skladišni ugljikohidrati u kvascima su glikogen i trehaloza i oba imaju vrlo važne uloge u fermentaciji. Glikogen je primarni skladišni ugljikohidrat, kojega kvasac mobilizira tijekom gladovanja. Mobilizacija glikogena uočena je na samom početku fermentacije, nakon inokulacije aerirane sladovine (obogaćene kisikom) kvascem. Uzrok tome je nemogućnost apsorpcije egzogenih šećera zbog manjka kolesterola u staničnoj membrani. Stoga se glikogen mora mobilizirati kako bi se odvila sinteza kolesterola u prisutnosti kisika. Trehaloza, s druge strane, nije polimerni ugljikohidrat nego disaharid. Pokazano je da se trehaloza akumulira prilikom stresnih uvjeta, kao što je manjak ugljikohidrata u sladovini. Udio trehaloze u suhoj tvari stanica kvasca prikupljenog iz fermentora je 5%, dok u stanicama izloženima stresu trehaloza čini čak do 15% suhe tvari stanice kvasca. Njezino djelovanje nije do kraja objašnjeno na molekularnoj razini, ali su studije pokazale da štiti membranu i proteine tijekom stresnih uvjeta kao potencijalni osmoregulator. Brzo nakupljanje trehaloze uočeno je nakon promjena u okolišu, kao što su dehidracija, povećanje temperature i visoki osmotski stres (proizvodnja piva visokog sadržaja alkohola) (Verbelen i Delvaux, 2009.).

### **Metabolizam dušičnih spojeva**

Dušični spojevi u sladovini heterogenog su sastava. Sladovina u prosjeku sadrži od 65 - 100 mg/100 mL dušičnih spojeva od kojih približno 20% čine proteini, 30-40% polipeptidi, 30-40% aminokiseline i 10% nukleotidi i ostali dušični spojevi. Iako se potreba za dušikom može zadovoljiti amonijevim ionima aminokiseline su preferirani izvor. Kvasac također može koristiti male peptide, ali proteoliza velikih proteina se ne odvija u sladovini, osim ukoliko ne dođe do autolize stanica. Transport aminokiselina u stanicu je aktivan proces, te zahtjeva energiju. Aminokiseline se klasificiraju u 4 razreda: A, B, C i D. Aminokiseline grupe A se prve brzo apsorbiraju, one iz grupe B sporije, te one iz grupe C tek nakon što su sve aminokiseline grupe A iz sladovine apsorbirane. Aminokiselina prolin (Pro) je jedini član grupe D. Kvasac u pravilu ne može razgraditi prolin, jer je za njegovu razgradnju potreban oksidativni metabolizam. Metabolizmom tih aminokiselina nastaju nusprodukti koji daju razne okuse pivu, što ih čini zanimljivima pivarima (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Metabolizam lipida

Prilikom inokulacije sladovine kvasac nema dovoljno sterola u membrani čime mu je onemogućen rast. Aeracijom sladovine omogućava se sinteza sterola, koji se mogu sintetizirati samo u prisutnosti kisika. Sama sladovina ne sadrži dovoljno lipidnih spojeva da bi se zadovoljile potrebe kvasca, ali dodavanjem tih spojeva u sladovinu uklanja se potreba za aeracijom sladovine. Steroli čine manje od 1% suhe mase stanice kvasca. Aerobne stanice kvasca sadrže većinom ergosterol (75-90%), lanosterol (5-15%) i skvalen (2-15%). Ako je količina kisika ograničena udio sterola u membranama se smanjuje, jer se distribuiraju između stanica majki i kćeri. Ukoliko koncentracija sterola padne ispod kritične vrijednosti od 0,1% onemogućen je daljnji rast stanica kvasca. Sinteza masnih kiselina nije toliko važna jer su one u sladovini prisutne u dovoljnim količinama za rast kvasca (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Formiranje aromatičnih spojeva

Mnogo okusnih tvari u pivu dolazi izravno iz sirovih materijala poput slada ili hmelja ili se formiraju prilikom ukomljavanja (reakcije djelovanja amilaza i stvaranja fermentabilnih šećera iz škroba). Međutim, najveći utjecaj na formiranje okusa ima sama fermentacija. Sekundarni metaboliti kvasaca mogu imati pozitivni ili negativni utjecaj na svojstva piva poput okusa i mirisa, a što ovisi o njihovoj koncentraciji i karakteristikama. Klasificiraju se u pet kategorija: alkoholi, esteri, organske kiseline, karbonilni spojevi (aldehidi i vicinalni diketoni) i spojevi koji sadrže sumpor (Verbelen i Delvaux, 2009.).

### Viši alkoholi

Poznato je više od 35 viših alkohola koji nastaju tijekom fermentacije sladovine. Alifatski alkoholi pridodaju alkoholnom okusu piva izazivajući osjećaj „zagrijavanja“ prilikom konzumacije. Također imaju indirektni utjecaj na okus jer su prekursori u sintezi esterskih spojeva. Alkoholi 3-metil-1-butanol i 2-feniletanol karakteristični su za lager pivo te su odgovorni za dio njegovog prepoznatljivog okusa. Alkohol 2-feniletanol ima slatku aromu sličnu mirisu ruže i ima sposobnost maskiranja dimetil sulfida (DMS) prisutnog u pivu. Fermentacijom također nastaju i neželjeni viši alkoholi poput tirosola i triptofola, ali njih iznad prihvatljivih razina sadrže neka piva gornjeg vrenja.



Kvasci sintetiziraju više alkohole kataboličkim ili anaboličkim putem. U kataboličkom putu kvasac iz aminokiselina sladovine transaminacijom dobiva  $\alpha$ -keto kiseline kao prekursore viših alkohola. U anaboličkom putu viši alkoholi sintetiziraju se iz  $\alpha$ -keto kiselina dobivenih sintezom aminokiselina iz ugljikohidrata sladovine. Viši alkoholi nastaju tijekom faze aktivnog rasta stope fermentacije i time su pod utjecajem svih faktora koji utječe na povećanje broja stanica kvasca, poput visokog sadržaja nutrijenata, temperature ili miješanja sladovine (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Esteri

Esteri su najbitniji aromatski spojevi prisutni u pivu. Neki od važnijih estera su: etilni acetat, izoamilni acetat, etilni kaproat, etilni kaprilat, feniletalni acetat. Kada su prisutni u odgovarajućim količinama poželjan su sastojak pivu te mu daju voćne i cvjetne arome. Mogu se podijeliti u acetatne estere i  $C_6 - C_{10}$  lančaste etilne estere masnih kiselina. Esteri se formiraju uglavnom tijekom faze aktivnog rasta (60%), a nešto manje tijekom stacionarne faze (40%). Formiraju se kondenzacijskom reakcijom između acetil-CoA/acil-CoA i etanola/viših alkohola, što katalizira enzim alkohol aciltransferaza. Pokazano je da je ravnoteža aktivnosti između enzima formiranja i razgradnje estera (esteraza) vrlo važna za nakupljanje estera u pivu. Za formaciju estera važna su dva faktora: dostupnost supstrata acetil-CoA i viših alkohola, te aktivnost enzima. Nadomještanje sladovine masnim kiselinama srednje dugih lanca pojačava se sinteza etilnih estera, dok dodatak viših alkohola u sladovinu potiče formiranje acetatnih estera. Otopljeni kisik djeluje na sintezu estera tako da ograničava stvaranje acetil-CoA (koji se koristi za sintezu lipida i rast stanica). Nezasićene masne kiseline vrše inhibiciju ekspresije gena za sintezu estera. Naravno, velik utjecaj na tip i količinu proizvedenih estera ima soj kvasca koji je koristi prilikom fermentacije (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Organske kiseline

U pivu je prisutno više od 100 različitih organskih kiselina. Najpoznatije su: piruvat, acetat, laktat, sukcinat, malat, citrat,  $\alpha$ -ketoglutarat i masne kiseline srednje dugih lanaca ( $C_6-C_{10}$ ). Njihova najvažnija uloga je snižavanje pH sladovine. Većina organskih kiselina stanični je višak, te nastaju kao rezultat nedovršenog ciklusa limunske kiseline. Kvasac ih izlučuje u vanjski okoliš kako bi održavao neutralni pH

unutar stanice. Osim toga, višak organskih kiselina uklanja se zbog manjka daljnjeg oksidativnog mehanizma i jer nisu potrebne u anaboličkim reakcijama u stanici.

Srednje duge (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) masne kiseline čine 85-90% svih masnih kiselina u pivu i daju mu neželjeni miris znoja, koza ili kvasca. Ove masne kiseline proizvode se *de novo*, te ne nastaju u procesu β-oksidacije masnih kiselina u sladovini. Upravljanje sintezom masnih kiselina najvjerojatnije je pod utjecajem istih kontrolnih mehanizama kao i sinteza estera, jer koriste isti supstrat za sintezu - acetyl-CoA (Verbelen i Delvaux, 2009.).

#### Vicinalni diketoni i ostali karbonilni spojevi

Jedan od ciljeva zrenja mladog piva je uklanjanje vicinalnih diketona (VDK), posebno 2,3-butandiona (diacetil) koji pivu daje aromu maslaca. On nastaje kao nusprodukt sinteza aminokiselina izoleucina, leucina i valina. Njihovom sintezom nastaje spoj α-acetolaktat, koji se izlučuje u sladovinu i tamo oksidativnom dekarboksilacijom postaje 2,3-butandion (diacetil). Uklanjanje diacetila iz mladog piva događa se prilikom sazrijevanja mladog piva. Kvasac reapsorbira diacetil te ga reducira u spojeve neutralnog okusa - acetoin i 2,3-butandiol. Kako bi se smanjila koncentracija diacetila u pivu moguće je koristiti nekoliko tehnika: odmor na toplom prije zriobe, optimizacija FAN (free amino nitrogen) sadržaja sladovine, dodatak enzima α-acetolaktat dekarboksilaze koji pretvara α-acetolaktat direktno u acetoin (Verbelen i Delvaux, 2009.).

#### Aldehidi

Gotovo bez iznimke daju neželjene okuse poput okusa trave, lišća ili kartona. Acetaldehid je prisutan u najvećoj koncentraciji, te je bitan prekursor sinteze etanola. Ima ga najviše na kraju eksponencijalne faza rasta, a najmanje na kraju zrenja piva. Bez dovoljnog broja stanica kvasca na kraju fermentacije nema pravilne redukcije acetaldehida u etanol. Kvasac na kraju fermentacije i tijekom sazrijevanja apsorbira acetaldehid, te ga reducira u etanol. Prilikom tog procesa potreban je dovoljan broj živih stanica kvasca koje apsorbiraju visoku koncentraciju acetaldehida. Karbonilni spojevi nastaju prilikom skladištenja piva i daju mu karakterističan okus kartona, a nastaju brojnim reakcijama koje uključuju oksidaciju lipida (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Sumporni spojevi

Mnogi sumporni spojevi derivati su sirovih sastojaka poput slada i hmelja, ali neke proizvode i kvasci. Najvažniji su sumporov dioksid (koji ima snažan i oštar miris), sumporovodik (koji miriše na trula jaja) i dimetil sulfid (DMS, miris kuhanog zelja). DMS je važan okusni dodatak lager pivima. Glavni prekursor DMS-a je SMM (S-metilmetionin) prisutan u mladom sladu (neprženi slad). SMM se formira prilikom naklijavanja ječma, tj pretvorbe ječma u slad. Prilikom prženja slada dolazi do termičkog raspada SMM-a u DMS ili DMSO (dimetil sulfoksid). Zbog visokog vrelišta, većina DMS-a ispari prilikom kuhanja sladovine, dok DMSO ostaje u sladovini. Tijekom fermentacije kvasac može reducirati 25% prisutnog DMSO u DMS. To najviše ovisi o soju, temperaturi i pH vrijednosti (Verbelen i Delvaux, 2009.).

Sumporovodik ( $H_2S$ ) i sumporov dioksid ( $SO_2$ ) igraju bitnu ulogu u okusu i stabilnosti lager piva.  $SO_2$  je antioksidans, te se reverzibilno veže za karbonilne spojeve dajući spojeve neutralna okusa. Reverzibilnim vezanjem za karbonilne spojeve,  $SO_2$  prikriva njihov utjecaj na okus piva. Problem je što se tijekom skladištenja piva ti spojevi mogu ponovno osloboditi jer kvasac ne posjeduje enzime za redukciju karbonilnih spojeva vezanih za sumporov dioksid. Oba spoja su važni intermedijeri prilikom sinteze aminokiselina koje sadrže sumpor (cistein i metionin), no mogu nastati i prilikom razgradnje tih aminokiselina. Pokazano je da manjak vitamina pantotenata, koji je važan za metabolizam metionina, uzrokuje nakupljanje  $H_2S$ . Kvasac prilikom sekundarne fermentacije može reapsorbirati sumporovodik, smanjujući njegovu koncentraciju u pivu (Verbelen i Delvaux, 2009.).

## Esencijalni minerali i vitamini

Vitamini i minerali su vrlo važni kofaktori i regulatori mnogih metaboličkih procesa. Njihova glavna uloga je da kao koenzimi, dijelovi enzima sudjeluju u kemijskim reakcijama enzima. Sojevi kvasaca jako se razlikuju prema svojim nutritivnim zahtjevima za vitamine i minerale. Gotovo svi vitamini (osim mioinozitola) su potrebni kvascima kao dijelovi koenzima. Sladovina obično sadrži sve potrebne vitamine i minerale potrebne za rast kvasca, ali njihova količina jako ovisi o vrsti supstrata za fermentaciju. Od minerala važni kationi su cink, magnezij, mangan, kalcij,

bakar, kalij i željezo. Koriste se kao „hrana kvasaca“ i dodaju se kao nadomjesci u sladovinu kako bi pospješili fermentaciju (Russel i sur., 2003.).

## Minerali

Jedan od najbitnijih minerala u stanici kvasca je fosfor. Potreban za sintezu strukturnih molekula (DNA, RNA, fosfolipidi) i fosforiliranih metabolita (glukoza-6-fosfat, ATP). Fosfor je kvascu dostupan u obliku anorganskog ortofosfata ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Sumpor je sljedeći vrlo bitan element potreban za sintezu aminokiselina koje sadrže sumpor (cistein, metionin) i tripeptida glutationa. Sumpor je kvascu dostupan u obliku sulfatnih aniona. Glutation također služi za skladištenje sumpora u uvjetima obilja. Magnezij je najobilniji unutarstanični dvovalentni kation u kvasca i primarno služi kao enzimski kofaktor. Pokazano je da magnezij pomaže kvascu u toleranciji visokih temperatura, osmotskog tlaka i toleranciji alkohola. Stimulira fermentaciju piva visokog alkoholnog sadržaja. Cink je potreban u tragovima i niti jedan drugi metalni kation ne može zamijeniti njegovu funkciju u stanici. Cink je kofaktor u mnogim bitnim metaboličkim reakcijama. Primjerice alkohol dehidrogenaza, bitan enzim u kvascu, je metaloenzim koji sadrži cink. Uobičajeno je korištenje nadomjestaka cinka prilikom fermentacije. Kalij je najzastupljeniji kation u stanici i bitan je za održavanje osmotskog potencijala unutar stanice. Stanica ga aktivno apsorbira uz pomoć  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  crpke, dok istovremeno izbacuje katione natrije izvan stanice. Natrij je uz kalij vrlo važan izvanstanični kation, te oni zajedno sudjeluju u održavanju osmotske ravnoteže. Mangan je esencijalan kation u metabolizmu kvasca. Regulator je ključnih enzima, te je pokusima pokazano da stimulira fermentaciju. Kalcij stimulira rast kvasca, ali nije esencijalan za rast. Uključen je u održavanje strukture i funkcije membrane. Također igra bitnu ulogu u flokulaciji. Bakar i željezo djeluju kao kofaktori u nekoliko bitnih enzima redoks reakcija u respiratornom lancu te su kvascu esencijalni za pravilan rast. Bakar je nužan u niskim, ali je toksičan u koncentracijama višim od 10 ppm. Željezo u sladovini zastupljeno u dovoljnim količinama za pravilan rast stanice kvasca, te ga obično ne treba naknadno dodavati (Russel i sur., 2003.).

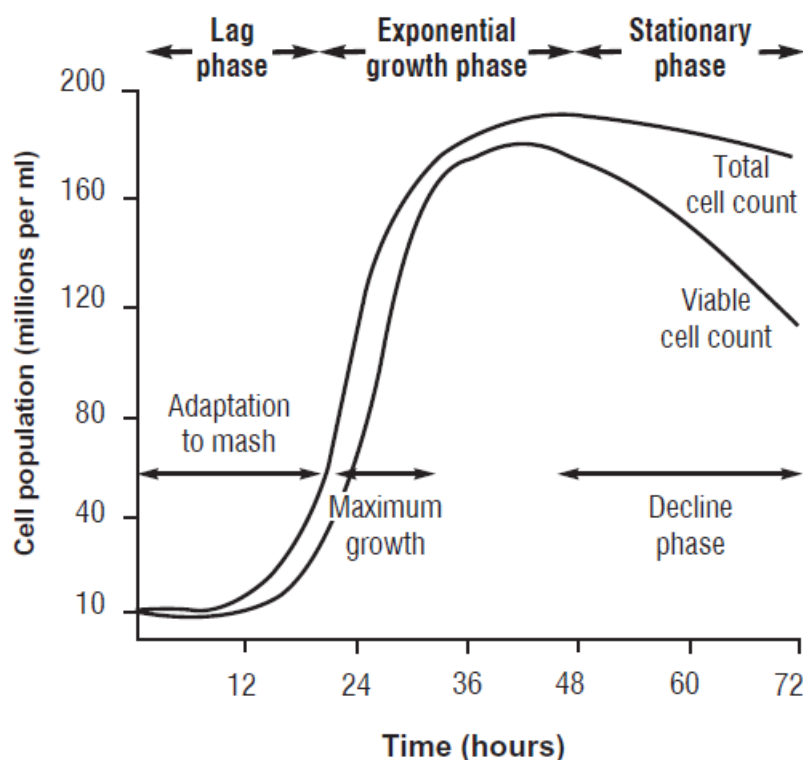
Tablica 1. Vitamini i njihova uloga u metabolizmu kvasca (Russel i sur., 2003.)

Vitamin	Aktivni oblik	Metabolička funkcija	Optimalna masena koncentracija/100mL
Biotin	Biotin	Reakcije karboksilacije i dekarboksilacije	0.56 µg
Kalcijev pantotenat	Koenzim A	Oksidacije keto kiselina Metabolizam aminokiselina, masnih kiselina, ugljikohidrata i kolina Reakcije acetilacije	45-65 µg
Tiamin (B1)	Tiamin pirofosfat	Fermentativna dekarboksilacija piruvata Rearanžmani u ciklusu pentoze, reakcije transketolaze, Biosinteza izoleucina i valina	60 µg
Mioinozitol	Mioinozitol	Fosfolipidi membrana (strukturna uloga)	9.3 mg (slobodan) i 18.9 mg (ukupan)
Niacin (B4)	NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup>	Koenzimi u REDOKS reakcijama	1000 - 1200 µg
Pirdoksin (B6)	Piridoksal fosfat	Metabolizam aminokiselina, dekarboksilacija i deaminacija	85 µg
Riboflavin (B2)	FMN, FADH	Konzimi u REDOKS reakcijama	20 – 50 µg

Tablica 2. Potrebne koncentracije metalnih iona i njihova funkcija (Russel i sur., 2003.)

Ion	Funkcija u stanici	Koncentracija
Mg <sup>2+</sup>	Stimulacija sinteze esencijalnih masnih kiselina Regulacija staničnih ionskih koncentracija Aktivacija membranske ATP-aze Održavanje permeabilnosti i strukture membrane	2 – 4 mM
K <sup>+</sup>	Središnji dio regulacije transporta divalentnih kationa Esencijalan za apsorpciju H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> Jaki aktivator glikolitičkog protoka, povećava količinu ATP-a, NAD(P)H, Pi i ADP-a	2 – 4 mM
Zn <sup>2+</sup>	Esencijalni kofaktor nekoliko vrlo bitnih metaboličkih enzima, npr. alkohol dehidrogenaze Pojačava sintezu riboflavina, aktivira kisele i alkalne fosfataze Pomaže u povećavanju proteinskog sadržaja fermentirajućih stanica	4 – 8 μM
Ca <sup>2+</sup>	Igra bitnu ulogu u flokulaciji Štiti strukturu membrane i pomaže u održavanju permeabilnosti membrane	4.5 mM potrebno za pravilan rast
Mn <sup>2+</sup>	Pomaže u regulaciji učinka Zn <sup>2+</sup> Stimulira sintezu proteina i biosintezu tiamina	2 – 4 μM
Cu <sup>2+</sup>	Esencijalan kao enzimski kofaktor	1.5 μM
Fe <sup>2+</sup>	Niske količine potrebne za funkcioniranje enzima s hem prostetičkom skupinom	1 – 3 μM

## Faze rasta kvasca



Slika 1. Tipična krivulja rasta za kvasac u sladovini, (Russel i sur., 2003.)

Tijekom lag faze kvasac se prilagođava novom okolišu te se njegov metabolizam aktivira nakon faze mirovanja. Nema povećanja broja stanica, no kvasci su veoma metabolički aktivni te se pripremaju za prvu diobu kojom završava ova faza. Sljedeća je faza ubrzanog rasta koja dolazi nakon lag faze, a prije log faze rasta. U ovoj fazi odvija se konstantno smanjenje vremenskog intervala između dioba. Što znači da se stanice sve brže i brže dijele. U log fazi kvasci dostižu najveću brzinu rasta. To je period logaritamskog udvostručenja broja stanica. Pri optimalnim uvjetima generacijsko vrijeme je 90-120 min. Nakon ubrzanog rasta slijedi usporavanje uzrokovano manjkom nutrijenata i povećanjem koncentracije inhibitora (npr. etanola). To je faza usporavajućeg rasta nakon koje slijedi stacionarna faza. Broj stanica tijekom ove faze je konstantan, odnosno ne raste niti pada. Broj mrtvih stanica je jednak broju novonastalih. Tijekom stacionarne faze kvasac može preživjeti dulji vremenski period na preostaloj maloj količini nutrijenata. Na samom kraju fermentacije dolazi faza odumiranja. Tijekom ove faze stopa ugibanja je veća od stope stvaranja novih stanica, te se time smanjuje broj stanica kvasca (Russel i sur., 2003.).

## Temperatura

Fermentacijom se povisuje temperatura, što dovodi do narušavanja idealnih uvjeta u fermentoru. Istraživanjima je uočeno da je termotolerancija kvasaca najveća prilikom vanjskog pH=4, što je izmjerena vrijednost pH prilikom stacionarne faze fermentacije. Stanice koje se brzo dijele osjetljivije su na temperaturne promjene. Kvasci mogu rasti na temperaturama od 5°C do 35°C, dok je za njihov rast optimalna temperatura oko 28°C. Kod hladnog šoka inhibira se fermentacija i pupanje, te je primijećeno da kvasci s većim sadržajem trehaloze bolje preživljavaju naglo hlađenje. Povišenjem temperature sladovine iznad optimalne vrijednosti aktivira se stanični odgovor prilikom kojeg kvasci sintetiziraju *heat shock* proteine (HSP) koji pomažu u toleranciji toplinskog stresa. Stoga se prilikom fermentacija velikih volumena piva preporuča hlađenje fermentora kako bi se kvasci održali na optimalnoj temperaturi. Time se povećava preživljavanje kvasaca i produljuje vrijeme aktivne fermentacije (Russel i sur., 2003.).

## Inokulacija i preživljavanje

Pravilna inokulacija sladovine je vrlo bitna kako bi se smanjila kontaminacija bakterijama, poboljšao proces fermentacije i time smanjili troškovi proizvodnje. Glavno pravilo inokulacije je 1 milijun stanica po 1 Plato/Brix stupnju. Na primjer: sladovinu od 12°P/B inokulirali bi s  $12 \cdot 10^6$  stanica. Plato/Brix stupnjevi označavaju sadržaj šećera u otopini, pri čemu jedan Plato/Brix stupanj odgovara 1g šećera/100g otopine. Za mjerenje staničnog preživljavanja koristi se test s metilenskim modrilom (Russel i sur., 2003.).

## pH

Kvasac preferira blago kiseli pH. Raspon optimalnog pH za rast je od 5,0 do 5,2, no pivarski i destilacijski kvasci mogu dobro rasti i pri pH od 3,5 do 6,0. Prilikom fermentacije kvasac izlučuje H<sup>+</sup> ione, zbog čega sladovina, čiji je početni pH= 5,2-5,5, tijekom fermentacije postaje kiseliya te njen pH pada na 4,0-4,5 (Russel i sur., 2003.).

## Fermentacija piva visokog sadržaja šećera

Prilikom fermentacije kojom nastaju visoki postotci alkohola koriste se sladovine viših koncentracija šećera. Viša koncentracija šećera uzrokuje osmotski stres



stanicama kvasca. Ključ uspjeha su dovoljna aeracija sladovine, više razine dostupnog dušika te inokulacija većim brojem stanica. Tolerancija na visoke koncentracije šećera i alkohola jako ovisi o soju koji se koristi (Russel i sur., 2003.). Primjerice soj kvasca Weihenstephan 34/70 karakteriziran je u istraživanjima prilikom kojeg je kvasac inokuliran u sladovine različitih koncentracija maltoze ili glukoze (dodane u obliku sirupa). Pokazano je da povećana koncentracija šećera uzrokuje sporiji rast, dulju lag fazu, nepotpuno iskorištavanje šećera, te povećanje koncentracije etil acetata i izoamil acetata u pivu. Povećane koncentracije maltoze u usporedbi s glukozom dale su uravnoteženiju fermentaciju, veći broj stanica i bolji okusni profil završnog proizvoda. Prilikom pokusa ispitivan je raspon koncentracija sladovine od 14°P/B do 24°P/B maltoze i glukoze. Najveći rast stanica uočen je kod sladovine od 14°P/B koja se sastoji od maltoze. U sladovini s glukozom pronađen je manji broj stanica u istim uvjetima. Povećanjem koncentracije šećera dolazi do opadanja broja stanica uz što je primijećen i produžetak trajanja lag faze. Sladovine od 14°P/B do 21 °P/B ulaze u eksponencijalnu fazu rasta tek oko 20 do 25 sati nakon početka fermentacije, dok sladovine od 24°P/B u eksponencijalnu fazu ulaze tek 46 sati nakon početka fermentacije. Postotak iskorištenog šećera također varira, pa je tako najveća iskoristivost uočena je u fermentacijama sladovine maltoze od 21°P/B (80%). Taj rezultat prate sladovine glukoze od 14°P/B i 21°P/B sa 75-76%, dok su sladovine od 24°P/B pokazale 67%-tnu iskoristivost. Mjerenjem dobivenog postotka alkohola sladovine maltoze od 21°P/B pokazale su najviše vrijednosti. Sladovine glukoze od 21°P/B nešto niže, te sladovine glukoze i maltoze od 24°P/B najniže vrijednosti. Razlog ovako slabijih fermentacijskih rezultata povećana je koncentracija šećera u odnosu na smanjene koncentracije dušičnih spojeva, te visok osmotski stres koji stanice kvasca moraju tolerirati. Dodavanjem velikih količina šećera razrjeđuje se sadržaj aminokiselina u sladovini što inhibira razmnožavanje i time smanjuje broj stanica (Pidocke i sur., 2009.).

## Utjecaj inokulacije na učinak fermentacije i okus piva

Fermentacije su provedene u laboratorijskim uvjetima koristeći soj lager kvasca CMBSPV09. Ispitano je pet različitih inokulacijskih količina: 10, 20, 40, 80 i 120×10<sup>6</sup> stanica/mL. Mjereno je vrijeme potrebno za postizanje stope fermentacije od 80%. Najnižem broju stanica od 10\*10<sup>6</sup> trebalo je 335 sati, broju stanica 20\*10<sup>6</sup> 220 sati (ovaj

broj stanica koristi se u pivovarama za početak fermentacije), 90 sati za  $40 \cdot 10^6$  stanica/mL, 50 sati za  $80 \cdot 10^6$  stanica/mL i 40 sati za  $120 \cdot 10^6$ . To znači da s dvostruko većim brojem inokuliranih stanice moguće je skratiti fermentacijsko vrijeme za 60%. U slučaju četverostrukog ili šesterostrukog povećanja koncentracije kvasca pokazano je smanjenje vremena fermentacije za 78%, odnosno 82%. Rezultati ovog pokusa pokazuju prednost dvostrukog povećanja broja inokuliranih stanica nad četverostrukim ili šesterostrukim prilikom postizanja stope fermentacije od 80%. Sladovina inokulirana brojem od  $40 \cdot 10^6$  stanica/mL pokazuje najveće smanjenje vremenskog perioda uz najmanje povećanje broja stanica. Sva ostala povećanja broja stanica ne rezultiraju dovoljno skraćenim vremenskim periodom u odnosu na količinu stanica, što nije isplativo u industrijskim uvjetima. Ono što se može zaključiti je da se povećanjem broj stanica povećava brzina postizanja stope fermentacije od 80% (Verbelen i sur., 2008.).

#### Utjecaj na karakteristike piva

Usprkos velikim razlikama u rastu među testiranim inokulacijskim količinama, alkoholni sadržaj je isti. Utjecaj na pH je očekivan i pokazuje smanjenje pH s povišenjem broja inokuliranih stanica. Razlog tome je povećana iskoristivost slobodnih dušičnih spojeva i primarnih fosfata (puferski spojevi), formacija organskih kiselina i  $\text{CO}_2$ , te izlučivanje  $\text{H}^+$  iona. Povećanje broja stanica nema utjecaja na gorčinu piva jer ona nastaje kao posljedica izomerizacije  $\alpha$ -kiselina prilikom kuhanja hmelja. Koncentracije viših alkohola pozitivno su korelirane povećanjem inokulacijskog broja. Razlog tome je veća količina apsorbiranih aminokiselina što uvjetuje bolju proizvodnju viših alkohola. Koncentracije estera nisu ovisile o koncentraciji inokuliranih stanica, dok su količine acetaldehida i DMS-a pokazale mali trend povećanja zajedno s brojem stanica. Osim toga koncentracije diacetila porastu na vrlo visoke vrijednosti kod visokih koncentracija inokuliranih stanica. Dvije najniže koncentracije pokazuju nagli pad koncentracije diacetila nakon što je iskorišteno 50% šećera. Za razliku od njih, 3 najviše koncentracije stanica pokazuju kontinuirani rast koncentracija diacetila, te pad razine navedenog ketona tek nakon što je iskorišteno 80% šećera. Završna koncentracija diacetila je stoga u korelaciji s vremenom, jer je dekarboksilacija  $\alpha$ -acetolaktata limitirajući korak u metabolizmu diacetila. Skraćena vremena fermentacije kod visokog broja inokuliranih stanica najvjerojatnije rezultiraju nekompletnom konverzijom  $\alpha$ -acetolaktata u diacetil i s time sprječavajući redukciju koja se obično može dogoditi. U

skladu s tim rezultatima očigledno je potrebna optimizacija procesa kako bi se uklonio višak formiranog diacetila (Verbelen i sur., 2008.).

Povećanjem broja inokuliranih stanica smanjuje se vrijeme fermentacije uz male metaboličke i fiziološke razlike na kvascima pri višim koncentracijama inokuliranih stanica, što pokazuje da populacija kvasca nije pod negativnim utjecajem povećane stanične gustoće (Verbelen i sur., 2008.).

## Formiranje i analiza sastava pjene piva

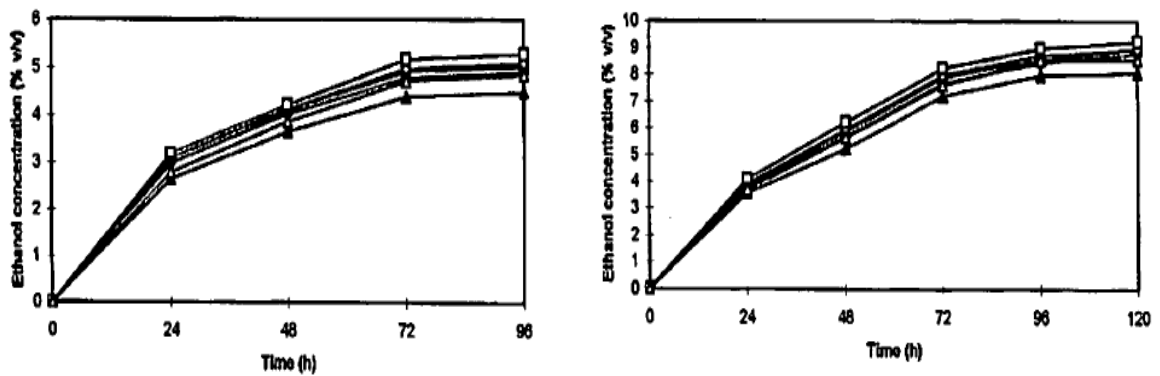
Pjena je kompleksan sustav plina, tekućine, čvrste tvari i surfaktanata. Uloga proteina je vrlo važna u formaciji i održavanju pjene, pošto interakcije protein-protein i protein-tekućina pomoću hidrofobnih, kovlanetnih ili vodikovih veza dovode do formiranja visokoleastičnog filma koji je vrlo otporan na sile površinske napetosti koje vrše molekule vode. Površinska napetost dovodi do kolabiranja mjehurića plina. Funkcije proteina u tom sustavu su formiranje i održavanje pjene. Protein LTP1 je vrlo dobar u formiranju pjene dok je protein Z vrlo dobar u održavanju. Kombinacijom ta dva proteina dobiva se pjena koja se lako formira, te je vrlo stabilna, što je poželjna karakteristika piva. Formiranje pjene tijekom fermentacije je negativna pojava jer može inhibirati preradu šećera u etanol, ali je vrlo poželjna u završnom proizvodu-pivu (Blasco i sur., 2011.).

Kvaliteta pjene uvjetovana je sa sortom slada, ali i hmelja koji se koristi prilikom kuhanja. Produkti fermentacije poput CO<sub>2</sub> i etanola također imaju velik utjecaj na kvalitetu pjene, kod više koncentracije etanola pjena je slabija, dok više otopljenog CO<sub>2</sub> povoljno utječe na kvalitetu pjene. Ako se pjena formira prilikom fermentacije to oslabljuje mogućnost formiranja kvalitetne pjene u završnom proizvodu jer dolazi do gubitka većine aktivnih tvari za stvaranje i održavanje pjene. Pjenenje piva rezultat je interakcije proteina i hmeljnih kiselina. Glavni proteini pjene u pivu potječu iz slada, dok kvasci tu imaju sekundarnu ulogu i služe kao atenuatori proteinaza. Osim toga vrlo su bitni i proteini za stabilizaciju pjene dobiveni od kvasaca. Štoviše, degradacija polisaharida (dekstrina) smanjuje viskoznost piva i time smanjuje curenje tekućine iz međuprostora mjehurića, čuvajući stabilnost pjene. Utjecaj kvasaca još nije dobro istražen, ali je poznato da djeluju u formiranju pjene prilikom fermentacije i prilikom

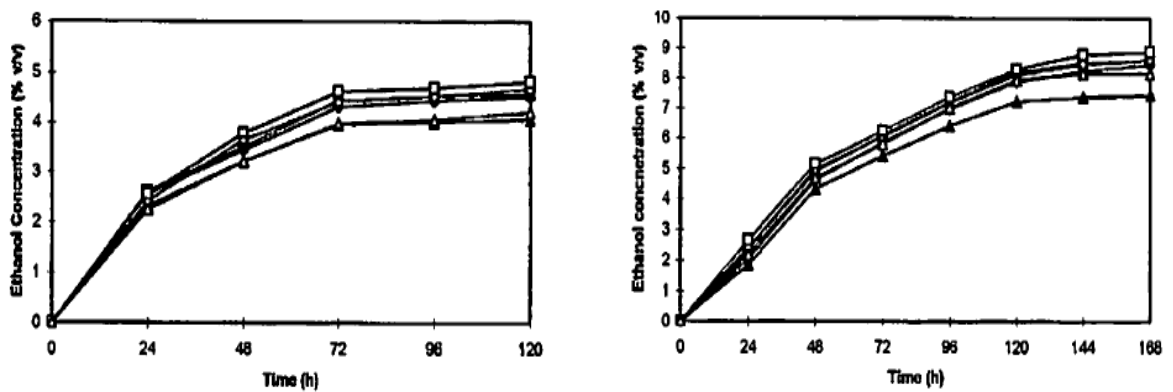
odležavanja piva. Uočen je pad kvalitete pjene u slučaju stresa kod kvasaca (primjerice zbog visokog udjela alkohola) (Blasco i sur., 2011.).

## Utjecaji magnezijevih i kalcijevih iona na fermentaciju

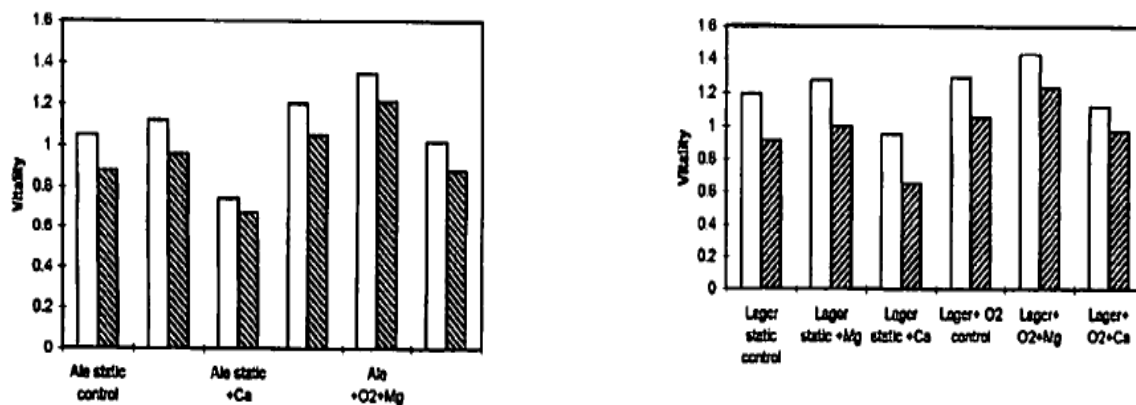
Magnezij kao vrlo bitan unutarstanični kation ima značajan utjecaj na fermentacijski metabolizam kvasaca. Stanica kvasca aktivno apsorbira  $Mg^{2+}$  pomoću specifičnog transportera s visokim afinitetom za  $Mg^{2+}$ . Donja granica koja je potrebna stanici kvasca za razvoj je 42,5 ppm (1,7 mM), dok pri koncentracijama iznad 2500 ppm (1M) dolazi do inhibicije rasta. Kalcij je stanici kvasca potreban u puno manjim koncentracijama, gdje donja granica za pravilan rast iznosi 10-20 ppm (0,25- 0,5 mM), dok se inhibicija rasta događa na koncentracijama višim od 1000 ppm (25mM) (Rees i Stewart, 1997.). Manjak magnezija uzrokuje preuranjeni završetak fermentacije smanjujući sposobnost kvasca da sintetizira potrebne metaboličke enzime, poput enzima sinteze masnih kiselina. S druge pak strane povećanje koncentracije magnezija ima povoljan utjecaj na stopu fermentacije, proizvodnju etanola, preživljavanje i broj stanica. Poznato je da je magnezij glavni kation (dio aktivnog mjesta) enzima alkohol dehidrogenaze, što može značiti da je apsorpcija magnezijevog kationa usko povezana sa sintezom ovog enzima. Magnezij, uz tu bitnu funkciju, također sudjeluje u izgradnji preko 300 drugih enzima., dok kalcij sudjeluje u izgradnji samo nekoliko. Tijekom rasta kvascima je izuzetno potreban  $Mg^{2+}$ , ali ne i  $Ca^{2+}$ . Stanica kvasca apsorbira  $Mg^{2+}$  iz okoliša, a  $Ca^{2+}$  izbacuje iz stanice, sukladno s tim  $Mg^{2+}$  djeluje unutar stanice, a  $Ca^{2+}$  izvan stanice (utječe na flokulaciju i pH okoliša).  $Mg^{2+}$  pomaže u stabilizaciji membrane i poznato je da štiti stanicu od stresa uzrokovanog povećanom koncentracijom etanola, temperaturom i osmotskim tlakom.  $Ca^{2+}$  djeluje antagonistički na mnoge funkcije rasta i metabolizma gdje je potreban  $Mg^{2+}$  tako da se kompetitivno veže na ista aktivna mjesta kao i  $Mg^{2+}$  (Walker i sur. 1996.). Istraživanjem je pokazano kako dodatak magnezija u sladovinu ima najpovoljnije učinke uz aeraciju sladovine prije fermentacije. Dodavanje kalcija, s druge strane je uzrokovalo antagonistički učinak na djelovanje magnezija. Mjerena je proizvodnja alkohola, stanično preživljavanje, broj stanica i iskorištenje prisutnog šećera (Rees i Stewart, 1999.). Koncentracija šećera u sladovini mjerena je OG (original gravity) sustavom, gdje je 1048 OG jednak iznosu 12°P/B, 1080 OG jednak 20°P/B (Rees i Stewart, 1997.).



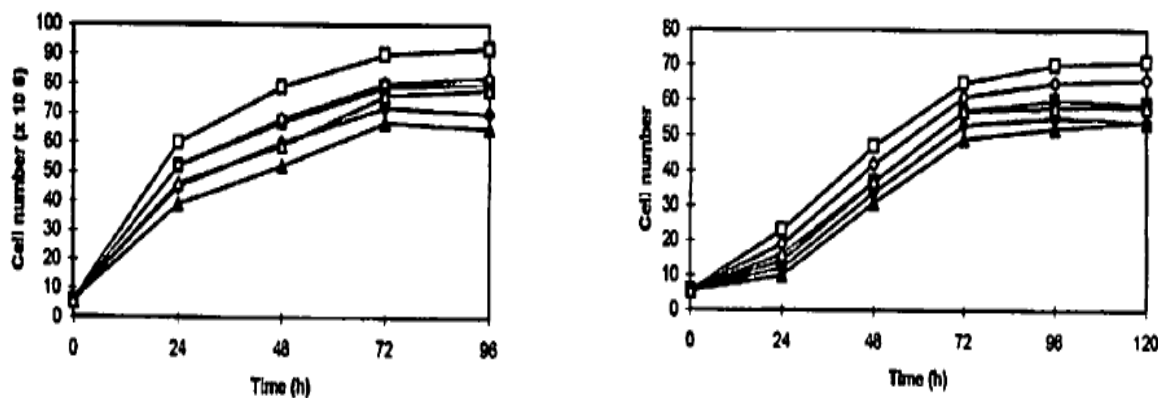
Slika 1: Proizvodnja etanola (%), *S. cerevisiae* ale kvasac u sladovini koncentracije 1048 OG (lijevo) i sladovini koncentracije 1080 OG (desno) (♦ kontrolna fermentacija bez dodataka, ■ fermentacija s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, ▲ fermentacija s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup>, ◇ fermentacija aerirane sladovine, □ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, Δ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup> (Rees i Stewart, 1999.)



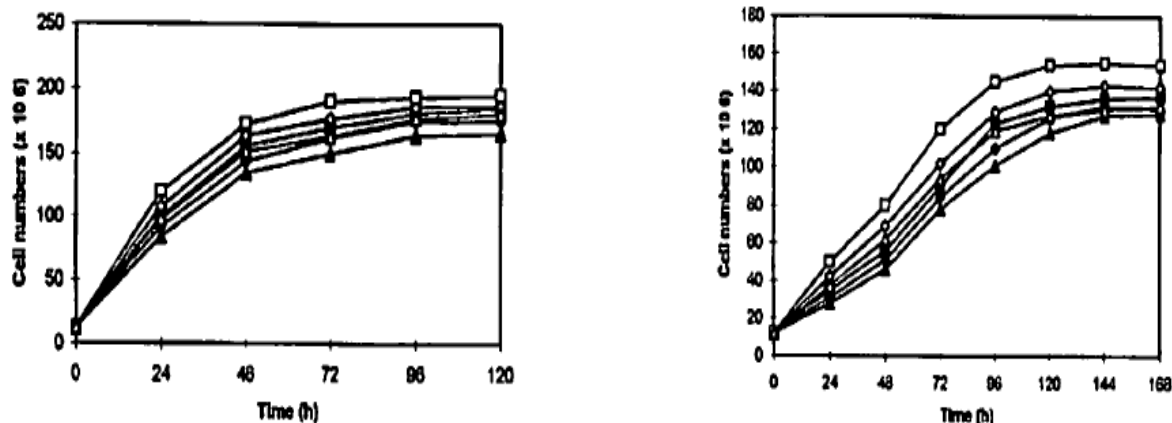
Slika 2: Proizvodnja etanola (%), *S. cerevisiae* lager kvasac u sladovini koncentracije 1048 OG (lijevo) i sladovini koncentracije 1080 OG (desno) (♦ kontrolna fermentacija bez dodataka, ■ fermentacija s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, ▲ fermentacija s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup>, ◇ fermentacija aerirane sladovine, □ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, Δ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup> (Rees i Stewart, 1999.)



Slika 3: Preživaljavanje kvasaca na kraju fermentacije, *S. cerevisiae* ale kvasac u sladovini koncentracije 1048 OG i sladovini koncentracije 1080 OG (lijevo) i *S. cerevisiae* lager kvasac (desno) u fermentaciji sladovina sa i bez 500 ppm  $Mg^{2+}$  i 800 ppm  $Ca^{2+}$ , te sa i bez aeracije prije fermentacije (□ preživaljavanje u 1048 OG, ■ preživaljavanje u 1080 OG) (Rees i Stewart, 1999.)



Slika 4: Brojevi stanica kvasaca prilikom fermentacije sladovine koncentracije 1048 OG, *S. cerevisiae* ale kvasac (lijevo) i *S. cerevisiae* lager kvasac (desno) (◆ kontrolna fermentacija bez dodataka, ■ fermentacija s dodanih 500 ppm  $Mg^{2+}$ , ▲ fermentacija s dodanih 800 ppm  $Ca^{2+}$ , ◇ fermentacija aerirane sladovine, □ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 500 ppm  $Mg^{2+}$ , △ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 800 ppm  $Ca^{2+}$ ) (Rees i Stewart, 1999.)



Slika 5: Brojevi stanica kvasaca prilikom fermentacije sladovine koncentracije 1080 OG, *S. cerevisiae* ale kvasac (lijevo) i *S. cerevisiae* lager kvasac (desno) (♦ kontrolna fermentacija bez dodataka, ■ fermentacija s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, ▲ fermentacija s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup>, ◇ fermentacija aerirane sladovine, □ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 500 ppm Mg<sup>2+</sup>, Δ fermentacija aerirane sladovine s dodanih 800 ppm Ca<sup>2+</sup> (Rees i Stewart, 1999.)

Dobiveni rezultati pokazuju povoljne učinke magnezija i negativne učinke kalcija na proizvodnju alkohola, preživljavanje i broj stanica na kraju fermentacije. Iz njih se može zaključiti da sladovinama od 1048 OG i 1080 OG nema dovoljno prirodno prisutnog magnezija, te da magnezij pokazuje puno bolju djelotvornost kada je kisik prisutan u sladovini. Kalcij, s druge strane, pokazuje negativan učinak na fermentaciju, čemu je uzrok djelomična inhibicija i zamjena magnezija u njegovim funkcijama, na primjer kod Mg<sup>2+</sup> ovisne ATP-aze (Rees i Stewart, 1999). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je potrebno dodavati magnezijeve soli prilikom proizvodnje piva kako bi se postigla što bolja učinkovitost u proizvodnji alkohola, ali i kako bi se smanjio stres na kvasce prilikom fermentacije sladovina s visokim koncentracijama šećera.

## Sahti: finski stil piva fermentiran pekarskim kvascem

Sahti, jedno od nekoliko primitivnih piva koja se i dalje proizvode u Europi, je finsko domaće pivo posebno u tome da je fermentirano pekarskim kvascem a ne pivarskim.. Razlike koje ga čine posebnim su: produljeno vrijeme ukomljavanja (4 ili više sati), korištenje grančica borovice kao začina, nekorištenje ili minimalno korištenje hmelja, poseban proces ispiranja, izostanak kuhanja sladovine, sladovina visoke koncentracije šećera (čak 20° P/B), te kratka primarna fermentacija od samo 2 dana, zbog niske tolerancije pekarskog kvasca na alkohol (Catallo i sur., 2020.; Ekberg i sur. 2015.). Posebna sahti mješavina: Viking slad, Lahti, Finland (većinom pils slad, manje tamnog i enzimskog slada) čini 90% slada tijekom ukomljavanja, dok 10% čini tamni Tuoppi raženi slad. Posebnim tradicionalnim postepenim dodavanjem vrele vode podiže se temperatura slada s 30°C na 70°C. Ukomljavanje traje u prosjeku od 4 do 6 sati te nakon njega slijedi ispiranje. Ispiranje je poseban proces prije kojeg se slad prenese u novu posudu gdje se održava na temperaturi između 85°C i temperature vrenja. Slad se nakon toga ispire vrućom vodom u posebnoj dugačkoj posudi koja se zove *kuurna* dok se ne dobije željeni volumen. Tradicionalno su *kurrna* posude drvene, no danas su zamijenjene posudama od nehrđajućeg čelika. Prilikom ukomljavanja ili ispiranja koriste se grančice i plodovi borovice kao začini. Inokulacijske koncentracije variraju od 1 do 2,5 g kvasac/L sladovine. Za kuhanje velikih količina iznad 100L koristi se starter kultura (hidratizirane velike količine suhog kvasca pripremljene u šećernoj otopini), dok se za manje količine kvasci direktno inokuliraju u sladovinu. Primarna fermentacija traje 24-48 sati na sobnoj temperaturi nakon čega se fermentacija prebacuje na hladnije temperature (5-10°C). Sljedeći korak varira između pivara, fermentacija se može ili prekinuti ili može početi sekundarna fermentacija u novom spremniku koja može trajati do nekoliko tjedana. Pripremljeno sahti pivo nakon toga se skladišti na hladno (5°C). Sahti je jako alkoholno pivo uobičajenog ABV-a (volumni udio alkohola u alkoholnom piću) oko 7-8%, slatkastog okusa, gusto i s jakim voćnim aromama porijeklom od kvasca. Ovo pivo niske je gorčine zbog izostavljanja hmeljenja (3-13 IBU), visokog preostalog šećernog ekstrakta slada (medijan 9,5°P) i nestabilne pjene. Arome raži i borovice su također posebno istaknute. Fermentacijom pomoću pekarskog umjesto pivarskog kvasca nastaje spoj 4-vinilgvajakol koji mirisom podsjeća na klinčić. Koncentracije viših alkohola, estera, te određenih posebnih aroma su više u sahti pivu nego u drugim pivima sličnog karaktera. Zbog nekuhanja sladovine nakon



ukomljava nja kontaminacija bakterijama mliječno-kiselog vrenja je uobičajena i štoviše, pozitivno pridonosi okusu završnog proizvoda kao što je slučaj u belgijskim lambic stilovima, fermentiranim bakterijama i divljim vrstama kvasaca. Slično mnogim Engleskim pivima, sahti je nisko karbonizirano pivo slabe pjene. Razlog tome su vrlo stresni uvjeti (osmotski pritisak i visoki ABV) što dovodi do oslobođenja proteinaze A iz stanica kvasaca. Kuhanjem sahti piva u tradicionalnim drvenim posudama neizbježna je infekcija divljim kvascima koji svojim aromatskim spojevima utječu na okus piva (Ekberg i sur., 2015.).

## Literatura

- (1) K.A. Jacques, PhD; T.P. Lyons, PhD; D.R. Kelsall; Inge Russel (2003.) : The Alcohol Textbook, 4th Edition, Chapter 9: Understanding yeast fundamentals, Nottingham University Press, 87. str. – 117. str.
- (2) Mahendra Rai; Paul Dennis; Bridge Pieter; J. Verbelen; Freddy R. Delvaux (2009.): Applied Mycology, Chapter 7: Brewing Yeast in Action: Beer Fermentation, CAB International, 110. str. – 128. str.
- (3) James E. Haber (2012.): Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*, Yeastbook, 02254-9110, 33. str. – 34. str.
- (4) Jürgen Wendland (2014.): Lager Yeast Comes of Age, Eukaryotic Cell, 10.1128/EC.00134-14, 1256. str.
- (5) <https://en.wikipedia.org/wiki/Reinheitsgebot>
- (6) Alba-Lois, L. & Segal-Kischinevzky, C. (2010) Beer & Wine Makers. Nature Education 3(9):17, 4. i 5. stranica
- (7) Elizabeth J. Lodolo; Johan L.F. Kock; Barry C. Axcell; Martin Brooks (2008.): The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing, Blackwell Publishing Ltd., 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x
- (8) Maya P. Piddocke; Stefan Kreis; Hans Peter Heldt-Hansen; Kristian Fog Nielsen; Lisbeth Olsson (2009.): Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity

beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts, Springer-Verlag, Appl Microbiol Biotechnol, 10.1007/s00253-009-1930-y

(9) P. J. Verbelen; T. M. L. Dekoninck; S. M. G. Saerens; S. E. Van Mulders; J. M. Thevelein; F. R. Delvaux (2008.): Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour, Springer-Verlag, Appl Microbiol Biotechnol, 10.1007/s00253-008-1779-5

(10) Lucía Blasco; Miquel Viñas; Tomás G.Villa (2011): Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast, INTERNATIONAL MICROBIOLOGY, 10.2436/20.1501.01.136

(11) Elizabeth M. R. Rees i Graham G. Stewart (1999): Effects of Magnesium, Calcium and Wort Oxygenation on the Fermentative Performance of Ale and Lager Strains Fermenting Normal and High Gravity Worts, Journal of the Institute of Brewing, Volume 105, No. 4

(12) Elizabeth M. R. Rees and Graham G. Stewart (1997): The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 103, pp. 287-291

(13) G. M. Walker; R. M. Birch; G. Chandrasena i A. I. Maynard (1996): Magnesium, Calcium, and Fermentative Metabolism in Industrial Yeasts, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54:1, 13-18, DOI: 10.1094/ASBCJ-54-0013

(14) Martina Catallo; Jarkko Nikulin; Linnea Johansson; Kristoffer Krogerus; Mika Laitinen; Frederico Magalhães; Marjokaisa Piironen; Atte Mikkelson; Cinzia L. Randazzo; Lisa Solieri and Brian Gibson (2020.): Sourdough derived strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their potential for farmhouse ale brewing, The Institute of Brewing & Distilling, John Wiley & Sons Ltd, 0.1002/jib.608

(15) Jukka Ekberg; Brian Gibson; Jussi J. Joensuu; Kristoffer Krogerus; Frederico Magalhães; Atte Mikkelson; Tuulikki Seppänen-Laakso and Arvi Wilpola (2015.): Physicochemical characterization of sahti, an ‘ancient’ beer style indigenous to Finland, © The Institute of Brewing & Distilling, John Wiley & Sons Ltd, 10.1002/jib.246