

## UTJECAJ ADITIVA SERVOMYCES® NA KVASCE RAZLIČITIH GENERACIJA TIJEKOM VRENJA PIVA

Valentina Obradović<sup>1</sup>, Svjetlana Škrabal<sup>1</sup>, Helena Marčetić<sup>1</sup>, Draženka Laljek<sup>2</sup>, Maja Ergović Ravančić<sup>1</sup>

Izvorni znanstveni rad – *Original scientific paper*

### Rezime

Pivo se procesom alkoholnog vrenja proizvodi iz slada, hmelja, vode i pivskog kvasca. U proizvodnji piva koriste se odabrani sojevi pivskog kvasca vrste *Saccharomyces uvarum* za tzv. lager piva (piva donjeg vrenja), dok se za proizvodnju ale piva (piva gornjeg vrenja) koristi vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, a mogu se koristiti i različiti hibridi tih kvasaca. U toku vrenja kvasac razlaže šećere iz sladovine na alkohol i CO<sub>2</sub>. Proizvodi njegova metabolizma su i nusproizvodi kao što su vicinalni diketoni koji značajno utječu na aromu i kvalitetu piva. Posebna se pažnja posvećuje procesu propagacije kvasca. Servomyces® jedan je od aditiva koji je proizveden kao dodatak za potrebe pivarske industrije. Cilj ovoga rada bio je utvrditi učinak na kvasce 1., 2. i 3. generacije, te utvrditi eventualne razlike između piva kojemu je pri kraju procesa kuhanja dodan aditiv Servomyces®, u odnosu na pivo koje je proizvedeno standardnim postupkom. U tu svrhu, tijekom procesa vrenja praćeni su prividni ekstrakt i koncentracija vicinalnih diketona, a na kraju vrenja izmjeran je stupanj prevrelosti i postotak mrtvih stanica kvasca. Redukcija vicinalnih diketona se pratila 6 - 9 dana nakon završetka vrenja. Utvrđeno je da je redukcija vicinalnih diketona brža uz dodatak Servomycesa®, te da je udio prividnog ekstrakta ustaljen nakon šestog dana. Broj mrtvih stanica kvasca bio je manji u kvascu s dodatkom Servomycesa®. Stupanj prevrelosti bio je znatno niži u uzorcima kojima je dodan Servomyces®.

Ključne riječi: *pivo, kvasac, aditivi, vicinalni diketoni, vrenje*

### UVOD

Pivo je osvježavajuće gazirano piće s malim udjelom alkohola. U proizvodnji piva velika se pažnja posvećuje kvascu koji se koristi za naciepljivanje pivske sladovine. Koriste se odabrani sojevi vrste *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces cerevisiae* (Marić i Navodnik, 1995). U toku vrenja kvasac razlaže šećere iz sladovine na alkohol i CO<sub>2</sub>. Kvasac tijekom uzgoja proizvodi i druge spojeve osim CO<sub>2</sub> i etanola, primjerice

FUXcj ] Dc'cdfj] fYXbc!dfY\fla Vybc[ 'ZUj i 'fYHU i b]j Yfn]fYHU i 'GURU'Y] i ž; cX" @-LžVfc^+ (#&  
U] 0^\* zdfP|çaa\æ  
Oad|•â^!\* Ô| [ azaââi] [ HZoa] zaaFA | eeeS[] :â) zaaP|çaa\æA  
S[!^•][ â^] &aaA^!|aaâO -d|E@A

glicerol, više alkohole, ostale arome okusa i mirisa te malu količinu biomase (Overkamp i sur., 2000).

Gotovo 90% aminokiselina koje su prisutne u sirovinama za proizvodnju piva se u procesu proizvodnje u anaerobnim uvjetima, tj. tijekom vrenja konvertiraju u više alkohole piva (Vuralhan i sur., 2005).

Anaerobnim vrenjem dio nikotinamid adenin dinukleotid hidrida (NADH) se oksidira u reakcijama sinteze glicerola, no to je za stanicu energetski nepovoljno jer se troši adenozin trifosfat (ATP) (Overkamp i sur., 2000). Vieira i sur. (2018) navode da kvasac može biti značajan izvor biogenih elemenata: željeza (1,76 mg/ 100 g otopljene vode), cinka (119 mg/100 g otopljene vode), mangana (0,564 mg/100 g otopljene vode) i bakra (0,364 mg/100 g otopljene vode). Proizvodi njegova metabolizma su i nusproizvodi kao što su vicinalni diketoni (VDK), koji značajno utječu na aromu i kvalitetu piva. Posebna se pažnja posvećuje procesu propagacije kvasca (razmnožavanje čiste kulture kvasca na veće količine) (Bohunicki i sur., 1972). Kvasci iz roda *Saccharomyces* vrlo dobro rastu na jednostavnoj podlozi sa šećerima kao izvorom energije i ugljika, amonijevim solima kao izvorom dušika, mineralnim tvarima (izvori Fe, K, Mg, Zn, Mn, Cu) potrebnih za funkcioniranje aktivnog metabolizma i tvarima rasta (Stewart i Russell, 1993). Kvasci su jednostanične mikroskopske gljivice kugličasta, eliptična ili izdužena oblika, promjera 5 - 8 µm. Osnovni tip stanice je blastospora, koja se razmnožava nespolno, pupanjem. Na blastospori izrasta pup koji se razvija te kada dosegne veličinu matične stanice otkida se od nje. Roditeljska stanica stvara pup na vanjskoj površini, kako pup raste dijeli se jezgra roditeljske stanice i potom jedna odlazi u pup. Na mjestu gdje se otkinuo pup ostaje ožiljak na roditeljskoj stanici i kada je velika površina prekrivena ožiljcima, stanica odumire (Duraković i Duraković, 2003). Inokulum mora imati više od 95 % živih stanica, ako nema potrebna je veća količina inokuluma. Veliki broj mrtvih stanica loše utječe na pivo koje poprima okus i miris po kvascu. Loša manipulacija kvascem i pretjerano kiselinsko pranje smanjuju životnost kvasca (Wackerbauer i sur., 1997). Optimalna temperatura vrenja za ale pivo (pivo gornjeg vrenja) je 16 – 20 °C, a za lager pivo (pivo donjeg vrenja) 9 - 13 °C. Općenito, vrijedi pravilo da je vrenje brže što je temperatura viša, ali ona ne smije biti previsoka jer utječe na sintezu metabolita koji mijenjaju okus i miris piva (Marić, 1996). Alkoholno vrenje obuhvaća niz enzimatskih procesa, čiji je konačni rezultat metaboliziranje heksoza na etanol i ugljični dioksid CO<sub>2</sub>, te se u tim procesima oslobađa energija koju stanice kvasca koriste u sintezi sirovina potrebnih za njihove životne aktivnosti, rast i razmnožavanje (Chul i sur., 2007). Ukoliko nema dovoljno pojedinih hranjivih tvari u odabranim količinama ekstrakta kvasca, mogu se koristiti specifični sojevi. Što je endogena hidrolitička aktivnost stanica kvasca veća tijekom autolize, više aminokiselina se može osloboditi iz proteina u ekstrakt kvasca (Sommer, 1998). Znatnije promjene uočene su tijekom ulaska u stacionarnu fazu (Hans i sur., 2001). Vieira i sur. (2018) su otkrili da je proteolitička aktivnost za autolizu bila najveća nakon druge uporabe pivskog kvasca. *S. cerevisiae* (uzgaja se na melasi trske) i *K. marxianus* (uzgaja se na permeatu sirutke) imali su utjecaj na opseg autolize (stanično otapanje komponenata, oslobađanje amino i nukleinskog dušika), te su utjecali na aktivnosti lipolitičkih enzima (Amrane i Prigent, 1998, Yamamura i sur. 1991). Ponovno korištenje kvasca u procesu proizvodnje piva

rezultiralo je povećanjem sadržaja proteina u ekstraktu kvasca (Vieiri i sur., 2018). Visokoproteinski sojevi *S. cerevisiae* mogu poslužiti kao početni materijal za proizvodnju ekstrakta kvasca (Jacob i sur., 2019). Upotreba kvasaca koji imaju intrizični katalitički mehanizam za razgradnju glutaminske kiseline tijekom autolize mogu utjecati na promjenu niza slobodnih aminokiselina (Masuda i sur., 2008). Danas se u proizvodnji piva mogu koristiti različiti aditivi. Cvangroschová i Šmogrovičová (2005) u svom radu su proučavale utjecaj upotrebe sredstva protiv pjenjenja i hrane za kvasce na tijek vrenja, redukciju diacetila i kvalitetu gotovog piva u sladovini gravitacije 13 °P. Prema njihovom istaživanju, dodatak Antifoam Foamsol u koncentraciji od 4,2 ml/hl značajno je smanjio pjenjenje u kotlu za sladovinu tijekom vrenja, tako da je omogućio smanjenje doze hmelja. Jedinice gorčine smanjene su za oko 9,7 BU tijekom vrenja s upotrebom Foamsola, ali bez sredstva protiv pjenjenja smanjene su za oko 12,6 BU. Stabilnost pjene je bila konstantna. Hranjivi dodatak Yeastlife Extra u koncentraciji od 4 g/hl pomogao je bržem smanjenju sadržaja diacetila i VDK.

Servomyces® jedan je od aditiva koji su proizvedeni kao dodatak za potrebe pivarske industrije. To je osušeni pivarski kvasac u koji je ugrađen cink. Patentiran je u Americi (Lallemend) kao dodatak pivskoj sladovini (Lallemendbrewing, URL). Odobren je kao dodatak za korištenje u njemačkoj pivarskoj industriji u skladu s njemačkim zakonom o čistoći piva. Svrha njegovog dodatka je ubrzavanje procesa vrenja i životnosti kvasca. Kada je kvasac pohranjen, on crpi rezervne hranjive tvari koje kasnije moraju biti kompenzirane da bi kvasac mogao uspješno obaviti vrenje sladovine (Schuster i sur., 1988). Sastav ekstrakta kvasca može biti obogaćen s različitim ugljikohidratima koji će se moći koristiti pri određenim uvjetima okoline kao što su povišene temperature i nedostatak pojedinih nutrijenata (Bokulich, 2017). Na tržištu patentiran "Servomyces", tvrtka Lallemend Inc., trgovački naziv aktivnog i osušenog kvasca (taksonomski naziv: *S. cerevisiae*), je zadržao visoke koncentracije cinka u svom metabolizmu. Dodavanjem ovog kvasca obogaćenog cinkom u sladovinu tijekom kuhanja dolazi do otapanja ekstrakta u sladovini (Fischborn i sur., 2004). Prema navodima proizvođača na 100 litara sladovine za vrenje koristi se 1 g Servomycesaa. Praktična ispitivanja su pokazala da Servomyces treba dodati desetak minuta prije kraja kuhanja.

Za uspješnost vrenja presudna su slijedeća svojstva kvasaca: flokulacija; potrošnja šećera, aminokiselina, malih peptida i amonijevih iona iz ekstrakta; tolerancija kvasca na visoke osmotske tlakove; tolerancija na etanol i potreba za kisikom. Navedena svojstva su vezana uz temperaturu vrenja koja je različita za kvasce donjeg i gornjeg vrenja. Kvasci donjeg vrenja počinju vrenje na 6 °C, završavaju na 18 °C, maksimalno na 34 °C. Kvasci gornjeg vrenja započinju vrenje sladovine pri temperaturi od 18 °C, završavaju na oko 25 °C, maksimalno na 37 °C (Stewart, 2009). Kvasac u hmeljnoj sladovini apsorbira otopljene šećere, vitamine, aminokiseline i amonijeve ione (Stewart, 2016). Dodatkom Servomyces® tj. mineralnih tvari ugrađenih u živo tkivo (stanice pivskog kvasca) postiže se efekt boljeg iskorištenja tih hranjivih tvari, tj. veći stupanj prevrenja (Sp). Servomyces® može značajno smanjiti vrijeme vrenja, poboljšati taloženje kvasca, povećati prinos alkohola, stimulirati sintezu proteina i rast kvasaca i time doprinijeti porastu biomase u procesu propagacije kvasca, reducirati sumporne

komponente, poboljšati zdravlje i životnost kvasca, reducirati koncentraciju vicinalnih diketona u glavnom vrenju. Thomas i sur. (1994) utvrdili su u svojoj studiji da ekstrakt kvasca i drugi složeni aditivi kao što su tripton i pepton pokazuju dvojak mehanizam kod vrenja piva. Posljedično, oni ne samo da opskrbljuju faktore rasta za nedovoljno opskrbljene stanice, nego potiču rast i vrenje sladovine visoke gravitacije, te održavaju vitalnost stanica na 80% i djeluju kao osmoprotektori. Učinak glicin betaina, koji je sastavni dio ekstrakata kvasca, bio je umjeren i povezan s poteškoćama u staničnom metabolizmu, što je najvjerojatnije uzrokovano njegovim pozitivnim nabojem. Osim toga, utvrđeno je da prolin proizveden katabolizmom arginina djeluje kao osmoprotektor prilikom vrenja pšenice (Thomas i sur., 1993). Korištenje nukleinskih kiselina povećalo je rast kvasca i učinak vrenja, iako se vitalnost stanica nije mogla održati Thomas i sur. (1994).

## MATERIJAL I METODE RADA

Uzorci piva su priređeni u industrijskoj proizvodnji piva. Nakon što je slad priređen mljevenjem, izvršeno je ukomljavanje (oko 1 h; tem. 45 – 72 °C), odvajanje sladovine (1- 3 h; 73 – 78 °C). Dobivena sladovina se kuhala 2,5 h pri tem 100 °C i bistrila 60 min. pri temp 90 – 100 °C. Potom je slijedila inokulacija sladovine (dodatak kvasca *Saccharomyces uvarum*). Vrenje i zrenje trajali su 9 dana, početak vrenja je bio pri 6 °C, a kraj pri 25 °C. Praćeni su procesi glavnog vrenja sladovine, te su stanice kvasca izdvojene po završetku glavnog vrenja sladovine. Otvaranjem ispusta pri dnu kotla za vrenje izuzeti su uzorci za provođenje analitičkog dijela eksperimenta. Na početku vrenja izmjeren je sadržaj ekstrakta u sladovini, te je iznosio 14,1% u uzorcima naciepljenim prvom generacijom kvasca i 13,8% u uzorcima naciepljenim drugom i trećom generacijom. Napravljena su tri pokusa, u svakome su korištena po dva cilindrično konusna kotla za vrenje (CKF). U jednom CKF – se radilo po standardnoj proceduri vrenja, a drugom uz dodatak aditiva *Servomyces*<sup>®</sup>. U prvom pokusu je inokulum bio kvasac prve generacije, u drugom je korišten kvasac druge generacije, a u trećem kvasac treće generacije. Praćeno je ukupno šest CKF-a koji su naciepljeni s tri različite generacije kvasca. Tri uvarka sladovine su naciepljena i proizvedena standardnim postupkom (uz dodatak ZnCl<sub>2</sub>), ostala tri uz dodatak aditiva *Servomyces*<sup>®</sup>, 10 minuta prije završetka procesa kuhanja u količini od 310 g po jednom uvaru sladovine. U prvom pokusu korišten je kvasac *Saccharomyces uvarum* prve generacije proizveden aerobnom propagacijom, u drugom pokusu kvasac *Saccharomyces uvarum* druge generacije, a u trećem kvasac *Saccharomyces uvarum* treće generacije. Od šestog do devetog dana vrenja određivana je koncentracija VDK mjerenjem na spektrofotometru na valnoj duljini 335 nm. Za mjerenje VDK priređen je uzorak piva temperiran na sobnoj temperaturi. Dodatkom filtracijskog sredstva dobiven je bistri uzorak. U 10 ml filtrata dodano je 5 ml 1% -tne otopine o-fenilendiamina, te mu je nakon stajanja 20 – 30 minuta na mračnom mjestu, dodano 2 ml 4M HCl. Potom je dodano tri žličice filtracijskog sredstva i profiltrirano preko lijevka prekrivenog satnim staklom. Koncentracija uzorka mjeri se na spektrofotometru, na valnoj duljini 335 nm. Aparat mjeri apsorbanciju.

$$VDK = 2.7 * A \quad (1)$$

2.7 - koeficijent

A – apsorbancija, nm

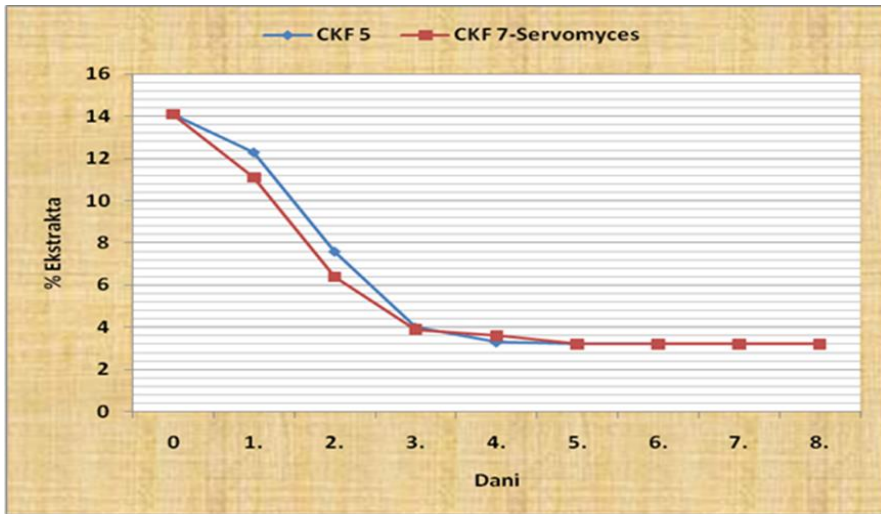
VDK - vicinalni diketoni, ppm

Ekstrakt u mladom pivu izmjereno je pomoću DMA 35N aparata direktnim očitavanjem vrijednosti (Anton-paar, URL). Prije očitavanja uzorak je degaziran postupkom prelijevanja iz jedne posude u drugu. Za mjerenje stupnja prevrelosti, uzorak iz CKF - a temperiran je u vodenoj kupelji pri temperaturi od 20 °C, a zatim je stavljen u tikvicu od 1000 ml, te mu je dodano 2 žličice filtracijskog sredstva Potom je tikvica začepljena i dobro promućkana osam puta, uz povremeno otvaranje čepa (sve dok se više ne čuje zvuk izlaženja CO<sub>2</sub>). Nakon toga je izvršena filtracija. Bistri i degazirani uzorak uliven je u pripadajuće posudice i postavljen u bubanj „Alcolyser Plus Beer“ (Anton – paar, URL).

Određivanje broja mrtvih stanica kvasca u uzorku kvasca vršen je brojanjem stanica kvasca na Thomaovoj komorici mikroskopiranjem (Evropska pivarska konvencija, 1985). Pri tom se koristilo metilensko plavilo koje je obezbojilo žive stanice, te ih je pod mikroskopom lako razlikovati. Potom se izvršilo brojanje stanica kvasca na Thomaovoj komorici mikroskopiranjem. Najprije su se izbroje sve stanice kvasca (obojene i neobojane) u svakom pojedinom kvadratu, a potom su brojane samo mrtve stanice kvasca (obojene u plavo).

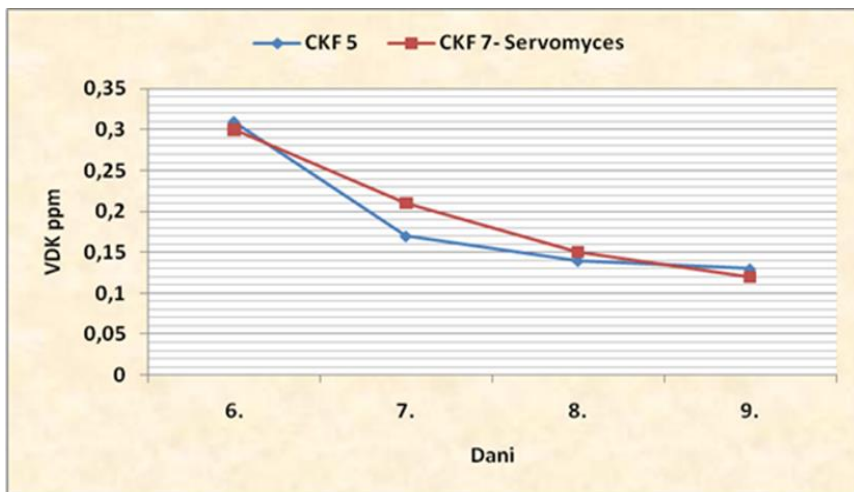
## REZULTATI I DISKUSIJA

Parametri koji su praćeni tijekom procesa vrenja bili su prividni ekstrakt i koncentracija vicinalnih diketona, a na kraju vrenja izmjereno je stupanj prevrelosti i postotak mrtvih stanica kvasca. Navedeni parametri su izuzetno važni za kvalitetu piva (Kunze, 1988), jer tijekom vrenja nastaju karbonilni spojevi, kao što su aldehidi i vicinalni diketoni koji negativno utječu na aromu i okus piva (Briggs i sur., 2004). Za potrebe provedbe eksperimenta napravljena su tri pokusa, svaki s po dva CKF-a. U svakom pokusu pratila su se istovremeno po dva CKF-a. U prvom pokusu, sladovina u dva kotla za vrenje (CKF 5 i CKF 7), nacijepljena je recikliranim kvascem prve generacije, u drugom pokusu u iduća dva kotla za vrenje (CKF 10 i CKF 15) sladovina je nacijepljena recikliranim kvascem druge generacije, te u trećem pokusu (CKF 12 i CKF 11) nacijepljeni su kvascem treće generacije. Pokusima se uspoređivao i kraj vrenja tj. dan kada se prividni ekstrakt ustalio na konačnoj vrijednosti (ista vrijednost ekstrakta izmjerena u dva uzastopna dana).



Grafikon 1. Promjena udjela ekstrakta po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a, naciijepljenog kvascem prve generacije  
*Graph 1. Change in the proportion of extract by days of beer fermentation from two comparative CKFs, inoculated with first generation yeast*

U prvom pokusu (korišten je reciklirani kvasac prve generacije). Izmjerena vrijednost početnog ekstrakta u obadva tanka bila ista (14,1%). Prva tri dana ekstrakt je brže padao u CKF 7, tj. u tanku gdje je bio dodan Servomyces® (Grafikon 1). Razlog tome je najvjerojatnije veća aktivnost kvasca što je dovelo do brže razgradnje ekstrakta. Četvrti dan, ekstrakt u CKF 7 padao je sporije od ekstrakta u CKF 5, a peti su se izjednačili. Glavno vrenje je u obadva tanka završilo šesti dan (Grafikon 1), tj. kada se vrijednost prividnog ekstrakta ustalila na 3,2%. Prema tome u prvom pokusu utvrđeno je da je proces vrenja u prvim danima tekao brže u tanku s dodatkom Servomyces®-a (CKF 7), no nakon toga je usporio i u konačnici je glavno vrenje završilo isti (šesti) dan u obadva tanka. Redukcija VDK se pratila 6 – 9 dana, nakon završetka glavnog vrenja. U prvom pokusu početna je koncentracija VDK (mjerena 6 - ti dan) u CKF 7 (Servomyces®) bila nešto niža nego u CKF 5. Diacetili, odnosno VDK daju okus i miris po maslacu. Redukcija diacetila se odvija pomoću kvasaca, na način da kvasac konvertira diacetil u acetoin, a potom u butandiol. Udio ukupnog diacetila (vicinalnih diketona i prekursora) u pivu bi trebala iznositi 0,1 ppm (Palmer, 2006). Navedeno je u skladu s dobivenim rezultatima za kraj vrenja u 2 i 3. pokusu u slučaju korištenja Servomyces®, te je za očekivati da će tako proizvedeno pivo imati dobru aromu. Deveti dan izmjeren je stupanj prevrelosti u tankovima i utvrđeno da je pivo u CKF 7 (dodan Servomyces®) imalo znatno niži stupanj prevrelosti od piva u CKF 5. Na kraju procesa vrenja ispušten je kvasac i napravljena analiza kojom se utvrdio postotak mrtvih stanica kvasca. Analizom je utvrđeno da je u kvascu iz CKF 7 (dodan Servomyces®) bio prisutan manji postotak mrtvih stanica kvasca nego u CKF 5 (Grafikon 2).

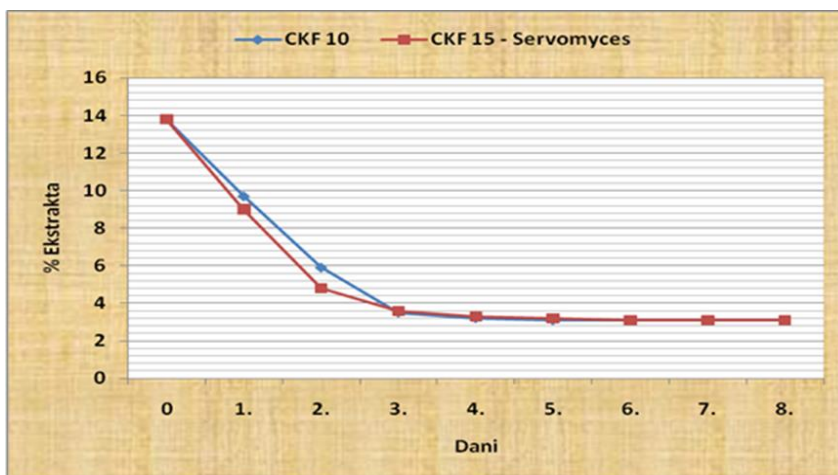


Grafikon 2. Redukcije VDK po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a, naciepljenog kvascem prve generacije

*Graph 2. VDK reductions by days of beer fermentation from two comparative CKFs, inoculated with first generation yeast*

U drugom pokusu CKF 10 je napunjen sladovinom po standardnom postupku vrenja, a CKF 15 je napunjen sladovinom kojoj je dodan aditiv Servomyces®. Za naciepljivanje je korišten kvasac druge generacije. Početni ekstrakt bio je u obadva tanka isti (13,8%) (Grafikon 3). Prva dva dana ekstrakt je brže padao u CKF 15. Razlog tome je očita veća aktivnost kvasca što je dovelo do brže razgradnje ekstrakta, što je u skladu s istraživanjima Fischborna i suradnika (2004). Naime, oni navode da se bolja ekstakcijska razgradnja postiže dodatkom Servomycesa® u odnosu na dodatak čistog ZnCl<sub>2</sub>, te smatraju da je bioraspoloživost Zn veća u stanicama Servomycesa®. Van Zandycke i Fischborn (2008) smatraju da deaktivirani kvasac obogaćen cinkom kao hrana za kvasce, daje slične rezultate kao i Servomyces® i slični aditivi, te da je važno uskladiti sastav hranjivih tvari sa specifičnim potrebama kvasaca.

Treći dan, ekstrakt u CKF 15 padao je sporije od ekstrakta u CKF 10, a peti su se gotovo izjednačili. Vrijednost prividnog ekstrakta ustalila se na 3,1% u obadva tanka. Vrenje je u CKF 10 završilo šesti dan, a u CKF 15 (dodan Servomyces®) sedmi dan. Prema tome, u drugom pokusu utvrđeno je da je proces vrenja u prva dva dana tekao brže u tanku sa dodatkom Servomyces® - a (CKF 15), no nakon toga je usporio i u konačnici je glavno vrenje završilo ranije u CKF 10, rađenom po standardnoj proceduri.



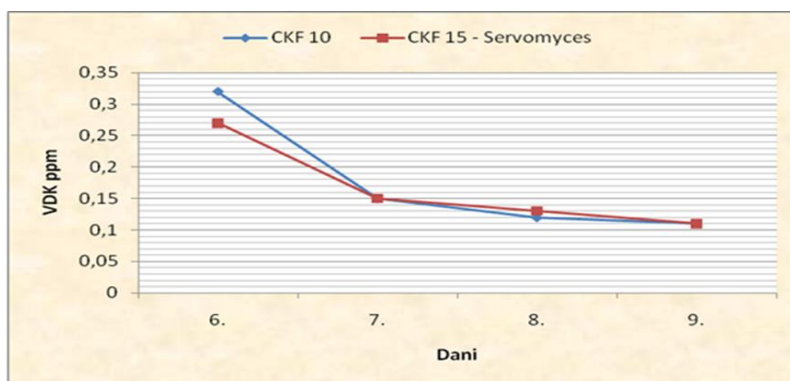
Grafikon 3. Promjena udjela ekstrakta po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a naciepljena kvascem druge generacije

*Graph. 3. Change in the proportion of extract by days of beer fermentation from two comparative CKFs inoculated with second generation yeast*

U drugom pokusu početna je koncentracija VDK (mjerena 6 - ti dan) u CKF 15 (dodan Servomyces®) bila niža nego u CKF 10, zatim je iduća dva dana padala sporije, da bi konačan rezultat izmjeren 9 – ti dan bio isti u obadva tanka (slika 4). Smanjenje njihove koncentracije tijekom glavnog i naknadnog vrenja, omogućuje da esteri i viši alkoholi budu presudni za aromu i okus gotovog piva (Kunzle, 2010.) Kits i Garshol (2021) navode kako pri uobičajenim temperaturama vrenja, odnosno pri temperaturama unutar optimalnog raspona, kvasac SafAle™ US-05 daje pivo dobro uravnoteženog aromatskog profila, kojim dominiraju voćni esteri. Povećanjem temperature vrenja uočen je snažan trend porasta nepoželjnih tvari arome.

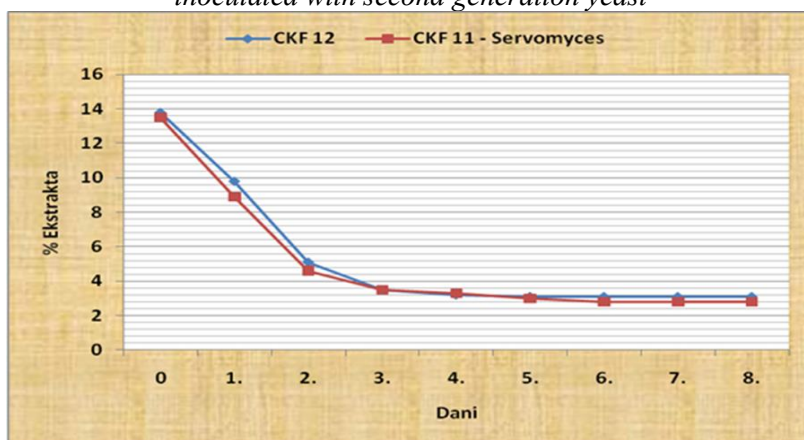
Deveti dan izmjeren je stupanj prevrelosti u tankovima i utvrđeno da je pivo u CKF 15 imalo niži stupanj prevrelosti od piva u CKF 10. Analizom je utvrđeno da je u kvascu iz CKF 15 (dodan Servomyces®) bio prisutan manji postotak mrtvih stanica kvasca nego u CKF 10 (Grafikon 8). U trećem pokusu CKF 12 je napunjen sladovinom po standardnom postupku, a CKF 11 je napunjen sladovinom kojoj je dodan Servomyces®. Za necijepljivanje je korišten kvasac treće generacije. Početni ekstrakt u CKF 12 bio je nešto viši (13,8 %) od ekstrakta u CKF 11 (13,5%). Prva dva dana ekstrakt je brže padao u CKF 11. Treći dan, ekstrakt je bio isti u obadva tanka (3,5%), dalje je padao približno istom brzinom (Grafikon 5). Prividni ekstrakt se ustalio na 3,1% u CKF 12 i 2,8% u CKF 11. Glavno vrenje je u CKF 12 završilo šesti dan, a u CKF 11 (Servomyces®) sedmi dan (Grafikon 3). Prema tome u trećem pokusu utvrđeno je da je proces vrenja u prva dva dana tekao brže u tanku sa dodatkom Servomyces-a (CKF 11), no nakon toga je usporio i u konačnici je glavno vrenje završilo ranije u CKF 12 (rađenom po standardnoj proceduri). Prema istraživanjima Cvengroschove i Šmogrovičove (2005) dodatak Servomyces® u količini 1g/hl skratio je vrijeme fermentacije za 12 sati, a poželjna vrijednost diacetila postignuta je šesti dan. U trećem pokusu koncentracija

VDK (mjerena 6. dan) u CKF 11 (Servomyces®), bila je sva četiri dana niža nego u CKF 12 (Grafikon 6). Deveti dan izmjeren je stupanj prevrelosti u tankovima i utvrđeno da je pivo u CKF 11 (dodan Servomyces®) imalo niži stupanj prevrelosti od piva u CKF 12, te je utvrđeno da je u kvasacu iz CKF 11 (Servomyces®) bio prisutan manji postotak mrtvih stanica kvasca nego u CKF 12 (Grafikon 3). Deveti dan izmjeren je stupanj prevrelosti u tankovima i utvrđeno da je pivo koje je sadržvalo Servomyces imalo znatno niži stupanj prevrelosti od piva koje je proizvedeno standardnim procesom proizvodnje. Najniži stupanj prevrelosti je imalo pivo proizvedeno u CKF 15, u kom su nacijepljeni kvasci druge generacije uz dodatak Servomyces® – a (Grafikon 7).



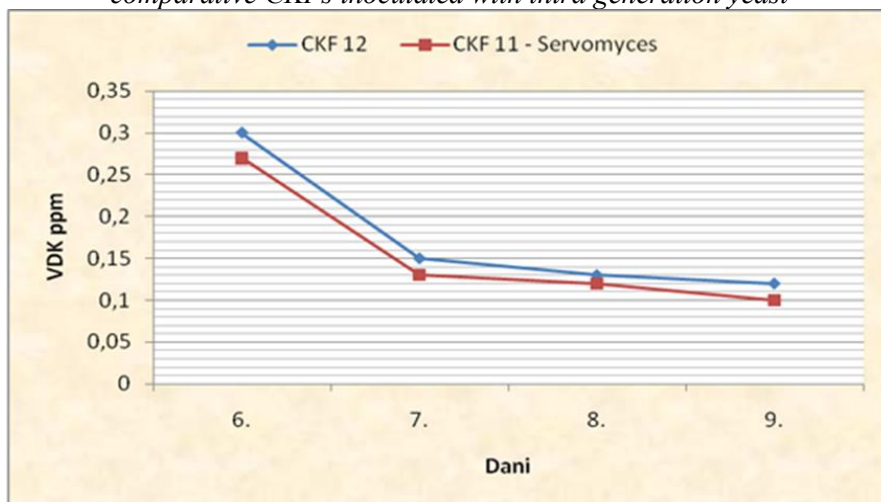
Grafikon 4. Redukcije VDK po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a naciepljena kvascem druge generacije

Graph 4. VDK reductions by days of beer fermentation from two comparative CKFs inoculated with second generation yeast



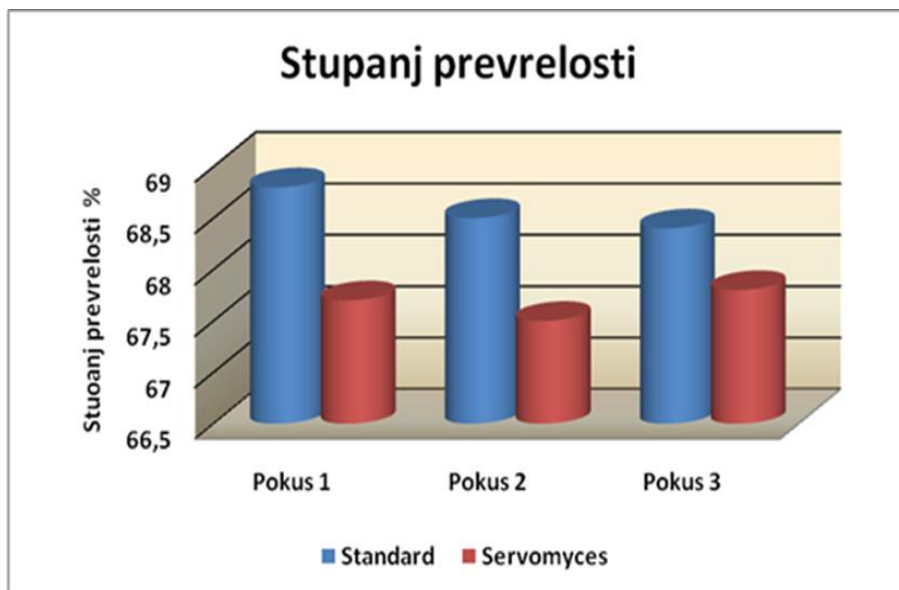
Grafikon 5. Promjena udjela ekstrakta po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a naciepljena kvascem treće generacije

Graph 5. Change in the proportion of extract by days of beer fermentation from two comparative CKFs inoculated with third generation yeast



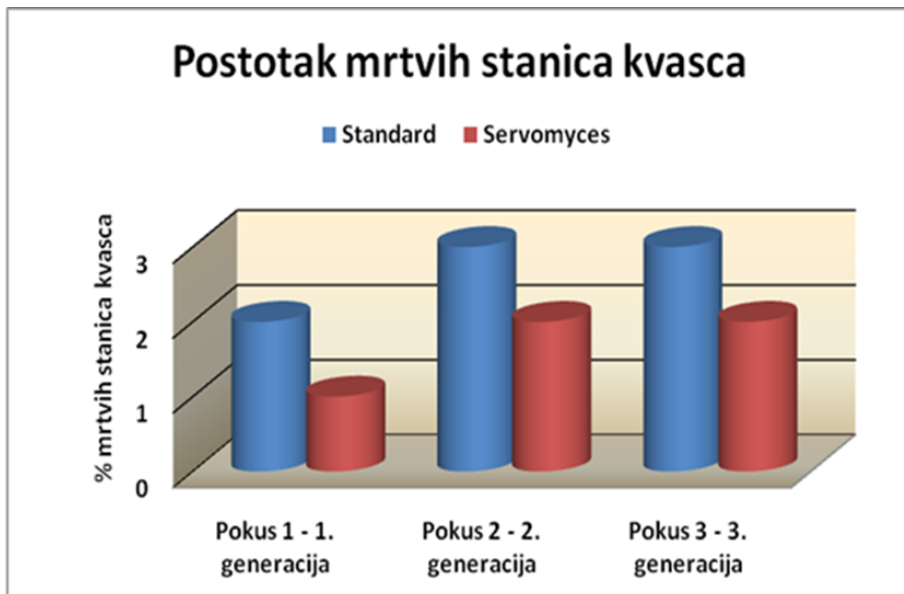
Grafikon 6. Redukcije VDK po danima vrenja piva iz dva usporedna CKF-a naciyepljena kvascem treće generacije

Graph 6. VDK reductions by days of beer fermentation from two comparative CKFs inoculated with third generation yeast



Grafikon 7. Usporedba stupnja prevrelosti za sva tri pokusa

Graph 7. Comparison of the degree of prevalence for all three experiments



Grafikon 8. Usporedba postotka mrtvih stanica kvasca u sva tri pokusa  
*Graph 8. Comparison of percentage of dead yeast cells in all three experiments*

## ZAKLJUČAK

Dodatak Servomycesa® povećava brzinu vrenja u prvim danima vrenja, te zamjetno utječe na smanjene broja vicinalnih diketona pri korištenju kvasaca prve generacije. Učinak na redukciju vicinalnih diketona je uz dodatak Servomycesa® najočitiiji u uzorcima naciepljenim kvascima treće generacije, te je njihov udio na kraju vrenja niži u odnosu na pivo proizvedeno bez Servomycesa®. Stupanj prevrelosti manji je u tankovima s pivom kojem je u procesu kuhanja dodan Servomyces®. Broj mrtvih stanica kvasca manji je u kvascu iz tankova sa Servomycesom®, što ukazuje na veću životnost toga kvasca. S obzirom da vicinalni diketoni negativno utječu na aromu i okus piva, a veći broj mrtvih stanica kvasca daje pivu okus i miris po kvascu, dodatak Servomycesa® u konačnici će se odraziti na poboljšan okus i miris piva. Udio ekstrakta se uz dodatak Servomycesa® je brže padao i ustalio se nakon šestog dana vrenja, te bi bilo dobro razmotriti mogućnost smanjenja vremena vrenja u industrijskoj proizvodnji piva.

## LITERATURA

- Amrane, A. and Prigent, Y. (1998). Effect of culture conditions of *Kluyveromyces marxianus* on its autolysis, and process optimization, *Bioprocess Engineering*, 18 no. 5, pp. 383-388.
- Bohunicki, J., Eržen, B., Marić, V., Pirkić, M., Todorović, N. (1972). Priručnik za mikrobiologiju u pivovarstvu, Poslovno udruženje industrije piva Jugoslavije, Beograd.
- Bokulich, N. A. (2017). Brewing microbiology current research, omics and microbial ecology in: Bamforth, C. W.: Caister Academic Press, Norfolk.
- Briggs D, Boulton C, Brookes P, Stevens R (2004): *Brewing: science and practice*, 1. izd. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge.
- Chul, C., Wackerbauer, K., Ah Kang, S. (2007). Influence of aeration during propagation of pitching yeast on fermentation and beer flavor, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2), 297 – 304.
- Cvengroschová, M., Šmogrovičová, D. (2005). Vplyv aditív na priebeh fermentácie mladiny. *Kvasny Prum* 51(3): 83-5 | DOI: 10.18832/kp2005005.
- Duraković, S., Duraković, L. (2003). Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb
- Evropska pivarska konvencija (1985). Analitika EBC IIIi mikrobioloska analitika EBC, Schweizer Brauerei-rundschau, ch-8047 Zurich.
- Fischborn, T.; McLaren, J.; Geiger, E.; Briem, F.; Glas, K. and Engelmann, J. (2004). *Servomyces* – a biological nutrient, *Master Brewers Association of the Americas*, 41, no. 4, pp. 366-370.
- Hans, M. A.; Heinzle, E. and Wittmann, C. (2001). Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, no. 5/6, pp. 776-779.
- Jacob, F. F.; Hutzler, M. and Methner, F.-J. (2019). Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content, *European Food Research and Technology*, 245, no. 1, pp. 95-109.
- Kits, D., Garshol, L. M. (2021). Norwegian Kveik brewing yeasts are adapted to higher temperatures and produce fewer off-flavours under heat stress than commercial *Saccharomyces cerevisiae* American Ale yeast. *BioRxiv*, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.15.448505v1.full>
- Kunze, W. (1998). Tehnologija sladarstva i pivarstva, Jugoslavensko udruženje pivara, Beograd.
- Kunze W (2010). *Technology Brewing & Malting*, 4. izd., VLB, Berlin.
- Kunze, W. (2014). *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin, 5. izd.
- Marić V, Nadvornik, Z. (1995). Pivo tekuća hrana, Prehrambeno – tehnološki inženjering, Zagreb.
- Marić, V. (1996). Čiste kulture pivskog kvasca, *Svijet piva* (2), Zagreb.
- Marić, V. (2009). Tehnologija piva, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
- Masuda, K., Guo, X., Uryu, N., Hagiwara, T., Watabe, S. (2008). Isolation of marine yeasts collected from the Pacific ocean showing a high production of  $\gamma$ -

- aminobutyric acid, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, no. 12, pp. 3265-3272.
- 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. (2006). *How To Brew*, Brewers Publications; 3. izd.
- Schuster, K., Weinfurtner, F., Narziss, L. (1988). *Tehnologija proizvodnje sladovine, PZIPSJ*, Beograd.
- Sommer, R. (1998). Yeast extracts: production, properties and components, *Food Australia*, 50, no. 4, pp. 181-183.
- Stewart, G.G., Russell, I. (1993). Fermentation – The "Black Box" of the Brewing Process. *MBAA Tech. Quart.* 30, 159–168.
- Stewart, G. G. (2009). The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. *J. I. Brewing* 115(1), 3-29.
- Stewart, G.G. (2016). *Saccharomyces* species in the Production of Beer. *Beverages* 2. 34.
- Tenge, C. (2009). *Yeast*. U: Eßlinger HM (ured.) *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, 1. izd., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 120, 131, 132, 134.
- Thomas, K. C.; Hynes, S. H. and Ingledew, W. M. (1993). Excretion of proline by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of arginine-supplemented high gravity wheat mash, *Journal of Industrial Microbiology*. 12, no. 2, pp. 93-98.
- Thomas, K. C.; Hynes, S. H. and Ingledew, W. M. (1994). Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 60, no. 5, pp. 1519-1524.
- Van Zandycke, S. M., Fischborn, T. (2008). The impact of yeast nutrients on fermentation performance and beer quality, *Master Brewers Association of the Americas* 45, no. 3, pp. 290-293.
- Vieira, E.; Cunha, S. C. and Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2018). Characterization of a potential bioactive food ingredient from inner cellular content of brewer's spent yeast, *Waste and Biomass Valorization*, [https:// doi.org/10.1007/s12649-018-0368-9](https://doi.org/10.1007/s12649-018-0368-9).
- Vuralhan, Z., Luttk, 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.
- Wackerbauer K, Tayama T, Kunert S (1997). Recent findings on the influence of yeast storage on the fermentative activity and vitality of yeasts in subsequent fermentations. *Monatsschr Brauwiss* 50 (7/8): 132–137.

Yamamura, M.; Takeo, K. and Kamihara, T. (1991). *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated-temperatures are susceptible to autolysis, *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (1991), no. 11, pp. 2861-2864.

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

<https://www.lallemandbrewing.com/en/continental-europe/products/servomyces-d50/> - preuzeto 18.08.2023.

## **EFFECT OF SERVOMYCES® ADDITIVES ON DIFFERENT GENERATIONS OF YEAST DURING BEER FERMENTATION**

### **Summary**

Beer is produced from malt, hops, water and brewer's yeast through the process of alcoholic fermentation. In the production of beer, selected strains of brewer's yeast of the *Saccharomyces uvarum* species are used for the so-called lager beer (bottom-fermented beer), while to produce ale beer (top-fermented beer) the species *Saccharomyces cerevisiae* is used, and different hybrids of these yeasts can also be used. During fermentation, the yeast ferments the sugars from the wort into alcohol and CO<sub>2</sub>. The products of its metabolism are also by-products such as vicinal diketones, which significantly affect the aroma and quality of beer. Special attention is paid to the yeast propagation process. Servomyces® is one of the additives produced as a supplement for the needs of the brewing industry. The aim of this work was to determine the effect on 1st, 2nd and 3rd generation yeasts, and to determine possible differences between fermented beer to which the additive Servomyces® was added at the end of the brewing process, compared to fermented beer that was produced by the standard process. For this purpose, the apparent extract and concentration of vicinal diketones were monitored during the fermentation process, and at the end of fermentation, the degree of overcooking and the percentage of dead yeast cells were measured. The reduction of vicinal diketones was monitored 6-9 days after the end of fermentation. It was found that the reduction of vicinal diketones is the same or slightly faster with the addition of Servomyces®, with a slightly lower concentration at the end of fermentation, and that the proportion of the apparent extract remained unchanged. The number of dead yeast cells was lower in yeast supplemented with Servomyces®.

**Keywords:** *beer, yeast, additives, vicinal diketones, fermentation*