

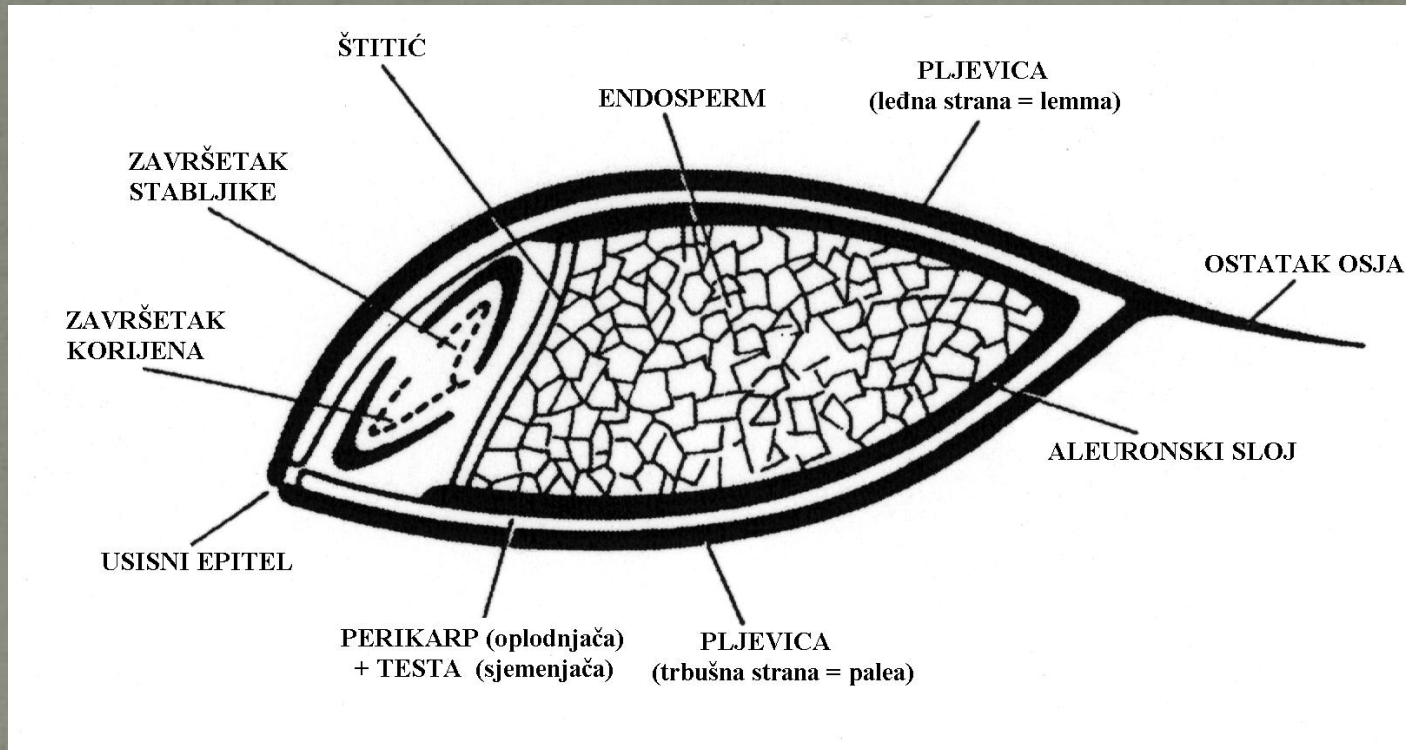
Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Mikroflora ječma i slada

ak. god. 2014/15.

Slika 1. Građa ječmenog zrna



Građa ječmenog zrna

- Stražnja (leđna) strana zrna je obavijena pljevicom ili lemom, a unutrašnja (trbušna) strana paleom.
- Glavni sastojak pljevice su celuloza i lignin, a ostatak čine manani, pentozani, hemiceluloze (β -glukani) i uronične kiseline, ali i silicij u znatnom udjelu.
- Prava ovojnica zrna je sjemenjača (testa), koja je povezana s oplodnjačom (perikarpom).
- Unutrašnjost zrna se sastoji od dva bitna dijela: embrija na jednom kraju i endosperma na drugom. U embriju se nalazi začetak korijena stabljike i lista te štitić, koji ga razdvaja od endosperma. Bogat je proteinima, topljivim šećerima, lipidima i mineralnim tvarima (pepelom).

Građa ječmenog zrna

- **EMBRIO**

- proteini (34 %)
- topljivi šećeri (20-25 %)
- lipidi (14-17 %)
- mineralni sastojci (5-10 %)

Sastoji se od dva dijela:

- a) začetka korijena stabljike i lista
- b) štitića (odvaja ga od endosperma)

- **ENDOSPERM**

- aleuronski sloj (α -amilaza, glukanaza, proteaze)
- mrtve stanice

velika (25 μm) i mala (2 μm) kristalična škrobna zrnca obavijena β -glukanom

Kontrolno-analitičke analize pivskog ječma i slada

- Sorte ječma (*Hordeum vulgare*):
 - ozimi (sije se sredinom rujna)
 - proljetni (jari, sije se u ožujku i travnju)
 - za proizvodnju slada, odnosno piva, koristi se isključivo dvoredni ječam (*Hordeum distichum*)
- Ocjena kakvoće zrna za slađenje određuje se prema:
 1. Vanjskom izgledu zrna (boja i miris, oblik, veličina, vlažnost, ujednačenost i oštećenost zrna, čistoća zrna, prisutnost drugih žitarica, urodica, insekata, relativnog broja iskljajalih zrna, osobine pljevice).
 2. Fizikalno-kemijskim analizama (sortiranost, hektolitarska masa, masa 1000 zrna, tvrdoća zrna, svojstva endosperma/brašnavost, udjel vode i proteina).
 3. Fiziološkim svojstvima (klijavost, energija klijanja nakon 3 i 5 dana, hidrosenzibilnost, moć bubrenja).

Odabir zrna ječma za slađenje

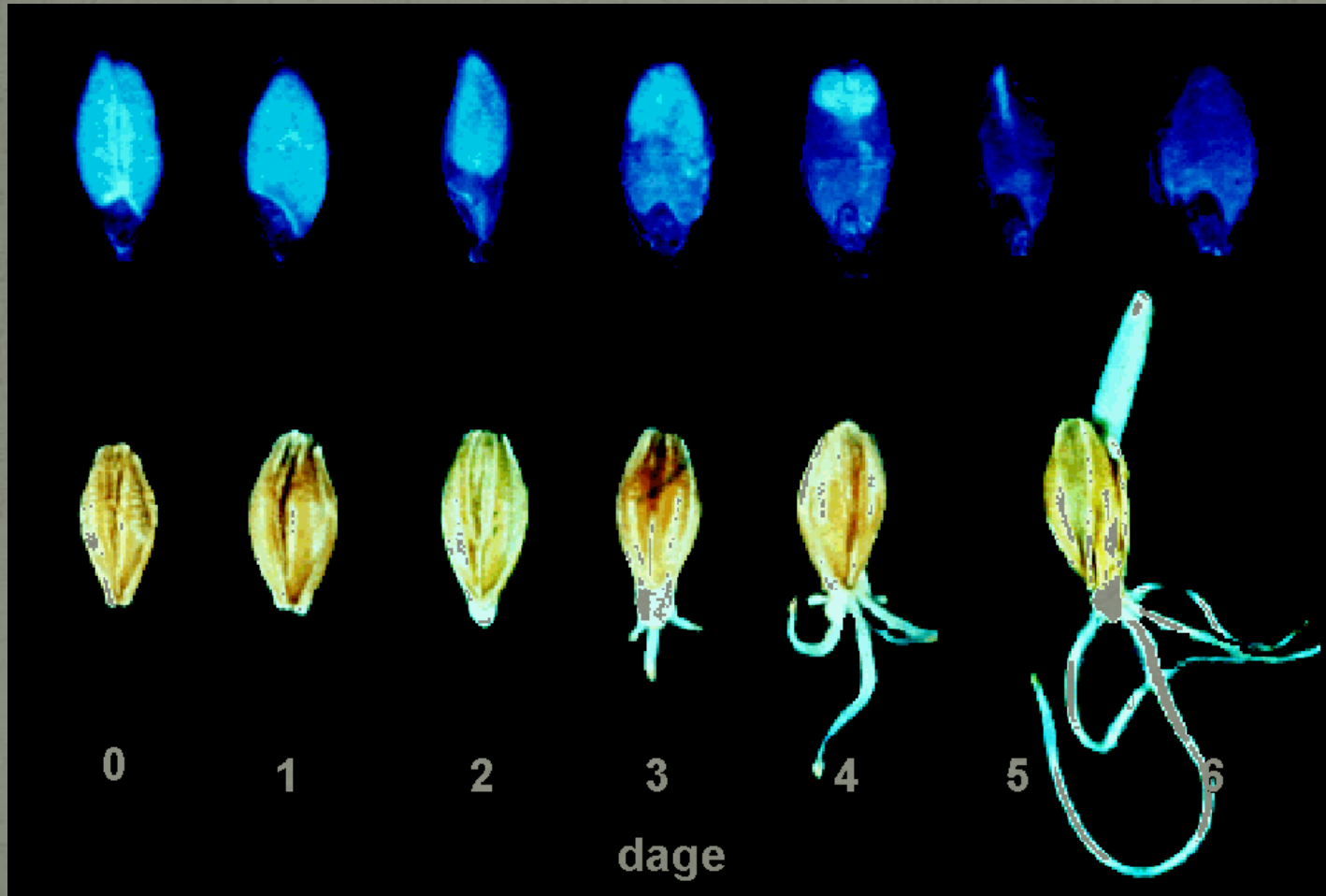
Zdrava zrna ječma pogodna za
slađenje



Oštećena zrna ječma nepogodna za
slađenje



Razgradnja ječmenog endosperma tijekom postupka slađenja



Mikroorganizmi na ječmu prije proizvodnje slada

• Broj mikroorganizama / g

• Aerobne bakterije

• $10^6 - 10^7$

• Bakterije mliječne kiseline

• $10^3 - 10^6$

• Kvasci

• $10^2 - 10^5$

• Plijesni

• $10^2 - 10^5$

Plijesni na ječmu

S obzirom na mjesto postanka i preživljavanja, žitne plijesni dijelimo na:

- plijesni s polja (poljske plijesni): potječu iz tla, vegetacije, zraka, kiše, insekata (rodovi *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* i *Penicillium*)
- plijesni iz skladišta (skladišne plijesni): rezultat nepravilnog skladištenja, visoka aktivnost vode, te vlaga i temperatura ječma, nepravilna aeracija

- *F. graminearum* (fuzarioza klasa):
 - prinosi mogu biti smanjeni do 30 %
 - klimatski uvjeti
 - postupak obrade tla
 - otpornost sorte ječma



Slika 1. Klasovi zahvaćeni fuzariozom

Kako onečišćenje ječma i slada utječe na konačni proizvod?



- neizravni utjecaj (slabija nalivenost zrna, smanjenje udjela endosperma i povećanje udjela pljevice)
- izravni utjecaj ("divlje pivo")
- **Slika 2. Izgled zrna ječmenog slada zaraženog plijesnima**

Aktivnost vode (a_w)

- U praksi se odnos parcijalnog tlaka vodene pare namirnice i tlaka čiste vodene pare na određenoj temperaturi definira kao aktivnost vode (a_w ; water activity).
- Izračunava se po jednadžbi:

$$a_w = p / p_s$$

- Gdje je:
 - p = parcijalni tlak vodene pare na površini namirnice
 - p_s = parcijalni tlak vodene pare iznad čiste vode pri istoj temperaturi
- Njome se procjenjuje koliki dio slobodne vode stoji na raspolaganju za odvijanje metabolizma prisutnih m.o.
- Kontrola rasta i razvoja m.o.

- Neke plijesni iz roda *Fusarium* i *Cladosporium* mogu rasti pri visokim a_w ako je ječam skladišten pri niskim temperaturama
- Psihrotolerantne plijesni iz roda *Penicillium* mogu rasti na temperaturama od -10 do +35 °C.
- Termofilni mikroorganizmi se brzo razmnožavaju na visokim temperaturama zrnja koje mogu dosegnuti 65 °C i više.

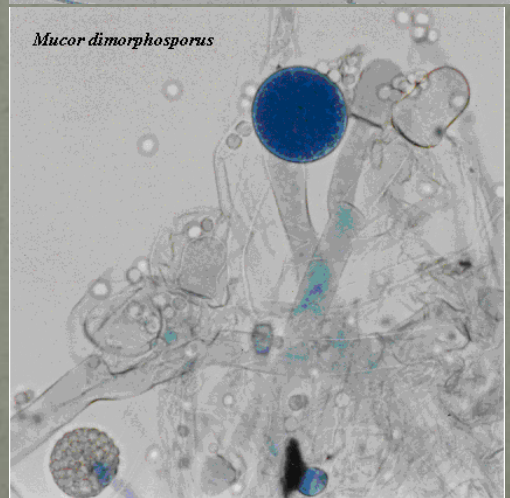
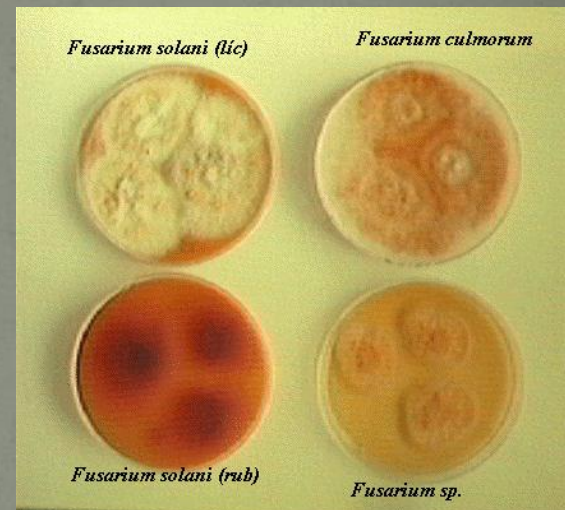
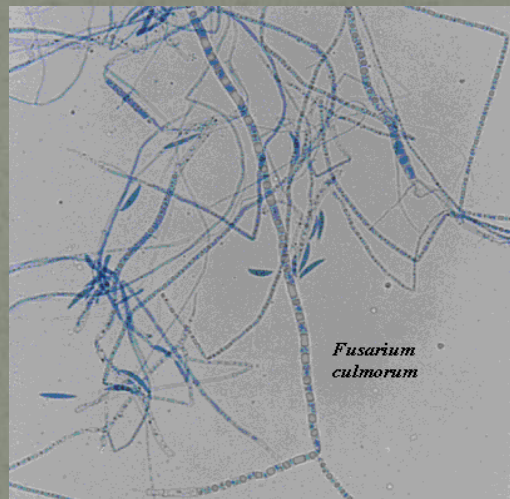
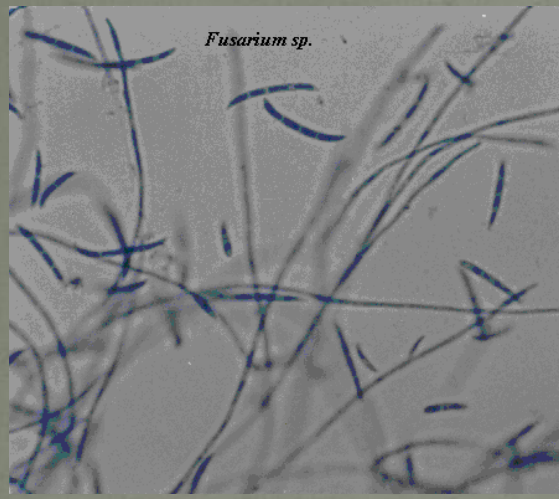
Tablica 2.1. Odnos između relativne vlažnosti, aktivnosti vode i udjela vode u zrnu ječma.

Relativna vlažnost (%)	a_w	Udjel vode (%)
60	0,6	12,0
70	0,7	12,3
80	0,8	16,6
90	0,9	20,3
95	0,95	24,8

Tablica 2.2. a_w potrebna za razvoj pojedinih vrsta mikroorganizama

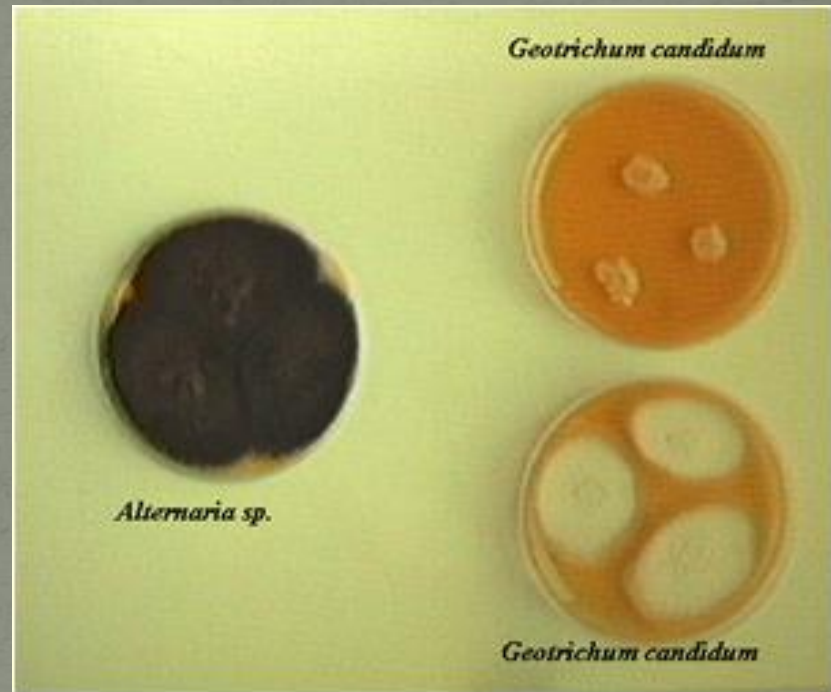
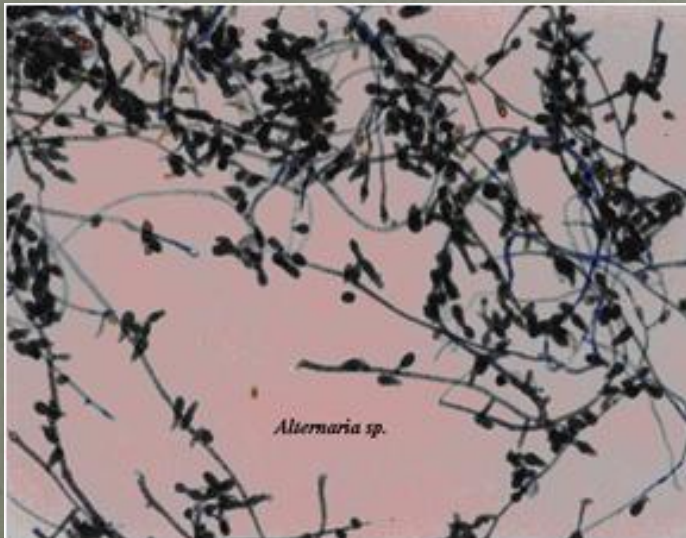
Vrsta mikroorganizama	a_w
Bakterije	0,90
<i>Clostridia</i>	0,98-0,95
<i>Escherichia coli</i>	0,96
<i>Salmonella</i>	0,95
<i>Staphylococci</i>	0,88
Plijesni	0,75
<i>Alternaria</i>	0,84
<i>Aspergillus niger</i>	0,90-0,87
<i>Mucor</i>	0,93
<i>Penicillium</i>	1,0-0,9
<i>Xeromyces</i> i drugi kserofilni oblici	0,60-0,62
Kvasci	0,95-0,87
Osmotolerantni	0,60

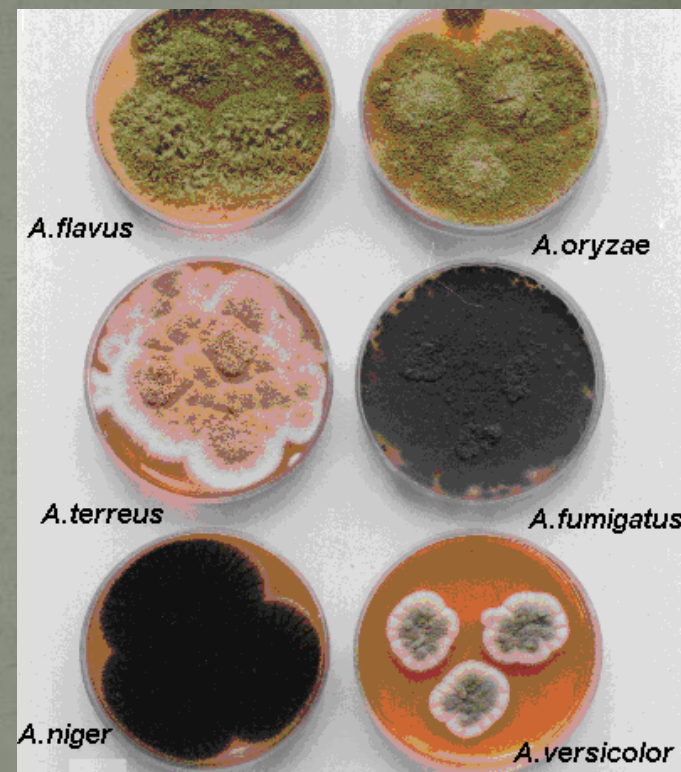
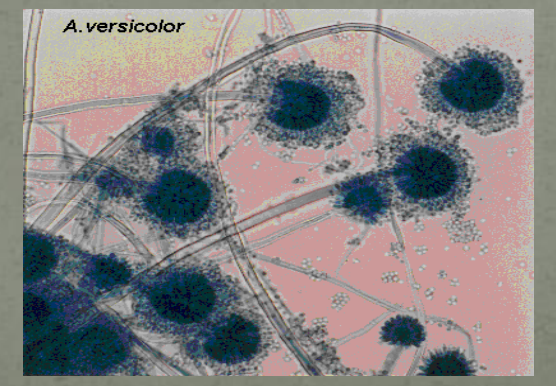
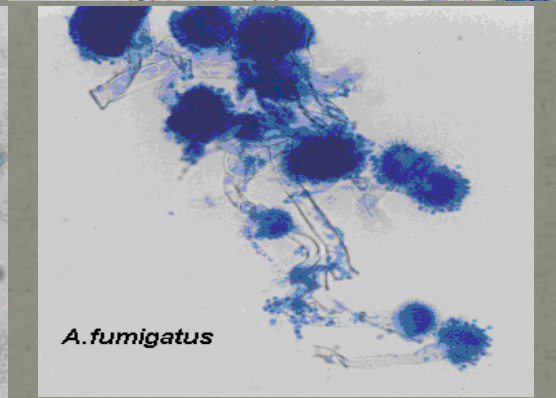
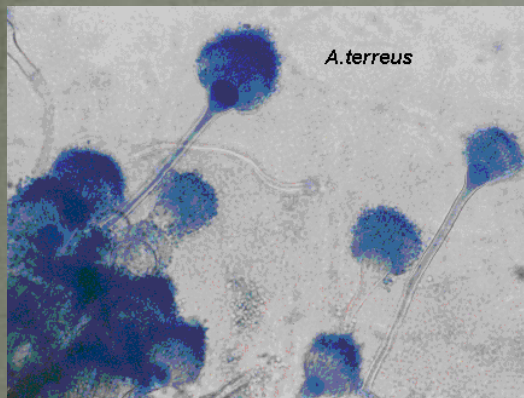
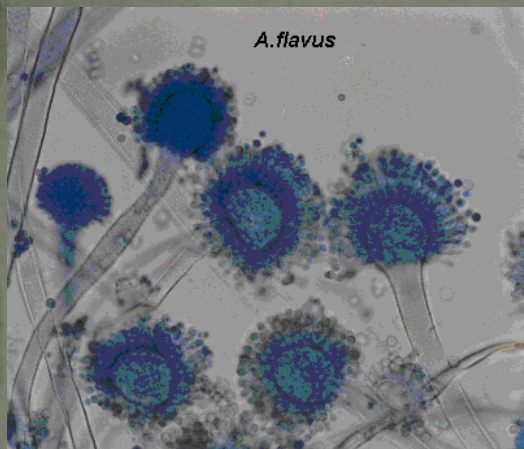
Najčešći rodovi plijesni na ječmu i sladu



Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora proizvodnje piva

26.10.2014.





Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora
proizvodnje piva

26.10.2014.

- Vrlo je jaka povezanost između plijesni zagađivača i insekata te grinja prisutnih na polju
- Ako su insekti prisutni u velikom broju, mogu povećati vlažnost žitarica te inicirati razmnožavanje mikroorganizama
- Neke se grinje i insekti mogu hraniti plijesnima, te služe kao prenosioci plijesni tako što kretanjem prenose spore na površini svojih tijela.
- Pri skladištenju ječma mogu nastati žarišta povišene temperature, pri čemu odrasli insekti idu prema površini prenoseći spore.
- Vlaga s dna prolazi prema površini, čime se prouzroči prijevremeno i nepravilno klijanje ječma, zagađenog plijesnima.
- **Embrio** je najomiljenije mjesto za naseljavanje plijesnima, budući da plijesni iz roda *Aspergillus* imaju lipolitičku aktivnost i mogu trošiti saharozu i rafinozu kao jedini izvor ugljika.
- U pravilno osušenom zrnju, udjel vlage u embriju mora biti istovjetan udjelu vlage u cijelom zrnju, te se izbjegava naseljavanje plijesni.

Mikroflora slada

- promijenjena mikrobiološka slika
- udvostručenje broja bakterija i kvasaca, razvoj micelijskih plijesni i aktivacija spora
- Prema fazama proizvodnje:
 - **Močenje:** ispiranje određenih rodova, ostali se aktiviraju
 - **Močenje i klijanje:** *Lactobacillus*, *Fusarium* spp., skladišne plijesni (osim ostalih, za vrijeme klijanja *Geotrichum candidum*).
 - **Sušenje:** najveći broj mikroorganizama ne preživljava zbog visoke temperature (osim *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Rhizopus*).
- -sprječavanje pravilnim skladištenjem!

Tablica 2.3. Broj živih m.o. na površini zrna tijekom proizvodnje slada

Faza slađenja	Aerobne bakterije	Laktobacili	Plijesni	Kvasci
skladišteni ječam	$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$4,7 \times 10^3$
1. močenje	$6,7 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$4,6 \times 10^5$
2. močenje	$6,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
zeleni slad (5 dana)	$5,7 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^2$	$3,9 \times 10^6$
odklicani slad	$5,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$
gotovi slad	$5,5 \times 10^6$	$5,7 \times 10^4$	$8,3 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$

Mikroflora gotovog slada

- Prema nekim istraživanjima, ukupan broj bakterija na ječmenom sladu je od $0,7-5,5 \times 10^6$ / gramu, ali je izolirano i do $9,8 \times 10^7$ / g.
- Najveći broj pripada bakterijama mliječne kiseline, laktobacilima.
- Najzastupljenije Gram+ su *Lactobacillus leishmanii*, *Pediococcus acidilactici* i *Lactobacillus delbrueckii*.
- Od Gram-, najzastupljenije su *Erwinia herbicola* i *Pseudomonas* spp.
- Broj kvasaca u gotovom sladu kreće se od $7,2 \times 10^2$ do $1,8 \times 10^4$ / g, a najčešći i u najvećem broju su ružičasti kvasci iz rodova *Sporobolomyces* i *Rhodotorula*. Ostali izolirani kvasci već se od prije nalaze na površini zrna.
- Broj plijesni, uključujući kvascima slične plijesni vrste *Aureobasidium pullulans* i *Geotrichum candidum*, te filamentoznih kvasaca iz roda *Trichosporon* može biti od 10^3 do 10^4 / g.

- Mikrobiološki status gotovog slada uvelike ovisi o rukovanju nakon proizvodnje. Moguće su križne kontaminacije između zrnja iz pojedinih šarži, te nove kontaminacije iz zraka. Ako prostorija nije dovoljno suha, moguće je nakupljanje vlage, koje pogoduje rastu i razmnožavanju kontaminanata.
- Na loše uskladištenom sladu ubrzo se mogu primijeniti povećano naseljavanje skladišnih plijesni.
- Pri relativnoj vlažnosti većoj od 79 %, slad "napadaju" skladišni aspergili, iz vrste *Aspergillus candidus* i *Aspergillus versicolor*, te čak i toksična vrsta *Aspergillus flavus*.

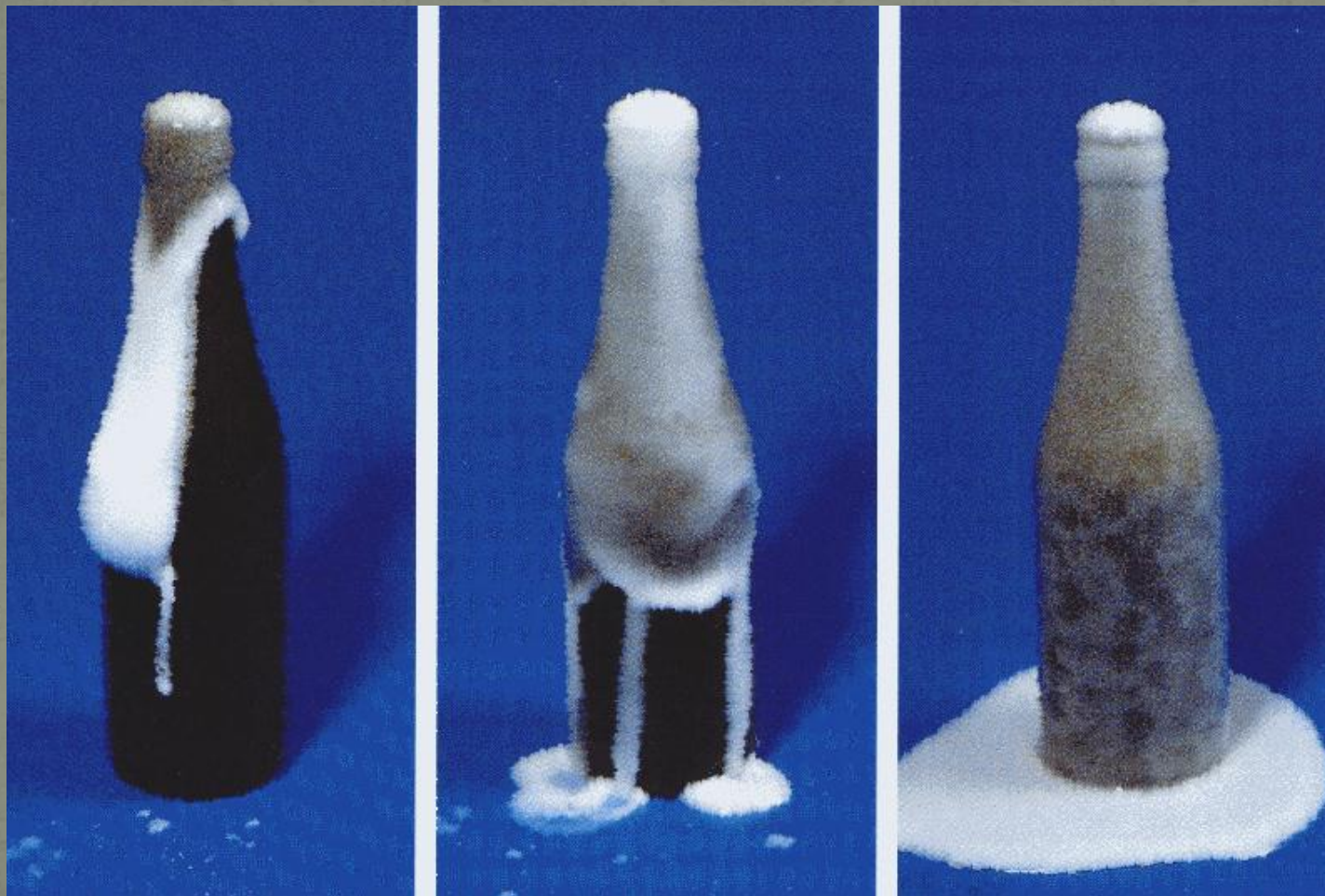
Mikotoksini na ječmu i sladu

- Deoksinivalenol (vomitoksin) - DON
 - proizvode ga *F. graminearum* u toplijim klimama i *F. culmorum* u hladnijim i vlažnim klimatskim uvjetima.
- Okratoksin A
 - najpoznatiji mikotoksin u Europi, kontaminira žitarice za vrijeme skladištenja, mogući kancerogen za ljude
 - proizvodi ga *Penicillium vericosum* i *Aspergillus ochraceus*
 - na Balkanu se 1950. godine pojavila "Balkanska endemska nefropatija"
- Aflatoksini
 - toksični spojevi koje proizvode plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.
 - do sada u Europi nije zabilježena njihova pojava u pivu.

Utjecaj mikroflore ječma i slada na pivo

- Najpoznatiji učinak je pojava "divljeg piva" (*eng. gushing*)
- *Aspergillus ruber* i *Asp. ochraceus* su odgovorne za neugodan okus i miris piva (miris na melasu, paljevinu, oštar i opor)
- tamnija boja piva djelovanjem *Fusarium sp.* i *Rhizopus oryzae*
- mikotoksini su toksični za kvasac, što ima učinak na vrenje

Slika 3. Izgled "divljeg piva" (eng. gushing)



Analize slada

- Iako ponekad slad ne pokazuje slabiju klijavost, njegove karakteristike nepovoljne su za proizvodnju piva, jer su mu proteini jako razgrađeni, te se dobiva sladovina s visokom koncentracijom dušika.
- Istraživanjima je dokazano da u usporedbi sa svježe pripremljenim slalom, ekstrakt iz slada skladištenog tijekom 1 mjeseca je imao veću koncentraciju dušika, a aktivnost α -amilaze i dijastatska snaga su bile izrazito slabe.
- Koncentraciju dušika u sladovini povećava prisutnost nekoliko bakterija iz roda *Pseudomonas* spp, te još neidentificirane vrste iz rodova *Aspergillus* i *Mucor*.

Utjecaj na ljudsko zdravlje

- svakodnevni kontakt sa zaraženim žitaricama može izazvati trajno kihanje, kašljanje, dermatitis i groznicu, te kronični bronhitis i plućnu fibrozu
- alergijske reakcije (kožne ili reaspiratornog sustava) zbog preosjetljivosti na mikroorganizme
- spore nekih plijesni i aktinomiceta:
 - promjera većeg od 10 μm izazivaju rinitis i vrućicu
 - promjera od 4 - 10 μm izazivaju astmatične napade
 - promjera manjeg od 4 μm izazivaju najteže oblike alergijskih reakcija