

# Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva

---

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

# Divlji kvasci u pivovarstvu

---

ak. god. 2014/15.

### Tablica 3.1. Vrste divljih kvasaca kontaminanata u pivovarama

***Brettanomyces anomalus***

*B. claussenii*

*B. lambicus*

*B. custersianus*

*B. custersii*

***Candida beechii***

*C. ernobii*

*C. humilis*

*C. intermedia*

*C. norvegica*

*C. sake*

*C. solani*

*C. tropicalis*

*C. versatilis*

***Debaromyces hansenii***

*D. marama*

***Dekkera bruxellensis***

*D. intermedia*

***Hanseniaspora uvarum***

*H. valbyensis*

*H. vineae*

***Kluyveromyces marxianus***

*Pichia anomala*

*P. fabianii*

*P. farinosa*

*P. fermentans*

*P. guilliermondii*

*P. membranaefaciens*

***Saccharomyces bayanus***

*S. cerevisiae*

*S. exiguus*

*S. pastorianus*

*S. unisporus*

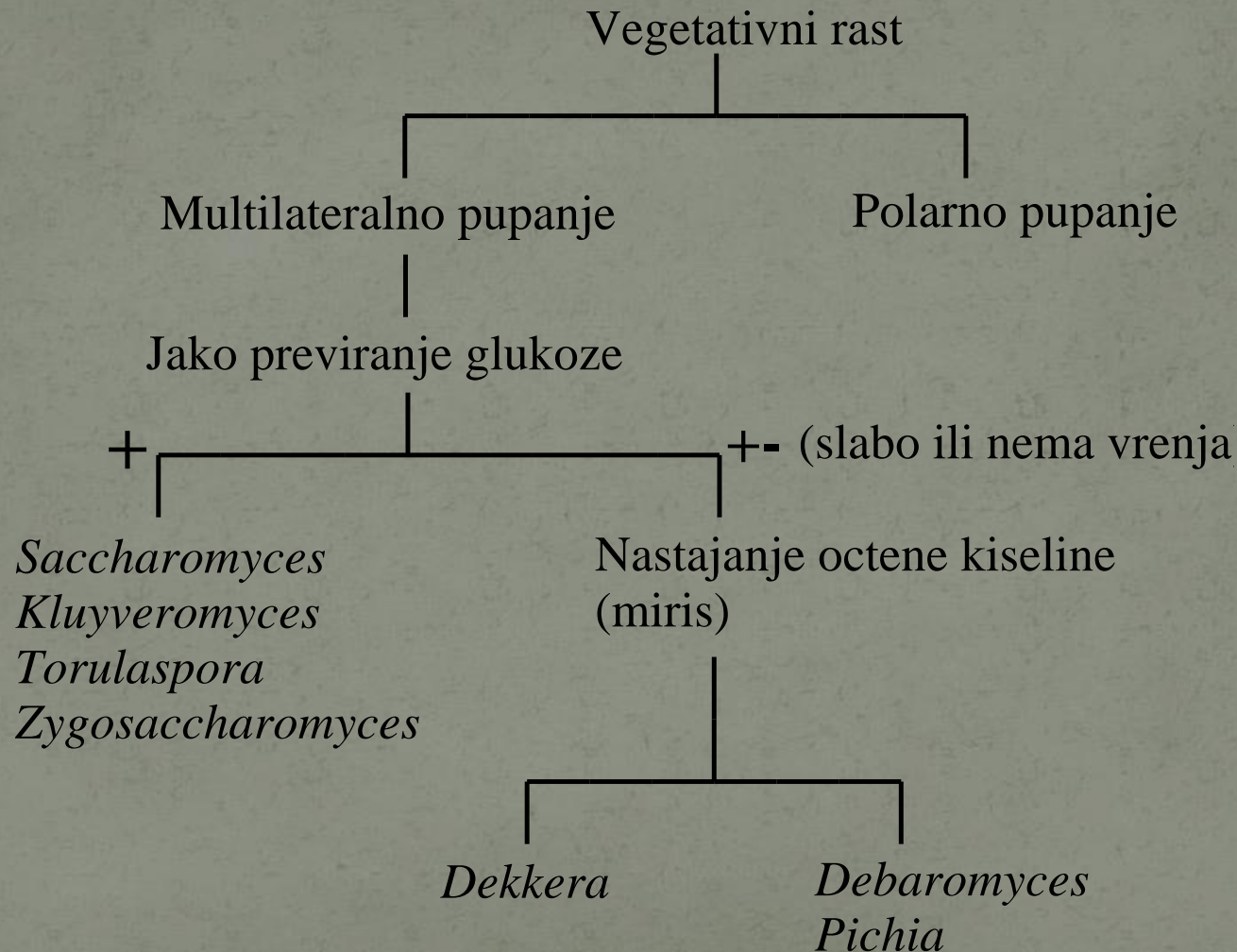
***Schizosaccharomyces pombe***

*Torulaspota delbrueckii*

***Zygosaccharomyces bailii***

*Z. rouxii*

# Slika 1. Identifikacija rodova divljih kvasaca u pivovarama



# Kako divlji kvasci utječu na kvarenje ?

- *Hanseniaspora, Kloeckera, Saccharomyces, Kluyveromyces, Torulaspora, Zygosaccharomyces i Candida spp.:*
  - neželjena fermentacija, nastajanje mutnoće i loših okusa
- *Dekkera, Brettanomyces:*
  - nastajanje octene kiseline, zamućenost
- *Debaromyces, Pichia i neke Candida spp.:*
  - zamućenost, okus po kvascu ili esterima, često proizvode površinski film ili pahuljaste nakupine

# Učinci divljih kvasaca u pivarstvu

- 1967. godine Gilliland je podijelio divlje kvasce u četiri kategorije:
  - fermentativni kvasci
  - "killer" kvasci ili kvasci ubojice
  - krivi soj kulturnih kvasaca
  - "aerobni", ne-fermentativni kvasci

# 1. Fermentativni kvasci

- Kvasci iz rodova *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* i *Zygosaccharomyces* su biokemijski slični i mogu rasti zajedno s kulturnim sojem *S. cerevisiae*
- Divlji sojevi *Saccharomyces* rastu brže jer brže koriste hranjiva iz podloge, s manje zahtjeva za vitaminima, tako da brzo mogu nadrastiti kulturni kvasac.
- Kontaminacija kvasca za nacjepljivanje, čak i kad je polazna kultura bila potpuno čista, neminovna je nakon uzastopnih fermentacija i nacjepljivanja u više generacija
- Flokulacija, odnosno sedimentacija, je jedno od najvažnijih svojstava pivskog kvasca, a divlji kvasci nisu flokulentni, pa pivo ostaje mutno.
- U pivima tretiranim sa sredstvima za bistrenje, prisutnost divljih kvasaca dovodi do problema trajnog zamućenja, jer su mnogi od ovih kontaminanata manji od kulturnog kvasca koji se uklanja filtracijom ili centrifugiranjem
- Pivski kvasac rijetko sporulira, ali divlji sporuliraju, tako da i nakon pasterizacije zaostaju u pivu, jer su spore otporne na zagrijavanje, za razliku od vegetativnih stanica

## 2. Kvasci ubojice ("killer yeasts")

- Kvasci ubojice su ekstremni oblici kontaminanata, koji ubijaju osjetljivi kulturni kvasac, te postaju dominantna kultura tijekom vrenja.
- Proizvedeno pivo je smrdljivog okusa i mirisa, slabe konačne prevrelosti
- Ne postoje selektivne podloge za njihovo određivanje, tako da se često ne može utvrditi njihova prisutnost sve dok ne postanu dominantna kultura i mogu se detektirati na neselektivnim podlogama, npr. različitom morfologijom i bojom kolonija.
- Genetičkim inženjerstvom bi se u kulturni kvasac mogla ugraditi određena otpornost (ugrađivanjem "killer" faktora), ali postoji opasnost da bi se promijenila specifična svojstva kulturnog kvasca, pa se to izbjegava.



### 3. Različiti kulturni kvasci

- U proizvodnji piva je uobičajeno korištenje jednog ili više specifičnih sojeva za proizvodnju željenog piva.
- Kada se u pivovari proizvodi više vrsta piva postoji opasnost od pogreške - naciepljivanja krive kulture kvasca.
- Brzina vrenja, konačna prevrelost, priroda i količina supstancija o kojima ovisi okus i miris, sposobnost flokulacije i nastajanja pjene su važna svojstva pojedinačnih sojeva.
- Povremeno je nužno provjeriti svaki soj pomoću brzih testova ili genetskih proba, kako bi se utvrdio identitet tog soja.

## 4. Aerobni kvasci

- Kvasci iz roda *Pichia* i posebice *P. membranaefaciens* su najčešći nefermentabilni kvasci zagađivači.
- Iako se u literaturi ovi nefermentabilni ili rijetko fermentabilni kvasci smatraju aerobnim mikroorganizmima, u sladovini mogu rasti u potpuno anaerobnim uvjetima!
- No, u prisutnosti kiselina ili etanola, oni ne mogu rasti anaerobno!
- Rodovi *Brettanomyces* i *Dekkera* koji metabolizmom proizvode octenu kiselinu, trebaju kisik za svoj rast i fermentaciju.
- Čine važnu komponentu kvašćeve flore pri vrenju Beligijskih lambic piva, ali kao i bakterije iz roda *Acetobacter* i *Gluconobacter*, mogu rasti u pivu tijekom odležavanja, ako je slučajno omogućen dotok zraka.
- Priroda flore u pivu uvelike ovisi o pristupu zraka, jer takve kulture rastu u već pakiranom pivu (izbjegle su pasterizaciju i filtraciju).
- *Debaromyces*, *Filobasidium* i *Pichia*, te *Candida* rastu u aerobnim uvjetima u pivu. Izazivaju zamućenje, ponekad stvaranje pokožice ili film na površini, te pahuljice ili talog.

# Uklanjanje divljih kvasaca

- Najvažnije je znati izvor zagađenja:
  - kvasac za naciepljivanje
  - površine uređaja i opreme
  - zrak
  - voda
- Sirovine koje se izravno dodaju (šećeri, suhi hmelj) su mogući, ali rijetko, izvor infekcije.
- Priroda divljih kvasaca, fermentativna ili oksidativna može biti rješenje izvora zagađenja, jer su aerobni kvasci uvijek povezani s infekcijom iz zraka
- Zakuhana i ohlađena sladovina rijetko je izvor zaraze, osim ako nije izmjenjivač topline pokvaren i zagađena uporabljena voda
- Cjevovodi koji vode u fermentor ili stijenke samog fermentora mogu biti izvor infekcije iz prethodne fermentacije.
- Posude moraju imati savršeno glatku unutrašnju površinu i moraju se očistiti i sterilizirati odmah nakon svake fermentacije te potvrditi standardnim mikrobiološkim testovima.

- Rutinskim mikrobiološkim ispitivanjima svake šarže kvasca za nacijepljivanje postiže se uočavanje razvoja kontaminacije puno prije no što dostigne neprihvatljivu razinu.
- Iako su rezultati mikrobioloških testova mogući tek kad je već kvasac naciepljen, osim kvasaca ubojica, kontaminanti se razvijaju sporo od jedne do druge fermentacije.
- U većini pivovara se kultura kvasca rutinski mijenja nakon određenog broja uzastopnih fermentacija, kako bi se zaštitili od razvoja kontaminanata.
- Ako nova kultura nije spremna, pranjem kulture kvasca s fosfornom ili sulfatnom kiselinom, čime se smanji pH do 2,3-3,0 tijekom 2 sata, postižu se uglavnom zadovoljavajući rezultati ako se radi o bakterijskom zagađenju.
- Divlji kvasci su otporni na niski pH kao i radna kultura, tako da je jedini način da do infekcije divljim kvascima ne dođe - visoka higijena!
- Uklanjanje otkrivenog zagađenja često zahtijeva intenzivna istraživanja mogućih uzroka i izvora. Nepobitno je da uklanjanje zagađenja s divljim kvascima ovisi o iskustvu i dobrom "nosu" pivara i mikrobiologa.

# Podloge za izolaciju divljih kvasaca

- Provjeravanje sladovine, opranih površina iz čistih fermentora, ventila, boca, bačvi i sl., filtriranog i pasteriziranog piva i ostalih uzoraka koji ne smiju sadržavati žive kvasce.

Neselektivne podloge:

- a) sladovina agar
- b) sladni ekstrakt agar
- c) Wallerstein Laboratories Nutrient (WLN) agar

- Provjeravanje kvasca za nacjepljivanje ili uzoraka tijekom vrenja (Ingledew i Casey, 1982)

a) **Inhibicijske podloge** (kulturni kvasac ne raste, a samo neki kontaminirajući kvasci mogu rasti:

- 1) "aktidionski" agar (WLN agar + aktidion), ne rastu kulturni kvasci i većina osjetljivih divljih kvasaca

2) Bakarni sulfat ili kristal violet agar (sladovina agar ili sladni ekstrakt agar + 6 mg/mL  $\text{CuSO}_4$  ili 20 mg/mL kristal violeta), ne rastu sojevi kulturnog kvasca *Saccharomyces*, ali divlji sojevi kvasca *Saccharomyces* mogu rasti

3) fuksin/sulfitni agar (u različitim omjerima), temelji se na istim principima kao i  $\text{CuSO}_4$  agar

b) Selektivne podloge (hranjiva samo za divlje kvasce)

1) lizin agar, selektivan za divlje kvasce koji mogu rasti na lizinu kao jedinom izvoru dušika

2) dekstrin agar ili škrobni agar, selektivni za kvasce koji mogu trošiti dekstrin ili škrob kao jedini izvor ugljika

3) citratni agar, ksiloza agar, selektivni za kvasce koji mogu rasti na tim izvorima ugljika

- Najuspješnija podloga za detekciju divljih kvasca je lizin agar, sintetička podloga s lizinom kao jedinim izvorom dušika.
- Gotovo svaki rod kvasaca, osim *Saccharomyces*, može trošiti amino grupe lizina za biosintezu ostalih aminokiselina, čak i proteina.
- Kada se uzmu uzorci kontaminiranog kvasca za nacjepljivanje ili uzorci uzeti tijekom vrenja, samo ne-*Saccharomyces* kvasci mogu izrasti u kolonije normalne veličine.
- Dva su važna nedostatka lizin agara:
  - 1) njegov selektivni učinak je u izgladivanju, ali izlučivanje nekih ekstracelularnih ili intracelularnih dijelova može omogućiti slabi rast *Saccharomyces* kvasaca sve do vidljivih kolonija
  - 2) *Saccharomyces* spp, biokemijski adaptirane da dobro rastu u pivovarama, potencijalno su najčešći kontaminanti u pivovarama, a ne mogu biti detektirani

- Druga najučinkovitija podloga je aktidion agar. Iako služi za detekciju kontaminirajućih bakterija, prikladan je za detekciju divljih kvasaca koji su otporni na aktidion.
- Aktidion (cikloheksimid) je antifungalni antibiotik na koji su divlji kvasci otporni do koncentracije 100 mg/mL kada se doda u komercijalnu hranjivu podlogu (WLN ili sladni ekstrakt agar), dok je većina sojeva kulturnih kvasaca inhibirana već pri koncentraciji od 5 mg/mL.
- Za određivanje dijastatskih divljih kvasaca, najpoznatiji je *Saccharomyces diastaticus*, koristi se dekstrin ili škrobni agar.
- Jednostavan princip je da ovi kvasci mogu koristiti dekstrine ili škrob kao jedini izvor ugljika (1 %), a normalna kultura kvasca *S. cerevisiae* i drugih ne-amilolitičkih kvasaca ne može.
- **Za pravilno nacjepljivanje na selektivne podloge nužno je izuzete uzorke kvasca višekratno oprati i centrifugirati, kako uz njih ne bi nacijepili i određeni dio hranjiva koji dolazi iz sladovine!**
- **Zatim slijedi nacjepljivanje na neselektivne podloge i tek kad dobijemo čistu kulturu kvasca, nacijepiti ga na selektivnu podlogu!**