

Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Bakterije koje izazivaju kvarenje u pivarstvu (1. dio)

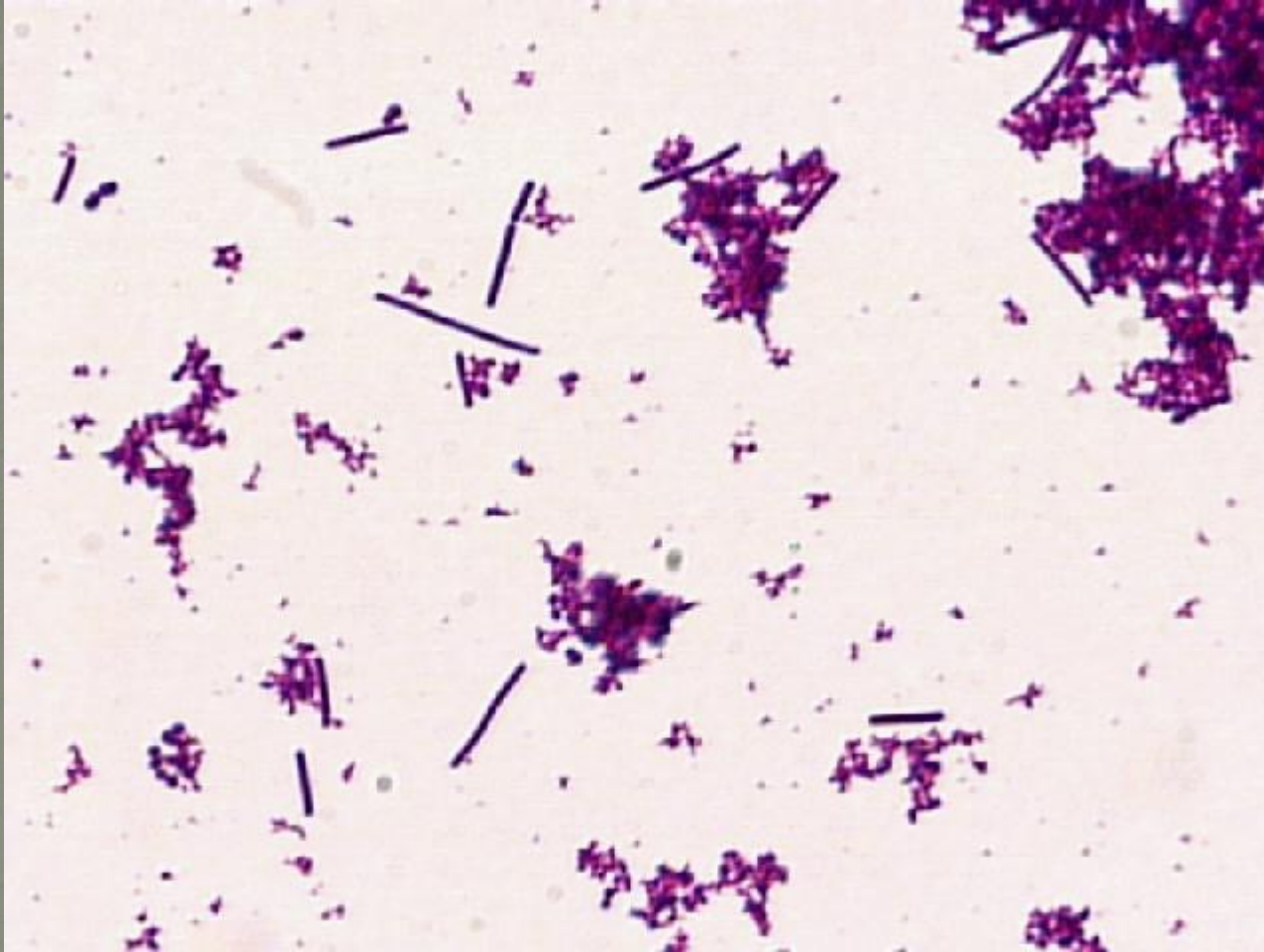
ak. god. 2014/15.

Tehnološka faza	Kontaminanti	Proizvodi metabolizma	Učinak
Ukumljavanje	Termofilne bakterije mliječne kiseline	Acetaldehid, etanol, mliječna kiselina, glicerol	Promjena okusa: smanjenje pH vrijednosti, povećanje kiselosti
Hlađenje i taloženje sladovine	<u>Koliformne bakterije</u> <i>(E. coli)</i> <u>Koliformne bakterije</u> <i>(Klebsiella)</i> <u>Bakterije mliječne kiseline</u> <i>(Lactobacillus sp., Pediococcus sp.)</i> <u>Bakterije octene kiseline</u> <i>(Gluconobacter sp.)</i> <i>Obesumbacterium proteus</i>	Mliječna kiselina, octena kis., etanol, H ₂ S, amonijak Acetomliječna kiselina, acetoin, 2,3-butandiol Mliječna kiselina, diacetil, glicerol Octena kiselina, glukonska kiselina Dimetil sulfid	Promjena arome i okusa (slatki okus, miris na kuhani kupus, miris po celeru, fenolni miris) Kiselost, zamućenost, miris po medu ili maslacu Smanjenje pH, povećana konc. hlapljivih kiselina Miris po pastrnjaku

Tehnološka faza	Kontaminanti	Proizvodi metabolizma	Učinak
Glavno vrenje	<u>Bakterije octene kiseline</u> (<i>Acetobacter</i> sp. i <i>Gluconobacter</i> sp.)	Octena kiselina, glukonska kiselina, CO ₂ , voda	Promjena pH, povećanje sadržaja ukupnih hlapljivih kiselina
	<u>Bakterije mliječne kiseline</u> (<i>Lactobacillus</i> sp.)	Mliječna kiselina, octena kiselina, glicerol, diacetil	Kiselost, mutnoća, miris po medu ili maslacu
	<i>Zymomonas anaerobia</i>	Etanol, acetaldehid, sumporovodik	Miris po gnjilim jabukama
Odležavanje i otočeno pivo	Kao kod glavnog vrenja		Neugodan miris, pojava zamućenja, pojava taloga

Gram⁺ bakterije u pivarstvu

Slika 4.1. Mikrobiološka slika laktobacila



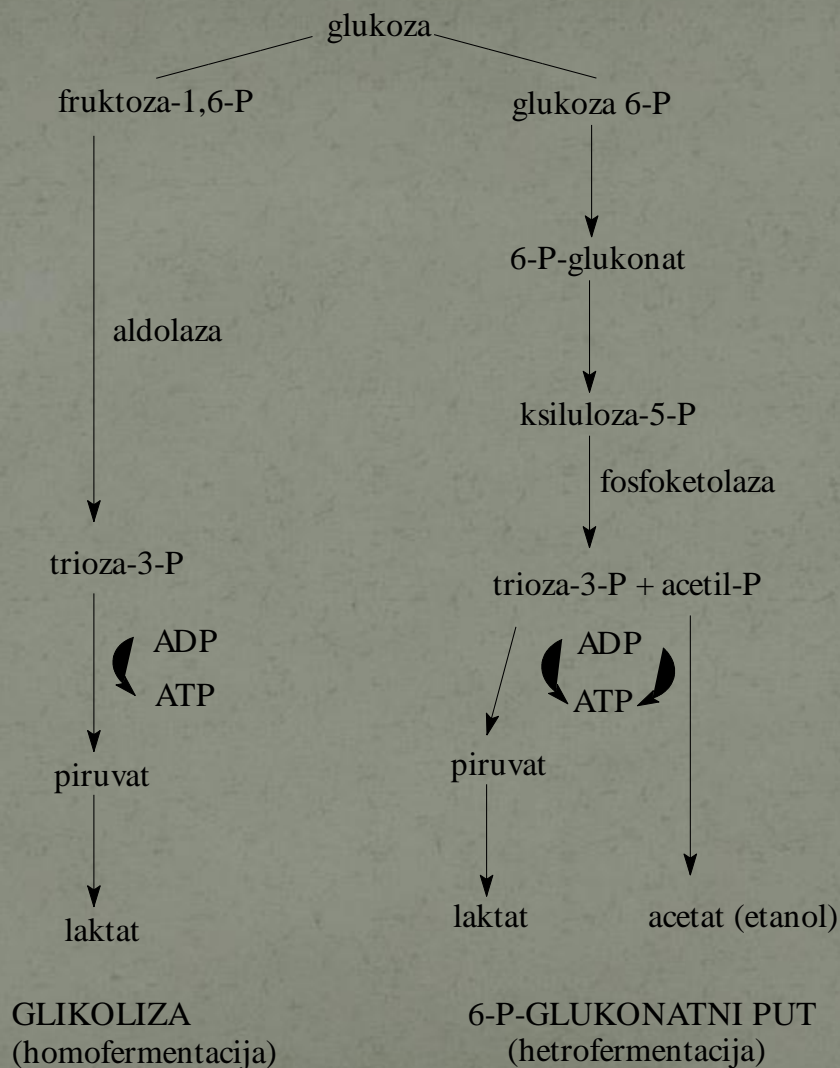
BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

- Gram+, ne sporulirajući štapići ili koki
- Nedostaje im enzim katalaza, striktno su fermentativne
- Dva tipa bakterija mliječne kiseline prema krajnjim proizvodima metaboličkog katabolizma šećera:
 - Heterofermentativne: proizvode ili smjesu mliječne kiseline, CO_2 , octene kiseline i/ili etanola
 - Homofermentativne: proizvode samo mliječnu kiselinu

Metabolizam ugljikohidrata u BMK

- Rijetko hidroliziraju polisaharide, osim *L. amylophilus*
- Kataboliziraju veliki broj disaharida
- Maltoza u stanicu ulazi sustavom permeaza i pomoću maltoza fosforilaze se pocijepa do glukoze i glukoza-1-fosfata
- Homofermentativni rodovi koriste glikolizu za katabolizam glukoze, te proizvode laktat kao krajnji proizvod: streptokoki, pediokoki i neki laktobacili, pomoću enzima aldolaze cijepaju fruktoza-1,6-bifosfat u dva triozafosfata, koji se konvertira do laktata preko piruvata (Sl. 4.2.).
- Heterofermentativni rodovi: leukonostok i neki laktobacili koriste fosfoketolazni put: glukoza-6-fosfat se oksidira do glukonat-6-fosfata i dekarboksilira. Tako nastaje ksiluloza-5-fosfat, koju fosfoketolaza pocijepa do triozafosfata, koji se konvertira do laktata i acetil fosfata, koji je prekursor ili do etanola ili do acetata, ovisno o oksidacijsko/redukcijskom potencijalu sustava.

Slika 4.2. Glavni putevi fermentacije heksoza u bakterijama mliječne kiseline



- Heterofermentativne bakterije uglavnom fermentiraju pentoze, pomoću permeaza, te induciraju sintezu enzima potrebnih za konverziju supstrata u ključni međuprodukt - D-ksiluloza-5-fosfat, s kojim započinje fosfoketolazni put.
- Fakultativno heterofermentativne bakterije: imaju enzim fosfoketolazu koja se inducira pentoznim šećerima, a u prisustvu glukoze ponašaju se kao homofermentativne bakterije mliječne kiseline.

Metabolizam dušika u BMK

- Bakterije mliječne kiseline su vrlo izbirljive i zahtijevaju cijeli niz aminokiselina i vitamina za rast.
- BMK posjeduju proteolitičku aktivnost, koja se odvija preko kompleksnog sustava enzima:
 - kazeinolitičke proteaze vezane na staničnu stjenku
 - ekstracelularne peptidaze
 - intracelularne peptidaze
 - peptidni transportni sustav
 - aminokiselinski transportni sustav
- Površinski vezane peptidaze su također dokazane kod laktobacila. Važno za pivare, jer u pivu nedostaju različite aminokiseline, čime se može ograničiti rast bakterija BMK!

Zahtjevi za kisikom

- BMK su aerotolerantni anaerobi, odnosno mikroaerofili, ne mogu uporabiti kisik kao terminalni elektron akceptor pri respiraciji
- Za razliku od striktnih anaeroba, BMK ne "odumiru" u prisutnosti kisika!
- BMK ne mogu sintetizirati hem i zbog toga ne nastaje katalaza, ali proizvode pseudokatalazu, za čiju aktivnost je potreban NADH.
- Pseudokatalaza je prvi put dokazana u pediokokima 1961. god., a ubrzo nakon toga u laktobacilima, leukonostocima i streptokokima, 1965. godine.
- Smatra se da postoji povezanost između koncentracije intracelularnog Mn^{2+} i tolerantnosti na kisik kod BMK.
- Lactobacili, leucinostoci i pediokoki sadrže visoke konc. Mn^{2+} u stanici, za koji se smatra da je odgovoran za "hvatanje" toksičnih oblika kisika, posebice radikala superoksida (O_2^-).

Rod *Lactobacillus*

- **Klasifikacija:**

- 1. grupa: *L. delbrueckii* i 11 obligatno homofermentativnih vrsta, od kojih većina nisu česti kontaminanti u pivovarama
- 2. grupa: fakultativno heterofermentativni *L. casei* te 32 *Lactobacillus* vrsta (*L. brevis*, *L. buchneri* i *L. fermentum* pronađene... u pivovarama) i 5 *Pediococcus* vrsta, uključujući *P. damnosus*
- 3. grupa: heterofermentativni laktobacili, uključujući *L. confusus* i *Leuconostoc paramesenteroides*.

Lactobacillus vrste izolirane iz piva, vina i namirnica

Vrste	Fermentacijska grupa	Uobičajeno stanište
<i>L. delbrueckii</i>	I	zrno, komina
<i>L. coryneformis</i>	II	pivo
<i>L. paracasei</i>	II	pivo
<i>L. brevis</i>	III	pivo, vino
<i>L. buchneri</i>	III	pivo, vino
<i>L. lindneri</i>	III	pivo
<i>L. casei</i>	II	mlijeko i mliječni proizvodi
<i>L. sake</i>	II	vino
<i>L. fermentum</i>	III	fermentirano povrće

Lactobacilli u pivu i pivovarama

- *L. brevis*, najčešći kontaminant piva:
 - fakultativno heterofermentativna bakterija
 - otporan na hmelj
 - optimalna temperatura rasta 30 °C i pH 4-5

Ostali:

- *L. lindneri*
- *L. delbrueckii*
- *L. fructivorans*
- *L. fermentum*
- *L. coryneformis*
- *L. plantarum*

- Ispitivanjem pojave kontaminanata u 81-oj pivovari, pronađeno je 660 sojeva iz roda *Lactobacillus* koji mogu izazvati kvarenje piva
- Od 660 sojeva:
 - 185 ih je identificirano kao vrste *L. casei*,
 - 97 kao *L. casei* var. *fusiformis*,
 - 6 kao *L. plantarum* var. *arabinosus*,
 - 56 kao *L. coryneformis*,
 - 4 kao *L. coryneformis* var. *torquens*,
 - 250 kao *L. brevis*,
 - 14 kao *L. brevis* var. *linderi* i
 - 48 kao *L. buchneri*.
- Eschenbecher (1969) uočio da se u jače hmeljenim pivima grupa II pojavljuje mnogo češće nego heterofermentativna grupa III, što se ne slaže s mišljenjem da je jedino *L. brevis* otporan na hmelj!

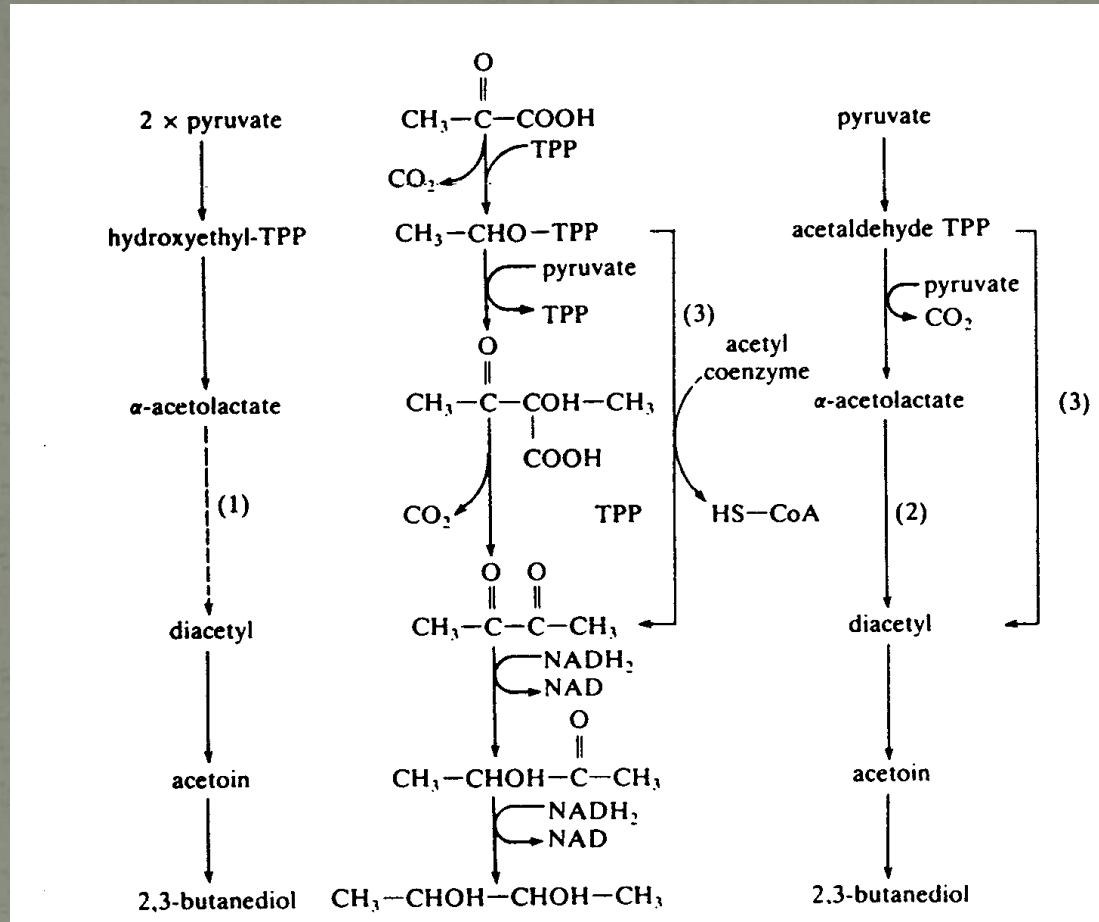
Kvarenje piva s laktobacilima

- Back (1982) smatra da treba izbjeći i najmanju prisutnost laktobacila u pivu
- u pokusnom ispitivanju na 5 različitih piva, Back je našao vrste *L. curvatus*, *L. brevis* i *L. lindneri* u svakom pivu, dok je *L. casei* našao u tri piva, a *L. plantarum*, *L. buchneri* i *L. coryneformis* u samo jednom pivu.
- smatra se da rast laktobacila u pivu ovisi o vrsti piva
- još uvijek nije pronađena korelacija između analitičkih parametara: pH, ekstrakt u osnovnoj sladovini, koncentracija dušika i amino dušika, količine fermentabilnih šećera, te sposobnosti laktobacila da se razmnožavaju.
- glavne supstancije koja inhibiraju rast laktobacila u pivu sastavni su dio hmelja: *trans*-humuloni i kolupuloni.

Učinak kvarenja na kakvoću piva

- laktobacili su najopasniji tijekom odležavanja piva i nakon pakiranja
- pokvarenost se ogleda blagom zamućenošću, ali se ponekad prije toga javi okus i miris na maslac, kao posljedica nastalog diacetila.
- glavni proizvod metabolizma laktobacila je mliječna kiselina, prag okusa je 300 ppm.
- diacetil nastaje u malim koncentracijama, ali je prag okusa 0,15 ppm, pa zbog toga prevlada okus na maslac

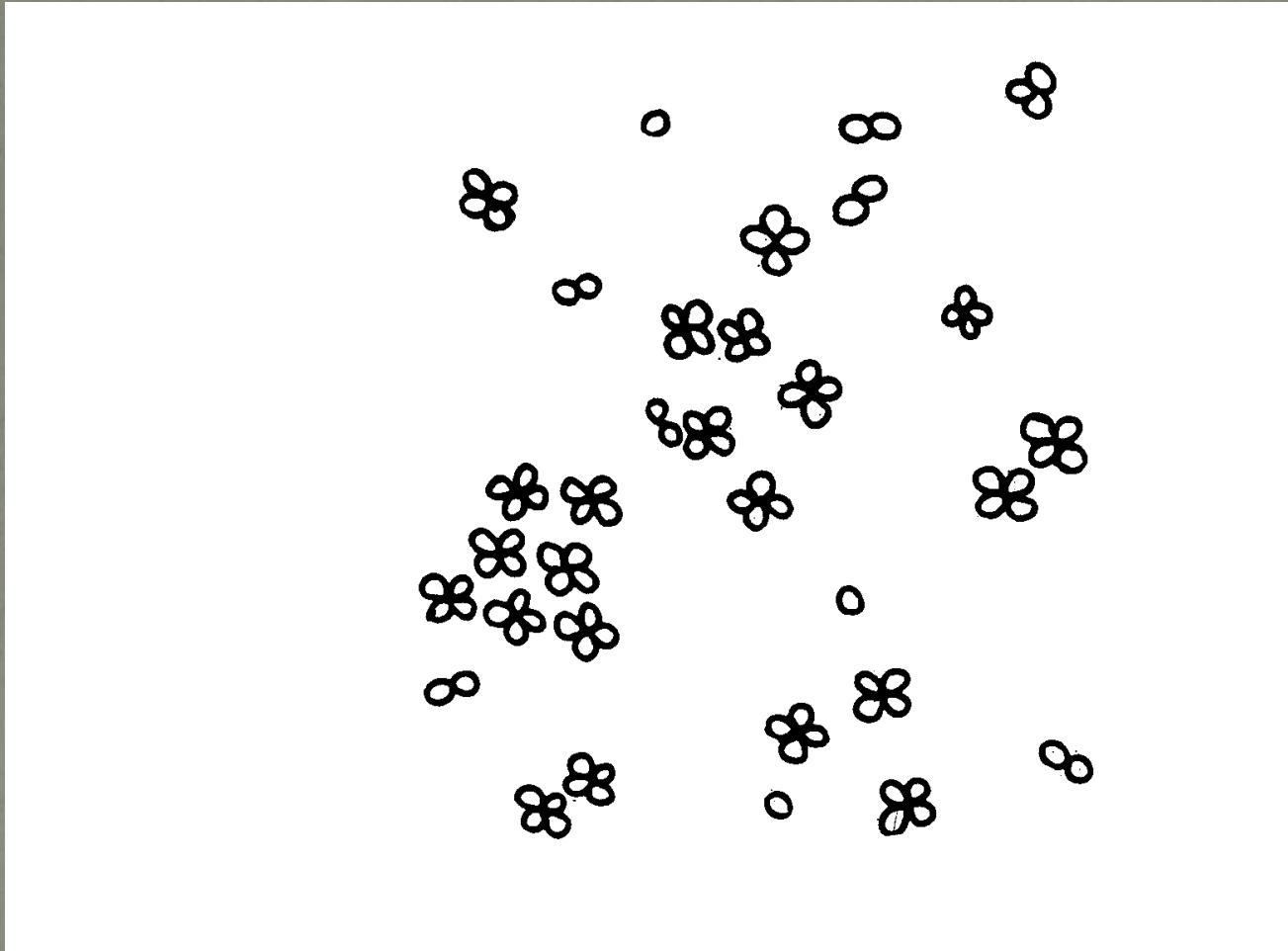
Slika 4.3. Putevi nastajanja diacetila i acetoina



Podloge za izolaciju laktobacila

- u pivarskoj mikrobiologiji najviše pobuđuje interes i oprečna mišljenja razvitak novih hranjivih podloga za selektivnu izolaciju i detekciju laktobacila i pediokoka.
- Casey i Ingledew (1981) načinili su popis od 23 hranjive podloge za izolaciju laktobacila, a Holzapfel (1992) čak 31.
- te su hranjive podloge testirane na dva ključna kriterija: izdvajanje i selektivnost.
- nažalost, podloge s kojima se postiže zadovoljavajuće izdvajanje laktobacila, imaju slabu selektivnost i obrnuto.

Slika 4.4. Rod *Pediococcus*



Slika 4.5. Mikroskopska slika pediokoka



Rod *Pediococcus*

Klasifikacija

- Pediokoki su homofermentativni koki koji se pojavljuju u obliku parova ili tetrada
- od davnina su poznati u pivarstvu pod imenom "sarcina".
- *Pediococcus damnosus* je najčešći pediokok pronađen u pivu, ali ne i na sirovinama za proizvodnju piva.
- *Pediococcus inopinatus* izoliran je iz vina, piva i pivskog kvasca, ali i fermentiranog povrća i mlijeka.
- *Pediococcus dextrinicus* i *P. pentosaceus* su izolirani iz piva, ali puno rjeđe no *P. damnosus*.
- *P. damnosus* je često izoliran iz gotovog piva i tijekom doviranja, a rijetko iz kvasca za nacjepljivanje.

Kvarenje piva s pediokokima

- Iako različite vrste pediokoka mogu preživjeti u pivima tijekom dužeg perioda, samo se *P. damnosus* i *P. inopinatus* mogu razmnožavati.
- Razlog tome je inhibicija rasta različitih vrsta pediokoka na niskom pH i slaba otpornost prema hmelju.
- *P. damnosus* je otporan na antiseptična svojstva sastojaka hmelja
- biotin i riboflavin pojačavaju brzinu rasta različitih *P. damnosus* sojeva, a kalcijev pantotemat je nužan za njegov rast.
- Pediokoki izazivaju nastajanje kiselina i okus piva po "maslacu", kao i laktobacili
- Koncentracija proizvedenog diacetila varira u različitim vrstama, a najveća je kod *P. damnosus*!

Identifikacija pediokoka

- Pediokoki su tipični katalaza-negativni organizmi, s homofermentativnim metabolizmom i karakterističnim stvaranjem tetrada.
- Ipak, test na katalazu nije uvijek pouzdan jer sojevi *P. pentosaceus*, kada rastu na podlogama s malom koncentracijom šećera, proizvode "pseudokatalazu", koja razgrađuje H_2O_2 , ali se od katalaze razlikuje po osjetljivosti na azid i nema hem.
- Zbog toga je moguća zamjena s katalaza-pozitivnim mikrokokima!

Rod *Leuconostoc*

- Rod *Leuconostoc* su heterofermentativni koki koji su ponekad ovalni ili čak kratki štapići, a pojavljuju se u parovima.
- Pronalazimo ih u povrću, voću i fermentiranom povrću, ali rijetko u pivovarama.
- Obligatno heterofermentativni laktobacili i rod *Leuconostoc* trebaju za svoj rast slična hranjiva, rastu na istim hranjivim podlogama, te se vrlo lako mogu zamijeniti, budući da laktobacili ponekad izgledaju kao kokobacili.
- razlika između leukonostoka i laktobacila: leukonostok proizvodi amonijak iz arginina.
- jedina vrsta pronađena u pivu je *Leuc. mesenteroides*, ali nije odgovoran za kvarenje piva

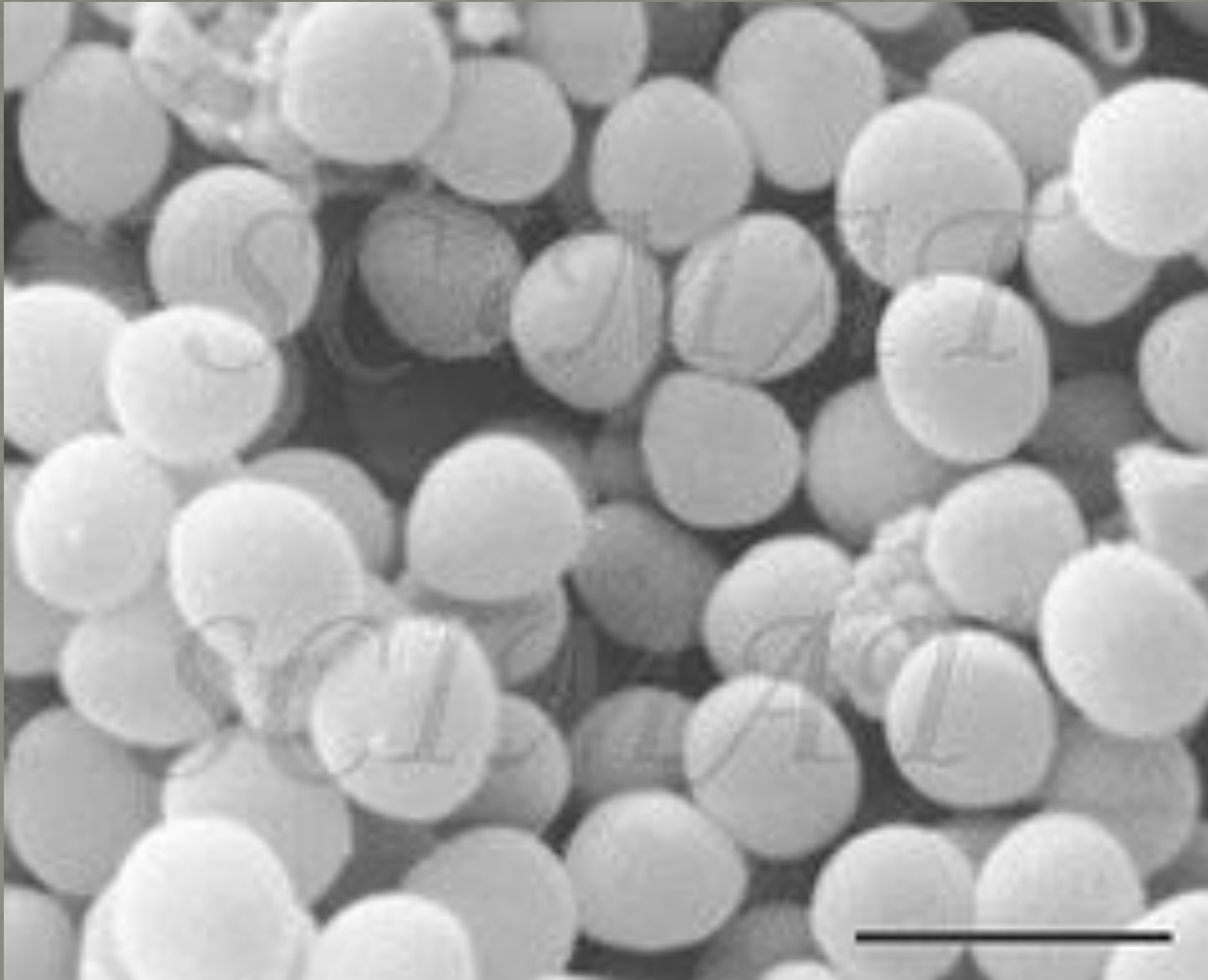
Homofermentativni koki

- Gram+ homofermentativni koki, koji se pojavljuju u parovima ili lancima, klasificirani su u rodove *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Vagococcus*.
- široko zastupljeni u svježem mlijeku i mliječnim proizvodima, biljkama, te ustima i probavi ljudi i životinja.
- jedini član ove grupe pronađen u pivovarama je *Lactococcus lactis*
- lako ga se može zamijeniti s laktobacilima jer raste na istim podlogama
- razlikuje se od leukonostoka svojim homofermentativnim metabolizmom šećera, a od pivskih pediokoka po staničnoj morfologiji (lanci prije no tetrade), te rastu pri pH 9,2 (pediokoki ne mogu rasti na visokom pH).

Micrococcus i *Staphylococcus*

- Rodovi *Micrococcus* i *Staphylococcus* sastoje se od Gram+ koka koji imaju katalazu i nemaju mliječno - fermentativni metabolizam
- mogu se razlikovati po svojoj sposobnosti da rastu pri pH 7,0 na agaru i po reakciji na katalazu.
- mikrokoki su striktni aerobi
- iako se ne smatraju važnima za pivare, najnovija su istraživanja pokazala da su široko rasprostranjeni u pivu i pivovarama, te da izazivaju kvarenje piva
- te bakterije rastu slabo ili nikako pri pH 4,5 i nižem, ne smetaju im sastojci hmelja, a u slučaju *M. varians* su obligatni aerobi.
- mogu preživjeti u pivu duže vrijeme
- *Micrococcus kristinae* je atipični *Micrococcus*, fakultativni anaerob, otporan na kiselinu i hmelj, odgovoran za kvarenje piva s niskom gorčinom i posebno pri visokom pH.
- intenzitet rasta ovisi o konc. kisika u pivu, ali čak i rast u tragovima izaziva voćnu aromu i ne tipičan okus piva.

Slika 4.6. Mikroskopska slika *Staphylococcus aureus*



Sporogene bakterije

- Aerobne bakterije koje tvore spore pripadaju rodu *Bacillus*
- spore ovih bakterija nalaze se na sladu i žitaricama koje se dodaju u pivo i mogu preživjeti kuhanje sladovine, ali ne mogu proklijati zbog niske pH vrijednosti fermentirajuće sladovine i piva
- otporne su na hmelj
- *B. coagulans* i *B. stearothermophilus* proizvode mliječnu kiselinu u slatkoj sladovini ako se drže na 55-70 °C više od 2 sata
- Sojevi bakterije *B. coagulans* potpomažu nastajanju nitrozamina preko redukcije nitrata do nitrita

Načini identifikacije rodova Gram+ bakterija u pivovarama

1) Katalaza	pozitivan \Rightarrow (5) negativan \Rightarrow (2)
2) Stanična morfologija	Štapići: <i>Lactobacillus</i> Koki \Rightarrow (3)
3) Proizvodnja plina iz glukoze	Pozitivan: <i>Leuconostoc</i> Negativan \Rightarrow (4)
4) Stanice u tetradama Stanice u parovima / lancima	<i>Pediococcus</i> <i>Lactococcus</i>
5) Štapići koji formiraju endospore	Pozitivan: <i>Bacillus</i> Negativan \Rightarrow (6)
6) Anaeroban rast	Pozitivan \Rightarrow (7) Negativan: <i>Micrococcus</i>
7) Liziranje s lizostafinom	Pozitivan: <i>Staphylococcus</i> Negativan: <i>M. kristinae</i>