

Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva

Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

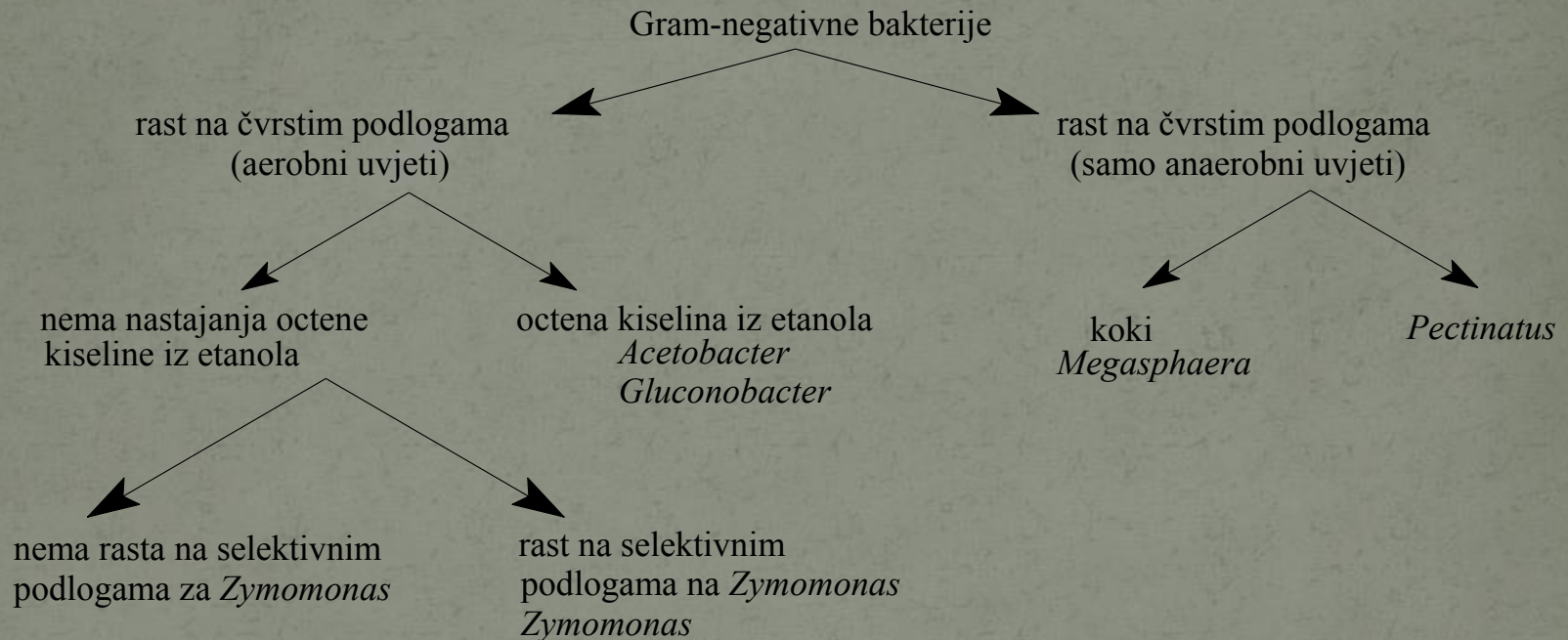
Bakterije koje izazivaju kvarenje u pivarstvu (2. dio)

ak. god. 2014/15.

Gram- negativne bakterije

- 1876. god. Louis Pasteur je izdao knjigu pod nazivom "Studije o pivu, njegovim bolestima i uzrocima tih bolesti. Postupci za postizanje stabilnosti, s novom teorijom vrenja."
- Pojava Gram- bakterija u proizvodnji piva izrazito nepoželjna!
- Važne bakterije koje su uzročnice kvarenja piva su bakterije octene kiseline, neki članovi porodice *Enterobacteriaceae*, *Zymomonas*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Selenomonas lactificex*, *Zymophilus raffinovorans*, *Zymophilus paucivorans* i *Megasphaera*.

Postupci za određivanje Gram- bakterija



Bakterije octene kiseline

- Bakterije octene kiseline su industrijski važna grupa Gram- bakterija sposobnih alkohol prevesti u octenu kiselinu.
- Kvare hranu, sokove i alkoholna pića, kao što su pivo, vino i jabukovača.
- Podijeljene su u dva roda: *Acetobacter* i *Gluconobacter* (*Acetomonas*)
- Najnovija taksonomska istraživanja pokazala su da su *Acetobacter* i *Gluconobacter* vrlo slični i zbog toga su svrstani u novu porodicu *Acetobacteriaceae*.

Rod *Acetobacter*

Opće karakteristike

- Stanice su Gram- ili Gram-varijabilne, elipsoidne do štapićaste, lagano zaobljene, veličine $0,6-0,8 \mu\text{m} \times 1,0-4,0 \mu\text{m}$, pojavljuju se samostalno, u parovima ili lancima.
- mogu biti statične ili pokretne, tada imaju lateralne flagele
- obligatni su aerobi s respiratornim metabolizmom, katalaza pozitivne, etanol oksidiraju do octene kiseline, a octenu kiselinu do CO_2 i H_2O
- u tekućim podlogama stvaraju krugove, film, zamućuju podlogu, a ponekad se može uočiti nakupina stanica
- taksonomskim proučavanjima pronađeno je postojanje *Acetobacter aceti*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter pasteurianus* i *Acetobacter hansenii*.

Metabolizam *Acetobacteria*

- Bakterije iz roda *Acetobacter* posjeduju respiratorni metabolizam i kao i *Gluconobacter*, izravno oksidiraju šećere, alkohole i steroide.
- Tako se glukoza oksidira do glukonske i 2- i 5-oksoglukonske kiseline, glicerol do dihidroksiacetona, a sorbitol do sorboze
- Također metaboliziraju šećere preko heksoza monofosfatnog puta i ciklusa limunske kiseline
- Dobro rastu u podlozi koja sadrži etanol, glicerol i natrijev laktat kao jedini izvor ugljika
- Nekoliko sojeva može rasti na NH_4^+ i etanolu kao jedinom izvoru dušika i ugljika.
- Samo nekoliko sojeva može koristiti aminokiseline kao jedini izvor ugljika, a faktori rasta su nužni ovisno o izvoru ugljika

Rod *Gluconobacter*

Opće karakteristike

- Morfologija stanica je vrlo slična stanicama *Acetobactera*.
- Pokretne stanice imaju između tri i osam polarnih flagela, a rijetko se vidi samo jedna flagela.
- Obligatni su aerobi, katalaza pozitivni, oksidaza negativni, ne reduciraju nitrat do nitrita, ali reduciraju etanol do octene kiseline.
- U pivu, sladovini ili podlogama s glukozom, stvaraju film na površini
- Neki sojevi viskozno rastu u pivu, kao posljedica izlučivanja dekstrana.
- Najvažnija vrsta iz ovog roda je *Gluconobacter oxydans*.

Metabolizam *Gluconobacteria*

- *Gluconobacter* imaju respiratorni metabolizam s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona.
- Najvažniji metabolički put je heksoza monofosfatni put.
- Cjelovita glikoliza i TCA ciklus ne postoje u roda *Gluconobacter*!
- Mogu oksidirati šećere, steroide i alifatske i cikličke alkohole.
- Koriste veliki broj šećera i alkohola kao jedini izvor ugljika i dobro rastu na D-manitolu, sorbitolu, glicerolu, D-fruktozi i D-glukozi.
- Mnogi sojevi koriste amonijeve ione, kao i pojedine aminokiseline kao jedini izvor dušika.

Kvarenje piva s rodovima *Acetobacter* i *Gluconobacter*

- Rodovi *Acetobacter* i *Gluconobacter* su otporni na bakteriostatička svojstva hmelja, kiseline i alkohola i zbog toga su sposobni kvariti pivo.
- Iako su striktni aerobi pa ne mogu rasti u sladovini i pivu dok vladaju anaerobni uvjeti, istraživanja su pokazala da su sojevi pronađeni u pivu vjerojatno mikroaerofili, jer su izolirani iz piva s malom koncentracijom kisika.
- Ove bakterije izazivaju kiseli, neugodan okus, zamućenje piva, kao posljedicu oksidacije polialkohola, kao što je glicerol sve do dihidroksiacetona.
- Zamućenje piva se ogleda u pojavi pokrova na površini piva (pokožice).
- Jačina zagađenosti piva ovisi o soju bakterije i koncentraciji alkohola u pivu.

- Još 1936. godine je uočeno da su bakterije potpuno inhibirane kod koncentracije alkohola veće od 6 %.
- No, neki sojevi rastu na podlogama koje sadrže 10 % alkohola, a *Acetobacter* sp. BS05 i *Gluconobacter oxydans* var. *oxydans* NCIB 9013 mogu preživjeti i pri 12-13 % alkohola u pivima s visokom koncentracijom ekstrakta.
- Bakterije iz ovih rodova možemo pronaći i na ječmu, sladu i hmelju, u sladovini, kvascu, posudama za skladištenje, postrojenju za filtraciju.
- Pronađene su i u uzorcima zraka uzetim iz pivovara!
- *Acetobacter* kao izvor ugljika češće koristi alkohol, a *Gluconobacter* šećere.
- Bakterije ovih rodova su otporne na antiseptična svojstva hmelja, kisele uvjete i tolerantne su na etanol.

Porodica Enterobacteriaceae

- Porodica Enterobacteriaceae sastoji se od velikog broja bakterijskih vrsta izoliranih iz različitih izvora.
- Neke vrste su nepatogene, ali ima puno patogenih za čovjeka, životinje, insekte i biljke.
- Te vrste su: *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Klyvera*, *Serratia*, *Cedecea*, *Morganella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella* i *Tatumella*.
- Gram- su, štapićaste, 0,3-1,0 μm x 1,0-6,0 μm
- Postoje i pokretne i nepokretne, a pokretne imaju peritrihne flagele.
- Ne tvore endospore, fakultativno su anaerobne, otporne na soli i sposobne rasti u podlogama s mineralnim solima koje sadrže glukozu kao jedini izvor ugljika i energije.
- Neke zahtijevaju vitamine i aminokiseline
- Sve vrste važne za pivarstvo su katalaza pozitivne i oksidaza negativne
- Nitrat reduciraju do nitrita i time sudjeluju u sintezi *N*-nitrozamina u pivu!

Rodovi i vrste bakterija iz porodice Enterobacteriaceae

Rod	Vrsta	Porijeklo i posljedice
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Crijevna flora, eventualno uzročnik enteritisa
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Uzročnik upale u mokraćnim putovima, kao i u respiratornom traktu
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>	Crijevna flora
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabili</i> <i>P. morganii</i> <i>P. rettgeri</i>	Crijevna flora, uzročnik gnjiljenja

Rod	Vrsta	Porijeklo i posljedice
<i>Serratia</i>	<i>S. narceses</i>	Crijevna flora
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	Crijevna flora, ponekad uzročnik kvarenja živežnih namirnica
<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i> <i>S. paratyphi A,B,C</i> <i>S. paratyphimurium</i> <i>S. enteritidis i dr.</i>	Uzročnik trbušnog tifusa Uzročnik paratifusa Uzročnik akutnih gastroeneteritisa
<i>Shigella</i>	<i>Sh. dysenteriae</i>	Uzročnik bakterijske dizenterije
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	Uzročnik enteritisa

Metabolizam bakterija iz porodice Enterobacteriaceae

- Previru D-glukozu putem glikolize i heksoza monofosfatnog puta da bi se dobile određene količine mravlje kiseline ili CO_2 i H_2 , octene kiseline, mliječne kiseline, jantarne kiseline, etanola, acetoina i 2,3-butandiola.
- Koncentracija ovih metabolita ovisi o bakterijskoj vrsti i uvjetima rasta.
- Postoje dva tipa fermentacija:
 - u miješanoj kiselinskoj fermentaciji koja je tipična za *E. coli*, nastaju etanol i kiseline, s malim koncentracijama ili bez nastajanja acetoina i 2,3-butandiola
 - *Klebsiella* proizvodi relativno velike koncentracije acetoina i 2,3-butandiola, ali manje količine kiselina preko 2,3-butandiol puta.
- Plinskom kromatografijom produkata metabolizma u pivu je utvrđeno 60 kontaminanata iz porodice enterobakterija !

- Poznato je da enterobakterije usporavaju ili ubrzavaju vrenje i značajno utječu na miris, okus i aromu konačnog proizvoda
- Smatra se da za razliku od *O. proteus* i *R. aquatilis*, ostale enterobakterije ne preživljavaju uvjete tijekom vrenja
- Ove bakterije mogu postojati u "nepovratnom" stanju, kada nije zapažen rast na standardnim laboratorijskim podlogama. Također mogu preživjeti u stanju "mirovanja".
- "Nepovratne" bakterije mogu imati ozbiljan učinak u pivovarama i dvojbeno je da li enterobakterije ne preživljavaju do kraja proizvodnje piva!
- Ako su prisutne u kvascu za nacjepljivanje, neće se moći detektirati standardnim podlogama i metodama za detekciju, ali će se utvrditi tek kad je zapaženo kvarenje piva.
- Još uvijek nema "sigurnih" načina njihovog utvrđivanja.

Obesumbacterium proteus

- Najpoznatiji enterobakterijski kontaminant
- Najčešće se pronalazi u kvascu za nacjepljivanje i vidljiv je kao "kratki debeli štapić".
- Raste i u hmeljenoj i nehmeljenoj sladovini, podnosi koncentracije etanola do 6 % (v/v).
- Može rasti u nehmeljenoj sladovini od pH 4,4, do 9,0.
- Može usporiti vrenje sladovine, koje rezultira pivom s konačnom previsokom koncentracijom ekstrakta i pH.
- Odgovoran je za povećanu koncentraciju dimetil sulfida, dimetil-disulfida, n-propanola, izobutanola, izopentanola, 2,3-butandiola i diacetila.
- Konačna koncentracija ovih spojeva ovisi o soju.
- Pivo zagađeno s *O. proteus* ima voćni okus i miris.

Rahnella aquatilis

- Mali štapići, veličine 0,5-0,7 μm x 2,0-3,0 μm , pokretne bakterije koje rastu pri 25 °C, ali im se pokretljivost gubi pri 37 °C
- Previru D-glukozu, uz nastajanje kiseline i CO_2
- Također previru laktozu, maltozu i rafinozu.
- Raste izvrsno i u hmeljenoj i nehmeljenoj slodovini, i u prisustvu i odsustvu kvasca.
- Pri uobičajenim koncentracijama ekstrakta normalno preživljava, kao i *O. proteus* (nakuplja se u kvascu za nacjepljivanje), ali u sladovinama s visokom konc. ekstrakta ne preživljava pri visokim konc. EtOH (11-12 % v/v).
- U **ale** vrenjima, *R. aquatilis* se izdiže na površinu sladovine zajedno s kvascem i preživljava 60-70 sati, a ostale enterobakterije ostaju suspendirane u slodovini i ne preživljavaju niske pH vrijednosti i visoke koncentracije EtOH
- U **lager** vrenjima, *R. aquatilis* se taloži zajedno s kvascem i predstavlja ozbiljan izvor kontaminacije, a najveći je problem nemogućnost određivanja ukupne količine bakterija tijekom vrenja.

- Kada je prisutna u fermentirajućoj sladovini, *R. aquatilis* značajno utječe na promjenu okusa, mirisa i arome gotovog proizvoda
- Konačna pH vrijednost sladovine kontaminirane s *R. aquatilis* viša je no uobičajeno, vjerojatno zbog metabolita koji se nagomilavaju tijekom vrenja
- Neuobičajeno visoke konc. diacetila (0,7 mg/L) i dimetil sulfita (DMS) (142,8 µg/L) su pronađene u pivu proizvedenom od sladovine kontaminirane s 10^6 stanica *R. aquatilis* / ml.
- Koncentracija ovih supstancija bila je u nekontaminiranom pivu daleko niža (0,04 µg/L diacetila i 54,6 µg/L DMS-a), a nastajanje ovih tvari ovisno je o razini kontaminacije i o soju *R. aquatilis*.
- Pivo kontaminirano ovom bakterijom je nepitko (užasnog okusa), s okusom po mlijeku, voću i sumporu istovremeno.
- Ječam, slad i hmelj, kao i ponovno nacijepljeni kvasac često su izvor kontaminacije!

Citrobacter freundii

- Povremeni kontaminant u naci jepljenoj sladovini, najbliži "srodnik" *E. coli*
- Pravilni štapići ~1,0 µm u promjeru i 2,0-6,0 µm dužine.
- Nalazimo ih slobodne ili u parovima, pokretne s peritrihinalnim flagelama
- *C. freundii* je fakultativno anaerobna bakterija, oksidaza negativna i katalaza pozitivna
- Citrat može služiti kao jedini uzvor ugljika, ali se i citrat-negativni sojevi mogu pronaći u pivovarama
- Nalazimo ju u ljudi, životinja, zemlji, vodi, kliničkom okruženju, kao sekundarno patogenu bakteriju.
- Reducira sposobnost kvasca za previranje, povećava koncentraciju laktata, piruvata, jantarne kiseline, izocitrata i DMS-a u konačnom pivu.
- Čak i najmanji broj stanica *C. freundii*, koje preživljavaju samo kratki dio vrenja, mogu pokvariti pivo.
- Pogodno je što je osjetljiva na visoke koncentracije EtOH i ne preživljava cijeli postupak proizvodnje piva.

Klebsiella

- Izolirana iz različitih faza proizvodnje piva, povezana s kvarenjem piva
- Ravni štapići, $0,3-1,0 \mu\text{m} \times 0,6-6,0 \mu\text{m}$, pojavljuje se samostalno, u parovima i kratkim lancima
- Nepokretna, kapsulirana, fakultativno anaerobna i oksidaza negativna
- *K. pneumoniae* patogena je za ljude jer izaziva upalu pluća
- Nova je vrsta, *K. terrigena*, pronađena u vodenom i zemljanom okolišu, i može rasti pri $10 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Pivo kontaminirano s vrstama *Klebsiella* imaju tipični fenolni okus. Sojevi *K. pneumoniae* su izolirani iz pivovara, ali im se još ne zna uloga u kvarenju piva. Poznato je da su osjetljivi na konc. EtOH i ne preživljavaju sveukupni postupak varenja piva.
- *Klebsiella* je poznati proizvođač suviška hlapljivih organsko-sulfidnih supstancija, kao što je DMS!

Ostali kontaminanti iz porodice Enterobacteriaceae

- Kontaminanti ove porodice obuhvaćaju: *E. aerogenes*, sojeve *Serratia* i *P. mirabilis*
- Pojavljuju se najčešće u sladovini prije vrenja i povezani su s ranijim fazama fermentacije
- Nastavljaju rasti u fermentirajućoj sladovini i proizvode metabolite koji imaju štetne učinke na kakvoću piva
- Sumporni i fenolni okusi piva odmah ukazuju na prisutnost enterobakterija, ali važna je njihova sposobnost da reduciraju nitrate do nitrita
- Neprihvatljiva koncentracija nitrita nastalih u pivu ukazuje na povećanu koncentraciju nitrata u vodi za proizvodnju piva, te prisustvo enterobakterija
- Mnoge pivovare podcjenjuju negativan utjecaj enterobakterija u pivarstvu, no važno je istaknuti da se one nalaze u vodi, zemlji i sirovinama, dakle, ječmu, sladu i hmelju, koji su glavni izvori ove bakterije kontaminanta.

Anaerobne Gram- štapićaste bakterije

- Pivarski mikrobiolozi su općenito prihvatili podjelu bakterija koje izazivaju pivo na aerobne i anaerobne vrste
- U anaerobne Gram- bakterije se ubrajaju:
 - *Pectinatus cerevisiiphilus*
 - *Pectinatus frisingensis*
 - *Selenomonas lactificex*
 - *Zymophilus raffinovorans*
 - *Zymophilus paucivorans*
- Striktno anaerobne bakterije čine važnu skupinu bakterija koje izazivaju kvarenje u pakiranom pivu, jer proizvode značajne količine octene i propionske kiseline, kao i acetoina u sladovini i pakiranom pivu.
- Pivo postaje zamućeno i ima okus po pokvarenim jajima

Rod *Zymomonas*

Opća svojstva

- Stanice iz roda *Zymomonas* su kratki "debeljuškasti" Gram- štapići, 1,0-1,4 μm x 2,0-6,0 μm .
- Pojavljuju se najčešće u parovima, ali i samostalno.
- Ne stvaraju endospore, uglavnom nisu pokretni, a pokretni sojevi imaju četiri polarne flagele.
- Previru glukozu i fruktozu, a ne i maltozu, oksidaza su negativni i anaerobi, ali podnose male koncentracije kisika.
- Previru glukozu i fruktozu do etanola i CO_2 modificiranom glikolizom, pri čemu nastaju male koncentracije acetaldehida, octene kiseline, mliječne kiseline i glicerola.
- Najvažnije svojstvo je sposobnost rasta i metabolizma u prisutnosti visokih koncentracija EtOH (čak do 15 % v/v).
- Danas se primjenjuju u proizvodnji čistog etanola.
- Rijetko su pronađeni u lager pivovarama jer im niske temperature vrenja (8-12 °C) ne pogoduju.

Rod *Megasphaera*

- Striktno anaerobni Gram⁻ koki, nalazimo ih u gotovom pivu, koje je zamućeno i smrdi.
- *M. cerevisiae* su Gram⁻, blago izduženi koki, 1,3-1,6 μm promjera, pojavljuju se u parovima i povremeno u kratkim lancima.
- Striktno su anaerobni, rastu na temperaturama između 15 i 37 °C, a optimalna je 28 °C.
- Katalaza su negativni, proizvode H₂S.
- Vrste iz roda *Megasphaera* proizvode značajne količine maslačne kiseline u pivu, a u manjim koncentracijama acetoin.
- Imaju status "pravog i opasnog" zagađivača piva !