

Mikrobiološki i fizikalno - kemijski profil hrvatskih piva

Gukov, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:593622>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2021.

Ana Gukov

1310/MB

**MIKROBIOLOŠKI I FIZIKALNO –
KEMIJSKI PROFIL HRVATSKIH
PIVA**

Rad je izrađen u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Adriane Lepur, znan. sur. i u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem dr. sc. Adriani Lepur i mag. ing. Matei Skoblar na stručnom vodstvu, prijateljskom pristupu, nesebičnom prenošenju znanja, uloženom vremenu i pomoći pri provođenju eksperimenata te ogromnoj količini strpljenja i motivaciji u svakom trenutku tijekom izrade diplomskog rada. Od srca zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima BIOCentra na razumijevanju, pristupačnosti i toploj atmosferi.

Neizmjereno sam zahvalna i prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na uloženom trudu i stručnoj pomoći te korisnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i učinili ovaj period studiranja posebnim. Hvala na svim kavama, druženjima i izlascima, uz vas je bilo lakše rješavati sve obaveze.

Posebno zahvaljujem sestri Emi na nesebičnom pomaganju i podršci u svemu te Tobiju koji me uveseljavao i tražio da ustanem i kada mi se nije dalo.

Veliko hvala Lovri na podršci, strpljenju i razumijevanju, te pruženim brojnim savjetima.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima Željki i Igoru, koji su uvijek tu, uz mene, u sretnim, ali i teškim trenucima i bez kojih sve ovo što sam do sada postigla ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku
mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

MIKROBIOLOŠKI I FIZIKALNO – KEMIJSKI PROFIL HRVATSKIH PIVA

Ana Gukov, 1310/MB

Sažetak: U ovom radu provedene su mikrobiološke i fizikalno–kemijske analize 11 različitih vrsta piva. Mikrobiološkim ispitivanjima pronađeni su aerobni i anaerobni mikroorganizmi u svim uzorcima piva. U komercijalno dostupnim vrstama piva potvrđen je rast aerobnih i anaerobnih bakterija koje proizvode organske kiseline. U nekim je pivima potvrđeno prisustvo radnog kvasca. U niti jednom pivu nisu pronađene koliformne bakterije ili kvasci iz roda *Brettanomyces*. U dva uzorka piva dokazana je prisutnost bakterija koje zagađuju pivo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* i *Pediococcus damnosus*. U niti jednom od 11 uzoraka piva nisu pronađene vrste *Acetobacter pasteurianus* i *Lactobacillus acidophilus*. U jednom je uzorku piva dokazana prisutnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* koji se smatra kvascem koji kvari pivo. Dokazani mikroorganizmi nisu znak zdravstvene neispravnosti piva, već utječu na organoleptičke promjene, mogu uzrokovati mutnoću i talog, te promjenu okusa piva. Fizikalno–kemijske analize pokazale su da su ispitivani parametri, pH i boja piva, bili u skladu s propisima. pH je u rasponu 4,18 – 4,89. Boja piva je za svijetla piva do 30 EBC (engl. *European brewery convention*), za tamna piva oko 57 EBC, za rezano lager pivo 49 EBC. Do odstupanja je došlo kod 3 uzorka, koji su imali veće EBC vrijednosti od očekivanih za pojedinu vrstu piva. Mjerena je i gorčina piva 6 mjeseci nakon otvaranja piva te su vrijednosti gorčine bile gotovo 10 puta manje od literaturno očekivanih u svim uzorcima. Gorčina je izražena u IBU (engl. *International Bitterness Units*) jedinicama, a uzrok odstupanja je proces starenja piva.

Ključne riječi: mikrobiologija piva, PCR, pivo, fizikalno-kemijske analize, kvasac

Rad sadrži: 70 stranica, 36 slika, 29 tablica, 42 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Neposredni voditelj: dr. sc. Adriana Lepur, znan. sur.

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: Matea Skoblar, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
3. Dr. sc. Adriana Lepur, znan. sur.
4. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjena)

Datum obrane: 01. ožujka 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial
Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

MICROBIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROFILING OF CROATIAN BEER

Ana Gukov, 1310/MB

Abstract: In this study, microbiological and physico-chemical analysis of 11 different beers were performed. Aerobic and anaerobic microorganisms were detected in all beer samples. All commercial beers contained aerobic and anaerobic, organic acid - producing bacteria. In some samples brewing yeasts were found. No samples contained coliform bacteria or *Brettanomyces* yeasts. Two beer samples contained typical beer spoilage bacteria: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* and *Pediococcus damnosus*. None of the beer samples contained *Acetobacter pasteurianus* and *Lactobacillus acidophilus* species. In one beer sample, it was found *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, the beer-spoiling yeast. Microorganisms found in some of the samples are not human pathogens and do not pose health threat, but they can affect organoleptic properties, cause increased turbidity and sedimentation, and change beer taste. Physico-chemical analysis included pH, colour and bitterness measurements. pH and colour were within the law regulated limit, pH between 4.18 - 4.89, and the colour of light beer up to 30 EBC (*European brewery convention*), for dark beer about 57 EBC, for half-half beer 49 EBC. Three beer samples had higher EBC values than it would be expected for that type of beer. The bitterness was measured 6 months after the beer was opened, hence the values were almost 10 times less than expected, perhaps due to beer aging. Bitterness was expressed as IBU (*International Bitterness Units*).

Keywords: beer microbiology, PCR, beer, physico – chemical analysis, yeast

Thesis contains: 70 pages, 36 figures, 29 tables, 42 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Principal investigator: PhD. Adriana Lepur, Research Associate

Mentor: PhD. Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: Matea Skoblar, mag. ing.

Reviewers:

1. PhD. Blaženka Kos, Full professor
2. PhD. Božidar Šantek, Full professor
3. PhD. Adriana Lepur, Research Associate
4. PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 01 March 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. TEHNOLOGIJA PIVA	3
2.1.1. Definicija piva i opis sirovina.....	3
2.1.2. Podjela piva	4
2.2. NADZOR PROIZVODNJE PIVA	5
2.2.1. Mikrobiološka kontrola	5
2.2.1.1. Svojstva i sastav hranjivih podloga	6
2.2.1.2. Uzgoj bakterija na selektivnim hranjivim podlogama.....	7
2.2.1.3. Uzgoj kvasaca na selektivnim hranjivim podlogama	7
2.2.2. Fizikalno-kemijska kontrola.....	7
2.3. MIKROORGANIZMI U PIVU.....	8
2.3.1. Kvasci u pivu.....	9
2.3.1.1. Kvasci	9
2.3.1.2. Primjena kvasaca u proizvodnji piva	9
2.3.1.3. Rod <i>Saccharomyces</i>	10
2.3.1.4. Podjela „divljih“ kvasaca	11
2.3.2. Bakterije u pivu	12
2.3.2.1. Gram - pozitivne bakterije.....	12
2.3.2.2. Gram - negativne bakterije.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Uzorci piva	15
3.1.2. Hranjive podloge	16
3.1.3. Laboratorijski uređaji	20
3.1.4. Laboratorijski pribor.....	21
3.1.5. Kemikalije	22
3.1.6. Otopine	23
3.1.7. Programi	23
3.2. METODE RADA	24
3.2.1. Priprema selektivnih hranjivih podloga.....	24
3.2.2. Priprema uzoraka piva.....	24
3.2.3. Nacjepljivanje hranjivih podloga	25
3.2.4. Brojanje poraslih kolonija	26
3.2.5. Bojanje po Gramu.....	27
3.2.6. Izolacija DNA.....	29
3.2.6.1. Obogaćivanje uzoraka piva	29

3.2.6.2.	<i>Izolacija genomske DNA iz mikroorganizama</i>	<i>30</i>
3.2.6.3.	<i>Određivanje koncentracije genomske DNA.....</i>	<i>31</i>
3.2.7.	Lančana reakcija polimerazom (PCR) i gel elektroforeza.....	32
3.2.7.1.	<i>Lančana reakcija polimerazom (PCR).....</i>	<i>32</i>
3.2.7.2.	<i>Gel elektroforeza</i>	<i>34</i>
3.2.8.	Fizikalno – kemijske analize piva	35
3.2.8.1.	<i>Određivanje pH vrijednosti</i>	<i>35</i>
3.2.8.2.	<i>Određivanje gorčine piva</i>	<i>35</i>
3.2.8.3.	<i>Određivanje boje piva</i>	<i>36</i>
4.	REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1.	MIKROBIOLOŠKI PROFIL PIVA	37
4.1.1.	Broj poraslih kolonija na selektivnim hranjivim podlogama	37
4.1.2.	Mikroskopiranje preparata obojanih po Gramu.....	40
4.1.3.	Čistoća izolirane genomske DNA	40
4.1.4.	Očekivane veličine PCR produkata nakon provedene lančane reakcije polimerazom i gel elektroforeze.	40
4.2.	FIZIKALNO – KEMIJSKA ANALIZA PIVA	41
4.2.1.	Određivanje boje piva.....	41
4.2.2.	Određivanje gorčine piva	43
4.2.3.	Određivanje pH vrijednosti piva.....	45
4.3.	MIKROBIOLOŠKE I FIZIKALNO – KEMIJSKE ODLIKE POJEDINIH UZORAKA PIVA.....	46
5.	ZAKLJUČCI.....	66
6.	LITERATURA.....	67

1. UVOD

Pivo je pjenušavo slabo alkoholno piće gorkog okusa i hmeljne arome. Proizvod je alkoholnog vrenja pивske sladovine. Fermentaciju provode kvasci iz roda *Saccharomyces* koji brzo fermentiraju šećere u prisustvu i odsustvu kisika, kako bi proizveli etanol. Kvasac za alkoholno vrenje dobiva se razmnožavanjem čiste kulture. Mora biti sposoban za brzo i visoko previranje sladovine do etanola i ugljikova dioksida. Kvasac je odgovoran za aromu vrenja i ukupni *bouquet* piva (Marić, 2009). Ovisno o željenom okusu piva koriste se različiti radni sojevi kvasaca – ale ili lager, a u novije vrijeme i „divlji“ kvasci koji daju fenolni okus, koji je tradicionalno nepoželjan okus piva.

Osnovne sirovine za proizvodnju piva su slad, hmelj, kvasac i voda. Za dobivanje slada upotrebljava se tzv. pivski (dvoredni) ječam. Procesom sladovanja pivskog ječma prvo se dobiva pivski slad. Iz slada se proizvodi sladovina koja se pomoću kvasca previre u pivo. Proizvodnja piva je složen i dugotrajan proces. Iako su prvi pisani tragovi o pripremi piva bili još 3000. godine prije nove ere u Babilonu, današnja saznanja o pivu daleko su naprednija. U 19. stoljeću pivo se često kvarilo i bacale su se čitave šarže (Marić, 2009). Francuski kemičar Louis Pasteur, jedna je od značajnih osoba za početak pivarske mikrobiologije. On je otkrio kako je kvarenje piva posljedica razvoja i rasta bakterija octene i mliječne kiseline, a Horace Brown je ustanovio da tome doprinose i „divlji“ kvasci. Pasteur je uveo znanost u pivarstvo te se smatra ocem modernog pivarstva (Enari, 1999; Pasteur i Faulkner, 1879). Pokazao je pivarima kako uzgojiti kulture čistih pivskih kvasaca, objasnio im što se točno događa tijekom vrenja i uveo je postupak pasterizacije piva čime mu se značajno produžava vijek trajanja. Utjecaj njegovih otkrića pomogao je uspostavljanju higijenskih navika koje danas smatramo uobičajenim. Kakvoća piva mora zadovoljavati zahtjeve kupaca bez obzira na godišnje doba. Kako bi se osigurala ujednačenost kvalitete duži vremenski period, provode se redovite kontrole kako gotovog piva tako i procesa njegove proizvodnje (Baxter, 2001). Nepoželjni mikroorganizmi, osim što mogu promijeniti okus ili pokvariti pivo, dovode i do nastajanja taloga i mutnoće.

Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika važno je kao mjera kakvoće piva. Mikroorganizmi koji proizvode organske kiseline mogu primjerice dovesti do snižavanja pH vrijednosti. Promjena boje nema učinak na zdravstvenu ispravnost već na prezentaciju samog

proizvoda. Za svaku pojedinu vrstu piva određene su skale arome, boje, okusa i ostalih karakteristika.

Flavonoidi, polifenoli te obojeni antocijani i tanini doprinose nestabilnosti piva. Proantocijanidini su odgovorni za koloidnu stabilnost, dok se flavonoide smatra odgovornima za stabilnost boje piva (Callemien i Collin, 2007). Promjene boje piva tijekom skladištenja uglavnom su posljedica enzimskih i ne enzimskih oksidacija polifenola i/ili nastajanja melanoidinskih spojeva (Šavel i sur., 2010). Tijekom proizvodnje piva, u fazi ukomljavanja i kuhanja sladovine s hmeljom, nastaju obojeni karamelni spojevi, koji utječu na intenzitet boje. U prisutnosti kisika, zbog oksidacije i dodatne razgradnje polifenola, u prvim danima skladištenja dolazi do brzog pojačavanja intenziteta boje (McMurrough i sur., 1997), isto kao i prilikom izloženosti piva dnevnom (vidljivom) svjetlu. Ove su promjene izraženije kod svijetlih nego kod tamnih piva. Osim navedenog, vrlo važan čimbenik koji utječe na intenzitet boje je i ambalaža u koju je pivo pakirano (Bamforth, 2008).

Cilj ovog rada bio je odrediti mikrobiološki profil različitih vrsta piva i njihove fizikalno-kemijske karakteristike te utvrditi postoji li povezanost mikrobiološkog i fizikalno-kemijskog profila s pojedinom vrstom piva. Određene su fizikalno-kemijske karakteristike: pH vrijednost, boja i gorčina piva. Mikrobiološki profil određen je pomoću tehnike selektivnih hranjivih podloga te bojanjem poraslih kolonija po Gramu. Odabrane mikrobiološke vrste su određene genskom analizom nakon izolacije genomske DNA iz piva, provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR) i analize produkata elektroforezom na agaroznom gelu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEHNOLOGIJA PIVA

Pivo je staro koliko i ljudska povijest. Proizvodi se više od 5000 godina. Proizvodni proces i kvaliteta piva su kroz povijest prolazili, i još uvijek prolaze kroz brojne promjene. Postoje brojne legende o pronalasku piva, međutim, najvjerojatnije za pronalazak piva nije zaslužna jedna osoba već se otkriće dogodilo slučajno (Marić, 2009).

Piva proizvedena u davna vremena su se bitno razlikovala od današnjih. Prije su piva bila mutna i podložna kvarenju. Par stoljeća kasnije napredak u proizvodnji piva događa se u samostanima, koji postaju središte razvoja procesa proizvodnje piva. U carstvu Karla Velikog se prvi put počinje koristiti riječ pivo (*beer, bier*). Potom se razvoj piva prestao prepuštati slučaju i počelo se znanstveno pristupati njegovoj proizvodnji. Razvoj mikroskopa uvelike je pridonio uvođenju nadzora kakvoće piva kao i klasifikaciji bakterija koje kvare pivo. Industrijski razvoj proizvodnje piva započinje tek krajem 19. stoljeća i posljedica je općeg razvoja znanosti i tehnologije. Tada se otvaraju brojna i danas aktivna središta istraživanja umijeća proizvodnje piva (Marić, 2009).

2.1.1. Definicija piva i opis sirovina

Pivo je pjenušavo i osvježavajuće piće, koje sadrži mali, srednji ili veliki udio alkohola, ima i karakterističan okus po sladu i manje ili jače izraženu gorčinu i specifičnu aromu po hmelju. Dobiva se fermentacijom pivske hmeljne sladovine pomoću pivskog kvasca (Grba, 2010). Proizvodnja slada započinje močenjem, klijanjem, a potom i sušenjem isklijalog zrna pivskog ječma, pljevičastog dvorednog ječma vrste *Hordeum sativum* koji se procesom sladovanja obogaćuje hidrolitičkim (proteolitičkim i amilolitičkim) enzimima. Dobiveni slad se koristi za proizvodnju piva, a ovisno o vrsti piva koriste se razne vrste slada: pilsen, minhenski, karamel svijetli, pšenični tamni, itd. Iz slada, neslađenih sirovina i hmelja dobiva se sladovina, vodeni ekstrakt navedenih sastojaka. Hmelj, neoplođeni cvat višegodišnje ženske biljke penjačice *Humulus lupulus*, dodaje se tijekom kuhanja piva da bi se dobila željena gorčina i aroma piva. Neslađene sirovine su sve neisklijale žitarice, poput ječma, pšenice, kukuruza, riže, njihova brašna ili škroba (Marić, 2009). Pivski kvasac dodaje se u ohlađenu sladovinu radi njenog vrenja. Koriste se čiste kulture kvasaca koje se razlikuju po temperaturi

vrenja i sposobnosti taloženja nakon njegova završetka. Voda je iznimno važan sastojak u proizvodnji piva i posebno se priprema za svaku vrstu piva. Tvari koje su odgovorne za njegovu karakterističnu aromu i okus razvijaju se tijekom proizvodnje i kuhanja sladovine kao i u procesu glavnog i naknadnog vrenja.

2.1.2. Podjela piva

Oko 80 % svjetskih piva pripada svijetlom tipu piva donjeg vrenja, a samo 20 % pripada ostalim tipovima. Danas se u većini zemalja pije više stotina vrsta piva te se postavlja pitanje kako je moguće samo od slada, neslađenih sirovina, vode i hmelja proizvesti toliko različitih tipova i vrsta piva. Ipak, ovisno o tvrdoći vode, kvaliteti i vrsti slada te neslađenih sirovina (ječam, kukuruz, riža, pšenica) i hmelja (gorke i aromatične sorte), vrsti kvasca (kvasci gornjeg i donjeg vrenja, „divlji“ kvasci) te primijenjenom tehnološkom postupku, koji uključuje dobivanje pivske sladovine, vrenje sladovine, doviranje, dozrijevanje i doradu mladog piva moguće je dobiti mnogo različitih vrsta piva s različitim okusima i aromama (Jackson, 2000, 1998; Marić i Nadvornik, 1995; Beazly, 1994).

Pivo se može podijeliti prema više kriterija. U osnovi piva mogu biti svijetla, jantarna, crvena, tamna i crna, ali se zapravo radi o različitim nijansama žute, crvene, crveno-smeđe i crne boje (Beazly, 1994). Zanimljiva je i podjela piva prema volumnom udjelu alkohola, koji uglavnom iznosi od 0,5 do 10 % vol. alkohola, a rijetko, ali moguće i više. Pivo se na temelju ove podjele dijeli na:

- bezalkoholno (ispod 0,5 % vol. alkohola)
- lagano (ispod 3,5 % vol. alkohola)
- standardno lager (sadrže 3,5 – 5,5 % vol. alkohola)
- jako pivo (više od 5,5 % vol. alkohola)
- ječmeno vino (> 10 % vol. alkohola)

Pivo se može podijeliti i prema vrsti kvasca i načinu vrenja. Pa tako razlikujemo pivo donjeg vrenja - lager, pivo gornjeg vrenja – ale, afričko pivo i „spontano prevrelo pivo“. Lager pivo se dobiva vrenjem pivske sladovine pomoću sojeva kvasca *Saccharomyces uvarum*. Ova vrsta piva u Hrvatskoj čini oko 90 % domaće proizvodnje i potrošnje piva (Ožujsko, Karlovačko, Pan, Osječko, Staročeško). Za alkoholno vrenje ale piva koristi se pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. „Spontano prevrelo pivo“ se proizvodi pomoću „divljih“ kvasaca, koji u sladovinu dospijevaju iz prirodnog okoliša (Marić, 2009).

2.2. NADZOR PROIZVODNJE PIVA

Higijena je oduvijek bila važna u procesu proizvodnje piva. Danas su higijenski zahtjevi povećani zbog sve dužih distribucijskih puteva i zahtjeva za povećanom trajnošću proizvoda. Ukratko, potrebno je čistiti, dezinficirati ili sterilizirati sve potencijalne izvore mikrobnog zagađenja konačnog proizvoda u svim fazama proizvodnje. Čišćenje i dezinfekcija su fizički i kemijski postupci za sprječavanje mikrobnog zagađenja preko radnih površina i tehnološke opreme te rukovanja djelatnika (Kunze, 1996). Čišćenjem se uklanjaju razne nečistoće koje mogu poslužiti kao hranjiva podloga za mikroorganizme, kao i sami mikroorganizmi. Postupak čišćenja i dezinfekcije provodi se po fazama: mehaničko čišćenje - uklanjanje vidljive nečistoće; kemijsko čišćenje - uklanjanje okom nevidljivih zaostataka vidljive nečistoće; ispiranje vodom; dezinfekcija i zadnje ispiranje vodom (Grba, 2010).

Prema mnogim autorima (Priest i Campbell, 1996; Marić i Bohunicki, 1987; Anonymous, 1985; Rainbow, 1981) uspješna mikrobiološka kontrola svodi se na:

1. često uzimanje uzoraka,
2. učestali nadzor mjesta koja se nepouzdao peru i dezinficiraju, poput mjernih uređaja i cjevovoda za njihovo povezivanje, pumpi, ventila s čepovima i poklopcima za blindiranje te ventila za uzorkovanje, gumenih crijeva i ostalih cjevovoda i dr.,
3. stalni mikrobiološki nadzor čiste kulture kvasca (prije naciepljivanja i nakon vrenja), vode za pranje i ispiranje te zraka za aeraciju sladovine.

Mikrobiološka, fizikalno–kemijska i senzorska kontrola svake posude provodi se od početka vrenja do točenja u boce. Jednako se kontroliraju i same napunjene boce prije puštanja u prodaju. Kontrola se provodi neprekidno, a broj analiza se po potrebi povećava ili smanjuje, ovisno o prethodno dobivenim rezultatima.

2.2.1. Mikrobiološka kontrola

Mikrobiološku kontrolu potrebno je provoditi kako bi se spriječio prelazak mikroorganizama iz mladog piva ili proizvodnog puta u gotovo pivo. Neželjeni mikroorganizmi prvo čine neznatan talog u pivu, da bi se s vremenom umnožili i učinili pivo mutnim, te zbog raznih produkata metabolizma kvarili njegov okus i učinili ga nepitkim (Nitzche i Eggers, 2002). Kontrola se provodi kako bi se što ranije detektirali neželjeni mikroorganizmi i otkrila

mjesta s kojih ulaze u pivo te kako bi se poduzele mjere za sprječavanje njihovog razmnožavanja (Barney i Kot, 1992).

U pivarstvu je uobičajena metoda određivanja štetnih mikroorganizama u pivu naciepljivanje istraživanog uzorka na selektivne hranjive podloge. Uzorci se uzimaju s različitih lokacija jer su i kvasac i voda i zrak mogući izvori kontaminacije koji se moraju na vrijeme uočiti. Mikrobiološka kontrola uzoraka pomoću selektivnih hranjivih podloga vrlo brzo daje rezultate i otkriva kontaminaciju čak i kad se radi o vrlo malenom broju stanica prisutnih kontaminanata. Uzorci se naciepljuju na selektivne podloge za rast određenih tipova mikroorganizama, bilo krute u Petrijevim zdjelicama ili tekuće u epruvetama. Kontrola higijene se provodi uzimanjem briseva posuda, cjevovoda, bačava i dijelova stroja za punjenje (zvona, čepilica i glava za punjenje). Membranska filtracija je česta metoda uzorkovanja za mikrobiološku kontrolu jer se organizmi zadržani na membrani mogu direktno obojiti i mikroskopirati ili kultivirati tako što se membrana položi na čvrstu podlogu u Petrijevoj zdjelici.

2.2.1.1. Svojstva i sastav hranjivih podloga

Hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama su otopine tvari koje im u laboratorijskim uvjetima omogućuju rast i razmnožavanje. Na hranjivim podlogama mogu se uzgajati bakterije, kvasci i plijesni. Moraju sadržavati izvore potrebnih kemijskih elemenata za sintezu dijelova njihovih stanica, te izvore energije kako bi se životni ciklus nesmetano odvijao. Selektivne hranjive podloge sprječavaju rast određenih mikroorganizama, dok stimuliraju rast drugih (prisutni su određeni supstrati ili sastojci poput boja ili antibiotika).

Prema konzistenciji hranjive podloge mogu biti tekuće, polučvrste i čvrste. Kao sredstvo za skrućivanje hranjivih podloga uglavnom se upotrebljava agar. Agar je smjesa polisaharida agaroze i agaropektina koja se dobiva iz stanične stijenke tihooceanskih crvenih algi iz rodova *Gelidium* i *Gracilaria* (Hajsig i Delaš, 2016).

Hranjive podloge mogu se pripremati u laboratoriju od pojedinih sastojaka prema postojećoj recepturi. Danas je mikrobiolozima na raspolaganju mnogo komercijalnih dehidriranih podloga u prahu za uzgoj većine poznatih vrsta mikroorganizama, a mogu se kupiti i već gotove sterilne podloge u Petrijevim zdjelicama ili epruvetama spremne za jednokratnu upotrebu. Komercijalne dehidrirane hranjive podloge sadrže sve sastojke u propisanom omjeru,

a za pripremu je potrebno dodati destiliranu vodu, po potrebi i neke dodatke (npr. pivo se dodaje u UBA podlogu) i podlogu sterilizirati (Hajsig i Delaš, 2016).

2.2.1.2. Uzgoj bakterija na selektivnim hranjivim podlogama

Glavni sastojak hranjivih podloga za uzgoj bakterija čini voda. Kao osnovni konstitucijski biogeni elementi dodaju se u propisanim koncentracijama: ugljik, vodik, dušik, fosfor i sumpor. Kao zajednički izvor ugljika, dušika, fosfora i sumpora dodaje se najčešće pepton, kazein, mesni ekstrakt ili ekstrakt kvasca. U prilikama kada je bakterijama za rast i razmnožavanje u hranjivoj podlozi nužan izvor ugljika, u njih se dodaju provjereni izvori ugljika kao što su ugljikohidrati, hlapljive masne kiseline ili metanol. Kada im je potreban siguran izvor dušika, u hranjive podloge se dodaju anorganske soli koje sadrže taj element, poput NaNO_3 , KNO_3 ili $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Za održavanje osmotske ravnoteže u hranjive podloge se dodaju NaCl , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 ili KH_2PO_4 . Pri uzgoju nekih vrsta bakterija, u hranjive podloge dodaju se vrlo male koncentracije elementa u tragovima kao što su: Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Ni, V, B, Cl, Na i Si. Ponekad se dodaju i tvari koje inhibiraju razvoj neželjenih bakterija ili drugih mikroorganizama u uzorku. Tako se postiže njihova selektivnost, pa primjerice žučne soli inhibiraju razvoj gram-pozitivnih bakterija, a Na-azid razvoj gram-negativnih bakterija (Hajsig i Delaš, 2016).

2.2.1.3. Uzgoj kvasaca na selektivnim hranjivim podlogama

Kvasci nisu osobito zahtjevni mikroorganizmi i rastu na brojnim hranjivim podlogama poput hranjivog agara ili krvnog agara. Porasle kolonije većine vrsta kvasaca imaju promjer 1 do 3 mm, bijele su do krem boje, uzdignute, glatke i sjajne površine, pravilnog ruba i mirišu na kvasac. Sve mikološke hranjive podloge sadrže prijeko im potrebne organske i anorganske spojeve i elemente. Za uzgoj kvasaca najčešće se upotrebljavaju čvrste hranjive podloge, kao što je to Sabouraudov agar. Ukoliko se u podlogu dodaju antibiotici (kloramfenikol, gentamicin, streptomycin i penicilin) onemogućava se rast bakterija (Hajsig i Delaš, 2016).

2.2.2. Fizikalno-kemijska kontrola

Kako bi se proizvelo kvalitetno pivo moraju se kontinuirano pratiti određeni parametri, koji uključuju:

- određivanje boje sladovine i piva
- mjerenje pH

- određivanje gorčine
- druga mjerenja (konačna prevrelost, stabilnost pjene, bistroća, ukupna količina kisika u pakiranom pivu, količina zraka u grliću boce pakiranog piva, količina alkohola, ukupni polifenoli, ukupni dušik, određivanje nitrata, tvrdoća vode, slobodnih aminokiselina i amonijaka, određivanje diacetila i viših alkohola).

2.3. MIKROORGANIZMI U PIVU

Svega je nekoliko rodova bakterija i kvasaca koji uspješno rastu na pivu i sladovini kao hranjivim podlogama. Prilikom ukomljavanja i kuhanja sladovine pojavljuju se bakterije mliječne kiseline, a najčešći kontaminanti piva su iz rodova *Pediococcus* i *Lactobacillus* (Marić, 2009).

Postoji mogućnost kontaminacije i raznim drugim aerobnim i anaerobnim bakterijama i „divljim“ kvascima. Tijekom odležavanja piva ti kontaminanti nastavljaju svoj rast, a mogu se pojaviti i novi zbog nečistih cjevovoda i tankova za naknadno vrenje piva. Svi kontaminanti koji su se održali u pivu do punjenja, zadržavaju se i dalje i ugrožavaju njegovu stabilnost (Marić, 2009).

U svakoj se tehnološkoj fazi proizvodnje piva mogu pojaviti specifični mikroorganizmi. Spomenuti se mikroorganizmi mogu podijeliti u 3 grupe:

a) Neškodljivi mikroorganizmi

Neškodljivi mikroorganizmi se ne mogu razmnožavati u pivu pa s vremenom odumiru. To mogu biti spore plijesni i različite vrste bakterija i kvasaca.

b) Potencijalno štetni mikroorganizmi

Potencijalno štetni mikroorganizmi se razmnožavaju u samo za njih povoljnim uvjetima, kao što su npr. povećan udio kisika u pivu, relativno visoka pH vrijednost piva (4,7 do 4,8), mali udio gorkih sastojaka hmelja i visoki udio neprevrelog ekstrakta. Predstavnici potencijalno štetnih bakterija su *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Pectinatus cerevisiphilus*, *Megasphaera cerevisiae* i *Enterobacteriaceae*. Posljedice njihova rasta u pivu su promjena pH vrijednosti zbog nastajanja mliječne kiseline i loš okus (*S. lactis*) te potpuno kvarenje piva (*P. cerevisiphilus* i *M. cerevisiae*).

c) Obligatno štetni mikroorganizmi

Obligatno štetni mikroorganizmi su imuni na odsustvo kisika i niske pH vrijednosti. Njihov rast, razmnožavanje i proizvodi metabolizma također izazivaju promjenu okusa i mirisa piva, a ako se razviju u većem broju, nakon dovoljno dugo vremena tvore talog i zamućuju pivo. Najčešće su to mliječno kisele bakterije iz roda *Lactobacillus*, kao što su *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. frigidus* te *Pediococcus damnosus*. Mogu se naći i stanice različitih kvasaca koje izazivaju promjenu okusa, pojavu zamućenja i taloga. Često su to stanice pivskog kvasca zaostale u pivu nakon filtracije, zatim stanice "divljih" kvasaca iz roda *Saccharomyces* te stanice drugih rodova kvasaca, kao npr: *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Hansenula* i *Candida* (Marić, 2009).

2.3.1. Kvasci u pivu

2.3.1.1. Kvasci

Kvasci su jednostanične, jednojezgrene, mikroskopske, fakultativno anaerobne nemicelijske gljivice čija se morfologija razlikuje od morfologije ostalih gljiva. Osnovna stanica kvasca je blastospora (blastokonidija). Razmnožavaju se nespolnim načinom, tj. pupanjem, ali i spolnim načinom, odnosno spolno nastalim sporama. Prema obliku stanice mogu biti kuglastog, jajolikog ili izduženog oblika, a veličina (promjer) pojedinačnih stanica je obično između 5 i 8 µm. Neki pleomorfni kvasci tijekom svojeg rasta u anaerobnim uvjetima tvore izdužene stanice slične hifama plijesni, nazvane pseudohifama, koje umrežene čine strukturu koju nazivamo pseudomicelij. Kvasci rastu u širokom rasponu pH vrijednosti, a također i u prisutnosti više od 50 % saharoze u podlozi. U mikroskopskom preparatu obojenom Gramovim postupkom se oboje plavo, pa se kvasci ubrajaju u gram-pozitivne mikroorganizme. U životnom ciklusu kvasca karakteristična je izmjena spolnog i nespolnog oblika razmnožavanja. Nespolno razmnožavanje pupanjem stanice kvasca može uslijediti na jednom, dva ili na više mjesta. Spolnim razmnožavanjem stvaraju se najčešće četiri ili više nepokretnih spora nazvanih askospore. Naziv su dobile po askusu, tvorevini nalik na vrećicu u kojoj su nastale. Do danas je poznato oko 1500 vrsta kvasaca svrstanih u skupine *Ascomycetes* i *Basidiomycetes* (Hajsig i Delaš, 2016).

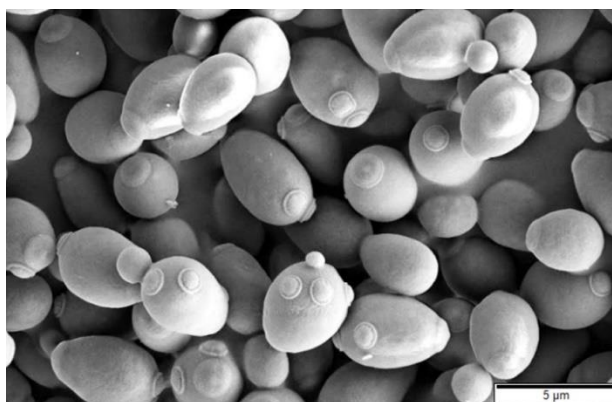
2.3.1.2. Primjena kvasaca u proizvodnji piva

Kvasci su mikroorganizmi koji imaju široku primjenu u industriji. Koriste se od davnina u tradicionalnoj proizvodnji vina, piva, alkoholnih pića i pekarskih proizvoda. Osim u

biotehnologiji, koriste se i u prehrambenoj industriji, kao dodatak prehrambenim proizvodima, najčešće kao pekarski kvasac ili osušena biomasa. Kvasac je vrlo zanimljiv i za temeljna znanstvena istraživanja, a jeftin je i lako dostupan mikroorganizam. Danas se različiti kvasci, najčešće selektirani i konstruirani metodama genetičkog inženjerstva, koriste i u farmaceutskoj proizvodnji novih lijekova (Grba, 2010).

2.3.1.3. Rod *Saccharomyces*

Kvasci iz roda *Saccharomyces* su vjerojatno najstariji komercijalno upotrebljavani mikroorganizmi i vrlo se često upotrebljavaju u proizvodnji hrane i pića. Najpoznatiji kvasac iz roda *Saccharomyces* je vrsta *S. cerevisiae* (slika 1), čiji se sojevi upotrebljavaju u proizvodnji vina, piva, kruha i jakih alkoholnih pića. Njegovo svojstvo visoke fermentacijske aktivnosti i dobro podnošenje različitih ekstremnih uvjeta okoline, prisutnih u industrijskim pogonima, dovelo je do selekcije nekoliko stotina sojeva s poznatim karakteristikama. U zadnjih nekoliko desetljeća *S. cerevisiae* se koristi i za proizvodnju lijekova, primjerice inzulina. Vrsta *S. cerevisiae* uključena je u grupu *Saccharomyces sensu stricto* kvasaca. Grupa se sastoji od osam vrsta: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* i *S. paradoxus*. Porijeklo kvasaca u fermentacijskim procesima još uvijek je nepoznato pa postoje brojne teorije. Pojedini istraživači tvrde da se ti mikroorganizmi nalaze na površini voća ili žitarica te u vrijeme fermentacijskih procesa prelaze u hranjivu podlogu, dok drugi tvrde da je *S. cerevisiae* „udomljena“ vrsta koja je prisutna samo tamo gdje je zabilježeno djelovanje čovjeka. Prema najnovijim spoznajama obje pretpostavke su točne (Grba, 2010).



Slika 1. Mikroskopska slika kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymous 1, 2021)

Vrste iz roda *Saccharomyces* posjeduju vrlo značajne fiziološke karakteristike koje im omogućuju primjenu u biotehnološkim procesima jer brzo fermentiraju šećere u prisustvu i

odsustvu kisika, kako bi proizvele etanol. To im svojstvo omogućuje da se prilagode na supstrate bogate šećerom i izvrše alkoholno vrenje (Mortimer, 2000).

2.3.1.4. Podjela „divljih“ kvasaca

Gilliland (1967) je podijelio „divlje“ kvasce u četiri skupine: fermentativni kvasci, kvasci ubojice („killer“ kvasci), proizvodni kvasci i aerobni kvasci (Grba, 2010).

a) Fermentativni kvasci su pripadnici rodova *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces*, koji imaju slične biokemijske osobine i mogu rasti zajedno sa *S. cerevisiae*. Međutim, „divlji“ sojevi iz roda *Saccharomyces* rastu brže od proizvodnog soja, jer brže koriste hranjive sastojke iz sladovine, a imaju i manje zahtjeve za vitaminima, pa njihov broj može brzo nadmašiti broj stanica proizvodnog kvasca. Kako je sposobnost flokulacije, odnosno sedimentacije stanica, jedno od najvažnijih svojstava pivskog kvasca, a „divlji“ kvasci nisu flokulentni, pivo kontaminirano „divljim“ kvascem ostaje mutno i nakon dugog odležavanja jer se stanice „divljih“ kvasaca nisu istaložile u konusno dno fermentora. Nadalje, pivski kvasac rijetko sporulira, a „divlji“ kvasci vrlo često. Zbog toga njihove spore zaostaju u pivu i nakon pasterizacije pošto su otporne na povišene temperature (Grba, 2010).

b) Kvasci ubojice su ekstremni oblici mikrobioloških kontaminanata, jer u okoliš izlučuju različite proteine, zvane zimocini, koji inaktiviraju osjetljiv radni soj kultiviranog kvasca, pa nakon određenog vremena postaju dominantni u mladom pivu. Takvo pivo ima loš okus i neugodan miris, a konačni stupanj prevrenja mu je nizak. Ti kvasci pripadaju rodu *Saccharomyces*, pa se često ne može ustanoviti prisutnost sve dok ne postanu dominantnom kulturom. Međutim, njihova prisutnost na neselektivnim podlogama može se odrediti samo na bazi različite morfologije i boje kolonija (Grba, 2010).

c) Proizvodni kvasci. U proizvodnji piva obično se koristi jedan ili više specifičnih sojeva čiste kulture pivskog kvasca. Kada se proizvodi više vrsta piva postoji opasnost od pogreške naciepljivanja krivog soja kvasca. Takve pogreške treba izbjegavati, jer brzina vrenja, prevrelost, sposobnost flokulacije, vrsta i udio sastojaka o kojima ovisi okus i miris piva te nastajanje pjene su važna svojstva pojedinačnih sojeva. Stoga je nužno povremeno provjeravati svaki soj pomoću brzih testova ili genetskih proba, da bi se ustanovio njihov identitet (Grba, 2010).

d) Aerobni kvasci. Kvasci iz roda *Pichia*, posebice *P. membranaefaciens*, najčešći su aerobni nefermentativni (ili vrlo rijetko fermentativni) kvasci koji kontaminiraju pivo. Iako se ti kvasci smatraju aerobnim mikroorganizmima, u sladovini mogu rasti u potpuno anaerobnim uvjetima. No, u mladom pivu, koje sadrži organske kiseline i etanol, ne mogu rasti anaerobno. Rodovi *Brettanomyces* i *Dekkera* proizvode octenu kiselinu i izazivaju zamućenje piva ali su važan sastojak kvašćeve flore pri vrenju belgijskih Lambic piva.. Tijekom rasta potreban im je kisik, stoga ukoliko postoji dodir piva sa zrakom, mogu rasti u pivu tijekom odležavanja. Ukoliko se ne inaktiviraju pasterizacijom ili se ne uklone filtracijom mogu rasti i u pivu u ambalaži. Osim navedenih, u pivu u aerobnim uvjetima se mogu pronaći i pripadnici rodova *Debaromyces*, *Filobasidium* i *Pichia*, te *Candida*. Ti rodovi izazivaju zamućenje, pojavu pahuljica ili taloga te ponekad stvaraju pokožicu ili „film“ na površini piva (Grba, 2010).

2.3.2. Bakterije u pivu

Bakterijska se populacija u pivovari mijenja tijekom tehnološkog postupka, od početka proizvodnje sladovine do gotovog piva otočenog u boce ili bačve.

2.3.2.1. Gram - pozitivne bakterije

Tipični predstavnici gram-pozitivnih bakterija su bakterije mliječne kiseline (BMK), u obliku štapića i koka, najčešće iz rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Priest i Campbell, 1996). One pivu smanjuju pH i povećavaju koncentraciju hlapljivih organskih kiselina.

Bakterije iz roda *Lactobacillus* imaju striktno fermentativan metabolizam, ne sporuliraju i štapićastog su oblika. One su mikroaerofili, dakle anaerobi koji toleriraju prisutnost kisika. Vrste se razlikuju prema načinu na koji metaboliziraju šećere, a glavni proizvod metabolizma je mliječna kiselina. Najčešći kontaminant piva je *L. brevis*, bakterija otporna na mikrobicidno djelovanje kolupulona i *trans*-humulona koji su sastavni dio hmelja. Ova vrsta prilagodila se promjenom metabolizma i sastavom stanične stijenke. *L. brevis* ima veću razinu lipoteikoične kiseline u staničnoj stijenci i promijenjen sastav i fluidnost unutarnje membrane. Također postoje promjene enzima koji sudjeluju u metabolizmu arginina. Otpornost *L. brevis* na hmelj je osobina, na koju utječe više čimbenika, a neki od tih čimbenika su otpornost na niski pH i visoki udio etanola, stoga se *L. brevis* može naći kao kontaminant piva (Behr i sur., 2006). Laktobacili mogu rasti pri 30 °C i pH 4 - 5. Ostali laktobacili koji se mogu naći u pivu su: *L. lindneri*, *L. delbrueckii*, *L. fructivorans*, *L. fermentum*, *L. oryzaeformis* i *L. plantarum*. Kvarenje ima za posljedicu pojavu blage mutnoće, ali se prije toga javlja okus i miris na

užegnuti maslac, kao posljedica nastalog diacetila. Back (1982) smatra da treba izbjeći i najmanju prisutnost laktobacila u pivu te da rast laktobacila u pivu ovisi o vrsti piva, iako još uvijek nije pronađena korelacija između analitičkih parametara (pH, ekstrakt u osnovnoj sladovini, koncentracija dušika i amino dušika, količine fermentabilnih šećera) i sposobnosti laktobacila da se razmnožavaju (Marić, 2009).

Bakterije iz roda *Pediococcus* su kugličastog oblika, a pojavljuju se u obliku parova ili tetrada. U pivarstvu su poznati pod imenom „sarcina“. Najčešći pediokok pronađen u pivu, ali ne i na sirovinama za proizvodnju piva je *P. damnosus*. Ova se vrsta u pivu može i razmnožavati jer ga za razliku od većine vrsta iz ovog roda ne inhibira nizak pH i otporan je na antiseptična svojstva sastojaka hmelja. Pediokoki su homofermentativne bakterije koje glikolizom proizvode mliječnu kiselinu zbog čega pivo dobiva okus po maslacu. *P. damnosus* može povećati udio diacetila u pivu napunjenom u ambalažu (Marić, 2009).

2.3.2.2. Gram - negativne bakterije

Pojava gram-negativnih bakterija izrazito je nepoželjna u proizvodnji piva. Tipičan predstavnik su bakterije octene kiseline. One oksidiraju etanol u octenu kiselinu i na taj način kvare pivo. Podijeljene su u 2 roda: *Acetobacter* i *Gluconobacter*.

A. pasterianus je tipični predstavnik kontaminanta koji pripada ovoj skupini. Bakterije octene kiseline su obligatni aerobi pa ne mogu rasti u pivu dok vladaju anaerobni uvjeti, međutim, otporne su na bakteriostatička svojstva hmelja, organskih kiselina i alkohola. Istraživanja su pokazala da su sojevi pronađeni u pivu vjerojatno mikroaerofili jer su izolirani iz piva s malom koncentracijom kisika. U pivu izazivaju kiseo, neugodan okus i zamućenje piva kao posljedicu oksidacije polialkohola, kao što je glicerol, sve do dihidroksiacetona. Na površini piva može se pojaviti pokožica koja upućuje na zamućenje. Kontaminacija piva ovisi o vrsti i soju bakterije te koncentraciji alkohola, a kontaminirano pivo ima miris po pastirnjaku (Beluhan, 2015).

Porodica *Enterobacteriaceae* sadrži velik broj rodova koji se mogu naći u pivu poput: *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klyvera*. Neke vrste su nepatogene, dok su neke patogene za čovjeka, životinje, insekte i biljke. Enterobakterije su nesporogene, fakultativne anaerobne bakterije štapićastog oblika koje značajno utječu na okus i aromu piva. U porodicu *Enterobacteriaceae* pripadaju i koliformne bakterije. One se

uobičajeno koriste kao bakterijski indikatori higijenske kvalitete hrane, vode i različitih površina. Primarno su apatogene i normalno obitavaju u debelom crijevu čovjeka i životinja, gdje su odgovorne za pravilnu probavu hrane, a iz organizma se izlučuju fekalijama (Ray, 2004). Ako iz debelog crijeva dospiju u druge dijelove probavnog trakta, ili u urinarni trakt ili krv, mogu uzrokovati infekcije kod čovjeka, stoga su potencijalni patogeni. Uključuju vrstu *Escherichia coli* i srodne vrste rodova *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella* (Bay i sur., 1994). Dokazivanje koliformnih bakterija može se raditi na MacConkeyevom agaru gdje fermentiraju laktozu u organsku kiselinu i CO₂ (Hajsig i Delaš, 2016). Prisutnost ovih bakterija uzrokuje pojavu slatkog okusa, fenolnog mirisa, mirisa na celer i kuhani kupus te mijenja aromu piva (Beluhan, 2015).

Osim navedenih, striktno anaerobne gram–negativne bakterije, ukoliko se nađu u pivu, izazivaju kvarenje piva u ambalaži, jer proizvode značajne količine octene i propionske kiseline te acetoina. Pivo dobiva okus po pokvarenim jajima (Van Vuuren, 1996). Rod *Zymomonas* tipičan je predstavnik anaerobnih bakterija, a čije vrste mogu rasti u prisutnosti visokih koncentracija etanola, do 15 % vol. Vrste iz roda *Megasphaera* proizvode značajne količine maslačne kiseline i smatraju se opasnim kontaminantom piva, a mogu se naći u zamućenom i pivu napunjenom u ambalažu. (Marić, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci piva

Za mikrobiološke te fizikalno-kemijske analize korišteno je 11 različitih vrsta piva (tablica 1). Brojevima od 1 do 6 označeni su uzorci različitih vrsta piva hrvatskih industrijskih pivovara, a brojevima od 7 do 11 označene su različite vrste piva malih (engl. *craft*) hrvatskih pivovara. Pivo industrijskih pivovara komercijalno je dostupno, a pivo malih pivovara uzorkovano je u razdoblju od 01.02.2020. do 15.02.2020.

Tablica 1. Vrste i osnovne značajke korištenih piva

Broj uzorka	Vrsta piva	% alkohola	Značajke
1	Svijetlo pivo, India Pale Ale	6,5 %	Nefiltrirano
2	Svijetlo pivo, American Blonde Ale	5,3 %	Nefiltrirano, nepasterizirano
3	Svijetlo pilsner pivo	4,5 %	/
4	Tamno pšenično pivo	5,4 %	/
5	Rezano lager pivo	5,9 %	/
6	Svijetlo lager pivo	5,0 %	Nefiltrirano
7	Svijetlo lager pivo	4,5 %	Nefiltrirano, nepasterizirano
8	Svijetlo lager pivo	4,5 %	Nefiltrirano, nepasterizirano
9	Svijetlo lager pivo	4,5 %	Nefiltrirano, nepasterizirano
10	Tamno lager pivo	5,5 %	Nefiltrirano, nepasterizirano
11	Svijetlo lager pivo	7,5 %	Nefiltrirano, nepasterizirano

3.1.2. Hranjive podloge

Sastavi hranjivih podloga korištenih u eksperimentima prikazani su u tablicama 2, 3, 4, 6, 7 i 8.

- a) UBA (Universal Beer Agar) - hranjiva podloga za uzgoj ukupnih mikroorganizama

Tablica 2. Sastav UBA (Universal Beer Agar) krute hranjive podloge, Sigma – Aldrich

Sastojak	g L ⁻¹
Agar	12,0
Dekstroza	16,1
Kalijev hidrogenfosfat	0,31
Željezov sulfat	0,006
Magnezijev sulfat	0,12
Manganov sulfat	0,006
Kalijev dihidrogenfosfat	0,31
Pepton	15,0
Natrijev klorid	0,006
Sok od rajčice	12,2
Kvašćev ekstrakt	6,1

pH vrijednost podloge iznosi 6,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta. Universal Beer Agar je podloga svijetlo žute boje koja se koristi za neselektivni uzgoj mikroorganizama važnih u pivskoj (engl. *brewing*) industriji. U aerobnim uvjetima na podlozi će izrasti sve aerobne bakterije i kvasci, primjerice bakterije iz roda *Acinetobacter*, dok će pri anaerobnim uvjetima izrasti sve anaerobne bakterije, primjerice iz rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Zymomonas spp.*

b) SDA (Schwarz Differential Agar) - hranjiva podloga za uzgoj kvasaca

Tablica 3. Sastav SDA (Schwarz Differential Agar) krute hranjive podloge, Sigma – Aldrich

Sastojak	g L ⁻¹
Pepton A	5,0
Kvašćev ekstrakt	3,0
Sladni ekstrakt	3,0
Dekstroza	10,0
Osnovni fuksin	0,47
Natrijev sulfat	2,92
Dekstrin	0,11
Agar	20,0

pH vrijednost podloge iznosi 6,9, a sterilizacija se provodi zagrijavanjem na 100 °C na miješalici 15 minuta dok se ne otopi agar. Schwarz Differential Agar (SDA) je selektivna podloga boje ciklame, a koristi se u pivskoj industriji za razlikovanje „divljih“ od sorti pivskog kvasca koji se koriste za proizvodnju piva. Na SDA podlozi „divlji“ kvasci rastu u obliku ružičastih kolonija koje mogu biti glatke, naborane ili mukoidne. Dok je rast pivskih kvasaca vidljiv kao tanki magloviti sloj mikro kolonije koje bojom nalikuju podlozi.

- *Candida albicans* - bijele do svijetlo roze kolonije,
- *Candida krusei* - roze, hrapave, ravne kolonije,
- *Saccharomyces cerevisiae* - roze kolonije.

c) MCC (MacConkey Agar No.3) - hranjiva podloga za uzgoj koliformnih bakterija

Tablica 4. Sastav MCC (MacConkey Agar No.3) krute hranjive podloge, OXOID

Sastojak	g L ⁻¹
Pepton	20,0
Laktoza	10,0
Žučne soli No. 3	1,5
Natrijev klorid	5,0
Neutral red	0,03
Kristal violet	0,001
Agar	15,0

pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta. MacConkey agar je diferencijalan medij svijetlo ružičaste boje. Služi za izolaciju i diferencijaciju gram-negativnih bakterija rodova *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas*. Ovaj se selektivni agar koristi i za izolaciju *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* te koliformnih bakterija iz fecesa, urina, namirnica, otpadne vode i dr. (tablica 5). Djeluje na način da žučne soli i kristal violet snažno inhibiraju rast gram-pozitivne mikroflore. Laktoza i pH indikator, neutralno crvenilo, upotrebljavaju se radi dokazivanja razgradnje laktoze. Laktoza-negativne kolonije su bezbojne, dok su laktoza-pozitivne kolonije crveno obojene i okružene mutnom zonom, što nastaje precipitacijom žučnih soli kao rezultat snižavanja pH vrijednosti podloge.

Tablica 5. Opis kolonija pojedinih vrsta koje rastu na MCC hranjivoj podlozi

Izgled kolonije	Vrsta bakterije
Bezbojne, prozirne	<i>Salmonella, Shigella..</i>
Velike, crvene, okružene zonom	<i>Escherichia coli</i>
Velike, crvene, mukozne	<i>Enterobacter, Klesbsiella</i>
Sitne, izolirane, neprozirne	<i>Enterococci, Staphylococci..</i>

d) Hranjiva podloga za uzgoj kvasca iz roda *Brettanomyces*

Tablica 6. Sastav *Brettanomyces* tekuće hranjive podloge, Sigma - Aldrich

Sastojak	g L ⁻¹
Dekstroza	10,0
Pepton	5,0
Sladni ekstrakt	3,0
Kvašćev ekstrakt	3,0
Tiamin	0,01
Kloramfenikol	0,1
Cikloheksimid	0,1
Gentomicin	0,05
Klorotetraciklin	0,1

pH vrijednost podloge iznosi 3,5, a medij je sterilan. *Brettanomyces* selektivni medij se koristi za testiranje vina i piva na vrstu kvasaca, *Brettanomyces spp.* To je žuti tekući medij pakiran u ampule. Rast *Brettanomyces spp.* u ovom mediju karakterizira pojava zamućenja. Ovi kvasci proizvode octenu kiselinu i izazivaju zamućenje piva, a koriste se u proizvodnji Lambic piva.

- e) WLD (Wallerstein Differential Agar) - hranjiva podloga za uzgoj bakterija koje proizvode organske kiseline

Tablica 7. Sastav WLD (Wallerstein Differential Agar) krute hranjive podloge,
Sigma – Aldrich

Sastojak	g L ⁻¹
Aktidion (cikloheksimid)	0,004
Agar	20,0
Bromkrezol zeleno	0,022
Kalcijev klorid	0,125
Kazein - enzimski hidrolizat	5,0
Dekstroza	50,0
Željezov klorid	0,0025
Magnezijev sulfat	0,125
Manganov sulfat	0,0025
Kalijev dihidrogenfosfat	0,55
Kalijev klorid	0,425
Kvašćev ekstrakt	4,0

pH vrijednost podloge iznosi 5,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta. Wallerstein Differential Agar podloga se koristi za selektivnu izolaciju i enumeraciju bakterija u pivovarama i industrijskoj fermentaciji. Podloga je plavo – zelene boje. Na podlozi pri aerobnim uvjetima rastu bakterije octene kiseline, *Flavobacterium* vrste, *Proteus* vrste i termofilne bakterije. Dok pri anaerobnim uvjetima rastu bakterije mliječne kiseline i bakterije iz roda *Pediococcus*. Na podlozi ne mogu rasti „divlji“ kvasci ni plijesni zbog dodanog kaptana. Sadrži pH indikator bromkrezol zeleno koji mijenja boju u žutu ukoliko bakterija proizvodi organske kiseline i snižava pH podloge.

- f) NBB (NBB-PCR Bouillon) - hranjiva podloga za obogaćivanje bakterija u uzorku piva

NBB je tekuća hranjiva podloga, Döhler Microsafety Design, kataloški broj: 710-1976. Sastav podloge je zaštićen, pH vrijednost iznosi 5,7, a medij je sterilan.

- g) YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose Broth) - hranjiva podloga za obogaćivanje kvasaca

Tablica 8. Sastav YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose Broth) tekuće hranjive podloge, Sigma - Aldrich

Sastojak	g L ⁻¹
Pepton	20
Dekstroza	20
Kvašćev ekstrakt	10

pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.

3.1.3. Laboratorijski uređaji

- Mikroskop, MICROS, Austrija
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlera, Španjolska
- Magnetna miješalica, Thermo Scientific, SAD
- Autoklav, Tuttnauer Europe BV 3870 ELVD, Nizozemska
- Mini centrifuga, LLG - uniCFUGE 3, LLG – Labware, Njemačka
- Mini centrifuga, MySpin 12, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Kabinet s laminarnim strujanjem zraka, EuroClone Spa, Italija
- Uređaj za uklanjanje statičkog elektriciteta, Stat - Pen, Sartorius Stedim Biotech, Njemačka
- Inkubator s miješalicom, Certomat T plus, Sartorius Stedim Biotech, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo XPE205, Delta Range, SAD
- Stolna miješalica, Koncept media, Hrvatska
- Stolni pH – metar, Mettler Toledo, SAD
- UV-Vis Spektrofotometar, NanoDrop One/OneC, Thermo Fisher Scientific, SAD

- Instrument za PCR, SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Uređaj za elektroforezu, OmniPAC Midi CS - 300V, Cleaver Scientific, UK
- UV Transiluminator, UVITEC Cambridge , UK
- Inkubator s miješalicom, Digital Heating Shaking Drybath, Thermo Fisher Scientific, SAD
- UV-Vis Spektrofotometar, Cary 100 UV-Vis spektrofotometar, Agilent Technologies, SAD
- Inkubator, AccuBlock™ Digital Dry Baths, Labnet International, SAD
- Termostat, POL-EKO aparatura, Poljska

3.1.4. Laboratorijski pribor

- Špatula
- Pinceta
- Automatske pipete
- Nastavci za automatske pipete (0,1-1000 µL)
- Staklena čaša (50 mL, 250 mL, 1000 mL)
- Štapić po Drigalskom
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice
- Erlenmeyerove tikvice (50 mL, 100 mL, 250 mL)
- Staklene boce s čepom na navoj (250 mL, 500 mL)
- Plastične epruvete, sterilne (50 mL, Falcon)
- Plastične tubice (1,5 mL, Eppendorf)
- Staklene pipete (1-10 mL)
- PCR mikrotubice
- Mikrotubica s filterom za pročišćavanje tijekom izolacije DNA
- Stalak za plastične tubice
- Stalak za PCR mikrotubice
- Kivete za spektrofotometar
- Stalak za kivete
- Vrećice za anaeroban uzgoj, AnaeroGen W-Zip COMPACT, OXOID AGS atmosphere generation system

- Komercijalni paket za anaerobni uzgoj, AnaeroGen™ Compact, Thermo Fisher Scientific
- Kadica za elektroforezu
- Češljíci za elektroforezu
- Staklene kuglice

3.1.5. Kemikalije

- Agaroz, Sigma-Aldrich A9539
- 2-log DNA ladder, New England Biolabs (0.1-10.0kb)
- Gel Loading Dye Purple (6x), no SDS, New England Biolabs
- GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in water, Biotium
- 1x PBS pufer
- 1x TAE (Tris-acetat-EDTA) pufer
- Ultra čista voda
- Izooktan (2,2,4-trimetilpentan), Merck
- Klorovodična kiselina, Sigma, SAD
- Set za izolaciju DNA, GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific
 - Otopina za digestiju
 - Otopina za liziranje
 - Pufer za ispiranje I
 - Pufer za ispiranje II
 - Pufer za eluiranje
- DNA *Saccharomyces* var. *diastaticus*
- DNA kvasca Fermoale AY4
- One Taq Hot Start Quick-Load DNA polimeraza, New England Biolabs
- Voda bez nukleaza za PCR, New England Biolabs
- DNA *Lactobacillus brevis*, 12 ng μL^{-1}
- DNA *Lactobacillus lindneri*, 12 ng μL^{-1}

Tablica 9. Sekvence uzvodnih i nizvodnih početnica za vrste *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus damnosus*, *Acetobacter pasterianus*. Matična otopina početnica sadržavala je par početnica (uzvodne i nizvodne) za pojedinu vrstu, obje početnice koncentracije 5μM u ultračistoj vodi

Vrsta bakterije	Sekvenca uzvodne početnice	Sekvenca nizvodne početnice
<i>Lactobacillus brevis</i>	CTT GCA CTG ATT TTA ACA	GGG CGG TGT GTA CAA GGC
<i>Lactobacillus lindneri</i>	ACG GTG TGA CGG TAT CTA AC	GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA
<i>Acetobacter pasterianus</i>	GTT TGT TTC CCG CAA GGG AC	TGC AGA GTG CAA TCC GAA
<i>Pediococcus damnosus</i>	ATA CAT GCA AGT CGG ACG CA	TGT CTC AGT CCC AAT GTG GC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	CCA TCT TCA ACT CCA TTC AGC TCT G	GAT GGT GAC GCA ATC ACG A
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CTT CGG TGA TGA CTG TGG GA	CCT GGT AAG GTT CTT CGC GT

3.1.6. Otopine

- Gramova otopina kristal violet, Merck
- Lugolova otopina za stabilizaciju, Merck
- Gramova otopina za odstranjivanje boje, Merck
- Gramova Safranin otopina, Merck

3.1.7. Programi

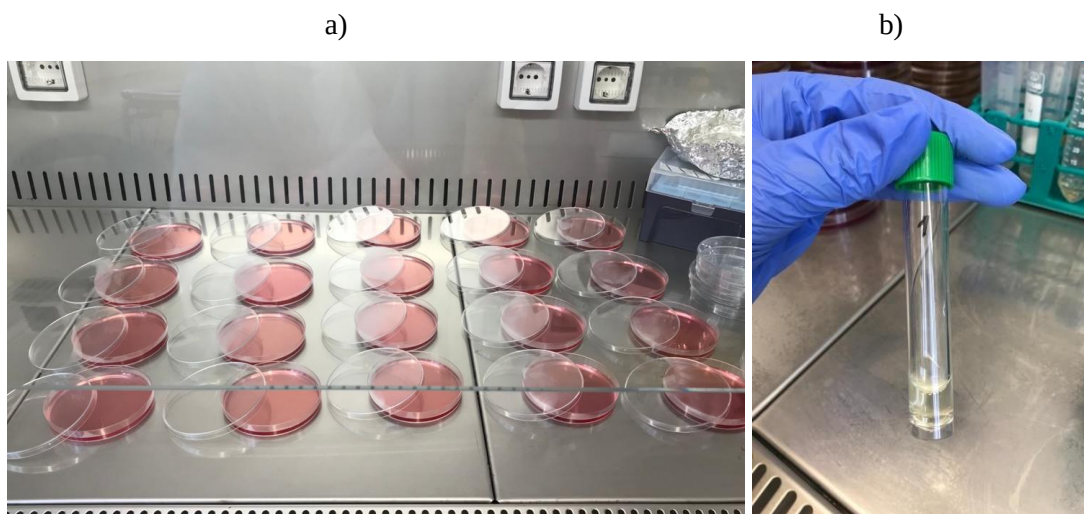
- Fiji – ImageJ, program za obradu slika, korišten za brojanje kolonija poraslih na hranjivim podlogama
- Microvisible, program pomoću kojeg se slika vidljiva mikroskopom prikaže na računalu
- Cary WinUV, program spektrofotometra

3.2. METODE RADA

U ovom poglavlju opisani su svi postupci potrebni za provođenje mikrobioloških analiza te određivanje fizikalno-kemijskih parametara piva. Opisani su koraci, od pripreme uzoraka do obrade podataka.

3.2.1. Priprema selektivnih hranjivih podloga

Sastojke selektivnih hranjivih podloga za pripremu 1 L određene podloge izvagati u staklenu čašu, a potom dodati 1 L destilirane vode. U staklenu čašu dodati magnet te čašu staviti na magnetsku miješalicu i zagrijavati do vrenja. Potom hranjivu podlogu prebaciti u staklene boce s navojnim čepom i sterilizirati 30 minuta pri 121 °C. Nakon sterilizacije, još tekuću podlogu izliti u aseptičnim uvjetima u laminaru u Petrijeve zdjelice (slika 2a). Na ovaj način pripremljene su sljedeće hranjive podloge: Universal Beer Agar (UBA), MacConkey Agar (MCC), Schwarz Differential Agar (SDA), Wallerstein Differential Agar (WLD). *Brettanomyces* selektivni medij je komercijalno dostupan gotov tekući medij kojeg je potrebno samo preliti iz ampule u epruvetu za uzgoj (slika 2b)



Slika 2. (a) Izlivene MacConkey hranjive podloge u Petrijeve zdjelice i (b) tekući *Brettanomyces* selektivni medij (vlastita fotografija)

3.2.2. Priprema uzoraka piva

Proces pripreme uzorka počinje temperiranjem, homogenizacijom i degaziranjem piva. Degaziranje se provodi na način da se pivo sobne temperature miješa na magnetnoj miješalici u Erlenmeyerovoj tikvici sve dok se sav CO₂ ne ukloni iz uzorka. Ovako pripremljeno pivo

nacijepiti na selektivne hranjive podloge, i u medije za obogaćivanje koje prethodi PCR analizi te služi za provođenje fizikalno-kemijskih ispitivanja.

3.2.3. Nacjepljivanje hranjivih podloga

50 mL degaziranog piva preliti u sterilne epruvete od 50 mL i centrifugirati 10 minuta na 10000 x g. Nakon centrifugiranja polagano odliti gotovo sav supernatant kako bi se sačuvao talog (oko 200 µL zaostane na stijenkama epruvete), koji ponekad nije vidljiv prostim okom. Na talog dodati 4800 µL sterilnog 1 x PBS pufera i resuspendirati talog. Ovim postupkom ukupan volumen smanjen je na 5 mL, što je koncentriranje početnog uzorak od 10 x.

100 µL pripremljenog uzoraka nacijepiti na svaku od podloga: WLD, UBA, SDA i MCC. Svaki uzorak treba nacijepiti u triplicatu na svaku selektivnu podlogu. Na selektivne hranjive podloge WLD i UBA uzorke treba nacijepiti još jednom u triplicatu, jer podloge treba staviti u vrećice za anaerobni uzgoj i provjeriti rast anaerobnih mikroorganizama.

Nanijeti 100 µL suspenzije na hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici te sterilnim štapićem u obliku slova L (Drigalskijev štapić) ravnomjerno rasporediti suspenziju po podlozi. Potom podlogu prosušiti desetak minuta u laminaru te ju okrenuti kako bi se spriječila kondenzacija i staviti u inkubator na 29 °C. Podloge na kojima će se pratiti anaerobni rast staviti u vrećice za anaerobni uzgoj prema uputama proizvođača te potom staviti u inkubator na 29 °C (slika 3). Osim nasađivanja na podloge, 100 µL suspenzije potrebno je nacijepiti i u *Brettanomyces* selektivni medij kojeg treba preliti iz ampula u sterilne epruvete za uzgoj (slika 2b), a epruvete staviti u termostatiranu miješalicu pri 29 °C i 200 okretaja min⁻¹.

Ovisno o vrsti podloge i mikroorganizmima čiji rast podloga podržava, hranjive podloge inkubirati 1-7 dana, a potom prebrojati porasle kolonije.



Slika 3. Nacijepljene hranjive podloge u inkubatoru. Ploče za aeroban uzgoj su na prve dvije police, a za anaeroban uzgoj su u plastičnim vrećicama na zadnjoj polici (vlastita fotografija)

3.2.4. Brojanje poraslih kolonija

Na čvrstim hranjivim podlogama, tijekom uzgoja u povoljnim uvjetima, od jedne žive bakterijske stanice ili više bakterijskih stanica porast će vidljive nakupine bakterija koje nazivamo kolonijama. Bakterijske kolonije mogu biti različitog oblika, izgleda i boje, što često ovisi o vrsti bakterije ili sastavu podloge na kojoj je uzgojena (Hajsig i Delaš, 2016). Neke bakterije tvore topljive ili netopljive pigmente pa su njihove kolonije obojene. Ako su im proizvedeni pigmenti netopljivi u vodi, obojene će biti samo kolonije, a tvore li topljive pigmente obojena će biti i njihova okolina. Mnoge bakterije prirodno ne stvaraju pigmente, ali njihove kolonije mogu biti obojene pri uzgoju na diferencijalnim podlogama. Primjerice, to može biti posljedica redukcije nekog spoja sadržanog u podlozi (Hajsig i Delaš, 2016).

Kolonije se mogu brojati ručno ili koristeći program ImageJ. Ova se metoda neizravnog određivanja broja stanica zasniva na pretpostavci da će iz svake žive stanice, odnosno nakupine stanica (engl. *colony forming unit*, *CFU*), porasti jedna kolonija. Dobivene vrijednosti je potrebno preračunati u CFU mL^{-1} piva. Prednost ovakvog postupka je njegova osjetljivost, a nedostatak što je sporiji od izravnih metoda brojanja i što se može upotrebljavati samo za određivanje onih bakterija koje možemo uzgojiti na odgovarajućoj hranjivoj podlozi.

ImageJ program služi za analizu i obradu fotografija te se koristio za brojanje kolonija na podlogama gdje je broj kolonija bio prevelik za precizno ručno brojanje. Potrebno je

fotografirati podlogu s kolonijama koje se želi prebrojati, zatim fotografiju pretvoriti u 8 - bitnu crno-bijelu fotografiju. Postojećim alatima ImageJ software-a korigirati pozadinsku interferenciju, razdijeliti spojene stanice, fotografiju pretvoriti u 2 - bitnu masku, te prebrojati kolonije kao crne/bijele razdvojene točke na crnoj/bijeloj pozadini. Postoji niz programskih alata kojima se slika može prilagoditi kako bi brojanje bilo što točnije, a na kraju je potrebno vizualno procijeniti je li program zadovoljavajuće pobrojao kolonije.

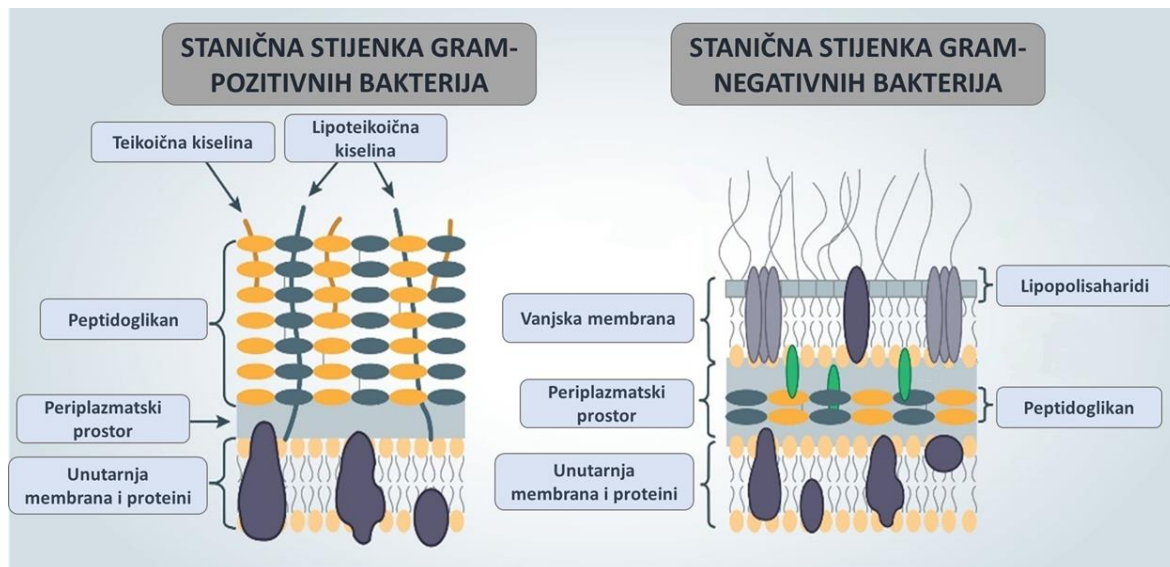
3.2.5. Bojanje po Gramu

Većina mikroorganizama su mikroskopski potpuno bezbojni. Stoga se, radi boljeg opažanja pojedinih dijelova njihovih stanica, poput stanične stijenke, spora, bičeva ili kapsule, te radi njihova razlikovanja, pripremaju obojeni preparati. Metode bojenja se dijele na jednostavna i složena (diferencijalna) bojenja. Upotreba boja u mikrobiologiji počela je u 19. stoljeću upotrebom prirodnih boja (karmin, indigo, tanin), ali su ih ubrzo zamijenile umjetne ili sintetičke, od kojih su većina derivati anilina pa se nazivaju anilinske boje. Boje su najčešće u obliku kristala soli i dijele se na kisele, tj. kationske i bazične, odnosno anionske boje. Molekula boje sadrži dvije osobito važne skupine: kromofornu, koja određuje boju spoja i auksokromnu koja omogućuje vezanje i pojačavanje boje (Hajsig i Delaš, 2016).

Gramovo bojanje je jedno od najvažnijih postupaka složenog bojanja bakterija. Ono je osnova njihove klasifikacije na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Hajsig i Delaš, 2016).

Stanična stijenka bakterija odgovorna je za oblik i zaštitu stanice. Sadrži peptidoglikan, murein, spoj koji joj daje čvrstoću, a sastoji se od lanaca N - acetilglukozamina i N - acetilmuraminske kiseline. Bakterije se, prema udjelu peptidoglikana u staničnoj stijenci (tj. prema razlici u građi stanične stijenke), dijele na dvije velike skupine: gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (slika 4). Gram-pozitivne bakterije sadrže nekoliko slojeva peptidoglikana i teikoične kiseline, dok gram-negativne sadrže vrlo malo peptidoglikana oko kojeg je sloj lipoproteina, lipopolisaharida i fosfolipida. Nakon kristal violet boje, te Lugolove otopine, sve se bakterije oboje ljubičasto - plavo. Međutim, određene bakterije tijekom ispiranja etanolom otpuste boju (odboje se). One se nakon bojenja safraninom (kontrastnim bojilom) oboje crveno. Kod gram-negativnih bakterija se zbog otopljenih lipida u vanjskim slojevima stanične stijenke otpušta taj kompleks boje i joda pa stanice ostaju neobojene i primaju kontrastno bojilo te postaju crvene. Kod gram-pozitivnih bakterija, jod iz Lugolove otopine s bojom kristal violet i

sastojcima u staničnoj stijenci tvori netopljivi kompleks, pa stanice nakon upotrebe sredstva za odstranjivanje boje, kao što je alkohol ili aceton, zadržavaju ljubičasto-plavu boju. Bakterije koje su nakon ispiranja etanolom zadržale ljubičasto - plavu boju, ostaju tako obojene i nakon bojenja safraninom (Hajsig i Delaš, 2016).



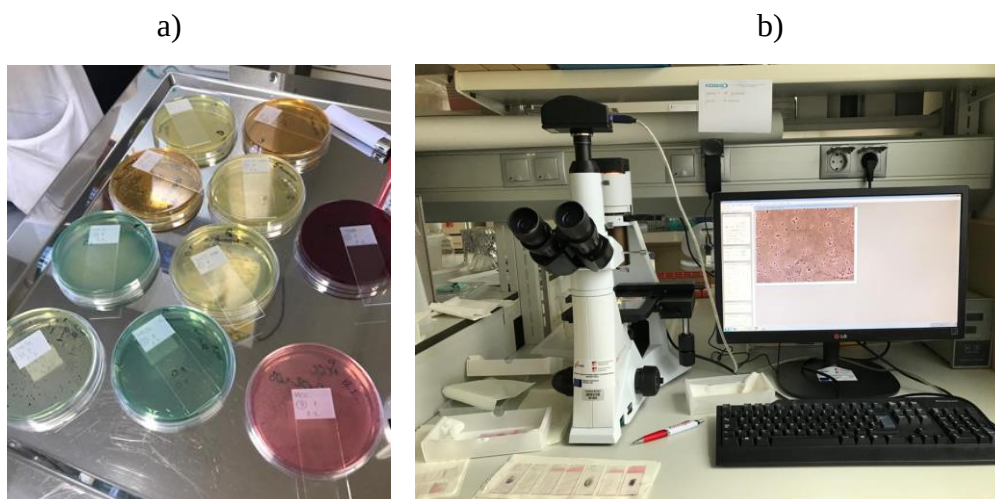
Slika 4. Razlika gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Preuzeto i prilagođeno prema: Anonymous 2, 2020)

Postupak bojanja po Gramu prikazan je na slici 5. Predmetnicu odmastiti pranjem sapunom ili deterdžentom i vodom, obrisati lanenom krpom ili papirnatim ubrusom i osušiti kružnim pokretima provlačenjem kroz plamen. Ohladiti i na središnji dio predmetnice nanijeti kapljicu destilirane vode. Zatim mikrobiološkom ušicom nanijeti uzorak odabrane kolonije u kapljicu vode na predmetnici i resuspendirati. Nakon sušenja na zraku uzorak se fiksira provlačenjem stakalca kroz plamen. Predmetnicu staviti na mjesto pripremljeno za bojanje i pustiti da se malo ohladi. Predmetno staklo potpuno prekriti otopinom boje kristal violet i držati 1 minutu te potom odliti boju. Nakon toga kratko isprati Lugolovom otopinom za stabiliziranje, a onda preparat u potpunosti prekriti Lugolovom otopinom za stabiliziranje i pustiti da djeluje 1 minutu. Zatim pažljivo ispirati otprilike 5 sekundi destiliranom vodom, nakon čega se predmetno stakalce primi drvenom štipaljkom i okreće u otopini za odstranjivanje boje 10 do 15 sekundi sve dok se ne pojavljuju obojani oblici i razmaz ne poprimi sivo - plavu boju. Nakon toga pažljivo ispirati otprilike 5 sekundi destiliranom vodom. Potom je potrebno predmetno staklo u potpunosti prekriti otopinom safranina i ostaviti da djeluje 1 minutu, ispirati predmetnicu destiliranom vodom otprilike 5 sekundi. Na kraju pustiti da se osuši i mikroskopirati. Preparat bakterija obično se promatra pri najvećem povećanju uz upotrebu imerzijskog objektiva i imerzijskog ulja ili anisola. Tijekom mikroskopiranja korišten je

program MICROVISIBLE pomoću kojeg se slika vidljiva na okularu može vidjeti i pohraniti na računalu. Također, program omogućava podešavanje slike, kao što je kontrast, svjetlina, ekspozicija (slika 6).



Slika 5. Slijed postupaka pri Gramovom bojanju (Hajsig i Delaš, 2016)



Slika 6. a) Priprema mikroskopskih preparata i b) mikroskopiranje obojenih preparata (vlastita fotografija)

3.2.6. Izolacija DNA

3.2.6.1. Obogaćivanje uzoraka piva

Kako bi identificirali vrste bakterija i kvasaca prisutne u uzorcima piva, koristi se metoda lančane reakcije polimerazom (PCR), a iz uzoraka je prethodno potrebno izolirati DNA prisutnih mikroorganizama. Uzorak se prije izolacije DNA uzgaja u različitim medijima za

obogaćivanje (npr. NBB i YPD mediji) kako bi se umnožile bakterije i kvasci prisutni u količinama ispod razine detekcije ove metode.

Priprema uzoraka za obogaćivanje:

Uzeti 50 mL degaziranog piva i centrifugirati ga pri 10000 x g tijekom 10 minuta te odiliti supernatant. Dodati 500 µL sterilnog 1 x PBS pufera i resuspendirati talog te opet centrifugirati pri 10000 x g tijekom 10 minuta. Ovaj korak služi za ispiranje taloga. Dobiveni talog resuspendirati u 2 mL medija za obogaćivanje u epruvetama od 50 mL:

- a) YPD - za obogaćivanje kvasaca
- b) NBB - PCR - za obogaćivanje bakterija

Epruvete sa do pola navijenim čepom staviti u inkubator na 29 °C pri brzini miješanja od 200 okretaja min⁻¹. Ostaviti inkubirati tijekom noći.

3.2.6.2. Izolacija genomske DNA iz mikroorganizama

Jedan od načina izolacije genomske DNA iz stanica bakterija, kvasaca, različitih staničnih kultura sisavaca i uzoraka tkiva, kao i krvi je korištenje komercijalnog paketa kemikalija. Ovako izolirana genomska DNA visoke je kakvoće. DNA se izolira upotrebom silika membrane koja se nalazi u koloni za pročišćavanje. Postupak traje manje od 20 minuta nakon liziranja stanica, a prinos pročišćene DNA je veći od 30 kb.

Ovisno o početnom uzorku, uzorak se razgrađuje proteinazom K i otopinom za razgradnju ili liziranje stanice. Potom se dodatkom RNaze A, uklanja RNA iz uzorka. Lizat se zatim miješa s etanolom (koji taloži DNA i proteine) i stavlja na kolonu za pročišćavanje gdje se DNA veže na silika membranu. Nečistoće se zatim uklanjaju ispiranjem kolone sa pripremljenim puferima za ispiranje. Genomska DNA se na kraju eluira ultra čistom vodom ili puferom niske ionske snage.

Postupak izolacije DNA:

Nakon obogaćivanja u YPD ili NBB mediju, 1 mL uzorka centrifugirati 10 minuta na 5000 x g i potom baciti supernatant, a talog zadržati. Resuspendirati talog u 180 µL otopine za digestiju. Zatim dodati 20 µL Proteinaze K i promiješati na stolnoj miješalici kako bi dobili homogenu suspenziju. Uzorak inkubirati pri 56 °C u termostatiranoj miješalici kako bi se stanice lizirale. Dodati 20 µL RNaze A i promiješati na stolnoj miješalici te inkubirati uzorak 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi razgradili RNA. Dodati 200 µL otopine za liziranje i

promiješati na stolnoj miješalici 15 sekundi dok se ne dobije homogena suspenzija. Dodati 400 μL 50 % etanola i promiješati na stolnoj miješalici. Prebaciti pripremljen lizat u kolonu za pročišćavanje umetnutu u mikrotubicu za sakupljanje. Kolonu centrifugirati 1 minutu pri 6000 x g i baciti mikrotubicu za sakupljanje sa sadržajem koji se sada u njoj nalazi. Potom staviti novu mikrotubicu za sakupljanje. Dodati 500 μL pufera za ispiranje s etanolom i centrifugirati 1 minutu pri 8000 x g i odbaciti sadržaj mikrotubice za sakupljanje. Opet dodati 500 μL pufera za ispiranje za etanolom i centrifugirati 3 minute na maksimalnoj brzini ≥ 12000 x g. Odbaciti mikrotubicu za sakupljanje i zamijeniti ju sterilnom 1,5 mL mikrotubicom. Dodati 50 μL pufera za eluiranje, inkubirati 2 minute na sobnoj temperaturi i centrifugirati 1 minutu pri 8000 x g. Baciti purifikacijsku kolonu te pročišćenu DNA odmah koristiti ili pohraniti na -20°C .

Staničnu stijenku kvasca teže je razbiti stoga se stanice kvasaca liziraju cijelu noć, dok za izolaciju bakterijske DNA, liziranje traje 30 minuta. Prilikom izolacije DNA kvasaca potrebno je dodati staklene kuglice na vrh špatule prije inkubacije u termobloku na 56°C . Staklene kuglice čuvaju se u zamrzivaču kako bi se smanjio statički elektricitet. Miješanjem na termostatisanoj miješalici stanice se liziraju. Nakon liziranja stanica, protokol izolacije DNA iz stanica kvasca je isti kao za izolaciju DNA iz stanica bakterija.

3.2.6.3. Određivanje koncentracije genomske DNA

Koncentracija izolirane genomske DNA određuje se spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra (NanoDrop) na koji se nanosi 2 μL uzorka izolirane genomske DNA. Program instrumenta preračunava vrijednost apsorbancije uzorka u odnosu na negativnu kontrolu, te prikazuje koncentraciju DNA izraženu kao $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Pufer za eluiranje koristi se kao negativna kontrola.

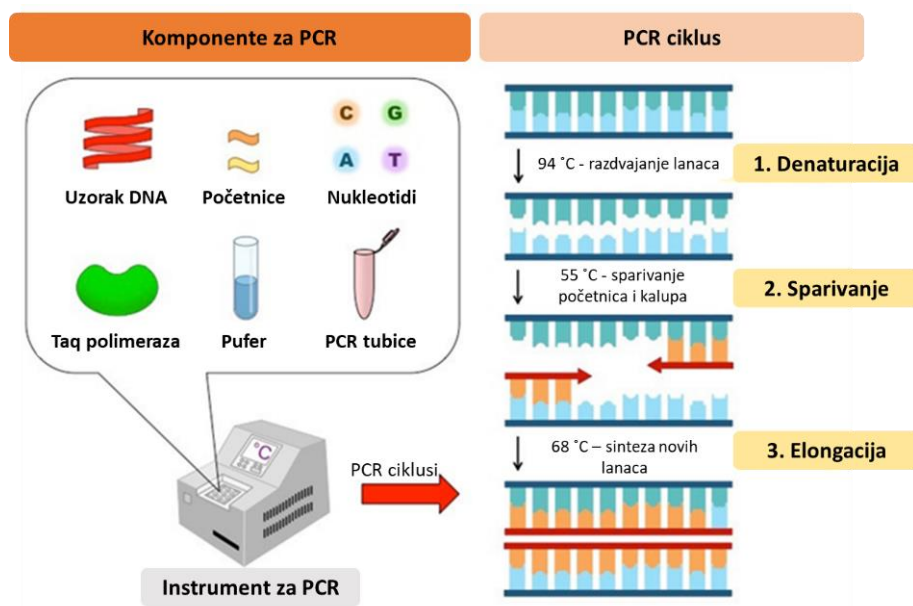
Spektrofotometrijskim mjerenjem nukleinskih kiselina može se odrediti količina DNA, ali i čistoća izolirane DNA. Nukleinske kiseline imaju najveću apsorbanciju pri 260 nm, proteini pri 280 nm, a polisaharidi pri 230 nm. Omjer apsorbancije A_{260}/A_{280} koristi se kao pokazatelj čistoće izolirane DNA, odnosno kao pokazatelj kontaminacije uzorka proteinima. Kada A_{260}/A_{280} iznosi manje od 1,6 smatra se da je DNA onečišćena proteinima ili nekim od reagensa korištenim tijekom izolacije DNA, a kada iznosi 1,8 i više smatra se da je uzorak zadovoljavajuće čistoće. Omjer A_{260}/A_{230} manji od 1,6, ukazuje na moguću kontaminaciju uzorka polisaharidima, a omjer 1,9 i više ukazuje na čist uzorak (Anonymous 3, 4).

3.2.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i gel elektroforeza

3.2.7.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Izolirana DNA koristi se u metodi lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). PCR omogućuje umnažanje specifičnih fragmenata DNA u iznimno velikoj količini zahvaljujući termostabilnoj DNA polimerazi koja je izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* (Taq - polimeraza). PCR postupak podrazumijeva da znamo rubne sekvence DNA fragmenta koji želimo umnožiti kako bismo mogli sintetizirati oligonukleotidne početnice, koje će omogućiti početak sinteze određenog DNA fragmenta.

Osnovne komponente za uspješnu PCR reakciju su uzorak DNA (lanac kalup - bakterijska i kvašćeva DNA iz različitih uzoraka piva); početnice - lanci DNA dugi oko 20 nukleotida i komplementarni rubnim segmentima nasuprotnih lanaca ciljane dvolančane DNA; deoksiribonukleozid - trifosfati i pufer sa magnezijevim ionima koji se nalaze u komercijalno pripremljenom puferu zajedno s DNA polimerazom (OneTaq) koja umnaža DNA i bojom koja služi da se vidi tijekom elektroforeze na agaroznom gelu (slika 7).



Slika 7. Slikovno prikazane potrebne komponente za PCR reakciju i proces PCR reakcije
(Preuzeto i prilagođeno prema: Anonymous 5, 2020)

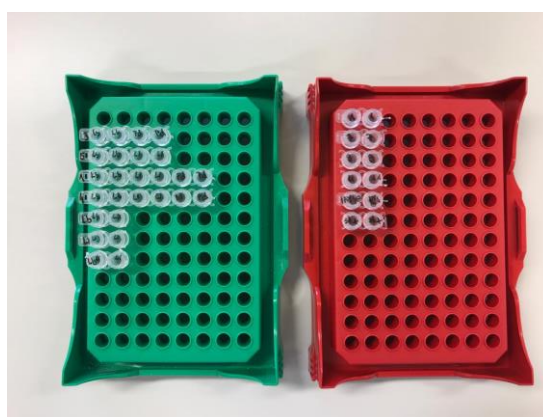
Umnažanje DNA molekule PCR metodom provodi se u instrumentu za PCR, koji omogućava umnažanje ciljnog slijeda više od milijardu puta u samo dva sata. Korištena je „touchdown“ PCR metoda, a reakcija se odvija u nekoliko koraka. Prvi korak je denaturacija dvolančane DNA uzorka, tj. razdvajanje lanaca pri temperaturi 94 °C tijekom 1 - 2 minute.

Potom slijedi sparivanje kalupa i početnica na temperaturi od 55 °C (engl. *annealing*). Ova temperatura se postupno, unutar 10 ciklusa, snižava od 55 °C do 35 °C, za 2 °C po ciklusu („touchdown“). Potom slijedi elongacija, odnosno sinteza dviju novih jednolančanih DNA na lancima denaturiranog DNA kalupa, za koju su potrebni deoksinukleozid-trifosfati kao građevni blokovi DNA i magnezijevi ioni. Elongacija se za OneTaq polimerazu odvija na temperaturi 68 °C. Nakon jednog ciklusa elongacije iz jedne molekule dvolančane DNA dobiju se dvije molekule dvolančane DNA u kojima je jedan lanac kalup, a drugi je novosintetiziran. Elongacija se potom provodi tijekom 35 ciklusa koji uključuju denaturaciju, sparivanja početnica s kalupom i elongaciju, nakon čega slijedi faza završne elongacije (pri 68 °C u trajanju od desetak minuta) u kojoj se dovršavaju sinteze svih eventualno nedovršenih nukleotidnih lanaca (Hajsig, Delaš, 2016). Ciklusi PCR reakcije prikazani su na slici 7, a izgled PCR tubica u stalku na slici 8. Nakon završenog PCR-a uzroci su čuvani na 4 °C do provođenja gel elektroforeze.

Sve potrebne komponente za PCR pipetiraju se u PCR tubice (slika 8). Ukupan volumen iznosi 12,5 µL. Postupak pripreme PCR smjesa prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Potrebni volumeni komponenti za postavljanje PCR reakcije

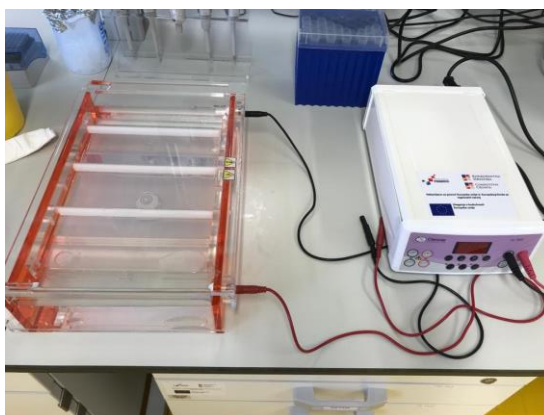
Komponenta	Za pripremu pozitivne ili negativne kontrole (µL)	Za pripremu uzorka DNA izoliranog iz piva (kvaščevo ili bakterijska DNA) (µL)
Uzorak DNA	0,5	6,05
Voda bez nukleaza	5,55	/
Uzvodne i nizvodne početnice	0,2	0,2
OneTaq DNA polimeraza	6,25	6,25



Slika 8. PCR tubice spremne za lančanu reakciju polimerazom (vlastita fotografija)

3.2.7.2. Gel elektroforeza

Za gel elektroforezu potreban je 2 %-tni agarozni gel. Za pripremu gela je potrebno odmjeriti 300 mL 1 x TAE pufera i 6 grama agaroze u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL te ju potom staviti u mikrovalnu pećnicu dok smjesa ne zakuha. Potrebno je u potpunosti otopiti agarozu u puferu. Nakon što je agaroz otopljen, tikvicu ohladiti pod vodom do cca 50 °C. Zatim u tikvicu dodati 10 000 x koncentriranu DNA boju (Gel Red). Preporuka proizvođača je da se boje doda 10 % volumena gela, dakle 30 µL za 300 mL gela, međutim eksperimentalno je utvrđeno kako se dodatkom boje u količini 5 % volumena gela dobije jasniji prikaz umnoženih fragmenata DNA na gelu. Gel se izlijeva u kalup na koji se, u predviđene utore, postave i češljici za jažice. Nakon što se gel polimerizirao prebacuje se u kadu za elektroforezu koju je potrebno napuniti s 1 x TAE puferom tako da u potpunosti prekrije gel. Zatim se vade češljici, a gel se, ukoliko je potrebno reže na manje segmente ovisno o broju uzoraka koji se analiziraju (slika 9).



Slika 9. Aparatura za gel elektroforezu (vlastita fotografija)

DNA standard (2 - log DNA) se priprema miješanjem komponenata prema podacima u tablici 11 te se nanosi po 10 µL standarda i svakog uzorka u jažice gela. Za PCR produkte nakon reakcije s početnicama za *L. brevis* i *P. damnosus* uočeno da je DNA vrpca na gelu jasnija kada se uzorak razrijedi s 1 x TAE puferom u omjeru 1:10 prije nanošenja na gel. Nakon nanošenja svih uzoraka na gel, pokrene se elektroforeza pri naponu od 130 V. Proces traje otprilike 90 minuta, sve dok boja u nanesenim uzorcima ne dođe do kraja gela.

Tablica 11. Podaci za pripremu standarda 2-log DNA ukupnog volumena 30 μL

Komponenta	Volumen (μL)
Gel Loading Dye Purple 6x	5,0
2-log DNA ladder	0,5
1x TAE pufer	24,5

3.2.8. Fizikalno – kemijske analize piva

3.2.8.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost mjeri se u sladovini, mladom pivu i gotovom pivu. Vrijednost pH se određuje pH – metrom koji ima mjerno osjetilo. Prije mjerenja potrebno je kalibrirati pH – metar u 2 ili 3 točke. Kako bi rezultati bili što precizniji, između svakog mjerenja elektrodu treba isprati destiliranom vodom pa samim uzorkom piva. Elektroda se čuva pohranjena u otopini KCl (EBC, 1998, metoda 9.42).

3.2.8.2. Određivanje gorčine piva

Gorčina okusa u pivu potječe uglavnom od izomeriziranih α -kiselina iz hmelja, iako oksidacijski produkti β -kiselina također mogu doprinijeti gorčini. U hmelju postoje tri analogna oblika α -kiselina u različitim omjerima, ovisno o varijetetu hmelja: humulonska (35 - 70 %), adhumulonska (10 – 15 %), kohumulonska (20 – 55 %) (Maye i Smith, 2016).

Kontrola gorčine je bitna jer znatno utječe na kakvoću piva. Određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 275 nm, a vrijednost apsorbancije se preračunava u gorčinu prema formuli:

$$\text{IBU} = 50 \times A_{275 \text{ nm}} \quad [1]$$

gdje je $A_{275 \text{ nm}}$ apsorbancija uzorka ili slijepe probe pri valnoj duljini od 275 nm. Rezultat se izražava kao cijeli broj s mjernom jedinicom IBU (engl. *International Bitterness Units*) (EBC, 1998, metoda 9.8). Jedna IBU jedinica ekvivalentna je 1 mg izo- α kiseline u 1 L vode ili piva.

Uzorke pripremiti tako da se 10 mL degaziranog piva otpipetira u Erlenmeyerovu tikvicu zajedno sa 500 μL 6 M HCl i 20 mL izooktana i nekoliko staklenih kuglica. Zatvorene Erlenmeyerove tikvice staviti na tresilicu na 15 minuta pri 130 okretaja min^{-1} kako bi se provela ekstrakcija izo- α -kiselina u izooktan. Nakon završenog miješanja, mjeriti apsorbanciju

izooktanskog sloja uzorka u odnosu na čisti izooktan kao referentnu otopinu (slijepa proba) na valnoj duljini od 275 nm. Prilikom mjerenja apsorbancije koristi se program Cary WinUV.

Na temelju izmjerene i literaturno očekivane vrijednosti gorčine piva izračunati brzinu oksidacije gorkih tvari piva prema formuli:

$$v_{oxid} (IBU \text{ dan}^{-1}) = \frac{gorčina_{literatura} - gorčina_{izmjerena}}{vrijeme \text{ provedene oksidacije}} \quad [2]$$

3.2.8.3. Određivanje boje piva

Boja piva određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije uzorka piva u odnosu na čistu vodu kao referentnu otopinu, tj. slijepu probu pri valnoj duljini 430 nm. Ukoliko vrijednost apsorbancije nije u linearnom području spektrofotometra, uzorak je potrebno razrijediti.

Vrijednost boje izražena u EBC jedinicama izračunava se prema formuli:

$$\text{Boja (EBC)} = A_{430 \text{ nm}} \times f \times 25 \quad [3]$$

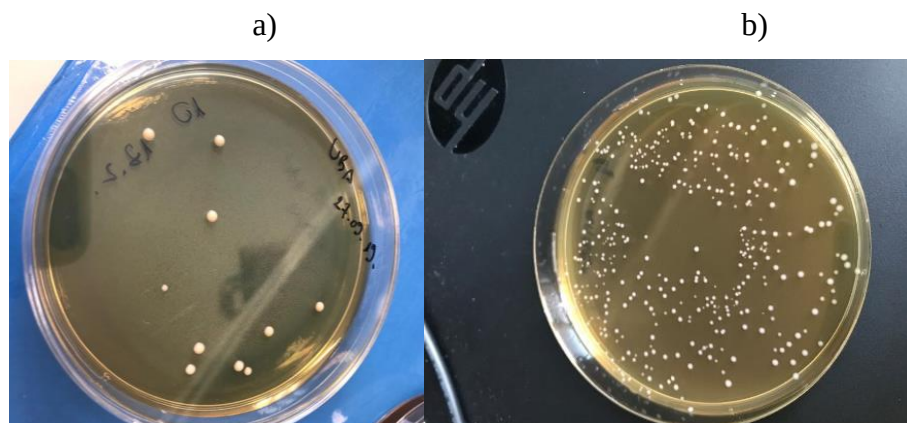
gdje je $A_{430 \text{ nm}}$ apsorbancija uzorka ili slijepe probe pri valnoj duljini od 430 nm u ćeliji od 10 mm, a f je faktor razrjeđenja uzorka (EBC, 1998, metoda 9.6).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. MIKROBIOLOŠKI PROFIL PIVA

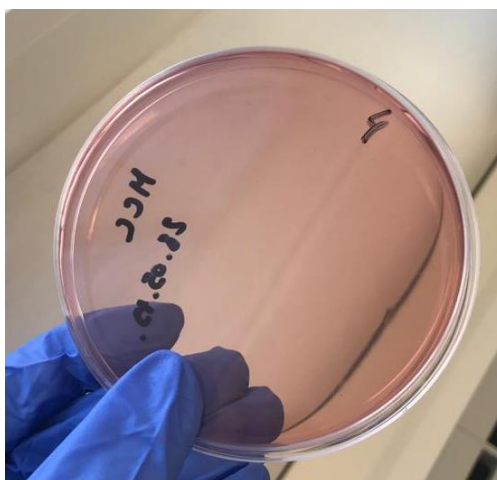
4.1.1. Broj poraslih kolonija na selektivnim hranjivim podlogama

U svih 11 uzoraka piva pronađeni su aerobni i anaerobni mikroorganizmi. Bakterije i kvasci važni u pivskoj industriji uzgajaju se na Universal Beer Agar (UBA) podlozi. Porasli mikroorganizmi vidljivi su kao bijele, okrugle kolonije različitih veličina (slika 10).



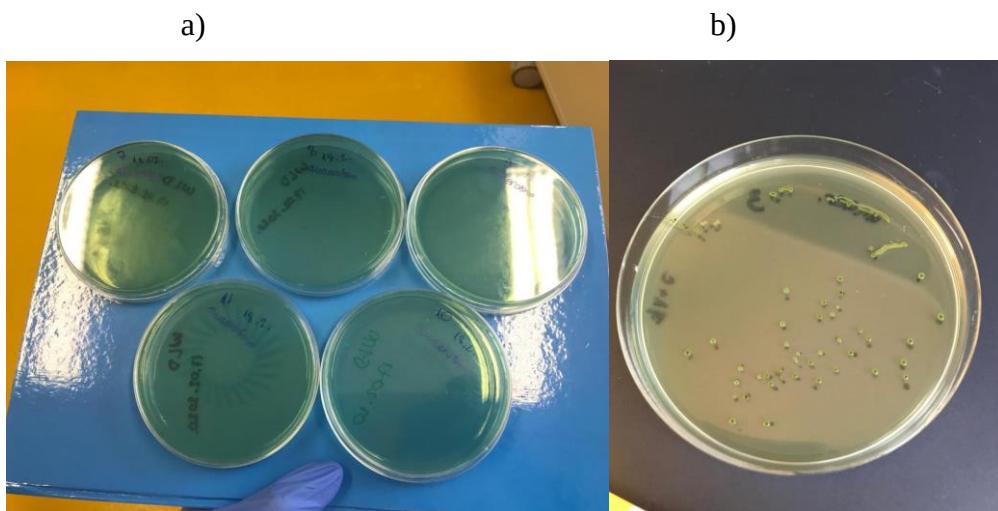
Slika 10. Izgled poraslih kolonija na hranjivoj podlozi UBA: (a) aerobno i (b) anaerobno (vlastita fotografija)

U niti jednom uzorku piva nisu pronađene potencijalno patogene, koliformne bakterije, kao ni kvasci iz roda *Brettanomyces*, odnosno nije bilo rasta mikroorganizama na MacConkey selektivnoj podlozi (slika 11) niti u *Brettanomyces* selektivnom mediju. Rezultat upućuje na zadovoljavajuću kvalitetu piva jer navedeni mikroorganizmi uzrokuju neželjeno zamućenje piva i snižavanje pH vrijednosti, te u nekim slučajevima i zdravstvenu neispravnost.



Slika 11. Nema vidljivih kolonija na selektivnoj podlozi MCC (vlastita fotografija)

U svim uzorcima piva industrijskih pivovara (uzorci 1 - 6), uzgojem na Wallerstein Differential Agar (WLD) podlozi, dokazano je prisustvo aerobnih i anaerobnih bakterija koje proizvode organske kiseline. Wallerstein Differential Agar sadrži pH indikator bromkrezol zeleno koji mijenja boju u žutu kada bakterija proizvodi organske kiseline zbog čega dolazi do snižavanja pH podloge (slika 12). U aerobnim uvjetima vidljiv je rast malih, bijelih, okruglih kolonija, a u anaerobnim uvjetima rast zelenih kolonija (slika 12b).



Slika 12. a) Zelena WLD podloga prije natepljivanja. b) Porasle kolonije na WLD podlozi u anaerobnim uvjetima. Podloga je promijenila boju u žuto nakon rasta bakterija koje proizvode organske kiseline (vlastita fotografija)

Rezultati mikrobiološkog ispitivanja na 5 različitih hranjivih podloga svih 11 uzoraka piva prikazani su u tablici 12. Kvasci su pronađeni u većini nefiltriranih piva, a izgled kolonija je upućivao na prisustvo „divljih“ kvasaca u nekim uzorcima (kolonije bakreno - zlatnog sjaja), ali i prisustvo radnih kvasaca koji su vidljivi kao kolonije roze boje.

Tablica 12. Rezultati rasta mikroorganizama na selektivnim hranjivim podlogama

Broj uzorka	Vrsta piva	Nefiltrirano pivo	Ukupni aerobi	Ukupni anaerobi	Aerobni proizvođači kiseline	Anaerobni proizvođači kiseline	Kvasci	Koliformne bakterije	Kvasac roda <i>Brettanomyces</i>
1	Svijetlo pivo, India Pale Ale	+	+	+	+	+	+	/	/
2	Svijetlo pivo, American Blonde Ale	+	+	+	+	+	/	/	/
3	Svijetlo pilsner pivo	/	+	+	+	+	/	/	/
4	Tamno pšenično pivo	/	+	+	+	+	/	/	/
5	Rezano pivo (mješavina svijetlog i tamnog lager piva)	/	+	+	+	+	/	/	/
6	Svijetlo lager pivo	+	+	+	+	+	/	/	/
7	Svijetlo lager pivo	+	+	+	/	/	/	/	/
8	Svijetlo lager pivo	+	+	+	/	/	+	/	/
9	Svijetlo lager pivo	+	+	+	/	/	+	/	/
10	Tamno lager pivo	+	+	+	/	/	/	/	/
11	Svijetlo lager pivo	+	+	+	+	/	+	/	/

U većini nefiltriranih piva pronađen je rast kvasaca na SDA selektivnoj podlozi.

4.1.2. Mikroskopiranje preparata obojanih po Gramu

U tablici 13 prikazan je ukupan rezultat bojanja po Gramu poraslih kolonija za svih 11 uzoraka piva.

Tablica 13. Rezultati bojanja po Gramu

Broj uzorka	Vrsta piva	Kvasci	Gram-pozitivne bakterije	Gram-negativne bakterije
1	Svijetlo pivo, India Pale Ale	+	+	+
2	Svijetlo pivo, American Blonde Ale	/	/	+
3	Svijetlo pilsner pivo	/	+	/
4	Tamno pšenično pivo	/	/	+
5	Rezano pivo (mješavina svijetlog i tamnog lager piva)	/	/	+
6	Svijetlo lager pivo	/	+	+
7	Svijetlo lager pivo	/	/	/
8	Svijetlo lager pivo	+	/	/
9	Svijetlo lager pivo	+	/	/
10	Tamno lager pivo	/	/	/
11	Svijetlo lager pivo	+	/	+

4.1.3. Čistoća izolirane genomske DNA

Na temelju rasta kolonija na selektivnim podlogama izolirana je genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca i/ili bakterija. Omjer A_{260}/A_{280} pokazuje da je izolirana DNA čista, osim za uzorak 7 gdje je omjer manji od 1,6 te je moguće onečišćenje proteinima. Omjer A_{260}/A_{230} je za sve uzorke manji od 1,6 što upućuje na moguće onečišćenje polisaharidima.

4.1.4. Očekivane veličine PCR produkata nakon provedene lančane reakcije polimerazom i gel elektroforeze.

Nakon provedene lančane reakcije polimerazom provodi se gel elektroforeza kako bi vizualizirali DNA vrpce nastale umnažanjem DNA fragmenta tijekom PCR-a. U tablici 14 navedene su očekivane veličine DNA fragmenta za par početnica korišten za detekciju pojedinog mikroorganizma.

Tablica 14. Očekivane veličine PCR produkata

Vrsta bakterije	Očekivana veličina DNA fragmenata (pb)
<i>Lactobacillus brevis</i>	1340
<i>Lactobacillus lindneri</i>	623
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	302
<i>Pediococcus damnosus</i>	315
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	1000
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	929

U niti jednom uzorku piva nisu pronađene vrste *Acetobacter pasteurianus* i *Lactobacillus acidophilus* korištenjem PCR metode.

4.2. FIZIKALNO – KEMIJSKA ANALIZA PIVA

4.2.1. Određivanje boje piva

Uzorci čija je apsorbancija bila izvan linearnog područja instrumenta, razrijeđeni su u omjeru 1:2 ili 1:3 s destiliranom vodom. Za dobivene vrijednosti apsorbancije pri 430 nm izračunata je prosječna vrijednost triplikata te boja piva prema protokolu opisanom u „Materijali i metode“. U tablici 15 su prikazane izračunate vrijednosti boje piva te su obojane prema boji piva koju iznos predstavlja.

Tablica 15. Vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri 340 nm i izračunata boja piva

Broj uzorka (razrjeđenje)	1 (1:2)	2 (1:1)	3 (1:1)	4 (1:2)	5 (1:1)	6 (1:1)	7 (1:3)	8 (1:3)	10 (1:2)	11 (1:1)
Vrsta piva	Svijetlo pivo, India Pale Ale	Svijetlo pivo, American Blonde Ale	Svijetlo pilsner pivo	Tamno pšenično pivo	Rezano pivo	Svijetlo lager pivo	Svijetlo lager pivo	Svijetlo lager pivo	Tamno lager pivo	Svijetlo lager pivo
Prosječna vrijednost $A_{340\text{ nm}}$	1,13	1,24	0,63	1,09	1,97	1,00	1,75	1,66	1,23	1,26
Faktor razrjeđenja	2	1	1	2	1	1	3	3	2	1
Boja [EBC]	56,51	31,01	15,83	54,56	49,16	24,90	131,26	124,46	61,26	31,50

Na slici 13 grafički je prikazan odnos boje piva i vrijednosti boje u EBC jedinicama. Vrste piva s bojom do 30 EBC pripadaju svijetlim pivima.

Pivo sadrži različite skupine polifenola, poput tanina, fenolnih kiselina, flavona, flavonola i proantocijanida koji imaju značajan utjecaj na stabilnost piva (Lee i sur., 2003; Eberhardt i sur., 2000). Flavonoidi su velikim dijelom odgovorni za boju tamnih i crnih piva pa tako tamna piva sadrže veću količinu tanina od svijetlih piva (Collin i sur., 2013). Od fenolnih kiselina u pivu se nalaze benzojeva i cimetna kiselina te njihovi derivati. Fenolne kiseline oksidacijom prelaze u žute pigmente. U dodiru s kisikom fenolne tvari lako oksidiraju. Fenolni spojevi pridonose senzorskim svojstvima odnosno okusu, aromi i boji (Cheynier, 2005). Izloženost svjetlu, kao i ambalaža u koju je pivo pakirano utječu na promjenu intenziteta boje piva. Smeđe staklene boce skoro u potpunosti štite pivo od sunčevih zraka (350-500 nm), dok prozirne ili zelene staklene boce omogućuju vrlo slabu ili nikakvu zaštitu (Bamforth, 2008).

SRM/Lovibond	Primjer	Boja piva	EBC
2	Svijetli lager		4
3	Pilsner		6
4	Pilsner Urguell		8
6			12
8	Pšenično		16
10	Svijetli ale		20
13			26
17	Tamni lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	Vrhunski Stout		138

Slika 13. Različite vrste piva i pripadajuće boje odnosno vrijednost boje u EBC jedinicama (DeLange, 2008)

4.2.2. Određivanje gorčine piva

Gorčina nastaje izomerizacijom α -kiselina iz hmelja u izo- α -kiseline tijekom vrenja, a njihova koncentracija starenjem opada te se gorčina ispravno određuje u svježem pivu. Za smanjenje gorčine zaslužni su vrijeme i temperatura čuvanja. U otvorenom i odstajalom pivu dogodila se oksidacija transmasnih kiselina, tj. nastajanja karbonilnih spojeva (Aron i Shellhammer, 2010). Čuva li se pivo na sobnoj temperaturi gorčina će brže opadati u odnosu na čuvanje piva u hladnjaku (King i Duineveld, 1999). Rezultati izmjerenih i izračunatih gorčina 11 uzoraka piva prikazani su u tablici 16, a tablične vrijednosti gorčine za pojedinu vrstu piva prikazane su na slici 14. Gorčina je mjerena u uzorcima piva otvorenih 7 mjeseci (222 dana), čime su uzorci bili izloženi kisiku i procesu oksidacije, što objašnjava niže vrijednosti gorčine od početnih, tj. očekivanih vrijednosti.

Na temelju izračunate vrijednosti brzine oksidacije gorkih tvari primijećeno je kako najveću brzinu oksidacije ima uzorak 1, India Pale Ale pivo u kojem je tijekom određivanja mikrobiološkog profila dokazana prisutnost kvasaca i bakterija koje proizvode organske kiseline. Najmanju brzinu oksidacije pokazuje uzorak svijetlog lager piva 7 iz male hrvatske pivovare u kojem tijekom nasađivanja na selektivne podloge nije bilo rasta kvasaca, kao ni bakterija koje proizvode organske kiseline. Općenito nije dokazana povezanost između mikrobiološkog profila pojedine vrste piva i brzine oksidacije gorkih tvari u pivu. Na ovaj način

provjerava se koliko dugo pivo može nakon otvaranja stajati u hladnjaku bez da promijeni aromu, okus ili gorčinu.

Tablica 16. Vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri 275 nm i izračunata gorčina piva

Broj uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11
Vrsta piva	Svijetlo pivo, India Pale Ale	Svijetlo pivo, American Blonde Ale	Svijetlo pilsner pivo	Tamno pšenično pivo	Rezano pivo	Svijetlo lager pivo	Svijetlo lager pivo	Svijetlo lager pivo	Tamno lager pivo	Svijetlo lager pivo
Prosječna vrijednost $A_{275\text{ nm}}$	0,11	0,10	0,08	0,03	0,03	0,06	0,17	0,12	0,05	0,06
Gorčina [IBU]	5,34	5,10	3,76	1,41	1,71	2,99	8,56	5,89	2,55	2,95
Očekivana vrijednost gorčine (prosječna vrijednost) [IBU]	55	15-25 (20)	27	22-30 (26)	18-22 (20)	5-15 (10)	5-15 (10)	5-15 (10)	22-30 (26)	5-15 (10)
Brzina oksidacije gorkih tvari [IBU dan ⁻¹]	0,224	0,067	0,105	0,111	0,082	0,032	0,007	0,019	0,106	0,032

Boja (SRM)	Vrsta piva	Gorčina (IBU)	Boja (SRM)	Vrsta piva	Gorčina (IBU)
1	Svijetli Lager	5-15	7	Vienna Lager	22-28
	Pšenični Ale	10-35		Ekstra posebna gorčina	30-55
	Belgijsko bijelo	10-17		Scottish Ale	9-20
	Lager	5-14		Engleski blagi Ale	10-24
2	Ledeni Lager	10-22	12	Engleski jaki Ale	30-65
	Sladovina	12-23		Crni Lager	22-30
	Pšenično pivo	3-15		Dunkelweizen	10-15
3	Marzen	7-25	17	Scotch Ale	25-35
	Pilsner	20-40		Amber Ale	30-40
	Svijetli/zlatni Ale	15-25		Irish Ale	20-28
	Belgijski trostruki Ale	20-25		Dusseldorf Altbier	25-48
4	Belgijski jaki Pale Ale	20-50	22	Barleywine	40-100
	Hefeweizen	10-35		Kalifornijsko pivo	35-45
	Kölsch	18-25		Old Ale	30-65
	Maibock Pale Lager	20-38		Dubbel Ale	18-25
5	Kremasti Ale	18-25	27	Munich Dunkel	18-28
	Engleski Pale Ale	20-40		Smeđi Ale	15-45
	Voćno/povrtno pivo	5-70		Bock	20-30
6	Pivo s biljkama i začinima	5-70	32	Porter	20-40
	American Pale Ale	28-40		Zobeni Stout	20-40
	India Pale Ale	35-65		Imperial Stout	50-80
	Amber Lager	18-30		Stout	30-60
7	Lambic	11-23	37	Irski suhi Stout	30-40
	Doppelbock	16-30		Milk Stout	15-25

Slika 14. Tablični prikaz odnosa vrste piva i vrijednosti gorčine u IBU jedinicama (Preuzeto i prilagođeno prema: EBC, 1998)

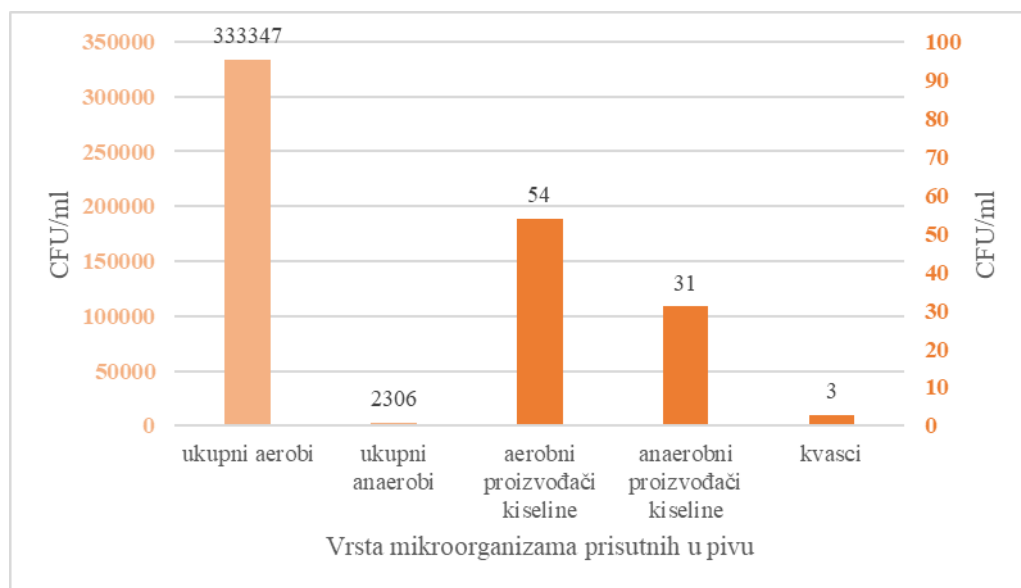
4.2.3. Određivanje pH vrijednosti piva

Pivo donjeg vrenja je većinom blago kiselo. pH vrijednost obično iznosi između 4 i 5, dok ale vrste mogu imati pH u rasponu 3 do 6. Kiselost pivu daju organske kiseline, a znatnu kiselost može uzrokovati i kontaminacija bakterijama, primjerice iz roda *Lactobacillus*. Kiselost „štiti“ pivo od patogena te mikroorganizama koji inače kvare hranu i prehrambene proizvode jer većini ne odgovara rast u uvjetima niskog pH (Marić, 2009). Izmjerene pH vrijednosti svih uzoraka su u rasponu od 4,18 do 4,89.

4.3. MIKROBIOLOŠKE I FIZIKALNO – KEMIJSKE ODLIKE POJEDINIH UZORAKA PIVA

a) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog India Pale Ale piva (uzorak 1)

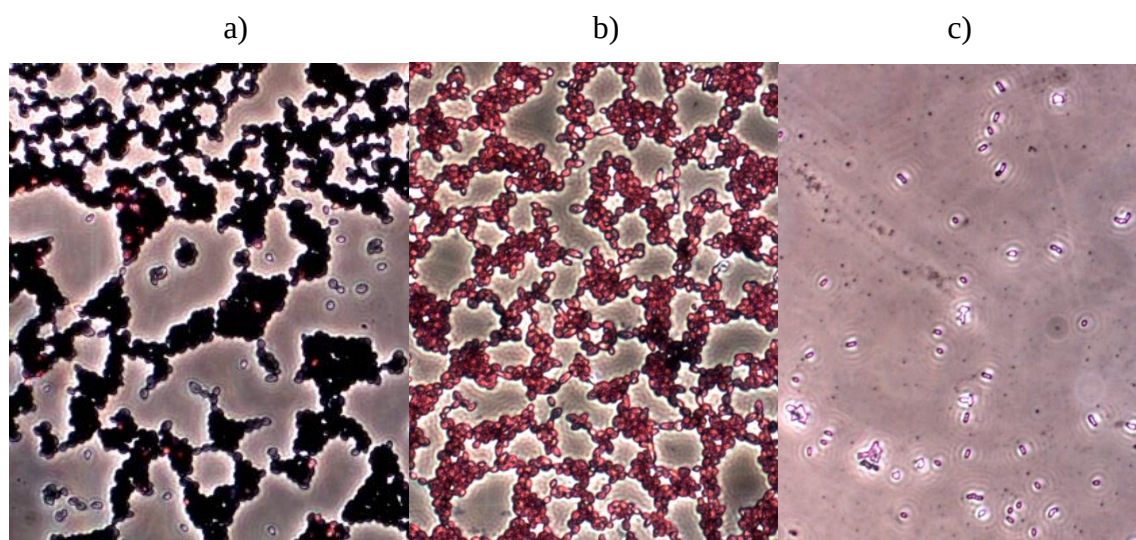
Na slici 15 grafički je prikazan mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog piva India Pale Ale (uzorak 1). Na UBA podlozi u aerobnim uvjetima vidljiv je rast 3 različite vrste kolonija: sitne prozirne kolonije; zatim manje, bijele, okrugle kolonije te velike, bijele, okrugle, masne kolonije. Prilikom anaerobnog uzgoja na UBA podlozi vidljive su 3 vrste kolonija bijele boje koje se razlikuju u veličini: jako sitne, srednje i velike. Aerobni proizvođači organskih kiselina oko kolonija su imali blago žutu zonu radi proizvodnje organskih kiselina. U ovom uzorku piva uočen je i rast različitih kvasaca poraslih na SDA podlozi. Vidljive su 3 vrste kolonija kvasaca: veće, roze, okrugle kolonije; veće, ispupčene kolonije bakreno-zlatne boje i veće, roze, okrugle kolonije nalik brdašcu.



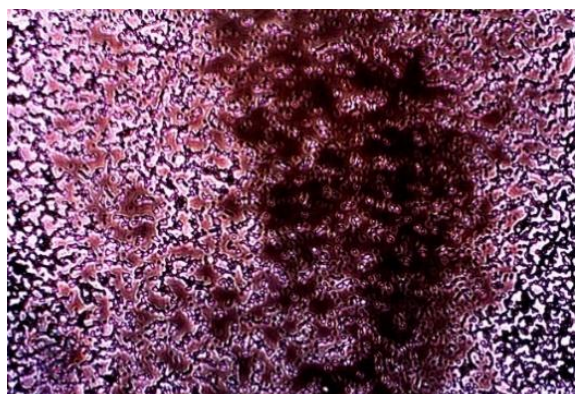
Slika 15. Mikrobiološki profil svijetlog India Pale Ale piva (uzorak 1)

Neke od poraslih kolonija obojane su po Gramu i mikroskopirane. Na UBA podlozi primijećen je rast 3 različita tipa kolonija, a mikroskopiranjem su pronađene stanice kvasaca, po 2 oblika gram - negativnih bakterija, štapići i koki u nakupinama (slika 16). Stanice kvasaca su karakteristično veće od stanica bakterija s vidljivim pupovima na pojedinim stanicama (slika 16a). Na mikroskopskom preparatu aerobnih bakterija koje proizvode organske kiseline

poraslih na WLD podlozi pronađeni su gram-pozitivni koki, diplokoki i tetrade (slika 17). U anaerobnim uvjetima rasta na WLD podlozi mikroskopiranjem su uočeni gram-negativni koki i diplokoki. Mikroskopiranjem kolonija sa SDA podloge uočeni su kvasci i njegovi pupovi.



Slika 161. Mikroskopski preparat kolonija: a) kvasca b) gram-negativnih koka u nakupinama c) gram-negativnih štapićastih bakterija, poraslih na UBA podlozi u anaerobnim uvjetima (vlastita fotografija)



Slika 172. Mikroskopski preparat gram-pozitivnih koka poraslih na WLD podlozi u aerobnim uvjetima (vlastita fotografija)

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca i bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 17 i 18.

Tablica 17. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	21.9 ng μL^{-1}	1,77	1,15

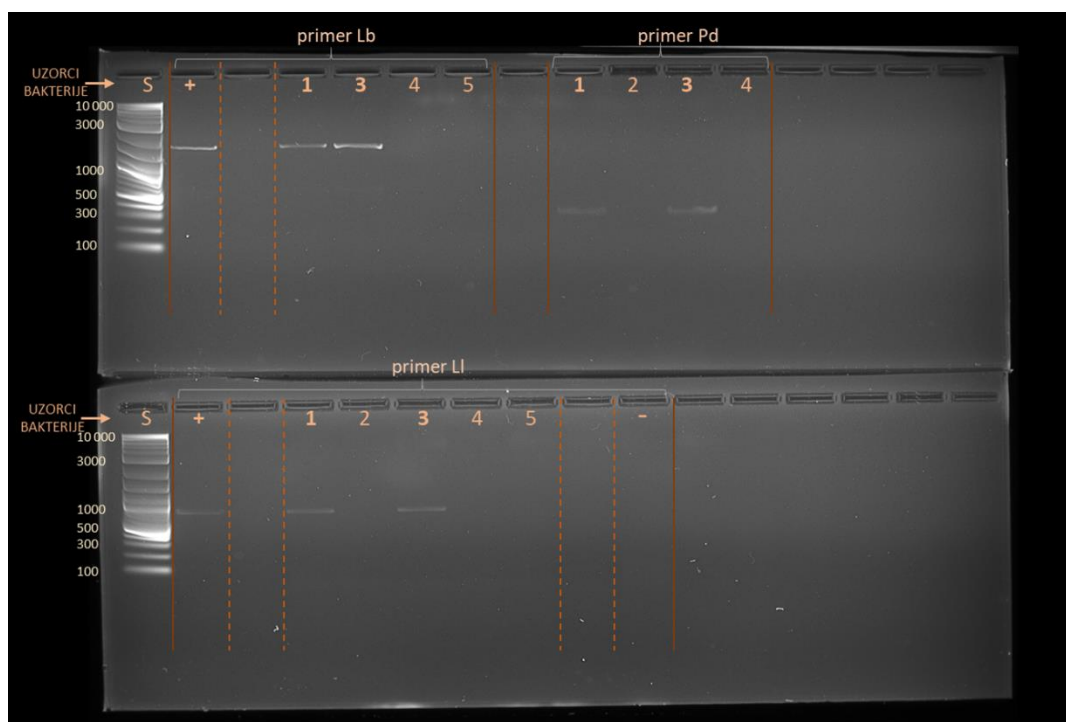
PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* dokazano je da svijetlo pivo, India Pale Ale ne sadrži DNA kvasca *S. diastaticus* (slika 32).

Tablica 18. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	59,4 ng μL^{-1}	1,49	0,56

Na slici 18 su naznačeni uzorci, i pozitivne kontrole (+) na gelu nakon PCR reakcije s početnicama specifičnim za *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Acetobacter pastorianus*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus acidophilus*. Vrpca pozitivne kontrole za *L. brevis* nalazi se na visini od 1340 pb, dok se vrpca za *L. lindneri* nalazi na visini od 623 pb (slika 18). Očekivana veličina vrpce specifične za *P. damnosus* je 315 pb.

U svijetlom pivu, India Pale Ale (uzorak 1) dokazana je prisutnost gram-pozitivnih bakterija, čestih kontaminanata piva *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* i *Pediococcus damnosus*. Detektirani mikroorganizmi nisu znak zdravstvene neispravnosti, već utječu na organoleptičke promjene i uzrokuju zamućenje piva (Pravilnik, 2008).



Slika 18. Prikaz gela nakon PCR reakcije i elektroforeze PCR produkata. S = standard, + = pozitivna kontrola, 1 = svijetlo pivo, India Pale Ale; 2 – svijetlo pivo, American Blonde Ale;

3 – svijetlo lager pivo; 4 – tamno pšenično pivo; 5 – rezano pivo (mješavina svijetlog i tamnog lager piva); - = negativna kontrola; Lb – PCR produkti sa specifičnim početnicama za *Lactobacillus brevis*; Pd – početnica za vrstu *Pediococcus damnosus*; Ll – početnica za vrstu *Lactobacillus lindneri* (vlastita fotografija)

Svijetlom pivu, India Pale Ale određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 56,51 EBC

- Više odgovara tamnom pivu, premda je India Pale Ale svijetlo pivo.

b) Gorčina = 5,34 IBU

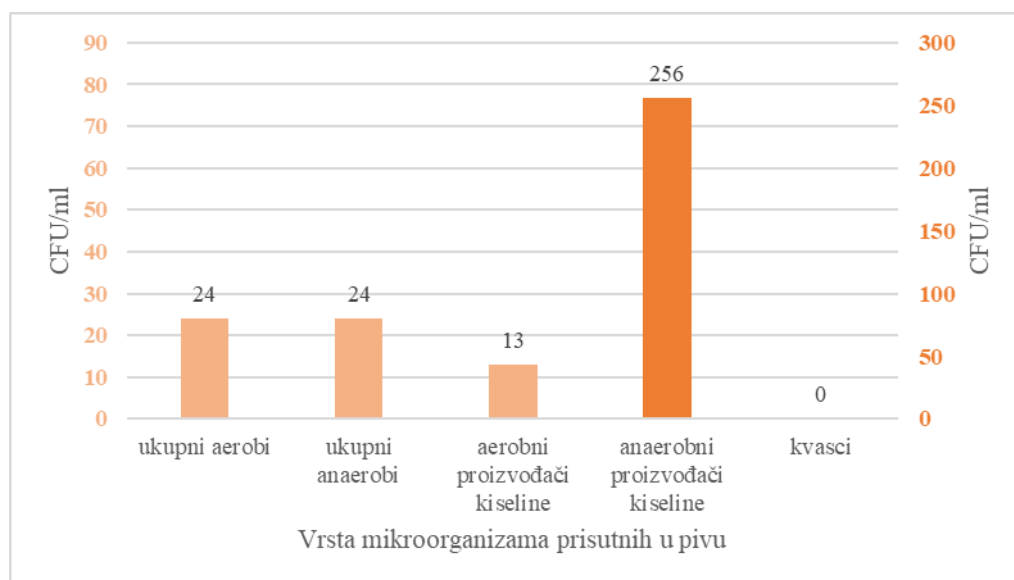
- Očekivana vrijednost gorčine India Pale Ale piva 55.

c) pH = 4,62

- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

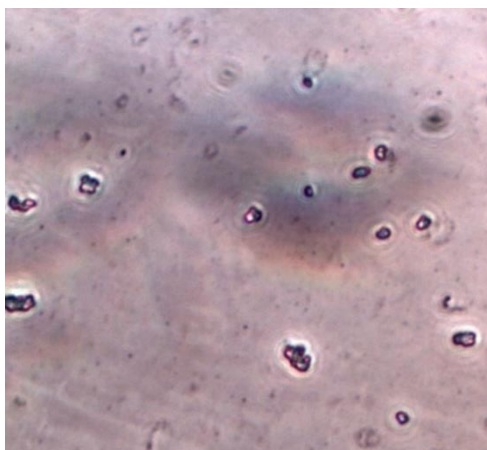
b) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog, nepasteriziranog American Blonde Ale piva (uzorak 2)

Na slici 19 vidljiv je mikrobiološki profil svijetlog American Blonde Ale, nefiltriranog i nepasteriziranog piva (uzorak 2). Na WLD podlozi uočen je rast manjih i većih kolonija anaerobnih proizvođača organske kiseline.



Slika 19. Mikrobiološki profil svijetlog American Blonde Ale piva (uzorak 2)

Neke od poraslih kolonija obojane su po Gramu i mikroskopirane. Aerobni proizvođači kiseline su gram-negativni koki koji tvore tetrade (slika 20).



Slika 20. Mikroskopski preparat gram-negativnih koka, koji tvore tetrade, poraslih na WLD podlozi u anaerobnim uvjetima (vlastita fotografija)

Uzorku je izolirana genomska DNA, a u tablici 19 je prikazana izmjerena koncentracija DNA i omjeri apsorbancija.

Tablica 19. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
2	13,0 ng μL^{-1}	1,5	0,53

Nakon provedene PCR reakcije i gel elektroforeze u uzorku American Blonde Ale piva nije pronađena niti jedna od 5 određivanih bakterija (slika 18).

Svjetlom, nefiltriranom i nepasteriziranom American Blonde Ale pivu određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 31,01 EBC

- Odgovara svjetlom pivu kakvo je American Blonde Ale pivo.

b) gorčina = 5,10 IBU

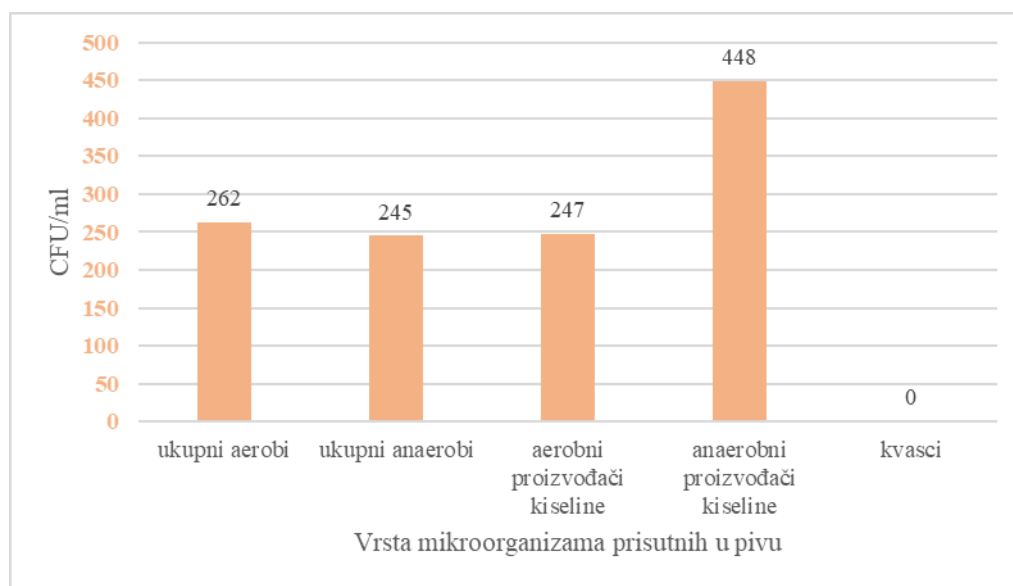
- Očekivana vrijednost gorčine American Blonde Ale piva je između 15 i 25 IBU.

c) pH = 4,52

- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

c) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog pilsner piva (uzorak 3)

Na slici 21 prikazan je mikrobiološki profil svijetlog pilsner piva (uzorak 3). Na zelenoj WLD podlozi oko kolonija aerobnih proizvođača organskih kiselina vidljiva je blago žuta zona zbog proizvodnje kiselina. Pivo sadrži i anaerobne bakterije koje proizvode organske kiseline koje su zelenu podlogu pretvorila u žutu. Vidljiva su dva tipa kolonija koje se razlikuju u veličini: male i srednje.



Slika 21. Mikrobiološki profil svijetlog pilsner piva (uzorak 3)

Neke od poraslih kolonija obojane su po Gramu i mikroskopirane te su u svijetlom lager pivu pronađene gram-negativne bakterije koki oblika koje tvore tetrade, a porasle su na WLD podlozi kao bakterije koje proizvode organske kiseline u aerobnim uvjetima.

Uzorku je izolirana genomska DNA, a u tablici 20 je prikazana izmjerena koncentracija DNA i omjeri apsorbancija.

Tablica 20. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
3	6,3 ng μL^{-1}	1,64	0,99

Nakon provođenja gel elektroforeze PCR produkata u svijetlom pilsner pivu (uzorak 3) dokazana je prisutnost gram-pozitivnih bakterija, čestih kontaminanata piva *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* i *Pediococcus damnosus* (slika 18).

Svijetlom pilsner pivu određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 15,83 EBC

- Odgovara svijetlom pivu kao što je ispitivano pilsner pivo.

b) Gorčina = 3,76 IBU

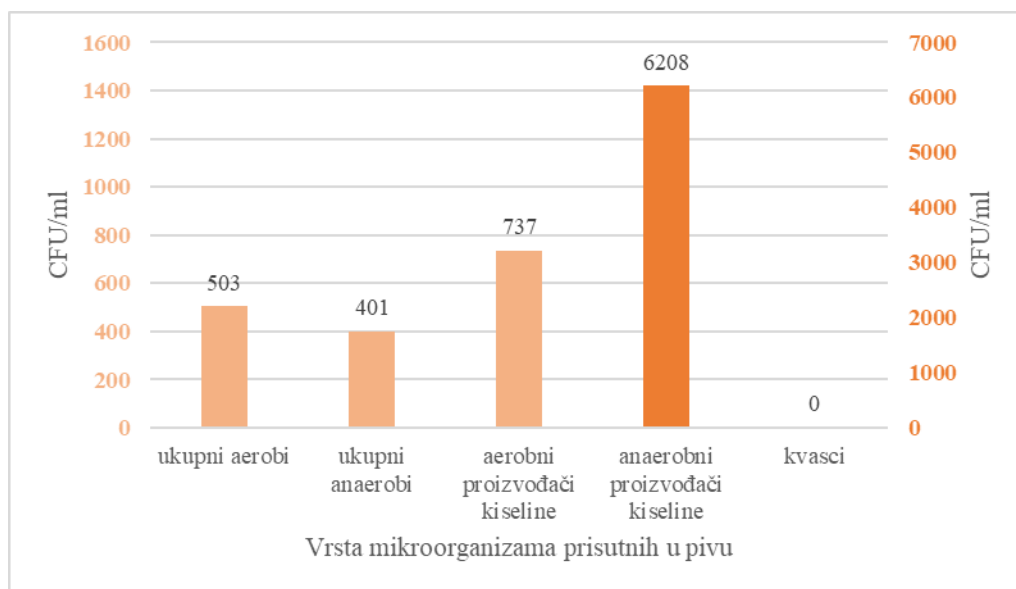
- Očekivana vrijednost gorčine ovog pilsner piva je 27.

c) pH = 4,57

- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

d) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike tamnog pšeničnog piva (uzorak 4)

Na slici 22 prikazan je mikrobiološki profil tamnog pšeničnog piva (uzorak 4). Anaerobni proizvođači organskih kiselina promijenili su boju podloge iz zelene u žutu.



Slika 22. Mikrobiološki profil tamnog pšeničnog piva (uzorak 4)

U tamnom pšeničnom pivu prilikom rasta u anaerobnim uvjetima primijećene su koki gram-negativne bakterije koje ponegdje rastu kao diplokokci. Također, u anaerobnim uvjetima bakterije koje proizvode organske kiseline rastu kao gram-negativni koki.

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 21.

Tablica 21. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
4	8,2 ng μL^{-1}	1,37	0,66

Nakon provedene PCR reakcije i gel elektroforeze u uzorku tamnog pšeničnog piva (uzorak 4) nije pronađena niti jedna od 5 određivanih bakterija (slika 18).

Tamnom pšeničnom pivu određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 54,56 EBC

- Odgovara tamnom pšeničnom pivu kakvo je ispitivano pivo.

b) Gorčina = 1,41 IBU

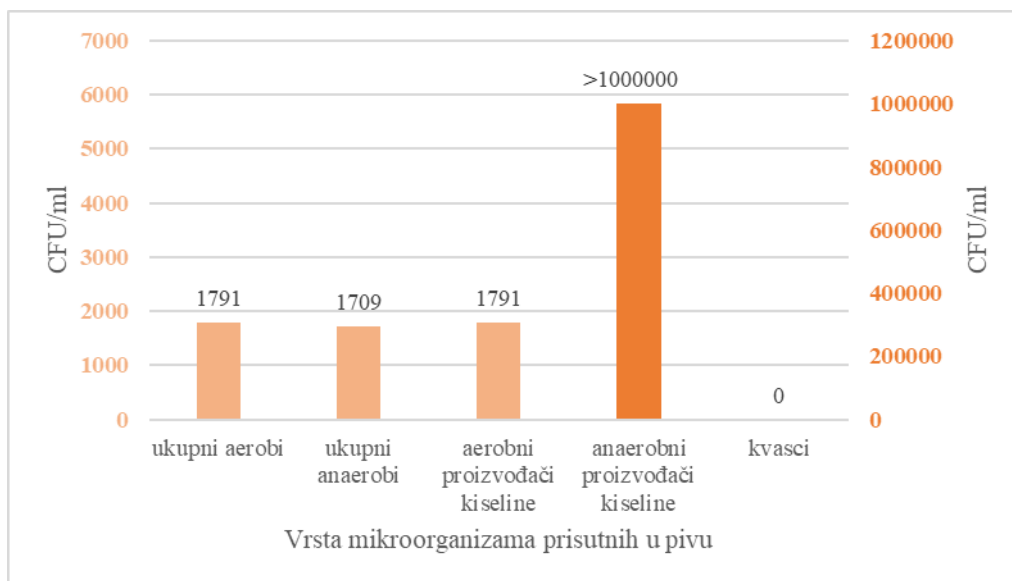
- Očekivana vrijednost gorčine između 22 i 30 IBU.

c) pH = 4,18

- Unutar očekivanog raspona za pH piva. U ovom uzorku pronađene su bakterije koje proizvode organske kiseline, što može objasniti nisku pH vrijednost piva.

e) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike rezanog lager piva (uzorak 5)

Na slici 23 grafički je prikazan mikrobiološki profil rezanog piva, tj. mješavine svijetlog i tamnog lager piva. Anaerobni proizvođači organskih kiselina promijenili su boju podloge iz zelene u žutu.



Slika 23. Mikrobiološki profil rezanog piva (uzorak 5)

Na mikroskopskom preparatu anaerobnih bakterija koje proizvode organske kiseline poraslih na WLD podlozi pronađeni su gram-negativni koki.

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 22.

Tablica 22. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
5	12,6 ng μL^{-1}	1,47	0,73

Nakon provedene PCR reakcije i gel elektroforeze u uzorku rezanog piva nije pronađena niti jedna od 5 određivanih bakterija (slika 18).

Rezanom (mješavina svijetlog i tamnog lager piva) pivu određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 49,16 EBC

- Odgovara literaturnim podacima za rezano pivo, tj. kombinaciju svijetlog i tamnog piva.

b) Gorčina = 1,71 IBU

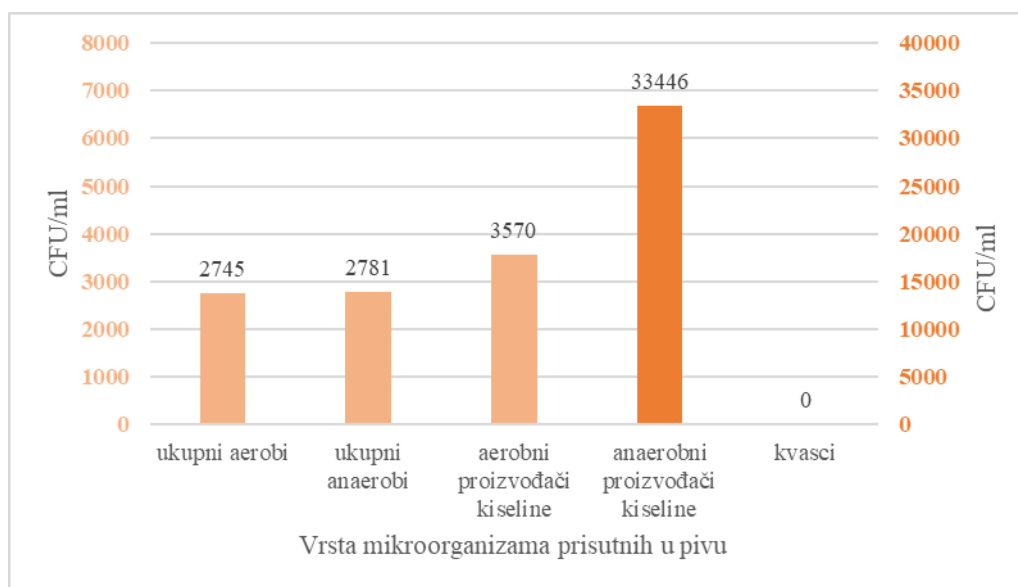
- Očekivana vrijednost gorčine je između 18 i 22 IBU.

c) pH = 4,46

- Unutar očekivanog raspona za pH piva. U ovom je uzorku pronađeno najviše bakterija koje proizvode organske kiseline, a pH vrijednost nije bila najniža izmjerena, što se može objasniti time da na pH piva utječe više faktora, a ne samo prisustvo bakterija koje proizvode organske kiseline.

f) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog lager piva (uzorak 6)

Na slici 24 grafički je prikazan mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog lager piva (uzorak 6). Anaerobne bakterije koje proizvode organske kiseline su kolonije zelene boje koje su zelenu WLD podlogu zbog proizvodnje organskih kiselina pretvorile u žutu podlogu.



Slika 24. Mikrobiološki profil svijetlog lager piva (uzorak 6)

Neke od poraslih kolonija obojane su po Gramu i mikroskopirane. U aerobnim uvjetima rasta na UBA podlozi mikroskopiranjem su uočeni gram-negativni koki. Na mikroskopskom preparatu aerobnih bakterija koje proizvode organske kiseline poraslih na WLD podlozi pronađeni su gram-negativni koki i tetrade. U anaerobnim uvjetima rasta na WLD podlozi mikroskopiranjem su uočeni gram-pozitivni koki.

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 23.

Tablica 23. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
6	19,8 ng μL^{-1}	1,53	0,64

Nakon provedene PCR reakcije i gel elektroforeze u uzorku svijetlog nefiltriranog piva nije pronađena niti jedna od 5 određivanih bakterija (nije prikazano na slika 18).

Svijetlom nefiltriranom lager pivu određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 24,90 EBC

- Odgovara svijetlom lager pivu.

b) Gorčina = 2,99 IBU

- Očekivana vrijednost gorčine svijetlog lager piva je između 5 i 15 IBU.

c) pH = 4,81

- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

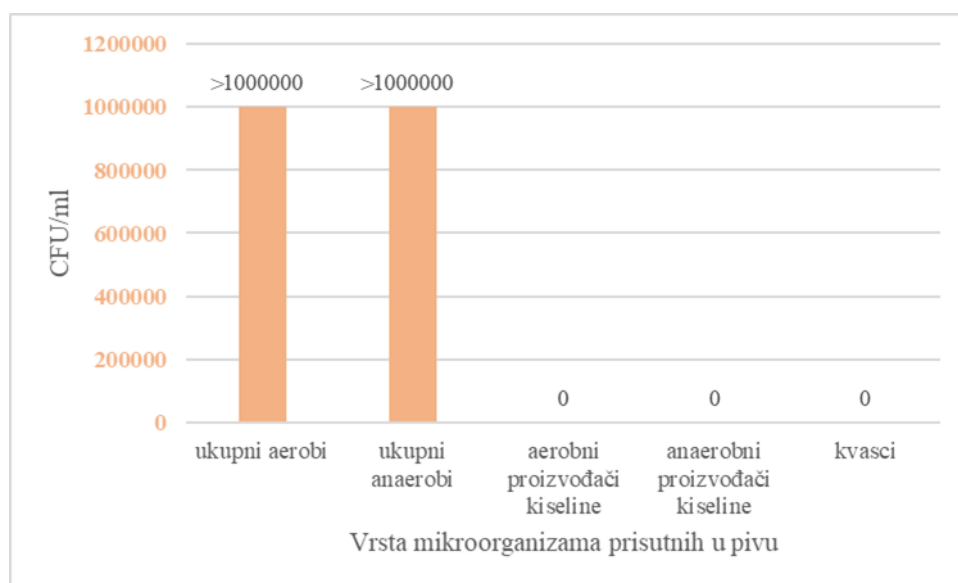
g) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 7)



Slika 25. Uzorak svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 7; vlastita fotografija)

Pivo pod brojem 7 je prvo u nizu uzoraka piva malih (engl. *craft*) proizvođača piva. To je svijetlo, nefiltrirano i nepasterizirano lager pivo, a u njemu su prisutni samo aerobni i

anaerobni mikroorganizmi u relativno visokoj koncentraciji (slika 26), vidljivi na UBA podlogama kao bijeli razmaz.



Slika 26. Mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog piva (uzorak 7)

Uzorku je izolirana genomska DNA, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbanacija prikazani su u tablici 24.

Tablica 24. Izmjerena koncentracija izolirane DNA, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
7	79,97 ng μL^{-1}	1,51	0,58

Omjer A_{260}/A_{280} manji je od 1,6 te je moguće onečišćenje izolirane DNA proteinima.

PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* dokazano je da uzorak 7 ne sadrži DNA kvasca *S. diastaticus* (slika 32), što je bilo i očekivano s obzirom da nije bilo rasta na SDA podlozi.

Uzorku piva 7 određene su fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 131,26 EBC

- Vrijednost boje je tamnija i od očekivane vrijednosti tamnih piva (uzorak piva 10), iako je uzorak 7 svijetlo pivo. Na povećanje vrijednosti boje može utjecati zamućenost piva.

b) Gorčina = 8,56 IBU

- Očekivana vrijednost gorčine svijetlog lager piva je između 5 i 15 IBU, čemu dobivena vrijednost odgovara.

c) pH = 4,66

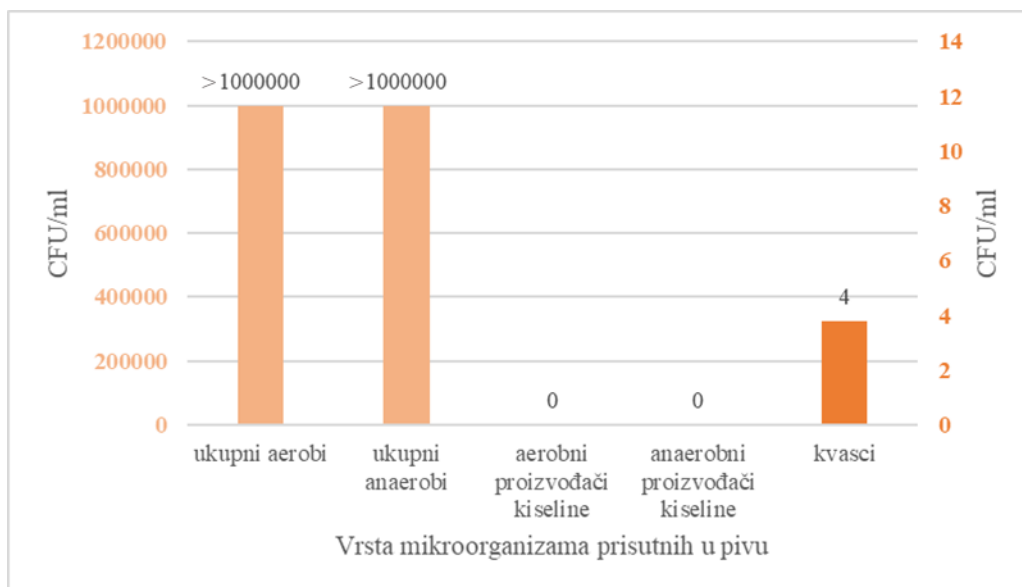
- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

h) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 8)

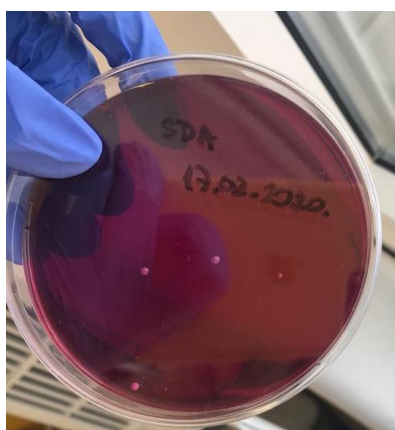


Slika 27. Uzorak svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 8; vlastita fotografija)

Uzorak piva 8, također je svijetlo, nefiltrirano i nepasterizirano lager pivo malih proizvođača piva sličnog mikrobiološkog profila kao pivo 7, sa relativno visokom koncentracijom aerobnih i anaerobnih mikroorganizama (slika 28). Vidljiv je rast kvasaca na SDA podlozi kao roze, okrugle, srednje kolonije (slika 29).



Slika 28. Mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 8)



Slika 29. Izgled poraslih kolonija na selektivnoj podlozi SDA (vlastita fotografija)

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca i bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 25.

Tablica 25. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
8	101,2 ng μL^{-1}	1,67	0,85

PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* dokazano je da svijetlo lager pivo (uzorak 8) ne sadrži DNA kvasca *S. diastaticus* (nije prikazano na slika 32).

Pivu uzorka 8 određene su fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 124,46 EBC

- Vrijednost boje je tamnija i od očekivane vrijednosti tamnih piva (uzorak piva 10), iako je uzorak 8 svijetlo pivo. Na povećanje vrijednosti boje utječe prisutnost mikroorganizama u pivu.

b) Gorčina = 5,89 IBU

- Očekivana vrijednost gorčine svijetlog lager piva je između 5 i 15 IBU. Dobivena vrijednost odgovara literaturnim podacima.

c) pH = 4,89

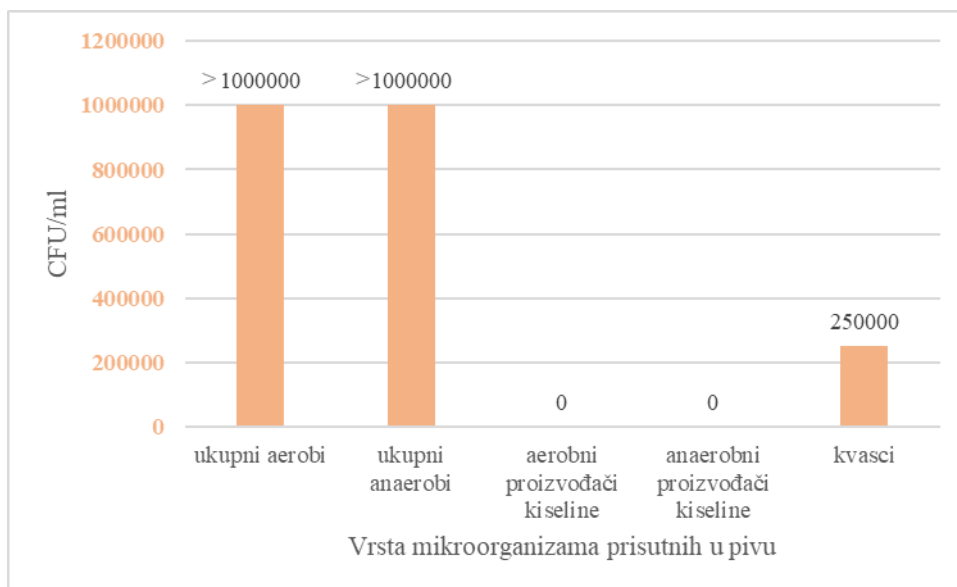
- Unutar očekivanog raspona za pH piva. Ova vrijednost je najviša od svih 11 izmjerenih uzoraka. Nije bilo rasta bakterija koje proizvode organske kiseline na WLD podlozi pa je veći pH i očekivan.

i) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 9)



Slika 30. Uzorak svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 9; vlastita fotografija)

Uzorak piva, svijetlo je, nefiltrirano i nepasterizirano lager pivo malih proizvođača sličnog mikrobiološkog profila kao i uzorak 8 (slika 31). Osim što kvasci tvore kolonije zlatno-bakrene boje i u većoj su koncentraciji.



Slika 31. Mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 9)

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca i bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 26.

Tablica 26. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
9	51,7 ng μL^{-1}	1,63	0,81

Provedena je PCR reakcija s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* te je došlo specifičnog umnažanja DNA. Vizualizacijom PCR produkata reakcije, na slici 32 redom su prikazani: DNA standard, PCR produkti uzoraka 1, 7, 9 i 11 nanaseni u paralelama, pozitivna kontrola *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* također u paraleli, te negativna kontrola Fermoale AY4, kvasac koji se koristi za fermentaciju piva gornjeg vrenja. Vidljive su DNA vrpce pozitivne kontrole u obje paralele na visini od 1200 pb što je malo veće od očekivane veličine DNA fragmenta od 1000 pb. U negativnoj kontroli, s kalupom DNA kvasca Fermoale AY4, nije došlo do umnažanja DNA što je i očekivano. Vidljiva je DNA vrpca PCR produkata na istoj visini kao u uzorku pozitivne kontrole pa zaključujemo da svijetlo lager pivo (uzorak 9) sadrži kvasac *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, koji se smatra kvascem koji kvare pivo. Ovo je jedino pivo u kojem je dokazana prisutnost *S. diastaticus* kvasca.



Slika 32. Prikaz gela nakon provedene gel elektroforeze PCR produkata reakcije s početnicama specifičnim za *S. diastaticus*. Kao kalup korištena je DNA uzoraka piva 1 (svijetlo, nefiltrirano India Pale Ale pivo), 7 (svijetlo, nefiltrirano, nepasterizirano lager pivo), 9 (svijetlo, nefiltrirano, nepasterizirano lager pivo), 11 (svijetlo, nefiltrirano, nepasterizirano lager pivo) te pozitivna i negativna kontrola (vlastita fotografija)

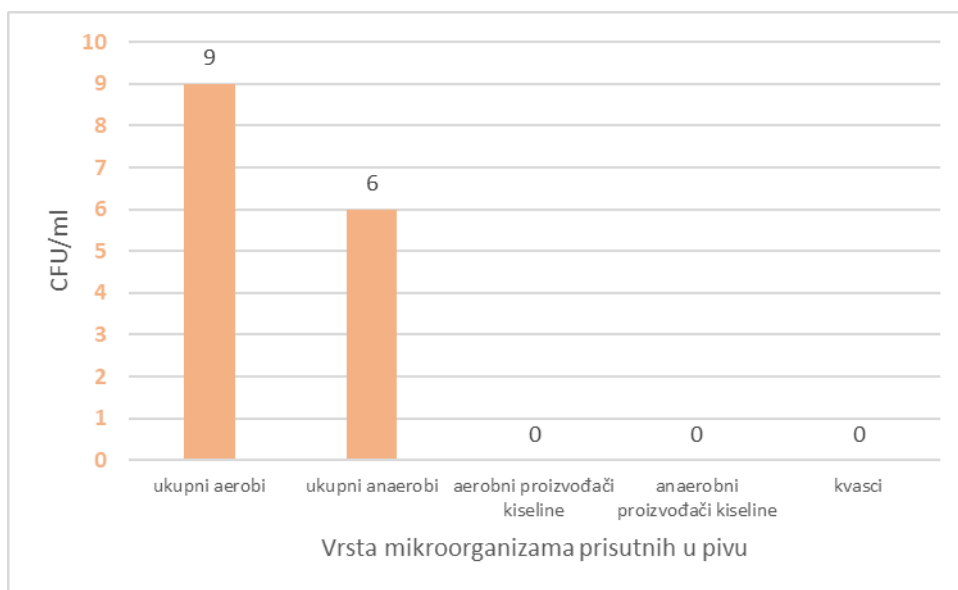
Nedostaju određivanja fizikalno – kemijskih karakteristika (boja, pH i gorčina piva) za ovaj uzorak jer se boca s pivom razbila tijekom potresa u Zagrebu 22. ožujka 2020. godine.

j) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike tamnog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 10)



Slika 33. Uzorak tamnog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 10; vlastita fotografija)

U nefiltriranom i nepasteriziranom tamnom pivu uzorka 10, pronađeno ja nešto aerobnih i anaerobnih mikroorganizama poraslih na UBA podlozi (slika 34).



Slika 34. Mikrobiološki profil tamnog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 10)

Uzorku je izolirana genomska DNA, a u tablici 27 je prikazana izmjerena koncentracija DNA i omjeri apsorbancija.

Tablica 27. Izmjerena koncentracija izolirane DNA, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
10	45,8 ng μL^{-1}	1,6	0,79

PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* dokazano je tamno lager pivo (uzorak 10) ne sadrži DNA kvasca *S. diastaticus* (slika 32), što je bilo i očekivano s obzirom da nije bilo rasta na SDA podlozi.

Uzorku tamnog piva 10 određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

- a) Boja = 61,26 EBC
 - Odgovara tamnom lager pivu.
- b) gorčina = 2,55 IBU
 - Očekivana vrijednost gorčine tamnog lager piva je između 22 i 30 IBU. Dobivena vrijednost je manja od očekivane zbog oksidacije piva.

c) pH = 4,83

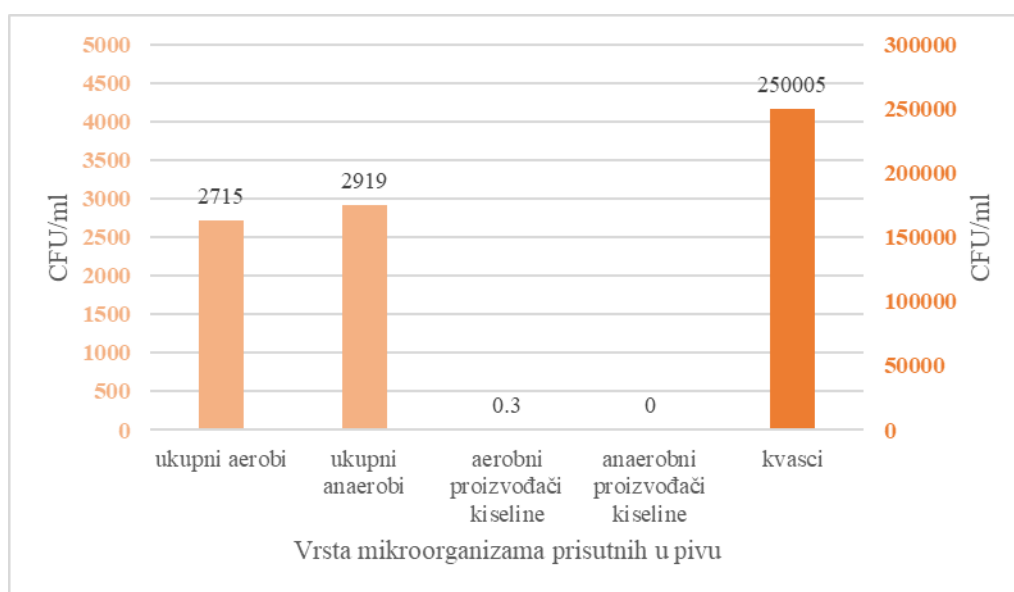
- Unutar očekivanog raspona za pH piva. Unutar očekivanog raspona za pH piva. Ova vrijednost je gotovo najviša među 11 izmjerenih uzoraka. Nije bilo rasta bakterija koje proizvode organske kiseline na WLD podlozi pa je veći pH i očekivan.

k) Mikrobiološke i fizikalno – kemijske odlike svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 11)



Slika 35. Uzorak svijetlog, nefiltriranog i nepasteriziranog lager piva (uzorak 11; vlastita fotografija)

Na slici 36 prikazan je mikrobiološki profil svijetlog, nefiltriranog, nepasteriziranog piva (uzorak 11). Na SDA podlozi vidljiv je rast sitnih, rozih kolonija te vrlo sitnih prozirnih kolonija. Na UBA podlozi porasle su kolonije u aerobnim i anaerobnim uvjetima.



Slika 36. Mikrobiološki profil svijetlog piva, nepoznat proizvođač (uzorak 11)

U aerobnim uvjetima rasta na WLD podlozi mikroskopiranjem su uočeni gram-negativni bacili, tj. bakterije koje proizvode organske kiseline štapićastog oblika.

Uzorku je izolirana genomska DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca i bakterija, a koncentracije izolirane DNA i omjeri apsorbancija prikazani su u tablici 28 i 29.

Tablica 28. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA bakterija, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
11	5,9 ng μL^{-1}	1,50	0,59

Nakon provedene PCR reakcije i gel elektroforeze u uzorku 11 nije pronađena niti jedna od 5 određivanih bakterija (nije prikazano na slici 18).

Tablica 29. Izmjerena koncentracija izolirane DNA po protokolu za izolaciju DNA kvasaca, omjer A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}

Broj uzorka	Koncentracija DNA	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
11	21,83 ng μL^{-1}	1,78	1,1

PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *S. diastaticus* dokazano je da svijetlo lager pivo (uzorak 11) ne sadrži DNA kvasca *S. diastaticus* (slika 32).

Uzorku piva 11 određene su ove fizikalno – kemijske karakteristike:

a) Boja = 31,50 EBC

- Odgovara svijetlom pivu.

b) Gorčina = 2,95 IBU

- Očekivana vrijednost gorčine svijetlog lager piva je između 5 i 15 IBU, čemu dobivena vrijednost i odgovara.

c) pH = 4,55

- Unutar očekivanog raspona za pH piva.

5. ZAKLJUČCI

- 1) Eksperimenti su provedeni s ciljem dobivanja mikrobiološkog profila piva te fizikalno-kemijskih karakteristika različitih vrsta piva.
- 2) U svim vrstama piva se nalaze aerobni i anaerobni mikroorganizmi. U komercijalno dostupnim pivima nalaze se aerobne i anaerobne bakterije koje proizvode organske kiseline.
- 3) Svijetlo India Pale Ale pivo (uzorak 1) i svijetlo lager pivo (uzorak 3) sadrže bakterijske kontaminante piva *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* i *Pediococcus damnosus*.
- 4) U niti jednom pivu nisu pronađene štetne, koliformne bakterije kao ni kvasci iz roda *Brettanomyces*, ali je u nekim uzorcima piva registrirana prisutnost proizvodnog kvasca.
- 5) U ovom istraživanju nije dokazana direktna povezanost između mikrobiološkog profila pojedinog piva i procesa njegove filtracije.
- 6) *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, kvasac koji se smatra pivskim kontaminantom pronađen je u svijetlom lager pivu malog proizvođača piva (uzorak 9).
- 7) Detektirani mikroorganizmi u svim vrstama piva nisu znak zdravstvene neispravnosti piva, već utječu na organoleptičke promjene, mutnoću, talog i promjenu okusa piva. Pravilnik o mikrobiološkim standardima jamči da je pivo zdravstveno ispravno, tj. proizvedeno i otočeno u primjerenim higijenskim uvjetima.
- 8) U vrstama piva malog proizvođača piva (uzorci 8 i 10) u kojima nema bakterija koje proizvode organske kiseline, pH vrijednost je veća nego u onima gdje ima bakterija koje sintetiziraju organske kiseline.
- 9) Gorčina svih uzoraka piva je puno manja od očekivanih vrijednosti jer je mjerena u odstajalim pivima koja su bila izložena zraku. Tijekom tog čuvanja u pivu pod djelovanjem kisika iz zraka dolazi do oksidacije α -kiselina čime se smanjuje gorčina piva.

6. LITERATURA

Anonymous (1985) Analitika EBC III i mikrobiološka analitika EBC, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, str. 33- 36; 209-212.

Anonymous 1 (2021) *Saccharomyces cerevisiae* slika, <https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae#/media/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg>. Pristupljeno 01. veljače 2021.

Anonymous 2 (2020) Gram-pozitivne i gram-negativne bakterije slika, <<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>>. Pristupljeno 16. prosinca 2020.

Anonymous 3 (2021) Nanodrop, <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>>. Pristupljeno 13. siječnja 2021.

Anonymous 4 (2021) Nanodrop, <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN52645-E-1214M-NanoDrop-Plants.pdf>>. Pristupljeno 13. siječnja 2021.

Anonymous 5 (2020) PCR skica, <<https://longroadtoinnovation.wordpress.com/2018/11/01/polymerase-chain-reaction-innovation-that-revolutionized-molecular-biology/>>. Pristupljeno 16. prosinca 2020.

EBC- Analytica (1998) EBC-European Brewery Convention, <<https://europeanbreweryconvention.eu/ebc-newsletter-issue-1-june-2018/>>. Pristupljeno 03. ožujka 2020.

Aron P. M., Shellhammer T. H. (2010) A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *J. I. Brewing*. **116**, 369-380.

Bamforth, C. W. (2008) Beer and health. U: Beer: A Quality Perspective. Elsevier, Burlington MA, str. 229-253.

Barney, M. C., Kot, E. J. (1992) A comparison of rapid microbiological methods for detecting beer spoilage microorganisms. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **29**, 91-95.

- Baxter, A. G. (2001) Louis Pasteur's beer of revenge. *Nat. Rev. Immunol.* **1**(3), 229-232.
- Bay, P., Wodarg, M. G. D., Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Comp.
- Beazly, M. (1994.) *Michael Jackson's beer companion*, A DBP book, Duncan Baird publishers, London.
- Behr, J., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2006) Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microb.* **72**(10), 6483-6492.
- Beluhan, S. (2015) Predavanja iz kolegija Mikrobiološke i kemijsko-fizikalne metode nadzora procesa proizvodnje piva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_bi_im_i_tsp/mikrobioloske_i_kemijsko_fizikalne_metode_nadzora_procesa_proizvodnje_piva>. Pristupljeno 04. siječnja 2021.
- Callemien, D., Collin, S. (2007) Involment of flavanoids in beer color instability during storage. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9066-9073.
- Cheyrier V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 223S-229S.
- Collin S., Jerkovic V., Bröhan M., Callemien D. (2013) Polyphenols and Beer Quality
- DeLange, A. J. (2008) The standard reference method of beer color specification as the basis for a new method of beer color reporting. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **66**(3), 143-150.
- Eberhardt M. V., Lee C. Y., Lui R. H. (2000) Nutrition-antioxidant activity of fresh apples. *Nature*. **405**(6789), 903- 904.
- Enari, T-M. (1999) *From Beer to Molecular Biology*, Carl, str. 17.
- Gilliland, R. B. (1967) Wild yeast spoilage. *Brew. Guard.* **96**, 37-45.
- Grba S. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, str. 15-43, 69-128
- Hajsig, D., Delaš, F. (2016) *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*, Hrvatsko mikrobiološko društvo, str. 27-46, 51-54, 89-98, 123-131, 153-155.

- Jackson, M. (1998) *The new world guide to beer*, A Quarto book, Running press book publishers, Philadelphia.
- Jackson, M. (2000) *Great beer guide*, Dorling Kindersley Limited, London.
- King, B. M., Duineveld, C. A. A. (1999) Changes in bitterness as beer ages naturally. *Food Qual. Prefer.* **10**(4-5), 315-324.
- Kunze, W. (1996) *Technology, Brewing and Malting*, international edition, VLB, Berlin, str. 137-156.
- Lee K., Kim Y., Kim D., Lee H., Lee C. (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6516-6520.
- Marić V. (2009) *Tehnologija piva*, Veleučilište u Karlovcu, str. 15-23, 175-193.
- Marić, V., Bohunicki, J. (1987) *Priručnik za mikrobiologe u pivarstvu*, Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Zagreb.
- Marić, V., Nadvornik, Z. (1995) *Pivo tekuća hrana. Prehrambeno-tehnološki inženjering*, Zagreb.
- Maye, J. P., Smith, R. (2016) Dry hopping and its effects on the international bitterness unit test and beer bitterness. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **53**, 134-136.
- McMurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J. (1997) Evaluation of rapid colloidal stabilization with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *J. Am. Soc. Brev. Chem.* **55**, 38-43.
- Mortimer R. K. (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **4**, 403-409.
- Nitzsche, F., Eggers, G. (2002) Praćenje higijene u pivovarama – mikrobiološki laboratorij kao davatelj usluge. *Svijet piva.* **48**, 6-8.
- Pasteur, L., Faulkner, F. (1879) *Studies on fermentation: the diseases of beer, their causes, and the means of preventing them*, Kraus Reprint.
- Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice (2008) *Narodne novine* **74**, Zagreb.

Priest, F. G., Campbell, I. (1996) *Brewing microbiology*, second edition, Chapman&Hall, London.

Rainbow, C. (1981) Beer spoilage microorganisms. U: *Brewing Science*, vol 2, Pollock, J. R. A. (ured.) Academic Press, New York and London, 491-550.

Šavel, J., Košin, P., Brož, A. (2010) Anaerobic and aerobic beer aging. *Czech J. Food Sci.* **28**, 18-26.

Van Vuuren, H. J. J. (1996). Gram-negative spoilage. *Brewing Microbiology*. Chapman and Hall London, 163-187.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Jukov

Ime i prezime studenta