

Pojavnost plijesni na zelenim, prženim i mljevenim zrnima kave različitog porijekla

Gracin, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:836595>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Mia Gracin
0058214870

**Pojavnost plijesni na zelenim, prženim i mljevenim zrnima
kave različitog porijekla**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Željko Jakopović

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Pojavnost plijesni na zelenim, prženim i mljevenim zrnima kave različitog porijekla

Mia Gracin, 0058214870

Sažetak:

Kava je jedan od najpopularnijih napitaka u svijetu koje se, zbog svojeg kemijskog sastava, smatra funkcionalnim pićem. Dvije najvažnije vrste kave na tržištu su *Coffea arabica* i *Coffea canephora* var. *robusta* koje se uzgajaju na tropskim područjima diljem svijeta. Kao i većina drugih namirnica, kava je podložna kontaminaciji plijesnima, ali i bakterijama koje uzrokuju razne bolesti stoga je važno provoditi kontrolu kvalitete proizvoda. Cilj ovog rada bio je odrediti pojavnost plijesni na zelenim, prženim i mljevenim zrnima kave različitog podrijetla. Plijesni su izolirane direktnim naciepljivanjem zrnja kave i mljevene kave na hranjive podloge, a za identifikaciju plijesni korištena je metoda uboda u tri točke na agaru te mikroskopiranje svjetlosnim mikroskopom. Promatranjem morfoloških karakteristika izoliranih plijesni, provedena je identifikacija do razine roda. Izolirane i identificirane plijesni pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Chaetomium*. Analizom dobivenih rezultata je ustanovljeno da prisutnost rodova plijesni ovisi o vrsti i obliku kave te o geografskom položaju uzgoja.

Ključne riječi: kava, plijesni, izolacija, identifikacija

Rad sadrži: 23 stranice, 10 slika, 7 tablica, 25 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Željko Jakopović

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Occurrence of mold on green, roasted and ground coffee beans of different origins

Mia Gracin, 0058214870

Abstract:

Coffee is one of the most popular beverages in the world, which, due to its chemical composition, is considered a functional drink. The two most important types of coffee on the market are *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* grown in tropical areas around the world. Like most other foods, coffee is subject to contamination by molds and bacteria that cause various diseases, so it is important to control the quality of the product. The aim of this work was to determine the occurrence of mold on green, roasted and ground coffee beans of different origins. Molds were isolated by direct inoculation of coffee beans and ground coffee onto nutrient media, and the method of three-point puncture on agar and microscopy with a light microscope was used to identify isolated molds. Identification (carried out to the genus level) was done by observing the morphological characteristics of the isolated molds. Isolated and identified molds belonged to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Chaetomium*. The analysis of the obtained results found that the presence of mold genera depends on the type and form of coffee and on the geographical location of cultivation.

Keywords: coffee, mold, isolation, identification

Thesis contains: 23 pages, 10 figures, 7 tables, 25 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Željko Jakopović, PhD

Thesis defended: September 19th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KAVA	2
2.1.1. MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI.....	4
2.2. PLIJESNI	5
2.2.1. IDENTIFIKACIJA PLIJESNI.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. UZORCI.....	7
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE ZA ODREĐIVANJE BROJA BAKTERIJA	7
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE ZA IZOLACIJU I IDENTIFIKACIJU PLIJESNI.....	9
3.1.4. PRIBOR I APARATURA	10
3.2. METODE	11
3.2.1. ODREĐIVANJE BROJA KOLONIJA BAKTERIJA I PLIJESNI	11
3.2.2. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA PLIJESNI	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. REZULTATI	14
4.1.1. REZULTATI ODREĐIVANJA BROJA KOLONIJA	14
4.1.2. REZULTATI IZOLACIJE I IDENTIFIKACIJE.....	14
4.2. RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČCI	20
6. POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

Kava je jedan od najkonzumiranijih napitaka u svijetu. Zbog svojih sastojaka, kava se smatra funkcionalnim pićem koje u malim količinama može pridonijeti boljem zdravlju ljudi. Regija u kojoj je potrošnja kave najveća je Europa, a slijede ju Azija i Oceanija te Sjeverna i Južna Amerika (Lim i sur., 2019).

Biljka kave zahtjeva posebne klimatske uvjete za rast koji su joj omogućeni u regijama oko ekvatora. Iz tog razloga su se najveći proizvođači kave smjestili baš u ta područja. Čak tri četvrtine proizvedene kave je uzgojeno na malim farmama diljem svijeta. Neki od najvećih izvoznika kave u svijetu su Brazil, Jemen, Indonezija, Etiopija, India, Vijetnam itd. Procjenjuje se da ukupno 250 milijuna ljudi ovisi o proizvodnji kave u tim zemljama (Van der Stegen, 2003). Kava koja je stavljena na tržište se gotovo u potpunosti sastoji od dvije vrste. Najzastupljenija je Arabica, kiselkasta i aromatična kava slabog okusa. S druge strane je Robusta koja ima puniji okus, ali je više gorka i manje aromatična (Wintgens, 2004). Ostale vrste čine manje od 2% kave na tržištu.

Kako bi se dobio oblik kave pogodan za konzumiranje, potrebno je proći niz procesa obrade. Pritom, u različitim fazama (uključujući berbu, obradu, sušenje, transport i skladištenje), može doći do kontaminacije plijesnima (Girma i Sualeh, 2022). Najčešće prisutne plijesni u zrnu kave su *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Osim što svojim rastom uništavaju sama zrna, plijesni proizvode sekundarne metabolite, mikotoksine, koji mogu biti štetni za zdravlje ljudi i uzrokovati niz bolesti. Iz tog razloga je važno provoditi kontrolu kvalitete proizvoda.

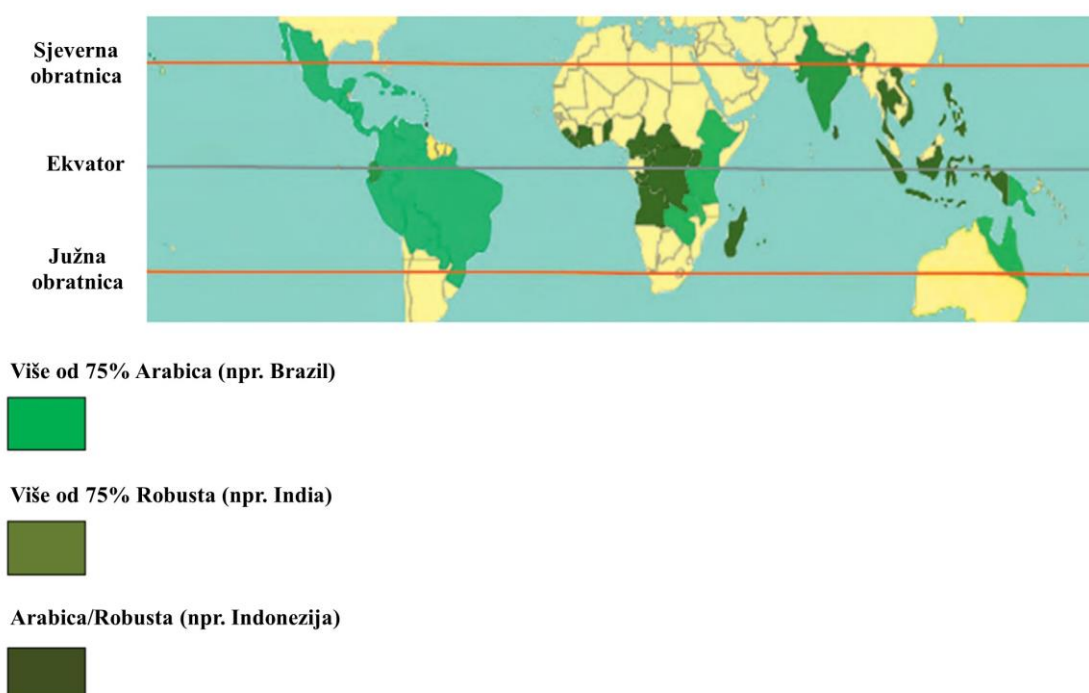
Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati plijesni (do razine roda) u dobivenim uzorcima kave. Također, željelo se ispitati zadovoljavaju li dobiveni uzorci kave kriterije postavljene od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KAVA

Kava, lat. *Coffea*, je rod koji spada u porodicu *Rubiaceae*. Postoji preko 90 vrsta kave od kojih su dvije ekonomski najvažnije *Coffea arabica* i *Coffea canephora*. Ponekad se vrstu *C. canephora* naziva i *C. robusta* jer je ime njene najpoznatije sorte *robusta*. Takvo imenovanje nije ispravno zato što postoje i druge sorte *C. canephora* kao što je *conilon* (Farah i Ferreira dos Santos, 2015). Arabica, koja izvorno potječe iz Etiopije, čini oko 60% ukupne kave koja se uzgaja u svijetu. Preostalih 40% uglavnom otpada na Robustu, koja potječe iz šuma središnje Afrike (Leitão, 2019; Wintgens, 2004).

Područja na kojima će uspjeti uzgoj kave jako ovise o klimi potrebnoj za rast same biljke. Najvažniji klimatski čimbenici su temperatura i količina padalina. Temperatura ne smije drastično varirati kroz godinu te ne smije biti ni preniska ni previsoka. Padaline su potrebne za rast same biljke, no za vrijeme cvjetanja nisu jako poželjne. Iz tih razloga su tropska područja i više nadmorske visine najpogodnije za uzgoj kave. Tropske regije osiguravaju dovoljnu količinu padalina, ali i potrebno sušno razdoblje dok nadmorske visine osiguravaju optimalnu temperaturu (Adhikari i sur, 2020).



Slika 1. Raspodjela svjetske proizvodnje kave (Paterson i sur., 2014)

Područja na kojima se uzgajaju Arabica i Robusta se razlikuju, no u nekim regijama je moguće pronaći obje vrste (slika 1). Arabica se pretežno uzgaja u regijama koje su smještene u Središnjoj i Južnoj Americi te istočnom dijelu Afrike (Van der Stegen, 2003). Raste na nadmorskim visinama između 1300 i 2000 m (Lim i sur., 2019). Optimalna temperatura za rast je između 18 i 22 °C, a potrebna količina padalina godišnje je između 1200 i 1800 mm (Adhikari i sur., 2020). Robusta se uglavnom uzgaja u područjima zapadne Afrike i južne Azije (Jeszka-Skowron i sur., 2016). Raste u toplijim područjima na nadmorskim visinama manjim od 1000 m (Lim i sur., 2019). Optimalna temperatura iznosi između 22 i 28 °C dok je potrebna količina oborina između 2000 i 2500 mm (Adhikari i sur., 2020).

Arabica i Robusta se ne razlikuju samo po okolišnim uvjetima potrebnim za rast, već i po mnogim drugim značajkama (Leitão, 2019). Jedna od navedenih značajki je razlika u izgledu biljke i zrna (slika 2). Biljka Arabice doseže visinu od 6 m dok Robusta može doseći i visinu od 10 m (Lim i sur., 2019). Zrna Robuste su manja i okruglija od zrna Arabice. Razlike u veličini dijelom su genetski uvjetovane, no mogu biti i rezultat utjecaja okolišnih uvjeta (Wintgens, 2004).



Slika 2. Izgled biljke i zrna Arabice (1A, 1B) i Robuste (2A, 2B) (Wintgens, 2004)

Razlike postoje i kada je riječ o otpornosti na nametnike i bolesti. Kao i svi usjevi, kava je podložna raznim štetnicima, bakterijama i plijesnima. Prisutnost nekih nametnika jako ovisi o okolišnim uvjetima koji su prisutni odnosno o području na kojem se uzgaja kava. Tako Arabicu mogu napadati nametnici koji ne napadaju Robustu jer ih nema u područjima gdje se ona uzgaja i obratno (Wintgens, 2004). Jedna od najvećih prijetnji kave je kukac *Hypothenemus hampei* koji uzrokuje trulež bobica. Šteta uzrokovana insektima može povećati vjerojatnost nastanka gljivičnih bolesti kao što su bolest bobica kave, bolest uvenuća kave te hrđu lista kave (Adhikari i sur., 2020). U odnosu na Arabicu, Robusta ima veću rezistenciju prema bolestima (Lim i sur., 2019).

Kemijski sastav zelenih zrna Arabice i Robuste još je jedna od značajki po kojoj se vrste mogu razlikovati. Ona su bogata bioaktivnim spojevima kao što su kofein, tokoferol, klorogenska kiselina i njeni derivati (Leitão, 2019; Jeszka-Skowron i sur., 2016). Zeleno zrno Robuste može sadržavati i do dva puta više kofeina od Arabice (Leitão, 2019). Sadržaj kofeina u zrnu Arabice iznosi 1,0-1,4%, a u zrnu Robuste 1,8-3,5 % (Wintgens, 2004). S druge strane, količine tokoferola veće su u zrnu Arabice (Leitão, 2019). Jeszka-Skowron i sur. (2016) su u svom istraživanju utvrdili da su koncentracije klorogenske kiseline i njenih derivata otprilike jednake kod obje vrste. Navedeni spojevi djeluju antioksidativno na ljudsko tijelo te smanjuju učestalost pojave nekih bolesti kao što su rak, dijabetes i pretilost (Leitão, 2019; Jeszka-Skowron i sur., 2016).

2.1.1. Mikrobiološki kriteriji

Sva hrana stavljena na tržište mora poštovati mikrobiološke kriterije koje je Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donijelo u lipnju 2008. godine. Navedeni kriteriji se nalaze u Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (dalje u tekstu: Pravilnik) koji je objavljen u Narodnim novinama br. 74/2008 (Benussi-Skukan i sur., 2009).

Za aerobne mezofilne bakterije i plijesni granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim je 10^2 CFU g^{-1} dok za *Enterobacteriaceae* granična vrijednost iznosi 10 CFU g^{-1} . Vrijednosti iznad 10^3 CFU g^{-1} za aerobne mezofilne bakterije i plijesni te 10^2 CFU g^{-1} za *Enterobacteriaceae* smatraju se nezadovoljavajućim. Rezultat analize se smatra prihvatljivim jedino ako se vrijednosti ispitivanih parametara uzoraka nalaze između dviju ranije navedenih vrijednosti (Benussi-Skukan i sur., 2009).

2.2. PLIJESNI

Plijesni su višestanične, filamentozne gljive (Teferi i Ayano, 2019) koje obuhvaćaju veliki broj vrsta te pripadaju carstvu *Gljiva*. U prirodnom okruženju rastu u obliku gustih razgranatih ili nerazgranatih niti (hifa) koje tvore isprepletenu mrežu zvanu micelij. Ovakav oblik tijela idealan je za preživljavanje u prirodi (Kossen, 2000). Zahvaljujući činjenici da podnose širok raspon uvjeta na kojima mogu preživjeti, moguće ih je pronaći na mnogim staništima diljem svijeta (Sekar i sur., 2008). Također, mogu koristiti veliki broj supstrata kao što su ugljikohidrati, proteini i organske kiseline. To im omogućava rast na velikom broju namirnica kao što su voće, povrće, žitarice, pića i mliječni proizvodi (Dagnas i Membre, 2012).

Plijesni mogu biti korisne i primjenjive u životu ljudi. Neke vrste se koriste u biotehnologiji i prehrambenoj industriji za proizvodnju raznih lijekova, prehrambenih proizvoda i pića. Nasuprot tome, mogu biti i patogene za biljke, životinje i ljude. Mnoge vrste napadaju biljke uzgojene za prehranu ljudi i životinja te uništavaju svježe i obrađene proizvode što može rezultirati velikim ekonomskim gubitcima (Atanda i sur., 2011). Također, u hranu i krmiva mogu izlučivati mikotoksine koji su toksični za ljude i životinje.

Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljiva koji izazivaju mikotoksikoze, akutna ili kronična oboljenja (ovisno o vrsti i dozi toksina). Dugogodišnjim izlaganjem mikotoksinima dolazi do pojave kroničnog oblika bolesti. Mikotoksikoze su česte u zemljama koje se nalaze u tropskim područjima, a osim što uzrokuju bolesti, mikotoksini mogu biti kancerogeni, genotoksični i mutageni (Peraica i Rašić, 2012). Neke od bolesti koje uzrokuju su leukopenija, imunodeficijencija pa čak i rak jetre (Pakshir i sur., 2021). Kod životinja, bolesti uključuju oštećenja jetre i bubrega, napad na središnji živčani sustav te kožne bolesti (Atanda i sur., 2011). Većina mikotoksina je vrlo termostabilna i rezistentna na učinke UV svjetla što znatno utječe na težinu njihovog uništenja (Peraica i Rašić, 2012; Atanda i sur., 2011). Okratoksin A (OTA), aflatoksini i fumonizini samo su neki od mikotoksina proizvedeni od strane plijesni (Adhikari i sur, 2020).

Glavni rodovi filamentoznih gljiva koji proizvode mikotoksine su *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. *Aspergillus* je jedan od ekonomski, ekološki i medicinski najvažnijih rodova plijesni (Asan, 2003). Poznato je više od 400 različitih vrsta tog roda (Houbraken i sur., 2020). Neke od njih se koriste u industriji pića, farmaceutskoj i enzimskoj industriji. Neke pak mogu izazvati bolesti kod ljudi. Poznato je 20-ak takvih vrsta, a neke od njih su *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Većina vrsta unutar roda *Aspergillus* je slabo

poznata, no među njima postoje i neke od najproučavanijih vrsta plijesni. Široko su rasprostranjene zahvaljujući činjenici da rastu na mnogo različitih izvora ugljika (Goldman i Osmani, 2007). Može ih se pronaći u tlu, vodi, zraku, sjemenu, hrani itd (Asan, 2003).

Penicillium je također široko rasprostranjen rod s više od 450 poznatih vrsta (Houbraken i sur., 2020). One kontaminiraju širok raspon hrane i mogu rasti na niskim temperaturama. Stoga često kvare hranu koja se nalazi u hladnjaku, osobito sir. Mogu proizvoditi brojne mikotoksine, ali i spojeve s antibiotskim svojstvima. Najpoznatiji antibiotik, penicilin, koristi se za liječenje brojnih bakterijskih infekcija (Bullerman, 2003).

Fusarium je rod plijesni čije se vrste mogu pronaći na poljima i u tlu diljem svijeta. Rod ima veliki broj vrsta od kojih su neki patogeni prema biljkama. Česta meta zaraze su žitarice pri čemu mogu napasti i samo zrno (Bullerman, 2003). Ustanovljeno je da je veći broj onih vrsta koje nisu patogene od onih koje uzrokuju bolesti. Većina vrsta ovog roda proizvodi niz sekundarnih metabolita, koji uvelike variraju u kemijskom obliku te su toksični i/ili kancerogeni za ljude i domaće životinje (Brown i Proctor, 2013).

Prijašnja mikrobiološka istraživanja kave pokazala su da su navedeni rodovi prirodni kontaminanti kave (Batista i sur., 2003). Zrna kave mogu biti kontaminirana prilikom samog rasta i berbe, ali i tijekom različitih faza obrade (Casas-Junco i sur., 2017). Jedan od načina zbog kojeg može doći do kontaminacija je nepravilno sušenje i ponovno vlaženje zelenih zrna kave (Van der Stegen, 2003). Osim toga, do kontaminacija može doći i za vrijeme transporta i skladištenja već obrađenih zrna (Casas-Junco i sur., 2017). Kontaminacijom dolazi do nastanka infekcija zbog kojih potrošači odbijaju konzumiranje proizvoda što proizvođačima može stvoriti velike ekonomske gubitke (Dagnas i Membre, 2012).

2.2.1. Identifikacija plijesni

Kako bi se moglo odrediti koji rodovi i vrste plijesni su prisutne u nekom uzorku, potrebno je provesti identifikaciju. Postoji više vrsta identifikacije kao što su morfološka i filogenetska (Samson i Varga, 2009). Najjednostavnija metoda je identifikacija na temelju oblika odnosno promatranja morfoloških karakteristika plijesni. Pritom je potrebno uzeti u obzir mnogo parametara kao što su tekstura i boja micelija, dimenzije i stupanj rasta, izgled reversa kolonije te izgled i oblik spora (Kossen, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Uzorci kava su dobiveni od QUAHWA d.o.o. te su bili dopremljeni u papirnatim pakiranjima. Korištene su dvije različite vrste kave, *Coffea arabica* (Arabica) i *Coffea canephora*. Uzorci *C. canephora* sadržavali su dvije sorte, *C. canephora* var. *robusta* (Robusta) i *C. canephora* var. *conilon* (Conilon). Arabica i Conilon su nabavljeni iz Brazila, a Robusta iz Gvatemale. Svaka vrsta/sorta kave je bila u obliku zelenih i prženih zrna te mljevena. Ukupno je bilo 9 uzoraka koji su se ispitivali.

3.1.2. Hranjive podloge za određivanje broja bakterija

Za određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima kava, korišten je hranjivi agar (Biolife, Italija) čiji je sastav prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Sastav podloge (hranjivi agar)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
mesni ekstrakt	3
NaCl	5
K ₃ PO ₄	0,3
pepton	15
agar	18

U destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 7,3, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Za određivanje broja bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae* u uzorcima kava, korišten je ljubičasto crveni žučni agar (LJCŽA) (Biolife, Italija) čiji je sastav prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Sastav podloge (LJCŽA)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
kristal violet	0,002
neutralna crvena	0,03
pepton	7
NaCl	5
kvašćev ekstrakt	3
dekstroza	10
žučne soli	1,5
agar	13

U destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 7,4, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Za određivanje broja bakterija mliječne kiseline u uzorcima kava, korišten je MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar (Biolife, Italija) čiji je sastav prikazan u tablici 3.

Tablica 3. Sastav podloge (MRS)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
pepton	10
goveđi ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
glukoza	20
tween 80	1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
natrijev acetat	5
agar	15

U destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

3.1.3. Hranjive podloge za izolaciju i identifikaciju plijesni

Za izolaciju i identifikaciju plijesni iz dobivenih uzoraka kava korištene su hranjive podloge čiji je sastav prikazan u tablicama 4-6.

a) Sladni agar

Tablica 4. Sastav podloge (sladni agar)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
maltoza	12,5
dekstrin	2,5
Glicerol	1,0
Peptokompleks	2,6
agar	17

Sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta, a pH vrijednost podloge u konačnici iznosi 4,6.

b) Dikloran 18% glicerol (DG18) agar

Tablica 5. Sastav podloge (DG18)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
glukoza	10
pepton	5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
glicerol	220
dikloran	0,02
kloramfenikol	1
agar	15

Sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta, a pH vrijednost podloge u konačnici iznosi 5,5- 5,8.

c) CZAPEKov agar s ekstraktom kvasca (CYA)

Tablica 6. Sastav podloge (CYA)

Sastav	Koncentracija (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	1
Ekstrakt kvasca	5
Saharoza	30
agar	15

Osim navedenog, u CYA podlogu dodaje se i 10 mL Czapekova koncentrata čiji je sastav prikazan u tablici 7.

Tablica 7. Sastav Czapekova koncentrata

Sastav	Masa (g)
NaNO ₃	30
KCl	5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	5
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,05

Sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta, a pH vrijednost podloge u konačnici iznosi 6,7.

Sve hranjive podloge pripremljene su prema uputama proizvođača, točnije, odvagane su propisane količine svake pojedine dehidrirane podloge, pomiješane s po 1 L destilirane vode, zagrijavane do vrenja i sterilizirane.

3.1.4. Pribor i aparatura

Prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju, korišteni su sljedeći pribori i aparatura:

- Mikrobiološke epruvete (16 × 160 mm)
- Stalak za epruvete
- Petrijeve zdjelice (φ 10 cm)
- Histološka pinceta

- Žlica
- Plastične lađice
- Plastični štapići po Drigalskom
- Mikrobiološka lanceta
- Mikrobiološka igla
- Predmetno i pokrovno stakalce
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vaga (Sartorius, Njemačka)
- Vibro mikser V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- Brojač kolonija BZG30 (WTW, Weilheim, Njemačka)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Svjetlosni mikroskop (Olympus, Japan, CX21)

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje broja kolonija bakterija i plijesni

Broj kolonija bakterija (aerobne mezofilne bakterije i bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae*) i plijesni potrebno je odrediti za pržena i mljevena zrna kave kako bi se utvrdilo poštuju li ispitivani uzorci zadane kriterije postavljene Pravilnikom. Također u sklopu ovog rada, određivan je broj kolonija bakterija i plijesni na zelenim zrnima različitih sorti kava. Osim mikroorganizama zadanih Pravilnikom, ispitala se i prisutnost bakterija mliječne kiseline u uzorcima kava. Određivanje je provedeno metodom neizravnog naciepljivanja serije decimalnih razrjeđenja. Izvagan je jedan gram svake vrste kave koji je pomoću žlice (ili pincete za zrna) prebačen u epruvetu s fiziološkom otopinom. Suspenzija se zatim homogenizira vibro mikserom.

Pipetmanom je uzet 1 mL homogenizirane suspenzije koji je potom ispušten u drugu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine čime je dobiveno prvo razrjeđenje. Postupak je ponavljen još jednom kako bi se dobilo drugo razrjeđenje. Na podloge je naciepljivano po 0,1 mL odabranog razrjeđenja. Na LJCŽA podloge je naciepljeno prvo razrjeđenje i originalna suspenzija, na hranjivi i sladni agar je naciepljeno prvo i drugo razrjeđenje dok su na MRS podlogu naciepljena sva tri razrjeđenja. Petrijeve zdjelice sa sladnim agarom su inkubirane

tjedan dana na 25 °C, a ostale 48 sati na 37 °C. Porasle kolonije su izbrojane pomoću brojača kolonija te su izračunate CFU vrijednosti prema formuli 1:

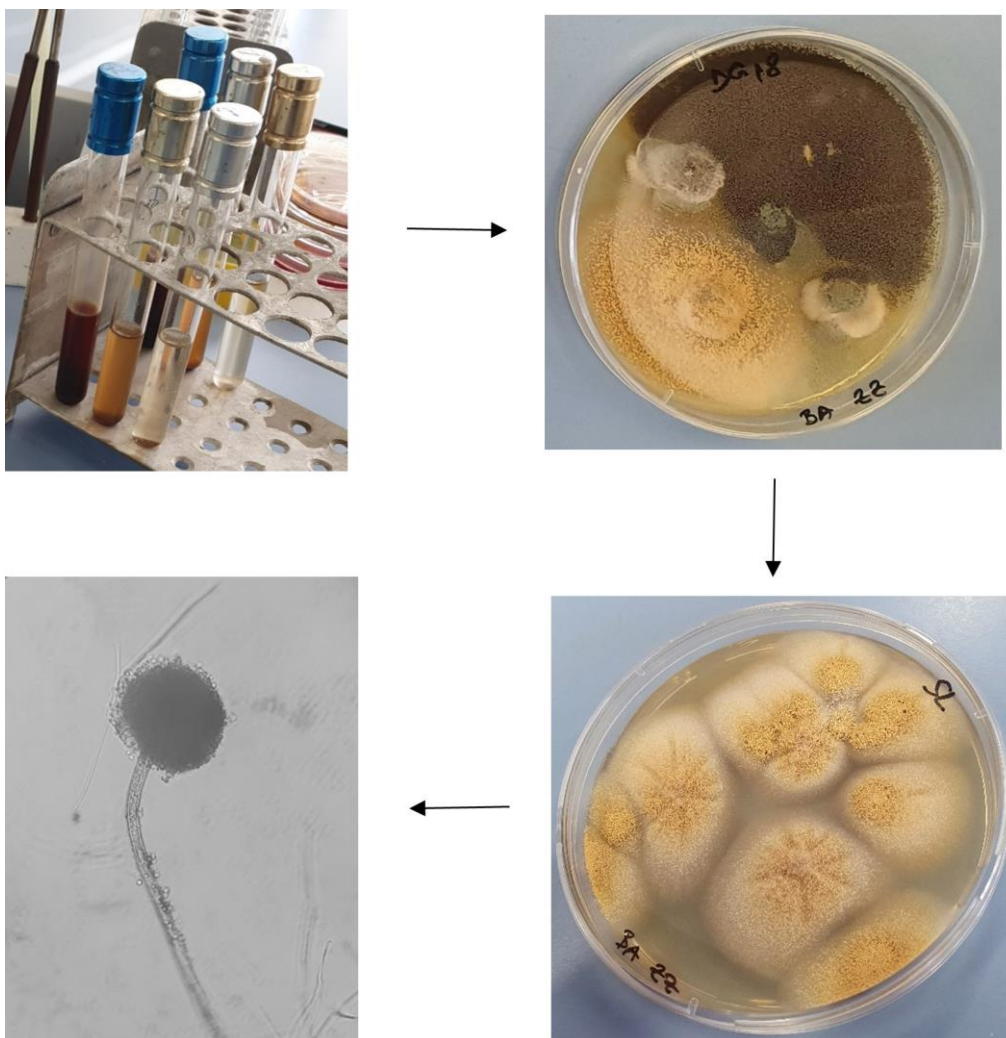
$$\text{CFU} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{upotrijebljen volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja (mL)} \quad [1]$$

3.2.2. Izolacija i identifikacija plijesni

Uzorci kave direktno su postavljeni na tri različite hranjive podloge s ciljem izolacije i identifikacije plijesni: sladni agar, DG18 i CYA. Mljevena kava posipana je po podlozi dok je po 5 zrna svake vrste kave aseptično, pincetom, stavljeno na svaku od podlogu. Petrijeve zdjelice svih uzoraka su inkubirane na 25 °C do porasta plijesni.

Za izolaciju poraslih plijesni korištena je metoda uboda u tri točke. Sterilnom mikrobiološkom lancetom zagrebena je po površini plijesni koju se izolira te je uzorak plijesni lancetom nacijepljen na agar u tri točke. Taj postupak ponovljen je za svaku vrstu koja je porasla na hranjivim podlogama te su Petrijeve zdjelice stavljene na inkubaciju pri 25 °C.

Nakon 5-7 dana uzgoja pri 25 °C, porasle su čiste kulture izoliranih plijesni koje je zatim trebalo identificirati. Prvi korak pri identifikaciji je bilo makroskopsko analiziranje, a potom i mikroskopsko. Dio micelija plijesni je uzet sterilnom mikrobiološkom iglom i uronjen u kapljicu vode na predmetnom stakalcu te mikrobiološkim iglama razvučen u tanki sloj. Postavljeno je pokrovno stakalce te je uzorak stavljen pod svjetlosni mikroskop. Dobiveni rezultati makroskopskog i mikroskopskog analiziranja su uspoređeni kako bi se dobili konačni rezultati identifikacije. Cijeli postupak izolacije i identifikacije je prikazan na slici 3.



Slika 3. Shema izolacije i identifikacije plijesni (vlastita fotografija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

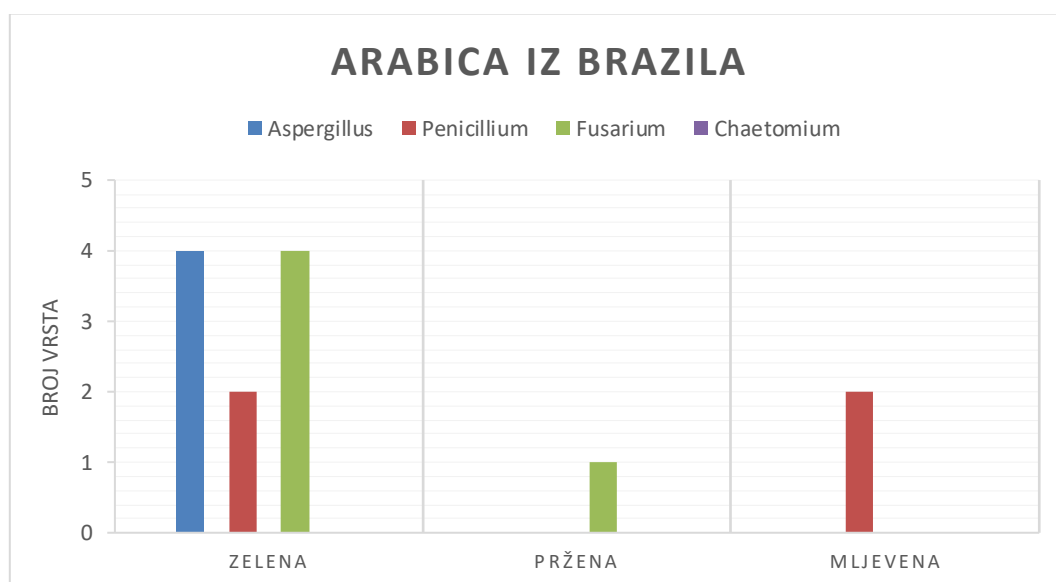
4.1. REZULTATI

4.1.1. Rezultati određivanja broja kolonija

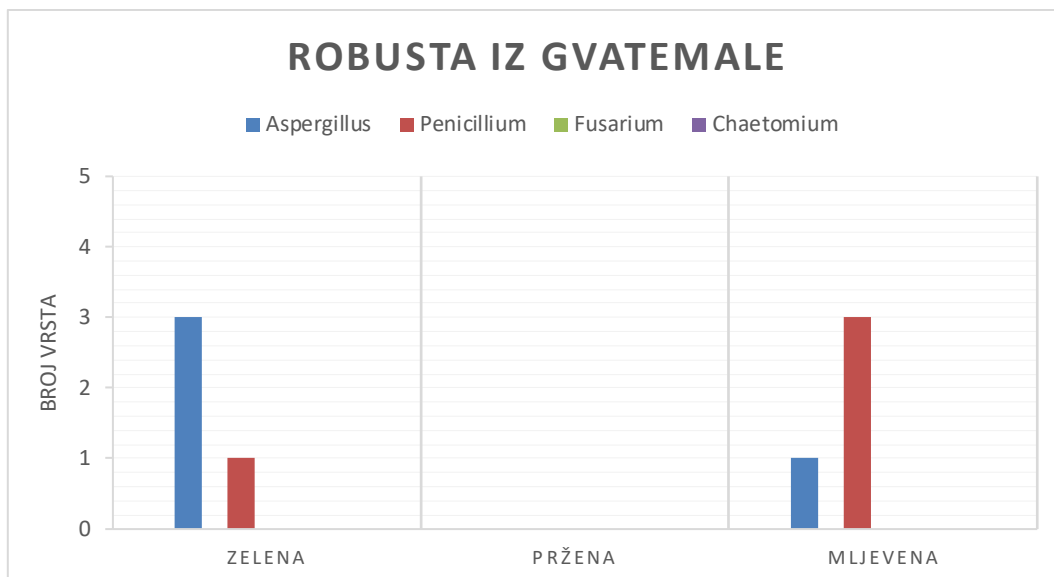
Računanjem broja kolonija bakterija i plijesni poraslih na hranjivim podlogama, ustanovljeno je da su svi postavljeni kriteriji zadovoljeni, odnosno broj poraslih kolonija bakterija i plijesni bio je manji od onog propisanog Pravilnikom. Nadalje, bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* nisu bile prisutne ni u jednom uzroku kave, dok su bakterije mliječne kiseline bile prisutne samo na uzorcima prženih zrna Robuste.

4.1.2. Rezultati izolacije i identifikacije

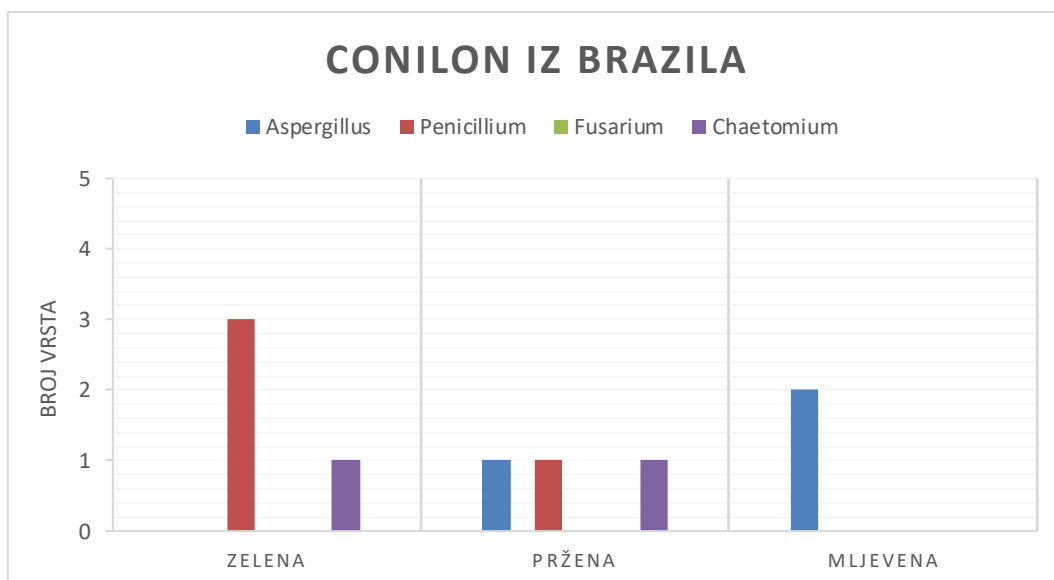
Izolirano je 20 različitih vrsta plijesni od kojih 6 vrsta pripada plijesnima iz roda *Aspegillus*, 8 vrsta pripada plijesnima iz roda *Penicillium*, 5 vrsta pripada plijesnima iz roda *Fusarium* te 1 vrsta pripada plijesnima iz roda *Chaetomium*. Neke vrste plijesni su pronađene na više različitih sorti i/ili oblika kave. Na slikama 4-6 je prikazana učestalost pojavljivanja pojedinih rodova plijeni u svih 9 uzoraka kave, a na slikama 7-10 su prikazane neke od izoliranih vrsta rodova plijesni.



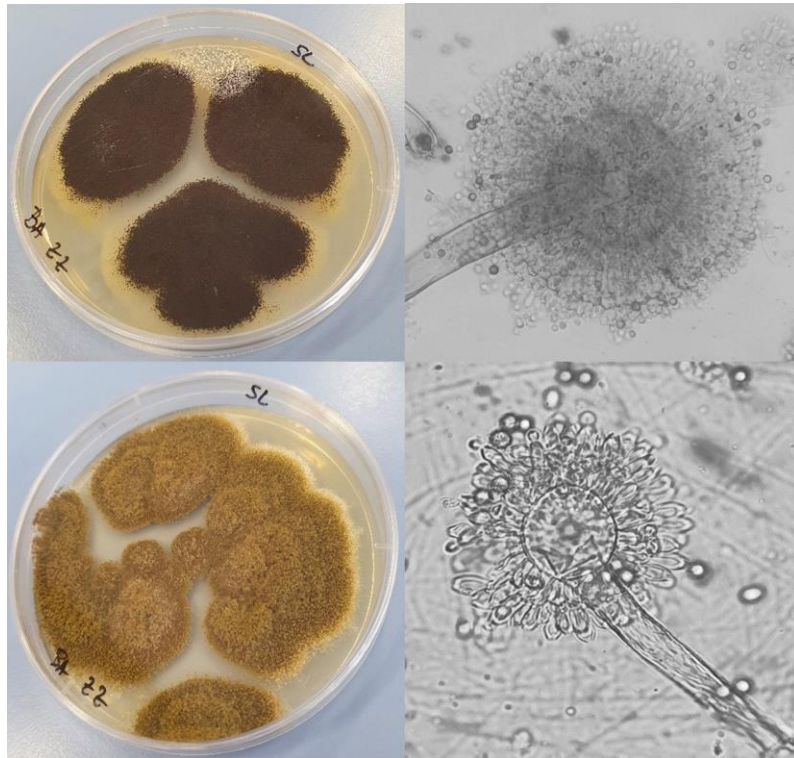
Slika 4. Broj vrsta pojedinih rodova plijesni u *C. arabica*



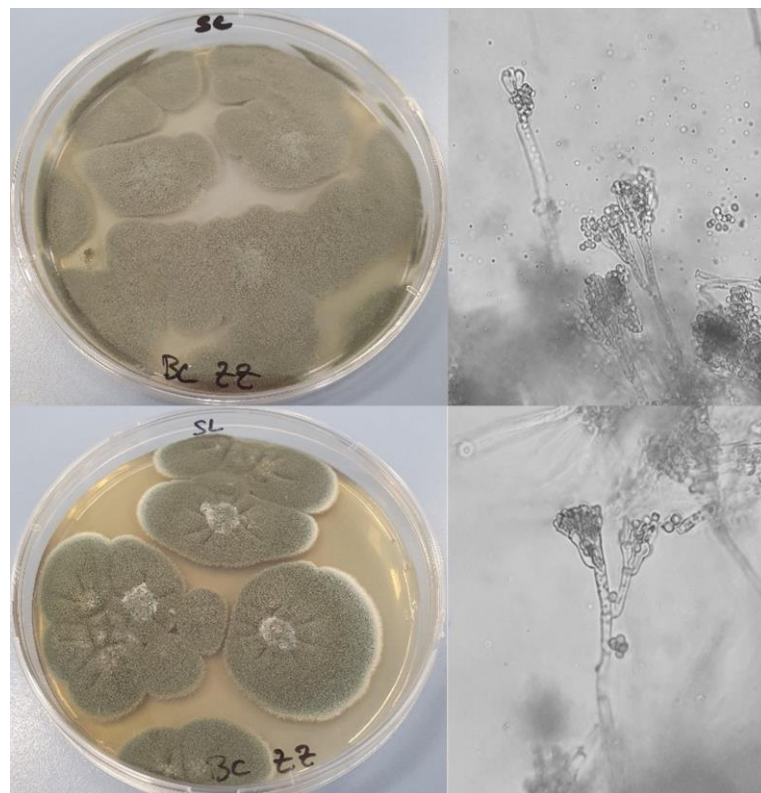
Slika 5. Broj vrsta pojedinih rodova plijesni u *C. canephora* var. *robusta*



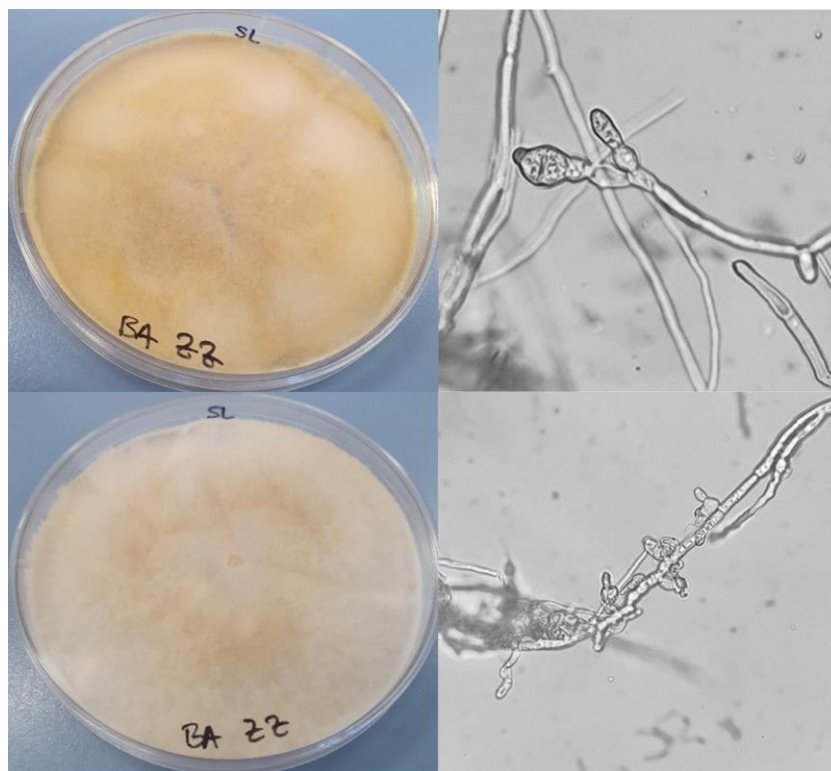
Slika 6. Broj vrsta pojedinih rodova plijesni u *C. canephora* var. *conilon*



Slika 7. Primjeri izoliranih vrsta iz roda *Aspergillus*



Slika 8. Primjeri izoliranih vrsta iz roda *Penicillium*



Slika 9. Primjeri izoliranih vrsta iz roda *Fusarium*



Slika 10. Primjeri izoliranih vrsta iz roda *Chaetomium*

4.2. RASPRAVA

Dobiveni rezultati izolacije i identifikacije govore o pojavnosti plijesni na zelenim, prženim i mljevenim zrnima kave različitog geografskog porijekla, ali i različitih sorti kave. S obzirom da su plijesni prirodni kontaminanti kave, očekivano je da će na uzorcima biti prisutne plijesni. Također, klimatski uvjeti na kojima raste kava pogodni su za rast plijesni. Promatrajući grafove na slikama 4-6, moguće je uočiti da se raspodjela rodova plijesni razlikuje ovisno o vrsti, sorti i obliku kave. Osim ranije spomenutih rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, izoliran je i rod *Chaetomium*.

Na zelenim zrnima kave Arabice su pronađene četiri različite vrste plijesni iz roda *Aspergillus* i *Fusarium* te dvije različite vrste iz roda *Penicillium*. Na prženim zrnima Arabice je pronađena samo jedna *Fusarium* vrsta. To nam govori da su obradom kave prženjem uklonjene sve vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* te dio plijesni iz roda *Fusarium*. Nadalje, s mljevene kave su izolirane dvije *Penicillium* vrste iako ih nakon prženja nije bilo. Mogući razlog pojave tih vrsta je kontaminacija prilikom procesa mljevenja kave ili prilikom skladištenja. Batista i sur. (2003) su u svom istraživanju iz zelenih zrna Arabice izolirali plijesni koje pripadaju *Aspergillus* i *Penicillium* rodovima.

Iz zelenih zrna Robuste su izolirane tri različite vrste plijesni iz roda *Aspergillus* te jedna vrsta iz roda *Penicillium*. Prženjem kave su uklonjene sve navedene vrste, no s obzirom da su u mljevenim uzorcima kave pronađene plijesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium*, dalo bi se zaključiti kako važnu ulogu u kontaminaciji gotovog proizvoda svakako ima skladištenje i rukovanje. Odnosno, važno je pridržavati se načela dobre proizvođačke prakse (GMP, eng. *Good Manufacturing Practice*) kako bi se osigurala mikrobiološka ispravnost proizvoda.

Na zelenim zrnima kave Conilon su izolirane tri različite vrste plijesni iz roda *Penicillium* te jedna vrsta iz roda *Chaetomium*. Prilikom prženja ove vrste kave uništene su dvije *Penicillium* vrste, no *Chaetomium* vrsta je i dalje prisutna. Uz to, iz pržene kave je izolirana jedna vrsta iz roda *Aspergillus*, a iz mljevene čak dvije vrste istog roda iako ih ranije nije bilo. To nam govori da postoji mogućnost kontaminacije proizvoda tijekom proizvodnog procesa koji se sastoji od više koraka. Prženjem kave moguće je ukloniti plijesni osjetljive na visoke temperature i tako poboljšati kvalitetu i ispravnost samog proizvoda. S druge strane, proces mljevenja može negativno utjecati na mikrobiološku ispravnost proizvoda s obzirom na mogućnost kontaminacije tijekom procesa, a što narušava kvalitetu zrna te uzrokuje ekonomske gubitke.

Vidljivo je da su neki rodovi plijesni prisutni na obje, a neki samo na jednoj vrsti kave. Plijesni iz roda *Penicillium* prisutne su na svim vrstama kave, no ostali izolirani rodovi nisu. Plijesni iz roda *Fusarium* izolirane samo iz *C. arabica*. To može značiti da navedene plijesni nisu prirodni kontaminanti *C. canephora*. Nadalje, prisutnost plijesni u dvije sorte *C. canephora* se razlikuje. Moguće je da je do toga došlo zato što te dvije sorte, iako pripadaju istoj vrsti kave, imaju različite prirodno prisutne rodove plijesni. Također, različito podrijetlo sorti može utjecati na prisutnost nekih rodova plijesni s obzirom da je Conilon dobavljen iz Brazila, a Robusta iz Gvatemale. Vidimo da *Aspergillus* plijesni nisu izolirane iz sorte Conilon, ali jesu iz Robuste iz čega bismo mogli zaključiti da se u kavama iz Brazila neće nalaziti plijesni iz roda *Aspergillus*. Pogledamo li rezultate izolacije plijesni iz Arabice, uočiti ćemo da su plijesni istog roda izolirane iz Arabice iako je i ona dobavljena iz Brazila kao i Conilon. Stoga zaključujemo da geografski položaj nije razlog zašto su *Aspergillus* plijesni odsutne u zrnima Conilon sorte, već je vjerojatnije da se plijesni tog roda prirodno ne nalaze u navedenoj sorti. Plijesni iz roda *Chaetomium* su izolirane samo iz sorte Conilon. Moguće je da su podneblje uzgoja i prirodna prisutnost jednako utjecale na pojavu te plijesni u sorti Conilon.

5. ZAKLJUČCI

1. Najzastupljeniji rodovi plijesni prisutni na kavi su *Penicillium* i *Aspergillus*.
2. Prisutnost rodova plijesni ovisi o vrsti i obliku kave te o geografskom položaju uzgoja.
3. Prženjem kave se uništavaju neke vrste plijesni što čini prženu kavu mikrobiološki ispravnijim oblikom kave.
4. Tijekom procesa mljevenja prženih zrna kave može doći do kontaminacije gotovih proizvoda.

6. POPIS LITERATURE

- Adhikari, M., Isaac, E. L., Paterson, R. R. M., Maslin, M. A. (2020) A Review of Potential Impacts of Climate Change on Coffee Cultivation and Mycotoxigenic Fungi. *Microorganisms* **8(10)**, 1625. doi:10.3390/microorganisms8101625
- Asan, A. (2003) Identification of Common *Aspergillus* species. *Turkish Journal of Botany* **27(2)**, 12. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/vol27/iss2/12>
- Atanda S. A. (2011) Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research* **5(25)**, doi:10.5897/ajmr11.487
- Batista, L. (2003) Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology* **85(3)**, 293–300. doi:10.1016/s0168-1605(02)00539-1
- Benussi-Skukan, A., Brlek-Gorski, D., Boroš, K., Dugum, J., Hegedušić, P., Humski, A. i sur. (2009) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. web stranica MPRRR. Vodič.
- Bullerman, L. B. (2003) SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* 5511–5522. doi:10.1016/b0-12-227055-x/01129-9
- Casas-Junco, P. P., Ragazzo-Sánchez, J. A., Ascencio-Valle, F. de J., Calderón-Santoyo, M. (2017) Determination of potentially mycotoxigenic fungi in coffee (*Coffea arabica* L.) from Nayarit. *Food Science and Biotechnology* **27(3)**, 891–898. doi:10.1007/s10068-017-0288-7
- Dagnas, S., Membré, J.-M. (2013) Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. *Journal of Food Protection* **76(3)**, 538–551. doi:10.4315/0362-028x.jfp-12-349
- Farah, A., Ferreira dos Santos, T. (2015) The Coffee Plant and Beans. *Coffee in Health and Disease Prevention* 5–10. doi:10.1016/b978-0-12-409517-5.00001-2
- Girma, B., & Sualeh, A. (2022) Prevalence and importance of the mycotoxin and ochratoxin A (OTA) in coffee: A review **10**, 88-100.
- Goldman, G.H., Osmani, S.A. (ured.). (2007) *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods* (1 izd.). CRC Press. doi:10.1201/9781420008517

- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.C., Meijer, M. i sur (2020) Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* **95**, 5-169.
- Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K., De Peña, M. P. (2016) Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, **242(8)**, 1403–1409. doi:10.1007/s00217-016-2643-y
- Kossen, N. W. F. (2000) The Morphology of Filamentous Fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **70**, 1–33. doi:10.1007/3-540-44965-5_1
- Leitão, A. L. (2019) Occurrence of Ochratoxin A in Coffee: Threads and Solutions—A Mini-Review. *Beverages* **5(2)**: 36. doi:10.3390/beverages5020036
- Lim, L.-T., Zwicker, M., Wang, X. (2019) Coffee: One of the Most Consumed Beverages in the World. *Comprehensive Biotechnology* 275–285. doi:10.1016/b978-0-444-64046-8.00462-6
- Pakshir, K., Dehghani, A., Nouraei, H., Zareshahrabadi, Z., Zomorodian, K. (2021) Evaluation of fungal contamination and ochratoxin A detection in different types of coffee by HPLC-based method. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* doi:10.1002/jcla.24001
- Paterson, R. R. M., Lima, N., Taniwaki, M. H. (2014) Coffee, mycotoxins and climate change. *Food Research International* **61**, 1–15. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.037
- Peraica, M., Rašić, D. (2013) Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. U: Lulić, S. (ured.) Zbornik sažetaka 20. međunarodnog savjetovanja Krmiva 2013.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvald, J.C., Andersen, B. (2019) Food and Indoor Fungi. U: Crous, P.W., Samson, R.A. (ured.) Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Nizozemska.
- Samson, R. A., Varga, J. (2009) What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology* **47(1)**, 13–20. doi:10.1080/13693780802354011

- Sekar P., Yumnam N., Ponmurugan K. (2008) Screening and Characterization of Mycotoxin Producing Fungi from Dried Fruits and Grains. *Advanced Biotech* **7(1)**, 12-15.
- Teferi, D., Ayano, A. (2019) Mycotoxigenic Moulds Associated with Coffee and Their Management (A Review). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* doi: 10.7176/JBAH/9-8-06
- Van der Stegen, G. H. D. (2003) Enhancement of coffee quality by mould prevention. *Food Control* **14(4)**, 245–249. doi:10.1016/s0956-7135(03)00009-4
- Wintgens, J. N. (ured.). (2004) *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*. doi:10.1002/9783527619627

Izjava o izvornosti

Ja Mia Gracin izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis