



PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Utjecaj mikroflore ječma i pšenice na kakvoću slada i piva

## The Effect of Barley and Wheat Microflora on Malt and Beer Quality

Kristina Habschied, Natalija Velić\*, Marina Tišma, Vinko Krstanović

Prehrambena-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Kuhačeva 20, Osijek, Hrvatska

### Sažetak

Mikroorganizmi (plijesni, kvasci i bakterije) koji se u velikom broju pojavljuju na ječmu i pšenici, sirovinama za proizvodnju slada, imaju značajan utjecaj na pokazatelje kakvoće konačnog proizvoda, slada. Posljedično, utječu i na kakvoću sladovine, odnosno piva. Iako su bakterije i kvasci dominantne vrste na ječmu i pšenici prije i nakon žetve, pravi problem predstavljaju plijesni zbog štetnih metabolita, koji utječu kako na zdravstvenu ispravnost sirovine, tako i na kakvoću samog slada. Plijesni od posebnog značaja pripadaju rodu *Fusarium* i nanose ekonomsku štetu cjelokupnoj industriji žitarica, te predstavljaju zdravstvenu prijetnju zdravlju ljudi i životinja zbog mikotoksina koje proizvode. Zbog svega navedenog, nužno je praćenje mikroflore tijekom cijelog proizvodnog lanca „ječam-pivo“ i suzbijanje proliferacije nepoželjnih mikroorganizama prije i tijekom slađenja.

Ključne riječi: ječam, pšenica, *Fusarium*, slad, sladovina, pivo, mikotoksini

### Summary

Microorganisms (fungi, yeasts and bacteria) largely present on barley and wheat, raw materials used for malt production, have great effect on the final product, malt. Consequently, microorganisms also affect the quality of wort and beer. Although bacteria and yeasts are dominant species on barley and wheat before and after the harvest, the real problem are fungi, due to their harmful metabolites that affect health safety of raw material and the quality of malt itself. Particularly problematic fungi are those from genus *Fusarium* that inflict economical damage to the whole cereal industry, and due to the possibility of the mycotoxins production, they present health threat to humans and animals. It is therefore necessary to monitor microflora throughout the productive chain „barley-beer“ and to suppress the proliferation of unwanted microorganisms, before and during malting.

Key words: barley, wheat, *Fusarium*, malt, wort, beer, mycotoxins

## 1. Uvod

Mikrofloru ječma i pšenice, posljedično i slada koji se od njih dobiva, čine razne mikrobne vrste kao što su bakterije, kvasci i filamentozne gljive (Van Nierop i Rautenbach, 2006). Na sastav mikroflore utječu klimatski uvjeti koji su prevladali za vrijeme uzgoja ovih žitarica, lokacija i primijenjene agrotehničke mjere uzgoja, uvjeti skladištenja i transporta, kao i procesni uvjeti tijekom proizvodnje slada.

Mikroflora može utjecati pozitivno i negativno na kakvoću slada i piva. Pozitivan utjecaj uključuje proizvodnju različitih korisnih metabolita, primjerice sintezu hormona koji stimuliraju klijanje zrna (Bu'lock, 1984), amilolitičkih i proteolitičkih enzima te enzima za razgradnju stanične stijenke (Flannigan, 1996; Noots i sur., 1998; Van Campenhout, 2000). Negativni učinci mikroflore su slabija nalivenost i smanjenje klijavosti zrna, sinteza mikotoksina, pojava prekomjernog pjenjenja piva („divlje pivo“, *eng. gushing*), pojava neželjenog mirisa i okusa piva te formiranje spojeva koji dovode do prerane flokulacije kvasca ili do problema prilikom procesa filtracije pri proizvodnji piva (Boivin i Malanda, 1997). Također, upotreba ječma kontaminiranog plijesnima koje sintetiziraju mikotoksine predstavlja opasnost po zdravlje korisnika (Schapira i sur., 1989; Sydenham i Thiel, 1996; Trucksess, 1996; Scott i Lawrence, 1997; Torres i sur., 1998).

Zbog svega navedenog, nužno je praćenje mikroflore tijekom cijelog proizvodnog lanca „ječam-pivo“ i suzbijanje

proliferacije nepoželjnih mikroorganizama prije i tijekom slađenja.

## 2. Mikrobna populacija zrna žitarica i slada

### 2.1. Mikroflora polja

Mikroflora polja sastoji se u najvećoj mjeri od bakterija, divljih kvasaca i filamentoznih gljiva koji potječu iz zraka i zemlje.

Bakterije predstavljaju brojčano dominantnu skupinu ( $10^6$  –  $10^7$  cfu/zrno) mikroorganizama na polju i prisutne su već u ranim fazama razvoja zrna. Bakterije izolirane u ovim fazama pripadaju rodovima *Aerobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Clavibacterium*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Streptomyces*, *Erwinia*, *Pseudomonas* i *Chromobacterium* (Fleet, 1998), a najčešće su prisutne vrste iz rodova *Erwinia*, *Micrococcus* i *Pseudomonas*. Bakterije mliječne kiseline uglavnom nisu prisutne na ječmu, iako je ponekad moguće pronaći *Lactobacillus delbrueckii* (Papadopoulou i sur., 1999).

Odmah iza bakterija po broju slijede kvasci ( $10^4$  –  $10^5$  cfu/zrno) (Fleet, 1998), iako je moguće da ih u kasnijoj fazi zrenja brojčano nadmaše plijesni. Do žetve, čak 50 – 85 % zrna može biti kolonizirano kvascima. Najčešće prevladavaju kvasci roda *Sporobolomyces* i *Rhodotorula*, iako su i kvasci iz rodova *Hansenula* i *Candida* također izolirani s ječma prije žetve. S

Corresponding author: natalija.skugor@ptfos.hr

obzirom na veliku sličnost mikroflore ječma i pšenice moguće je da se i vrste *Cryptococcus*, *Torulopsis* i *Trichosporon* koje su pronađene na pšenici prije žetve, mogu pronaći i na ječmu (Flannigan, 1987). Najčešće izolirane vrste na ječmu su *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hansenula polymorpha*, *Candida catenulata*, *Candida vini*, *Trichosporon beigelii* (Petters i sur., 1988).

Iako su bakterije i kvasci dominantne vrste na pšenici i ječmu prije žetve i nakon žetve, pravi problem predstavljaju plijesni zbog štetnih proizvoda njihova metabolizma koji utječu kako na zdravstvenu ispravnost sirovine, tako i na sladarsku kakvoću same sirovine. Plijesni su velika skupina mikroskopskih gljivica koje se mogu klasificirati kao plijesni s polja, skladišne plijesni i plijesni uznapredovalog kvarenja (Duraković i Duraković, 2003). Plijesni koje se najčešće mogu pronaći na ječmu i pšenici na polju uključuju vrste rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium* (tablica 1.), pri čemu najveće probleme u sladarstvu i pivarstvu predstavljaju plijesni roda *Fusarium* (Papadopoulou i sur., 1999).

**Tablica 1.** Najčešći rodovi plijesni izolirani sa 100 zrna ječma nakon žetve (Haikara i sur., 1977)

**Table 1.** Most frequent genus of molds isolated from 100 kernels of barley after harvest (Haikara et al., 1977)

Rod Genus	Stupanj kontaminacije zrna plijesnima (%)	
	Number of kernels contaminated with molds (%)	
	Raspon Range	Prosječna vrijednost Mean
<i>Alternaria</i>	36-89	61
<i>Cladosporium</i>	7-79	38
<i>Fusarium</i>	7-39	22
<i>Cephalosporium</i>	0-26	9
<i>Aspergillus</i>	0-34	3
<i>Epicoccum</i>	0-12	2
<i>Penicillium</i>	0-5	1

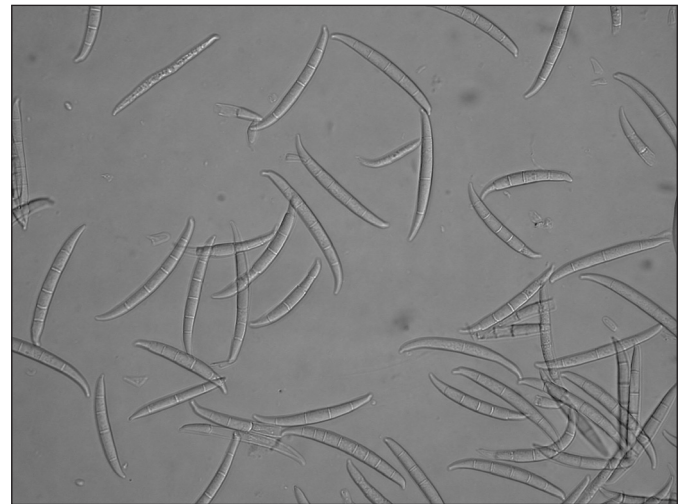
## 2.2. Skladišna mikroflora

Nakon žetve i za vrijeme skladištenja mikroflora zrna se mijenja pod utjecajem temperature skladištenja, vlažnosti zrna i vremena skladištenja. Rezultirajući profil vrsta naziva se „skladišna mikroflora“. Zrno s visokim sadržajem vlage prije skladištenja se mora osušiti do sadržaja vlažnosti manjeg od 14 %. Sušenjem zrna do sadržaja vlažnosti 12 % ( $a_w = 0,6$ ) u potpunosti je onemogućen mikrobnii rast. Sušenjem do sadržaja vlažnosti 14 % ( $a_w = 0,7$ ) onemogućen je rast plijesni s polja i kvasaca, budući da oni ne rastu pri aktivitetu vode nižem od 0,9; kao i bakterija čiji je minimalni aktivitet vode neophodan za rast 0,93 (Flannigan, 1987). Kada bi se zrna visokog udjela vlage (iznad 14 %) skladištila, moglo bi doći do proliferacije mikroorganizama i pregrijavanja žitarica. Proliferacija skladišnih plijesni obično se događa na uštrb plijesni s polja. Tako su plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* dominantne vrste u skladištima na obiteljskim gospodarstvima (Flannigan, 1987). Proliferacija plijesni roda *Fusarium*, plijesni s polja, događa se često zbog nepravovremenog sušenja sirovine. Kako bi se ovi problemi izbjegli, potrebno je primjenjivati higijenske mjere i provoditi kontrolu skladišnih prostora.

## 2.3. Plijesni roda *Fusarium*

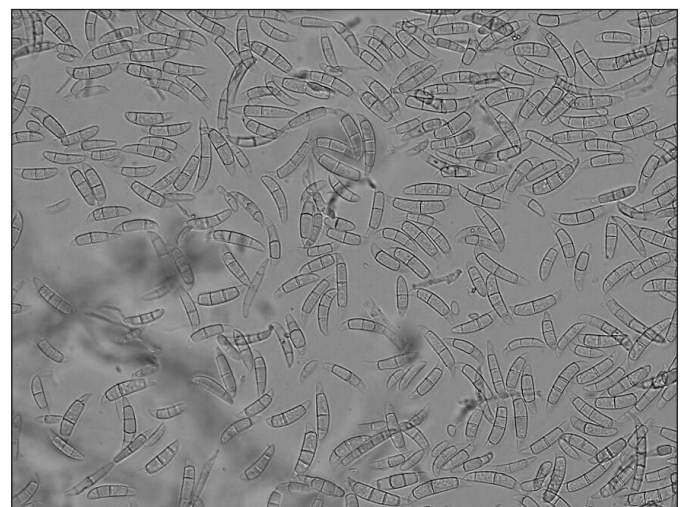
Plijesni roda *Fusarium* su najčešće plijesni koje se pojavljuju na žitaricama u našem podneblju (Jurković i sur., 1998). Rod *Fusarium* uključuje sljedeće vrste: *F. acuminatum*, *F. anthophilium*, *F. avanceum*, *F. cerealis* (crookwellense), *F. chlamydosporum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutininans*, *F. tricintum*, *F. verticilioides*, i dr. (Logrieco i sur., 2003).

Iako je prema MEBAKU (Mittteleuropäische Brau-technische Analysenkommission), mikrobiološka kontrola ječma prilikom prijema u sladaru uključivala utvrđivanje stupnja kontaminacije plijesnima *F. graminearum* i *F. culmorum*, novi europski propisi (European Brewing Convention, EBC) zahtijevaju kontrolu ječma na prisustvo ukupnog broja plijesni iz roda *Fusarium*. (MEBAK, 1997; EBC, 2005). Ove plijesni uzročnici su bolesti žitarica nazvane „fuzarioza klasa“ koja kod ječma i pšenice ima karakter isključivosti - šarža zrna koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana je ovim plijesnima, smatra se nepogodnom



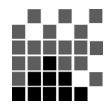
**Slika 1.** *F. graminearum* na selektivnoj podlozi prema MEBAK-u i makrokonidije

**Figure 1.** *F. graminearum* on selective agar plate according to MEBAK and its macroconidias



**Slika 2.** *F. culmorum* na selektivnoj podlozi prema MEBAK-u i makrokonidije

**Figure 2.** *F. culmorum* on selective agar plate according to MEBAK and its macroconidias



za slađenje (Schwarz i sur., 1997). Od svih mikoza na našim žitaricama najčešće i kvantitativno najzastupljenije su upravo fuzarioze klasa (Ožegović, 1995).

Sve vrste plijesni roda *Fusarium* pripadaju razredu Fungi imperfecti (*Deuteromycetes*). Za njih je karakteristično da se razmnožavaju aseksualnim putem pomoću konidiospora, ali se mnoge razmnožavaju i seksualnim putem. U tim slučajevima aseksualna faza (anamorfni oblik) označava se kao *Fusarium*, a seksualna faza (telemorfni oblik) kao *Gibberella* ili *Nectria*. Vrste roda *Fusarium* koje se nazivaju „agresivni paraziti“ (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*) izazivaju fuzariozu klasa (Chelkowski, 1989). Ostale vrste koje se također često mogu pronaći na ječmu i pšenici (*F. avenaceum*, *F. tricinum*, *F. sporotrichoides*, *F. poea*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum*) nazivaju se „slabi paraziti“ ili „oportunisti“. Oni napadaju samo oštećeno zrno (proklijalo ili naprslo, zrno oštećeno mrazom ili ono kojeg su načeli insekti ili ptice). *F. graminearum* i *F. culmorum* su najrasprostranjenije patogene vrste u srednjoeuropskoj klimatskoj zoni (Bottalico, 1998). U Hrvatskoj je zastupljeno više vrsta plijesni roda *Fusarium*: *F. nivale*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* i *F. graminearum* (Tomasović, 1993). Za područje istočne Hrvatske prevalentna vrsta je *F. graminearum* (Jurković i sur., 1998; Krstanović i sur., 2005). U hladnijim klimatskim područjima, kao primjerice u sjeverozapadnoj Europi (Nizozemska, skandinavske zemlje), prevalentna vrsta je *F. culmorum* (Snijders, 1990).

Sve vrste plijesni roda *Fusarium* razgrađuju celulozu i susreću se u svim tipovima zemljišta. Zahvaljujući velikoj konkurentskoj moći u odnosu na većinu drugih saprofita mogu preživjeti i duže od godinu dana u površinskom sloju tla i pri tome ostati aktivne (Teich, 1989). Plijesni iz tla prelaze na biljku na kojoj su latentno prisutne, pri čemu je najpovoljniji period za infekciju 2-3 dana prije cvjetanja. Simptomi fuzarioze klasa postaju vidljivi oko dva tjedna nakon infekcije jer pojedini klasići na još zelenom klasu požute. Napadnuta zrna su često štura i sitna. U kišnom periodu na pljevici ječma mogu se primjetiti ružičaste ili crvene mrlje (skladišta konidija). U slučaju snažne kontaminacije događa se da zrna ne ispadaju iz pljevice ili da se ne odvajaju od nje prilikom vršidbe. Mikrobna kolonizacija zrna ječma uglavnom je ograničena na vanjski sloj zrna, na pljevicu i na prostor između pljevice i perikarpa, ali događa se da prodre i u endosperm (Van Nierop i Rautenbach, 2006). Vrsta i stupanj infekcije varira u odnosu na klimatske prilike, lokaciju uzgoja i podložnost sorte ječma i pšenice infekciji. Viši genotipovi ječma nisu toliko podložni infekciji, a njihovo zrno akumulira manje mikotoksina (De la Pena i sur., 1999; Franckowiak, 2000; Ma i sur., 2000).

### 3. Utjecaj kontaminiranih žitarica na kakvoću slada i piva

Mikrobna proliferacija je integralna komponenta procesa slađenja i može imati pozitivne i negativne učinke na kakvoću slada. Povoljni učinci mikroflora uključuju proizvodnju mikrobnih metabolita kao što su biljni hormoni koji stimuliraju klijanje ječma (Tuomi i sur., 1995; Flannigan, 1996; Noots i sur., 1999), te pridonose enzimskom potencijalu slada producirajući amilolitičke i proteolitičke enzime te enzime za razgradnju stanične stijenke (Flannigan, 1996; Noots i sur., 1999; Van Campenhout, 2000). Istraživanja koja su proveli Schwarz i sur. (2002) pokazala su da je u zrnima ječma koja su snažno inficirana plijesnima roda *Fusarium* došlo do razgradnje škroba u endospermu te da nedostaje proteinski matriks koji inače okružuje granule škroba, što upućuje na snažne amilolitičke i proteolitičke sposobnosti ove plijesni. Neke od bakterijskih vrsta i plijesni prisutnih na sladu (*Lactobacillus plantarum*,

*Pediococcus pentosaceus*, *Geotrichum candidum*) mogu se koristiti kao starter kulture u proizvodnji slada s ciljem unaprjeđenja procesa proizvodnje i kakvoće slada (Boivin i Malanda, 1997).

Međutim, mikroorganizmi uzrokuju i probleme kada su prisutni na sladu, a to su primjerice loš vizualni izgled zrna, a u pojedinim slučajevima i nepoželjne arome. Nadalje, mikroorganizmi proizvode širok spektar sekundarnih metabolita koji uključuju i visoko toksične mikotoksine. Plijesni roda *Fusarium* mogu proizvoditi spojeve koji uzrokuju pojavu stvaranja divljeg piva. Pojedine bakterijske vrste proizvode polisaharidne komponente koje mogu smanjiti sposobnost filtracije piva i uzrokovati pojavu mutnoće piva. Mikroflora zrna može također potrošnjom raspoloživog kisika uzrokovati smanjenje energije klijanja, na način da inducira pospanost zrna (Papadopoulou i sur., 1999).

Iako nije moguće u potpunosti spriječiti rast mikroorganizama za vrijeme procesa slađenja, moguće je kontrolirati određene skupine mikroorganizama primjenjujući odgovarajuće postupke o kojima će biti riječi u posljednjem dijelu ovog pregleda.

#### 3.1. Slađenje kontaminiranih žitarica i utjecaj na kakvoću slada

Proces slađenja sastoji se od tri osnovne faze: močenja, klijanja i sušenja. Aktivnost mikroorganizama tijekom močenja ovisi o početnoj mikrobnj kontaminaciji zrna, vlažnosti supstrata i procesnim uvjetima (temperatura, aeracija). Do naknadne kontaminacije može doći i zbog razvoja mikroflora u sladari. Uvjeti koji vladaju tijekom slađenja (vlaga, aeracija, temperatura) posebno pogoduju daljnjem razvoju mikroorganizama. Broj mikroorganizama povećava se nakon močenja i klijanja, a smanjuje se nakon procesa sušenja slada (Douglas i Flannigan, 1988; Petters i sur., 1988). Tijekom sušenja dolazi do smanjenja broja mikroorganizama, ali neke vrste nastavljaju svoj razvoj i tijekom prvih faza sušenja (*Rhizopus* i *Mucor*). Plijesni koje su otpornije na toplinu (*Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*) nastavljaju rasti i na sladu. Broj mikroorganizama na suhom sladu sličan je početnom broju na ječmu, ali je njihov sastav drukčiji. Do povećanja broja bakterija često dolazi tijekom procesa močenja, dok se taj broj nešto smanjuje na kraju klijanja i konačno reducira više od 98 % tijekom procesa sušenja zelenog slada. Neke bakterijske vrste, obično iz rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus*, preživljavaju proces slađenja i zaostaju na sladu tako da ih je moguće izolirati tijekom procesa ukomljavaanja slada. Iako su prisutne na početku procesa ukomljavaanja, broj bakterija se polako smanjuje tijekom postupka ukomljavaanja i dalje tijekom kuhanja sladovine (O'Sullivan i sur., 1999; Booyens i sur., 2002).

Bakterije mliječne kiseline i *Geotrichum candidum* su najčešći kontaminanti koji se javljaju tijekom močenja i klijanja u velikim industrijskim sladarama (Noots i sur., 1999).

Nakon sušenja, faktor koji određuje ukupan broj mikroorganizama na gotovom sladu, postaje vlažnost zrna. Vlažnost 4 - 6 % u prvih 18 mjeseci skladištenja ne dovodi do većih promjena u mikrobnj populaciji. Pri sadržaju vlažnosti oko 14 % dolazi do progresivnog rasta plijesni roda *Aspergillus*. Nadalje, pri sadržaju vlažnosti iznad 20 % prevladavaju vrste roda *Penicillium*. Temperatura skladištenja i koncentracija CO<sub>2</sub> također su značajni za mikrobnj rast. Optimalna temperatura rasta za funge iznosi 25 - 35 °C, dok količina od 10 % (v/v) CO<sub>2</sub> značajno smanjuje njihov broj (Axcell i sur., 2000).

Kontaminirani ječam obično se odlikuje većom pospanošću zrna, smanjenom klijavošću i smanjenjem prinosa tijekom

slađenja. Rezultirajući slad često se odlikuje prerazgrađenim škrobom zbog prisutnosti hidrolaza mikrobnog podrijetla. Nadalje, oštećenja zrna uzrokovana mikroorganizmima kontaminantima mogu rezultirati neugodnim mirisom i promjenom boje slada, kao i sintezom mikotoksina (Priest i Campbell, 1987.).

Simptomi zaraze plijesnima roda *Fusarium* posebno dolaze do izražaja tijekom procesa slađenja. Micelij ovih plijesni razvija se kratko nakon močenja, a očituje se kao bijeli, zračni micelij čije hife prodiru u unutrašnjost zrna dajući mu dlakav izgled. Mjesto najintenzivnijeg rasta plijesni je klica. Ona odumire pa zrna napadnuta plijesnima roda *Fusarium* u pravilu ne klijaju. Ipak se unutar takvih zrna odvijaju promjene koje su slične onima tijekom klijanja i mogu se povezati s djelovanjem enzimskih sustava plijesni. Kod prevrtanja tijekom procesa slađenja bijeli micelij se razara i dobiva izgled mokre vate, a na njegovom mjestu zrno dobiva intenzivno ljubičastu boju koja se trajno zadržava na zrnu. Takva zrna nazivaju se „relevantna crvena zrna“ (Niessen i sur., 1991).



**Slika 3.** *F. graminearum* na zelenom sladu pšenice  
**Figure 3.** *F. graminearum* on wheat green malt



**Slika 4.** *F. culmorum* na zelenom sladu pšenice  
**Figure 4.** *F. culmorum* on wheat green malt

Fuzarioza može utjecati direktno i indirektno na kakvoću ječmenog i pšeničnog slada. Indirektno može utjecati na transport hranjivih sastojaka tijekom razvoja zrna i povezan je s razvojem micelija navedenih plijesni, što za posljedicu ima već spomenutu slabiju nalivenost (težina 1000 zrna) tj. smanjenje udjela endosperma i povećanja udjela pljevice. S tim je povezan povećan udjel proteina te smanjenje ekstrakta. Pojava “divljeg piva”, koje je posljedica djelovanja toksina iz plijesni na enzimsku aktivnost zrna i/ili utjecaja enzima iz plijesni koje imaju drugačiju strukturu i svojstva od onih iz slada, definira se kao direktan utjecaj fuzarioze. Promjene kakvoće ječmenog i pšeničnog slada uzrokovane su visokom proteolitičkom aktivnosti koja dovodi do povišenja koncentracije topljivog dušika i slobodnog  $\alpha$ -amino dušika (FAN, *eng.* free amino nitrogen) u sladovini, jakoj razgradnji stanične stijenke i smanjenoj amilolitičkoj aktivnosti zbog ometanja *de-novo* sinteze  $\alpha$ -amilaze pod utjecajem inhibitora iz plijesni (Greenhalgh i sur., 1986; Narziss, 1999; Schwarz i sur. 2001). Aktivnost  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze je ključni čimbenik odgovoran za dijastatsku snagu slada koja dalje definira kakvoću fermentacije (Taylor i Robbins, 1993; Agu i Palmer, 1997; Osman, 2002).

Narušavanje zdravstvene ispravnosti pivarskih sirovina vezano je uz proizvodnju mikotoksina o kojima će biti riječi u nastavku.

### 3.2. Utjecaj mikroflora na proizvodnju i kakvoću sladovine

Kakvoća gotovog slada direktno utječe na kakvoću sladovine. Povećanje vrijednosti boje sladovine (visoka vrijednost EBC jedinica) i visoki udio proteina uzrokovani su nekontroliranim oslobađanjem dušikovih spojeva iz ječma tijekom slađenja (Bol i sur., 1985). Smanjenje koncentracije  $\beta$ -glukana, kao i povećanje udjela ekstrakta (koncentracije šećera), ukupnog topljivog dušika i FAN-a, posljedica su prerazgrađenosti škroba tijekom slađenja. Smanjenje koncentracije  $\beta$ -glukana i pentozana utječe na smanjenje viskoznosti sladovine što za posljedicu ima lošiju kakvoću pjene piva (Evans i sur., 1999). Povećanje ekstrakta, ukupnog topljivog dušika i FAN-a utječe pozitivno na brzinu procesa fermentacije tijekom proizvodnje piva (Prentice i Sloey, 1960; Sloey i Prentice, 1962; Gjertsen i sur., 1965; Haikara, 1983; Sacher, 1997; Van Nierop i Rautenbach, 2006). Problemi s bistrenjem sladovine povezani su s promjenama u sastavu organskih kiselina različitih šarži slada, što je pak povezano s mikrobnim metabolizmom i metabolizmom samog zrna ječma tijekom slađenja (Stars i sur., 1993).

### 3.3. Utjecaj mikroflora na fermentaciju i kakvoću piva

Slad lošije kakvoće može utjecati na proces fermentacije na način da uzrokuje smanjenje brzine fermentacije. Kvasac ne provodi fermentaciju i ostaje suspendiran što dovodi do preuranjene flokulacije kvasca (*eng.* premature yeast flocculation ili PYF). Preuranjena flokulacija kvasca događa se pri velikim koncentracijama šećera (Stratford, 1992) i rezultira slabom prevrelošću sladovine, odnosno visokim udjelom zaostalog ekstrakta i malim brojem stanica nakon fermentacije, što utječe na kakvoću samog piva (Inagaki i sur., 1994). Različita istraživanja ukazuju da se faktori koji izazivaju PYF mogu pronaći i u samom ječmu, odnosno pljevici ječma (Axcell i sur., 1986; Herrera i Axcell, 1991). To su visokomolekularni polisaharidi bogati arabinozom i ksilozom (Axcell i sur., 1986;



Herrera i Axcell, 1991a) koji sadrže i spojeve s dušikom (Fujino i Yoshida, 1976). Tretiranje pljevice slada pripravkom ekstracelularnih fungalnih enzima neposredno prije kuhanja sladovine uzrokuje preuranjenu flokulaciju kvasca, kao i razgradnju arabinoksilana iz pljevice slada pomoću fungalnih enzima. Nadalje, arabinoksilanski fragmenti pokazuju sposobnost izazivanja preuranjene flokulacije samo kada su dovoljno veliki da onemoguće povezivanje stanica kvasca i formiranje flokula (Van Nierop i sur., 2006). Van Nierop i sur. istražuju utjecaj antimikrobnih spojeva, posebice antikvašćevih spojeva i razvijaju testove za mjerenje antikvašćeve aktivnosti. Pokazano je da slad koji ima visoku vrijednost antikvašćeve aktivnosti uzrokuje preuranjenu flokulaciju kvasca kao i pojavu pjenjenja piva (Van Nierop i sur., 2008).

Prilikom ocjenjivanja kakvoće piva u obzir se uzimaju fizikalna i senzorska svojstva. Fizikalna svojstva kao što su bistrina, pjena i boja vrlo su važna jer utječu na formiranje prvog dojma o proizvodu. Senzorske karakteristike uključuju rok trajanja, stabilnost okusa, konzistentnost profila okusa i aromu određene vrste piva. Pivo ne smije sadržavati spojeve opasne po zdravlje ljudi, primjerice mikotoksine. Tijekom procesa proizvodnje piva koncentracija mikotoksina se uglavnom smanjuje, ali vodotopljivi i termostabilni mikotoksini kao npr. deoksinivalenol mogu završiti u pivu što za posljedicu ima devijacije u boji piva i pojavu prekomjernog pjenjenja piva (Wolf-Hall i Schwarz, 2002). Za prekomjerno pjenjenje nisu odgovorni samo mikotoksini već i različiti fungalni polipeptidi (hidrofobini), površinski aktivni proteini (Kleemola i sur., 2001; Van Nierop i sur., 2006). Axcell i sur. (2000) povezuju ovu pojavu s antimikrobnim peptidima koje proizvodi sam ječam kao odgovor na mikrobnu kontaminaciju. Plijesni roda *Fusarium* pridonose snažnim priokusima u pivu. Priokusi mogu varirati od okusa pregorene melase do oštrog okusa na vino (Flannigan, 1987).

#### 4. Mikotoksini u ječmu, sladu i pivu

Mikotoksini su skupina sekundarnih visokotoksičnih metabolita plijesni koji nastaju u uvjetima stresa te predstavljaju značajnu opasnost u prehrambenom lancu (Kłosovski i sur., 2010; Mankevičiene, 2011). Kontaminacija slada i piva ovim metabolitima rezultat je proliferacije plijesni prisutnih na sirovinama za proizvodnju slada, a mogu imati negativan utjecaj na iskorištenje procesa proizvodnje piva. U novije vrijeme provode se istraživanja metabolizma kvasca tijekom procesa fermentacije žitarica koje su kontaminirane mikotoksinima (Kłosovski i sur., 2010; Kłosovski i Mikulski, 2010). Mikotoksini koje proizvode skladišne plijesni rijetko se pronalaze u sladu i pivu. Odabirom odgovarajućih skladišnih uvjeta moguće je smanjiti ili u potpunosti spriječiti njihovu proizvodnju. Plijesni s polja, s druge strane, predstavljaju prijetnju zdravstvenoj sigurnosti žitarica i proizvoda od žitarica, pri čemu se vrste roda *Fusarium* smatraju najvažnijim proizvođačima mikotoksina iz te skupine.

Plijesni roda *Fusarium* sintetiziraju mikotoksine kada se nalaze u nepovoljnim uvjetima (Smith i Moss, 1985; Medentsev i sur., 2001; Boeira i sur., 2002) i oni u najvećoj mjeri pripadaju skupini trihotecena, kojih ima oko stotinu. Razlikuju se trihoteceni tipa A i tipa B. Važni predstavnici trihotecena tipa A su T-2 toksin, HT-2 toksin i diacetoksiscirpenol (DAS), a tipa B nivalenol (NIV), fusarenon-X i deoksinivalenol (DON). Trihotecene tipa A proizvode vrste *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichoides* i *F. poae*, koje se rjeđe susreću na ječmu i pšenici iz Srednje Europe, dok trihotecene tipa B proizvode vrste *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. cerealis*, (sinonim:

*F. crookwellense*) (Sacher, 1997). Osim trihotecena plijesni roda *Fusarium* produciraju i mikotoksine koji imaju estrogeno djelovanje, od kojih je najpoznatiji zearalenon (ZEA) i njegovi derivati. Mnogi autori povezuju količinu mikotoksina sa stupnjem infekcije plijesnima roda *Fusarium* (Hart i sur., 1984; Lamper i sur., 2000; Lori i sur., 2003; Schwarz i sur., 2001). Kod jače kontaminacije plijesnima roda *Fusarium* trebalo bi provesti i toksikološku analizu što je sladarima često složeno i skupo.

Trihoteceni su dobro topljivi u vodi pa se ovi spojevi mogu prenijeti s inficiranog zrna preko vode za močenje na zdrava zrna i zatim blokirati ili usporavati sintezu enzima. Utjecaj DON-a i T-2 toksina na aktivnost amilaze iz slada istraživali su Garda-Buffer i sur. (2010) i pokazali da trihoteceni ometaju aktivnost amilaze tijekom slađenja, ali njihovo djelovanje ne pokazuje linearno ponašanje tijekom inhibicije enzima. Kako je većina ovih toksina termostabilna (Scott, 1984; Lauren i Ringrose, 1989; Wolf-Hall i sur., 1999; Hazel i Patel, 2004; Pronik i sur., 2005), za očekivati je da kuhanje sladovine tijekom proizvodnje piva neće na njih imati utjecaja. Dobra vodotopljivost trihotecena u vodi omogućava im prelazak iz sirovina u sladovinu i pivo (Trucksess i sur., 2001). Ipak, djelomično se uklanjaju s tropom što se posebno odnosi na mikotoksine male vodotopljivosti kao što je ZEA. Tablica 2. prikazuje učestalost pojavljivanja mikotoksina DON-a u pivu.

Trihoteceni pokazuju citiotoksična i imunosupresivna svojstva vezana uz 12,13-epoksi grupu kojoj se pripisuje sposobnost inhibicije sinteze proteina vezivanjem na ribosome (Trucksess i sur., 2001; Legzdina i Buerstmayr, 2004). Svi navedeni mikotoksini ne predstavljaju samo rizik za zdravlje ljudi, već djeluju i kao snažni fitotoksini i tako utječu na sam proces slađenja. O utjecaju mikotoksina na proces slađenja i kakvoću slada, odnosno piva već je bilo riječi: inhibicija sinteze proteina, smanjenje klijavosti zrna, utjecaj na *de novo* sintezu  $\alpha$ -amilaze tijekom slađenja, pojava divljeg piva, promjene u boji piva, itd. Nadalje, DON i nivalenol pokazuju inhibicijski učinak na rast, broj stanica i vitalnost sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji se upotrebljavaju za proizvodnju lager i ale vrsta piva; dok ZEA utječe na promjenu profila okusa piva već u koncentraciji od 2  $\mu\text{g/mL}$ , što je koncentracija mikotoksina koja se može očekivati za žitarice kontaminirane plijesnima roda *Fusarium* (Boeira i sur., 1999; Boeira i sur., 2003).

Kako bi istražili što se događa s fuzarijskim mikotoksinima tijekom slađenja i proizvodnje piva, Schwarz i suradnici (1995) odabrali su pet uzoraka pivarskog ječma kontaminiranog *F. graminearumom* i pratili promjene koncentracije DON-a. DON pripada skupini nemakrocikličkih trihotecena, a poznat je i pod nazivom vomitoxin. Granice njegove tolerancije u gotovim žitarskim proizvodima za ljudsku prehranu iznosi 1  $\mu\text{g/g}$ , odnosno za stočnu hranu ovisno o vrsti životinja od 5-10  $\mu\text{g/g}$  (Duraković i sur., 2000; Trucksess i sur., 2001). Koncentracija DON-a u kontaminiranim uzorcima iznosila je od 4,8 do 22,5  $\mu\text{g/g}$  ječma. Tijekom slađenja došlo je do promjene koncentracije DON-a. Prvo se tijekom močenja ta koncentracija smanjivala, vjerojatno uslijed ispiranja zrna i uklanjanja nečistoća i micelija plijesni. Tijekom klijanja koje je uslijedilo, kao i tijekom ranih faza sušenja koncentracija DON-a opet se povećavala. U zelenom sladu starom pet dana razina DON-a bila je veća za 18 - 114 % nego u početnoj sirovini - ječmu. Po završetku proizvodnog procesa, Schwarz i suradnici su mjerenjem koncentracije DON-a u pivu utvrdili da je 80 - 93% od početne koncentracije DON-a u sladu završilo u pivu. ZEA, koji je također određivan na početku i kasnije tijekom slađenja, nije pronađen u pivu, što je bilo i za očekivati



Tablica 2. Učestalost pojavljivanja DON-a u pivu (Lancova i sur., 2008)

Table 2. Incidence of DON in beer (Lancova i sur., 2008)

Zemlja Country	Učestalost Incidence	Srednja vrijednost Mean $\gamma_{DON}/\mu\text{g}L^{-1}$	Raspon Range $\gamma_{DON}/\mu\text{g}L^{-1}$	Referenca Reference
Afrika/Africa	0/35	*	*	Odhav and Naicker (2002)
Argentina/Argentina	22/50	14,3	4–221	Molto et al. (2000)
Kanada**/Canada**	29/50	5,4	0,3–50	Scott et al. (1993)
Češka/Czech	59/77	13	7–70	Ruprich and Ostry (1995)
Francuska/France	1/49	20	*	Payen et al. (1983)
Njemačka/Germany	85/196	205	do 569	Niessen and Donhauser (1993)
Njemačka/Germany	18/18	5	do 9	Weddeling et al. (1994)
Koreja/Korea	14/54	*	1–23	Shim et al. (1997)
USA/USA	0/14	*	*	Trucksess et al. (1986)
Turska/Turkey	0/50	*	*	Omurtag and Beyoglu (2007)
Austrija/Austria	25/33	10,2	4,5–29,5	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Belgija/Belgium	47/47	18,1	4,1–56,7	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Cipar/Cyprus	5/6	8	4,0–12,2	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Češka/Czech	17/17	21,5	4,6–55,3	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Danska/Denmark	9/9	19,9	6,0–47,1	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Francuska/France	24/27	11	4,1–30,2	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Finska/Finland	¾	7,4	5,2–10,6	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Njemačka/Germany	45/46	4,7	4,0–40,5	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Grčka/Greece	4/4	17	16,2–16,8	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Mađarska/Hungary	2/2	10,8	10,5–11,1	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Irska/Ireland	2/2	8,7	7,7–9,6	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Italija/Italy	16/16	10,5	5,0–29,4	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Nizozemska/Netherlands	¾	8	5,9–9,7	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Norveška/Norway	¾	7,7	6,0–9,9	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Poljska/Poland	10/10	17,2	5,0–32,9	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Švedska/Sweden	4/7	5,1	5,1–14,6	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Slovačka/Slovakia	9/12	13,5	5,5–36,9	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Španjolska/Spain	6/13	7,3	5,1–12,2	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)
Velika Britanija/U K	25/33	10,9	4,1–30,8	Papadopoulou-Bouraoui et al. (2004)

\*nema podataka; \*\* uključujući 17 uvoznih piva



s obzirom na njegovu slabiju topljivost i nižu termostabilnost u odnosu na DON. Rezultati istraživanja prikazani su u tablici 3. Slično istraživanje proveli su i Noots i sur. (1999) pri čemu je oko 80 % DON-a u sladu sintetizirano nakon faze močenja.

**Tablica 3.** Razvoj DON-a tijekom slađenja prirodno inficiranog ječma (Schwarz i sur., 1995)

**Table 3.** Development of DON during malting of naturally infected barley (Schwarz i sur., 1995)

	$\gamma_{\text{DON}} / \mu\text{gg}^{-1}$				
	Robust A	Excel B	Robust C	Excel D	Excel E
<b>Ječam</b> <i>Barley</i>	10,6	22,5	8,5	4,8	-
<b>Pregled</b> <i>Dockage</i>	22,6	26,5	8,3	5,4	-
<b>Močenje</b> <i>Steep-out</i>	1,1	2,5	-	-	-
<b>Zeleni slad</b> <b>nakon 5 dana</b> <b>klijanja</b> <i>5-day green malt</i>	3,8	12,3	1,5	5,5	-
<b>Slad</b> <i>Kilned malt</i>	3,5	12,3	1,4	4,8	-
<b>Korjenčići</b> <i>Malt rootlets</i>	5,1	50,6	3,9	14,4	-

ZEA je nesteroidni mikotoksin koji djeluje na estrogenske receptore (Zinedine i sur., 2007; Zinedine i Manes, 2009). Istraživanje koje su proveli Zoellner i sur. (2000) pokazalo je da 51 % ZEA iz polaznih sirovina prijeđe u konačan proizvod - pivo. Kocić -Tanackov i sur. (2007) pratili su koncentraciju ZEA tijekom mikroslađenja. Tijekom močenja došlo je do povećanja koncentracije ZEA (što je oprečno rezultatima koje su dobili Schwarz i suradnici 1995. za DON), dok je tijekom klijanja koje je uslijedilo došlo do smanjenja koncentracije ZEA. Navedeni rezultati mogu se objasniti reakcijama mikotoksina s komponentama ječma, metabolizmom ječmenih enzima ili utjecajem ostalih mikroorganizama prisutnih na ječmu (Schwarz i sur., 1995; Dupire, 2003). Tijekom sušenja opet je došlo do povećanja koncentracije ZEA, budući da su uvjeti koji vladaju tijekom sušenja nepovoljni za plijesni i kao odgovor na njih dolazi do sinteze mikotoksina. Otklicavanjem slada nakon sušenja dolazi do smanjenja koncentracije ZEA u sladu jer dio ostaje na klici. Također, neki sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji provode fermentaciju metaboliziraju ZEA u  $\alpha$ - i  $\beta$ - ZEA, manje toksične derivate (Lancova et al., 2008).

Derivati DON-a i ZEA, tzv. „skriveni“ mikotoksini su primjerice 3- i 15- acetil-DON, DON-3-di-glukozid, DON-3-mono-glukozid i ZEA-4-glukozid i predmet su intenzivnih istraživanja. Naime, skriveni mikotoksini nastaju u reakcijama mikotoksina s drugim spojevima koji se nalaze u žitaricama (npr. šećerima, aminokiselinama ili sulfatnim grupama), pri čemu nastaju derivati koji su manje toksični i dovode do prividnog smanjenja početne koncentracije mikotoksina (Galaverna i sur., 2009). Berthiller i sur. (2005) utvrdili su da skriveni DON čini i do 12 % ukupnog sadržaja DON-a u ispitivanim žitaricama. Lancova i sur. (2008) ispitivali su promjene DON-a i njegovog konjugata DON-3-Glc tijekom

slađenja ječma i proizvodnje piva. Tijekom klijanja došlo je do povećanja koncentracije mikotoksina pri čemu je primijećeno i značajno povećanje koncentracije DON-3-Glc. Daljnje značajno povećanje koncentracije konjugata DON-a događa se tijekom ukomljavaanja slada, tako da je u sladovini koncentracija konjugata deset puta viša nego u meljavi slada.

Mikotoksin koji je čest kontaminant ječma, a ne ubraja se u skupinu fuzarijskih mikotoksina je nefrotoksični, hepatotoksični, genotoksični i imunotoksični ohratoksin A (Varga i sur., 2000; Mateo i sur., 2007). Prva plijesan za koju je dokazano da je dobar proizvođač ohratoksina A bila je plijesan *Aspergillus ochraceus*, vrsta karakteristična za tropske predjele. U umjerenim i hladnijim klimatskim područjima plijesan odgovorna za produkciju ohratoksina A je *Penicillium verrucosum* (Noots i sur., 1999.). Ohratoksin A rijetko se pronalazi u pivu u koncentracijama većim od 1 ng/mL, iako je primjena osjetljivijih analitičkih metoda s nižim pragom detekcije (0,05-0,1 ng/mL) pokazala da se ohratoksin u tragovima pojavljuje s velikom učestalošću u pivima (Scott, 1997). U novije vrijeme koriste se metode s još nižim pragom detekcije (UPLC-kapljevinska kromatografija ultravisokog učinka). Béláková i sur. (2011) su metodom UPLC-a mjerili koncentracije ohratoksina u 237 uzoraka ječma, slada, hmelja i piva u razdoblju od 2008-2009 godine. U 39 % uzoraka piva utvrđena je koncentracija ohratoksina u rasponu 0,001-0,054 ng/mL, dok je u jednom uzorku piva koncentracija iznosila 0,2438 ng/mL. Kostelanska i sur. (2011) su metodom UPLC-a mjerili koncentracije DON-a i njegovog derivata deoksinivalenon-3-glukozida tijekom procesa proizvodnje alkoholnih i bezalkolnih piva.

Osim slada i piva mikotoksinima mogu biti kontaminirani i klica i korjenčići, zaostali tijekom proizvodnje slada, kao i hmelj, sastojak koji pridonosi aromi i gorčini piva (Solarska, 2007). Klica i korjenčić se zbog svoje hranidbene vrijednosti (visok udio proteina i vlakana) i niske cijene koriste u prehrani stoke, stoga je važno voditi računa o koncentraciji mikotoksina koji se mogu nalaziti u njima (Flannigan, 1996; Cavaglieri i sur., 2009). Rijetka istraživanja mikotoksikološke ispravnosti hmelja pokazala su da on može biti kontaminiran plijesnima roda *Fusarium* i njihovim mikotoksinima (Hazel i Patel, 2004, Solarska, 2007).

## 5. Sprječavanje razvoja mikroflora na žitaricama prije i tijekom slađenja

Iako ukupna količina i sastav mikroflora značajno utječu na pokazatelje kakvoće i zdravstvenu ispravnost slada i piva, vrste iz rodova *Fusarium* i *Aspergillus* su kontaminanti koji izazivaju najveću štetu i čiju je metaboličku aktivnost nužno kontrolirati. Najbolji način kontrole je prevenirati kontaminaciju ječma ovim rodovima ili za slađenje koristiti isključivo nekontaminirani ječam.

Već je spomenuto da na pojavu fuzarioze utječu primijenjene agrotehničke mjere i sorte karakteristike. Važnu ulogu ima postupak obrade tla, npr. zaoravanje slame s povećanim udjelom celuloze i proteina pogoduje razvoju plijesni roda *Fusarium*. Ako se primjeni duboko oranje, opasnost od pojave epidemije se smanjuje. Također je važno što se koristi kao predusjev pa su tako zeljaste biljke (kupus, repa, krumpir) bolje nego biljke koje obogaćuju tlo dušikom (mahunarke).

Suzbijanje fuzarioze pomoću fungicida do sada se nije pokazalo učinkovitim. Milus i Parsons (1994) primjenili su 10 različitih fungicida na pšenicu prije umjetne infekcije *F. graminearum* pri čemu nije došlo do statistički značajnog smanjenja kontaminacije niti do smanjenja razine mikotoksina



DON-a u zrnu. Ioos i sur. (2005) također su istraživali primjenu fungicida. U slučaju prirodne infekcije primjena fungicida imala je različit učinak na uzročnike fuzarioza i na njihove metabolite te njihovo djelovanje nije bilo jednako na sve metabolite. Fungicidi utječu na biokemijske procese u plijesnima, ali i na njihov razvoj te iz tog razloga mogu različito djelovati na sintezu trihotecena i na proliferaciju plijesni roda *Fusarium*.

Mogućnost mikrobne kontrole povećava se tijekom skladištenja budući da je u ovoj fazi moguće kontrolirati okolišne uvjete. Temperatura i vlažnost tijekom skladištenja trebaju biti usmjereni ne samo na sprječavanje proliferacije plijesni nego i na sprječavanje klijanja zrna i prevenciju štete koju nanose insekti. Vitalna mikroflora ječma, koja se sastoji uglavnom od rodova *Alternaria* (79 %) i *Fusarium* (27 %), može se smanjiti tijekom skladištenja. Sposobnost *Fusarium* vrsta da proizvode mikotoksine smanjuje se s produljenjem vremena skladištenja, stoga se kao postupak za smanjenje broja plijesni roda *Fusarium* predlaže čuvanje kontaminiranog ječma kroz duži vremenski period. Skladištenje ječma pri visokim temperaturama (40 °C) i niskoj vlažnosti (7,2 – 8,8 %) rezultiralo je smanjenjem vitalnosti mikroflora i hidrosenzibilnosti zrna (Beattie i sur., 1998). Osim temperature i vlažnosti na mikrobnu aktivnost tijekom skladištenja utječe i sastav plinova. Povećane koncentracije CO<sub>2</sub> inhibiraju razvoj filamentoznih gljiva (Axcell i sur., 1986).

Sprječavanje razvoja mikroflora i produkcije mikotoksina tijekom slađenja može se postići odabirom procesnih parametara ili primjenom različitih kemijskih i fizikalnih tretmana. Osnovni problem ovih postupaka je što su neprihvatljivi krajnjim korisnicima i što ne dolazi do sprečavanja nastajanja mikotoksina ili njihove razgradnje kada već nastanu. Nepovoljna mikroflora može se smanjiti početnim močenjem zrna bez aeracije (Briggs i McGuinness, 1993). Ovaj korak pomaže održati zrno vitalnim i osigurava jednolično klijanje (Briggs i sur., 1981). Izmjena vode za močenje tijekom faze aeracije smanjuje nakupljanje mikroorganizama i njihovu respiraciju jer se tako smanjuje pristup hranjivim tvarima (Briggs i McGuinness., 1993). Močenje u razrijeđenim anorganskim kiselinama (sumporna, fosforna i hipokloridna kiselina) potpomaže klijanju ječma (Doran i Briggs, 1993a,b). Dodatak natrijevog hipoklorita u vodu za močenje uzrokuje smanjenje kontaminacije plijesnima, ali u visokim koncentracijama (> 0,1 %) nepovoljno utječe na klijanje zrna. Isto djeluju i metilbromid ili propilen-oksidi. Formaldehid uništava plijesni roda *Fusarium*, ali zaostaje jak, neugodan miris po zemlji (Gjertsen i sur., 1965). Potpuna sterilizacija ječma i slada može se postići  $\gamma$ -zračenjem, ali to negativno utječe na parametre kakvoće slada (Noots i sur., 1999).

Postoji malo mogućnosti kontroliranja mikroflora i produkcije mikotoksina preko procesa slađenja jer bi svaka promjena procesa koja bi bila dovoljno značajna da djeluje na mikrobni rast, ujedno imala i velik utjecaj na kakvoću slada. Naime, sama supresija rasta plijesni nije dovoljna budući da mikotoksini mogu biti prisutni i ako micelij plijesni nije vidljiv. Iako se veća količina mikotoksina ispere tijekom močenja, plijesan zadržava sposobnost produkcije mikotoksina tijekom i nakon močenja, klijanja i sušenja (Wolf-Hall, 2007).

Papandoupolou i sur. (1999) proveli su sustavno istraživanje tijekom procesa slađenja kako bi se otkrile kontrolne točke na kojima se može utjecati na razvoj mikroflora. Posebno je istražena uloga pojedinih faza slađenja i mogućnosti njihova modificiranja kako bi se mogli kontrolirati nepoželjni mikroorganizmi. Promjene u postupku slađenja imale su mali utjecaj na mikrofloru gotovog slada. Mijenjanje režima močenja bilo je učinkovito što se tiče smanjenja stupnja fungalnog rasta - slađenje s tri močenja rezultiralo je jačim fungalnim rastom,

što je podatak od komercijalnog značenja. Također, dodatak  $\alpha$ - i  $\beta$ -kiselina hmelja tijekom slađenja uzrokovao je inhibiciju mikrobne proliferacije, ali su  $\alpha$ -kisleline izazvale pojavu divljeg piva.

Mikroorganizmi koji pokazuju antimikrobni potencijal mogu se koristiti kao starter kulture u bioprocima u kojima je nepoželjna upotreba kemikalija s antimikrobnim učinkom, kao što je to slučaj sa slađenjem. Osim antimikrobnog učinka korištenje starter kultura tijekom slađenja dovodi do poboljšanja fizikalnih i kemijskih parametara kakvoće gotovog slada (Linko i sur., 1998). Faza inokulacije i sastav mješovite starter kulture kritični su u odnosu na mikrofloru procesa slađenja. Prirodna mikroflora ječma naglo se aktivira tijekom močenja. Upravo je zbog toga najčešće odabran trenutak za inokulaciju starter kultura upravo ova faza. Dodatak odabranih mikrobnih kultura tijekom slađenja prvi put je opisan 1959. (Dixon, 1959) godine u modificiranom postupku slađenja koji je imao za cilj biološko zakiseljavanje slada. Ovo je postignuto močenjem isključivo ječma u zakiseljenoj vodi za močenje koja je sadržavala jedan soj bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii*. Navedenim postupkom postiže se pH povoljan za aktivnost amilolitičkih i proteolitičkih enzima (Noots i sur., 1999.). Haikara i Laitila (1995) istraživali su utjecaj bakterija *Lactobacillus plantarum* i *Pediococcus pentasaceus* na prirodnu mikrofloru ječma. Ukupan broj bakterija se tijekom istraživanja smanjio, ali se smanjila i kontaminacija plijesnima roda *Fusarium*. U slučaju jake infekcije učinak je bio slabiji. Antagonističko djelovanje bakterija mliječne kiseline temelji se na kompeticiji za hranjive tvari i prostor, kao i na proizvodnji različitih antimikrobnih spojeva (organske kiseline, vodikov peroksid, bakteriocini). Ove bakterije mliječne kiseline pokazale su selektivno antimikrobno djelovanje budući da je omogućen rast drugim mikroorganizmima kao što su kvasci. Rezultati primjene navedenih bakterija kao starter kultura su povećanje prinosa i stupnja razgrađenosti slada, smanjenje viskoznosti sladovine i udjela  $\beta$ -glukana, povećanje filtrabilnosti kome i sladovine, poboljšanje enzimске aktivnosti, niži pH sladovine, niže vrijednosti boje sladovine (povezano sa smanjenjem kontaminacije plijesnima roda *Fusarium*), stabilnija organoleptička svojstva piva i viši stupanj prevrelosti (Haikara i sur., 1995; Haikara i Laitila, 1995). Dodatak bakterija *L. plantarum* i *L. acidophilus* u vodu za močenje rezultiralo je smanjenjem sinteze mikotoksina DON-a i ZEA.

Boivin i Malanda (1993) proveli su istraživanje u kojem su, da bi spriječili proliferaciju plijesni i inhibirali sintezu mikotoksina, u vodu za močenje ječma dodavali „sladarski kvasac“ *Geotrichum candidum*. Antifungalno djelovanje sladarskog kvasca je posljedica kompeticije jer on raste brže od plijesni i sprječava sintezu mikotoksina, a time se također riješava problem pojave divljeg piva. Dodatkom sladarskog kvasca dobiva se slad stalne i homogene kakvoće. Pozitivni učinci dodatka sladarskog kvasca su povoljna razlika ekstrakta fine i grube meljave, krhkost, razgrađenost, homogenost, filtrabilnost i smanjenje udjela  $\beta$ -glukana, povoljno djelovanje na sladarski pogon (smanjuje opterećenje otpadnih voda).

Osim upotrebe starter kultura kao sredstva za biokontrolu, moguća je upotreba starter kultura koje aktivno doprinose klijanju ječma i razgrađenosti slada. Noots i sur. (2003) koristili su plijesni roda *Rhizopus* kao starter kulture s ciljem poboljšanja procesa razgradnje endosperma ječma. *Rhizopus* starter kultura proizvodila je enzime za razgradnju stanične stijenke, većinom  $\beta$ -glukanazu, ksilanazu i proteaze s povoljnim učinkom na pokazatelje kakvoće slada. Odabrane starter kulture sudjeluju u razgradnji stanične stijenke ječma tako da plijesan difundira u endosperm zrna i tamo sintetizira i izlučuje enzime za razgradnju stanične stijenke. Pokazalo





se da kombinacija metaboličkih aktivnosti starter kulture *Rhizopus* VII i fizioloških procesa, koji se odvijaju u zrnu ječma, rezultira slađenim žitaricama koje pokazuju povećanu enzimsku aktivnost i jaču razgrađenost stanične stijenke te sladovinom poboljšanih karakteristika.

Iako su se starter kulture pokazale učinkovitima u suzbijanju nepoželjnih mikroorganizama i poboljšanju parametara kakvoće slada, njihov učinak još uvijek nije razjašnjen do kraja pa proizvođači slada izbjegavaju njihovu primjenu.

## 6. Zaključak

U radu je dan pregled relevantnih istraživanja problematike utjecaja mikroorganizama na parametre kakvoće sirovine, poluproizvoda i gotovog proizvoda za cijeli lanac procesa proizvodnje piva (ječam ili pšenica – slad – pivo)

Posebna pažnja posvećena je utjecaju mikroorganizama na zdravstvenu ispravnost i sigurnost gotovog proizvoda. Toksikogene plijesni roda *Fusarium* stvaraju najveće probleme, pri čemu je za područje Hrvatske posebno značajna vrsta *F. graminearum* i mikotoksin deoksivalenol koji ona producira.

Gotovo dva desetljeća istraživanja primjene starter kultura u cilju pospješivanja kakvoće slada i piva uglavnom su bila dio istraživanja velikih svjetskih sladara i pivovara i njihovi podatci nisu dostupni u znanstvenoj literaturi. Međutim, posljednjih nekoliko godina provode se istraživanja problematike negativnog utjecaja plijesni s ciljem pronalaska supresiva rasta plijesni koji nisu toksični za ljude i ne utječu na parametre kakvoće slada, kao i sredstava koje će nastale mikotoksine prevoditi u manje toksične derivate ili u potpunosti sprječavati njihovu produkciju kada se plijesan nađe u nepovoljnim uvjetima.

## 7. Literatura

- Agu R. C., Palmer G. H. (1997)  $\alpha$ -glucosidase activity of sorghum and barley malts. *Journal of The Institute of Brewing*, 103, 25-29.
- Analytica Microbiologica European Brewery Convention (2005), Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Axcell B. C., Tulej R., Mulder C. J. (1986) The influence of the malting process on malt fermentability performance. Proceedings of the 19<sup>th</sup> Convention of the Institute of Brewing, Australia New Zealand Section, 63-69.
- Axcell B. C., Van Nierop S., Vundla W. (2000) Malt induced premature yeast flocculation. *The Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 37, 501-504.
- Beattie S., Schwarz P. B., Horley R., Barr J., Casper H. H. (1998) The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. *Journal of Food Protection*, 61, 103.
- Béláková S., Benesová K., Mikulíková R., Svoboda Z. (2011) Determination of Ochratoxin A in brewing materials and beer by ultraperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 126, 321-326.
- Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R. (2005) Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glukoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3421-3425.
- Boeira L. S., Bryce J. H., Stewart G. G., Flannigan B. (1999) Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeasts. 2. Deoxynivalenol and nivalenol. *Journal of The Institute of Brewing*, 105, 376-381.
- Boeira L. S., Bryce J. H., Stewart G. G., Flannigan B. (2002) Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zerealenone, deoxynivalenol and fumonisin B1, *International biodetermination biodegradation*, 50, 69-81.
- Boeira L. S., Bryce J. H., Stewart G. G., Flannigan B. (2003) The effects of Fusariotoxins on the performance of brewing yeast. EBC Symposium, Brussels, Belgium (ICBD Research Letter) Dostupno na: [http://www.bio.hw.ac.uk/icbd/Newsletter/Newsletter\\_Summer\\_2003.htm](http://www.bio.hw.ac.uk/icbd/Newsletter/Newsletter_Summer_2003.htm); pristupljeno 15. 01. 2008.)
- Boivin P., Malanda M. (1993) Influence of starter cultures in malting on the microflora development and malt quality. Proceeding of the European Brewery Convention Congress. Oslo, IRL Press, Oxford 24, 95-10.
- Boivin P., Malanda M. (1997) Improvement of malt quality and safety by adding starter culture during the malting process. *The Technical Quarterly Master Brewers Association of America*, 34, 96-101.
- Bol J., Klopper W. J., Vermiere H. A., Motshagen M. E. (1985) Relation between the microflora of barley and malt quality. Proceeding of the European Brewery Convention 20<sup>th</sup> Congress. 20, 643-650.
- Booysens C., Dicks L. T. M., Meijering I., Achermann A. (2002) Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 63-73.
- Bottalico A. (1998) *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80, 85-103.
- Briggs D. E., Hough J. S., Stevens R., Young T. W. (1981) Malting and brewing science. Volume 1, Malt and sweet wort. Chapman and Hall, London
- Briggs D. E., McGuinness G. (1993) Microbes on barley grains. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 24.
- Bu'lock J. D. (1984) *The Applied Mycology of Fusarium*. str. 215. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cavaglieri L. R., Keller K. M., Pereya C. M., Gonzalez Pereya M. L., Alonso V. A., Rojo F. G., Dalcerio A. M., Rosa C. A. R. (2009) Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *Journal of Stored Products Research*, 45, 147-150.
- Chelkowski J. (1989) Formation of mycotoxins produced by *Fusaria* in heads of wheat, triticale and rye. U: Chelkowski J. (ed): Topics in secondary metabolism, taxonomy and pathogenicity, str. 72. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- De la Pena R. C., Smith K. P., Capettini F., Muehlbauer G. J., Gallo-Meagher M., Dill-Macky R., Somers D. A., Rasmusson D. C. (1999) Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 561-569.
- Dixon T. R. (1959) Process for the production of acidified malt. United States Patent Office br. 2, 903, 399.
- Doran P. J., Briggs D. E. (1993) A The use of chemical agents to overcome dormancy in malting barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 85.
- Doran P. J., Briggs D. E. (1993) b Microbes and grain germination. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 165.
- Douglas P. E., Flannigan B. B. (1988) A microbiological evaluation of barley malt production. *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 85.
- Dupire S. (2003) Mycotoxins and other contaminants in the malting and brewing industries. Proceeding of the European Brewery Convention Congress, Dublin, Ireland.



- Duraković S. i Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, str. 59. Kugler, Zagreb, Hrvatska.
- Duraković S. (2000) Specijalna mikrobiologija, str. 137-142. Duriex, Zagreb, Hrvatska.
- Evans D. E., Nischwitz R., Stewart D. C., Cole N., MacLeod L. C. (1999) The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. *Monographs of European Brewing Convention*, 27, 114-128.
- Flannigan B. (1987) The microflora of barley and malt. U: Priest F. G., Campbell, I. (ed.): *Brewing Microbiology* 1st Ed., str. 83-120. Elsevier Applied Science, London & New York.
- Flannigan B. (1996) The microflora of barley and malt. U: Priest F. G., Campbell I. (eds): *Brewing Microbiology*, 2nd ed.; str. 83-125. Chapman & Hall, London, UK.
- Flannigan B. (1996) Handbook for fourth SAC conference, 45-55.
- Fleet G. H. (1998) The microbiology of alcoholic beverages. U: Wood B. J. B. (ed): *Microbiology of fermented foods*. Vol. I, str. 236-248. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Franckowiak J. D. (2000) Notes on plant height in six-rowed barley and FHB resistance. *Proceedings of the 8th International Barley Genetics Symposium*, vol 2., 107-109.
- Fujino S., Yoshida T. (1976) Premature flocculation of yeast induced by some wort components. *Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co. Ltd*, 19, 45-53.
- Galaverna G., Dall'asta C., Mangia M., Dossena A., Marchelli R. (2009) Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Science*, 27, 87-92.
- Garda-Buffon J., Baraj E., Badiale-Furlong E. (2010) Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 505-511.
- Gjertsen P., Trolle B., Anderson K. (1965) Studies on gushing II. Gushing caused by microorganisms, specially *Fusarium* species. *Proceeding of the European Brewery Convention Congress*, 10, 428-438.
- Greenhalgh R., Levandier D., Adams W., Miller J. D., Blackwell B. A., McAlees A. J., Taylor A. (1986) Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 98-102.
- Haikara A. (1983) Malt and beer from barley artificially contaminated with *Fusarium* in the field. *Proceedings of the European Brewing Convention*, 19, 401-408.
- Haikara A., Laitila A. (1995) Influence of lactic acid starter cultures on the quality of malt and beer. *Proceedings of the European Brewing Convention*, Brussels, 249.
- Haikara A., Makinen V., Hakulinen R. (1977) On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. *Proceedings of the Congress of European Brewing Convention*, 16, 35-46.
- Haikara A. Uljas H., Suürmakki A. (1995) Lactic acid starter cultures in malting- a novel solution to gushing problems. *Proceedings of the European Brewing Convention*, Brussels, 163.
- Hart L. P., Pestka J. J., Liu M. T. (1984) Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 74, 1415-1418.
- Hazel C. M., Patel S. (2004) Influence of processing on trichotecenes levels, *Toxicology Letter*, 51-59.
- Herrera V. E., Axcell B. C. (1991) a Induction of premature yeast flocculation by on polysaccharide fraction isolated from malt husk. *Journal of the Institute of Brewing*, 97, 359-366.
- Herrera V. E., Axcell B. C. (1991) Studies on the binding between yeast and a malt polysaccharide that induces heavy yeast flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*, 97, 367-373.
- Inagaki H., Yamazumi K., Uehara H., Moczuki K. (1994) Determination of fermentation behavior - malt evaluation based on the original small scale fermentation test. *Symposium on malting technology. Monographs of the XXIII European Brewing Convention Symposium Fachverlag Hans Carl, Nuernberg, Germany*, str. 110-136.
- Ioos R., Belhadj A., Menez M., Faure A. (2005) The effects of fungicides on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* and their associated trichotecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection*, 24, 894-902.
- Jurković D., Culek M., Čosić J. (1998) Mycopopulation of the treated winter wheat seed in eastern Croatia. *Cereal Research Communication*, 26, 67-72.
- Kleemola T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Kotaviita E., Olkku J., Haikara A. (2001) Characterization and detection of the gushing factors produced by fungi. *Proceedings of 28th European Brewery Convention Congress*, Budapest, 129-138.
- Kłosovski G., Mikulski D. (2010) The effect of raw material contamination with mycotoxin on composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. *Bioresource Technology*, 101, 9723-9727.
- Kłosovski G., Mikulski D., Grajewski J., Błajet-Kosicka A. (2010a) The influence of the raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technology*, 101, 3147-3152.
- Kocić-Tanackov S. D., Škrinjar M. M., Grujić O. S., Pejin J. D. (2007) Zearalenone production during micro-malting of barley. *Proceedings of the National Science*, 113, 27-34.
- Kostelanska M., Zachariasova M., Lacina O., Fenclova M., Kollós A. L., Hajslova J. (2011) The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realized by UFLC-TOFMS method, *Food Chemistry*, 126, 1870-1876.
- Krstanović V., Klapac T., Velić N., Milaković Z. (2005) Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001-2003 in Eastern Croatia. *Microbiological Research*, 160, 353-359.
- Lamper C., Teren J., Bartok T., Komoroczy R., Mesterhazy A., Sagi F. (2000) Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of ergosterol content. *Cereal Research Communication*, 28, 337-344.
- Lancova K., Hajslova J., Poustka J., Krplova A., Zaacharaisova M., Dostalek P., Sachambula L. (2008) Transfer of *Fusarium* mycotoxins and „masked“ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants*, 25, 732-744.
- Lauren D. R., Ringrose M. A. (1989) Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants*, 14, 435-443.
- Legzdina L., Buerstmayr, H. (2004) Comparison of infection with *Fusarium* head blight accumulation of mycotoxins in grain of hulles and covered barley. *Journal of Cereal Science*, 40, 61-67.
- Linko M., Haikara A., Ritala A., Penttilä M. (1998) Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65, 85-98.
- Logrieco A., Botalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. (2003) Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.
- Lori G. A., Sisterna M. N., Haidukowski M., Rizzo I. (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158, 29-35.



- Ma Z., Steffenson B. J., Prom L. K., Lapitan N. L. (2000) Mapping of quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in barley. *Phytopathology*, 90, 1079-1088.
- Mankevičiene A., Butkute B., Gaurilčikiene I., Dabkevičius Z., Supreniene S. (2011) Risk assesment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains, *Food Control*, 22, 970-976.
- Mateo R., Medina A., Mateo E. M., Jiménez M. (2007) An overview of Ochratoxin A in beer and wine, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 79-83.
- MEBAK-Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision (1997) Brautechnische Analysenmethoden, Bd. I, 3, izdanje, str. 89-90.
- Medentsev A. G., Arinbasarova A. Y., Akimenko V. K. (2001) Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Microbiology*, 70, 26-30.
- Milus E. A., Parsons C. E. (1994) Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 78, 697-699.
- Narziss L. (1999) Die Technologie der Maltzbereitung, str. 25-30. F. Enke, Stuttgart, Germany.
- Niessen L., Donhauser S., Weideneder A., Geiger E. (1991) Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malz, *Brauwelt* 131, 1556-1562.
- Noots I., Delcour J. A., Michiels C. W. (1998) From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical Reviews in Microbiology*, 25, 121-153.
- Noots I., Derycke V., Jensen H. E., Michiels C., Delcour J. A., Coppens T. (2003) Studies on barley starchy endosperm cell wall degradation by *Rhizopus* VII. *Journal of Cereal Science*, 37, 81-90.
- Osman A. M. (2002) The advantages of using natural substrate-based methods in assessing the roles and synergistic and competitive interactions of barley malt starch-degrading enzymes. *Journal of The Institute of Brewing*, 108, 204-214.
- O'Sullivan T. F., Walsh Y., O'Mahony A., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. (1999) A comparative study of malthouse and brewhouse microflora. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 55-61.
- Ožegović I., Pepeljnjak S. (1995) Mikotoksikoze, str. 65. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
- Papandoupolou A., Wheaton L., Muller R. (1999) The control of selected micro-organism during the malting process. *Journal of the Institute of Brewing*, 106, 179-188.
- Petters H. I., Flannigan B., Austin B. (1988) Quantitative and qualitative studies on microflora of barley malt production. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 279-297.
- Prentice N., Sloey W. (1960) Studies on barley microflora of possible importance to malting and brewing quality I. The treatment of barley during malting with selected microorganisms. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 28-34.
- Priest F. G., Campbell I. (1987) Brewing microbiology, str. 83-84. Elsevier Applied Science Publisher LTD, London & New York.
- Pronik C., Cenkowski S., Abransom D. (2005) Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. *Food Control*, 17, 789-796.
- Reiß J. (1986) *Schimmelpilze*, Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 121.
- Sacher B. (1997) Über den Einfluß von Sorte, Umwelt, agronomischen Maßnahmen und Mälzungstechnologie auf die wertbestimmenden Eigenschaften von Winterweizenmalzen. Dissertation, str. 139-144. TU München- Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, München, Germany.
- Schapira S. F. D., Whitehead M. P., Flannigan B. (1989) Effects of the mycotoxins dyacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on malting characteristics of barley. *Journal of The Institute of Brewing*, 95, 415-417.
- Schwarz P. B., Casper H. H., Barr J., Musial M. (1997) Impact of *Fusarium* head blight on the malting and brewing quality of barley. *Cereal Research Communication*, 25, 813-814.
- Schwarz P. B., Casper H. H., Beattie S. (1995) Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53, 121-127.
- Schwarz P. B., Jones B. L., Steffenson B. J. (2002) Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60, 130-134.
- Schwarz P. B., Schwarz J. G., Zhou A., Prom L.K., Steffenson B. J. (2001) Effect of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* infection on barley and malt quality. *Mon. Schr. Brauwiss.*, 54, 55-53.
- Scott P. M. (1984) Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47, 489-499.
- Scott P. M., Lawrence G. (1997) Determination of aflatoxins in beer. *Journal of AOAC International*, 80, 1229-1234.
- Sloey W., Prentice N. (1962) Effects of *Fusarium* isolates applied during malting on the properties of malt. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 25-29.
- Smith J., Moss M. (1985) Mycotoxins formation, analysis and significance. John Wiley & Sons, New York.
- Snijders C. H. A. (1990) Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. *Phytopatology*, 129, 133-140.
- Solarska E. (2007) Study on cause of *Fusarium* cone tip blight. Proceedings of the Scientific Commission CICH-IHB-IHGC, International Hop Grower's Convention; Tettngang, Germany, 95-97.
- Stars A. C., South J. B., Smith N. A. (1993) Influence of malting microflora on malt quality. Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention 24, 103-110.
- Stratford M. (1992) Yeast flocculation: Restructuring the theories in line with research. *Cerevisiae.*, 21, 38-45.
- Sydenham E., Thiel P. G. (1996) Psychochemical data from some selected *Fusarium* toxins. *Journal of AOAC International*, 79, 1365-1379.
- Taylor J. R. N., Robbins D. J. (1993) Factors influencing  $\beta$ -amylase activity in sorghum malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 413-416.
- Teich A. H. (1989) Epidemiology of Wheat Scab Caused by *Fusarium* spp. U: Chelkowski J. (ed): Topics in Secondary Metabolism, Taxonomy and Pathogenicity, str. 269-282., Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Tomasović S. (1993) Fuzarijska oboljenja pšenice (*Fusarium* spp.). *Glasnik zaštite bilja*, 7-8, 230-238.
- Torres M. R., Sanchis V., Ramos A. J. (1998) Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked-immunosorbent-assay method. *Journal of Food Microbiology*, 39, 139-143.
- Truckses M. W. (1996) Mycotoxins. *Journal of AOAC International* 79, 200-205.
- Trucksess M. W. ed. (2001) Mycotoxin protocols, str. 97-113. Humana Press Inc., New Jersey, USA.
- Tuomi T., Laakso S., Rosenqvist H. (1995) Plant hormones in fungi and bacteria from malting barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 101, 351-357.



Van Campenhout L. (2000) Interactions between barley respiratory activity and its microbial community: towards a controlled germination process. Ph. D. Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Germany.

Van Nierop S. N. E., Axscell B. C., Cantrell I. C., Rautenbach M. (2008) Optimized quantification of the antiyeast activity of different barley malts towards a larger brewing yeast strain, *Food Microbiology*, 25, 895-901.

Van Nierop S. N. E., Rautenbach M. (2006) The impact of microorganisms on barley and malt quality - a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 69-78.

Varga J., Rigo K., Téren J. (2000) Degradation of Ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 1-7.

Wolf-Hall C. E. (2007) Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 89-94.

Wolf-Hall C. E., Hanna M. A., Bullerman L. A. (1999) Stability of deoxynivalenol in heat treated foods. *Journal of Food Protection*, 62, 962-964.

Wolf-Hall C. E., Schwarz P. B. (2002) Mycotoxins and fermentation-beer production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504, 217-226.

Zinedine A., Manes J. (2009) Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed in Morocco. *Food Control*, 20, 334-344.

Zinedine A., Soriano J. M., Molto J. C., Manes J. (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-8.

Zoellner P., Berner D., Jodlbauer J., Lindner W. (2000) Determination of zearalenone and its metabolites  $\alpha$ - and  $\beta$ - zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 738, 233-241.