

# Mikrobiološki rizici sigurnosti i kvalitete tijekom proizvodnje piva

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



I. Čosić<sup>a\*</sup> i B. Matijević<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Državni hidrometeorološki zavod, Sektor za kvalitetu zraka, Služba kemijski laboratorij, Ravnice 48, 10 000 Zagreb

<sup>b</sup> Veleučilište u Karlovcu, Trg Josipa Jurja Strossmayera 9, 47 000 Karlovac

## Sažetak

Pivo se smatra relativno stabilnim proizvodom s obzirom na mikrobno kvarenje. Kemijski sastav piva ne pogoduje rastu većine mikroorganizama, što je povezano s niskom pH-vrijednosti i niskim udjelom fermentabilnih ugljikohidrata te sadržajem alkohola, sastojcima hmelja i anareobnim uvjetima koje osigurava nastali CO<sub>2</sub>. Međutim, određene bakterijske vrste mogu rasti u pivu, izazivajući promjene u fizikalno-kemijskim i senzorskim svojstvima proizvoda, čime ga čine neprihvatljivim za konzumaciju. Rast bakterija u pivu očituje se povećanjem biomase i pojavom mutnoće, a kod izraženijeg kvarenja i nastajanjem taloga. Mikrobna populacija u pivovari mijenja se tijekom tehnološkog procesa proizvodnje. Posebno štetni kontaminanti za proizvodnju piva su bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* i *Megasphaera*. S ciljem smanjenja rizika na najmanju moguću razinu, svi industrijski pogoni, bilo da je riječ o velikim industrijama ili malim (*craft*) pivovarama, moraju biti u mogućnosti brzo detektirati i identificirati mikrobne kontaminante tijekom cijelog tehnološkog procesa. Mikrobiološka analiza tijekom procesa proizvodnje, punjenja i pakiranja proizvoda ima važnu ulogu u osiguranju kvalitete i zdravstvene ispravnosti proizvoda za konzumaciju. U tu svrhu pivovare provode mikrobiološku analizu uzoraka primjenjujući tradicionalne, ali i suvremene metode detekcije i identifikacije. Kroz ovaj pregledni članak istražuje se utjecaj mikrobne kontaminacije piva na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva proizvoda te se prikazuju izazovi s kojima se pivovare suočavaju da bi osigurale mikrobiološku ispravnost proizvoda s ciljem osiguranja kvalitete i sigurnosti proizvoda te sprječavanja proizvodnih i financijskih gubitaka.

## Ključne riječi

Pivo, mikrobna kontaminacija, senzorska svojstva piva, osiguranje mikrobiološke sigurnosti, tradicionalne i suvremene mikrobiološke metode

## 1. Uvod

Proces proizvodnje piva dijeli se na tehnologiju proizvodnje slada i tehnologiju proizvodnje piva.<sup>1</sup> Oba procesa podliježu fizičkim, kemijskim i mikrobiološkim kontaminacijama zbog čega je iznimno važno provoditi kontrolu kvalitete procesa od zaprimanja sirovina do isporuke gotovog proizvoda.

Kontaminacija hrane odnosi se na pojavu štetnih mikroorganizama i kemikalija kao i na fizičku kontaminaciju, odnosno kontaminaciju proizvoda stranim tijelima.<sup>2,3</sup>

Fizička kontaminacija odnosi se na prisutnost stranog tijela u proizvodu, a može se dogoditi u bilo kojoj fazi proizvodnje. Takva vrsta kontaminacije ne uzrokuje promjenu fizikalno-kemijskih svojstava proizvoda, ali može biti iznimno opasna i ugroziti zdravlje potrošača. Jedan od primjera fizičke kontaminacije su komadići razbijenog stakla ili metalni otpaci u gotovom proizvodu.<sup>2,4</sup>

U kemijske kontaminante spadaju sve vrste kemikalija, uključujući teške metale i pesticide. Prisutnost mikotoksina u ječmenom sladu najčešći je oblik kemijske kontaminacije u procesu proizvodnje slada koji se kao sirovina upotrebljava za proizvodnju piva.<sup>3,5</sup> Njihova prisutnost predstavlja opasnost po zdravlje potrošača, a najčešće se ogleda u lošem vizualnom izgledu zrna i nepoželjnoj aromi. Nadalje,

prisutnost mikotoksina u sladu može dovesti do prerane flokulacije kvasca ili do problema tijekom procesa filtracije piva, što ima kao posljedicu pojavu mutnoće piva. U konačnici, visoko toksični mikotoksini uzrokuju prekomjerno pjenjenje piva ("divlje pivo", engl. *gushing*) koje se očituje prilikom otvaranja boce prije konzumacije<sup>3,5,6</sup> i ima izravan negativan utjecaj na reputaciju proizvoda, a samim time i na ugled tvrtke.

Posljedica mikrobne kontaminacije je promjenu fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava prehrambenog proizvoda koju uzrokuju mikroorganizmi (bakterije, kvasci i plijesni).<sup>2,3,7-9</sup>

U pivskoj industriji do kontaminacije može doći tijekom procesa proizvodnje (primarna kontaminacija) i tijekom procesa punjenja (sekundarna kontaminacija). Primarna kontaminacija najčešće potječe od mikrobiološkog onečišćenja sirovina, dok sekundarna nastaje tijekom procesa punjenja,<sup>3,9-13</sup> najčešće kao posljedica neodgovarajućeg održavanja i čišćenja opreme.

Higijena pogona, s naglaskom na tehnološku opremu, ključan je preduvjet dobre proizvođačke prakse u svakoj prehrambenoj industriji. S ciljem sprječavanja mikrobnog onečišćenja i smanjenja rizika od mikrobiološke kontaminacije na najmanju moguću razinu potrebno je čistiti, dezinficirati ili sterilizirati sve potencijalne izvore mikrobnog onečišćenja u svim fazama proizvodnje. Čišćenjem se uklanjaju razne nečistoće koje mogu poslužiti kao hranjiva podloga za mikroorganizme, kao i sami mikroorganizmi.<sup>1,14,15</sup>

\* Autor za dopisivanje: dr. sc. Ivana Čosić  
E-pošta: [ivana.cosic@cirus.dhz.hr](mailto:ivana.cosic@cirus.dhz.hr)

Automatizirani postupci čišćenja i dezinfekcije [*Clean-in-place* (CIP)] standardni su industrijski postupci za uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama. Međutim, pojedine vrste mikroorganizama ne mogu se ukloniti djelovanjem kemijskih sredstava pod utjecajem visoke temperature.<sup>1,10,14,15</sup> Zaostali mikroorganizmi prijanjanju na površinu te proizvode sloj nazvan matrica koji ih okružuje i štiti. Dodatkom novih organskih tvari tijekom procesa proizvodnje mikroorganizmi unutar matrice se hrane, rastu i razmnožavaju te se mikrobnj zajednici pridružuju i druge vrste mikroorganizama, pri čemu biofilm raste i još jače prijanja za površinu. U konačnici, stanice ili skupine stanica mogu se aktivno ili pasivno odvojiti i prionuti na novo mjesto, što dovodi do novog potencijalnog izvora kontaminacije.<sup>8–13</sup> Stoga je optimizacija postupaka čišćenja i dezinfekcije iznimno važna da bi se rizik od kontaminacije u svim fazama procesa proizvodnje sveo na najmanju moguću razinu.<sup>1,14</sup>

Učinkovitost postupaka čišćenja i dezinfekcije prati se propisanim mikrobiološkim analizama upotrebom selektivne hranjive podloge. Uz nadzor postupaka čišćenja i dezinfekcije, nužno je i mikrobiološki pratiti cijeli proces proizvodnje, od zaprimanja sirovina do otpreme gotovog proizvoda.<sup>1,14,16,17</sup>

## 2. Mikroorganizmi kao kontaminanti i uzročnici promjena svojstava piva

S obzirom na to da je pivo proizvod koji po svojem sastavu ima antimikrobna tj. antibakterijska svojstva, a očituju se sadržajem alkohola (0,5 – 10,0 % w/w), gorkih antimikrobnih spojeva hmelja (17 – 55 ppm iso- $\alpha$ -kiselina), visokim sadržajem CO<sub>2</sub> (cca. 0,5 % w/v) te prisutnosti SO<sub>2</sub>, smatra se da je pivo mikrobiološki stabilan proizvod.<sup>12–14,18,19</sup> Procesi filtracije, pasterizacije i propisanog skladištenja pri niskim temperaturama također doprinose sprječavanju rasta i razmnožavanja mikroorganizama te mikrobiološkoj stabilnosti proizvoda.<sup>13</sup>

Unatoč navedenim činjenicama, sve stroži zahtjevi za smanjenjem koncentracije kisika i niska pH-vrijednost piva (2,8 – 4,8)<sup>20</sup> i pića od slada ometaju mikrobiološku proliferaciju,<sup>19</sup> što može imati kao posljedicu mikrobiološku kontaminaciju proizvoda popraćenu promjenom fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava.

### 2.1. Vrste mikroorganizama koji kontaminiraju pivo

Prema promjenama koje stvaraju u pivu, mikroorganizmi se mogu podijeliti u sljedeće grupe.<sup>1,13,15,19</sup>

#### 2.1.1. Latentni mikroorganizmi

Latentni organizmi su mikrobiološke kulture koje se povremeno susreću tijekom procesa proizvodnje piva, a obično se pojavljuju kao posljedica neodgovarajuće higijene. Njihova prisutnost u pivovari često je povezana s kontaminiranim procesnom vodom ili građevinskim radovima unutar

pivovare. Tipični latentni mikroorganizmi koji se pojavljuju tijekom procesa proizvodnje piva su sporulirajuće bakterije i enterobakterije kao pokazatelji onečišćenosti vode.<sup>13,19</sup>

#### 2.1.2. Neškodljivi mikroorganizmi

Neškodljivi mikroorganizmi nisu u mogućnosti multiplicirati se u pivu, već s vremenom u pivskom mediju odumiru. Ipak njihova prisutnost ukazuje na neodgovarajuću higijenu određenog dijela pogona uz potencijalnu mogućnost rasta i razvoja opasnijih vrsta mikroorganizama<sup>1,13,15</sup> kao što su: *Acetobacter* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Gluconobacter oxydans*, *P. agglomerans*, *Klebsiella* spp. i aerobni divlji kvasci.<sup>13,19</sup>

#### 2.1.3. Indirektno štetni mikroorganizmi

Indirektno štetni mikroorganizmi imaju neizravan utjecaj na kvarenje piva. Rastu tijekom procesa proizvodnje piva, uzrokujući negativna senzorska svojstva u konačnom proizvodu. U indirektno štetne mikroorganizme spadaju enterobakterije kao i određeni sojevi divljih kvasca iz roda *Saccharomyces cerevisiae*. *Obesumbacterium proteus* i *Rahnella aquatilis* najznačajniji su indirektno štetni mikroorganizmi iz skupine *Enterobacteriaceae*. Bakterije iz roda *Clostridium* također se smatraju indirektno štetnim mikroorganizmima, a najčešće potječu iz sirovina i pivskih dodataka te se razvijaju tijekom procesa proizvodnje pivske sladovine.<sup>13,19</sup>

#### 2.1.4. Potencijalno štetni mikroorganizmi

Potencijalno štetni mikroorganizmi mogu rasti i razmnožavati se u pivu kao hranjivom mediju ako su im uvjeti za rast i razvoj odgovarajući. To su *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus kristinae*, *Pediococcus inopinatus*, *Zymomonas mobilis*, *Z. raffinivorans* i *S. cerevisiae* (ex. *pastorianus*)<sup>13,19</sup> kao i *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis* i *Enterobacteriaceae*.<sup>1,15</sup>

Navedeni mikroorganizmi rastu u proizvodima s niskim udjelom alkohola i visokom koncentracijom neprevrelog ekstrakta, niskom koncentracijom hmelja te visokim sadržajem kisika i relativno visokom pH-vrijednošću (4,7 – 4,8).<sup>1,13,15</sup>

#### 2.1.5. Obligatno štetni mikroorganizmi

Obligatno štetni mikroorganizmi su najopasniji kvaritelji piva. To su anaerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji rastu i razmnožavaju se bez prisutnosti kisika, ali i pri niskim koncentracijama kisika. Odgovara im niska pH-vrijednost piva te bez duge prilagodbe imaju izravan negativan utjecaj na mikrobiološku kakvoću piva koja se očituje neodgovarajućim senzorskim profilom uz pojavu zamucenja i/ili taloga.<sup>1,13,15,19</sup> Referirajući se na autorice E. Storgårds<sup>13</sup> i K. Mastanjević,<sup>19</sup> u tu skupinu spadaju: *La-*

*ctobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. brevisimilis*, *L. frigidus*, *L. coryniformis*, *L. casei*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. frisingensis* i *Megasphaera cerevisiae*.

Određene vrste divljih kvasca također mogu imati izravan štetan učinak na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva piva uzrokujući neželjenu sekundarnu fermentaciju.<sup>1,13,15</sup> To su najčešće sojevi iz roda *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces pastorianus* i *Saccharomyces ellipsoideus*).<sup>1</sup> Također, postoje i druge vrste divljih kvasaca koje se smatraju oblatno štetnim mikroorganizmima, a ne pripadaju rodu *Saccharomyces* sp. U tu skupinu ubrajaju se kvasci iz roda *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Hansenula* i *Candida*.<sup>1,15</sup>

### 3. Najznačajniji mikrobnii kontaminanti, uzročnici kvarenja piva

Određene vrste mikroorganizama kvare pivo te uspješno rastu u pivu i sladovini kao hranjivim podlogama, a nazivaju se pivski kontaminanti. Među bakterijskim kulturama koje kvare pivo, četiri roda, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* i *Megasphaera*, smatraju se posebno štetnima za proizvođače piva s obzirom na učestalost incidenta i negativne učinke na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva piva.<sup>1,13–15,18</sup>

#### 3.1. Bakterije iz roda *Lactobacillus*

Laktobacili su gram-pozitivne štapičaste bakterije, a pripadaju skupini oblatno štetnih mikroorganizma.<sup>14</sup> Mogu se klasificirati u tri skupine:<sup>21–23</sup>

- obvezno homofermentativne bakterije,
- fakultativno heterofermentativne bakterije,
- obvezno heterofermentativne bakterije.

##### 3.1.1. Obvezno homofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus*

Obvezno homofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus* fermentiraju glukozu u mliječnu kiselinu i ne fermentiraju pentoze i glukonat. Neki od predstavnika su *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. gasserii*, *L. ruminis*.<sup>24,25</sup>

##### 3.1.2. Fakultativno heterofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus*

Fakultativno heterofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus* fermentiraju heksozu u mliječnu kiselinu i mogu proizvesti plin iz glukonata, ali ne iz glukoze, i fermentiraju pentoze u mliječnu i octenu kiselinu.<sup>23</sup> Neki od predstavnika su: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. sakei*.<sup>24,26</sup>

##### 3.1.3. Obvezno heterofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus*

Obvezno heterofermentativne bakterije iz roda *Lactobacillus*, poput *L. kefir*, *L. brevis*, *L. fermentum* i *L. reuteri*, fermentiraju heksoze u mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, etanol i CO<sub>2</sub>.<sup>14,24</sup> Ove bakterije imaju negativan utjecaj na kvalitetu piva, a mogu se naći u različitim fazama proizvodnje i skladištenja piva, posebno u pivskoj sladovini, tropu, tankovima za fermentaciju i maturaciju kao i napunjenoj ambalaži (boce, limenke, bačve).<sup>18</sup> Općenito se dijele na dvije skupine prema njihovoj toleranciji na etanol: niskoalkoholne i visokoalkoholne. Niskoalkoholne bakterije su one koje rastu pri koncentraciji etanola do 4 %, dok visokoalkoholne bakterije mogu rasti pri koncentraciji etanola iznad 12 %.<sup>18,27</sup>

Obvezno heterofermentativne bakterije u pivu mogu biti korisne ili štetne za kvalitetu i sigurnost piva, ovisno o vrsti i uvjetima.<sup>28</sup> Djelovanje štetnih vrsta obvezno heterofermentativnih bakterija iz roda *Lactobacillus* ima za posljedicu smanjenje pH-vrijednosti i stabilnosti pjene te promjenu senzorskih svojstava piva. Nakon određenog vremena, ovisno o stupnju kontaminacije, može se pojaviti i talog, te pivo postaje mutno.<sup>3,14,15,18,29,30</sup>

Od brojnih bakterijskih vrsta iz roda *Lactobacillus* za pivarsku industriju po broju prijavljenih incidenata najznačajniji je *Lactobacillus brevis*. *L. brevis* je gram pozitivna heterofermentativna bakterija koja raste pri temperaturi 1 – 30 °C u pH području 3,5 – 5,0 te je općenito otporna na spojeve hmelja.<sup>14,31</sup>

#### 3.2. *Pediococcus* sp.

Bakterije iz roda *Pediococcus* su gram-pozitivne, homofermentativne, fakultativno anaerobne bakterije koje ne proizvode katalazu, a pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline (BMK). Morfološki se po obliku svrstavaju u skupinu koka, a kao rezultat diobe stanica duž dvije simetrične ravnine pojavljuju se u obliku parova ili tetrada te su u pivarstvu poznati pod imenom *sarcina*.<sup>14,15,24,31–33</sup> Različiti sojevi bakterija iz roda *Pediococcus* razlikuju se po svojoj toleranciji na kisik, pH vrijednosti i temperaturi. Neke bakterijske vrste *Pediococcus* sp. mogu fermentirati ugljikohidrate, tj. glukozu do mliječne kiseline, što je popraćeno sniženjem pH vrijednosti i promjenom senzorskih svojstava.<sup>3,14,15,29,30,33</sup>

Najčešći pediokok pronađen u pivu tijekom procesa maturacije i u ambalaži je *Pediococcus damnosus*. *P. damnosus* raste i razmnožava se pri niskim temperaturama između 22 i 25 °C, tolerira niske pH-vrijednosti i visoku koncentraciju alkohola (etanola) te je otporan na antiseptička svojstva hmelja.<sup>14,15,31,32</sup> Samim time, uzročnik je mikrobioloških kontaminacija, što dovodi i do promjene fizikalno-kemijskih te senzorskih svojstava.

### 3.3. *Pectinatus* sp.

Bakterija *Pectinatus* je rod strogo anaerobnih, gram-negativnih, sfernih bakterija koje pripadaju podgrani *Sporomusa* unutar razreda *Clostridium*, što ukazuje na moguće gram-pozitivne pretke.<sup>34–36</sup> Prema Rodríguez-Saavedra i sur.,<sup>37</sup> bakterije iz roda *Pectinatus* su 2010. prekvalificirane u razred *Negativicutes*, red *Selenomonadales* i obitelj *Veillonellaceae*. Dosad je identificirano šest vrsta bakterija iz roda *Pectinatus*: *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae*, *P. brassicae*, *P. portalsensis*, *P. sottacetoni* koje se razlikuju po svojim genetičkim, fenotipskim i metaboličkim karakteristikama.<sup>38</sup>

Bakterije iz roda *Pectinatus* mikrobiološki razlikujemo prema obliku stanica, veličini, pokretljivosti, otpornosti na antibiotike te s obzirom na spektar fermentacije i otpornost na hmelj. Te bakterije imaju sposobnost razgradnje šećera, alkohola i organskih kiselina uz proizvodnju acetoina i razvoj sumporovodika ( $H_2S$ ), što se ogleda u senzorskoj olfaktornoj analizi, te zamućenjem piva što se ogleda u oftalmološkoj senzorskoj analizi.<sup>34,36,37,39–41</sup>

Bakterije *P. cerevisiophilus*, *P. frisingensis*, *P. haikarae* izolirane su iz pokvarenog piva, no njihovo prirodno stanište još uvijek nije poznato, te nije utvrđen način prijenosa. Prema istraživanjima, one mogu kontaminirati područja pivarske industrije kao i proizvode putem sirovina (ječmeni slad, kukuruzna krupica, riža, hmelj) te putem nečistih boca vraćenih s tržišta, kao i operativnim putem od radnog osoblja.<sup>37</sup>

### 3.4. *Megasphaera* sp.

Bakterije iz roda *Megasphaera* su gram-negativne, obvezno anaerobne bakterije koje pripadaju obitelji *Veillonellaceae*, podgrani *Sporomusa*, razredu *Clostridia*, koljenu *Firmicutes*.<sup>42,43</sup> Postoji pet bakterijskih vrsta iz roda *Megasphaera*, a to su: *M. cerevisiae*, *M. elsdenii*, *M. micronuciformis*, *M. paucivorans* i *M. sueciensis*.<sup>42,44</sup> Na temelju analize sekvencije gena dokazana je sličnost među vrstama u rasponu 88,0 – 94,5 %, <sup>42</sup> a morfološki se po obliku svrstavaju u skupinu koka, imaju prosječni promjer 0,4 – 2,0  $\mu m$  te su nepokretne i ne stvaraju spore.<sup>42,45</sup> Pojavljuju se u parovima, a povremeno i u kratkim lancima te se smatraju pravim i opasnim zagađivačem piva, pri čemu su bakterijske vrste *M. cerevisiae*, *M. paucivorans* i *M. sueciensis* najčešće izolirane i to uglavnom u nepasteriziranim gotovim proizvodima s niskim udjelom alkohola.<sup>46</sup> Bakterije iz roda *Megasphaera* striktno su anaerobne bakterije te mogu rasti u pivu s manje od 0,3  $mg\ l^{-1}$  otopljenog kisika i otporne su na antiseptička svojstva hmelja, a optimalna temperatura rasta im je između 15 i 37 °C. Sposobne su fermentirati glukozu, fruktozu i laktat kao i proizvoditi plin, te kao krajnji metabolički produkti nastaju:  $H_2S$ , octena, propionska, maslačna i valerična kiselina, što se ogleda u senzorskoj olfaktornoj analizi, a dolazi i do zamućenja piva, što se također ogleda u oftalmološkoj senzorskoj analizi.<sup>15,34,36,40,42,44,46</sup>

## 4. Izvori mikrobne kontaminacije

Izvori mikrobne kontaminacije u pivskoj industriji dijele se na primarnu i sekundarnu kontaminaciju. Primarna kontaminacija potječe od mikrobiološkog onečišćenja sirovina te se javlja u procesima kuhanja sladovine, fermentacije i maturacije, a sekundarna kontaminacija nastaje tijekom procesa punjenja piva. Dok se sekundarna kontaminacija uglavnom povezuje s neodgovarajućom higijenom opreme tijekom punjenja proizvoda u boce, limenke ili bačve, do incidenta kvalitete povezanog s mikrobiološkim onečišćenjem opreme može doći i tijekom procesa proizvodnje.<sup>3,9–13</sup> Mikrobna kontaminacija, bilo da potječe od primarnog ili sekundarnog izvora, dovodi do promjene fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava piva, a mogu je uzrokovati različite vrste mikroorganizma (bakterije, kvasci i plijesni), pri čemu se bakterije mliječne kiseline (*Lactobacillus* sp. i *Pediococcus* sp.) te bakterije iz roda *Pectinatus* i *Megasphaera* smatraju najznačajnijim mikrobnim kontaminantima u procesu proizvodnje i punjenja piva.<sup>2,3,7–9</sup> Glavne mikrobne vrste koje kontaminiraju pivo tijekom različitih faza tehnološkog procesa proizvodnje i punjenja piva prikazane su u tablici 1.

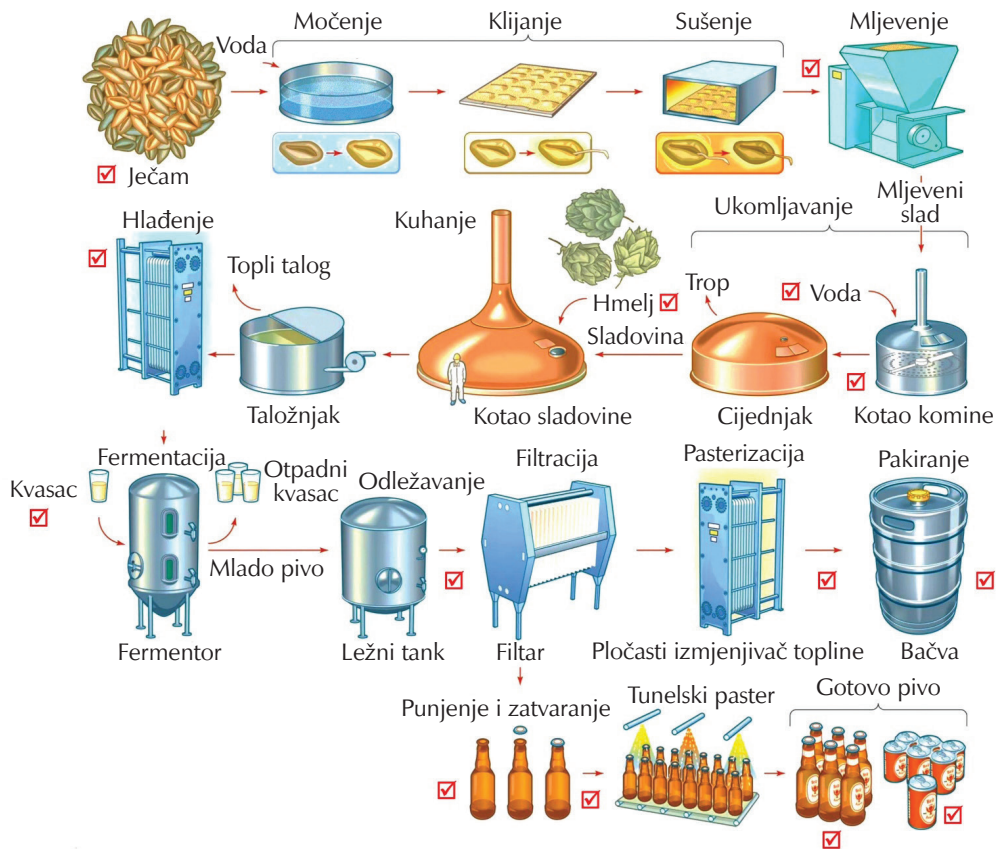
### 4.1. Primarna kontaminacija

Primarna kontaminacija u procesu proizvodnje piva odnosi se na sve postupke od zaprimanja sirovina do punjenja i pakiranja proizvoda te obuhvaća cijelu šaržu proizvoda,<sup>3</sup> što predstavlja izuzetnu opasnost za kvalitetu, zdravstvenu sigurnost i stabilnost proizvoda tijekom roka trajanja.

Ječmeni slad dobiva se tehnološkim procesom obrade ječma, što obuhvaća procese močenja, klijanja i sušenja, a tijekom procesa može biti kontaminiran različitim vrstama mikroorganizama. Mikrofloru ječma čine razne mikrobne vrste (bakterije, kvasci i filamentozne gljive) koje mogu imati pozitivne, ali i negativne učinke na kakvoću slada i piva. Negativni učinci mikroflora su slabija nalivenost i smanjenje klijavosti zrna te sinteza mikotoksina koja ima posljedicu prekomjernog pjenjenja piva, te nastaje tzv. "divlje pivo" (engl. *gushing effect*). Prisutnost mikotoksina također predstavlja opasnost po zdravlje potrošača, a najčešće se ogleda u lošem vizualnom izgledu zrna i nepoželjnoj aromi.<sup>3,5,6</sup>

Voda je glavni sastojak piva, a njezin udio u pivu iznosi 89 – 93 %.<sup>15</sup> Za proces proizvodnje piva voda se obrađuje raznim tehnološkim postupcima s ciljem uklanjanja kamenca i neželjenih organskih i anorganskih tvari, no samim time povećava se i rizik od mikrobiološke kontaminacije.<sup>1,3,48</sup>

Hmelj se u pivarstvu ponajprije upotrebljava za postizanje željene gorčine piva, no također djeluje kao antibakterijski i antioksidativni agens te pozitivno utječe na stabilizaciju piva.<sup>1,48,49</sup> Unatoč tome, hmelj može biti izvor mikrobiološke kontaminacije piva koja najčešće nastaje tijekom procesa proizvodnje i obrade hmelja te tijekom skladištenja.<sup>3,48</sup>



Slika 1 – Tehnološki proces proizvodnje piva s pripadajućim mogućim izvorima (☑) mikrobne kontaminacije<sup>47</sup>

Fig. 1 – Beer production associated with possible sources (☑) of microbial contamination<sup>47</sup>

Usljed neodgovarajućeg održavanja, i s tehničkog i s higijenskog aspekta, do kontaminacije može doći tijekom procesa hlađenja vruće sladovine u pločastom izmjenjivaču topline.<sup>13</sup>

Da bi se proveo proces fermentacije, neizostavna je upotreba pivskog kvasca koji se upotrebljava tijekom procesa fermentacije, pri čemu dolazi do konverzije šećera dobivenih procesom sladenja u alkohol i CO<sub>2</sub>.<sup>1,15</sup> Međutim, kvasac može biti i izvor kontaminacije u pivu koji negativno utječe na kvalitetu i sigurnost piva. To se najčešće događa tijekom postupka obnavljanja, tj. regeneracije upotrijebljenog kvasca s ciljem ponovne upotrebe.<sup>3,13</sup> Mikrobiološka stabilnost kvasca je ključna za cijeli proces proizvodnje piva, s obzirom na to da se u kasnijim fazama proizvodnje, maturacije (odležavanja) i punjenja mogu pojaviti tzv. divlji kvasci, koji se također smatraju pivskim kontaminantima.<sup>1,6,13–15,18</sup>

Uz opremu, koja je uslijed neodgovarajuće provedbe higijenskih postupaka često izvor kontaminacije u pivovarima, rizike izvora mikrobiološke kontaminacije također predstavljaju mjerni instrumenti kao što su termometri, manometri, ventili te dijelovi opreme s tzv. "slijepim ulicama" koje su teže dostupne tijekom provedbe postupaka čišćenja i dezinfekcije (CIP).<sup>13</sup>

U procesu maturacije također su moguće kontaminacije najčešće uzrokovane neodgovarajućom higijenom tanka, a izvori mogu biti i curenja na pripadajućim ventilima, cijevima i sl. Po završetku procesa maturacije slijedi proces filtracije, pri čemu se upotrebljavaju razna filtracijska sredstva, koja također mogu biti izvor kontaminacije.<sup>3,13</sup>

#### 4.2. Sekundarna kontaminacija

Prema dostupnoj literaturi, više od 50 % incidenata kvalitete povezanih s mikrobiološkom kontaminacijom pripisuje se procesima punjenja u boce, limenke ili bačve, tj. sekundarnoj kontaminaciji.<sup>3,9–11,13</sup> Stoga, svi dijelovi procesne opreme koji su u izravnom ili neizravnom kontaktu s praznim bocama namijenjenim za punjenje, kao i s napunjenim nezatvorenim bocama, limenkama ili bačvama mogući su izvori onečišćenja. Najčešći dijelovi procesne opreme, detektirani kao izvor sekundarnog onečišćenja su: brtve, peračica povratne ambalaže (boce), inspektor praznih boca, punjač i područje oko punjača te vodilica čepilica.<sup>9,13</sup> U području od peračice boca do inspektora praznih boca kontaminacija se najčešće događa tijekom transporta praznih opranih boca zbog prisutnosti mikroorganizama u zraku. Prisutnost mikroorganizama u zraku ovisi ponajprije o higijenskim uvjetima, temperaturi

Tablica 1 – Mikrobni kontaminanti tijekom različitih faza tehnološkog procesa proizvodnje i punjenja piva<sup>6</sup>  
 Table 1 – Spoilage microorganisms during different stages of beer production and bottling<sup>6</sup>

Procesni korak Process stage	Bakterije Bacteria	Kvasci Yeast	Plijesni Mold
Od ječma do slada From barley to malt	<i>Acetobacteriaceae</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Candida</i> sp. <i>Debaromyces</i> sp. <i>Hansenula</i> sp. <i>Hanseniaspora</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Sporobolomyces</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp.	<i>Absidia</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Botrytis</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Epicoccum</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
Sladovina Wort	<i>Enterobacteriaceae</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.	
Inokulacija sladovine Wort inoculation	<i>Obesumbacterium</i> sp. <i>Rhanella aquatilis</i>	<i>Saccharomyces</i> sp.	
Proces fermentacije Fermentation process	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.	
Maturacija (odležavanje) i pakiranje Maturation and packaging process	<i>Acetobacter</i> sp. <i>Gluconobacter</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Megasphaera</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Pectinatus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Selenomonas</i> sp. <i>Zymomonas</i> sp. <i>Zymophilus</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Bretanomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Hansenula</i> sp. <i>Hanseniaspora</i> sp. <i>Pichia</i> sp. <i>Schizosaccharomyces</i> sp. <i>Torulopsis</i> sp.	

i vlažnosti prostorije kao i o protoku zraka. Najveći broj incidenata kvalitete povezan s mikrobiološkom kontaminacijom obilgatno štetnih mikroorganizama koji kvare pivo zabilježen je na području punjača i čepilice.<sup>11</sup>

Do sekundarnih kontaminacija koje uzrokuju kvarenje piva ne dolazi iznenadno, već su one posljedica sekvencijalnog rasta mikrobioloških kultura koje se ne smatraju pivskim kontaminantima, tj. nemaju posljedicu kvarenja proizvoda. Najčešće su to bakterije octene kiseline i neke enterobakterije koje se “zavuku” u brtve, ventile ili dijelove opreme koji su teže dostupni za čišćenje i održavanje.<sup>9,13</sup> To su aerobni mikroorganizmi koji nemaju sposobnost rasta i razmnožavanja u pivu s obzirom na to da su zahtjevi za kisikom sve stroži i da je pivo proizvod s niskim udjelom kisika. Međutim, zbog sposobnosti stvaranja sluzi i u dotoku novih organskih tvari prisutni mikroorganizmi se hrane, rastu i razmnožavaju te se mikrobnj zajednici pridružuju i druge vrste mikroorganizama<sup>8–13</sup> koje potiču rast bakterija mliječne kiseline. U konačnici najopasniji pivski kontaminanti (*Pectinatus* sp. i *Megasphaera* sp.) mogu metabolizirati mliječnu kiselinu u propionsku kiselinu<sup>9,13,42,44</sup> rezultirajući značajnom mikrobiološkom kontaminacijom koja se ogleda u senzorskoj olfaktornoj analizi te u zamucenju piva što se ogleda u oftalmološkoj senzorskoj analizi.

## 5. Utjecaj mikrobne kontaminacije na senzorska svojstva piva

Prisutnost mikroorganizama u pivu svojim rastom i metaboličkom aktivnošću utječe na senzorska svojstva piva te ga ovisno o stupnju kontaminacije mogu činiti i neprihvatljivim za konzumaciju. Divlji kvasci i (fakultativno) anaerobne bakterije koje imaju sposobnost rasta i razmnožavanja u pivu povećavaju svoju biomasu, a to rezultira pojavom mutnoće, te u stadiju izraženijeg kvarenja sedimentiraju. Također, metabolička aktivnost bakterija može rezultirati sniženjem pH-vrijednosti piva, što se očituje u organoleptičkoj analizi. Pivo je tada kiseliše u odnosu na njegov standardni senzorski profil. Uz kiseli aromu, uslijed metaboličkih procesa prisutnih mikroorganizama u pivu, postoji niz negativnih aroma koje se javljaju kao posljedica mikrobiološke kontaminacije kako je prikazano u tablici 2.<sup>3,14,15,18,21,29,30,33,34,36,37,39–42,44</sup>

Bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* i *Pediococcus* uzrokuju visok stupanj zamucenja uz pojavu taloga, a glavni produkt njihova metabolizma je mliječna kiselina uz koju može nastati i octena kiselina što daje pivu kiseli okus. Uz navedeno, pivo može imati i okus i miris na užegnuti maslac, kao posljedica nastalog organskog spoja 2,3-butan-dion, poznatog pod imenom Diacetil.<sup>15,29,30</sup>

Tablica 2 – Mikrobni kontaminanti piva, proizvodi njihovog metabolizma i senzorske promjene piva  
Table 2 – Spoilage microorganisms, products of their metabolism, and influence on sensory beer profile

Mikroorganizam pivski kontaminant <i>Beer spoilage microorganism</i>		Produkti metabolizma <i>Product of metabolism</i>	Nepoželjna aroma/okus/izgled piva <i>Off flavour and visual appearance of beer</i>	Izvor <i>Source</i>
Bakterije mliječne kiseline <i>Lactic acid bacteria</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	Mliječna kiselina <i>Lactic acid</i> , Octena kiselina <i>Acetic acid</i> , Diacetil <i>Diacetyl</i>	kiselo <i>sour</i> , okus po maslacu <i>buttery taste</i> , zamućenost <i>turbidity</i>	3,14,15,18,21,29,30,33,50
<i>Pectinatus</i> sp.	<i>P. cerevisiophilus</i> , <i>P. frisingensis</i> , <i>P. haikarae</i>	Octena kiselina <i>Acetic acid</i> , Propionska kiselina <i>Propionic acid</i> , Acetoin <i>Acetoin</i> , H <sub>2</sub> S H <sub>2</sub> S	zamućenost <i>turbidity</i> , miris na pokvarena jaja <i>odour of rotten eggs</i>	34,36,37,39–41,50
<i>Megasphaera</i> sp.	<i>M. cerevisiae</i>	Maslačna, octena <i>Butyric acid</i> , Propionska kiselina <i>Propionic acid</i> , Kapronska kiselina <i>Kaprioc acid</i> , Izovalerijanska kiselina <i>Isovaleric acid</i> , Valerijanska kiselina <i>Valeric acid</i> , Acetoin <i>Acetoin</i> , H <sub>2</sub> S H <sub>2</sub> S	zamućenost <i>turbidity</i> , miris na pokvarena jaja <i>odour of rotten eggs</i>	15,34,36,40,42,44,50

Kvarenje piva s bakterijama *Pectinatus* sp. manifestira se pojavom mutnoće, izraženim kiselim okusom zbog nastanka octene, propionske i drugih organskih kiselina. Također, pivo dobiva miris na pokvarena jaja zbog nastanka suporovodika.<sup>34,36,37,40,41</sup>

Bakterije iz roda *Megasphaera* također uzrokuju zamućenost piva te proizvode sumporovodik. No za te bakterije je svojstveno da proizvode masne kiseline te maslačnu, valerijansku, kapronsku te propionsku kiselinu, koje pivu daju nepoželjnu aromu.<sup>34,36,41,42,44</sup>

## 6. Kontrola kvalitete procesa proizvodnje i punjenja piva s mikrobiološkog aspekta

Mikrobiološku kontrolu potrebno je provoditi tijekom cijelog procesa proizvodnje od zaprimanja sirovina do isporuke gotovog proizvoda (tablica 3). Cilj kontrole je u što ranijoj fazi procesa proizvodnje detektirati prisutnost neželjenih mikroorganizama te otkriti njihove izvore i spriječiti daljnji rast i razmnožavanje. Uobičajena metoda određivanja štet-

nih mikroorganizama je naciepljivanje istraživnog uzorka na hranjive podloge. Podloge mogu biti selektivne ili neselektivne, nakon čega slijedi inkubacija u strogo definiranim uvjetima (željena temperatura, aerobni ili anaerobni uvjeti) tijekom točno određenog vremena.<sup>1,14–16</sup> Ako uzorci sadrže mali broj mikrobnih stanica, potrebno ih je koncentrirati metodom membranske filtracije. Membranska filtracija je česta metoda uzorkovanja za mikrobiološku kontrolu jer se organizmi zadržani na membrani mogu izravno obojiti i mikroskopirati ili kultivirati tako što se membrana položi na čvrstu podlogu u Petrijevoj zdjelici.<sup>15,51</sup>

Kontrola higijene opreme, dijelova strojeva, posuda i cjevovoda provodi se uzimanjem zadnje ispirne vode (nakon CIP-a) te pomoću mikrobioloških briseva.<sup>1,15</sup>

Kontrola se provodi za sve vrste mikroorganizama koje kontaminiraju pivo (latentni, neškodljivi, indirektno štetni, potencijalno štetni i obligatno štetni mikroorganizmi).<sup>1,14–16</sup>

Uzorci se uzimaju sukladno propisanom planu uzorkovanja kako je prikazano u tablici 3. Plan uzorkovanja uspostavljen je za svaku pivovaru zasebno na temelju procjene rizika od mikrobiološke kontaminacije.<sup>1,3,14</sup>

Tablica 3 – Plan uzorkovanja i mikrobiološki kriteriji tijekom različitih faza tehnološkog procesa proizvodnje i punjenja piva<sup>14,52</sup>  
 Table 3 – Sampling plan and microbiological criteria during different stages of beer production and bottling process<sup>14,52</sup>

	MJESTO UZORKOVANJA SAMPLING PLACE	VRSTA MIKROORGANIZMA TYPE OF MICROORGANISM	KRITERIJ CRITERIA		MJESTO UZORKOVANJA SAMPLING PLACE	VRSTA MIKROORGANIZMA TYPE OF MICROORGANISM	KRITERIJ CRITERIA	
SLADOVINA WORT	Linija proizvodnje sladovine: provjera higijene Wort line: hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml <i>1 organism/ 100 ml</i>	MATURACIJA MATURATION	Tank za maturaciju (odležavanje): provjera higijene Maturation (storage) tank: hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml <i>1 organism/ 100 ml</i>	
		bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria			bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria	
SLADOVINA Wort	Sladovina Wort	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 25 ml <i>1 organism/ 25 ml</i>	Pivo tijekom procesa maturacije (odležavanja) Maturation (storage) process: beer analyses	ukupan broj aerobnih bakterija <i>total number of aerobic bacteria</i>	1 kolonija/ml <i>1 organism/ml</i>		
		bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria			divlji kvasci wild yeast	0 kvasaca 0 yeast	
KVASAC YEAST	Tank za pohranu kvasca: provjera higijene Yeast storage tank: hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml <i>1 organism/ 100 ml</i>	bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria			
		bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria					
KVASAC YEAST	Analiza kvasca Yeast analyses	ukupan broj aerobnih bakterija <i>total number of aerobic bacteria</i>	1 kolonija/ml <i>1 organism/ml</i>	TANK GOTOVOG (BISTROG) PIVA BRIGHT BEER TANK (BBT)	TANK gotovog (bistrog) piva: provjera higijene Bright beer tank (BBT): hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>the total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml <i>1 organism/ 100 ml</i>	
		divlji kvasci wild yeast	10 <sup>6</sup> procesnog kvasca <i>1 organism/10<sup>6</sup> process yeast</i>			bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria	
		bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria			ukupan broj aerobnih bakterija <i>total number of aerobic bacteria</i>	10 kolonija/ 100 ml <i>10 organisms/ 100 ml</i>	
FERMENTACIJA FERMENTATION	Tank za fermentaciju: provjera higijene Fermentation tank: hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml <i>1 organism/ 100 ml</i>	Analiza piva iz tanka gotovog (bistrog) piva Beer analyses from bright beer tank (BBT)	bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria		
		bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria				divlji kvasci wild yeast	0 kvasaca 0 yeast
		ukupan broj aerobnih bakterija <i>total number of aerobic bacteria</i>	1 kolonija/ml <i>1 organism/ml</i>				bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria
FERMENTACIJA FERMENTATION	Pivo tijekom procesa fermentacije Fermentation process: beer analyses	divlji kvasci wild yeast	0 kvasaca 0 yeast	bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria			
		bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria</i> , <i>Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria					
		ukupan broj aerobnih bakterija <i>total number of aerobic bacteria</i>	1 kolonija/ml <i>1 organism/ml</i>					



Tablica 3 – (nastavak)  
Table 3 – (continued)

	MJESTO UZORKOVANJA SAMPLING PLACE	VRSTA MIKROORGANIZMA TYPE OF MICROORGANISM	KRITERIJ CRITERIA
PODRUČJE PUNIONICE PIVA I NAPUNJENA AMBALAŽA FILLING AREA AND PACKAGED BEER	Punjač (boce, limenke, bačve): provjera higijene Filler (bottles, cans, kegs): hygiene check	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml 1 organism/ 100 ml
		bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria, Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria
	Brisevi na području punjača <i>Swabs at the filler area</i>	aerobne i anaerobne vrste mikroorganizama <i>aerobic and anaerobic microorganisms</i>	prema definiranim kriterijima <i>according to defined criteria</i>
	Prazna ambalaža <i>Empty container</i>	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	1 kolonija/ 100 ml 1 organism/ 100 ml
		bakterije mliječne kiseline <i>lactic acid bacteria</i>	0 bakterija 0 bacteria
	Napunjena ambalaža <i>Filled container</i>	ukupan broj aerobnih mikroorganizama <i>total number of aerobic microorganisms</i>	0 bakterija, kvasaca i plijesni <i>0 bacteria, yeast, mould</i>
		divlji kvasci <i>wild yeast</i>	0 kvasaca 0 yeast
		bakterije mliječne kiseline, <i>Pectinatus</i> sp. i <i>Megasphaera</i> sp. <i>lactic acid bacteria, Pectinatus</i> sp. and <i>Megasphaera</i> sp.	0 bakterija 0 bacteria

### 6.1. Hranjive podloge za detekciju mikroorganizama u pivarskoj industriji

Hranjive podloge su otopine tvari koje mikroorganizmi u laboratorijskim uvjetima omogućuju rast i razmnožavanje. Mogu se pripremati u laboratoriju od pojedinih sastojaka prema postojećoj recepturi, no danas je na raspolaganju mnogo komercijalnih dehidriranih podloga u prahu koje su znatno jednostavnije za upotrebu. Wallerstein Laboratory Nutrient medij (WLN agar) je komercijalno dostupna hranjiva podloga koja sadrži sve potrebne izvore kemijskih elemenata i energije za rast i razmnožavanje aerobnih bakterija, kvasaca i plijesni specifičnih za pivarsku industriju. Posebna pažnja posvećuje se mikrobiološkoj čistoći kulture kvasca koja se upotrebljava u procesu fermentacije. U tu svrhu primjenjuju se inhibicijske podloge na kojima ne raste kultivirani kvasac, već rastu samo neke vrste nepoželjnih divljih kvasaca. Najčešće upotrebljavana inhibicijska podloga s tom svrhom je WLN agar uz dodatak cikloheksimida, poznatog pod imenom aktidion. Aktidion (cikloheksimid) je antifungalni antibiotik koji inhibira

rast većine kultiviranih kvasaca već pri koncentraciji manjoj od  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , dok je za divlje kvasce prag tolerancije  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Dodatak bakrova sulfata također će inhibirati rast kultiviranih vrsta procesnog kvasca, a omogućiti rast i razmnožavanje za divlje kvasce.<sup>14,15</sup> Lizin agar je najpoznatija selektivna podloga za rast i razmnožavanje divljih kvasca koji raste na aminokiselini lizinu kao jedinom izvoru dušika. Za kvasce koji se za rast i razmnožavanje koriste izvorima ugljika upotrebljavaju se još i dekstrin ili škrobni agar te citratni ili ksiloza agar.<sup>15</sup>

Za selektivnu izolaciju i detekciju bakterija mliječne kiseline kao standardna hranjiva podloga najčešće se upotrebljava MRS bujon. Preporučuju se također brojne druge hranjive podloge od kojih su iznimno bogate i komercijalno dostupne Raka Ray No.3 i NBB®.

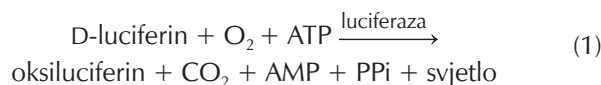
Obligatno štetni mikroorganizmi, *Pectinatus* sp. i *Megasphaera* sp. detektiraju se upotrebljavajući posebno osjetljive selektivne hranjive podloge koje sadrže redukcijske tvari za poticanje rasta striktno anaerobnih bakterija.<sup>1,14,31</sup>

### 6.2. Metode brzog određivanja mikroorganizama koje uzrokuju kvarenje piva

U pivarstvu se primjenjuju brojne brze metode za detekciju i identifikaciju mikroorganizama koji su uzročnici kvarenja piva, kako je prikazano u tablici 4. Tome doprinose oštri zakonski propisi, zahtjevi potrošača, velika ponuda konkurentnih piva na tržištu, povećan trend izbjegavanja pasterizacije piva i tehnološka unaprijeđenja.<sup>14,15</sup>

Od svih navedenih tehnika prikazanih u tablici 4, prema brzini detekcije i reproducibilnosti rezultata te troškovima analize, u pivarskoj industriji najčešće se primjenjuju ATP bioluminiscencija i lančana reakcija polimerazom (PCR).

Adenozin trifosfat (ATP) molekula je vrlo važna za organizam, a ATP bioluminiscencija je metoda kojom se provodi mjerenje učinkovitosti higijenskih postupaka u raznim industrijskim pogonima, pa tako i u industriji piva. To je brz, jednostavan i visoko osjetljiv proces koji daje uvid u količinu svjetla koju produciraju bakterije zahvaljujući reakciji ATP-a s enzimom luciferazom. Skupina enzima luciferaze zajedno s kofaktorima D-luciferinom i kisikom producira svjetlo<sup>14,50,54</sup> prema sljedećoj reakciji:<sup>54,55</sup>



Do emisije svjetla dolazi jer se u reakciji formira oksiluciferin u elektronski pobuđenom stanju te otpušta foton svjetlosti. Količina emitiranog svjetla mjeri se luminometrom, a izražava se RLU jedinicama (engl. *Relative Light Units*). RLU vrijednost proporcionalna je količini ATP-a koji se nalazio na testnoj površini s koje je bris za ispitivanje higijene uziman.<sup>14,54,55</sup>

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda koja na vrlo specifičan način omogućuje umnažanje DNA fragmenta pomoću enzima polimeraze. Postupak podrazumijeva da znamo rubne sekvencije DNA fragmenta koji želi-

Tablica 4 – Tehnike brze detekcije i identifikacije mikroorganizama<sup>14,15,50,53,54</sup>

Table 4 – Techniques for rapid detection and identification of microorganisms<sup>14,15,50,53,54</sup>

METODA METHOD	TEHNIKE TECHNIQUES
Fizikalno kemijske metode Physicochemical methods	Mjerenje vodljivosti Conductivity measurement
	Mikrokolorimetrija Microcolorimetry
	Turbidometrija Turbidometry
	Protočna citometrija Flow cytometry
Biokemijske metode Biochemical methods	ATP bioluminiscencija ATP bioluminescence
	Direktna epifluorescentna mikroskopija Direct epifluorescence microscopy
	Uzimanje proteinskih otisaka Protein fingerprinting
	Imunoanaliza (ELISA) Immunoassay (ELISA)
Molekularne metode Molecular methods	Molekularne probe (DNK/RNK) Molecular trials (DNA/RNA)
	Kariotipija Karyotyping
	Lančana reakcija polimerazom (PCR) Polymerase chain reaction (PCR)
Imunološke metode Immunological methods	Tehnike monoklonskih antitijela Monoclonal antibody techniques

mo umnožiti da bismo mogli sintetizirati oligonukleotidne početnice, koje će omogućiti početak sinteze određenog DNA fragmenta. Reakcija se odvija u lancu, odnosno ponavljanjem u nekoliko ciklusa, a sa svakim ponavljanjem broj DNA fragmenata se eksponencijalno povećava.

PCR metoda omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanog uzorka te je u vrlo kratkom vremenu moguće ispitati mikrobiološku ispravnost uzorka piva. Testovi su grupirani na temelju fizioloških i biokemijskih karakteristika skupine mikroorganizama (bakterije, kvasci, divlji kvasci), zbog čega je moguće jednim testom identificirati nekoliko vrsta mikroorganizama pojedine skupine.<sup>14,50,53,54</sup>

Odabir odgovarajuće metode za testiranje i utvrđivanje kontaminacije ponajprije ovisi o financijskim mogućnostima pivovare, ali i stručnosti laboratorijskog osoblja. Uz odgovarajuću stručnost laboratorijskog osoblja tradicionalne mikrobiološke metode, pored brojnih ograničenja u usporedbi s instrumentalnim metodama (tablica 5) prikladne su za svakodnevnu mikrobiološku kontrolu. To je posebno izraženo kod velikih proizvodnih pogona koji kontinuirano

educiraju laboratorijsko osoblje. Uz svakodnevnu primjenu tradicionalnih metoda prema potrebi primjenjuju se i brze (suvremene) metoda. Manji industrijski pogoni (*craft* pivovare) često imaju nedostatak stručnog laboratorijskog osoblja kao i ograničena financijska sredstva, što im otežava mikrobiološku kontrolu proizvodnog pogona i piva. U svakom slučaju, s ciljem smanjenja rizika na najmanju moguću razinu, svi industrijski pogoni, bilo da je riječ o velikim industrijama ili malim (*craft*) pivovarama, moraju biti u mogućnosti brzo otkriti i identificirati mikrobnе kontaminante tijekom cijelog procesa proizvodnje, punjenja i pakiranja piva.<sup>1,14,15,50,53</sup>

Tablica 5 – Usporedba tradicionalnih i brzih instrumentalnih metoda za mikrobiološku analizu piva<sup>14,15,50,53,54</sup>

Table 5 – Comparison of traditional and rapid instrumental methods for microbiological analyses of beer<sup>14,15,50,53,54</sup>

Tradicionalne metode Traditional methods	Brze metode (suvremene) Rapid methods (contemporary methods)
Intenzivan i naporan rad laboratorijskog osoblja Intensive and strenuous work of laboratory staff	Automatizirane i lake za upotrebu Automated and user-friendly
Dugo vremensko razdoblje do rezultata Extended waiting period for results	Brzo dobivanje rezultata Fast obtaining of results
Mala ulaganja Low investments	Skupi analitički uređaji i kemikalije Expensive analytical devices and chemicals
Subjektivna obrada podataka Subjective data processing	Objektivna obrada podataka Objective data processing
Ograničena reproducibilnost rezultata Limited reproducibility of results	Dobra reproducibilnost rezultata Good reproducibility of results
Ponovljivost rezultata ovisi o kvaliteti laboratorija i iskustvu laboratorijskog osoblja. Repeatability of results depends on the quality of the laboratory and experience of laboratory staff.	Ponovljivost rezultata ne ovisi o kvaliteti laboratorija i iskustvu laboratorijskog osoblja. Standardni protokoli rada. Reproducibility of results is not dependent on the quality of the laboratory and experience of laboratory staff. Standard operating protocols.

## 7. Zaključak

Mikrobna kontaminacija može znatno utjecati na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva piva, čineći ga neprihvatljivim za konzumaciju te pivovari stvoriti proizvodne i financijske gubitke. Prisutnost bakterija u pivu očituje se u povećanju biomase i pojavi mutnoće, a kod izražajnijeg kvarenja i nastajanju taloga. Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus* sp. i *Pediococcus* sp.) najčešće rezultira promjenom pH-vrijednosti, što ima kao

posljedicu promjenu senzorskog profila piva koja se manifestira kiselim okusom uslijed nastanka mliječne i octene kiseline. Striktno anaerobne bakterije *Pectinatus* sp. i *Megasphaera* sp. smatraju se iznimno opasnim pivskim kontaminantima za koje je svojstveno da proizvode octenu, propionsku, maslačnu, valerijansku, izovalerijansku te kapronsku kiselinu uz nastajanje acetoina i H<sub>2</sub>S što pivu daje nepoželjnu aromu na pokvarena jaja te ga čini zamućenim uz pojavu taloga. Higijena pogona i tehnološke opreme ključna je za sprječavanje mikrobnog onečišćenja te je optimizacija postupaka čišćenja i dezinfekcije ključna za smanjenje rizika od kontaminacije u svim fazama procesa proizvodnje. Učinkovitost postupaka čišćenja i dezinfekcije te cijeli tehnološki proces proizvodnje i punjenja piva mora biti popraćen propisanim mikrobiološkim analizama sukladno planu uzorkovanja. U tu svrhu, pivovare provode mikrobiološku analizu uzoraka primjenjujući tradicionalne, ali i suvremene metode detekcije i identifikacije, ovisno o financijskim mogućnostima pivovare, ali i stručnosti laboratorijskog osoblja. Na taj način se osigurava mikrobiološka ispravnost proizvoda, sprječavajući tako proizvodne i financijske gubitke. Pivovare moraju biti u mogućnosti brzo detektirati i identificirati mikrobne kontaminante tijekom cijelog procesa proizvodnje, punjenja i pakiranja piva, čime se osigurava kvaliteta i sigurnost proizvoda te smanjuje rizik od reklamacija kupaca i potrošača i čuva ugled proizvoda te tvrtke koja ga proizvodi i puni.

#### ZAHVALA

Rad je nastao u sklopu projekta "Atrij znanja", koji je sufinancirala Europska unija iz fonda za regionalni razvoj, Operativni program "Konkurentnost i kohezija" 2014. – 2020. Broj ugovora: KK.01.1.1.02.0005.

#### Literatura References

1. W. Kunze, Technology Brewing and Malting, 6<sup>th</sup> ed. VLB Berlin, Njemačka, 2019.
2. K. Kamala, V. P. Kumar, Chapter 1 – Food Products and Food Contamination, u A. M. Holban and A. M. Grumezescu (ur.), In Handbook of Food Bioengineering, Microbial Contamination and Food Degradation, Vol. 10, Academic Press, London, Cambridge, Oxford, Velika Britanija, 2018., str. 1–19.
3. C. Ciont, A. Epuran, A. D. Kerezsi, T. E. Coldea, E. Mudura, A. Pasqualone, H. Zhao, R. Suharoschi, F. Vriesekoop, O. L. Pop, Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production, *Foods*. **11** (17) (2022) 1–19, doi: <https://doi.org/10.3390/foods11172693>.
4. A. Darwish, M. Ricci, F. Zidane, J. A. T. Vasquez, M. R. Casu, J. Lanteri, C. Migliaccio, F. Vipiana, Physical Contamination Detection in Food Industry Using Microwave and Machine Learning, *Electronics (Switzerland)* **11** (19) (2022) 1–17, doi: <https://doi.org/10.3390/electronics11193115>.
5. K. Habschied, N. Velić, M. Tišma, V. Krstanović, Utjecaj mikroflore ječma i pšenice na kakvoću slada i piva, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **6** (3-4) (2011) 100–111.
6. I. M. Suiker, H. A. Wösten, Spoilage yeasts in beer and beer products, *Curr. Opin. Food Sci.* **44** (2022) 1–7, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100815>.
7. J. Bergsveinson, V. Pittet, B. Ziola, RT-qPCR analysis of putative beer-spoilage gene expression during growth of *Lactobacillus brevis* BSO 464 and *Pediococcus clausenii* ATCC BAA-344 T in beer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96** (2) (2012) 461–470, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4334-3>.
8. C. Faille, C. Cunault, T. Dubois, T. Bénézec, Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **46** (2018) 65–73, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.002>.
9. A. Devolli, M. Kodra, E. Shahinasi, D. Feta, F. Dara, Hygienic Control In Beer Bottling And Dispensing System, *J. Hyg. Eng. Des.* **15** (2016) 1–11, UDC 663.4:579.67
10. E. M. Wagner, S. Thalguter, M. Wagner, K. Rychli, Presence of microbial contamination and biofilms at a beer can filling production line, *J. Food Prot.* **84** (5) (2021) 896–902, doi: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-368>.
11. E. Storgårds, K. Tapani, P. Hartwall, R. Saleva, M. L. Suihko, Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **64** (1) (2006) 8–15, doi: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>.
12. M. Michel, S. Cocuzza, M. Biendl, F. Peifer, S. Hans, Y. Methner, F. Pehl, W. Back, F. Jacob, M. Hutzler, The impact of different hop compounds on the growth of selected beer spoilage bacteria in beer, *J. Inst. Brew.* **126** (4) (2020) 354–361, doi: <https://doi.org/10.1002/jib.624>.
13. E. Storgårds, Process hygiene control in beer production and dispensing, VTT Publications, Espoo, Finska, 2000.
14. G. G. Stewart, I. Russell, A. Anstruther, Handbook of Brewing, 3. izd., CRC Press, Boca Raton, SAD, 2018.
15. V. Marić, Tehnologija Piva. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, 2009.
16. M. C. Barney, E. J. Kot, A comparison of rapid microbiological methods for detecting beer spoilage microorganisms, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **29** (1992) 91–95.
17. C. Rainbow, Beer spoilage microorganisms, u J.R. Pollock (ur.), *Brewing Science*, Vol 2, Academic Press, New York, SAD, 1981., str. 491–550.
18. K. Suzuki, 125<sup>th</sup> Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria, *J. Inst. Brew.* **117** (2) (2011) 131–155, doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>.
19. K. Mastanjević, S. Keleković, A. Domaćinović, T. M. Pavetić, K. Mastanjević, Draught Beer-Maintaining the Quality Through Hygienic Measures, u D. Blažević, N. Ademović, T. Barić, J. Cumin and E. Desnica (ur.), 31<sup>st</sup> International Conference on Organization and Technology of Maintenance (OTO 2022, Osijek). Lecture Notes in Networks and Systems, Vol. 592, Springer, Cham, 2022., str. 176–185.
20. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Pravilnik o pivu (NN 142/2011).
21. W. H. Holzapfel, R. Geisen, U. Schillinger, Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food-Grade Enzymes, *Int. J. Food Microbiol.* **24** (1995) 343–362, doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00036-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00036-6).
22. M. E. Stiles, W. H. Holzapfel, Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy, *Int. J. Food Microbiol.* **36** (1997) 1–29, doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01233-0).
23. E. Salvetti, S. Torriani, G. E. Felis, The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update, *Probiotics Antimicrob. Prot.* **4** (4) (2012) 217–226, doi: <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>.
24. B. Ray, A. Bhunia, *Fundamental Food Microbiology*, 6<sup>th</sup> ed., CRS Press, Boca Raton, SAD, 2014.

25. T. G. Giaccon, G. Caetano de G. E. Cunha, K. P. Eliodório, R. Pinheiro de S. Oliveira, T.O. Basso, Homo- and heterofermentative lactobacilli are distinctly affected by furanic compounds, *Biotechnol Lett.* **44** (12) (2022) 1431–1445, doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03310-6>.
26. A. Ricciardi, E. Parente, A. Tramutola, A. Guidone, R.G. Ianniello, D. Pavlidis, E. Tsakalidou, T. Zotta, Evaluation of a differential medium for the preliminary identification of members of the *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* groups, *Ann. Microbiol.* **65** (3) (2015) 1649–1658, doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1004-y>.
27. R. S. Gold, M. M. Meagher, R. Hutkins, T. Conway, Ethanol Tolerance and Carbohydrate Metabolism in Lactobacilli, *J. Ind. Microbiol.* **10** (1) (1992) 45–54, doi: <https://doi.org/10.1007/BF01583633>.
28. F. Vriesekoop, M. Krahl, B. Hucker, G. Menz, 125<sup>th</sup> Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly, *J. Inst. Brew.* **118** (4) (2012) 335–345, doi: <https://doi.org/10.1002/jib.49>.
29. S. Q. Liu, Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour, u A. Hill (ur.), *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier, Cambridge, Velika Britanija, 2015., str. 357–374.
30. J. Liu, L. Li, B. Li, B. M. Peters, Y. Deng, Z. Xu, M. E. Shirtliff, Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*, *Microb. Pathog.* **110** (2017) 257–261, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.044>.
31. K. Sakamoto, W. N. Konings, Beer spoilage bacteria and hop resistance, *Int. J. Food Microbiol.* **89** (2-3) (2003) 105–124, doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3).
32. I. Snauwaert, P. Stragier, L. De Vuyst, P. Vandamme, Comparative genome analysis of *Pediococcus damnosus* LMG 28219, a strain well-adapted to the beer environment, *BMC Genomics* **16** (1) (2015) 1–12, doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1438-z>.
33. S. D. Todorov, C. M. Dioso, M. T. Liong, L. A. Nero, K. Khosravi-Darani, I. V. Ivanova, Beneficial features of *Pediococcus*: from starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **39** (1) (2023) 1–20, doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03419-w>.
34. A. Haikara, I. Helander, *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*, u M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (ur.), *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*, 3<sup>th</sup> ed., Springer, New York, SAD, 2006., str. 293–300.
35. I. M. Helander, A. Haikara, I. Sadovskaya, E. Vinogradov, M. S. Salkinoja-Salonen, Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *Pectinatus* – Lipopolysaccharides of a Gram-positive genus, *FEMS Microbiol. Rev.* **28** (5) (2004) 543–552, doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.05.001>.
36. P. Ashtavinayak, H. A. Elizabeth, Review: Gram Negative Bacteria in Brewing, *Adv. Microbiol.* **06** (03) (2016) 195–209, doi: <https://doi.org/10.4236/aim.2016.63020>.
37. M. Rodríguez-Saavedra, D. González de Llano, G. Beltran, M. J. Torija, M. V. Moreno-Arribas, *Pectinatus* spp. – Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* **336** (2021) 108900, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108900>.
38. A. C. Parte, LPSN – List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68** (6) (2018) 1825–1829, doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>.
39. C. C. Kern, R. F. Vogel, J. Behr, Identification and differentiation of brewery isolates of *Pectinatus* sp. by Matrix-Assisted-Laser Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), *Eur. Food. Technol.* **238** (5) (2014) 875–880, doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2173-4>.
40. A. Vaughan, T. O'Sullivan, D. Van Sinderen, Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review, *J. Inst. Brew.* **111** (4) (2005) 355–371, doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>.
41. A. B. Díaz, E. Durán-Guerrero, C. Lasanta, R. Castro, From the Raw Materials to the Bottled Product: Influence of the Entire Production Process on the Organoleptic Profile of Industrial Beers, *Foods* **11** (20) (2022), doi: <https://doi.org/10.3390/foods11203215>.
42. H. Marchandin, R. Juvonen, A. Haikara, *Megasphaera* u W. B. Whitman (ur.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2015., str. 1–11.
43. V. B. Lanjekar, N. P. Marathe, V. Venkata Ramana, Y. S. Shouche, D. R. Ranade, *Megasphaera indica* sp. nov., an obligate anaerobic bacteria isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64** (2014) 2250–2256, doi: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059816-0>.
44. S. A. Shetty, N. P. Marathe, V. Lanjekar, D. Ranade, Y. S. Shouche, Comparative genome analysis of *Megasphaera* sp. reveals niche specialization and its potential role in the human gut, *S. PLoS One.* **8** (11) (2013) e79353, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079353>.
45. R. Juvonen, M. L. Suihko, *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56** (4) (2006) 695–702, doi: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63699-0>.
46. L. Kyselová, T. Brányik, Quality improvement and fermentation control in beer, u A. Méndez-Vilas (ur.), *Microbial pathogens and strategies for combating them. Science, technology and education*, Formatex Research Center, Badajoz, Španjolska, 2015., str. 1008–1016.
47. T. W. Young, Beer. *Encyclopedia Britannica*, URL: <https://www.britannica.com/topic/beer> (7. 11. 2023.).
48. H. M. Eßlinger, *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH, Freiberg, Njemačka, 2009.
49. J. C. Machado, F. Lehnhardt, Z. E. Martins, M. A. Faria, H. Kollmannsberger, M. Gastl, T. Becker, I. M. P. L. V. O. Ferreira, Sensory and olfactometry chemometrics as valuable tools for assessing hops' aroma impact on dry-hopped beers: A study with wild Portuguese genotypes, *Foods* **10** (6) (2021) 1397, doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061397>.
50. E. Storgårds, A. Haikara, R. Juvonen, Brewing control systems: microbiological analysis, u C.W. Bamforth (ur.), *Brewing: New Technologies*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, Velika Britanija, 2006., str. 391–426.
51. J. G. Mulvany, *Membrane Filter Techniques in Microbiology*, u J. R. Norris, D. W. Ribbons (ur.), *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, Velika Britanija, 1969., str. 205–253.

52. I. Čosić, B. Matijević, Mikrobiološki plan uzorkovanja, Ve-leučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, 2022.
53. K. Suzuki, Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon – A Review, J. Am. Soc. Brew. Chem. **78** (2020) 245–259, doi: <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1782101>.
54. R. C. Oldham, M. A. Held, Methods for detection and identification of beer-spoilage microbes, Front. Microbiol. **14** (2023) 1–15, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1217704>.
55. G. Shama, D. J. Malik, The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays, Int. J. Hyg. Environ Health. **216** (2) (2013) 115–125, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.009>.

## SUMMARY

### Microbiological Risks in Beer Production – Safety and Quality Aspects

Ivana Čosić<sup>a</sup>\* and Bojan Matijević<sup>b</sup>

Beer is considered as a relatively stable product with regard to microbial spoilage. Its chemical composition does not favour the growth of most microorganisms, due to its low pH and content of fermentable carbohydrates, alcohol, hop ingredients, and the anaerobic conditions generated by CO<sub>2</sub>. However, certain bacterial species can grow in beer, leading to metabolic activity that alters its physicochemical and sensory characteristics, rendering the beer unacceptable for consumption. Bacterial growth in beer can manifest as biomass and turbidity, and in severe cases, sediment formation. The microbial population within the brewery changes throughout the beer production process. Particularly harmful spoilage bacteria for beer production belong to the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* and *Megasphaera*. To minimise the risk to the lowest possible level, all industrial facilities, whether large-scale or small craft breweries, must be able to quickly detect and identify microbial contaminants throughout the entire technological process. Microbiological analysis during production, filling, and packaging is crucial for ensuring the quality and safety compliance of the product for consumption. Therefore, breweries conduct microbiological analysis of samples using both traditional and modern detection and identification methods. This review explores the impact of microbial contamination on the physicochemical and sensory properties of beer, highlighting the challenges that breweries face in ensuring the microbiological integrity of the product. The article emphasizes the importance of maintaining product quality and safety, as well as preventing production and financial losses.

#### Keywords

Beer, microbial contamination, sensory properties of beer, microbiological safety assurance, traditional and modern microbiological methods

<sup>a</sup>Croatian Meteorological and Hydrological Service, Air Quality Sector, Chemical Laboratory Department, Ravnice 48, 10 000 Zagreb, Croatia

<sup>b</sup>University of Applied Sciences, Trg Josipa Jurja Strossmayera 9, 47 000 Karlovac, Croatia

Review  
Received December 19, 2023  
Accepted January 24, 2024