

Výskyt silně flokulující kontaminace v lahvovém pivě

Ing. JAN ŠAVEL, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

Do redakce došlo 3. února 1972

Cizí kvasinky zaujímají důležité místo mezi mikroorganismy kazícími pivo. Mohou využívat zbytkové cukry piva, rozmnožovat se v něm a kazit je tvorbou sedimentu nebo zákalu. Kvasničný zákal vzniká v stočeném pivu méně často, většinou u více provzdušněných piv, v nichž se mohou rozmnožovat kvasinky s převahou aerobního metabolismu nad anaerobním. Tato zjištění, často uváděná v literatuře, jsme si potvrdili sledováním velkého počtu vzorků piv s nízkou trvanlivostí (Šavel, 1970). Tvorba kvasničné sedimentu je tedy nejčastější příčinou porušení předepsané trvanlivosti lahvového piva.

Kvasničná sedimentu v pivě bývá práškovitá, krupicovitá, nebo se buňky kvasnic seskupí do větších shluků. Tyto sedimenty lze obvykle snadno rozmíchat několikerým převrácením láhve.

Mnoho cizích kvasinek tvoří sedimentu stejného charakteru jako kulturní kmen a kromě toho bývají v sedimentu přítomny kvasinky různých druhů. Vzhledem sedimentu závisí nejen na druhu kvasinek a složení piva, ale liší se i mezi různými kmeny jednoho druhu kvasinek. Proto lze jen obtížně ze vzhledu sedimentu soudit na přítomnost cizích kvasinek.

Průkaz a stanovení cizích kvasinek v sedimentu zkažených piv umožňuje mnoho mikrobiologických testů (Bendová a Urmová 1972, Gilliland 1971, Šavel 1970). Případy, v nichž lze přímo z charakteru sedimentu spolehlivě určit, že se pivo zkažilo cizími kvasinkami, jsou dosti vzácné. Tímto druhem kvasničné kontaminace se zabývá naše sdělení.

Materiál a metody

Kvasničné kmeny. Kmeny *Sacch. logos*, *Sacch. pastorianus*, *Sacch. exiguus*, *Sacch. diastaticus* a flokulující kmeny *Sacch. carlsbergensis* jsme obdrželi ze sbírky VÚPS v Praze, kmeny *Sacch. cerevisiae* ze sbírky katedry mikrobiologie VŠCHT v Praze. Vlastnosti cizích kvasinek z naší sbírky jsme popsali v předešlém sdělení (Šavel 1970).

Určení charakteru sedimentu v pivě. 10° pasterované pivo v 0,5 l láhvi jsme zaočkovali 0,2 ml kvasničné suspenze, získané třídenní kultivací čistého kvasničného kmene v sladidě (10 % hm) při 28 °C. Láhev jsme asepticky uzavřeli sterilní korunkou a po pětidenní kultivaci při 20 °C jsme hodnotili charakter sedimentu.

Stanovení vlastností izolovaných kmenů kvasinek. Všechny znaky izolovaných kvasničných kmenů jsme určili podle Lodderové (1952, 1970).

Sedimentační vlastnosti kvasinek. Čisté kmeny kvasinek jsme kultivovali 5 dní při 20 °C v provozní (10 % hm) mladině a po separaci kvasinek jsme měřili jejich sedimentační vlastnosti podle Helma a Thorna (1953).

Průkaz cizích kvasinek. Přítomnost cizích kvasinek jsme prokazovali kultivační metodou na půdě s krystalovou violetí (Scherrer et al. 1969) a s kyselinou jódoctovou (Šilhánková 1962, Šavel 1970).

VÝSLEDKY POKUSŮ

Výskyt a izolace silně flokulující kvasničné kontaminace

V lahvovém pivu jednoho závodu našeho národního podniku se v krátké době po stočení (3 až 5 dní) objevovaly velké shluky bílé, sýrovité hmoty. Mikroskopickou prohlídkou jsme zjistili, že se skládají z kvasničných buněk morfologicky obtížně odlišitelných od buněk kulturního kmene. Protřepáním láhve zkaženého piva se shluky rozptýlily, ale po 2 až 3 hodinách klidu se samovolně spojily ve větší kusy vzhledem podobné kouskům žvýkačkových gumy. Tyto aglomeráty lpěly velmi pevně na dně láhve a bylo je možno uvolnit pouze velmi intenzivním protřepáváním. Závada činila samozřejmě pivo neprodejným a bylo ji nutno co nejdříve odstranit.

Ze shluků kvasinek jsme izolovali kvasničný kmen, který kazil pivo stejným postupem. Protože tento kmen dobře rostl na půdě s krystalovou violetí, bylo zřejmé, že původcem nákazy je kmen cizích kvasinek. Stejnou metodou jsme identifikovali zdroj kontaminace. Byl jím nedostatečně vyčištěný úsek potrubí mezi filtrem a stáčecím strojem.

Po dokonalé sterilaci stáčecích cest se podařilo závadu odstranit a trvanlivost piva se zvýšila na 10 až 14 dní. Pivo se nyní kazilo pouze kvasinkami kulturního kmene za vzniku prachovité nebo krupicovité sedimentu.

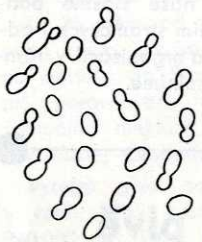
Popsaná kontaminace piva je v praxi velmi nepříjemná nízkou trvanlivostí napadeného piva i charakteristickým vzhledem sedimentu, která snadno upoutá pozornost spotřebitele. Proto jsme se zabývali kmenem kvasničné kontaminace podrobněji.

Vlastnosti izolovaného kmene kvasničné kontaminace

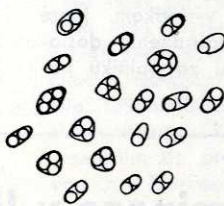
Ze vzorků piv s charakteristickými shluky kvasnic jsme izolovali několik čistých kvasničných kmenů. Protože všechny izoláty kazily po zpětném zaočkování piva způsobem popsaným v předešlém odstavci, tato vlastnost se neměnila v dalších generacích kvasinek a nezávisela na původu použitého piva, považovali jsme izolát za zástupce stejného kvasničného druhu. Schopnost kazit pivo charakteristickým způsobem se nezměnila ani po dvouletém (tříměsíčním intervalu mezi přeočkováním) uchovávání kmenů ve sbírkové kultuře. Výsledky získané studiem tří náhodně vybraných izolátů se navzájem prakticky nelišily a jsou uvedeny v dalším textu.

Růst v sladidovém extraktu. Po třech dnech růstu při 25 °C jsou buňky kulaté, krátce oválné nebo oválné (obr. 1). Vyskytují se jednotlivě, v párech nebo malých

shlucích, rozmnožují se pučením. Velikost buněk je $(3,2-6,7) \times (4,1-9,5) \mu\text{m}$. Po třech dnech se tvoří silný sediment; po jednoměsíční kultivaci při 17°C slabý prstenec v místě styku sladiny se sklem. Zákal ani povrchová blanka (křís) nevzniká.



Obr. 1



Obr. 2

Růst na sladidlovém agaru. Po třídní kultivaci při 25°C jsou buňky kulaté, krátce oválné nebo oválné, jednotlivé, v párech nebo v malých shlucích (obr. 1).

Po měsíci je nátěr na sladidlovém agaru lesklý až slabě matný, bílé barvy.

Tvorba pseudomycelia. Pseudomycelium se netvoří.

Sporulace. Kvasinky snadno sporulují na sádrovém kačku i na acetátovém agaru podle Fowela (1952). Spory jsou kulovité, nejčastěji 2—3, ale vyskytují se i buňky s 1 nebo 4 spory (obr. 2).

Zkvašování cukrů

| | | | |
|------------------|---|----------|------|
| glukóza | + | maltóza | + |
| galaktóza | + | laktóza | — |
| sacharóza | + | rafinóza | +1/3 |
| rozpuštěný škrob | — | | |

Asimilace cukrů

| | | |
|-----------|---|-----------------------------|
| glukóza | + | laktóza slabě nebo vůbec ne |
| galaktóza | + | |
| maltóza | + | |

Asimilace etanolu

(+)

Asimilace dusičnanu draselného —

Podle těchto znaků lze zkoumaný kmen zařadit k *Saccharomyces* sp. Zjištěné vlastnosti svědčí o příslušnosti k druhu *Sacch. cerevisiae*, ale kmen jsme nemohli detailně studovat pro nedostupnost potřebných chemikálií. Protože lze kvasinky tohoto kmene snadno zaměnit za kulturní kvasinky, doplňujeme popis vlastností ještě dalšími znaky:

Růst v mladíně. Tvar i velikost buněk je stejný jako ve sladidně. Sediment ve Freudenreichově baničce má stejný vzhled jako sediment kulturního kmene (*Sacch. carlsbergensis*) na rozdíl od něho však mnohem pevněji lpí na dně baničky. Lze jej uvolnit pouze silným krouživým pohybem.

Růst v 10° pivě. Po pětidenní kultivaci při 20°C vznikne na dně láhve souvislá blána, která po protřepání láhve sloupne a roztrhává se na několik částí. Stojí-li láhev potom v klidu, sbalí se části sedimentu do několika větších kusů hmoty podobné žvýkačce gumě. Toto samovolné sbalování je pro zkoumaný kmen charakteristické a po každém dalším roztřepání se znovu opakuje. Zkoumaný kmen dobře roste na půdě s krystalovou violetí, zatímco na půdě s kyselinou jódoctovou neroste.

Tvorba kvasničné sedimenty jinými kvasinkami

Abychom porovnali vzhled sedimenty izolovaného kmene se sedimenty jiných kvasinek, zaočkovali jsme 10° pivo několika kmeny cizích kvasinek. Vybrali jsme různé druhy *Saccharomyces* sp. a silně flokulující kmeny *Sacch. carlsbergensis*, neboť lze předpokládat, že flokulující kvasinky rostou v pivě za tvorby shluků. Výsledky těchto zkoušek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Vzhled kvasničných sedimentů v pasterovaném pivě

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| <i>Sacch. diastaticus</i> | prachovitá |
| <i>Sacch. logos</i> | prachovitá |
| <i>Sacch. exiguus</i> | prachovitá |
| <i>Sacch. pastorianus</i> | prachovitá |
| <i>Sacch. carlsbergensis</i> | krupicovitá |
| flokulující kmen č. 1 | vločkovitá |
| flokulující kmen č. 2 | krupicovitá |
| flokulující kmen č. 3 | |
| <i>Sacch. cerevisiae</i> | |
| kmen č. 1 | prachovitá |
| kmen č. 2 | prachovitá |
| kmen č. 3 | prachovitá |
| kmen č. 4 | prachovitá |
| kmen č. 5 | prachovitá |
| kmen č. 6 | prachovitá |
| <i>Sacch. cerevisiae</i> | |
| haploidní kmen č. 1 | prachovitá |
| haploidní kmen č. 2 | souvislý povlak, blána |
| haploidní kmen č. 3 | prachovitá |
| haploidní kmen č. 4 | prachovitá |
| <i>Sacch. cerevisiae</i> var. | |
| elipsoideus kmen č. 1 | prachovitá |
| kmen č. 2 | prachovitá |
| kmen č. 3 | prachovitá |
| zkoumaný kmen | souvislý povlak, blána |

Pouze sediment jediné kmeny (haploidní kmen *Sacch. cerevisiae*) byla podobná sedimentu izolovaného kmene. Souvislá blána haploidního kmene se však po protřepání přeměnila v hrubou, krupicovitou sediment, která se na rozdíl od zkoumaného kmene dále nespojovala do souvislých shluků. Také podle výsledků dřívější práce (Šavel 1970) nevykazoval ani jeden z 24 kmenů cizích kvasinek izolovaných z piva charakteristický vzhled sedimentu izolovaného kmene.

Flokulační vlastnosti izolovaného kmene

K zjištění souvislosti mezi tvorbou krupicovitě, vločkovitě sedimentu nebo shluků a flokulacími vlastnostmi kvasinek jsme testovali vybrané kmeny tvořící tyto sedimenty v Helmově roztoku. Podle vzrůstající flokulace schopnosti lze vybrané kmeny seřadit takto:

Flokulační schopnost
minimální

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| <i>Sacch. carlsberg.</i> | < <i>Sacch. carlsberg.</i> |
| flokul. kmen č. 1 | flokul. kmen č. 3 < |
| < zkoumaný kmen | < <i>Sacch. cerev.</i> |
| | hapl. kmen č. 2 < |
| | < <i>Sacch. cerev.</i> |
| | kmen č. 2 |
| | maximální |

Všechny kmeny se v Helmově roztoku sdružovaly do hrubých shluků s velmi rychlou sedimentací. Je zajímavé, že shluky izolovaného kmene se nevyznačovaly dalším sbalováním, dobře pozorovatelným po zaočkování do piva. Tento úkaz se nepodařilo vyvolat ani přidávkou etanolu (0,5—3,0 % obj.), ani piva (10 % hm.) k Helmově roztoku (čísla udávají výslednou koncentraci složky v Helmově roztoku). Opatrným okyselením piva s kvasničnými shluky se hrubá sediment aglutinovaných kvasinek přeměnila na prachovitou. Opětovné vytvoření shluků lze dosáhnout úpravou kyselosti prachovité suspenze na původní hodnotu. Také zabíjení shluků v pivě na 50 až 60°C způsobuje jejich změnu na prachovitou suspenzi. Všechna tato pozorování svědčí o tom, že se na tvorbě shluků podílí vazba vodíkovými můstky.

DISKUSE

Z důvodů, které jsme uvedli v úvodní části, lze ze vzhledu kvasničné sedimenty v zkaženém pivě jen velmi zřídka usuzovat na přítomnost kontaminace kvasinkami. Proto se literatura prakticky nezmiňuje o vztahu mezi druhem kvasinek kazících pivo a vzhledem sedimenty vytvořených těmito kvasinkami. Vlastnosti cizích kvasinek se zkoumají mnohem častěji z jiných hledisek. Posuzuje se jejich schopnost kazit pivo, ovlivňovat jeho chuť a vůni

aj. Přesto se domníváme, že je z praktického hlediska vhodné referovat o výskytu této kontaminace ve stočeném pivě, neboť napadené pivo se kazí velmi rychle a morfoloická podobnost cizích kvasinek s buňkami kulturního kmene může vést k nesprávným závěrům o příčině zkázy piva. Gilliland (1971) se zmiňuje o silně flokulujících kontaminujících kvasinkách a odkazuje ve svém článku na další původní práce (Hough 1957, Gilliland 1957). Gilliland (1957) řadí kvasinky podle flokulace do čtyř skupin. Pro jednu z nich je typickým znakem tvorba „sýrovitých“ shluků kvasnic. Hough (1957) používá flokulčních testů k zkoumání násadních kvasnic. Podle těchto prací však nelze spolehlivě srovnávat popsané kmeny s naším izolátem. V žádné z nich není popsáno samovolné další sbalování sedimentu, charakteristické pro náš izolát.

V naší práci jsme nemohli stanovit všechny obvyklé taxonomické znaky, neboť systematická studie vyžaduje velké množství biochemických testů s látkami naší laboratoři nedostupnými. Přesto považujeme za prokázané, že zkoumaný kmen náležel k rodu *Saccharomyces*. Na základě porovnání morfoloických a biochemických vlastností izolovaného kmene a vlastností *Sacch. cerevisiae* předpokládáme, že zkoumaný kmen je silně flokulujícím kmenem *Saccharomyces cerevisiae*. Lindner (1930) popsal druh *Sacch. cratericus*, později uváděný jako *Sacch. cerevisiae* (Lodderová 1952, 1970), který se vyznačoval tvorbou sýrovité hmoty v mladíně. Povrch sedimentu tohoto kmene v mladíně byl pokryt charakteristickými „krátery“. Tento znak však chyběl u námi zkoumaného kmene, jehož sediment byl zcela rovný.

Zajímavá je schopnost izolovaných kvasinek tvořit v pivě pevné aglomeráty. To je zřejmě způsobeno velkou vzájemnou afinitou kvasničných stěn, kultivovaných v pivě. Tento jev nebyl pozorován u žádného ze zkoumaných kmenů cizích kvasinek. Eddy (1955) referuje o kvasinkách, které se staly silně flokulujícími přidávkou etanolu k Helmově roztoku. Naproti tomu neměl přidávek etanolu ani piva k buňkám izolovaného kmene rozptýleného v Helmově roztoku podstatný vliv na vzrůst flokulace.

Poděkování

Děkuji doc. Ing. L. Šilhánkové, CSc. z katedry mikrobiologie VŠCHT a dr. O. Bendové, CSc. z VÚPS v Praze za laskavé poskytnutí kmenů kvasinek.

Literatura

- [1] BENDOŮVÁ, O. - KURZOVÁ, V. Kvasný prům. 18, 1972 s. 77—78.
- [2] EDDY, A. A. J. Inst. Brew. 61, 1955 s. 307, 313, 318.
- [3] FOWELL, R. A. Nature, 170, 1952 s. 578.
- [4] GILLILAND, R. B. Wallerstein Lab. Commun. 20, 1957 s. 41—71.
- [5] GILLILAND, R. B. J. Inst. Brew. 77, 1971 s. 276—283.
- [6] HELM, E., THORNE, R. S. W. Wallerstein Lab. Commun. 16, 1953 s. 315—326.
- [7] HOUGH, J. S. J. Inst. Brew. 63, 1957 s. 483—490.
- [8] LINDNER, P. Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Sechste Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin 1930, s. 502.
- [9] LODDER, J. - KREGER-VAN RIJ, N. J. W. The Yeasts. A taxonomic Study. Amsterdam, 1952.
- [10] LODDER, J. The Yeasts. A taxonomic Study. London, Amsterdam, 1970.
- [11] SCHERRER, A. - SOMMER, A. - PFENNINGER, H. Brauwiss. 22, 1969, s. 191—195.
- [12] ŠAVEL, J. Kvasný prům. 18, 1970 s. 60—65.
- [13] ŠILHÁNKOVÁ, L. Folia microbiol. 7, 1962 s. 255—256.
- [14] ŠILHÁNKOVÁ, L. Kvasný prům. 8, 1962 s. 175—181.

Šavel, J.: Výskyt silně flokulující kontaminace v lahvovém pivě. Kvas. prům. 19, 1973, č. 8, s. 171—173.

Popisuje se výskyt kvasničné kontaminace lahvového piva. Infikované pivo mělo nízkou (3 až 5 dní) trvanlivost a obsahovalo typické shluky kvasničných buněk. Ze shluků byl izolován kmen kvasinek, který kazil pivo stejným způsobem. Charakteristickým znakem izolovaného kmene je schopnost shlukovat se v pivě do kousků, vzhledem podobných žvýkáci gumě. Studium izolovaného kmene se zjistilo, že náleží k rodu *Saccharomyces*.

Pravděpodobně jde o silně flokulující kmen *Sacch. cerevisiae*. Mezi 20 různými kmeny *Saccharomyces* sp. se však nepodařilo nalézt kmen stejných vlastností. Charakteristické shluky kvasnic vznikají teprve kultivací kvasinek v pivě a neobjevují se u buněk z konce růstové fáze v mladíně. Kvasničné buňky jsou pravděpodobně ve shlucích vzájemně vázány vodíkovými můstky.

Шавел, Я.: Заражение бутылочного пива флокулирующими дрожжами. Квас. прм. 19, 1973, № 8, стр. 171.

В статье рассматривается конкретный случай заражения бутылочного пива флокулирующими дрожжами. Пиво отличалось крайне неудовлетворительной стойкостью, т. е. всего лишь от 3 до 5 дней, оно помутнело и в нем появились типичные скопления дрожжевых клеток. Из скоплений был изолирован штамм, оказавшийся способным вызвать сам описанное заражение. Его характерной особенностью является, следовательно, ясно выраженная тенденция к флокуляции и образованию скоплений, напоминающих своим видом жевательную резину. Штамм был идентифицирован как относящийся к семейству *Saccharomyces*. По всей вероятности это один из флокулирующих штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. Между 20 известными штаммами *Saccharomyces* нет, однако ни одного, обладающего сходными свойствами. Скопления дрожжей появляются лишь в пиве, в то время как в сусле их нет. Можно предполагать, что клетки дрожжей связаны водородными мостиками.

Šavel, J.: Flocculation in Bottled Beer Due to Yeast Contamination. Kvas. prům. 19, 1973, No. 8, p. 171—173.

The article deals with the yeast contamination of bottled beer. The keeping quality of contaminated beer was very low, i. e. from 3 to 5 days and it was turbid due to the presence of typical agglomerates of yeast cells. One yeast strain isolated from aggregates was found to be able to cause the described contamination alone. The characteristic property of the strain in question is its ability to form in beer agglomerates resembling as far as their shape is concerned — chewing gum. The strain was identified as belonging to the *Saccharomyces* family. Apparently it is one of flocculating *Saccharomyces cerevisiae* kind, but among 20 known *Saccharomyces* strains none was found with comparable properties. Characteristic agglomerates appear in beer and there is no sign of them in wort. Most likely the yeast cells in agglomerates are held together by hydrogen bonds.

Šavel, J.: Das Vorkommen stark flokkulierender Kontamination im Flaschenbier. Kvas. prům. 19, 1973, Nr. 8, S. 171—173.

Es wird das Vorkommen der Hefekontamination im Flaschenbier beschrieben. Das infizierte Bier wies eine niedrige Haltbarkeit (3 bis 5 Tage) auf und enthielt typische Anhäufungen von Hefezellen. Aus den Anhäufungen wurde der Hefestamm isoliert, der das Bier auf die gleiche Art verderbte. Das charakteristische Merkmal dieses isolierten Stammes ist die Fähigkeit der Hefen, sich im Bier zu Klumpen anzuhäufen, die im Aussehen dem Kaugummi ähnlich sind. Durch das Studium des isolierten Hefestammes wurde festgestellt, dass er dem Genus *Saccharomyces* angehört. Es handelt sich wahrscheinlich um einen stark flokkulierenden Stamm der *Sacch. cerevisiae*. Es ist jedoch nicht gelungen, unter 20 verschiedenen Stämmen *Saccharomyces* sp. einen Stamm mit identischen Eigenschaften zu finden. Die charakteristischen Anhäufungen der Hefen entstehen erst bei der Kultivierung der Hefen im Bier und kommen bei den Zellen aus dem Ende der Wachstumsphase in der Würze nicht vor. Die Hefezellen sind wahrscheinlich in den Anhäufungen untereinander durch Wasserstoffbrücken verbunden.