

Vliv kvasničné kontaminace na trvanlivost piva

663.41.004.64
663.461.2

Ing. JAN ŠAVEL - Ing. MARIE PROKOPOVÁ - Ing. ANDELA ŘEŘICHOVÁ, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

Úvod

Kvasničná kontaminace je velmi častou příčinou zkázy piva. Kvasinky se v pivu pomnožují a tvoří v něm sedimentu nebo zákal. Podle našeho zjištění se tímto způsobem kazí většina našich piv.

Trvanlivost piva závisí na několika činitelích. Záleží nejen na druhu a množství kvasinek, ale i na jejich fyziologickém stavu a chemickém složení piva. Neuvažuje se vliv teploty, protože trvanlivost se stanovuje při stále teplotě.

Jednotlivé druhy kvasinek se liší schopností kazit pivo. V pivě se pomnožují jak kulturní, tak cizí kvasinky. Za kulturní se považují spodní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, nyní *Saccharomyces uvarum* Beijerinck), za cizí všechny ostatní. Některé cizí kvasinky kazí pivo rychleji, jiné pomaleji než kulturní. Velmi nebezpečnou kvasničnou kontaminací je *Saccharomyces diastaticus*, dobře rostoucí i v dokonale prokvašeném pivu.

Vztah mezi trvanlivostí piva a množstvím buněk v čerstvě stočeném pivu se ověřoval očkovaním čistých kmenů do pasterovaného piva a sledováním jeho trvanlivosti. Pro kulturní kvasinky platil lineární vztah mezi logaritmem množství buněk a trvanlivostí při 20 °C (Šavel 1970).

Je zřejmé, že při různém zastoupení kulturních i cizích kvasinek bude trvanlivost záležet na množství buněk jednotlivých druhů kvasinek a na jejich schopnosti kazit pivo. Proto se tato práce zabývá závislostí mezi množstvím i druhy kvasinek a trvanlivostí vzorků piv odebraných z běžných stáček.

Materiál a metody

Původ vzorků

Vzorky 10° piv pocházely z 12 pivovarů. V osmiměsíčním intervalu se odebralo náhodně celkem 135 vzorků. U všech vzorků se sledovaly hodnoty uvedené v dalším textu. Celkový obsah kvasinek (metoda M) se stanovil na mladinovém agaru s přísadou streptomycinu k potlačení bakterií (Šavel a Řeřichová 1973).

Obsah cizích kvasinek (metoda K) se stanovil kultivací na mladinovém agaru s 18 mg/l krystalové violeti (Scherrer et al. 1969). Také k této půdě se přidával streptomycin. Obsah cizích kvasinek (metoda J) se stanovil kultivací na mladinovém agaru s kyselinou jódovou (Šavel 1970). Trvanlivost při 20 °C se určovala podle ČSN 56 0186. Protože obsah kvasinek v čerstvě stočených pivech byl většinou nízký, zachytily se kvasničné buňky před kultivací na membránovém filtru SYNPOR 6. Narostlé kvasničné kolonie se počítaly po třídenní kultivaci při 28 °C.

Totožnost kvasničných sedimentů po stanovení trvanlivosti se ověřovala mikroskopicky a ve zředěném vzorku sedimentu se stanovil celkový obsah kvasinek a obsah cizích kvasinek oběma metodami. Do sledovaného souboru se zařadily pouze vzorky, jejichž sedimenty se skládaly z kvasinek (98,5 % všech odebraných vzorků).

Výsledky

Protože není možné uvést všechny získané výsledky, je zkoumaný soubor charakterizován třídním rozdělením jednotlivých hodnot. Rozdělení trvanlivosti a obsahu kvasinek v sledovaném souboru uvádí tab. 1 a 2.

Tabulka 1. Rozdělení trvanlivosti 10° piv v sledovaném souboru vzorků

Trvanlivost (dny)	Počet vzorků	%
3 — 6	17	12,59
7 — 9	69	51,11
10 — 12	37	27,41
13 — 15	10	7,41
16 — 17	2	1,48
Celkem	135	100,00

Tabulka 2. Obsah kvasinek ve vzorcích 10° piva po stočení

Počet kvasinek /ml piva	Počet vzorků		%		
	metoda		M	K	J
pod 0,1	1	20	4	0,74	14,82
0,1 — 1,0	10	24	19	7,41	17,78
1,1 — 10,0	28	52	44	20,74	38,52
10,1 — 100,0	70	35	62	51,85	25,92
nad 100,0	26	4	6	19,26	2,96
Celkem	135	135	135	100,00	100,00

Kromě absolutních hodnot obsahu cizích kvasinek se jejich množství vyjadřovalo také jako poměrný obsah cizích kvasinek z celkového počtu kvasinek. K výpočtu se použilo vzorce

$$(1) \text{ poměrný obsah cizích kvasinek (\%)} = \frac{\text{počet cizích kvasinek/ml piva} \cdot 100}{\text{celkový počet kvasinek/ml piva}}$$

Výsledky shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3. Relativní zastoupení cizích kvasinek ve všech kvasinkách v 10° pivu po stočení

Poměrný obsah cizích kvasinek %	Počet vzorků		%	
	K	J	K	J
0 — 10	50	26	37,04	19,26
11 — 30	34	25	25,18	18,52
31 — 50	30	23	22,22	17,04
51 — 70	10	30	7,42	22,22
71 — 90	7	8	5,18	5,92
91 — 100	4	23	2,96	17,04
Celkem	135	135	100,00	100,00

Stejně jsou zpracovány výsledky rozborů kvasničných sedlin (tab. 4). Jako kritéria, zda se cizí kvasinky množí v pivu rychleji než ostatní kvasinky, použilo se indexu růstu cizích kvasinek v stočeném pivu podle vzorce

$$(2) \text{ Index růstu} = \frac{\text{poměrný obsah cizích kvasinek v pivu po zkažení}}{\text{poměrný obsah cizích kvasinek v pivu po stočení}}$$

Tabulka 4. Relativní zastoupení cizích kvasinek ve všech kvasinkách sedlin 10° piv po zkažení

Poměrný obsah cizích kvasinek %	Počet vzorků		%	
	K	J	K	J
0 — 10	126	77	93,34	57,03
11 — 30	5	30	3,70	22,23
31 — 50	1	18	0,74	13,33
51 — 70	3	6	2,22	4,45
71 — 90	0	2	0	1,48
91 — 100	0	2	0	1,48
Celkem	135	135	100,00	100,00

V závislosti na metodě stanovení cizích kvasinek se získá index I_K (metoda K) a I_J (metoda J). Hodnoty indexů I_K , I_J jsou v tabulce 5.

+ vzorky s indexy typu 0 se do hodnocení nezahrnují. K určení rozdílů uvedených hodnot mezi jednotlivými pivovary slouží přehledná tabulka 6.

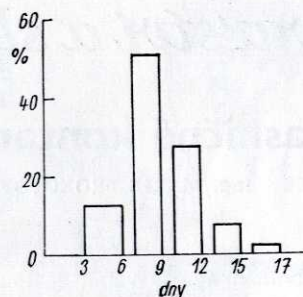
Tabulka 5. Index růstu cizích kvasinek v stočeném pivu

Index růstu (I_K I_J)	Počet vzorků		%	
	metoda		K	J
0 — 0,20	110	67	85,26	49,63
0,21 — 0,50	8	25	6,20	18,53
0,51 — 0,80	1	11	0,78	8,15
0,81 — 1,00	3	7	2,33	5,18
1,01 — 3,00	2	18	1,55	13,33
více než 3,00	5	7	3,88	5,18
Celkem	129 ⁺	135	100,00	100,00

Tabulka 6. Průměrné hodnoty trvanlivosti a obsahu cizích kvasinek pro jednotlivé pivovary

Pivovar číslo	Střední hodnota (průměr)			
	trvanlivost dny	celk. obsah kvasinek	cizí kvasinky	
			metoda K	metoda J
1	8,2	53,5	25,4	40,4
2	8,0	121,3	24,7	44,7
3	9,4	17,3	21,5	48,6
4	10,1	9,3	10,1	83,0
5	8,3	45,8	28,8	78,7
6	8,5	132,1	49,9	62,9
7	10,0	13,8	5,0	49,8
8	8,1	110,0	35,4	28,7
9	9,7	47,7	33,0	34,4
10	11,3	45,2	26,2	71,0
11	8,2	36,8	25,0	60,1
12	8,6	48,2	34,4	66,7

Korelaci mezi celkovým obsahem kvasinek a trvanlivostí znázorňuje graf 1. Kromě toho je tato závislost zpracována tabulkovou formou (tab. 7).

Obr. 1. Rozdělení trvanlivosti 10° piv v sledovaném souboru vzorků
osa x : trvanlivost (dny)
osa y : % vzorků

Tabulka 7. Vztah mezi celkovým obsahem kvasinek a trvanlivostí

Celkový obsah kvasinek /ml	Trvanlivost (dny)
0,1 — 1,0	9 — 17
1,1 — 10,0	7 — 15
10,1 — 100,0	5 — 13
nad 100,0	3 — 10

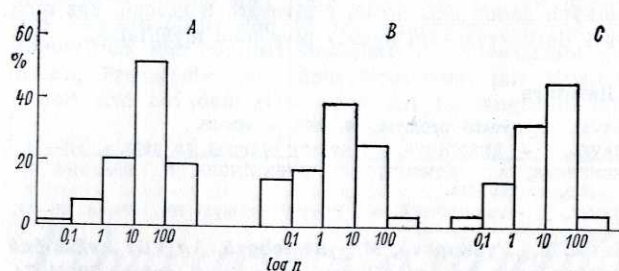
Diskuse

Kvasničná kontaminace je dosud hlavní příčinou nevyhovující trvanlivosti lahveho piva. V sledovaném souboru 10° piv trvanlivostí nevyhovělo ČSN 56 6635 12,59 % vzorků. Existují však pivovary, v nichž je podíl vzorků s nízkou trvanlivostí ještě vyšší.

Mezi množstvím kvasničných buněk v pivu po stočení a jeho trvanlivostí je vzájemný vztah. Jak je patrné z korelačního grafu, je trvanlivost úměrná logaritmu počátečního počtu buněk. Výpočtem se získal korelační koeficient 0,5749, který charakterizuje významnou závislost na zvolené hladině významnosti $p = 0,01$.

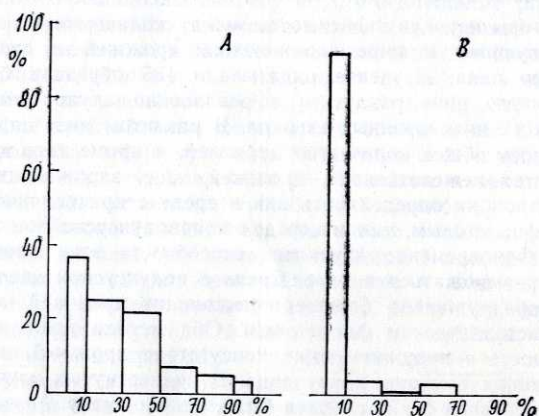
Závislost získaná v předešlé práci očkovaním čistého kmene do piva a sledováním trvanlivostí, má stejný tvar, ale je mnohem „těsnější“ (korelační koeficient má větší hodnotu). Příčiny tohoto jevu nyní diskutujeme.

Ve vzorcích z provozních stáček velmi kolísá obsah cizích kvasinek, které se liší schopností kazit pivo. Množství cizích kvasinek v stočených pivech i v kvasničných sedlinách je značné.

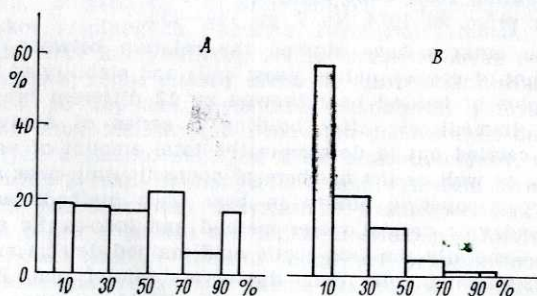


Obr. 2. Obsah kvasinek ve vzorcích 10° piv po stočení
osa x : počet kvasinek/ml piva (logaritická stupnice)
osa y : % vzorků
A : celkový obsah kvasinek
B : cizí kvasinky na půdě s krystalovou violetí
C : cizí kvasinky na půdě s kyselinou jódovou

Dvě metody, kterými se stanovily cizí kvasinky, neposkytly stejné výsledky. To souvisí s rozdílným spektrem cizích kvasinek, které tyto metody prokazují. Metoda s krystalovou violetí dokazuje především kontaminanty rodu *Saccharomyces*, metoda s kyselinou jódovou ostatní cizí kvasinky. Jak se prokázalo dříve (Šavel a Prokopová 1973), nejsou tyto metody vzájemně doplňkové, takže nelze výsledky obou stanovení jednoduše sčítat. V průměru platí, že metoda s kyselinou jódovou dává vyšší výsledky, než metoda s krystalovou violetí.



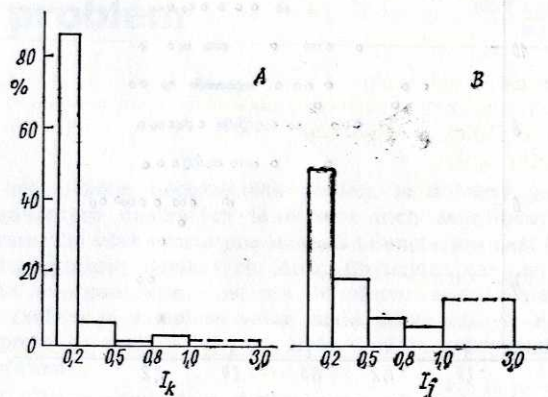
Obr. 3. Relativní zastoupení cizích kvasinek (metoda s krystalovou violetí) ve všech kvasinkách v pivě po stočení (A) a v kvasničné sedlině (B)
osa x : relativní obsah cizích kvasinek ve všech kvasinkách
osa y : % vzorků



Obr. 4. Relativní zastoupení cizích kvasinek (metoda s kyselinou jódovou) ve všech kvasinkách u piva po stočení (A) a v kvasničné sedlině (B)
osa x : relativní obsah cizích kvasinek ve všech kvasinkách
osa y : % vzorků

Důležitým kritériem významu cizích kvasinek vzhledem k trvanlivosti je index, charakterizující schopnost cizích kvasinek kazit pivo ve srovnání s kulturními kvasinkami. V převážné většině sledovaných piv neovlivnila kontaminace cizími kvasinkami významně trvanlivost v negativním smyslu. Naopak, nízké hodnoty I_K , I_J u většiny vzorků dokazují, že se cizí kvasinky pomnožovaly v pivě pomalu a rozhodující vliv na jeho trvanlivost měly kulturní kvasinky.

Z tohoto důvodu dochází k zdánlivě paradoxnímu jevu, neboť vysoký obsah cizích kvasinek relativně zvyšuje trvanlivost piva. Ve skutečnosti je však vysoký obsah cizích kvasinek při vyšším celkovém obsahu kvasinek bezpečným důkazem nízké péče o čistotu stáček cest. Jími se, nezávisle na kvalitě filtrace, do piva vnášejí kulturní i cizí kvasinky. K tomu přistupují i jiné negativní vlivy působení cizích kvasinek, jako nepříjemné chuti i vůně.



Obr. 5. Indexy růstu cizích kvasinek ve stočeném pivu
osa x : index růstu
osa y : % vzorků
A : metoda s krystalovou violetí
B : metoda s kyselinou jódovou

U malého počtu vzorků se postihla kvasničná kontaminace, která kazila pivo rychleji ve srovnání s kulturními kvasinkami. Také zde se dosáhlo lepšího výsledku metodou s kyselinou jódovou proti metodě s krystalovou violetí.

Ze získaných výsledků vyplývá, že z přítomnosti cizích kvasinek prokázaných oběma metodami v pivě nelze soudit na sníženou trvanlivost. Teprve hromadění cizích kvasinek v sedlině (vysoký I_K nebo I_J) upozorňuje na nebezpečnou kvasničnou kontaminaci cizími kvasinkami.

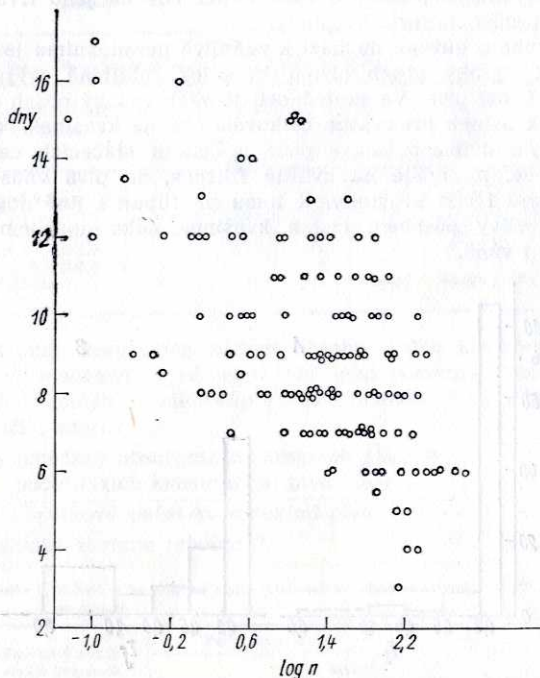
Proto není účelné pravidelně stanovovat cizí kvasinky ve všech odebraných vzorcích, ale řídit se celkovým obsahem kvasinek stanovených na mladinovém agaru. Dobrým vodítkem je tab. 7, která udává vztah mezi celkovým obsahem kvasinek a trvanlivostí. Je-li skutečná trvanlivost podstatně nižší než její hodnota odhadnutá podle celkového počtu kvasinek, je nutné stanovit množství cizích kvasinek v stočeném pivě i sedlině, a to souběžně oběma metodami.

Tímto způsobem lze nalézt nebezpečnou kvasničnou kontaminaci a podle indexu I určit metodu k jejímu průkazu. To umožňuje pátrat po zdroji nákazy a v tomto případě prokazují obě metody stanovení cizích kvasinek velmi cenné služby.

K stanovení úrovně čistoty stáček cest postačí stanovit v pivu stočeném do sterilní láhve cizí kvasinky na půdě s kyselinou jódovou. Tato metoda poskytuje v převážné většině případů vyšší hodnoty než metoda s krystalovou violetí a postihuje i větší počet vzorků s velkým indexem růstu.

Detailní rozbor ukázal, že velký rozptyl trvanlivosti při jinak stálém celkovém obsahu kvasinek nelze přičítat pouze různému podílu cizích kvasinek v stočených

pivech. Zřejmě se dále uplatňují i další vlivy, např. rozdíl v chemickém složení pív z jednotlivých pivovarů i mezi jednotlivými várkami stejného pivovaru, různý obsah kyslíku v pívě i rozdíly mezi používanými várečnými kvasnicemi. Analýza těchto vlivů je však značně komplikovaná a vázaná na množství vhodných rozborů, které nebylo možno provést.



Obr. 6. Závislost mezi celkovým obsahem kvasinek a trvanlivostí
osa x: log počtu buněk v pívě po stočení
osa y: trvanlivost

Tyto závěry platí ovšem pouze pro 10⁹ česká piva vyráběná dosavadní běžnou technologií při současné surovinové skladbě. Je samozřejmé, že jejich změna by podstatně ovlivnila závislost trvanlivosti — množství buněk.

Diskutujeme nyní praktické aspekty uvedených výsledků. Snižovat počet buněk v stočeném pívě je zatím nejsnazší cestou, jak dosáhnout vyšší trvanlivosti. Trvanlivost lze zvýšit i jinými způsoby, neboť kromě obsahu kvasinek závisí i na jiných faktorech. Doporučuje se např. vyrábět piva s minimálním rozdílem dosažitelného a dosaženého (při výstavu) stupně prokvašení. To je však při dnešní surovinové skladbě a dobách dokvašování značně problematické.

Podle výsledků v experimentální části mělo pouze 8,15 % vzorků nižší obsah než 1,0 kvasinky/ml. Podrobnější měření v jednotlivých závodech prokázalo, že hlavní příčinou tohoto stavu je nedostatečná péče o čistotu stáček cest. Většina pivovarů ze sledovaného souboru měla deskové filtry, které umožňovaly při pečlivé práci a sterilaci snížit obsah kvasinek pod 0,1–0,05 kvasinek/ml. Naproti tomu celkový obsah kvasinek ve většině stočených pív (71,11 %) byl vyšší než 10 buněk/ml.

Nedostatečná čistota lahví se uplatňovala jen u malého počtu vzorků, a to když se nedodržovaly předepsané teploty a koncentrace mycích roztoků.

Naproti tomu nelze zastírat, že dokonalé čištění a sterilace přináší komplikace. Příčinou je nevhodná konstrukce, popř. volba některých materiálů, částí filtrů i stáček strojů. Například dosud jediným tuzemským deskovým filtrem schopným bez komplikace horkovodní sterilace je filtr Škoda 800×800 mm se zlatolakovým povlakem a těsněním ze speciální pryže. Sterilace jedenkrát týdně zaručila stálou vysokou kvalitu piva, které obsahovalo méně než 0,01 kvasinky/ml po filtraci.

Těsnění i ochranný nátěr ostatních tuzemských filtrů sterilací značně trpí. Podobné problémy se vyskytují i u stáček strojů. Chybí sterilizační zařízení pro cirkulační promývání plicních orgánů horkou vodou.

Také účinné čisticí systémy pívního potrubí i povrchů velkých nádob jsou dosud v pivovarech vzácné. Bez nich však další zvyšování kvality piva není myslitelné.

Literatura

- ŠAVEL, J., Kvasný průmysl, **16**, 1970, s. 60–65.
ŠAVEL, J. — ŘEŘICHOVÁ, A., Kvasný průmysl, **19**, 1973, s. 145–147.
SCHERRER, A. — SOMMER, A. — PFENNINGER, H., Brauwiss. **22**, 1969, s. 191–195.
ŠAVEL, J. — PROKOPOVÁ, M., Kvasný průmysl **20**, 1974, s. 25–27.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Řeřichová, A.: Vliv kvasničné kontaminace na trvanlivost piva. Kvas. prům. **20**, 1974, č. 7, s. 149–153.

Sledovala se závislost mezi množstvím kvasničné kontaminace a trvanlivostí 135 vzorků lahvevého piva z provozních stáček 12 pivovarů. V pívě po stočení se stanovil celkový počet kvasinek, cizí kvasinky na půdě s krystalovou violetí, na půdě s kyselinou jódoctovou a schopnost těchto kvasinek pomnožovat se v pívě. Metoda s kyselinou jódoctovou poskytuje všeobecně vyšší hodnoty obsahu cizích kvasinek proti metodě s krystalovou violetí. Obě metody postihují také kvasinky rychle kazící pivo, i když v sledovaném souboru se tato kontaminace vyskytla jen u malého počtu vzorků. Mezi log počtu kvasničných buněk v pívě po stočení a jeho trvanlivostí je lineární vztah.

Шавел, Я. — Прокопова, М. — Ржержихова, А.: Влияние присутствия в пиве заражающих дрожжей на его стойкость. Квас. прум. **20**, 1974, № 7, стр. 149–153.

Авторы изучали зависимость между количеством присутствующих в пиве заражающих дрожжей и стойкостью пива. Изучение охватывало 135 образцов бутылочного пива разлитого в разливно-закупорочных цехах 12 пивоваренных заводов. В разлитом пиве определялось общее количество дрожжей, а кроме того количество нежелательных дрожжей, т. е. заражающих. Эти дрожжи определялись как в среде с кристаллическим фиолетовым, так и в среде с моноiodуксусной кислотой. Одновременно изучалась способность этих дрожжей размножаться в пиве. Среда с иодуксусной кислотой обнаруживала больше заражающих дрожжей чем с кристаллическим фиолетовым. Оба метода дают возможность обнаружить тоже присутствие дрожжей, вызывающих быструю порчу пива. В подвергнутых изучению образцах таких случаев было, однако, мало. Между логарифмом числа дрожжевых клеток в пиве после его разлива и его стойкостью существует линейная зависимость.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Řeřichová, A.: Effects of Contaminating Yeast Cells Upon the Keeping Quality of Beer. Kvas. prům. **20**, 1974, No. 7, pp. 149–153.

The authors have studied the relation between the amount of contaminating yeast cells and stability of 135 samples of bottled beer brewed by 12 different breweries. Immediately after bottling a series of analyses was carried out to determine the total amount of yeast cells, as well as the numbers of contaminating ones and their propagating ability in beer. Two methods were applied viz.: crystal violet method and iodo-acetic acid one. Generally the iodo-acetic acid method detects more contaminating cells than the crystal violet one. Both methods detect reliably yeast cells quickly spoiling the beer too. In studied samples only a few were so contaminated. It has been confirmed that a linear relation exists between the log of yeast cells and stability of beer.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Řeřichová, A.: Einfluss der Hefekontamination auf die Haltbarkeit des Bieres. Kvas. prům. 20, 1974, No. 7, S. 149—153.

Es wurde die Abhängigkeit zwischen der Menge der Hefekontamination und Haltbarkeit bei 135 Bierproben aus Betriebsabfüllungen in 12 Brauereien verfolgt. Im abgefüllten Bier wurden bestimmt: die Gesamtzahl der Hefen, Fremdhefen auf dem Nährboden mit Kristallviolett und auf dem Nährboden mit Jodessigsäure und

die Fähigkeit dieser Hefen sich im Bier zu vermehren. Die Methode mit Jodessigsäure gibt im allgemeinen höhere Werte des Gehalts an Fremdhefen als die Methode mit Kristallviolett. Beide Methoden erfassen auch die Hefen, welche das Bier schnell verderben, obwohl diese Kontamination nur bei einer geringer Zahl der verfolgten Proben vorkam. Zwischen \log der Zahl der Hefezellen im Bier nach dem Abfüllen und seiner Haltbarkeit besteht eine lineare Beziehung.