

Růst kvasinek na ztužených půdách pod tlakem CO₂

663.12
663.132

Ing. JAN ŠAVEL, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Jihočeské pivovary, k. p., České Budějovice

ÚVOD

Klasické metody stanovení kulturních a cizích kvasinek neumožňují rozlišit mezi kmeny rychle kvasícími pivo a kmeny, které v pivu rostou pomalu, nebo nerostou. Stanovení celkového počtu kvasinek v pivu proto nemůže s uspokojivou přesností předpovědět trvanlivost piva.

Konzentrace oxidu uhličitého silně ovlivňuje růst kvasinek v pivo [1]. Pro stanovení mikroorganismů rychle kazičích pivo jsme doporučili polepvnou pivní půdu a kultivaci pod tlakem CO_2 [2]. O vlivu CO_2 na stanovení kvasinek na ztužených půdách neexistují v pivovarské literatuře údaje.

MATERIÁL A METODY

Kvasničné kmeny pocházely ze sbírky VÚPS v Praze (tab. 1). Živné půdy A, B, C (tab. 2) se připravily podle [3], polepevná pivní půda G podle [2]. Půdy D až G (tab. 2) se sterilovaly v autoklávu 15 min při 121 °C. Zaočkované plotny se kultivovaly v termostatu na vzduchu, nebo v přístroji pro kultivaci pod tlakem CO₂ [2].

Tab. 1. Seznam kmenů kvasinek

1. *Saccharomyces carlsbergensis*, kmen č. 2
2. *Saccharomyces carlsbergensis*, kmen č. 96
3. *Hansenula anomala*
4. *Kloeckera apiculata*
5. *Torulopsis utilis*
6. *Pichia membranaefaciens*
7. *Saccharomyces cerevisiae*
8. *Saccharomyces exiguus*
9. *Saccharomyces diastaticus*
10. *Saccharomycus logos*
11. *Saccharomyces pastorianus*

Tab. 2. Seznam živných půd

- A. Mladinový agar
- B. Mladinový agar s krystalovou violetí
- C. Mladinový agar s kyselinou jódoctovou
- D. Kvasničný autolyzát 0,01 %, glukóza 0,5 %, agar 1,8 %, dest. voda
- E. Kvasničný autolyzát 0,1 %, glukóza 0,5 %, agar 1,8 %, dest. voda
- F. 12% pivo, agar 1,8 %
- G. Polopěvná pivní půda z 12% piva

Tab. 3. Růst kvasinek v 12% pivu při 20 °C

| Čas (dny) | Kmen č. | | | | | | | | | | |
|--------------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 3 | — | — | — | — | — | — | + | — | + | — | — |
| 7 | + | + | — | — | — | — | + | ± | + | + | ± |
| 10 | + | + | — | — | + | — | + | + | + | + | + |
| 18 | + | + | — | — | + | + | + | + | + | + | + |
| 30 | + | + | — | — | + | + | + | + | + | + | + |

POSTUP PRÁCE A VÝSLEDKY

Růst kvasinek v 12% pivu

Po pomnožení kvasinek v sterilní mladině (48 h při 28 °C) se 0,1 ml zředěné kvasničné suspenze (asi 10^4 buněk) očkovalo do 0,5 l láhve s 12% pasterovaným pivem. Po uzavření láhve sterilní korunkou se stanovila trvanlivost těchto uměle kontaminovaných piv (tab. 3). Růst kvasinek v pivu se hodnotil jako pozitivní (+), negativní (—), nebo částečný, slabý (+).

Tab. 4. Růst kvasinek na různých půdách. Aerobní kultivace při 25 °C, a — růst po 4 dnech, b — růst po 7 dnech

[illegible]

Tab. 5. Růst kvasinek na různých půdách. Kultivace pod 0,2 MPa CO₂ při 25 °C, a — růst po 4 dnech, b — růst po 7 dnech

| Půda | Kmen. č. | | | | | | | | | | | |
|------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b |
| A | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| B | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + |
| C | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + |
| D | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + |
| E | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| F | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| G | — | ± | — | ± | — | — | — | — | — | ± | + | + |

Tab. 6. Počty kolonií kvasinek na různých půdách. Aerobní kultivace při 25 °C, a — růst po 4 dnech, b — růst po 7 dnech

| Půda | Počet kolonií na misce | | | | | | | |
|------|------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|
| | kmen č. | | | | | | | |
| | 1 | 3 | 6 | 9 | 1 | 3 | 6 | 9 |
| A | 248 | 265 | 402 | 408 | 381 | 390 | 403 | 449 |
| E | 158 | 161 | 387 | 418 | 316 | 385 | 412 | 435 |
| F | 197 | 236 | 268 | 330 | 311 | 325 | 400 | 427 |
| G | 0 | 102 | 242 | křís | 222 | křís | 388 | 461 |

Tab. 7. Počty kolonií kvasinek na různých půdách. Kultivace pod 0,2 MPa CO₂ při 25 °C, a — růst po 4 dnech, b — růst po 7 dnech

| Půda | Počet kolonií na misce | | | | | | | |
|------|------------------------|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|
| | kmen č. | | | | | | | |
| | 1 | 3 | 6 | 9 | 1 | 3 | 6 | 9 |
| A | 65 | 120 | 0 | 0 | 308 | 333 | 378 | 426 |
| E | 28 | 36 | 0 | 0 | 290 | 305 | 362 | 410 |
| F | 139 | 151 | 0 | 0 | 268 | 285 | 339 | 444 |
| G | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 435 |

Vliv CO₂ na růst kvasinek

Kvasinky se pomnožily v sterilní mladině (48 h při 28 °C), zředily sterilní vodou a nanášely očkovací jehlou na půdy podle tab. 2, nebo vpichovaly do polopevné půdy. Po kultivaci v termostatu na vzduchu, nebo pod tlakem CO₂ se hodnotil růst kvasinek jako pozitivní (+), negativní (—), nebo částečný, slabý (±). Výsledky udávají tab. 4 a 5.

Vliv CO₂ na počet narostlých kolonií kvasinek

Kvasinky pomnožené v sterilní mladině (48 h při 28 °C) se zředily sterilní vodou na koncentraci asi 3 · 10⁵ buněk · ml⁻¹. 0,1 ml suspenze se roztěrem očkovalo na půdy podle tab. 2, nebo se stejné množství suspenze přelilo polopevnou půdou G. Po kultivaci na vzduchu, nebo pod tlakem CO₂ se spočetly narostlé kolonie (tab. 6 a 7).

Vliv CO₂ a etanolu na růst kvasinek

Kvasinky pomnožené v sterilní mladině (48 h při 28 °C) se zředily sterilní vodou a nanášely očkovací jehlou na půdy A, E, F (tab. 2) s přidávkou 4 % etanolu a bez etanolu. Po čtyřdenní aerobní kultivaci při 25 °C rostly všechny kmeny dobře i na půdách s etanolem, růst na těchto půdách pod tlakem CO₂ uvádí tab. 8.

DISKUSE

V stočeném pivu mohou růst různé kmeny kulturních i cizích kvasinek. Trvanlivost piva závisí na teplotě, počáteční koncentraci kvasničných buněk, jejich fyziologickém stavu, druhu a kmenu kvasinek a na složení piva.

Všeobecně se uvádí, že dobře prokvašená piva s vysokým obsahem etanolu a oxidu uhličitého, mají vysokou trvanlivost. V této práci se kvasinky očkovaly do dobře prokvašeného 12% piva, s obsahem etanolu okolo 4 %. *Sacch. diastaticus* a *Sacch. cerevisiae* kazily pivo velmi rychle za tvorby silných sedlin, *Hansenula anomala* a *Kloeckera apiculata* pivo nekazily, ostatní kvasinky se ve schopnosti kazit pivo řadily mezi uvedené druhy.

Oxid uhličitý má velký význam pro růst kvasinek v pivo. Pod tlakem 0,2 MPa CO₂ nerostly *Hansenula anomala* a *Kloeckera apiculata* ani na živinami bohatém mladinovém agaru. U ostatních kvasinek závisel stupeň inhibice růstu také na obsahu živin a růstových faktorů v půdě.

Na půdách s nízkým obsahem živin potlačoval CO₂ růst kvasinek více než na půdách bohatých na živiny (mladinový agar). Je zajímavé, že i kulturní kmeny kvasinek jsou částečně inhibovány oxidem uhličitým na mladinovém agaru. Za tlaku 0,2 MPa se ve vodě při 25 °C rozpouští 0,30 % CO₂, obsah CO₂ v pivo se pohybuje mezi 0,35 až 0,45 %. Za aerobních podmínek rostly všechny kmeny na uvedených půdách dobře.

Na půdě s krystalovou violetí potlačoval CO₂ jen jeden z kvasničných kmenů, rostoucích za aerobních podmínek. Na půdě s kyselinou jódooctovou cizí kvasinky pod tlakem CO₂ nerostly. Cizí kvasinky rychle kazí pivo se proto lépe prokazují na půdě s krystalovou violetí.

Stanovení cizích kvasinek na živných půdách pod tlakem CO₂ lépe odpovídá přirozeným podmínkám pro růst kvasinek v pivo, než klasické stanovení bez CO₂. Z tab. 6 a 7 je patrné, že z buněk přítomných v pivo, se pomnoží pouze část. Tento vliv je zvláště výrazný u polopevné pивní půdy, v níž po 7 dnech kultivace nerostla *Pichia membranaefaciens*, rostoucí v CO₂ dobře i na agaru ztuženém pivo. Pouze u *Sacch. diastaticus* narostl po 7denní kultivaci stejný počet kolonií jako na mladinovém agaru.

V pivě přítomný etanol může rovněž potlačovat růst kvasinek, jak se prokázalo očkováním a kultivací kvasinek na půdách s přidávkou etanolu. Etanol v zkoušené koncentraci ovlivňoval růst kvasinek pouze v prostředí CO₂, neboť při aerobní kultivaci rostly všechny kvasinky i na půdách s etanolem dobře.

Na mladinovém agaru i na půdě s glukózou a autolyzátem potlačovaly 4 % etanolu pod tlakem CO₂ růst kmenů pomalu kazících pivo. Růst rychle kazících kmenů (*Sacch. diastaticus*, *Sacch. cerevisiae*) etanol neovlivňoval. Tento vliv byl zvláště patrný na pивní půdě ztu-

Tab. 8. Vliv etanolu na růst kvasinek. Kultivace pod 0,2 MPa CO₂ při 25 °C, a — růst po 4 dnech, b — růst po 7 dnech, Et — 4 % C₂H₅OH

| Půda | Kmen č. | | | | | | | | | | | |
|------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b |
| A | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| A+ | — | ± | — | ± | — | — | — | — | — | ± | ± | + |
| Et | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | — | ± | ± | + |
| E | ± | ± | ± | ± | — | — | — | — | — | ± | ± | + |
| E+ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | ± | ± | + |
| Et | — | — | — | — | — | — | — | — | — | ± | ± | + |
| F | ± | + | ± | + | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| F+ | ± | + | ± | + | — | — | — | — | ± | ± | + | + |
| Et | — | — | — | — | — | — | — | — | — | ± | ± | + |

žené agarem, která po autoklávování pravděpodobně obsahovala zbytkový etanol z piva. Autoklávováním piva za stejných podmínek poklesl etanol ze 4 % na 1,5 %, které je nutné přičíst k 4 % etanolu, přidaným do půdy před rozléváním na misky.

V pivu se mohou rychle pomnožovat pouze kvasinky, odolné současněmu působení etanolu a CO₂. Pro předpověď trvanlivosti je nutno znát počet těchto kvasinek v pivu. Pro jejich stanovení v provozní mikrobiologické kontrole by se mohlo použít půd s přídavkem etanolu a kultivovaných pod tlakem CO₂. Při kultivaci provozních vzorků lahvového piva rostla na mladinnovém agaru s etanolem pod tlakem CO₂ většinou jen menší část z celkového počtu v pivu přítomných kvasinek.

Literatura

- [1] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 124.
[2] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 267.
[3] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. Praha 1980.

Šavel, J. - Prokopová, N.: Růst kvasinek na ztužených půdách pod tlakem CO₂. Kvas. prům., 27, 1981, č. 8, str. 175—177.

Sledoval se růst 11 kmenů kulturních a cizích kvasinek v 12 % pivu. Kvasinky kazily pivo různou rychlostí, některé z nich nerostly v pivu ani po 30 dnech. CO₂ (0,2 MPa) potlačoval růst některých kvasinek na mladinnovém agar, glukózovém agar s kvasničným autolysátem, agarem ztuženém pívem a na mladinnových půdách s krystalovou violetí a kyselinou jódooctovou. Stupeň inhibice kvasinek oxidem uhličitým závisel na obsahu živin v půdě a zvyšoval se přídavkem etanolu k půdám. Za aerobních podmínek rostly kvasinky dobře i na půdách s etanolem. Kmeny rychle kazící pivo byly relativně necitlivé k CO₂ a etanolu.

Шавел, Я. - Проконова, М.: Рост дрожжевых грибов в усиленной среде под давлением CO₂. Квас. прум., 27, 1981, № 8, стр. 175—177.

Был исследован рост 11 штаммов культурных и посторонних дрожжевых грибов в 12 %-ном пиве. Дрожжи оказывали влияние на испорчение пива разной скоростью, некоторые из них в пиве не размножались и в течение 30 дней. CO₂ (0,2 МПа) подавлял рост некоторых дрожжей на агаре охмеленного сусла, на глюкоз-

ном агаре с дрожжевым автолизатом, в агаре усиленном пиве и в среде охмеленного сусла с кристаллическим фиолетовым и иодоуксусной кислотой. Степень ингибирования дрожжевых грибов углекислым газом зависела от содержания питательных веществ в среде и она повышалась с прибавкой этанола в среду. При аэробных условиях дрожжи размножались хорошо и в среде с этанолом. Штаммы быстро портящие пиво были относительно мало чувствительны к CO₂ и к этанолу.

Šavel, J. - Prokopová, M.: The Growth of Yeasts on Solid Mediums under CO₂-Pressure. Kvas. prům. 27, 1981, No. 8, pp. 175—177.

The growth of 11 cultural and strange yeasts' strains has been followed in 12% beer. The yeasts spoiled the beer in various speed, some of them did not grow even after 30 days. CO₂ (0,2 MPa) suppressed the growth of some yeasts on the wort-agar, on the glucose agar with yeasts' autolysate, on the beer stiffened by agar and on wort mediums containing the crystalline violet and iodoacetic acid. The grade of yeasts' inhibition by CO₂ depended on the content of nutrients in the medium and increased by the addition of ethylalcohol to the medium. The strains, spoiling quickly the beer, were relatively sensitive to CO₂ and to ethylalcohol.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Das Wachstum der Hefen auf verfestigten Boden unter CO₂-Druck. Kvas. prům. 27, 1981, No. 8, S. 175—177.

Es wurde das Wachstum von 11 Stämmen der Kultur- und Fremdhefen in 12 % Bier verfolgt. Die Hefen verderben das Bier mit verschiedener Geschwindigkeit. Einige von der verfolgten Stämmen wiesen im Bier auch nach 30 Tagen kein Wachstum auf. CO₂ (0,2 MPa) wirkte hemmend auf das Wachstum einiger Hefestämme auf den folgenden Böden: Würzeagar, Glukoseagar mit Hefe-autolysat, durch Agar verfestigtes Bier, Würzeboden mit Kristallviolett und Jodessigsäure. Der Inhibitionsgrad der Hefen durch Kohlendioxid war von dem Gehalt der Nährstoffe im Boden abhängig und erhöhte sich bei Zusatz von Äthanol zu dem Boden. Unter aeroben Bedingungen wuchsen die Hefen gut auch auf den Böden mit Äthanolzusatz. Die als schnelle Bierverderber wirkenden Stämme waren zu CO₂ und Äthanol relativ unempfindlich.