

Vlivy podmiňující specifický růst mléčných bakterií v pivu

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

ÚVOD

Mezi mikroorganismy, kazícími pivo, zaujímají mléčné bakterie důležité místo [1, 2]. Mléčné bakterie, které se vyskytují v provozu, se liší schopností kazit pivo.

Obvyklé diagnostické půdy prokazují široké spektrum mléčných bakterií, bez přihlédnutí k rychlosti růstu v pivu. Tím klesá informační hodnota mikrobiologických analýz, neboť zkáza piva mohou způsobit stopové koncentrace nebezpečných bakterií, doprovázených řádově větším množstvím relativně neškodných mléčných bakterií.

Pro nalezení zdrojů nebezpečné kontaminace má proto stanovení celkového počtu mléčných bakterií omezený význam. Přídavkem vhodných živných látek lze stanovení zrychlit, ale se zkrácením doby rozboru obvykle klesá specifičnost stanovení nebezpečných bakterií.

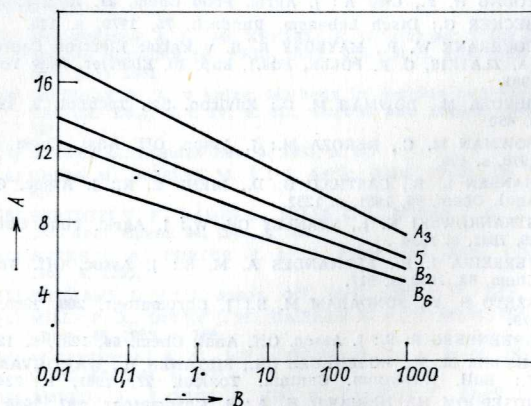
V současnosti se vyvíjejí nové půdy s vyšší specifíčností pro stanovení bakterií, rychle rostoucích v pivu. Látky podporující růst mléčných bakterií se v nich kombinují s látkami se specifickým účinkem proti relativně neškodným bakteriím (3–5). Pivo se může považovat za vysoce specifické médium pro průkaz nebezpečných bakterií [6].

Ačkoliv četná sdělení podrobně popisují fyziologické a biochemické vlastnosti mléčných bakterií a faktory, podporující jejich růst [7–9], málo místa se věnuje vlivům, omezujícím růst mléčných bakterií v pivu a podmiňujícím jeho specifické vlastnosti jako růstového média.

MATERIÁL A METODY

Mléčné bakterie

Mléčné bakterie se izolovaly z různých míst pivovarského provozu (tab. 1). Bakterie, rychle rostoucí v pivě, pivo silně kalily. Závislost trvanlivosti na počáteční koncentraci bakterií v pivu udává obr. 1. Kmeny I, III, IV a 4 se uchovávaly na šikmé agarové půdě P- [10], zbývající kmeny v pivní půdě s nízkým obsahem agaru při 5 °C.



Obr. 1. Závislost trvanlivosti na počáteční koncentraci bakterií v pivě. A — trvanlivost piva při 20 °C (dny), B — počet bakterií v 1 ml piva.

Tab. 1. Přehled kmenů mléčných bakterií

Rod	Kmen	Původ	Trvanlivost ^{a)} 12% piva při 20 °C (dny)	Specifická růstová rychlost v 12% pivě (den ⁻¹)
<i>Pedio-</i> <i>coccus</i>	I	kvasnice	70	—
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	III	pivo	>100	—
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	IV	mladé pivo	>100	—
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	4	pivo	>100	—
<i>Pedio-</i> <i>coccus</i>	B ₂	pivo	7	1,559
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	B ₆	pivo	6	1,836
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	5	pivo	8	1,422
<i>Lacto-</i> <i>bacillus</i>	A ₃	pivo	9	1,153

a) — počáteční koncentrace buněk 10² ml⁻¹

Tab. 2. Růst mléčných bakterií v pivovarských substrátech (0,06 % agaru)

Půda	Doba průkazu (dny)/ intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C							
	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
12% mladina	0	0	0	0	3/2	2/3	2/3	0
12% sladina	0	1/4	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	0
prokvašená sladina	3/2	1/4	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	2/3
12% pivo	0	0	0	0	3/3	1/3	1/3	2/3

Pro jednotlivé testy se kmeny I, III, IV a 4 anaerobně pomnožovaly v tekuté půdě P⁻ (0,1 MPa CO₂), kmeny B₂, B₆, 5 a A₃ v pivní půdě s nízkým obsahem agaru (0,2 MPa CO₂) v tlakovém anaerostatu [6], 5 dní při 28 °C.

Půdy s nízkým obsahem agaru (0,06 %)

K 3 ml 2% roztaveného agaru se přidalo 100 ml tekuté půdy (piva, sladiny apod.) a po rozlití do zkumavek se půda ponechala 1 h při 5 až 8 °C. Další živné složky se přidávaly jako koncentrované roztoky do půdy před smísením s roztaveným agarem. Přídavkem H₂SO₄ (c = 0,5 mol.l⁻¹) a NaOH (c = 1 mol.l⁻¹) se upravilo pH piv při sledování vlivu pH na růst bakterií, pH neupraveného piva bylo 4,5.

Do zkumavek s půdou se očkovací jehlou očkávaly vpichem suspenze kmenů bakterií a kultivovaly při 28 °C. Růst se hodnotil počtem dnů, potřebných k prvému pozorovatelnému růstu a intenzitou růstu, hodnocenou po 7 dnech kultivace: 0 — žádný růst, 1 — velmi slabý, 2 — slabý, 3 — silný, 4 — velmi silný růst.

Při přípravě ostatních půd (P⁻, MRS apod.), očkování a kultivaci se postupovalo podle [10].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Mléčné bakterie se v mikrobiologické kontrole v pivovarských substrátech nejčastěji na půdách s bohatým obsahem živin (půdy MRS, VLB S 7 apod.). Příznivé složení

Tab. 3. Růst mléčných bakterií v 12% pivě (0,06 % agaru) s různým obsahem hořkých látek

12% pivo (A) + prokvašená 12% sladina (B)	Doba průkazu (dny)/intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C							
	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
100 % A	0	0	0	0	3/3	1/3	1/3	2/3
80 % A + 20 % B	0	0	0	6/1	1/3	1/4	1/3	1/3
60 % A + 40 % B	0	7/1	4/2	4/1	1/4	1/4	1/3	1/3
40 % A + 60 % B	7/1	7/2	3/3	4/3	1/4	1/4	1/4	1/3
20 % A + 80 % B	7/1	2/3	2/4	2/4	1/4	1/4	1/4	1/3
100 % B	3/2	1/4	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	2/3

Tab. 4. Růst mléčných bakterií v 12% pivě (0,06 % agaru) s různým přídavkem živných látek

12% pivo +	Doba průkazu (dny)/intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C							
	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
KA (5 g.l ⁻¹)	3/3	1/2	1/4	3/4	1/4	1/4	1/4	2/4
MPB (5 g.l ⁻¹)	2/3	1/3	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	2/4
KA (0,5 g.l ⁻¹)	6/1	6/2	5/3	5/3	1/4	1/4	1/4	2/4
MPB (0,5 g.l ⁻¹)	0	5/2	2/3	2/3	1/4	1/4	1/4	1/4

KA — kvasničný autolýzát, MPB — masopeptonový bujón

půd zaručuje rychlý růst bakterií, ale pomnožují se také bakterie, které v pivě rostou pomalu, nebo v něm nerostou.

Z celkového obsahu mléčných bakterií se proto trvanlivost piva předpovídá jen obtížně. K sestavení specifické půdy je nutné zjistit, které faktory podmiňují růst mléčných bakterií v pivu.

Z pivovarského provozu jsme izolovali 4 kmeny mléčných bakterií, které rychle kazily pivo a 4 kmeny, které se v pivu pomnožovaly pomalu, nebo v něm nerostly.

Růst bakterií se sledoval v půdách s nízkým obsahem agaru. Tato technika dovoluje anaerobní kultivaci ve vysoké vrstvě půdy, potlačí se aerobně rostoucí bakterie a v krátké době se získá průkaz růstu bakterií. Metoda slučuje výhody kultivace v tekutých i ztužených půdách.

Očkování kmenů bakterií do základních pivovarských substrátů prokázalo rozhodující význam hořkých látek pro pomnožení bakterií v pivu (tab. 2). Ačkoli většina bakterií výborně rostla ve sladine, vyžadovaly 2 kmeny rovněž látky, přítomné v prokvašené sladine a pravděpodobně vylučované kvasnicemi do piva.

Vliv hořkých látek na růst mléčných bakterií se ověřoval očkováním bakterií do půd, připravených z různých dílů prokvašené sladiny a piva (tab. 3).

Selektivní účinek hořkých látek lze zrušit přídavkem vhodných zdrojů dusíkatých látek a růstových faktorů (tab. 4). V pivovarské mikrobiologii se do živných půd pro mléčné bakterie používá kvasničný autolýzát, nebo masopeptonový bujón. Tyto látky podporují nejen růst nebezpečných mléčných bakterií, ale také růst relativně neškodných kmenů. Proto uměle sestavené půdy, obsahující větší množství těchto látek, nedosahují potřebné specifčnosti.

Tab. 5. Růst mléčných bakterií v 12% pivě (0,06 % agaru) s různým přidavkem cukrů (5 g.l⁻¹)

12% pivo +	Doba průkazu (dny)/intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C							
	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
glukosa	0	0	0	7/1	3/4	1/3	1/3	2/3
fruktosa	0	0	0	5/1	3/3	1/3	1/3	2/3
sacharosa	0	0	0	6/1	3/3	1/3	1/3	2/3
maltosa	0	0	0	7/1	3/3	1/3	1/3	2/3

Tab. 6. Růst mléčných bakterií v 12% pivě (0,06 % agaru) s různým přidavkem aminokyselin (1 g.l⁻¹)

12% pivo +	Doba průkazu (dny)/intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C								
	pH	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
lysin	5,4	0	1/4	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	0
kyselina									
asparagová	4,1	0	0	0	0	3/1	2/2	0	0
histidin	4,5	0	0	0	0	3/3	1/3	1/3	1/3
glycin	4,5	0	0	7/2	5/2	4/3	2/3	2/3	2/3

Růst některých kmenů mléčných bakterií v pivě je omezen rovněž nízkým obsahem živin a růstových faktorů v pivě a tyto kmeny rostou pomalu i v prokvašené sladince (např. kmen I). Na půdách pro stanovení mléčných bakterií se zvýšeným obsahem živin a růstových faktorů, však tyto kmeny rostou velmi dobře. Předpokládáme výraznější pomnožení těchto kmenů ve várečných kvasnicích.

V průběhu hlavního kvašení a dokvašování se v přítomnosti kvasnic mohou pomnožit i kmeny citlivé k hořkým látkám. Várečné kvasnice zpravidla obsahují velká množství pediokoků, které se v pivě pomnožují pomalu, nebo v něm nerostou.

Naproti tomu přidavek různých cukrů k pivu výrazně nepodpořil růst mléčných bakterií (tab. 5). Přidavek aminokyselin k pivu podpořil (lysin), výrazně neovlivnil (glycin, histidin), nebo naopak potlačil (kyselina asparagová) růst bakterií (tab. 6). Více se uplatnila změna pH po přidavku kyseliny, nebo kyselé aminokyseliny, než přidavek zdroje aminodusku.

Značný vliv na růst mléčných bakterií v pivu mělo pH. V pivu s pH pod 4,0 ustával i růst kmenů, rychle rostoucích v pivu (tab. 7). Mléčné bakterie v pivě rostly nejlépe mezi pH 5,1 až 5,8, silně se však pomnožovaly i kmeny, které při běžném pH (4,3 až 4,5) v pivě nerostly. Podobný vliv pH se prokázal i při kultivaci kmenů v prokvašené sladince.

Přidavek ethanolu k pivu (2 až 4 %) částečně potlačoval kmen B₂, ostatní kmeny byly k ethanolu relativně necitlivé.

Postupná difúze plynů vysokou vrstvou půdy s nízkým obsahem agaru umožnila sledovat vliv CO₂ a O₂ na růst mléčných bakterií v pivě. Zkumavky se zaočkovanou půdou se kultivovaly v tlakovém anaerostatu, naplněném CO₂, nebo O₂ pod různým tlakem. Oxid uhličitý při tlaku 0,4 MPa částečně inhiboval růst kmenů B₆ a A₃, podobně jako kyslík při tlaku 0,15 MPa. Inhibiční vliv plynů závisel také na koncentraci bakterií v půdě a klesal s rostoucí koncentrací bakterií. Vzdušný kyslík,

Tab. 7. Růst mléčných bakterií v 12% pivě (0,06 % agaru) s různým pH

12% pivo pH	Doba průkazu (dny)/intenzita růstu po 7 dnech, 28 °C							
	I	III	IV	4	B ₂	B ₆	5	A ₃
3,9	0	0	0	0	4/1	4/2	0	0
4,3	0	0	0	0	3/3	2/3	2/3	3/3
4,5	0	0	0	0	3/3	1/3	1/3	2/3
5,1	0	2/3	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
5,8	0	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	0
6,6	0	2/4	1/4	1/4	5/2	1/4	1/4	0

difundující do půdy za atmosférického tlaku, naopak částečně podporoval růst všech kmenů, rostoucích v pivě, s výjimkou kmene B₂.

Oxid uhličitý potlačuje v pivě růst převážně většiny gramnegativních bakterií a působí jako jejich selektivní inhibitor. Je vhodnějším inhibitorem gramnegativních bakterií, než obvykle používaný β-fenylethanol, který může potlačovat i některé mléčné bakterie.

Tyto výsledky mohou sloužit k návrhu selektivní půdy pro stanovení mléčných bakterií, rychle rostoucích v pivě. Na specifickém růstu těchto bakterií v pivu se uvedené vlivy podílejí komplexně. Látky, podporující růst mléčných bakterií, musí být ve vyváženém vztahu s látkami, omezujícími růst relativně neškodných mléčných bakterií.

Nevhodná změna složení půdy se projeví v narušení této rovnováhy a v ztrátě specifičnosti stanovení, čímž klesá hodnota mikrobiologického rozboru. Nepřítomnost všech mléčných bakterií, prokázaná na půdách pro stanovení celkového počtu mléčných bakterií, je spolehlivou zárukou vysoké trvanlivosti, ale tohoto stupně čistoty se v provozu dosáhne velmi obtížně. Často může pivo obsahovat relativně neškodné kmeny mléčných bakterií při dostatečně vysoké trvanlivosti piva.

V mikrobiologické kontrole se obvykle dává přednost stanovení bakterií na ztužených půdách. Z hodnot počtu mikroorganismů v pivě se usuzuje na trvanlivost. Podle praktických zkušeností je trvanlivost piva přímo úměrná logaritmu počtu buněk v pivu po stočení, konstanty této závislosti však silně závisejí na kmenu bakterií, fyziologickém stavu buněk a složení piva. Ztužené půdy, bohaté živinami, nerozlišují mezi škodlivými a méně nebezpečnými kmeny.

Faktory určující trvanlivost piva se lépe napodobí při kultivaci v tekuté půdě, v níž se přednostně uplatní kmeny s nejvyšší růstovou rychlostí a minimální lag fází. Ztužením půdy se ovlivní vzájemné působení živiných a inhibičních látek a jejich transport z půdy do buněk, což je zvláště patrné při zachycování zárodků na membránových filtrech.

Kmeny B₂, B₆, 5 a A₃ např. velmi dobře rostly v pivu s nízkým obsahem agaru (0,06 %), avšak na 2% pivním agaru nerostly vůbec kmeny B₂ a A₃. Také z praktických důvodů mají tekuté půdy mnoho výhod (snadná příprava), které vyvažují jejich jedinou nevýhodu, kvalitativní vyjadřování výsledků.

Tekuté půdy, obsahující látky podporující růst bakterií a zachovávající specifičnost stanovení, mohou přispět k rychlému odhalování nebezpečné kontaminace ve výrobě.

Literatura

- [1] BENDOŮVÁ, O. - KURZOVÁ, V.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 197.

- [2] BACK, W.: Mschr. Brau. 34, 1981, s. 267.
[3] BACK, W.: Brauwelt 120, 1980, s. 1562.
[4] DACHS, E.: Brauwelt 121, 1981, s. 1778.
[5] BACK, W.: Brauwelt 122, 1982, s. 2090.
[6] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 26, 1980, s. 266.
[7] ESCHENBECHER, F.: Brauwiss. 22, 1969, s. 14.
[8] BACK, W.: Brauwiss. 31, 1978, s. 336.
[9] WACKERBAUER, K. - KIRCHNER, G. - MATSUZAWA, K. - GREIF, H.: Mschr. Brau. 34, 1981, s. 267.
[10] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. Praha 1980.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Vlivy podmiňující specifický růst mléčných bakterií v pивu. Kvas. prům., 29, 1983, č. 11, s. 246—249.

Článek se zabývá vlivy, podmiňujícími specifický růst mléčných bakterií v pivě. V pивu s nízkým obsahem agaru (0,06 %) s přidavkem různých živin a růstových faktorů se sledoval růst 4 kmenů mléčných bakterií, které rychle kazily pivo a 4 kmenů, které pivo nekazily, nebo kazily velmi pomalu. Kmeny nerostoucí v pivu, byly citlivé k působení hořkých látek, nebo vyžadovaly zvýšený obsah dusíkatých látek a růstových faktorů. Přídavek kvasničného autolyzátu nebo masopeptonového bujónu do piva eliminoval inhibiční charakter hořkých látek, podobně jako úprava pH na hodnoty 5,1 až 5,8. Dále se sledoval vliv přidavku aminokyselin, cukrů, ethanolu, CO₂ a O₂ na růst mléčných bakterií v pivu. Získané výsledky se mohou uplatnit při přípravě půdy s vysokou specifičností pro průkaz bakterií, které rychle kazí pivo.

Шавел, Я., Проконова, М.: Действия, обуславливающие специфический рост молочных бактерий в пиве. Квас. прум. 29, 1983, № 11, стр. 246—249.

Статья занимается действиями, обуславливающими специфический рост молочных бактерий в пиве. В пиве с низким содержанием агара (0,06 %) с прибавкой разных питательных веществ и факторов роста исследовался рост четырех штаммов молочных бактерий, которые быстро вызывали порчу пива и четырех штаммов или не вызывающих порчу или медленно действующих. Штаммы, не растущие в пиве, были чувствительны к действию горьких веществ или требовали повышение содержания азотосодержащих веществ и факторов роста. При помощи прибавки дрожжевого автолизата или мясептонного бульона в пиво исключался ингибиционный характер горьких веществ, также как при изменении pH до величины 5,1—5,8. Далее исследовалось влияние добавки аминокислот, сахара, этанола, CO₂ и O₂ на рост молочных бактерий в пиве. Полученные результаты могут найти применение при приготовлении среды высокой

специфичности для доказательства бактерий, вызывающих быструю порчу пива.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Factors Influencing Growth of Lactic Bacteria in Beer. Kvas. prům. 29, 1983, No. 11, p. 246—249.

The article is focused on a study of factors influencing growth of lactic bacteria in beer. Four strains of bacteria which caused a quick spoilage of beer, four strains which caused a very slow spoilage of beer and four strains which had no effect on beer were tested in beer with a low content of agar (0,06 %) and with the addition of various nutrients. Growth characteristics were measured. The not-growing strains were sensitive to the effect of bitter substances. For the growth of these strains an increased content of nitrogen compounds and growth factors was necessary. The addition of yeast autolysate or bacteriological peptone into beer eliminated the inhibitory effect of bitter substances. Similar effect was observed with a change of the pH value to 5,1—5,8. The growth characteristics of lactic bacteria in beer were tested with respect to an addition of amino acids, sugars, ethanol, CO₂ and O₂, as well. The results achieved can be used for a preparation of identifying media for bacteria which caused beer spoilage.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Einflüsse, die das spezifische Wachstum der Milchsäurebakterien im Bier bedingen. Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 11, S. 246—249.

In dem Artikel werden die Einflüsse behandelt, die das spezifische Wachstum der Milchsäurebakterien im Bier bedingen. Im Bier mit niedrigem Agargehalt (0,06 %) und Zugabe von verschiedenen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren wurde das Wachstum bei 4 Stämmen der schnellverderbenden Milchsäurebakterien und 4 Stämmen, die entweder überhaupt nicht oder nur sehr langsam bierverderbend wirken, verfolgt.

Die im Bier nicht wachsenden Stämme waren gegen die Wirkung der Bitterstoffe empfindlich oder erforderten einen höheren Gehalt an stickstoffhaltigen Substanzen und Wachstumsfaktoren. Die Zugabe von Hefeautolysat oder Fleischpepton-Bouillon ins Bier eliminierte den Inhibitionscharakter der Bitterstoffe ähnlich wie die pH-Korrektur auf Werte 5,1 bis 5,8. Weiter wurde auch der Einfluß der Zugabe von Aminosäuren, Zucker, Äthanol, CO₂ und O₂ auf das Wachstum der Milchsäurebakterien im Bier verfolgt. Die erzielten Ergebnisse können bei der Aufbereitung eines Nährbodens mit hoher Spezifität für den Beweis der schnellverderbenden Bakterien appliziert werden.