

Využívání mikrobiologických rozborů k zvyšování trvanlivosti piva

663.41:579 663.461.2

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

Klíčová slova: pivo, zvyšování trvanlivosti, mikrobiologické rozborů

ÚVOD

Biologická trvanlivost piva je důležitým znakem jeho kvality. Přes poměrně nízkou hodnotu trvanlivosti, požadovanou ČSN 56 6635, reklamují odběratelé v letních měsících pivo pro nízkou trvanlivost. K nalezení příčin nízké trvanlivosti se v praxi s rozdílným úspěchem využívají mikrobiologické metody.

Nesprávný výklad výsledků vede k nedůvěře k mikrobiologickým rozborům. Z praxe je známo, že piva s řádově stejnými obsahy mikroorganismů se mohou podstatně lišit trvanlivostí. Mikrobiologická šetření někdy neumožňují spolehlivě nalézt příčiny poklesu trvanlivosti a navrhnout účinná nápravná opatření.

VLIVY PŮSOBÍCÍ NA TRVANLIVOST PIVA

1. Teplota

Trvanlivost piva se podle ČSN 56 6635 posuzuje při 20 °C. S tím souvisejí obtíže při hodnocení vlivu skutečné teploty transportu a skladování piva na trvanlivost. Podle našich zkušeností klesá trvanlivost exponenciálně s teplotou podle vztahu:

$$(1) \quad d_t = d_{20} \cdot \exp b (20 - t) = d_{20} \cdot f$$

kde d_t je doba kažení piva (trvanlivost) při teplotě t , d_{20} — trvanlivost piva při 20 °C, b — koeficient teplotní závislosti.

V rozmezí 5 až 24 °C jsme pro kažení piva laktobacily stanovili $b = 0,130 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, pro kažení piva kvasinkami $b = 0,069 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$. Hodnoty faktoru f uvádí tab. 1, koeficientu b lze využít pro konstrukci stupnice jednotek kažení piva (obdoba pasteračních jednotek [1]).

Tab. 1. Hodnoty faktoru pro přepočet trvanlivosti při různých teplotách

Faktor f					
Teplota Laktobacily Kvasinky [°C]			Teplota Lakto- Kvasinky [°C] bacily		
5	7,029	2,815	15	1,916	1,412
6	6,172	2,627	16	1,682	1,318
7	5,419	2,452	17	1,477	1,230
8	4,759	2,289	18	1,297	1,148
9	4,179	2,136	19	1,139	1,071
10	3,669	1,994	20	1,000	1,000
11	3,222	1,861	21	0,878	0,933
12	2,829	1,737	22	0,771	0,871
13	2,484	1,621	23	0,677	0,813
14	2,181	1,513	24	0,595	0,759

Uvedený vzorec slouží pouze k orientačnímu posouzení vlivu teploty na trvanlivost. Stanovení trvanlivosti při předepsané teplotě je nejpřesnějším, avšak časově nejdelším způsobem posouzení biologické stability piva.

2. Druh mikroorganismu

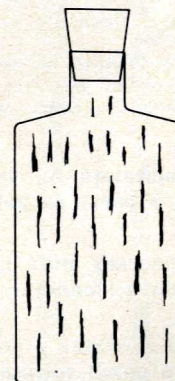
Jednotlivé druhy mikroorganismů se podstatně liší rychlostí růstu v pivě a piva, obsahující stejný počet mikroorganismů s různou schopností kazit pivo, se výrazně liší trvanlivostí.

Podrobně jsme tento jev zkoumali při kažení piva mléčnými bakteriemi. Ze závodů, trvale dosahujících nízkou nebo vysokou trvanlivost, se odebíraly vzorky pív a po zkažení se z nich izolovaly mléčné bakterie. Tyto závody věnovaly sanitaci přibližně stejnou péči a stočená piva obsahovala řádově stejná množství mikroorganismů.

Izolovanými kmeny bakterií se ve stejné koncentraci zaočkovala pasterovaná piva z těchto závodů. Bakterie, izolované z pív s nízkou trvanlivostí, kazily pivo rychleji, než bakterie, izolované z pív s vysokou trvanlivostí, nezávisle na původu piva.

Trvanlivost rovněž závisí na koncentraci mikroorganismů v stočeném pivě, avšak popsané pokusy poukazují na velký význam druhu přítomných mikroorganismů. K rychlému posouzení schopnosti jednotlivých kmenů bakterií kazit pivo se bakterie zaočkují vpichem do piva, částečně ztuženého 0,06 % agarů a zjišťuje se doba, potřebná k viditelnému růstu bakterií [2].

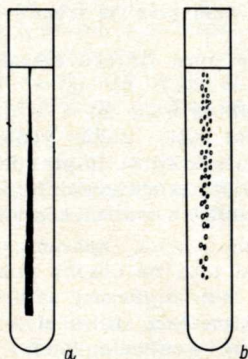
Mechanismus kažení piva bakteriemi umožňuje sledovat podobná technika. Stočené pivo se asepticky zbaví oxidu uhličitého a po přidavku aktidionu se částečně ztuží 0,06 % agarů v plochých (Rouxových) lahvích. Pozoruje se rychlost růstu bakterií, přítomných v pivě (obr. 1).



Obr. 1. Kažení 300 ml 12% piva rychle rostoucími laktobacily. Stočené pivo s 0,06 % agarů. 4. den kultivace při 25 °C.

Charakter růstu bakterií v pivu s 0,06 % agarů dovozuje také rozlišit kmeny, které silně kalí pivo, od kmenů, tvořících v pivu sediment. Bakterie kalící pivo obvykle postupně prorůstají agar, zatímco kmeny tvořící sediment rostou za tvorby kulovitých kolonií (obr. 2). Rozdílný charakter růstu pravděpodobně souvisí se schopností separace buněk po jejich dělení.

Podobné rozdíly v schopnosti kazit pivo existují i u kvasinek. Za zvláště nebezpečné druhy považujeme některé kvasinky rodu *Saccharomyces* [3].



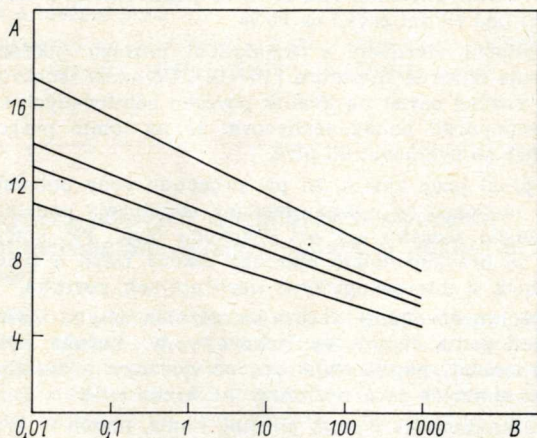
Obr. 2. Růst bakterií, tvořících v pivu zákal (a) a sediment (b). Vpich do pivního agaru (0,06 %).

3. Množství mikroorganismů a jejich fyziologický stav

Pokusy s očkováním různých kmenů kontaminujících mikroorganismů do piva většinou prokázaly platnost vztahu:

$$(2) \quad d_{20} = -p \cdot \log c_0 + q$$

kde d_{20} je trvanlivost piva při 20 °C, p , q — konstanty a c_0 počáteční koncentrace mikroorganismů v pivu. K těmto pokusům se většinou používalo buněk z exponenciální fáze růstu a vztah (2) lze odvodit např. z kinetické rovnice prvního řádu pro růst mikroorganismů (obr. 3, 4). Buňky, které nejsou v exponenciální fázi růstu, kazí pivo pomaleji.



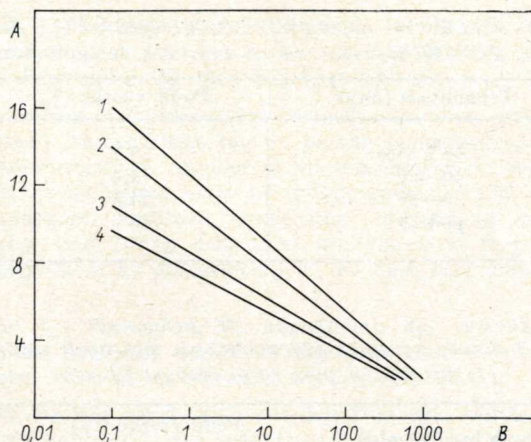
Obr. 3. Závislost trvanlivosti 12% piva na počáteční koncentraci mléčných bakterií (4 kmeny). A — trvanlivost (dny), B — koncentrace (počet buněk v 1 ml).

Při kažení piva směsí mikroorganismů v různém fyziologickém stavu neplatí vztah (2) přesně. S rostoucí koncentrací mikroorganismů v pivu však vždy roste pravděpodobnost, že se pivo kazí.

Podle literárních údajů kulturní kvasinky nekazí pivo v koncentraci pod 5 buněk v láhvi, avšak u některých cizích kvasinek a mléčných bakterií toto omezení neplatí. Uvádí se, že 5 laktobacilů v láhvi piva kazí 12% pivo za 10 až 12 dní [4].

Pro dosažení trvanlivosti, udávané ČSN 56 6635, doporučují pracovníci VÚPS hodnoty obsahu mikroorganismů pod 1 až 5 buněk v 1 ml, což se shoduje i s našimi výsledky [5]. Při výskytu rychle rostoucích kmenů bakterií však ani tato hranice není spolehlivou zárukou požadované trvanlivosti (obr. 3).

Zahraniční odborná literatura obsahuje jen málo údajů o obsahu mikroorganismů v stočeném pivu. Při stáčení biologicky stabilního piva s trvanlivostí více než 60 dní se v láhvi piva nevyskytovaly mléčné bakterie a obsah kvasinek byl u většiny vzorků nižší než $0,01 \text{ ml}^{-1}$ [4]. Podle jiných údajů se obsah mikroorganismů pod $0,05 \text{ ml}^{-1}$ pokládal za přípustný, nad $0,1 \text{ ml}^{-1}$ za nepřipustný [6].



Obr. 4. Závislost trvanlivosti 12% piva na počáteční koncentraci kvasinek. A — trvanlivost (dny), B — koncentrace (počet buněk v 1 ml). 1, 2 — dva kmeny *Sacch. uvarum* (carlsbergensis), 3 — *Sacch. cerevisiae*, 4 — *Sacch. diastaticus*.

Podle našich zkušeností zaručuje celkový obsah mléčných bakterií pod $0,001 \text{ ml}^{-1}$ trvanlivost 12% piva nad 30 dní, avšak při nepřítomnosti nebezpečných kmenů lze této trvanlivosti dosáhnout i s obsahem mléčných bakterií pod $0,01 \text{ ml}^{-1}$. Podobné hodnoty platí i u kvasinek.

Mikrobiologické rozborů v kontrolních laboratořích se většinou omezují na stanovení kvasinek na mladinovém, nebo sladinovém agaru, nebo mléčných bakterií, na půdách, podporujících co nejvíce jejich růst. Existují i rychlomety, ale zpravidla platí, že informační hodnota rozborů je nepřímo úměrná době rozboru. Nejspolehlivější rozbor je trvanlivost piva. Nadějný je vývoj vysoce specifických půd [2].

4. Složení piva

Růst mikroorganismů v pivě podporují, nebo inhibují látky, uvedené v tab. 1. Stabilita piva také značně závisí na pH. Pokusy o předpověď biologické stability piva podle jeho složení byly však neúspěšné.

Růst kontaminujících mikroorganismů lze do jisté míry zpomalit snížením koncentrace látek, podporujících jejich růst, nebo zvýšením koncentrace inhibujících látek, ale požadavky na pěnivost, organoleptické vlastnosti a technologické podmínky většinou znemožňují provést úpravy složení piva v potřebném rozsahu.

Užitečné informace přinesly pokusy se sledováním trvanlivosti piva v závislosti na přídavku pivovarských meziproductů (sladina, mladina, prokvašená sladina) k pivu. Látky podporující růst mléčných bakterií v pivu pocházely ze sladiny, avšak některé z nich vznikaly až

Tab. 2. Vliv složení piva na růst mikroorganismů v pivu

Složky piva	
podporující růst	inhibující růst
cukry dusíkaté látky anorganické soli růstové faktory rozpuštěný kyslík (podle koncentrace a mikroorganismu)	ethanol hořké látky oxid uhličitý specifické inhibitory rozpuštěný kyslík (podle koncentrace a mikroorganismu)

Tab. 3. Trvanlivost piva z výstupu deskového filtru
(70 vzorků)

Trvanlivost (dny)	Podíl vzorků (%)
60 a více	55,7
40—59	4,3
20—39	24,3
pod 20	15,7

Tab. 4. Obsah kvasinek (77 vzorků) a mléčných bakterií
(16 vzorků) v pivu za deskovým filtrem

Obsah buněk (ml ⁻¹)	Podíl vzorků (%)	
	kvasinky	mléčné bakterie
0,1 a více	16,9	31,3
0,01—0,1	19,5	25,0
pod 0,01	63,6	43,7

činností kvasnic. Izolovali jsme kmeny bakterií, které nerostly ve sladině, avšak rostly v prokvašené sladině a pivu.

Kmeny bakterií, rychle rostoucích v pivu, se také vyznačovaly vysokou rezistencí k hořkým látkám. Inhibiční vliv hořkých látek závisel na přítomnosti dalších složek v pivu [2]. Sledováním růstu kvasinek rodu *Saccharomyces* v pivu se prokázalo, že nebezpečné druhy kvasinek jsou rezistentní k současnému působení oxidu uhličitého a ethanolu [3].

Často diskutovaným problémem je vliv rozdílu mezi skutečným a dosažitelným prokvašením piva. Podle našich zkušeností vzrůstá rychlost růstu kontaminantů v pivě se zvyšující se hodnotou tohoto rozdílu v různém rozsahu. Pivo může obsahovat kontaminanty, jejichž rychlost růstu v pivu se nepodaří podstatně snížit ani úplným prokvašením piva.

Mezi specifické inhibitory, které mohou ovlivňovat růst bakterií a kvasinek v pivu, náleží látky, vylučované kvasinkami. Patří sem např. „killer“ faktory kvasinek [7], nebo termolabilní faktor, inhibující růst mléčných bakterií [8]. V současnosti se konají pokusy přenést genetickým metodami tvorbu těchto faktorů do vybraných kmenů kulturních kvasinek [9].

Příprava piva, odolného proti veškeré provozní kontaminaci, je dosud prakticky neproveditelná a rozhodujícím činitelem k dosažení vysoké trvanlivosti je eliminace rychle rostoucích kontaminantů.

Podrobná diskuse vlivu mikrobiologické čistoty pro-

vozu na rozšíření kontaminace v pivovaru přesahuje rámec článku a proto se omezíme na mikrobiologický stav piva po filtraci a při stáčení.

Vliv filtrace a stáčení piva na trvanlivost

Současná křemelinová filtrace umožňuje snížit počet mikroorganismů až na 0,01 ml⁻¹, desková filtrace (s vložkami č. 10) na 0,001 ml⁻¹. V praxi se vyskytují hodnoty až stokrát vyšší, podle podmínek filtrace a mikrobiologické čistoty filtru. Je prakticky nemožné rozlišit mikroorganismy, procházející filtrem, od mikroorganismů, představujících vnitřní kontaminaci filtru.

Množství kontaminujících mikroorganismů ve filtrovaném pivu závisí také na obsahu mikroorganismů ve vstupujícím pivu. Mikroorganismy se hromadí ve filtračním materiálu (křemelina, filtrační vložky). Filtrační materiál, nasycený kontaminujícími mikroorganismy, uvolňuje buňky do filtrátu, ještě před dosažením maximálního tlakového rozdílu na filtru.

Kromě náhodného pronikání buněk filtrem jsme pozorovali vyplavování většího počtu mikroorganismů tlakovými rázy při filtraci („klepání koberců“).

Předpokladem pro získání piva s vysokou stabilitou je co největší snížení rychle rostoucích kontaminantů ve vstupujícím do filtru. Tyto mikroorganismy se nejčastěji dostávají do piva v ležáckém sklepě z přepracovaného piva, vráceného do pivovaru.

Při nižším obsahu těchto kontaminantů lze i filtrací běžnými azbestocelulosovými vložkami připravit trvanlivé pivo. Přehled ročních výsledků sledování kvality filtrace azbestocelulosovými vložkami, označenými číslem 10, uvádí tab. 3.

Podmínkou pro dosažení těchto výsledků byla dokonalá cirkulační sterilace deskového filtru horkou vodou, vytékající z výstupu filtru s teplotou 75 až 80 °C (0,5 až 1 h). S vodou horkou nad 80 °C se podíl vzorků s trvanlivostí nad 60 dní zvýšil na 80 %.

Sanitační, sterilační a dezinfekční postupy podrobně popisuje odborná literatura [10—12]. Účinnost těchto zásahů značně závisí na kvalitě povrchu sanitovaných celků, schopnosti buněk zachycovat se na tomto povrchu a znovu se uvolňovat do piva.

V praxi jsme zjistili, že při průchodu vody potrubím, nebo hadicemi se mikroorganismy uvolňovaly podstatně v menším rozsahu než při průchodu piva. Při stáčení piva se pravděpodobně uplatňují změny tlaku a tvorba bublinek v mikroskopických nerovnostech povrchu.

Z těchto důvodů se kvalita sanitačních zásahů obtížně hodnotí podle čistoty výplachové vody. Rovněž odběr stěrů mnohdy neposkytuje správné výsledky, neboť zdroje kontaminace jsou rozloženy nerovnoměrně.

Mikrobiologická čistota potrubí, hadic, nádob a strojů se nejlépe hodnotí nepřímými metodami, tj. podle rozdílu v počtu mikroorganismů, nebo trvanlivosti piva na vstupu a výstupu ze sledovaného celku [13].

Dezinfekci, a někdy i sterilaci odolávají zbytky piva v dutinách kohoutů, vzorkovacích kohoutků a kusech tvaru T, neprocházející jimi pivo a obsahují-li ještě vzduch. Z piva s pomnoženými mikroorganismy se při stáčení postupně dávkuje mikroorganismy a jejich množství se doplňuje růstem, zejména v době, kdy je zařízení mimo provoz. Neprocházející potrubím pivo, stoupne teplota v částech, uložených v prostorách s vyšší teplotou.

Uvedené faktory se uplatňují zejména ve stáčecích strojích. Lahvárenské plniče jsou umístěny v místnostech s vyšší teplotou a zbavit je kontaminujících mikroorganismů je velmi obtížné i při cirkulační sterilaci. Pouhé proplachování horkou vodou, nebo dezinfekce ne-

jsou zpravidla dostatečně účinné. Praktické zkušenosti se sterilací stáčecího stroje pro plnění biologicky stabilního piva shrnuje ve výborném článku *Posada et al.* [4].

Velmi obtížně se steriluje i plnič sudů. Při nedostatečně vymytých sudech se do zásobního bubnu plniče dávkuje s pivem, strhávaným se vzduchem, mikroorganismy a v plniči vznikají druhotné zdroje kontaminace. Jímání pěny a piva do zvláštní nádrže přináší problémy s likvidací tohoto piva.

Při nedostatečné sanitaci a sterilaci plnicích strojů stoupá obsah rychle rostoucích mikroorganismů v pivě při průchodu plničem na hodnoty okolo jednotek až desítek v 1 ml.

Literatura

- [1] ŠAVEL, J., Kvas. prům. **24**, 1978, s. 99
- [2] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. **29**, 1983, s. 246
- [3] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. **27**, 1981, s. 175.
- [4] POSADA, J. - GALINDO, J. G. - PALOMERO, F. L.: EBC Proc. 1973, s. 399
- [5] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. SNTL Praha 1980
- [6] ANONYM: Brew. Dig. **44**, 1969, č. 4, s. 80
- [7] BENDO VÁ, O.: Biol. listy **48**, 1983, s. 36
- [8] DOLEZIL, L. - KIRSOP, B. H.: J. Inst. Brew. **86**, 1980, s. 122
- [9] BENDO VÁ, O. - KUPCOVÁ, L. - JANDEROVÁ, B. - VONDREJS, V. - VERNEROVÁ, J.: Mschr. Brauwiss. **36**, 1983, s. 167
- [10] TOPKA, P.: Kvas. prům. **29**, 1983, s. 57
- [11] TOPKA, P. - TOLMAN, J.: Kvas. prům. **29**, 1983, s. 148
- [12] TOPKA, P.: Kvas. prům. **29**, 1983, s. 268
- [13] KOLEKTIV: Hygiena a sanitace v pivovarech, sladovnách, soddokárnách a vinařských závodech. STIPP, Praha 1975

Šavel, J. - Prokopová, M.: Využívání mikrobiologických rozborů k zvyšování trvanlivosti piva, Kvas. prům., **30**, 1984, č. 1, s. 10—13.

Článek se zabývá faktory, které ovlivňují trvanlivost piva, jako jsou teplota, druh mikroorganismů, počet mikroorganismů ve stočeném pivu, jejich fyziologický stav a složení piva.

Diskutují se problémy s hodnocením mikrobiologické čistoty potrubí, hadic, nádob a stáčecích strojů a uvá-

dějí se praktické závěry pro dosažení vysoké trvanlivosti piva.

Шавел, Я., Проконова, М.: Использование микробиологических анализов для повышения стойкости пива. Квас. прум. **30**, 1984, № 1, стр. 10—13.

Статья занимается факторами, оказывающими влияние на стойкость пива, как температура, типы микроорганизмов и их количество в разлитом пиве, их физиологическое состояние и состав пива.

Обсуждаются проблемы оценки микробиологической чистоты труб, резиновых трубок и разливочных машин и приводятся практические выводы для достижения высокой стойкости пива.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Utilization of Results from Microbiological Analyses to an Increase of Beer Stability. Kvas. prům. **30**, 1984, No. 1, p. 10—13.

A review of factors which influence the beer stability is given. Among these factors belong temperature, type of microorganism, number of microorganisms in bottled beer, physiological state of microorganisms and beer composition. Problems concerning hygiene of tubes, vessels, and filling machines are discussed from the standpoint of an achievement of the high beer stability.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Ausnützung der mikrobiologischen Analysen zur Erhöhung der Haltbarkeit des Bieres. Kvas. prům. **30**, 1984, Nr. 1, S. 10—13.

Der Artikel befaßt sich mit den Faktoren, welche die Haltbarkeit des Bieres beeinflussen, wie Temperatur, Art der Mikroorganismen, Zahl der Mikroorganismen im abgefüllten Bier, ihr physiologischer Zustand und die Zusammensetzung des Bieres.

Diskutiert werden die Probleme der Auswertung der mikrobiologischen Reinheit der Leitungen, Schläuche, Gefäße und Abfüllmaschinen; im weiteren werden praktische Maßnahmen zur Erreichung einer hohen Bierhaltbarkeit angeführt.