

## Z výzkumu a praxe

### Možnost pomnožení pivovarských kontaminujících mikroorganismů v průběhu kvašení

VĚRA KURZOVÁ, prom. biol., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

**Klíčová slova:** pomnožení mikroorganismů, kvašení, divoké kvasinky, mléčné bakterie, koliformní bakterie

Kvašení je důležitým úsekem výroby piva, neboť teprve zkvašením mladiny se získává pivo s typickými chuťovými vlastnostmi. Rozhodující vliv na průběh kvašení mají kvasnice, jimž se přisuzuje značný vliv na senzorické vlastnosti piva.

Z těchto důvodů patří kvasnice v pivovarské technologii k základním surovinám, od nichž se však liší tím, že jsou živým organismem, který při vhodných podmínkách a správné péči o ně projevuje tendenci regulovat prostředí pro svou produkční činnost, oslabovat negativní a škodlivé vlivy a reprodukovat tím podmínky pro dokonalou jakost piva. Toto z empirie vzniklé a výzkumem potvrzené pojetí připomíná v mnohém moderní kybernetické názory o homeostatických systémech, které projevují sklon k automatické samoregulaci svého prostředí. Podmínkou pro tuto přirozenou činnost kvasinek je jejich dobrý fyziologický stav a vitalita. Vedle různých mechanických nečistot, s kterými přicházejí kvasnice v provozu do styku, jako jsou bílkovinná tělíska, tříslobílkovinné látky, chmelové pryskyřice, částice prachu apod., představují hlavní nebezpečí pro kvasnice četné kontaminující mikroorganismy. Mikrobiální kontaminace nejen poškozuje samotný fyziologický stav kvasnic, ale kontaminované kvasnice představují nejčastější zdroj kontaminace v celém pivovarském provozu. Kontaminace z násadních kvasnic se potom udržuje v zakvašené mladině až po hotové pivo.

V návaznosti na práce sledující jak výskyt kontaminujících pivovarských mikroorganismů, metody jejich stanovení, tak i jejich vliv na jakost a trvanlivost piva [1, 2, 3], pokračovali jsme v tomto výzkumu řešením často diskutovaného problému o možnosti rozvoje kontaminujících mikroorganismů v průběhu hlavního kvašení, tedy za přítomnosti kulturních pivovarských kvasinek.

#### Materiál a metody

Modelové kvasné zkoušky probíhaly ve skleněných válcích v objemech 0,5 l sterilní mladiny zakvašené čistou kulturou pivovarských kvasinek, v porovnání průběhu kvašení s přídavkem směsné kultury jednotlivých skupin kontaminujících mikroorganismů. Kvašení probíhalo při 8 °C po dobu 7 dnů. Z pív a kvasnic byly vyizolovány koliformní bakterie, pediokoky a laktobacily, které byly před vlastním pokusem pomnoženy v 10% sterilní mladině. Směsná kultura divokých kvasinek byla připravena ze sbírkových kmenů VÚPS. V každém pokusu byly současně s kontrolním válcem zakvašeny 3 válce s přídavkem kontaminujících mikroorganismů ve třech zvyšujících se koncentracích, a to  $1 \cdot 10^1$ ,  $1 \cdot 10^2$  a  $1 \cdot 10^3$  na 1 ml mladiny. Po ukončení hlavního kvašení byl kultivačně stanoven počet kontaminantů v kvasnicích a v pivu. Mladé pivo bylo slito do lahvíček se šroubovací-

mi uzávěry a pivo modelově dokvašováno 4 týdny při 2 °C. Po této době byl v pivu opět stanoven kultivačně počet kontaminujících mikroorganismů.

První sledovanou skupinou pivovarských kontaminantů jsou *cizí* neboli *divoké kvasinky*, jak jsou nazývány všechny ostatní druhy kromě kulturních pivovarských kvasinek. Přináleží často sice k opomíjeným, ale velmi častým a závažným kontaminantům pivovarských provozů, které mohou nepříznivě ovlivnit jakost piva tvorbou sedimentu, zákalu i změnou jeho senzorických vlastností.

Tabulka 1 uvádí výsledky sledování pomnožovací schopnosti divokých kvasinek v průběhu hlavního kvašení a dokvašování. V průběhu hlavního kvašení se přibližně o jeden řád zvýší počet divokých kvasinek vzhledem k jejich obsahu při zakvašení (součet počtu divo-

Tabulka 1. Pomnožovací schopnost divokých kvasinek při hlavním kvašení a dokvašování

	Počáteční koncentrace divokých kvasinek v mladině			
	kontrola	$10^1$	$10^2$	$10^3$
Začátek kvašení:				
% extraktu mladiny	9,73	9,73	9,73	9,73
pH mladiny	5,33	5,33	5,33	5,33
počet divokých kvasinek na 1 ml kvasinek	0	8,5	85	850
Konec hlavního kvašení:				
% extraktu	3,77	3,75	3,72	3,58
zdánlivý stupeň prokvašení %	61,3	61,5	61,8	63,4
sediment v ml	7,5	7,5	8,0	8,5
pH	4,49	4,41	4,42	4,45
počet divokých kvasinek v pivu na 1 milión kvasinek	0	10	40	467
počet divokých kvasinek v sedimentu na 1 milión kvasinek	0	70	690	7 358
Konec dokvašování:				
pH	4,39	4,35	4,35	4,38
počet divokých kvasinek v pivu na 1 milión kvasinek	0	155	1 640	17 078

kých kvasinek v pivu a sedimentu kvasnic). Při dokvašování se počet divokých kvasinek ještě zhruba zdvojnásobuje. Celkové pomnožení je tedy dvacetinásobné, přičemž k většímu pomnožení docházelo v podmínkách hlavního kvašení.

Další sledovanou skupinou pivovarských kontaminantů jsou mléčné bakterie — laktobacily a pediokoky. Tato skupina mikroorganismů náleží z hlediska pivovarského k nejobávanějším a při našich četných průzkumech pivovarských procesů bývá i nejčastější příčinou snížené jakosti piva. Tabulky 2 a 3 uvádějí výsledky pomnožovací schopnosti laktobacilů a pediokoků v průběhu hlavního kvašení a dokvašování. Získané výsledky prokazují, že laktobacily představují ze sledovaných skupin největší nebezpečí pro kvasící mladinu a dokvašující pivo. Bakterie se v průběhu kvašení silně pomnožují, větší část jich zůstává v mladém pivu. Bakterie v mladém pivu se pak ve vhodných podmínkách při dokvašování dále ještě pomnožují, i když v míře podstatně menší než při hlavním kvašení.

Počty pediokoků zůstávají ke konci hlavního kvašení zhruba stejné jako byla jejich původní koncentrace při zakvašení (součet počtu pediokoků v pivu a sedimentu kvasnic). Vezmeme-li však v úvahu, že zjištěné počty zárodků jsou vztahovány na 1 milión kvasinek a že při kvašení se samozřejmě pomnožují, je i zde vzhledem k množství kvasničního sedimentu vzrůst kontaminujících pediokoků zřejmý. Při dokvašování se u všech zvolených koncentrací řádově zvyšuje počet pediokoků v pivu.

Poslední sledovanou skupinou kontaminujících mikroorganismů jsou koliformní bakterie; tab. 4 uvádí výsledky jejich pomnožovací schopnosti v průběhu kvašení. Získané údaje ukazují, že v průběhu hlavního kvašení se koliformní bakterie silně pomnožují, přičemž v sedimentu kvasnic byl zjištěn v přepočtu na 1 milión kvasinek

větší podíl bakterií než v pivu. Z tohoto zjištění vyplývá, že tyto mikroorganismy představují nebezpečí pro kvasnice, které tyto bakterie při sedimentaci strhují z piva

Tabulka 3. Pomnožovací schopnost pediokoků při hlavním kvašení a dokvašování

	Počáteční koncentrace pediokoků v mladině			
	kontrola	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Začátek kvašení				
% extraktu mladiny	8,93	8,93	8,93	8,93
pH mladiny	5,53	5,53	5,53	5,53
počet pediokoků na 1 milión kvasinek	0	1,1	11,1	111,1
Konec hlavního kvašení				
% extraktu	1,66	1,64	1,63	1,54
zdánlivý stupeň prokvašení	81,4	81,6	81,7	82,8
sediment v ml	9,5	8,5	8,0	8,0
pH	4,35	4,32	4,34	4,36
počet pediokoků v pivu na 1 milión kvasinek	0	1,6	3,7	55,5
počet pediokoků v sedimentu na 1 milión kvasinek	0	0,2	8,7	50
Konec dokvašování				
pH	4,36	4,33	4,33	4,37
počet pediokoků v pivu na 1 milión kvasinek	0	10,0	166,6	1 500

Tabulka 2. Pomnožovací schopnost laktobacilů při hlavním kvašení a dokvašování

	Počáteční koncentrace laktobacilů v mladině			
	kontrola	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Začátek kvašení:				
% extraktu mladiny	9,61	9,61	9,61	9,61
pH mladiny	5,32	5,32	5,32	5,32
počet laktobacilů na 1 milión kvasinek	0	1,1	11,1	110
Konec hlavního kvašení:				
% extraktu	3,52	3,40	3,19	3,04
zdánl. stupeň prokvašení %	63,37	64,46	66,80	68,36
sediment v ml	8,5	8,5	9,0	9,0
pH	4,52	4,50	4,46	4,46
počet laktobacilů v pivu na 1 milión kvasinek	0	4 862	38 886	280 356
počet laktobacilů v kvasnicích na 1 milión kvasinek	0	385	1 578	39 468
Konec dokvašování:				
pH	4,38	4,36	4,32	4,22
počet laktobacilů v pivu na 1 milión kvasinek	0	9 368	96 542	648 388

Tabulka 4. Pomnožovací schopnost koliformních bakterií při hlavním kvašení a dokvašování

	Počáteční koncentrace bakterií v mladině			
	kontrola	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Začátek kvašení				
% extraktu mladiny	9,54	9,54	9,54	9,54
pH mladiny	5,46	5,46	5,46	5,46
počet koliformních bakterií na 1 milión kvasinek	0	1,5	15	155
Konec hlavního kvašení				
% extraktu	3,54	3,22	3,14	3,00
zdánlivý stupeň prokvašení	62,9	66,2	67,1	68,5
sediment v ml	8	8	8	8,5
pH	4,43	4,33	4,33	4,33
počet koliformních bakterií v pivu na 1 milión kvasinek	0	43	350	1 280
počet koliformních bakterií na 1 milión kvasinek	0	267	2 000	10 160
Konec dokvašování				
pH	4,32	4,30	4,15	3,98
počet koliformních bakterií v pivu na 1 milión kvasinek	0	54	590	1 200

Tabulka 5. Vliv kmene kvasnic na kosedimentační schopnost koliformních bakterií

	Kvasničný kmen					Mladina s koliform- ními bakteriemi
	I	II	III	IV	V	
Začátek kvašení						
% extraktu mladiny	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50
pH mladiny	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28
počet koliformních bakterií 1 ml mladiny	3 000	3 000	3 000	3 000	3 000	3 000
na 1 milión kvasinek	313	395	288	375	313	—
Konec hlavního kvašení						
% extraktu	2,28	1,75	2,52	1,82	1,49	9,29
zdánlivý stupeň prokvašení % sediment ml	76,0	81,6	73,4	80,8	84,3	2,21
pH	9,5	10,0	10,0	9,5	9,0	0
počet bakterií v pivu v 1 ml	4,15	4,10	4,10	4,10	4,15	5,05
na 1 milión kvasinek	7 800	9 300	5 700	4 000	5 200	10 000 000
počet bakterií v sedimentu	4 590	2 270	3 560	1 250	1 300	—
na 1 milión kvasinek	10 314	12 328	10 450	11 434	10 333	—

s sebou do sedimentu. Zbývající podíl bakterií v pivu zůstává při dokvašování v podstatě nezměněn. Z toho vyplývají pravděpodobně tradující se názory, že koliformní bakterie, či mladinové bakterie, jejichž podstatnou většinu koliformní bakterie představují, se v pivě nepomnožují. Tyto závěry se pravděpodobně vyvozují z rozdílu hodnot získaných rozbořem mladiny před zakvašením a v dokvašeném pivu, kdy byl zaznamenán často i silný úbytek koliformních bakterií. Uvedená kvasná zkouška ukazuje, že většina koliformních bakterií se váže na kvasnice, které při dalším nasazení do provozu představují nebezpečí sekundární kontaminace.

Vzhledem k výsledkům laboratorní kvasné zkoušky za přítomnosti koliformních bakterií, kdy větší část této kontaminace byla stržena do sedimentu kvasnic, přezkoušeli jsme dále vliv násadního kmene kvasnic na kosedimentační schopnost koliformních bakterií. Tuto otázku studovali i někteří zahraniční autoři, např. *White a Kidney* [4], kteří blíže sledovali příčiny rozdílu výskytu bakteriální kontaminace v průběhu kvašení za stejných podmínek. Zjistili, že jeden ze sledovaných kmenů *Saccharomyces cerevisiae* má výrazně zvýšenou schopnost usazovat se společně s bakteriemi. Při našem sledování jsme zjišťovali, zda se obdobná vlastnost vyskytne i u některého produkčního kmene kvasnic *Saccharomyces uvarum*. Při laboratorních kvasných zkouškách jsme použili čisté kultury pivovarských kvasinek vedených ve sbírce VÚPS. Průběhy těchto zkoušek uvádí tab. 5. Ze zjištěných hodnot je vidět, že koliformní bakterie se při růstu v mladíně bez přítomnosti kvasinek pomnožily na hodnotu  $1 \cdot 10^7$  ml<sup>-1</sup> oproti hodnotě 4 —  $9,3 \cdot 10^3$  ml<sup>-1</sup> při průběhu kvašení za přítomnosti pivovarských kvasinek. V sedimentu kvasnic bylo zjištěno  $10 - 12,3 \cdot 10^3$  koliformních bakterií na 1 milión kvasinek. Přihlédneme-li k celkovému množství sedimentu kvasnic v kvasných válcích, je vidět, že většina pomnožené bakteriální kontaminace se strhuje, stejně jako tomu bylo v předcházející zkoušce, spolu s kvasnicemi do sedimentu. Vliv použitých kvasničných kmenů na kosedimentační schopnost koliformních bakterií se v našem případě neprojevil. Stanovené hodnoty koliformních bakterií jsou po hlavním kvašení s různými kmeny pivovarských kvasinek řádově stejné.

Při konečném zhodnocení uvedené výzkumné práce lze konstatovat, že se jednotlivé skupiny kontaminujících

mikroorganismů projevovaly v průběhu kvašení různě, vždy se však pomnožovaly. Tuto skutečnost je nutno mít na zřeteli při aplikaci sanitačních opatření v pivovarských provozech a dbát současně i na čistotu násadních kvasnic.

#### Literatura

- [1] BENDOŮVÁ, O. - KURZOVÁ, V.: Vliv mikrobiálních kontaminantů na jakost piva a metody jejich stanovení. Výzk. zprávy VÚPS ev. č. 6/2 1976, 1977, 1978
- [2] BENDOŮVÁ, O. - KURZOVÁ, V.: Výzkum mikroorganismů kontaminujících pivovarskou výrobu se zřetelem k zajištění trvanlivosti piva. Výzk. zpráva VÚPS ev. č. 6/2 1979
- [3] KURZOVÁ, V. - VERNEROVÁ, J.: Výzkum mikrobiálních kontaminantů pivovarských kvasnic. Výzk. zpráva VÚPS ev. č. 9, 1982
- [4] WHITE, F. H. - KIDNEY, E.: Proc. EBC Berlin 1979, s. 803
- [5] WINDISCH, S.: Proc. EBC Rome 1959, s. 286
- [6] KIRSCHNER, G.: Mschr. Brauerei, 33, 1980, č. 8, s. 292
- [7] PRIEST, F. G. - SOMMERWILLE, H. J. - HOUGH, J. S.: Gen. Microbiol. 75, 1973, s. 295
- [8] PRIEST, F. G. - COWBOURNE, M. A. - HOUGH, J. S.: J. Inst. Brew. 80, 1974, s. 342.

**Kurzová, V.: Možnost pomnožení pivovarských kontaminujících mikroorganismů v průběhu kvašení. Kvas. prům. 30, 1984, č. 11, s. 242—245.**

Autorka sledovala modelovými kvasnými zkouškami možnosti rozvoje kontaminujících mikroorganismů za přítomnosti kulturních pivovarských kvasinek. Výsledkem bylo zjištění, že jednotlivé skupiny kontaminantů se sice při kvašení projevují různě, avšak vždy se pomnožují.

Počet divokých kvasinek se při hlavním kvašení zvyšuje přibližně o 1 řád a při dokvašování se ještě zdvojnásobuje. Laktobacily se pomnožují silně, větší podíl jich však zůstává v mladém pivu. Při dokvašování se pomnožují dále, avšak podstatně méně než při hlavním kvašení. Počty pediokoků jsou na konci hlavního kvašení asi stejné jako při zakvašení a při dokvašování se jejich koncentrace řádově zvyšuje. Koliformní bakterie se sice při hlavním kvašení silně pomnožují, avšak většina jich zůstává v kvasničním sedimentu. Zbývající podíl se při dokvašování nemění.

Курзова, В.: Возможность размножения пивоваренных контаминирующих микроорганизмов в течение брожения. Квас. прум. 30, 1984, № 11, стр. 242—245.

Автор исследовала при помощи модельных бродильных испытаний возможности развития контаминирующих микроорганизмов в присутствии культурных пивных дрожжей. Результатом было определение, что отдельные группы контаминантов хотя при брожении проявляются разным способом, однако всегда размножаются.

Количество диких дрожжей в течение главного брожения повышается приблизительно на один порядок и при послеброжении еще увеличивается в два раза. Лактобациллы сильно размножаются, но большая их часть остается в молодом пиве. При послеброжении размножение далее происходит, но существенно менее чем при главном брожении. Количество педиококков в конце главного брожения приблизительно то же, как при закваске и при послеброжении их концентрация порядком увеличивается. Колиформные бактерии при главном брожении размножаются сильно, однако большинство из них остается в дрожжевом остатке. Оставшаяся часть при послеброжении не изменяется.

**Kurzová, V.: Reproduction of Contaminant Microorganisms During Fermentation of Beer.** Kvas. prům. 30, 1984, No. 11, pp. 242—245.

The author studied a possibility of the reproduction and growth of contaminant microorganisms in presence of the pure culture of brewing yeasts in model fermentation tests. The results showed that despite the individual groups of contaminants had different behaviour during the fermentation the number of contaminants always increased. The number of wild yeasts increases about one order during the principle fermentation and during the post-fermentation this number yet increases twice. The number of pediococci remained the

same during the principle fermentation however, during the post-fermentation its number increases about one order. Significant reproduction of coliform bacteria was observed during the principle fermentation however, the majority of them remains in yeast sediment. During the post-fermentation the number of coliform bacteria in beer remains unchanged.

**Kurzová, V.: Möglichkeiten der Vermehrung der kontaminierenden Brauerei-Mikroorganismen im Verlauf der Gärung.** Kvas. prům. 30, 1984, Nr. 11, S. 242—245.

Die Autorin verfolgte in Modell-Gärversuchen die Entwicklungsmöglichkeiten der kontaminierenden Mikroorganismen bei Anwesenheit von Brauerei-Kulturhefen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß sich die einzelnen Kontaminantengruppen während der Gärung zwar unterschiedlich verhalten, immer wurde jedoch ihre Vermehrung festgestellt.

Die Zahl der Wildhefen erhöht sich während der Hauptgärung ungefähr 10mal, bei der Nachgärung wurde noch eine weitere zweifache Vermehrung festgestellt. Bei den Lactobazillen wurde eine starke Vermehrung festgestellt, ihr größerer Anteil verbleibt jedoch im Jungbier. Während der Nachgärung vermehren sie sich weiter, aber wesentlich weniger als bei der Hauptgärung. Die Pediokokkenzahlen sind am Ende der Hauptgärung ungefähr gleich wie am Anfang der Gärung; während der Nachgärung erhöht sich ihre Konzentration ordnungsmäßig. Die coliformen Bakterien vermehren sich zwar während der Hauptgärung stark, ihre Mehrheit verbleibt jedoch im Hefesediment. Bei dem Restanteil wurde während der Nachgärung keine wesentlichere Änderung festgestellt.