

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (FAPPZ)



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Mikroorganismy v pivovarnictví

Bakalářská práce

Lehocká Kateřina

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikroorganismy v pivovarnictví" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za veškerou pomoc, vlídný přístup a za poskytování cenných informací při zpracování mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat svým rodičům za veškerou podporu a trpělivost během celého mého studia.

Mikroorganismy v pivovarnictví

Souhrn

Proces výroby piva zahrnuje mikrobiální aktivitu v každé jeho fázi, od růstu a sklizně surovin, sladovnictví až po balení výsledného produktu. Hlavním cílem bakalářské práce bylo zpracovat souhrn mikroorganismů účastnících se tohoto procesu a nejčastěji kontaminujících mikroorganismů v pivovarském provozu.

Většina mikrobiálních aktivit probíhající během výroby jsou žádoucí, jelikož pivo je výsledkem mikrobiální fermentace, což je řízený proces, při kterém dochází k přeměně cukrů na alkohol, a to za pomoci pivovarských kvasinek. Z nich se při vaření piva používají v podstatě dva hlavní kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (kvasinky spodního kvašení, vhodné pro výrobu piva typu ležák) a *Saccharomyces pastorianus* (kvasinky svrchního kvašení pro piva typu Ale).

V práci jsou také popsány jednotlivé kroky výrobního procesu, při kterých lze škodlivé a potencionálně škodlivé mikroorganismy eliminovat. Mezi tyto kroky patří hvozdnění, rmutování a chmelovar (působení vysokých teplot), případně působením hořkých chmelových kyselin. Dále je to hlavní kvašení, kdy alkohol vyprodukovaný kulturními kvasinkami způsobí pokles pH a tím zakonzervování produktu, ležení, filtrace (mechanické odstranění kontaminace), pasterace (tepelná inaktivace mikroorganismů) a jako poslední, ale ne méně důležité skladování hotového piva při nízkých teplotách.

Existují mikroorganismy, které jsou schopny tomuto prostředí odolávat, mohou způsobit nežádoucí chuť piva a ovlivňovat tak jeho celkovou kvalitu. Nejvýznamnější z nich jsou bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus* a *Pediococcus*), které se mohou vyskytovat v různých fázích výroby a patří především mezi nejčastější kontaminanty hotového piva. Dále enterobakterie kontaminující mladinu, striktně anaerobní bakterie (*Pectinatus*, *Megasphaera*) a octové bakterie, tj. *Gluconobacter* a *Acetobacter*, které škodí převážně v konečné fázi výroby. Dále byly popsány mikroorganismy, které se v pivu nevyskytují často a nejsou tak považovány za hlavní kontaminanty. Jedná se o skupinu divokých kvasinek a plísni, které mohou růstem na surovinách způsobovat znehodnocení a o skupinu patogenních mikroorganismů jako jsou *Salmonellae typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Ty však nemají v pivu možnost pomnožování a odumírají.

K zabránění výskytu mikrobiální kontaminace, která může způsobit znehodnocení a stažení výrobků z oběhu patří například zavádění správných výrobních postupů a systémů řízení procesů jako je HACCP a CIP. Proto je každodenním úkolem sladařů a pivovarníků pečlivá kontrola všech zařízení, surovin a všech kroků procesu výroby.

Klíčová slova: Chmel, bakterie, kvasinky, spodní kvašení, mikrobiologie

Microorganisms in the brewing industry

Summary

The process of beer production includes microbial activity in each of its phases, from the growth and harvesting of raw materials, malting to the packaging of the final product. The main goal of the bachelor thesis is to introduce the process and provide a summary of the microorganisms participating in this process and the most frequently contaminating microorganisms in the brewing industry.

Most of the microbial activities that take place during production are desirable as beer is the result of microbial fermentation. This is a controlled process in which sugars are converted into alcohol using brewer's yeast. The yeast used basically has two main strains that are used in brewing: *Saccharomyces cerevisiae* (bottom-fermenting yeast, suitable to produce lager-type beer) and *Saccharomyces pastorianus* (top-fermenting yeast for Ale-type beers).

The thesis also describes the individual steps of the production process, in which both harmful and potentially harmful microorganisms can be eliminated. These steps include germination, mashing and hop growing. Hop growing is needed mainly due to the action of high temperatures or the action of bitter hop acids. Furthermore, it is during the main fermentation, where the alcohol produced by cultured yeast causes a decrease in pH and thus product preservation, also starts aging, and filtration (mechanical removal of contamination), pasteurization (thermal inactivation of microorganisms) and finally, the storing of finished beer at low temperatures begins.

There are microorganisms that can withstand this environment and can cause an undesirable taste to the beer and affect its overall quality. The most important of these are lactic acid bacteria (*Lactobacillus* and *Pediococcus*), which can appear at various stages of production and are among the most common contaminants of finished beer. Furthermore, enterobacteria contaminating wort, strictly anaerobic bacteria (*Pectinatus*, *Megasphaera*) and acetic acid bacteria, *Gluconobacter* and *Acetobacter*, which are harmful mainly in the final stage of production. Furthermore, microorganisms have been found which do not occur frequently in beer and are thus not considered to be the main microorganisms spoiling beer. It is a group of wild yeasts and fungi that can cause deterioration when grown on raw materials, as well as a group of pathogenic microorganisms such as *Salmonellae typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. However, they do not have the ability to multiply in beer and so they die. The research will also be supplemented by photographic documentation of selected contaminating bacteria (microscopic features). Regular inspections of beer and operation are needed to ensure a safe product. The microorganisms present in beer can't be observed with the naked eye or assessed in any sensory way, so it is very important to choose the right method for their determination and identification leading to the elimination of health diseases. The bachelor's thesis describes the microbial control in breweries, possible measures in finding contamination and, finally, systems to prevent contamination in breweries.

These systems mainly include HACCP and CIP. The daily task of maltsters and brewers is therefore to carefully control all steps of the production process, equipment and raw materials.

Keywords: Hop, bacteria, yeasts, bottom fermentation, microbiology

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíl práce	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Co je pivo	11
3.2 Základní suroviny na výrobu piva.....	11
3.2.1 Voda	11
3.2.2 Sladovnický ječmen.....	12
3.2.3 Chmel	13
3.2.4 Pivovarské kvasinky	13
3.2.4.1 Morfologie pivovarských kvasinek	13
3.2.4.2 Kvasinky svrchního kvašení	15
3.2.4.3 Kvasinky spodního kvašení	15
3.2.4.4 Uchovávání a ošetření kvasnic	16
3.2.4.5 Míchání a vločkování kvasnic	17
3.3 Proces výroby piva	18
3.3.1 Sladovnictví	19
3.3.1.1 Výroba sladu	19
3.3.1.2 Mletí sladu	20
3.3.1.3 Vystírání sladu	20
3.3.1.4 Rmutování sladu	20
3.3.2 Scezování sladiny	21
3.3.3 Chmelovar	21
3.3.4 Kvašení mladiny	22
3.3.5 Dokvašování piva	22
3.3.6 Filtrace piva.....	23
3.3.7 Pasterace piva	23
3.3.8 Stáčení piva	23
3.4 Mikrobiologická kontaminace piva	25
3.4.1 Bakterie mléčného kvašení.....	27
3.4.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	29
3.4.1.2 Rod <i>Peciococcus</i>	31
3.4.2 Enterobakterie	32
3.4.3 Striktně anaerobní bakterie	33
3.4.3.1 Rod <i>Pectinatus</i>	33

3.4.3.2	Rod <i>Megasphaera</i>	35
3.4.3.3	Rod <i>Zymophilus</i>	36
3.4.4	Octové bakterie	37
3.4.5	Ostatní rody	37
3.4.5.1	Rod <i>Kocuria</i>	37
3.4.5.2	Sporotvorné kazící bakterie.....	38
3.4.6	Plísně.....	39
3.5	Kontrola mikrobiální kontaminace v pivovarech	39
3.5.1	Identifikace mikroorganismů	40
3.5.2	HACCP a CIP	42
4	Závěr	43
5	Literatura.....	44

1 Úvod

Pivovarnictví je významnou lidskou činností již od počátku urbanizace a civilizace v neolitu. Dodnes zůstává pivo oblíbeným a výnosným nápojem. Je spotřebováno po celém světě, v přepočtu na obyvatele jsou předními zeměmi konzumující pivo Česká republika, Irsko, Německo, Rakousko a Velká Británie (Harrison & Albanese 2019).

Pivo je produkt ceněný svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (tj. jakostí) a má také poměrně vysokou mikrobiální činnost, která je velmi důležitá při tvorbě chuťových a dietetických vlastností, které jsou pro pivo charakteristické. Pivo je jedním z nejstarších alkoholických nápojů s obsahem alkoholu okolo 4 %, který má dlouholetou tradici. Je to nápoj připravený ze sladu, chmele a vody zkvašený kulturními pivovarskými kvasinkami. Slad se vyrábí ze sladovnického ječmene naklíčením a hvozděním. Kvasinky se používaly k provádění kvašení více méně od počátku pivovarnictví. Ačkoli kvasinky nebyly v té době specificky známé, nebylo žádným tajemstvím, že nejlepší piva se vyráběla vedle pekáren. Pivo se vyrábí v pivovarech a jeho výroba se skládá ze tří výrobních úseků, zahrnující mechanické, fyzikálně chemické a biochemické procesy.

Během výroby piva se mohou vyskytnout i rody negativně působících mikroorganismů, které mohou svou činností kvalitu piva výrazně snižovat. Patří k nim některé mléčné bakterie, např. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* a *Pediococcus damnosus* a některé gramnegativní bakterie, např. *Pectinatus cerevisiiphilus* a *Megasphaera cerevisiae*. Uvedené mikroorganismy mohou snižovat kvalitu piva v důsledku tvorby zákalu, kyselosti a produkcí nepříjemných pachů, např. diacetylu. Při kažení piva je potřeba i kvůli velkým finančním ztrátám pivovarů jednotlivé druhy kontaminace včas a co možno nejrychleji detekovat a odstranit jejich zdroj.

2 Cíl práce

Pivo patří mezi oblíbené nápoje nejen v České republice, ale i na celém světě. Na jeho výrobě se významně podílejí (pozitivně či negativně) mikroorganismy. Cílem bakalářské práce bylo popsat proces výroby piva a jeho charakteristiku. Dalším úkolem bylo vytvořit přehled mikroorganismů důležitých pro výrobu piva, popsat způsoby jejich využití v pivovarnictví, ale také charakteristiku nevhodně působících mikroorganismů na výrobu tohoto nápoje.

3 Literární rešerše

3.1 Co je pivo

Ingledeew & Hysert (1994) definovali pivo jako kvašený, nedestilovaný, alkoholický nápoj s obsahem alkoholu od 0,5 do 10 %, který se vyrábí přesně daným technologickým postupem. Pivo, stejně jako každá fermentovaná potravina, je mikrobiálně bohatý produkt. Aktivita mikroorganismů je zapojena do každého kroku jeho produkce a udává řadu sensorických vlastností, které přispívají ke konečné kvalitě. Je jedním z významných produktů lidstva a pro jeho jedinečnou chuť se konzumuje po celém světě. Při střídavé konzumaci také nelze popřít jeho pozitivní účinky na zdraví, a to hlavně díky obsahu vhodných vitaminů, iontů, antioxidantů a také minerálních látek jako je draslík a hořčík (Bokulich & Bamforth 2013).

3.2 Základní suroviny na výrobu piva

Pivo je nápoj složený ze čtyř hlavních surovin: vody, ječného sladu, chmele a pivovarských kvasnic. U 4% piva by mělo složení obsahovat asi 94 % vody, 1-2 % zbytkových cukrů, 4 % ethanolu a 0,1 % chuťových sloučenin. Složení každé suroviny a způsob, jakým se z nich v průběhu vaření piva kombinuje jejich aroma a chuť, má velký vliv na finální charakter piva a umožňuje vytvoření velké škály pivních druhů, které máme v dnešní době k dispozici (Parker & Bri 2012). Jednou z nejobtížněji obhospodařovatelných surovin při výrobě piva (pokud jde o sledování kvality) je kultura kvasinek, jelikož se skládá z živých organismů, u nichž vitalita a schopnost kvasit může být ovlivněno množstvím faktorů. Kultura kvasinek by měla být vitální, bez kontaminujících bakterií a divokých kvasinek. Kmen kvasinek by měl mít dobrou odolnost vůči četným stresovým faktorům (jako je např. teplota, ethanol, pH, osmotický tlak), bez zjevných slabin z hlediska výživy (spotřebování kyslíku a sacharidů, dusík, minerální požadavky atd.) (Russell 2016).

3.2.1 Voda

Voda je hlavní složkou piva, která představuje okolo 90-95 % obsahu hotového výrobku a její kvalita je jeden z faktorů ovlivňující jeho chuť (Bamfort 2016). Z hlediska kvantity je nejdůležitější surovinou pro výrobu piva. Chemicko-biologické složení vody má tedy při výrobě piva velmi důležitý význam a v procesu vaření není žádný krok, který by nebyl složením vody ovlivněn. Úprava vody je proto v mnoha případech nezbytná. Voda musí být pitná, čistá a bez obsahu patogenních mikroorganismů (Wunderlich & Back 2009). Na proces vaření má velký vliv druhy solí a jejich koncentrace v použité vodě. Přítomnost solí ovlivní aktivitu a stabilitu enzymů během mletí, stejně jako pH mladiny, stupeň a rychlost kvašení, tvorbu zákalu, autooxidaci a konečnou chuť piva. Mnoho piv, dnes světově známých, získalo do značné míry svou slávu právě díky obsahu solí ve vodě. Například „Plzeň“ (bledý ležák) se vyrábí z velmi měkké vody, zatímco hořké pivo „Burton“ používá vodu s velmi vysokým obsahem minerálů, takzvanou tvrdou vodu (Ingledeew & Hysert 1994).

Téměř každý pivovar má svou vlastní čističku vody a je potřeba vodu upravit na požadovanou kvalitu pro účely pivovaru. Musí splňovat zákonné limity, jako jsou pokyny Světové zdravotnické organizace (WHO) pro kvalitu pitné vody. Zejména musí být čistá, bez zárodků a škodlivých látek. Další parametry jsou spojeny s jejím použitím jako sládkové vody v pivovaru. Důležitými hodnotami jsou obsah vápníku a zásaditost. Hodnota pH je zvláště důležitá, protože různé výrobní kroky probíhají optimálně pouze při přesně definované hodnotě pH. Během mletí se ze sladu uvolňuje větší množství iontů, tyto ionty reagují s vodními ionty, které způsobují změny hodnoty pH. Hodnota zbytkové zásaditosti ve vodě poté udává, zda se pH během rmutování zvýší nebo sníží. Ideální voda na vaření piva je voda měkká (Wunderlich & Back 2009; Eumann & Schaeberle 2016).

Proces vaření piva je energeticky náročný a používá velké objemy vody. Pivovarnictví zahrnuje řadu dávkových operací během zpracování surovin na finální výrobek. Voda se využívá jak k samotné výrobě, tak k mytí, čištění a sterilizaci jednotek po dokončení každé fáze. Velké množství této vody je vypouštěno do kanalizace. Typický pivovar nejvíce vody spotřebuje ve varně, sklepích a na balírně (Olajire 2020).

3.2.2 Sladovnický ječmen

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je primární surovinou pivovarnictví a je upřednostňován před jinými možnými zdroji škrobu hlavně díky obsahu enzymů a obalu, který pokrývá zrna chránící embryo a později pomáhá při pivovarské filtraci (Tricase et al. 2018). Všechny alternativní zdroje škrobu mohou ovlivňovat barvu, zakalení a chuť piva. Ječmen obsahuje 80 až 88 % sušiny a 12 až 20 % vody. Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky. Skupinu organických látek v zrně ječmene představují především sacharidy, které tvoří asi 80 % hmotnosti ječného zrna. Nejvíce zastoupenou jednotlivou složkou je škrob, což je zásobní rostlinný polysacharid tvořený α -amylosou a amylopektinem.

Počasi přirozeně ovlivňuje mikrobiální komunitu rostoucí na ječmeni a zejména neobvykle vlhké roky mohou podpořit jejich růst a patogenezí (Noots et al. 1998). Po sklizni může být ječmen skladován pouze po určitou dobu před sladováním, aby byl překonán vegetační klid. Během této doby mikroorganismy nadále rostou a interagují s živým zrnem a podmínky musí být pečlivě sledovány, aby se zajistilo, že zrna je skladována v prostředí s nízkou vlhkostí, aby se minimalizoval mikrobiální růst (Petters et al. 1988).

Požadovaná vysoká kvalita ječmene je specifikována několika parametry, jako je klíčivost, obsah bílkovin, třídění (velikost jader), obsah vody, jaderní abnormality a infestace. Proto je před příjmem ječmene nezbytná kontrola jeho kvality. Hodnocení zrna zahrnuje jak vizuální, tak laboratorní hodnocení a každá dodávka by měla být před vyložením zkontrolována. Celosvětově se ječmen používá nejvíce pro sladovnické účely a to, jak již bylo zmíněno, především pro pivovarnický průmysl. V posledních letech však roste zájem o začlenění ječmene do lidské stravy, protože je zdravý, snadno dostupný a relativně levný (Gupta et al. 2010).

3.2.3 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus Lupulus* L.) je rostlina čeledi *Cannabaceae* a jeho samčí květy (běžně známé jako chmelové šišky) jsou v pivovarnictví zodpovědné za charakteristickou chuť, vůni a hořkost piva. Chmel a jeho složky jsou při výrobě piva považovány za nezbytné a jsou zodpovědné za jeho odlišnost od všech ostatních sycených nápojů. Je tedy v pivovarnictví nepostradatelnou surovinou (Zanoli & Zavatti 2008).

Obsah vody v chmelových hlávkách po sklizni bývá 72 až 82 % a sušením se musí snížit až na 8 %. Po dosušení se chmel skladuje a během toho přijímá vzdušnou vlhkost, a tím zvyšuje obsah vody asi na 11 %. Poté se třídí, lisuje do žoků a odesílá buď k dalšímu zpracování, nebo přímo do pivovarů. Nicméně v přirozené podobě se chmel v současnosti skoro nepoužívá. Téměř veškeré pivo je ošetřeno buď ve formě sušeného (dehydratovaného) chmele, prášku, pelet a jiných chmelových produktů jako jsou extrakty a éterické oleje (Almaguer et al. 2014). Existuje několik způsobů, jak přidat chmel do nápoje. Může být přidán najednou nebo v různých časech během varu, a tím dodat pivu chuť a také antimikrobiální vlastnosti (Jaskula et al. 2008).

Nejdůležitějšími složkami chmele pro vaření piva jsou alfa a beta kyseliny, což jsou chmelové pryskyřice zodpovědné za hořkost piva a antimikrobiální účinky a dále esenciální oleje, ty zase za aroma. Dalšími složkami jsou například polyfenoly, které zabraňují procesům stárnutí piva a dodávají pivu drsnější hořkost až svíravost (Cattoor et al. 2013).

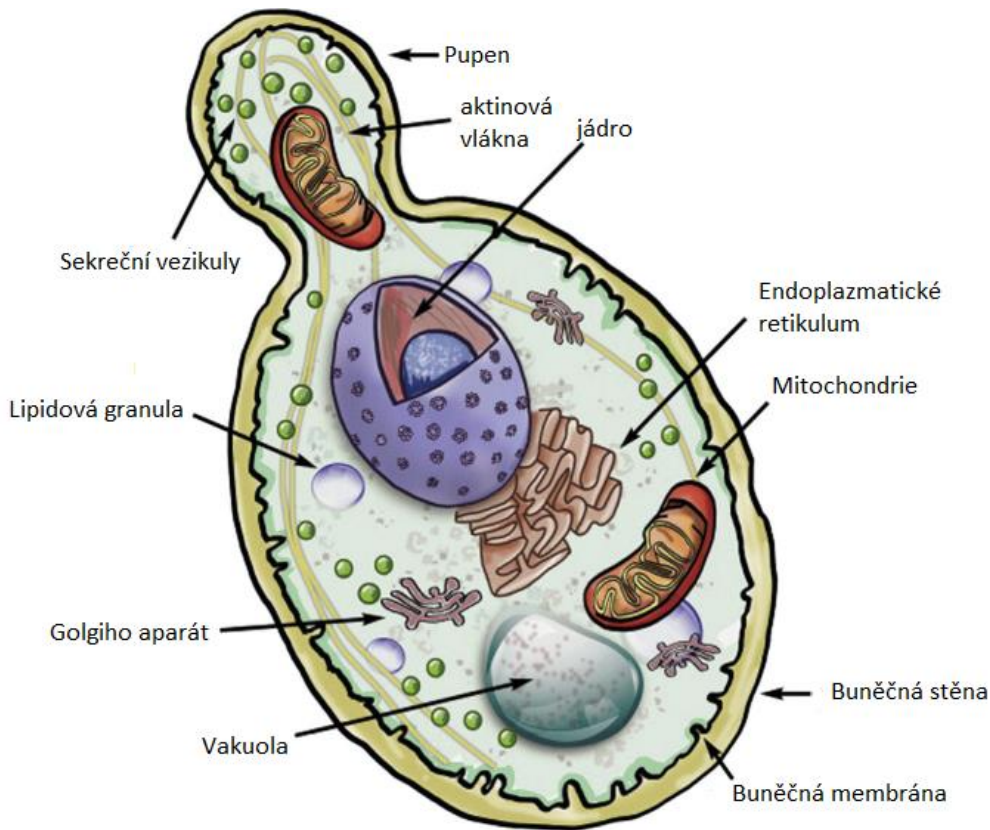
Sakamoto et al. (2001) udávají, že přítomnost chmele v pivech působí jako antimikrobiální konzervant a bylo popsáno jeho působení proti grampozitivním bakteriálním rodům, jako jsou *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* a *Pediococcus*.

3.2.4 Pivovarské kvasinky

Kvasnice jsou nejdůležitější součástí procesu pivovarského kvašení. Přeměňují cukr na alkohol, oxid uhličitý a další sloučeniny, které ovlivňují chuť a vůni piva (Speers & Forbes 2015). Podle některých vědeckých klasifikací jsou všechny pivní kmeny kvasinek zařazeny do rodu *Saccharomyces* a druhu *cerevisiae*. Většina organismů v říši hub jsou mnohobuněčné; kvasinky jsou však jednobuněčný organismus. Existuje několik používaných taxonomických variant. Nejvhodnější označení pro druh spodních pivovarských kvasinek je *Saccharomyces uvarum* a *Saccharomyces carlsbergensis* a pro svrchní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Speers & Forbes 2015).

3.2.4.1 Morfologie pivovarských kvasinek

Kvasinková buňka měří asi 5-10 μm v průměru a je obvykle kulovitého, válcovitého nebo oválného tvaru. Vyskytují se jednotlivě, v párech nebo řetězcích (Speers & Forbes 2015). Stejně jako jiné živé buňky se i kvasinky skládají převážně z vody. Kvasinková buňka dále obsahuje typické organely jiných eukaryotických buněk (obr.1).



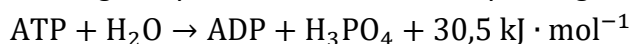
Obr. 1: Morfologické znázornění stavby kvasinky (převzato od Speers & Forbes 2015, upraveno).

Metabolismus kvasinek je z pivovarského hlediska hlavně přeměnou zkvasitelných cukrů na alkohol a oxid uhličitý, za účasti enzymů a koenzymů. Je ovlivňován složením mladiny, vlastnostmi kvasnic a podmínkami procesu.

Kvasinky dávají přednost především jednoduchým cukrům (glukóze a fruktóze), jelikož tyto dva cukry mohou vstoupit do buněk facilitovanou (pasivní) difuzí. Sacharóza, která se skládá ze propojených molekul glukózy a fruktózy nemůže procházet plazmovou membránou. Hydrolyzuje se tedy na dvě složky enzymem invertáza a tyto dva jednoduché cukry pak mohou snadno vstoupit do buňky. Sladový cukr neboli maltóza, který se skládá ze dvou propojených glukózových jednotek, vyžaduje pro transport přes membránu energii. Enzym maltáza (α -glukosidáza) je syntetizován buňkou za účelem hydrolyzování maltózy uvnitř buňky na jednotlivé glukózové jednotky, které pak buňka může využít. Maltotrióza, která se skládá ze tří propojených glukózových jednotek, je pro buňku kvasinky ještě obtížněji využitelná. Pokud jsou kvasinky ve stresu, často cukr nevstřebávají, což vede k tomu, že tento cukr zůstává v mladině. Pro metabolismus kvasinek je kromě sacharidů významná celá řada dalších zdrojů výživy. Jedná se o aminokyseliny, peptidy, lipidy, vitaminy, ionty Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ a další (Russell 2016).

Glykolýza cukrů

Jednoduché cukry jsou v buňce přeměněny na fruktosu-6-fosfát, který vstupuje do metabolické dráhy glykolýzy cukrů. Cílem glykolýzy je získání stavebních kamenů pro buněčnou syntézu a získání energie. Energie se získává v podobě adenosintrifosfátu – ATP. Tato látka je chemickým energetickým akumulátorem buňky. Energie se uvolňuje při reakci:

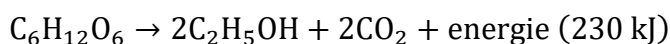


Klíčovým meziproduktem glykolýzy je pyruvát, od něhož může metabolická dráha postupovat dvěma rozdílnými směry.

V aerobním prostředí pokračuje metabolismus citrátovým cyklem. Odbourávání uhlovodíkového řetězce může být dotaženo až do CO_2 .



Pivovarsky nejvýznamnější částí metabolismu kvasinek je přeměna pyruvátu na alkohol. Kvašení probíhá za anaerobních podmínek podle rovnice (Gay – Lussac):



Změnu metabolismu kvasinek při přechodu z anaerobní do aerobní fáze popsal poprvé Louis Pasteur. Zjistil, že kyslík potlačuje produkci alkoholu a zvyšuje produkci oxidu uhličitého a biomasy. Tento efekt se nazývá Pasteurův efekt (Kosař & Procházka 2000).

3.2.4.2 Kvasinky svrchního kvašení

Svrchně kvašená piva (Ale piva) představují jen malé procento z celkové spotřeby piva. Patří mezi ně například ejl, strout, pšeničné pivo atd. Jsou velmi běžná ve Velké Británii, Německu, Kanadě, Spojených státech a v neposlední řadě v Belgii. Při fermentaci se používá svrchní kvasnicový kmen *Saccharomyces cerevisiae*, který je využitý při vyšších teplotách než u spodního kvašení, a to v rozmezí 16–24 °C, takže kvašení je rychlejší, obvykle 3-8 dní. Ke konci kvašení stoupají kvasinky na povrch piva, jelikož zachycují oxid uhličitý (CO_2) a jsou jím nadnášeny. Kvasinky se poté odstraní buď odsáváním nebo odstředěním. Svrchně kvašená piva jsou více ovocná, zatímco při spodním kvašení se produkují piva čistší s částečně sirnatou vůní (Pavslar & Buiatti 2009).

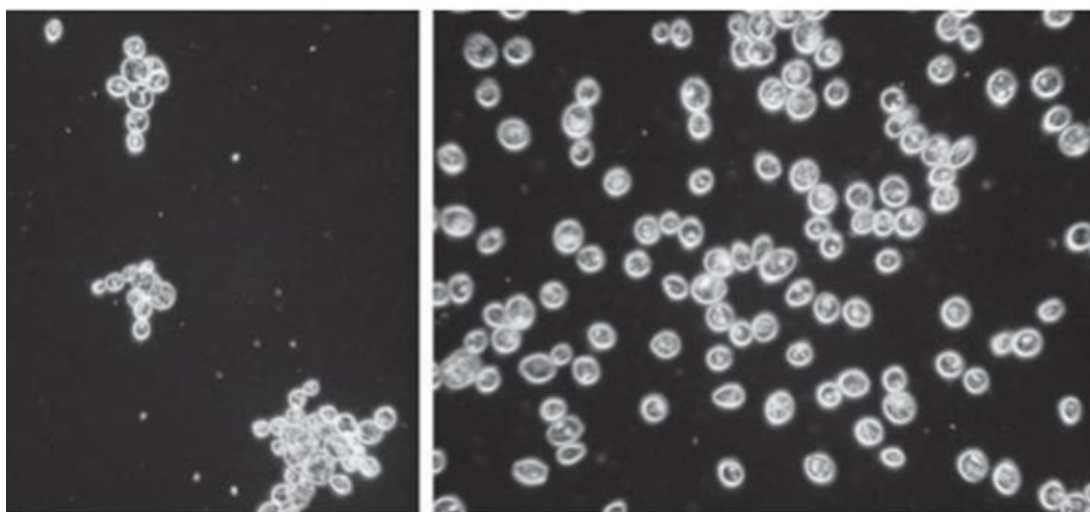
3.2.4.3 Kvasinky spodního kvašení

U těchto kvasinek je klasifikace složitější. Zdá se, že vývoj spodních kvasinek je výsledkem hybridizace mezi kvasinkou *Sacharomyces cerevisiae* a další kvasinkou z kmene *Sacharomyces* (tím druhým původcem může být *Sacharomyces monacensis* nebo *Sacharomyces bayanus*). *Sacharomyces monacensis* se používá jako synonymum pro *Sacharomyces pastorianus*, takže ležácké kvasinky jsou v současné době klasifikovány jako *Sacharomyces pastorianus* (Meusdoerffer 2009). Díky nižším teplotám (8-15 °C) probíhá kvašení déle než u svrchních kvasinek, obvykle 7-12 dní. Kvasinky poté klesají ke dnu a vytváří zakalenou hmotu na dně nádoby.

Kvasnice obvykle při této teplotě procházejí primárním kvašením. Po primárním kvašení je pivo skladováno v chladných podmínkách, aby došlo ke zrání a zlepšení jeho sensorických vlastností. Poté následuje dlouhá fáze sekundárního kvašení při teplotách mezi -1 °C až +4 °C. Po fermentaci je pivo vysoce zakalené kvůli přítomnosti zbytkových kvasinek a koloidního zákalu. Existují různé techniky, jak se zákalu zbavit jako je filtrace, gravitační sedimentace nebo centrifugace. Ale pouze filtrace je schopna docílit takové průzračnosti piva, jaká je požadovaná na trhu a dále také docílit stability piva na mnohem delší dobu (Pavslar & Buiatti 2009).

Spodním kvašením jsou vyráběny celosvětově nejoblíbenější ležácká piva. Jedinečný typ českého ležáckého piva se tradičně vyrábí z ječného sladu, vysoce kvalitního Žateckého chmele (s vysokým obsahem polyfenolických sloučenin) společně s použitím rmutování dekokční metodou, spodního kvašení a dlouhého studeného zrání neboli ležáctví (Lorencová et al. 2019).

Morfologické rozdíly mezi svrchními a ležáckými kvasinkami jsou malé. Pod mikroskopem, lze oba druhy kvasinek rozlišit, pouze podle jejich schopností se shlukovat. Toto rozlišení je znázorněno na obrázku 2. Kvasinky ležáků se oddělují velmi brzy po pučení a buňka mateřská a dceřiná pak znovu pučí. Výsledkem jsou jednotlivé buňky nebo dvojice buněk. Buňky svrchně fermentujících kvasinek při dalším pučení stále drží pohromadě a tvoří shluky (Meussdoerffer 2009).



Obr. 2: Spodně kvašené kvasinky (vlevo) a svrchně kvašené kvasinky (vpravo) (převzato od Meussdoerffer 2009).

3.2.4.4 Uchovávání a ošetření kvasnic

Opakované používání násadních pivovarských kvasnic s sebou přináší nutnost jejich skladování za vhodných podmínek. Podmínky skladování by měly zajistit zachování viability (životaschopnosti) kvasnic a zároveň zabránit jejich kontaminaci. Skladování kvasnic je pro kvasničné buňky obdobím hladovění a mělo by tedy být co nejkratší (Kopecká et al. 2017).

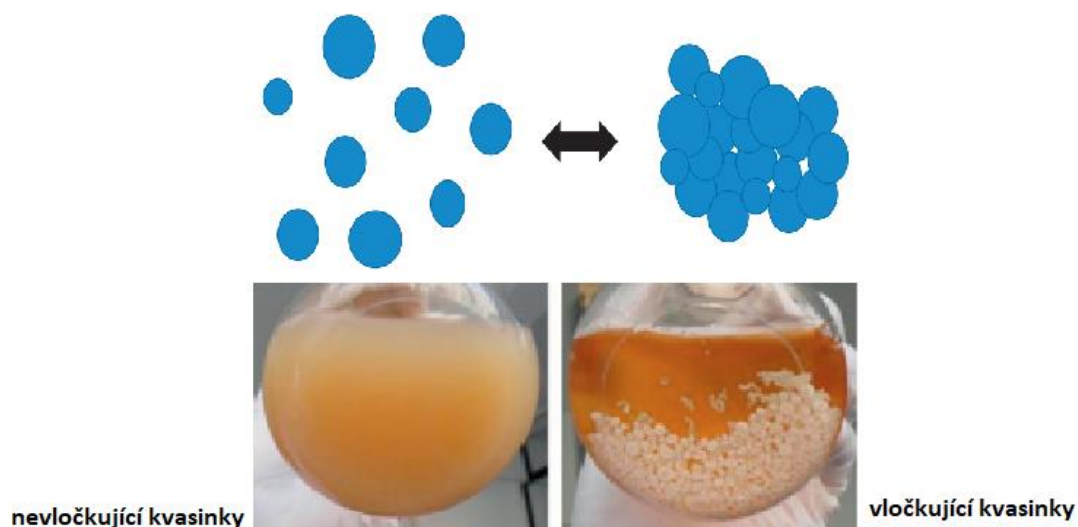
Součástí spilky je místnost pro uchovávání kvasnic tzv. kvasničárna, ve které jsou skladovány a ošetřovány násadní kvasnice. Na veškeré zařízení v této místnosti jsou kladeny vysoké hygienické nároky. V místnosti je udržována nízká teplota pod 5 °C, optimální teplota skladovaných kvasnic je 0 až 2 °C. Počet a velikost zásobníků na kvasnice musí být též v souladu s počtem vedených kmenů, výkonem varny a používanou technologií (zákvasná dávka, způsob sběru kvasnic, jejich ošetřování). Obvyklou výbavou kvasničáren je přívod ledové vody, zařízení na zakvašování a síto. Dnešní moderní síta jsou uzavřena do pouzdra, takže není možný kontakt s okolní atmosférou. To snižuje riziko mikrobiologické kontaminace. Výjimkou zůstává mytí kvasnic vodou nebo kyselinami, například v pivovarech, které opakovaně používají svrchně kvašené kvasnice po velmi dlouhou dobu. Mytí kvasnic kyselinou poté snižuje mikrobiologická rizika (Meussdoerffer 2009).

3.2.4.5 Míchání a vločkování kvasnic

Pro zajištění homogenity kvasnic během jejich skladování je používáno různých systémů promíchávání. Buňky ve stacionární fázi růstu jsou mnohem méně citlivé k mechanickému stresu. Obecně platí, že mechanické poškození kvasnic během míchání je dáno nikoliv délkou a intenzitou míchání, ale spíše aktuálním fyziologickým stavem kvasnic a pH prostředí. Odolnost buněk vůči mechanickému poškození a jiným stresům může být i kmenově specifická. Mírné promíchávání kvasnic během jejich skladování zabraňuje výskytu tzv. hot spots – míst s vyšší teplotou, způsobenou metabolickou aktivitou buněk. Nadměrné míchání sebraných kvasnic, však může během následujícího kvašení vést k prodloužení LAG fáze, nízkému prokvašení a k uvolňování buněčného materiálu, který negativně ovlivňuje čírost piva a stabilitu pěny.

Byl sledován i vliv rotační rychlosti míchání na fermentační schopnost svrchních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Se stoupající rotační rychlostí docházelo ke snižování životaschopnosti, vyššímu zákalu piva, snížení stability pivní pěny, zvýšení pH piva a mechanickému poškození buněk (Kopecká et al. 2017).

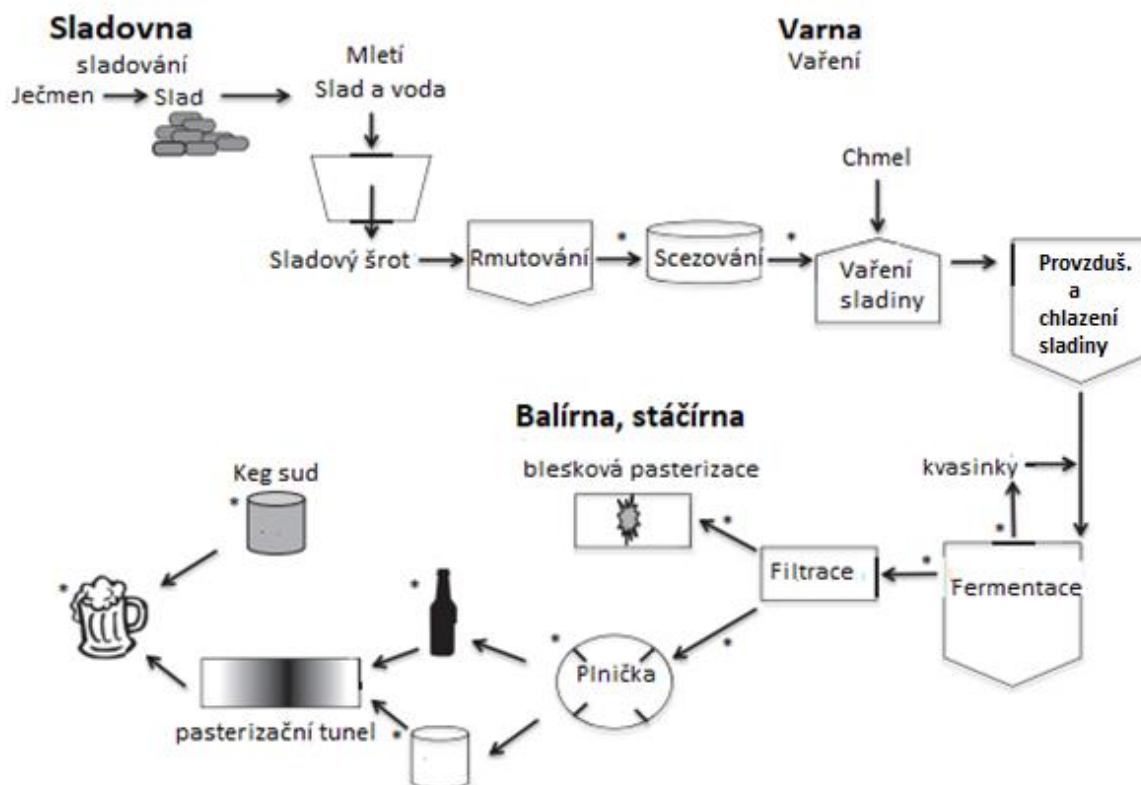
Dále může probíhat vločkování kvasinek, což je nepohlavní proces, při kterém se kvasinkové buňky spojují a vytvářejí shluky. Objevuje se spontánně na konci kvašení a je řízen geneticky. Pokud kmen kvasinek nemá příslušné geny, nikdy nebude schopen vločkování. Na konci kvašení je vždy nutné oddělit kvasnice od mladého piva. Pokud kvasinky tvoří vločky, je tento proces mnohem jednodušší, bez ohledu na to, zda shluky klesají na dno nebo stoupají na povrch (Guizani & Mothershaw 2005). Tento proces může být pozitivní i negativní. Pokud se kvasinky usadí příliš brzy, nezůstává aktivní dostatek buněk kvasinek ke snížení diacetylu. Pokud je vločkování příliš slabé a mnoho kvasinkových buněk zůstává v suspenzi, může dojít i po filtraci k problémům se zákalem (Meussdoerffer 2009). Proces vločkování kvasinek je znázorněn na obr 3.



Obr.3: Proces vločkování kvasinek (Převzato od Guizani & Mothershaw 2005, upraveno).

3.3 Proces výroby piva

Výroba piva zahrnuje sladovnictví a pivovarnictví. Jedná se o hodnotový řetězec, který je znázorněn na obrázku č. 4 a v němž každý krok ovlivňuje kvalitativní vlastnosti výsledného piva (Wunderlich & Back 2009).



Obr.4: Schéma procesu výroby piva (převzato od Hill 2015, upraveno).

3.3.1 Sladovnictví

Sladovnictví je definováno jako řízená klíčivost obilovin, aby byly zajištěny dané fyzikální a biochemické změny v zrnech, která jsou poté stabilizována sušením (Gupta et al. 2010). Cílem sladování je přeměnit ječmen na slad bohatý na enzymy a extrakt, a to za minimálních nákladů a ztrát. Vzniká tzv. zelený slad. Proces sladování se skládá ze tří základních kroků-máčení, klíčení a hvozdění ječmene, jako dostupného zdroje sacharidů (škrobu) a enzymů pro vaření piva (Parker & Bri 2012). Tomuto rozdělení pak odpovídají i tradiční názvy jednotlivých technologických úseků-máčírna, klíčírna a hvozdý (Kosař & Procházka 2000).

Vzhledem k tomu, že sladovny nejsou často v blízkosti pivovaru, provádí se hromadná přeprava sladu, která může být také jedním z kritických bodů. V pivovaru je poté nutné slad přemístit do vhodného skladu a před použitím zrna očistit. Možné kovové úlomky se odstraňují magnetem. Cizí semena, kameny, dřevo, klíčky a volné slupky se odstraní pomocí síta, odsávače nebo cyklonových separátorů (Ingledew & Hysert 1994).

Slad je zdrojem amyláz, což jsou enzymy rozkládající škrob v ječmeni, doplňkových zrnech a vytvářejí jednodušší cukry, jako zdroj energie pro kvasinky, které se metabolizují během kvašení piva (Wolf-Hall 2007).

3.3.1.1 Výroba sladu

První hlavní fází výroby sladu je máčení. Cílem máčení je zvýšit řízeným způsobem obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna, dále při únosné spotřebě vody odstranit splavky a lehké nečistoty, umýt zrna a ze zrna vyloučit nežádoucí látky. Máčení dnes považujeme za nejdůležitější úsek výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě (Kosař & Procházka 2000). Zrna ječmene se nejprve namočí do provzdušňované vody při 10-15 °C a poté se 3-7 dní máčí při teplotě 15-20 °C. Během této doby se obsah vlhkosti zvyšuje přibližně na 45 % (Harrison & Albanese 2019.).

Počáteční ponoření ječmene může být alespoň částečně použito jako čisticí operace s odstraněním nečistot a rozpuštěním některých nežádoucích složek obilí, které by mohly ovlivnit pивní chuť (Schwarz & Li 2011). Při máčení se mikrobiální buňky na zrně rychle množí a jsou stimulovány rozpuštěnými živinami, vlhkostí, teplem a provzdušňováním (Parker & Bri 2012).

Druhá hlavní fáze se nazývá klíčení. Jehož cílem je aktivace a syntéza enzymů a docílení požadovaného rozluštění (vnitřní přeměny) zrna při minimálních nákladech a únosných sladovacích ztrátách. Jakmile zrna začne klíčit, aktivují se enzymy, které rozkládají buněčné stěny kolem škrobu a zrna začíná růst, čímž vznikají kořínky a výhonky. Nepochybně nejdůležitějšími enzymy sladu jsou amylasy. Konkrétně α -amylasa a β -amylasa. Výsledkem kvašení je tzv. zelený slad (Kosař & Procházka 2000; Parker & Bri 2012).

Třetí a závěrečnou fází je hvozdění. Zelený slad je na hvozdě nejprve předsušen při teplotě do 60 °C, následně pak vyhrát a dotažen při teplotách od 80 do 105°C. Cílem hvozdění je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu, zastavit

životní a lušticí pochody v zrně a vytvořit aromatické a barevné látky, charakteristické pro druhy sladu za minimálních nákladů a ztrát (Kosař & Procházka 2000). Fáze hvozďení je nejdůležitějším kontrolním bodem pro tvorbu chuti, kde je rozhodující teplota, čas a vlhkost. Pouze malé změny relativní vlhkosti, dosažené pečlivou kontrolou recirkulace vzduchu, mohou změnit chuť sladů a poté výslednou chuť piva (Meilgaard 2001). Se zvyšující se teplotou vzniká ve sladu více chutí, vůní a barev. Během hvozďení nebo pražení může vzniknout obrovská škála různých druhů sladu s různou barevností a intenzitou chuti (Betancur et al. 2020). Se zvyšující se teplotou také dochází k neenzymatickým hnědnoucím reakcím, jako jsou maillardovy reakce, karamelizace a pyrolýza.

Speciální slady vyráběné nižšími stupni ohřevu, jako je například tzv. křišťálový slad má poté sladkou, ovocnou až karamelovou chuť a dodává pivu oranžovo/hnědou barvu (Parker 2012).

3.3.1.2 Mletí sladu

Než slad přejde do procesu rmutování je nutné ho umlít. Předtím se ze sladu odstraní případné zbylé nečistoty, aby se předešlo poškození mlecího válce. Mletí zvyšuje reaktivní plochu pro enzymy, takže sladové přísady se snadněji rozpouštějí. Kvalita mletí má vliv na rmutování a scezování, a tím i na kvalitu výsledného piva (Briggs et al. 2004). Mletí je důležitou fází vaření, protože ovlivňuje pozdější etapy procesu výroby (např. výroba cukrů, rychlost separace mladiny) a tím i kvalitu konečného produktu (Mousia 2004).

3.3.1.3 Vystírání sladu

Během fáze mletí se většina nerozpustných, nefermentovatelných sacharidů a bílkovin hydrolyzovala na rozpustné, fermentovatelné materiály pomocí enzymů přítomných ve sladu. Poté se již mletý slad nejprve smísí s vodou a umístí se do tzv. vystírací kádě. Pro zvýšení účinku amylázy během počátečního mačkáčského období je udržována teplota směsi mezi 40 a 50 °C (Harrison 2019).

3.3.1.4 Rmutování sladu

Základním požadavkem všech rmutovacích postupů je převést do roztoku veškerý škrob i vhodný podíl bílkovin a dalších látek. Štěpení škrobu probíhá ve třech stupních při působení fyzikálně-chemických a enzymových procesů. Mluvíme o mazovatění, ztekucení a zcukření (Kosař & Procházka 2000). Ve fázi rmutování se škrob rozkládá sladovými enzymy na jednodušší cukry, které poté mohou kvasinky využít a zkvasit. Ječný slad obsahuje dostatek enzymů na přeměnu škrobu, proteinů i glukanů. Také má vnější plášť nebo slupku, která při vaření piva funguje jako filtrační lůžko (Parker & Bri 2012). Hlavními enzymy hydrolyzujícími škrob ve sladu jsou α -amyláza a β -amyláza (De Schepper 2021). Účinek těchto enzymů je závislý především na teplotě, pH a době působení. Aktivita enzymů stoupá s teplotou až do určité, pro každý enzym specifické hodnoty. Odrmutované dílo lze popsat jako hustou suspenzi mláta ve vodném roztoku extraktivních látek, tj. ve sladině (Kosař & Procházka 2000).

3.3.2 Scezování sladiny

Scezování je separace, která slouží k oddělení sloučenin sladu rozpuštěných při rmutování od nerozpustných částí (např. slupka) a získat tak čirou kapalinu. V pivovarství se obvykle ke scezování využívá pouze hydrostatického tlaku. Teplota během scezování je důležitá, jelikož se zvyšující se teplotou klesá viskozita a proces scezování je urychlen. Teploty nad 80 °C jsou však nepříznivé, jelikož dochází k inaktivaci α -amylázy a nerozpuštěný škrob poté nemůže být štěpen (Wunderlich & Back 2009).

Scezování je na rozdíl od rmutovacího procesu převážně fyzikálním procesem, který probíhá ve dvou fázích: scezování předku a vyslazování mláta. V první fázi scezování se s využitím filtrační vrstvy mláta oddělí hlavní podíl v suspenzi zadržené sladiny, tj. předku. Ve druhé fázi se poté mláto promyje horkou vodou. Promytím, v pivovarské terminologii se používá termín vyslazení, se získá zředěná sladina zvaná výstřelky. Získaný objem sladiny pohromadě se dále zpracuje při chmelovaru. Mláto oddělené při scezování se využívá jako zkrmitelný odpad (Kosař & Procházka 2000).

3.3.3 Chmelovar

Sladina získaná scezováním se v mladinové pánvi vaří s chmelem po dobu 90–120 minut a výsledným produktem je horká mladina. Hořká chuť se do piva dostává právě při varu z chmele nebo chmelových extraktů. Po přidání chmele k vroucí sladině se chmelové α -kyseliny tepelně přemění na hořce chutnající iso- α -kyseliny izomerizační reakcí (Liu et al. 2015). Přidání chmele (*Humulus lupulus* L.) během procesu vaření navíc představuje překážku pro mikrobiální růst, protože některé sloučeniny pocházejících z chmele jsou antimikrobiálně aktivní (Schurr et al. 2015).

Chmelovar má několik funkcí: téměř všechny mikroorganismy, které zbyly po rmutování jsou usmrceny, dochází k inaktivaci enzymů a sterilizace mladiny, voda je odpařena a mladina je koncentrovaná, látky způsobující zakalení jsou vysráženy, klesá hodnota pH a narůstá barva, dále jsou odstraněny nežádoucí těkavé látky a zvýší se extrakce esenciálních olejů a pryskyřic z chmele. Mezi sloučeniny extrahované z chmele patří esenciální oleje humulon (α -hořká kyselina), lupulon (β -hořká kyselina) a tanin. Oleje humulon a lupulon poskytují pivu důležité chuťové vlastnosti a mají také antimikrobiální vlastnosti (Harrison & Albanese 2019).

Klasická varní souprava je tvořena sběračem sladiny a mladinovou pánví. Ohřev je zajištěn vnitřním nebo vnějším vařákem, u starších pánví parním duplikátorem ve dně a popřípadě též v části lubu pánve. Odloučení hrubých kalů je při tomto uspořádání zajištěno v samostatné vířivé kádi (Kosař & Procházka 2000).

Po ukončení varu je mladina přečerpávána kolem vnitřní strany nádoby zvané vířivá kád', dokud horký kal (bílkoviny) a použitý chmel nevytvoří sedimentační kužel uprostřed dna nádoby (Zarnkow 2014). Mladina je poté oddělena z chmele, rychle se ochladí na teplotu potřebnou ke kvašení, což je 7-15 °C a umístí do fermentační nádoby. Spotřebovaný chmel lze použít jako hnojivo.

Mladinu je poté nutné ochladit pomocí výměníků tepla. Po vychladnutí se mladina také provzdušní neboli okyslíčí, aby mohl pokračovat dostatečný růst kvasinek. Deskové výměníky tepla používané v pivovarech jsou velmi účinné a hygienické. Mikrobiologická účinnost sanitace deskového chladiče se kontroluje pravidelným odběrem vzorků výplachové vody a studené mladiny (Harrison & Albanese 2019).

3.3.4 Kvašení mladiny

Kvašení (společně se zráním piva) patří mezi časově nejnáročnější kroky při výrobě piva. Konvenční proces kvašení se skládá ze dvou fází: hlavního kvašení (obvykle 5-8 dní) a zrání (obvykle 7-30 dní). Fáze kvašení začíná vychladnutím mladiny, která se přenesse do fermentoru a naočkuje se kvasinkami, které hrají zásadní roli při výrobě všech alkoholických nápojů. Naplnění fermentační nádoby mladinou se nazývá sběr mladiny. Poté dochází k přeměně fermentovatelných cukrů (např. glukózy, maltózy, maltotriózy) na ethanol a CO₂ spolu s produkcí dalších vedlejších metabolických produktů jako esterů, vyšších alkoholů, aldehydů, organických kyselin, které ovlivňují chuťový charakter piva (Kyselová & Brányik 2015).

Kvašení probíhá ve fermentační místnosti zvané spilka, která musí být hygienicky čistá, aby se snížily případné problémy s kontaminací. Také musí být větrána, aby se v ní nehromadil CO₂, který se vytváří při kvašení. CO₂ je těžší než vzduch, a proto se hromadí při zemi a také v kádích. Při obsahu 7 až 10 % CO₂ ve vzduchu, nastává akutní ohrožení života a nebezpečný je obsah CO₂ ve vzduchu od 3 %. Ventilátory musí proto odsávat vzduch nízko u podlahy. Celý prostor spilky a také samostatně veškeré kádě jsou chlazeny. Teplota ve spilkách se obvykle pohybuje mezi 5 až 10 °C. Nádoby určené na fermentaci mohou být ze skla, nerezové oceli, hliníku a dříve také ze dřeva. Nevýhodou ale bylo, že dřevěné kádě způsobují problémy při čištění a dezinfekci, které se u nádob vyrobených z jiných materiálů nevyskytují (Harrison & Albanese 2019).

3.3.5 Dokvašování piva

Cílem dokvašování piva je dosažení optimálních organoleptických vlastností, nasycení oxidem uhličitým a vyčeření. Z chemického pohledu je zrání piva odbouráním chuti mladého piva. Klesá obsah SO₂, thiolů (merkaptanů), acetaldehydu (pokles o 20 až 70 %), mastných kyselin (pokles o 20 až 40 %). Dochází ke změnám složení a nárůstu obsahu sensoricky aktivních esterů. Další důležitou skupinou reakcí jsou interakce polyfenolů a bílkovin, při kterých vznikají za účasti dalších látek nerozpustné komplexy. Nejprve je to chladový zákal, který se dalším stárnutím přeměňuje na stabilnější formu trvalého zákalu. Prostor, ve kterém probíhá dokvašení piva, se nazývá ležácký sklep. Sklep musí být větrán tak, aby se v něm nehromadil CO₂. Teplota je udržována na -2 až +3 °C.

Velmi důležité při dokvašování piva je čiření, které ovlivní průběh filtrace, pěnovost piva, chuť piva a koloidní stabilitu. Průběh čiření ovlivňuje charakter zákalu, teplotu, intenzitu a dobu dokvašování. Klasická technologie doporučuje dobu dokvašování u výčepních piv (10%) 21 dnů, u ležácků (12%) 70 dnů. Řada piv má své odlišné výrobní postupy, které stanovují dobu

ležení na potřebnou délku. Celková doba dokvašování proto může kolísat v rozmezí 1 až 10 týdnů (Kosař & Procházka 2000).

3.3.6 Filtrace piva

Účelem filtrace je zachovat pivo tak, aby dlouhodobě nedocházelo k žádným viditelným změnám a aby si pivo zachovalo svůj původní vzhled. Obecně platí, že filtrační kroky plní dvě role, a to odstranit usazené materiály jako jsou zbylé kvasničné buňky a bakterie, které se neoddelily sedimentací při skončení hlavního kvašení, a poté oddělit zákalotvorné částice (stabilizace).

Filtraci lze rozdělit na povrchovou a hloubkovou, a to v závislosti na místě pevné separace. Při povrchové filtraci se částice, které se mají oddělit, zadržují na povrchu aktivního média (filtračního materiálu). Naproti tomu, při hloubkové filtraci, probíhá separační proces uvnitř (v hloubce) filtračního materiálu. Filtrační materiály používané v pivovarnictví jsou práškové substance, a to křemelina na filtraci piva a perlity na filtraci sladiny (Meusdoerffer 2009).

3.3.7 Pasterace piva

Pasterace je mírná tepelná úprava, při které se pivo zahřívá na teplotu nižší než 100 °C. Používá se k minimalizaci zdravotních rizik způsobených patogenními mikroorganismy a k prodloužení trvanlivosti o několik dní až týdnů. Jsou způsobeny pouze malé změny sensorických a nutričních vlastností.

Aby bylo možno úroveň pasterace kvantifikovat, byla zavedena tzv. pasterační jednotka PJ (anglicky PU). Pasterační jednotka je definována jako pasterační účinek tepla působící při teplotě 60 °C přesně 1 minutu. V Evropě je se udává jako bezpečná hodnota 20 až 30 PJ. Vlastní pasterace se provádí v pastérech. V praxi se používají dva základní druhy pastérů, a to pastér průtokový a pastér tunelový (sprchový). Při tunelové pasterizaci lahve nebo plechovky, procházejí řadou vodních trysek aplikujících teplo, a při průtokové pasterizaci se pivo rychle zahřívá v deskovém výměníku tepla a zadržovací trubici před balením. Aplikace tepla může ovlivnit chuť piva mnoha způsoby, zejména pokud je hladina kyslíku v pivu vysoká. Nicméně, při správné praxi a s ohledem na kontrolu kvality, lze vyrábět vysoce kvalitní výrobek s minimálními změnami chuti a vysokým stupněm mikrobiální stability (Wray 2015).

3.3.8 Stáčení piva

Balení a distribuce piva představují dvě největší výzvy pro udržení mikrobiální stability piva. Během všech předchozích varních procesů, od varu mladiny, po úpravu za studena, jsou mladina a pivo uloženy ve vysoce čistitelných, bežešvých nádobách z nerezavějící oceli (za předpokladu, že jsou používána nejmodernější zařízení a hygienické postupy).

Po zabalení však produkt putuje po různých površích v plnicím zařízení, je krátce vystaven atmosféře a je rozložen do různých nádob. Biofilmy se mohou tvořit na povrchu

výplňových hlav a v oblastech plnění, což zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace (Bokulich & Bamforth 2013).

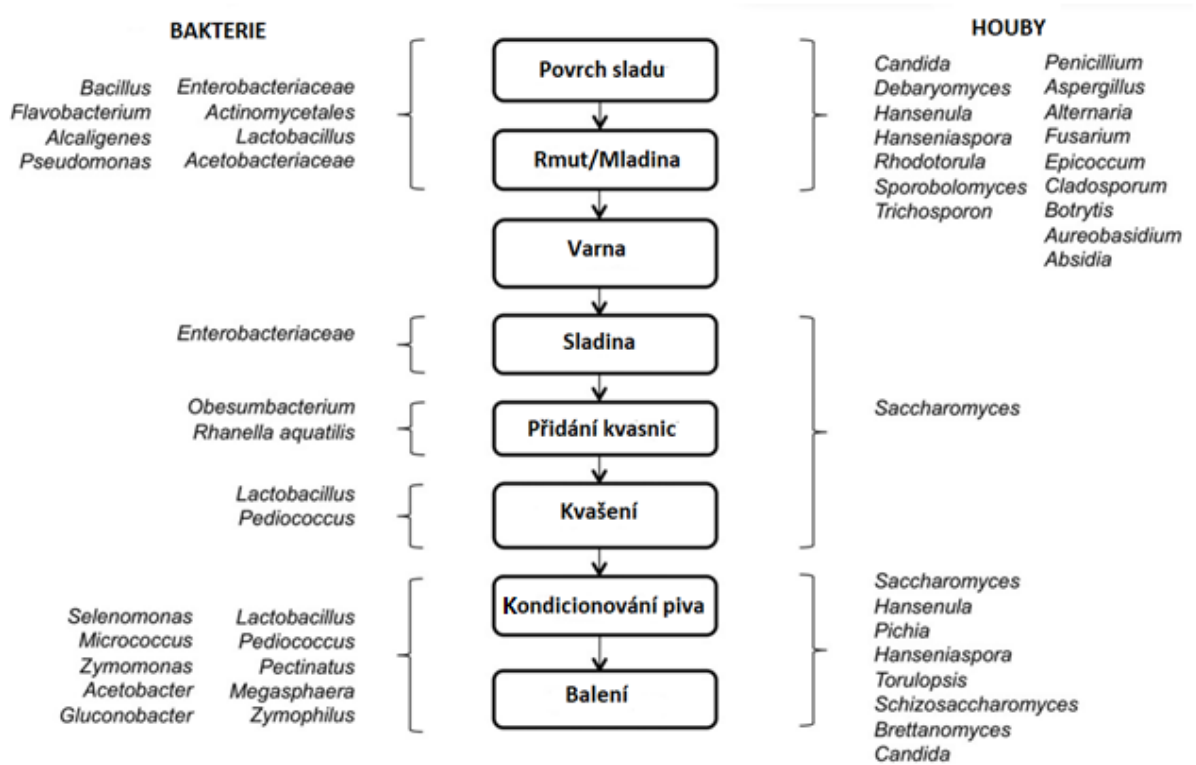
V dávné historii se v českých pivovarech používaly sudy dřevěné. V šedesátých letech byly dřevěné sudy nahrazeny sudy hliníkovými a v následujících pěti letech provedly všechny pivovary výměnu hliníkových sudů, za nerezové KEG sudy o obsahu 30 a 50 litrů. Mytí, plnění a vyprazdňování sudu se provádí přes uzávěr. V prvním kroku se sudy vyprázdňují a vyčistí vodou. Před plněním se sudy předtlakují oxidem uhličitým, aby se minimalizovalo zachycování kyslíku během plnění. S ohledem na dostatečné čištění a hygienu plnicího zařízení, je plnění sudu méně rizikovým.

Nejvyšší mikrobiální riziko u sudového piva se obvykle vyskytuje v místě prodeje (bary, restaurace), kde nevyhovující hygienický stav výčepního zařízení a málo vyškolený personál může být základní příčinou sekundární kontaminace. Mikrobiální infekce může prorůst špatně vyčištěnými hadicovými spoji zpět do sudu a vést ke zkažení obsahu (Hofmann & Fischer 2015). Sudy představují zvláštní riziko, jelikož se používají opakovaně a často kolují mezi různými pivovary. Při návratu sudů do pivovaru, mohou vznikat nepříznivé podmínky, včetně dlouhodobého vystavení vyšším teplotám a vzduchu – což z nich činí potenciální živnou půdu pro kolonizaci mikroorganismy (Bokulich & Bamforth 2013).

V současné době se v České republice podíl piva plněného do skleněných lahví nebo plechovek pohybuje mírně nad 50 %. Díky vysoké bariérové vlastnosti a mechanické pevnosti poskytuje sklo vynikající ochranu proti rozptylu plynů – kyslíku a CO₂ a také vůči mikrobiologické kontaminaci z vnějšího prostředí (Meussdoerffer 2009). Lahve musí být před opětovným naplněním vyčištěny, kdy účelem čištění je odstranění všech částic a tekutin z lahve. Čištění skleněných lahví se provádí aplikací žíravého roztoku s přibližně 2% koncentrací NaOH při teplotě přibližně 80°C. Po skončení čištění se lahve opláchnou pitnou vodou a ochladí na přibližně pokojovou teplotu. Tento krok je dalším mikrobiologickým kritickým bodem, proto se ke snížení rizika v oplachovacích zónách používá dezinfekce, například oxidem chloričitým nebo kyselinou peroctovou. Když očištěné láhve opustí pračku, jsou přeloženy do plnicího stroje. Zdrojem kontaminace piva během jeho plnění do obalů, mohou být dopravníkové pásy, zejména v případech, kdy nejsou zahrnuty do procesu sanitace linky. Doba a vzdálenost této přepravy, by proto měly být co nejkratší, aby se zabránilo kontaminaci mikroorganismy prouděním vzduchu nebo instalací nad přepravním pásem (Hofmann & Fischer 2015).

3.4 Mikrobiologická kontaminace piva

Mohou existovat miliony organismů, které kontaminují potraviny. Mikroorganismy odpovědné za kazivost piva, jsou však omezeny pouze na několik bakterií, „divokých“ kvasinek a plísní, které jsou znázorněny na obr. 5 v diagramu níže.



Obr. 5: Přehled bakteriálních a houbových druhů ve všech hlavních fázích výroby piva (převzato od Bokulich & Science 2013, upraveno).

Pivo má řadu vlastností, které brání mikrobiálnímu růstu, včetně nízkého pH, vysoké koncentrace alkoholu, nízké hladiny živin, antiseptického působení chmelových kyselin, nízké koncentrace kyslíku a karbonizace (Hill 2015). V takto selektivním prostředí piva, část mikroorganismů rychle odumírá. Část přežívá po více či méně dlouhou dobu a vyskytují se v pivu v latentní formě, aniž by jej jakýmkoliv způsobem ovlivňovaly. K těmto mikroorganismům náleží všechny tepelně rezistentní bakterie vytvářející endospory, zvláště rody *Bacillus* a *Clostridium*. Proto může být pivo velmi šetrně ošetřeno krátkodobým záhřevem nebo pasterací v lahvích. Také patogenní mikroorganismy jako jsou *Salmonellae typhimurium* a *Staphylococcus aureus* nemají v pivu žádnou možnost pomnožování a odumírají (při případné kontaminaci) v krátkém čase (Kosař & Procházka 2000; Sakamoto & Konings 2003).

Pivovarnický průmysl, jsou mikroorganismy kazící pivo problematické po celá staletí. Mikrobiální kontaminace se do pivovaru dostává především ze surovin, jako je slad nebo chmel, ale také vzduchem a vodou.

Dále prostřednictvím potrubí nebo ze špatně sterilovaných nádob, které se používají během pivovarského procesu. Prostřednictvím turbulence vzduchu ve stáčecí hale se poté zajišťuje jejich neustálý pohyb v prostředí haly. Zdrojem kontaminace piva, během jeho plnění do obalů, mohou být dopravníkové pásy, zejména v případech, kdy nejsou zahrnuty do procesu sanitace linky. Pivovar sám o sobě není sterilní prostředí. Výskyt cizích mikroorganismů v pivovaru, by však měl být minimalizován prostřednictvím vhodného designu pivovaru a čistícími postupy. Náchylnější k mikrobiálnímu napadení, jsou především piva nízkoalkoholická, nealkoholická a také nepasterizovaná. To hlavně z důvodu toho, že piva nízkoalkoholická a nealkoholická neobsahují alkohol, nebo ho obsahují jen ve velmi nízkých koncentracích. Během výroby takových piv poté mívají za následek vyšší obsah zkvasitelných cukrů v hotovém produktu, a tím vyšší náchylnost k napadení. U nepasterizovaných piv je to především kvůli absenci tepelného záhřevu a nebezpečí přežití mikroorganismů. Samotný proces vaření piva a konečný produkt, jsou pro mnoho mikroorganismů nehostinným prostředím. Existuje však několik vybraných mikroorganismů, které jsou schopny tomuto prostředí odolávat. Tyto mikroorganismy poté mohou způsobit nežádoucí chuť piva a ovlivňovat jeho celkovou kvalitu (Davies et al. 2015).

Mezi mikroorganismy kazící pivo patří bakterie mléčného kvašení a nejnebezpečnější pro pivovarnický průmysl jsou rody *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Stewart & Priest 2011). Druhou skupinou bakterií kazících pivo jsou striktně anaerobní gramnegativní bakterie. Mezi které patří rody *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymopilus* a *Selenomonas*.

Do skupiny gramnegativních bakterií dále patří bakterie kyseliny octové, tj. *Gluconobacter* a *Acetobacter* a nejrozšířenější bakterie kontaminující mladinu *enterobakterie*, zejména rod *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Obesumbacterium* a *Escherichia*. Tyto dva rody bakterií mohou zkazit pivo zákalem, kyselostí a produkcí nepříznivého zápachu, který je způsobený přítomností diacetylu nebo sirovořivku (Sakamoto & Konings 2003). Bakterií kontaminující pivo je mnohem větší množství a všechny rody jsou rozděleny na grampozitivní a gramnegativní a podle jejich tvaru níže v tabulce číslo 1.

Dále mohou pivo kontaminovat dvě skupiny hub. Tou první jsou houby vláknité neboli plísňe, které sice nejsou považovány za organismy primárně kazící pivo, ale i přesto mohou pivo kontaminovat, a to prostřednictvím růstu na surovinách (Hill 2015). Druhou skupinou jsou divoké kvasinky, které jsou v pivovarnictví definovány jako kvasinky, které nejsou záměrně používány a jsou proto přísně kontrolovány (Stewart & Priest 2011). Divoké kvasinky způsobují méně závažný problém s kažením než bakterie, ale i přes to jsou považovány za nepříjemnost pro pivovary a to hlavně proto, že je obtížné je během identifikace odlišit od kvasinek pivovarských (Sakamoto & Konings 2003).

Tab. 1: Zastoupení bakteriálních rodů kazící pivo (převzato z Hill 2015, upraveno).

	Tyčinky	Koky
Grampozitivní bakterie	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Pediococcus</i> spp.
	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. damnosus</i>
	<i>Lb. brevisimilis</i>	<i>P. dextrinicus</i>
	<i>Lb. buchneri</i>	<i>P. inopinatus</i>
	<i>Lb. casei</i>	
	<i>Lb. coryneformis</i>	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Lb. curvatus</i>	<i>M. kristinae</i>
	<i>Lb. lindneri</i>	
	<i>Lb. malefermentans</i>	
	<i>Lb. parabuchneri</i>	
	<i>Lb. plantarum</i>	
Gramnegativní bakterie	<i>Pectinatus</i> spp.	<i>Megasphaera</i> sp.
	<i>P. cerevisiiphilus</i>	<i>M. cerevisiae</i>
	<i>P. frisingensis</i>	
	<i>Selenomonas</i> sp.	<i>Zymomonas</i> sp.
	<i>S. lacticifex</i>	<i>Z. mobilis</i>
	<i>Zymophilus</i> sp.	
	<i>Z. raffinivorans</i>	

3.4.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou obecně grampozitivní, nesporulující, nerespirační bakterie, tyčinkovitého nebo kokového tvaru, které mají společné metabolické a fyziologické vlastnosti. Tyto bakterie produkují kyselinu mléčnou, jako hlavní metabolický produkt sacharidového kvašení (Lorenzo et al. 2018). Primární kontaminace mléčnými bakteriemi může značně poškodit sensorické vlastnosti piva produkcí nežádoucích sensorických látek již během jeho výroby. Sekundární neboli post-pasterizační kontaminace, poškozují finální výrobek tvorbou zákalu a negativně ovlivňuje jeho chuť a vůni (Back 2005).

BMK dělíme na homofermentativní, kde hlavním produktem jejich metabolismu je kyselina mléčná, a heterofermentativní, které produkují směs kyseliny mléčné, etanolu a oxidu uhličitýho. Bakterie mléčného kvašení mohou tvořit až 70 % veškeré kontaminace v pivovarnictví. Z mikroflóry nalezené v pivovaru jsou tyto bakterie nejobávanější, jelikož jsou obtížné z hlediska detekce, zotavení zkaženého piva a identifikace (Stewart & Priest 2011).

Bakterií mléčného kvašení objevených v pivu je velké množství. Nejčastěji se vyskytující druhy v pivovarnictví jsou *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* a *Pediococcus damnosus* (Munford et al. 2020).

BMK jsou v přírodě rozšířené a spojené především s rostlinnou hmotou (včetně ječmene a sladu). Jejich výskyt v pivovaru je tedy častý i nevyhnutelný a jejich rozsáhlý rozptýl ve sladovém prachu, aerosolech a zařízeních je nezpochybnitelný. Většina BMK se díky antibakteriálnímu působení sloučenin pocházejících z chmele v pivu obvykle nerozšiřuje.

Přehled druhů laktobacilů a pediokoků, které se mohou uplatnit jako kontaminanty piva, je uveden v tabulce č. 2. Ale ne všechny uvedené druhy mají schopnost pivo kazit – u mléčných bakterií je typický výskyt, jak kmenů kazících pivo, tak i kmenů nekazících. Jak bylo výše uvedeno, druhy *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* a *Pediococcus damnosus* patří mezi nejvíce rizikové a nejčastější kontaminanty hotového piva. *Lactobacillus brevis* je podle odhadů zodpovědný za přibližně více než 50 % případů mikrobiálního kažení piva (Sakamoto & Konings 2003). Druh *Pediococcus damnosus* se většinou vyskytuje v pivu při dokvácení, v jeho finálním stavu a méně často v kvasnicích. Druhy *Pediococcus inopinatus* a *Pediococcus pentosaceus* jsou detekovány zejména jako kontaminace kvasnic a jen zřídka v pivu (Priest 2003). Ostatní zástupci mléčných bakterií, jako je *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* nevykazují rezistenci vůči hořkým chmelovým látkám, a proto se v pivu běžně nemohou vyskytovat.

Avšak ty, které se přizpůsobily přísným podmínkám prostředí piva (konkrétně vyvinuly toleranci vůči chmelu), jsou nejrozšířenějšími kazícími mikroorganismy piva současnosti. Tyto mléčné bakterie vykazují silnou odolnost vůči chmelovým hořkým kyselinám, což je charakteristický rys, který není pozorován u dalších gram pozitivních bakterií. Chmelová rezistence BMK se považuje za souhrn několika odlišných mechanismů, které společně působí proti toxickým účinkům hořkých kyselin z chmele (Suzuki 2015).

BMK kazí pivo acidifikací, tvorbou oparu nebo produkcí diacetylu, který dává pivu intenzivní máslové aroma. Mnoho kmenů může také produkovat extracelulární polymerní látky (EPS) v pivu, způsobovat olejovitou konzistenci nebo v extrémních případech tvořit sliz.

I přes to, že jsou bakterie mléčného kvašení primárně nežádoucími kontaminanty piva, mohou být využívány k okyselování rmutů podle tradičních germánských pivovarnických postupů nebo společně s kvasinkami při výrobě kyselých piv, spontánně kvašeného piva Lambic, berlínského pšeničného piva a některých dalších belgických piv (Bokulich & Bamforth 2013).

Tab. 2 Kontaminace piva mléčnými bakteriemi (Tyakht et al. 2021).

Druh	škodlivost	Kontaminace
<i>L. acetotolerans</i>	NZ	NZ
<i>L. amylolyticus</i>	NZ	primární
<i>L. backii</i>	škodlivý- kazí pivo	NZ
<i>L. brevis</i>	škodlivý- kazí pivo, zkvašuje dextriny	většinou sekundární
<i>L. brevisismilis</i>	potencionálně škodlivý	většinou primární
<i>L. buchneri</i>	NZ	NZ
<i>L. casei</i>	potencionálně škodlivý, produkce diacetylu	NZ
<i>L. coryniformis</i>	potencionálně škodlivý, produkce diacetylu	většinou primární
<i>L. curvatus</i>	NZ	NZ
<i>L. delbrueckii</i>	NZ	primární
<i>L. fermentum</i>	NZ	NZ
<i>L. fructivorans</i>	NZ	NZ
<i>L. lindneri</i>	škodlivý- kazí pivo, obtížně kultivovaný	většinou primární
<i>L. malefermentans</i>	NZ	NZ
<i>L. parabuchneri</i>	NZ, izolován z kvasnic	NZ
<i>L. paracasei</i>	potencionálně škodlivý	NZ
<i>L. paracollinoides</i>	škodlivý- kazí pivo	NZ
<i>L. paraplantarum</i>	NZ	NZ
<i>L. paicuvorans</i>	NZ, typový kmen izolován z ležáckého tanku	NZ
<i>L. plantarum</i>	potencionálně škodlivý, produkce diacetylu	většinou sekundární
<i>P. acidilactici</i>	NZ	NZ
<i>P. claussenii</i>	NZ	NZ
<i>P. damnosus</i>	škodlivý- kazí pivo, kontaminace kvasnic, produkce diacetylu, tvorba exopolysacharidů	většinou primární
<i>P. dextrinicus</i>	NZ- kazí málo chmelená piva	NZ
<i>P. inopinatus</i>	potencionálně škodlivý, kontaminace kvasnic	většinou primární
<i>P. parvulus</i>	NZ	NZ
<i>P. pentosaceus</i>	potencionálně škodlivý, kontaminace kvasnic	většinou primární

- Škodlivý druh – většina kmenů kazí pivo; potenciálně škodlivý – některé kmeny kazí pivo
- Primární kontaminace – kvasnice, nefiltrované pivo, přetlačné tanky atd.
- Sekundární kontaminace – stáčírna lahví, kečů, plechovek atd.
- NZ – nedostatečně známo

3.4.1.1 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní, nesporotvorné bakterie obecně tyčinkovitého tvaru, mohou být však značně variabilní. Lze pozorovat i koky, které jsou často organizovány v řetězech. Dle Matoulkové (2014) se vyskytují většinou jednotlivě, tvorba řetězků je méně častá. Pouze některé druhy laktobacilů (např. *Lactobacillus brevis*) obsahují i v případě čistých kultur směs dlouhých a krátkých buněk.

Optimální růstová teplota je většinou mezi 30 a 40 °C, ačkoliv celková růstová teplota se může pohybovat od 2 do 53 °C; optimální pH pro růst je mezi 3 a 8. Obecně snášejí kyslík, ale rostou dobře i v anaerobních podmínkách. Produkují kyselinu mléčnou jako hlavní produkt kvašení z cukrů (Pot 2014). Délka buněk i jejich tvar jsou závislé na stáří kultury, složení kultivačního média, tenzi kyslíku apod.

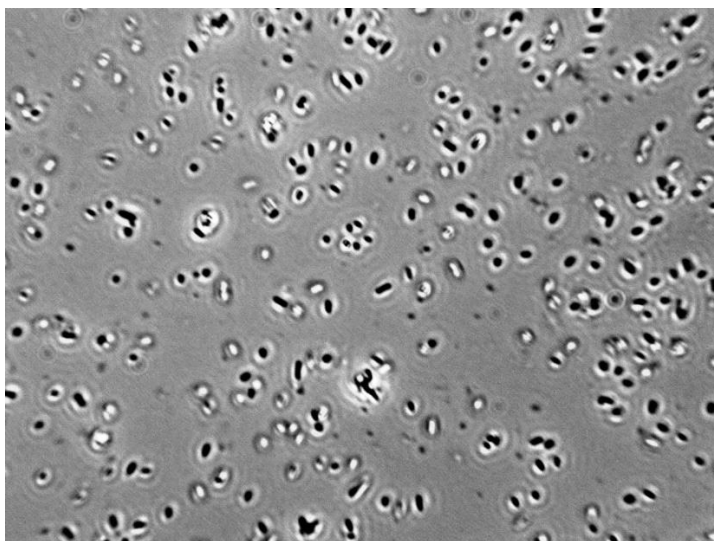
Na agarových plotnách vytvářejí laktobacily hladké, lesklé, zpravidla bílé až krémové kolonie s pravidelnými okraji, o průměru 2–5 mm. V tekutých médiích je růst zpravidla rovnoměrný v celém objemu. V kultivačním médiu vyžadují přítomnost zkrasitelných cukrů,

aminokyselin, peptidů, esterů mastných kyselin, solí, derivátů nukleových kyselin a vitamínů skupiny B (Matoulková 2015).

Lactobacillus brevis

Lactobacillus brevis je obligátní heterofermentativní bakterie tyčinkovitého tvaru se zaoblenými konci a je znázorněna na obrázku číslo 6. Vyskytuje se buď v oddělených nebo krátkých řetězcích. Díky tomu, že roste i při nízkém pH a tomu, že vyžaduje v prostředí nižší koncentraci kyslíku, se *Lactobacillus brevis* stává potenciálně jedním z nejvíce nežádoucích mikroorganismů kazící pivo (Teixeira 2014). Roste optimálně při teplotě 30 °C a pH 4–6. Je fyziologicky všestranný a díky schopnosti kvasit dextriny a škrob v pivovarnictví může způsobovat problémy (Sakamoto & Konings 2003).

Munford et al. (2020) mléčnou bakterii *Lactobacillus brevis* popisují jako nejčastěji detekovaný mikroorganismus v pivovarech a je také uznáván jako nejvíce znepokojující v důsledku smyslových změn konečného produktu. Společnými vlastnostmi *Lactobacillus brevis* je tvorba plynu, fermentace pentózy, melibiózy a také štěpení argininu. Tento nejběžnější pivní škůdce způsobuje zákal piva a sedimentů a také znatelnou redukci pH, což dodává pivu kyselou chuť. Diacetyl se však netvoří a často se jedná o sekundární kontaminaci (Meussdoerffer 2009).

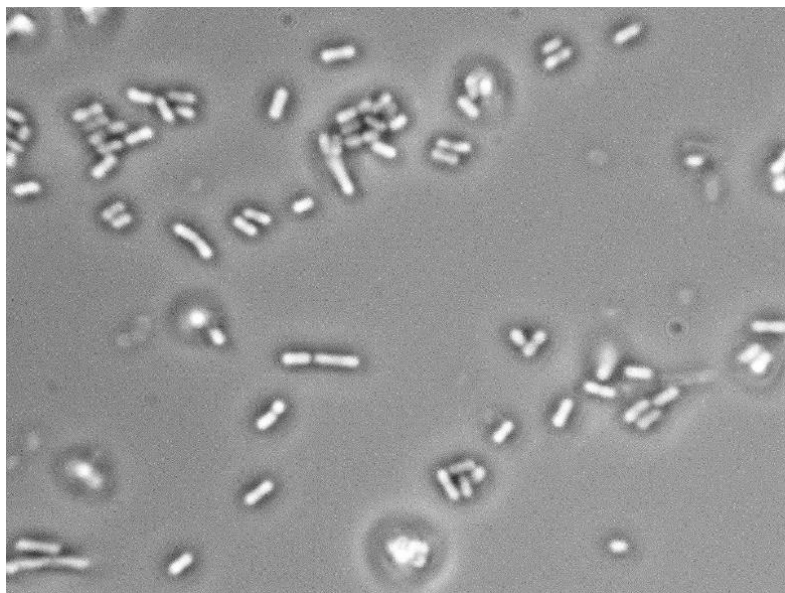


Obr. 6: *Lactobacillus brevis* (Převzato z <https://wineserver.ucdavis.edu/#/>)

Lactobacillus casei

Lactobacillus casei je grampozitivní, nesporulující bakterie produkující kyselinu mléčnou. Jedná se o tyčinky vyskytující se jednotlivě, v párech nebo v řetězcích, které jsou znázorněny na obrázku číslo 7 (Gobbetti 2014). *Lactobacillus casei* je udáván jako zdroj diacetylu.

I když diacetyl není primárním produktem metabolismu BMK, způsobuje v pivu silnější změnu chuti než kyselina mléčná. Příčinou je především to, že limit pro přítomnost diacetylu v pivu je mnohem nižší než u kyseliny mléčné (Munford et al. 2020). Diacetyl vzniká také při kvašení kvasinek a příliš vysoké množství vzniká tehdy, kdy kvasinky nejsou řádně odstraněny z mladého piva (Sakamoto & Konings 2003).



Obr 7: *Lactobacillus casei* (Převzato z <https://wineserver.ucdavis.edu/#/>)

3.4.1.2 Rod *Pediococcus*

Buňky rodu *Pediococcus* mají tvar koků, často uspořádaných v tetradách, popřípadě jednotlivě či ve dvojicích; nikdy v řetězcích. Občas jsou souhrnně označovány jako „mléčné koky“. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, anaerobní bakterie. Jsou homofermentativní, takže glukosu fermentují na kyselinu mléčnou, a to bez produkce plynu. Optimální teplota růstu je uváděna v rozmezí 25–35 °C, ale např. *Pediococcus damnosus* roste v rozmezí 8–30 °C, u druhu *Pediococcus acidilactici* je uváděno optimum okolo 40 °C s maximální teplotou růstu 50–53 °C. Optimální pH pro růst je cca 5,5, ale rozmezí je druhově i kmenově závislé.

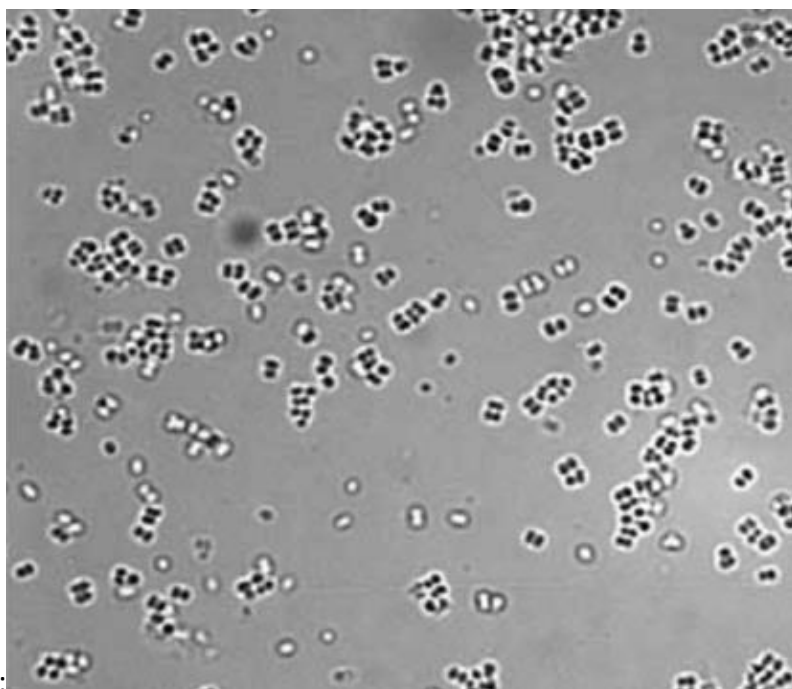
Pediokoky podobně jako laktobacily vyžadují pro svůj růst přítomnost jednoduchých cukrů, aminokyselin, peptidů, vitamínů, solí apod. Typickým zástupcem rodu *Pediococcus* je, dříve se často vyskytující v pivovarech, *Pediococcus damnosus*.

Zajímavostí u tohoto druhu je fakt, že jeho výskyt byl potvrzen v pivu, pivovarských kvasnicích, ale nikoliv v surovinách pro výrobu piva nebo na rostlinném materiálu. Dále se v pivovarském prostředí vyskytují druhy *Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus*, které jsou nacházeny i ve sladu a mohou růst během počátečních etap výroby sladiny, kdy je technologická teplota pod 50 °C. Výskyt pediokoků v této fázi výroby, však nemá negativní dopad na konečnou kvalitu piva (Matoulková 2015).

Pediococcus damnosus

Pediococcus damnosus je homofermentativní bakterie kulovitého tvaru viz obrázek 8. Suzuki (2015) uvádí, že pивní kontaminace, která je způsobená *Pediococcus damnosus* se vyznačuje tvorbou kyseliny a máslovou příchutí diacetylu.

Množství produkovaného diacetylu je vysoké a často znatelné i při nízké úrovni kontaminace. Tato bakterie mléčného kvašení, stejně jako rod *Lactobacillus*, je odolná vůči inhibičním látkám chmele. Některé kmeny tohoto druhu snášejí až 10 % (hmot./obj.) ethanolu (Harrison & Albanese 2019). *P. damnosus* se běžně vyskytuje jako kontaminant kvasnic a piva, ale nevyskytuje se v pivovarských surovinách, což naznačuje, že tento druh je velmi dobře přizpůsoben pivovarnickému prostředí. Neočekávané zvýšení hladiny diacetylu během procesu fermentace a zrání, je často způsobeno právě přítomností této bakterie. *P. damnosus* navíc údajně lpí na pivovarských kvasinkách a někdy indukuje předčasnou sedimentaci kvasinkových buněk, což vede ke zpomalení procesu fermentace (Priest & Cambell 2003).



Obr. 8: Mléčná bakterie *Pediococcus damnosus* (převzato od Matoulková 2015).

3.4.2 Enterobakterie

V pivovarském provozu se vyskytují zejména zástupci rodů *Shimwellia*, *Obesumbacterium*, *Rahnella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter*. Schopnost těchto bakterií růst a množit se v hotovém pивu je minimální. Vyskytují se zejména jako kontaminace kvasnic. Jsou schopny produkovat sensoricky nežádoucí látky (např. dimethylsulfid, diacetyl, aceton) na začátku hlavního kvašení, který poté přechází do hotového piva (Laitila 2015).

Nejsou citlivé na působení hořkých chmelových kyselin a provzdušněná mladina pro ně představuje ideální prostředí pro růst a množení. Mohou konkurovat pivovarským

kvasinkám a zpomalovat jejich růst. Většina enterobakterií je však citlivá na ethanol a kyselé pH a nejsou tedy schopné přežít v pozdějších fázích hlavního kvašení a nepřecházejí do hotového piva. Výjimkou jsou druhy *Shimwellia pseudoproteus* a *Rahnella aquatilis*, které jako kontaminanty násadních kvasnic přecházejí opakovaně do nové mladiny a mohou škodit (Bokulich & Bamforth 2013).

Zdrojem enterobakterií v pivovarském provozu je kontaminovaná voda nebo např. netěsnosti spojů potrubí, kterými se do zchlazené mladiny mohou dostávat nečistoty a bakterie z prostředí. Enterobakterie přítomné ve vzorcích vody, kvasnic a zjištěné při kontrole sanitace, jsou indikátorem zhoršených hygienických podmínek a nízké úrovně sanitace v daném pivovarském provozu (Paradh 2015).

3.4.3 Striktně anaerobní bakterie

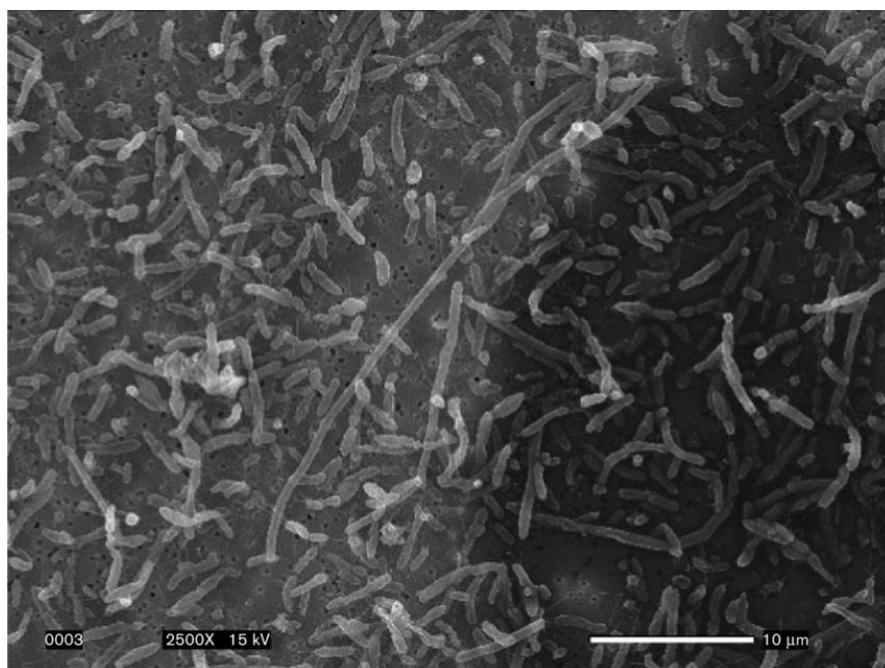
Obsah kyslíku je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících mikrobiologickou stabilitu piva. Současným trendem ve vývoji plnicích technologií je snížení koncentrace kyslíku v hotovém pivu na minimální hodnoty. Pivo se tak stává prostředím, kde se mohou uplatnit striktně anaerobní bakterie, které pro svůj růst a množení vyžadují velmi nízký nebo nulový obsah kyslíku. Bylo zjištěno, že pouze několik striktně anaerobních bakterií je zodpovědných za kontaminaci piva. Mezi anaerobní kontaminanty patří rody *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* a *Selenomonas*, *Pectinatus* a *Megasphaera*. Ty jsou považovány za nejdůležitější pivo kazící bakterie, zejména v jeho nepasterizovaném stavu. Například pivo zkažené bakteriemi *Pectinatus* a *Megasphaera* je charakteristické masivním zákalem a intenzivním zápachem připomínajícím zkažená vejce.

Jejich přítomnost v pivovaru není odhalena při běžné mikrobiologické kontrole – striktně anaerobní bakterie nelze detekovat pomocí membránové filtrace, nerostou na pevných půdách. Stanovení je také limitováno technikou odběru vzorku – při kontaktu těchto bakterií s kyslíkem dochází k jejich odumření a k získání falešně negativních výsledků (Matoulková & Kubizniaková 2014). Z tohoto důvodu je kultivace anaerobních bakterií náročná na vybavení. Při očkování a kultivaci je nutné použít anaerobní boxy, které umožňují úpravu atmosféry (Paradh 2015).

3.4.3.1 Rod *Pectinatus*

Do rodu *Pectinatus* jsou řazeny tři druhy (*Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus haikarae*), které jsou nacházeny vždy pouze ve spojení s kontaminací piva a pivovarskými provozy. Bakterie rodu *Pectinatus* jsou rovné až mírně zakřivené pohyblivé tyčinky s bičíky na povrchu těla a jsou znázorněny na obr. 9.

Rostou při teplotě 28–32 °C. Pro spolehlivé usmrcení *Pectinatus* postačují teploty okolo 58–60 °C po dobu 1 minuty, tedy mírnější podmínky, nežli je běžná pasterace piva.



Obr. 9: *Pectinatus haikarae* – mikrograf (převzato od Juvonen 2015).

Bakterie rodu *Pectinatus* patří především mezi sekundární kontaminaci. Byly detekovány v plních, v kanalizaci, ve vzduchu a na biofilmu členitých povrchů ve stáčírňe lahví. Mimo prostor stáčecí haly byla přítomnost bakterií *Pectinatus* potvrzena pouze ojediněle také v pivu v ležáckých tancích, v přetlačných tancích a v odpadních kanálcích v podlaze na úseku filtrace piva. Kažení piva touto bakterií má za následek zvýšený zákal piva viz obr. 10. Dále kyselou chuť, shnilý vaječný zápach v důsledku tvorby octové, propionové kyseliny a stejně tak sirovodíku (Liu et al. 2015). Bakterie *Pectinatus* jsou velmi dobře přizpůsobené k růstu v pivu, rozpětí pH růstu je od 3,5 do 8,0. Snáší koncentraci etanolu do 4,5 % a koncentraci hořkých kyselin do 150 mg/l. V současné době je podle odhadů *Pectinatus* původcem 20–30 % případů bakteriálního kažení lahvového, velmi často nepasterovaného piva. Náchylnější ke kažení touto bakterií jsou dále piva nealkoholická, nízkoalkoholická a méně chmelená (Matoulková & Kubizniaková 2014).

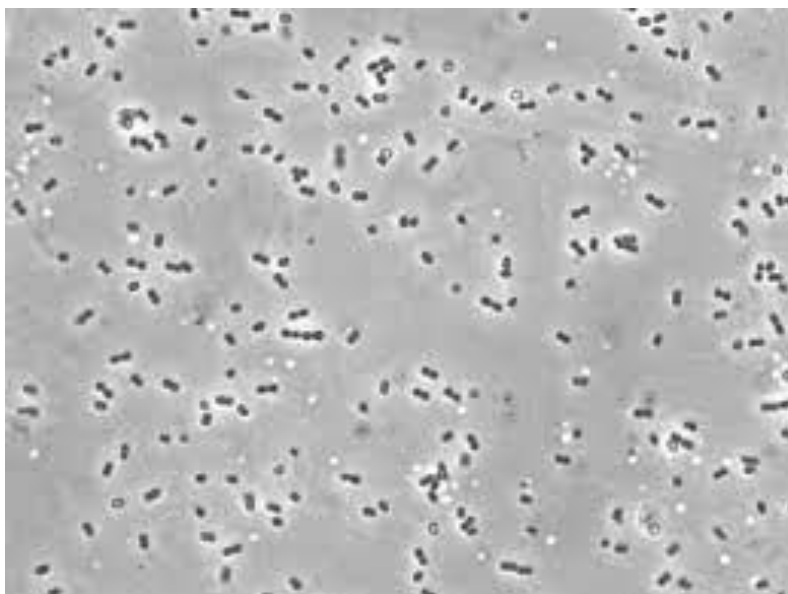


Obr. 10: Zákal způsobený bakterií *Pectinatus* (vpravo) (převzato od Juvonen 2015).

3.4.3.2 Rod *Megasphaera*

Bakterie rodu *Megasphaera* kontaminující v pivovarském prostředí zahrnuje tři druhy: *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera paucivorans* a *Megasphaera sueciensis*. Ovlivňuje hlavně nepasterizovaná nízkoalkoholická piva, a to kvůli tomu, že má menší odolnost vůči ethanolu než například *Pectinatus*. Znehodnocuje pivo produkcí mastných kyselin, tvorbou zákalu a nepříjemného zápachu (Kyselová & Brányik 2015). Buňky *Megasphaera* jsou nemobilní a nesporotvorné koky (viz obr. 11). Obvykle jsou uspořádány jednotlivě, v párech a někdy v krátkých řetězech. Výše zmíněné druhy rodu *Megasphaera* lze od sebe navzájem rozlišit podle velikosti buněk; *Megasphaera cerevisiae* je největší, a naopak *Megasphaera sueciensis* nejmenší (Juvonen 2015).

Megasphaera představuje hlavně sekundární kontaminaci a byla izolována z vodovodního potrubí, z podlahy ve stáčecí hale a ze vzduchu v okolí pivovaru. Předpokládá se, že *Megasphaera* se může vyskytovat již v mladině při hlavním kvašení, detekována byla i v kvasnicích a v potrubí s CO₂ (Matoulková & Kubizniaková 2014).

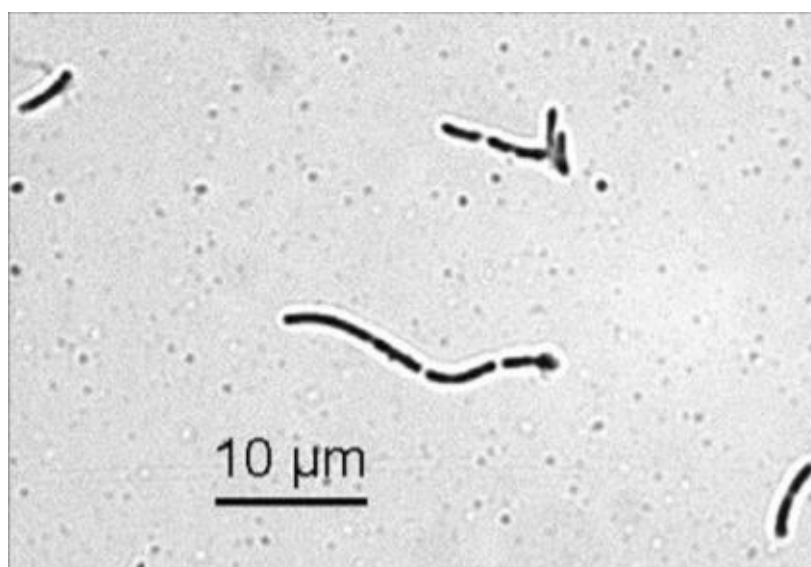


Obr. 11: *Megasphaera* (převzato od Juvonen 2015).

3.4.3.3 Rod *Zymophilus*

Rod *Zymophilus* zahrnuje dva druhy, *Zymophilus paucivorans* a *Zymophilus raffinosivorans*, nacházené vždy v souvislosti s pivovarskými provozy, konkrétně jsou spojovány převážně s pivovarskými kvasnicemi. Uváděna je také přítomnost *Zymophilus raffinosivorans* v odpadech a kanálech v pivovaru.

Bakterie rodu *Zymophilus* jsou rovné, mírně zakřivené, pohyblivé tyčinky, vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo méně často v krátkých řetězcích (obr. 12). Hlavními produkty metabolismu těchto bakterií jsou kyselina octová a propionová, *Z. paucivorans* navíc produkuje stopová množství kyseliny mléčné. *Zymophilus* roste při pH nad 4,3–4,6 a při obsahu alkoholu do 5 % a jeho schopnost kazit pivo je podobná rodu *Pectinatus* (Juvonen 2015).



Obr. 12: *Zymophilus raffinosivorans* (převzato od Matoulková & Kubizniaková 2014).

3.4.4 Octové bakterie

Paradh (2015) ve své práci popisuje octové bakterie jako aerobní, nesporetvorné, gramnegativní nebo gramlabilní bakterie s elipsoidní až krátkou morfologií buněk ve tvaru tyčinek. Vyskytují se jednotlivě, v párech nebo v řetízích a někdy jsou pohyblivé povahy. K optimálnímu růstu bakterií octového kvašení dochází mezi pH 5 až 6,5, ale k jejich růstu může dojít i při vysoce kyselém pH.

Octové bakterie metabolizují ethanol na kyselinu octovou, čímž dodávají pivu chuť octa. Vzhledem k zavedení účinných postupů čištění a hygieny v moderních pivovarech a účinnému odstraňování kyslíku z post fermentačních procesů se tyto bakterie nepovažují za velmi závažné (Sakamoto & Konings 2003). Mezi bakterie octového kvašení patří 15 ověřených rodů, ale pouze dva rody, a to *Acetobacter* a *Gluconobacter* jsou spojovány s kontaminací piva (Priest 2003). *Gluconobacter* není schopen zcela oxidovat ethanol na oxid uhličitý (CO₂) a vodu (H₂O) vytvořením acetátu a také není schopen oxidovat laktát na CO₂ a H₂O, zatímco *Acetobacter* dokáže oxidovat ethanol na acetát a ten dále oxidovat (Bossaert et al 2021).

3.4.5 Ostatní rody

Mezi další bakterie kontaminující pivo můžou patřit rody *Kocuria* a také sporotvorné kazící bakterie, mezi které patří především rody *Bacillus*, *Clostridium* a *Paenibacillus* (Priest & Cambell 2003).

3.4.5.1 Rod *Kocuria*

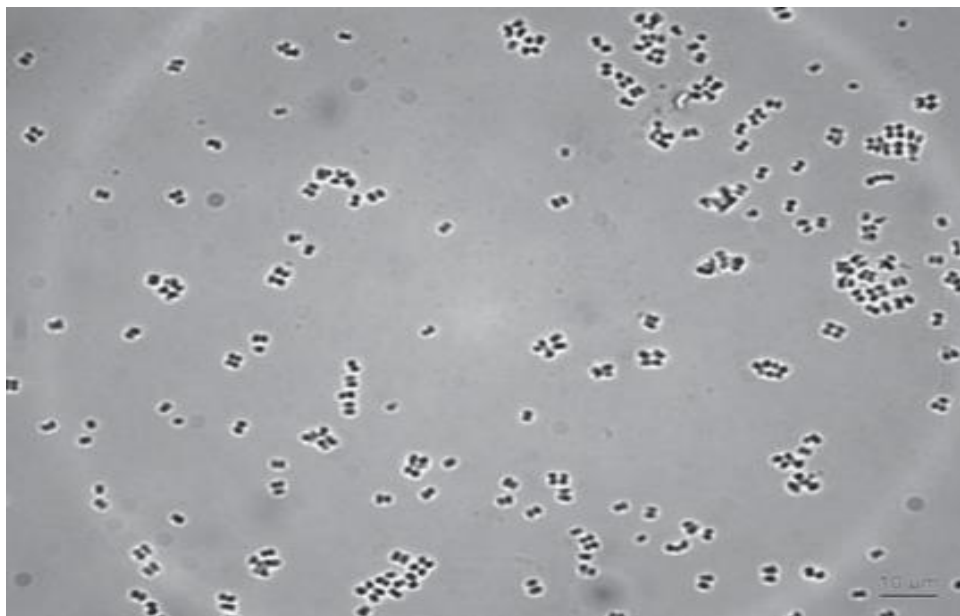
Grampozitivní aerobní bakterie, které nejsou považovány za závažnou kontaminaci pivovarské výroby a jejich buňky jsou uspořádané po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích, které jsou znázorněny na obr. 13 (Matoulková & Kubizniaková 2018).

Bokulich & Bamforth (2013) k tomuto rodu bakterií dodávají, že může růst pouze v pivu s nízkým obsahem ethanolu, chmelových sloučenin a při hodnotách pH vyšších než 4,5. Z hlediska mikrobiologické kontroly v pivovarské laboratoři jsou významné pouze dva druhy bakterií tohoto rodu, a to *Kocuria kristinae* (dříve *Micrococcus kristinae*) a *Kocuria varians*. Na rozdíl od jiných druhů *Kocuria*, které jsou přísně aerobní, *Kocuria kristinae* je fakultativně anaerobní, a proto nepřítomnost kyslíku podporuje růst tohoto druhu. Podle Sakamoto & Konings (2003) byla bakterie *Kocuria kristinae* hlášena jako pивní kontaminant produkující ovocné aroma a atypickou chuť piva.

Druh *Kocuria varians* je běžně nacházen v pivovarském prostředí, může se vyskytovat i v pivu a přežívat v něm delší dobu. Produkci kyselin může snížit pH média až na 4,3-5,9. Pivo však nekazí – tento druh je striktně aerobní a jako ostatní *Kocuria* je citlivý na hořké chmelové látky, alkohol a kyselé prostředí.

Riziko poškození piva rodem *Kocuria* je poměrně zanedbatelné, jejich význam spočívá zejména v možnosti záměny s jinými bakteriemi při mikrobiologické kontrole.

Mohou být nesprávně identifikovány jako pivo škodící bakterie *Pediococcus* a ten může být naopak nesprávně určen jako neškodné bakterie *Kocuria*, zejména pokud je prováděna např. jenom mikroskopie vzorku kvasnic, bez kultivačního stanovení (Matoulková & Kubizniaková 2018).



Obr. 13: *Kocuria kristinae* (převzato od Matoulková & Kubizniaková 2018).

3.4.5.2 Sporotvorné kazící bakterie

Další skupinou bakterií kontaminujících v pivovarnictví mohou být bakterie tvořící spory. Hlavní skupiny sporotvorných bakterií, které se mohou nacházet v pivovarském prostředí jsou *Bacillus*, *Clostridium* a *Paenibacillus*. Tyto grampozitivní bakterie jsou obecně citlivé na nízké pH, chmelové hořké kyseliny a nezpůsobují problémy v běžně chmeleném pivo (Suzuki 2015).

Takeuchi et al. (2005) ale uvádějí informaci, že u piv s neobvykle vysokou hodnotou pH nebo s nízkým obsahem hořkosti, tudíž u méně chmelených, by mohly být některé druhy *Clostridium*, konkrétně *Clostridium butyricum* schopny růst a produkovat butyrát, který poté dodává pivo nepříjemné sýrové aroma. Také skupina *Bacillus cereus* byla hlášena jako jeden z druhů izolovaných z pivovarnického prostředí, a to kvůli třem druhům, které obsahují gen na rezistenci chmele – *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* a *Paenibacillus humicus*. Pan Suzuki (2015) k tomu dodává, že některé bakterie právě z druhu *Bacillus cereus* jsou známé jako potravinové patogeny, které způsobují těžkou nevolnost, zvracení a průjem. Naštěstí díky mikrobiologické stabilitě piva však nebyly zdokumentovány žádné případy otravy, včetně těch, které by způsobil *Bacillus cereus*.

3.4.6 Plísně

Plísně představují při výrobě piva ve srovnání s jinými mikroorganismy (kvasinky, bakterie) menší nebezpečí. Jsou častou kontaminací, především obilovin používaných jako suroviny při vaření piva. Například na klíčícím ječmeni a zeleném sladu. Mezi plísně nejčastěji kontaminující v pivovarnickém průmyslu patří rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* a *Mucor*.

Největším nebezpečím je to, že některé plísně jsou schopny produkovat mykotoxiny, což jsou toxické metabolické produkty toxigenních plísní. Mykotoxiny jsou tepelně velmi odolné (až do 200 °C) a rozpustné v ethanolu, takže snadno přežívají jak sladařský, tak i pivovarský výrobní proces. Proto je vždy nutná pečlivá kontrola vstupních surovin (ječmen, slad, příp. rýže, kukuřice). Při konzumaci mohou mít závažné nežádoucí účinky na zdraví. Vykazují toxické a karcinogenní účinky. Dalším negativním jevem, které plísně způsobují je tzv. přepěňování piva (gushing), kdy při otevření lahve pivo přepění a pěna vyteče z lahve. Může být způsobeno několika příčinami, nejčastější je ale právě přítomnost plísně *Fusarium* v použitém sladu. Rozvoj plísní je podmíněn vlhkostí, proto lze snížením vlhkosti úspěšně potlačit jejich růst (Laitila 2015).

3.5 Kontrola mikrobiální kontaminace v pivovarech

Kompletní proces výroby piva zahrnuje sled mikrobiálních složek, které dramaticky ovlivňují konečný produkt. Znalost, kontrola a řízení těchto složek ve všech fázích poté vedou ke zvýšení kvality výsledného piva (Bokulich & Bamforth 2013).

Nejběžněji používanou metodou pro zjišťování výskytu bakterií kazící pivo v pivovarech je dodnes tradiční inkubace na kultivačních médiích – očkovací metody. Obvykle trvá týden nebo i déle, než bakterie vytvoří viditelné kolonie na Petriho miskách nebo než zvýší zákal. Výrobky jsou proto často uvolněny do prodeje dříve, než jsou k dispozici mikrobiologické výsledky. Proto pokud je pak v pivním výrobku zjištěna a identifikována bakterie kazící pivo, musí být ihned stažena z trhu. To pivovaru může způsobit vážné obchodní škody. Dále se využívá různě selektivních půd, a to především na stanovení kvasinek, koliformních a mléčných bakterií. Jako testovací médium se nejčastěji využívá agar (kultury membránové filtrace), bujón a koncentrát na bázi NBB bakterií to především díky selektivitě, proveditelnosti a jednoznačného vyhodnocení i finanční nenáročnosti.

Je však třeba stanovit metodu, která určí, zda jsou zjištěné bakterie schopny růstu v pivu, či nikoli. V současné době je jedinou dostupnou metodou tzv. „vynucovací test“, při němž se zjištěná bakterie znovu naočkuje a inkubuje v pivu. Detekce viditelného zákalu v naočkovaném pivu trvá obvykle 1 měsíc nebo i déle, což znamená, že tato metoda není příliš praktická. Naleznou-li se v prostoru ohniska kontaminace, hrají důležitou roli čisticí a dezinfekční prostředky, v mnoha případech v kombinaci s teplem. Zjistíme-li škodlivé mikroorganismy v pivu ležáckých tanků, doporučuje se opatrné oddělení kalů, v nichž jsou kontaminanty zvláště silně nahromaděny (Sakamoto & Konings 2003).

3.5.1 Identifikace mikroorganismů

Jen několik málo druhů mléčných bakterií jsou výraznými kontaminanty v pivovarském průmyslu. Pro zajištění kvality hotového piva, obvykle postačí kontrolovat možné kontaminace *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus* spp. a *Lactobacillus brevis*. Většina studií o bakteriích pивní kontaminace se zaměřuje na taxonomickou klasifikaci těchto bakterií. To umožnilo identifikovat bakterie zjištěné v pivu a pivovarech a přijmout vhodná opatření k jejich kontrole (Sakamoto & Konings 2003). Univerzální kultivační půda, která by umožňovala rychlou a spolehlivou detekci všech pivu škodících mléčných bakterií, neexistuje (Back 2005).

Nejčastěji používanými půdami pro detekci bakterií mléčného kvašení jsou půdy MRS a NBB (viz obr. 14), a to jak ve svém původně navrhovaném základním složení, tak i různě modifikované. Dále se využívají například NBB-A, BMB a Raka-Ray.

Součástí půd jsou inhibitory, které zabrání rozvoji kvasinek, plísní a gramnegativních bakterií a současně neovlivňují růst mléčných bakterií. Mléčné bakterie jsou fakultativně anaerobní, a proto se doporučuje jejich kultivace za anaerobních podmínek.

Detekci mléčných bakterií komplikuje také jejich pomalý růst, doba inkubace při 28–30 °C bývá 5–7 dní, někdy i déle. U některých mléčných bakterií byla prokázána adaptace na podmínky v pivu a při zaočkování na médium, se složením naprosto odlišným od piva (obsah živin, pH, obsah solí, chmelových látek atd.), tyto bakterie nerostou. V provozní laboratoři je výhodné při přípravě půdy přidávat pivo vyráběné v daném provozu – předpokládá se adaptace pivu-škodících bakterií na toto pivo, a tedy jejich snazší identifikace (Matoulková 2015). Pivo je do půd přidáváno v různém poměru – Taskila et al. (2011) doporučuje přídavek piva do kultivační půdy alespoň 25 %.

Pro budoucí zjištění bakterií v těchto médiích je nutná identifikace druhu. Sakamoto & Konings (2003) konstatují, že pro tuto identifikaci slouží kromě základních testů, jako je morfologie kolonií, také gramovo barvení a katalázové testy. U mléčných bakterií není zcela nutná identifikace na úroveň druhu. Mnohem důležitějším znakem je poté jejich schopnost růstu v pivu a schopnost pivo kazit.

Ze všech surovin jsou nejpravděpodobnějším zdrojem mléčných bakterií kvasnice, jelikož se přidávají až po varu mladiny. Mléčné bakterie se mohou vyskytovat v pivovarských kvasinkách, pocházejí ze zpracovatelského prostředí a špatně sanitovaných zařízení. Kvasinky získané na konci procesu kvašení, nazýváme také jako recyklované kvasinky. Ty jsou známy jako jedna z hlavních zásobáren kazících bakterií v pivovarech. Omývání znovu získaných kvasinek kyselinou na konci procesu kvašení, je již dlouholetou praxí několika pivovarů a má velký současný význam, neboť snižuje množství vyprodukovaného odpadu přispívajícího k udržitelnějšímu pivovaru. Běžně používané podmínky pro promývání kyselinou jsou teplota nižší než 5 °C a pH mezi 2 až 2,2, které je dosažené použitím kyseliny fosforečné potravinářského typu (Munford et al. 2020).

Protokol o mytí kyselinou se u pivovarů liší, přičemž některé provádějí praní na konci každého kvasného procesu, zatímco jiné provádějí praní pouze tehdy, pokud je zjištěna významná bakteriální kontaminace (Cunningham & Stewart 2000). Kvasinky by měly být zkontrolovány před jejich nasazováním (nejlépe 2-4 dny před vařením piva) a měsíční kontroly

by měly být prováděny také za účelem testování na nepivovarní kmeny, které se mohou časem rozrůstat. Tolerance je menší než 10 KTJ/ml pro bakterie a nulová tolerance divokých kvasinek (Rodríguez-Saavedra et al. 2020).



Obr. 14: Kolonie *Lactobacillus brevis* na půdě MRS (vlevo) a BMB (vpravo) po 5 dnech inkubace (převzato od Kubizniaková et al. 2016).

Stanovení enterobakterií není složité. Jejich optimální teplota růstu je u většiny kolem 37 °C. Pro detekci Enterobakterií v mladině a kvasinkách se doporučuje použití agaru MacConkey doplněný o látku, která potlačuje růst kvasinek. MacConkey agar je selektivní médium pro koliformní bakterie a enterobakterie. Obsahuje žlučové soli, které inhibují růst většiny grampozitivních bakterií, a krystalovou violeť, která umožňuje na základě barevné změny média rozlišit bakterie fermentujících laktózu od bakterií které ji nakvasí vlivem produktů metabolismu. Dostupné jsou i molekulární metody, např. PCR (Hill 2015).

Plísně z rodů *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* a *Fusarium* jsou hlavními riziky, pokud jde o infekci ječmene a sladu. Tolerance růstu plísní u obilovin je menší než 10 kolonií tvořící jednotky (KTJ) na gram. Nulová tolerance je poté u divokých kvasinek a také slad by měl být zcela bez plísní. Při každém příjmu a v pravidelných intervalech se během skladování odebírají vzorky sladu a provádí se testy na přítomnost bakterie, plísní, divokých kvasinek a mykotoxinů.

Nejjednodušší způsob, jak vyhodnotit vnitřní mikroflóru obilí je ten, že se zrno ponoří do bělidla po dobu 1 minuty, aby se zabila povrchová mikroflóra a poté se opláchně destilovanou vodou. Zrno se před přidáním do roztaveného agaru buď rozemele nebo se jednotlivá zrna položí na jeho povrch do Petriho misky. Inkubuje se při teplotě 25–30 °C, aby mikroby umístěné uvnitř obilí mohly vyrůst. Stupeň vnitřní kontaminace je poté ukazatelem kvality a skladovatelnosti zrna (Hill 2015).

3.5.2 HACCP a CIP

HACCP

Koncept analýzy rizik a kritických kontrolních bodů (HACCP) byl poprvé vyvinut v 60. letech 20. století NASA. Byl navržen tak, aby zabránil mikrobiálním, fyzikálním a chemickým rizikům v potravinách pro vesmírné mise. Dnes je HACCP mezinárodně uznávaným systémem (souborem pokynů) a je široce používán pro bezpečnou výrobu potravin (Janevská 2010).

Systém HACCP v pivovarnictví rozlišuje rizika chemická, fyzikální a pro nás nejdůležitější – biologická.

Zdrojem biologického nebezpečí jsou základní suroviny, technologické zařízení, obalové a pomocné materiály, a i okolní prostředí. Za zdraví škodlivé se pokládají plísně produkující mykotoxiny.

Rod *Fusarium* kromě toho produkuje látky způsobující přepěňování. Vedle patogenních mikrobů (např. *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*) je za zdravotně závadné látky možno považovat, a to hlavně při zvýšené kontaminaci, i biogenní aminy, které vznikají činností mléčných bakterií nebo divokých kvasinek. Sledována je čistota technologického zařízení po jednotlivých sanitačních operacích. K hodnocení se používají přímé i nepřímé metody posouzení mikrobiologické čistoty. Univerzální použití pro HACCP má ATP bioluminiscenční metoda, která velmi rychle hodnotí celkové mikrobiální znečištění provozního zařízení. Obecně systém HACCP požaduje, aby se závadám čelilo přímo na místě jejich vzniku. Spoléhá proto na preventivní opatření, aby závady nemohly vůbec vzniknout (Kosař & Procházka 2000).

CIP

Pro minimalizaci rizik mikrobiální kontaminace znečištěných nádob a zařízení je důležité, aby byl pivovar navržen a zkonstruován s ohledem na hygienu. Pro čištění velkokapacitních pivovarů se v dnešní době využívá především automatizovaného systému CIP. Lze ho definovat jako techniku automatizovaného čištění a dezinfekci technologického zařízení ze stabilně umístěné sanitační stanice. Zkratka tohoto zařízení pro sanitaci pochází z anglického Cleaning in place – čištění na místě. Stanice se skládá z nádob s čistícími roztoky, které jsou poháněny po okruzích a vracejí se zpět do zásobníku stanice k opakovanému použití. Sanitovány jsou všechny plochy, které přicházejí do styku s výrobkem. Sanitační program se skládá z předvýplachu vodou, alkalického čištění, mezivýplachu, kyselého čištění, mezivýplachu, dezinfekce a konečného výplachu. U alkalického čištění se nejčastěji využívá 1-2% roztok NaOH, přičemž dochází k odstranění nečistot organické povahy. Kyselé čištění zabraňuje usazování pивního a vodního kamene a odstraňuje stopy alkalického prostředí. Obvykle se využívá 0,8-1,5% roztok HNO₃. Tento systém slouží zásadně k tomu, že odstraňuje špínu, která by mohla vést k zavlečení, růstu a usídlení mikroorganismů (Davies et al. 2015).

4 Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zpracovat přehled mikroorganismů účastnících se procesu výroby piva a dále nejčastěji kontaminujících v pivovarském provozu.

Během výrobního procesu piva existuje několik kroků, při kterých lze škodlivé a potencionálně škodlivé mikroorganismy eliminovat. Hotové pivo vykazuje vysokou mikrobiologickou stabilitu díky svým vlastnostem jako je nízké pH, obsah alkoholu, chmelových látek, nízké množství O₂, vysoké množství CO₂. Existují však mikroorganismy, především bakterie, které tyto bariéry dokážou překonat a tím mohou pivo poškodit změnou barvy, tvorbou zákalu a produkcí zdraví škodlivých a nežádoucích sensoricky aktivních látek. Riziko kontaminace je mnohem vyšší u piv nealkoholických a nízkoalkoholických.

Mezi nejvýznamnější kontaminanty v pivovarnictví patří některé mléčné bakterie, enterobakterie, aerobní octové bakterie a striktně anaerobní bakterie. Tyto skupiny bakterií lze nalézt v různých fázích výroby, v surovinách, v meziproduktech, ale i v hotovém pivu.

Nicméně pivo lze zahrnout mezi potraviny s nízkým stupněm rizik, a to díky tomu, že patogenní mikroorganismy se v něm nemohou pomnožovat a během výrobního procesu hynou. Ale i přes to je kontrola a zavedení přísných pravidel pro zajištění bezpečnosti velmi důležitá. Zavedení správných hygienických postupů v každé fázi výrobního procesu je rozhodující pro zabránění růstu nežádoucích mikroorganismů a k zajištění kvality a bezpečnosti výsledného produktu.

5 Literatura

Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt EK, Becker T. 2014. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. *Journal of the Institute of Brewing* **120**:289–314.

Bamforth ChW. 2003. History and Types. Pages 418–422 in Luiz Trugo, Finglas PM, editors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2 edition. University of California, Davis, CA, USA.

Bamforth ChW. 2016. *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. Elsevier Science, University of California.

Betancur MI, Motoki K, Spence C, Velasco C. 2020. Factors influencing the choice of beer: A review. *Food Research International* **137**:1-18.

Bokulich NA, Bamforth ChW. 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**:157–172.

Bossaert S, Winne V, Opstaele FV, Buyse J, Verreth Ch, Herrera-Malaver B, Geel MV, Verstrepen, Crauwels S, Rouck G, Lievens B. 2021. Description of the temporal dynamics in microbial community composition and beer chemistry in sour beer production via barrel ageing of finished beers. *International Journal of Food Microbiology* **339**:1-18.

Briggs DE, Boulton ChA, Brookes PA, Stevens R. 2004. *Brewing science and practise*. Woodhead Publishing Limited and CRC press, Cambridge.

Cattoor K, Dresel M, De Bock L, Boussery K, Van Bocxlaer J, Remon JP, De Keukeleire D, Deforce D, Hofmann T, Heyerick A. 2013. Metabolism of hop-derived bitter acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:7916–7924.

Davies S, Sykes T, Philips M, Hancock J. 2015. Hygienic design and Cleaning-In-Place (CIP) systems in breweries. Page 221-239 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd. Staffordshire.

Department of Viticulture & Enology University of California. 2018. Available from <https://wineserver.ucdavis.edu/#/>

De Schepper CF, Michiels P, Buvé C, Van Loey AM, Courtin CM. 2021. Starch hydrolysis during mashing: A study of the activity and thermal inactivation kinetics of barley malt α -amylase and β -amylase. *Carbohydrate Polymers* **255**:117494.

Eumann M, Schaeberle C. 2016. Chapter 5 - Water. Pages 97-111 in Bamforth ChW, editor. *Brewing Materials and Processes*. EUWA Water Treatment Plants, Gartrigen, Germany.

Gobbetti M, Minervini F. 2014. *Lactobacillus: Lactobacillus casei*. Pages 432-438 in Batt C, Patel P, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*: 2 edition. University of Bari, Italy.

- Guizani N, Mothershaw A. 2005. Fermentation. Pages 111-152 in Hui YH, Sherkat F. Handbook of Food Science, Technology and Engineering - 4 Volume Set. Elsevier LTD, United Kingdom.
- Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. 2010. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**:318–328.
- Harrison MA, Albanese JB. 2019. Beer/Brewing. Pages 467-477 in Schmidt TM, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. University of Michigan, Michigan.
- Hill AE. 2015. Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. Pages 271-286 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd. The International Centre for Brewing & Distilling, Heriot-Watt University, Scotland.
- Hofmann R, Fischer J. 2015. Beer packaging: Microbiological hazards and considerations. Pages 319-334 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, VLB Berlin, Berlin.
- Ingledeu WM, Hysert DW. 1994. Brewing Technology. Pages 1-11 in Reference Module in Food Science. Elsevier. University of Saskatchewan, Canada.
- Janevska DP, Gospavic R, Pacholewicz E, Popov V. 2010. Application of a HACCP-QMRA approach for managing the impact of climate change on food quality and safety. *Food Research International* **43**:1915–1924.
- Jaskula B, Kafarski P, Aerts, G, De Cooman, L. 2008. A kinetic study on the isomerization of hop α -acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:6408-6415.
- Juvonen R. 2015. Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. Pages 195-218 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier Ltd.
- Keukeleire DD. 2000. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. *Química nova*. **23**:108–112.
- Kosař K, Procházka S. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. VÚPS, Praha.
- Kyselová L, Brányik T. 2015. Quality improvement and fermentation control in beer. Pages 477-500 in Holzapfel W, editor. *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Institute of Chemical Technology Prague, Prague.
- Liu SQ. 2015. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. Pages 357-374 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. National University of Singapore, China.

Lorencová E, Salek RN, Černošková I, Buňka F. 2019. Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control* **106**:1–8.

Matoulková D, Kubizniaková P. 2014. Microbiology of brewing - Strictly anaerobic bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* and *Selenomonas* and methods for their detection. *Kvasny Prumysl* **60**:285–294. *Kvasny Prumysl*.

Matoulková D, Kubizniaková P. 2015. Lactic acid bacteria and cultivation methods of their detection - Part I. *Kvasny Prumysl* **61**:76–88. *Kvasny Prumysl*.

Matoulková D, Kubizniaková P. 2018. Brewing Microbiology - *Kocuria* (*Micrococcus*) and Cultivation Methods for their Detection - Part 1. *Kvasny Prumysl* **64**:10–13. *Kvasny Prumysl*.

Meilgaard M. 2001. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: A review. *Journal of the Institute of Brewing* **107**:271–286.

Meussdoerffer FG. 2009. A Comprehensive History of Beer Brewing. Pages 4-42 in Eßlinger HM, editor. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH, Germany.

Mousia Z, Balkin RC, Pandiella SS, Webb C. 2004. The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. *Process Biochemistry* **39**:2213–2219.

Munford ARG, Chaves RD, Sant'Ana AS. 2020. Inactivation kinetics of beer spoilage bacteria (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, and *Pediococcus damnosus*) during acid washing of brewing yeast. *Food Microbiology* **91**:103–513.

Noots I, Delcour JA, Michiels C. 1998. From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit. Rev. Microbiol.* **25**:121–153.

Olajire AA. 2020. The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production* **256**:1–21.

Parker D.K. 2012. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. Pages 133-158 in John Piggott, editor. *Alcoholic beverages: Sensory evaluation and consumer research*. Woodhead Publishing Limited, Britain.

Paradh AD. 2015. Gram-negative spoilage bacteria in brewing. Pages 175-194 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Vasantdada Sugar Institute, Pune, Maharashtra, India.

Pavsler A, Buiatti S. 2009. Beer N. Department of Food Science, University of Udine, Italy.

Petters HI., Flannigan B., Austin B. 1988. Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:279–297.

Priest FG, Cambell I. 2003. *Brewing mikrobiology* 3 edition. Heriot-Watt University, Edinburgh, UK.

- Rodríguez-Saavedra M, González de Llano D, Moreno-Arribas MV. 2020. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International* **138**:1-9.
- Russell I. 2016. Yeast. Pages 77-96 Bamforth CHW, editor. *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. Heriot-Watt university, Edinburgh.
- Sakamoto K, Konings WN. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* **89**:105–124.
- Sakamoto, K., Margolles, A., Van Veen, H.W., Konings, W.N., 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *Journal of Bacteriology* **183**:5371-5375.
- Schurr BC, Behr J, Vogel RF. 2015. Detection of acid and hop shock induced responses in beer spoiling *Lactobacillus brevis* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology* **46**:506–506.
- Schwarz, P., and Li, Y. 2011. Malting and brewing uses of barley. Pages 478-521 in Ullrich SE, editor. *Barley: Production, Improvement and Uses*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.
- Speers A, Forbes J. 2015. Yeast: An overview. Pages 3-9 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Heriot-Watt University, Edinburgh.
- Stewart GG, Priest FG. 2011. Beer shelf life and stability. Pages 527-539 in Kilcast D, Subramaniam P, editors. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Heriot-Watt University, UK.
- Suzuki K. 2015. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. Pages 141-173 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Quality Control Center, Asahi Breweries, Ltd., Japan.
- Takeuchi A, Iijima K, Suzuki K, Ozaki K, Yamashita H. 2005. Application of ribotyping and rDNA internal space analysis (RISA) for assessment of microflora in brewery environments. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **63**:73–75.
- Teixeira P. 2014. *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. Pages 418-424 in Batt CA, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology: 2 Edition*. Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal.
- Tricase C, Amicarelli V, Lamonaca E, Leonardo R. 2018. Economic Analysis of the Barley Market and Related Uses. Pages 25-46 in Zerihun Tadele, editor. *Grasses as Food and Feed*. University of Bern, Switzerland.
- Tyakht A et al. 2021. Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. *Food Microbiology* **94**:103658.

Wolf-Hall CE. 2007. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology* **119**:89–94.

Wray E. 2015. Reducing microbial spoilage of beer using pasteurisation. Pages 253-269 in Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Cambden BRI, Surrey, UK.

Wunderlich S, Back W. 2009. General Aspects of Beer and Beer Making, Hops and Yeast Processes and Quality Criteria. Pages 3-16 in Preedy VR, editor. *Beer in Health and Disease Prevention*. Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Freising-Weihenstephan, Germany.

Zanoli P, Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology* **116**:383–396.

