

# Štúdium prania kvasiniek

JÁN ARPAI, Mikrobiologické oddelenie Výskumného ústavu mraziarenského v Bratislave  
OLGA JANOTKOVÁ, Výskumné pracovisko Slovenských pivovarov, n. p., Bratislava

663.12/.14:548.2

*Experimentálne práce boli vykonané na bývalom Výskumnom ústave potravinárskeho priemyslu v Bratislave*

## *II. časť: Účinky chemikálií a antibiotík ako prísad pracích vôd pri laboratórnych a poloprevádzkových pokusoch*

### Úvod a problematika

V predchádzajúcom príspevku sme predložili výsledky sledovania účinkov stacionárneho a prietokového spôsobu prania z hľadiska mikrobiologickej čistoty a fyziologických vlastností prevádzkových kultúr a čistých kmeňov kvasiniek (Arpai, Janotková 1958). Popri faktoroch akými sú napr. rýchlosť výmeny práce vody, jej teplota, dĺžka prania a ďalšie, zdôraznili sme najmä základnú požiadavku účinného prania, ktorou je dostatok biologicky bezchybnej vody. Tento predpoklad nie je však v praxi vždy splnený, resp. bezprostredne splniteľný. To viedlo už Pasteura (1876) k tomu, aby sa pokúsil o zlepšenie dezinfekčnej účinnosti prania chemickými prísadami. Neskôršie Will (1909) a najmä Henneberg (1909 a 1926) vyskúšali celý rad chemikálií, t. j. anorganické a organické kyseliny, resp. ich soli, ako dezinfekčné prídavky k pracím vodám. Sledovali sa tiež účinky katadýnových prípravkov (Vavrušová, Kocková 1950). Najnovšie sa v zahraničí používajú niektoré peroxydy a najmä kvater-

nárne amonné zlúčeniny ako dezinfekčné činidlá aj pri čistení varných kvasníc (Müller 1953, Compton et al. 1954).

Napriek dobrým výsledkom dosiahnutým chemickými dezinfekčnými činidlami, z ktorých mnohé vykazujú pomerne široké rozpätie medzi inhibičnou dávkou účinnou na produkčné kvasinky z jednej strany a na cudzie mikroorganizmy zo strany druhej, má tento spôsob čistenia kvasiniek predsa tú nevýhodu, že kvasničné bunky po tomto ošetrení bývajú obyčajne viacmenej fyziologicky oslabené (Kutscher 1956). Skúšali sa preto aj také špecifické antibiotické látky, ktoré sa vyznačujú inhibičnými účinkami na baktériovú mikroflóru, avšak nebránila životným pochodom kvasiniek. Tyrotrícín, penicilín, polymyxín a niektoré tetracyklínové antibiotiká sa používali na laboratórne pokusy, pri ktorých sa zistili nielen protibaktériové účinky na škodlivej mikroflóre varných kvasiniek (Strandskov, Bockelmann 1954; Visor, Prescott 1954; Haas 1955; Case, Lyon 1956), ale v niektorých prípadoch i stimulácie kvasného procesu (Kocwowa 1955). To nás



viedlo k tomu, aby sme sa venovali sledovaniu tejto problematiky s osobitným zreteľom na použiteľnosť tých antibiotík, o ktorých sme sa presvedčili, že za istých podmienok priaznivo vplyvajú, resp. stimulujú metabolizmus kvasiniek (Arpai, Janotková 1957), čo je dôležité preto že pránim sa nemá odstrániť iba infekčná mikroflóra, ale aj zlepšiť fyziologický stav kvasiniek.

#### Pokusná časť

##### Materiál a metódy

Ako kvasničný materiál sme pri sledovaní účinnosti prania na čistiaci efekt a fyziologické prejavy použili tie isté vzorky ako v prvej časti práce (Arpai, Janotková 1958).

Ako testorganizmy na stanovenie protimikróbnej, resp. dezinfekčnej účinnosti chemikálií a antibiotík sme použili jednak huby: *Saccharomyces pastorianus*, *Hansenula anomala*, *Candida albicans*, *Torulopsis berlese species*, *Pichia membranaefaciens*,

a jednak baktérie: *Lactobacillus pastorianus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Sarcina lutea*, *Acetobacter pasteurianum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas cerevisiae*.

Kultúry týchto mikróbov sme získali sčasti izoláciou zo vzoriek nepraných kvasníc a sčasti sme použili zbierkové kmene. Pracovné postupy pri izolácii a diagnostike (Bergey 1948, Razga 1953, Stöckli 1953) sú podrobne opísané v záverečnej zpráve príslušnej výskumnej úlohy 14—7/1957 VÚPP.

Ako testorganizmus na kvantitatívne stanovenie antibiotík sme použili *Bac. subtilis*.

Z chemikálií sa skúšali klasické dezinfekčné prostriedky podľa Henneberga (1909), tj. kyselina fluorovodíková, kyselina solná, kyselina dusičná, kyselina sirová, kyselina fosforečná, kyselina mravčia, kyselina octová, kyselina maselná, kyselina mliečna, kyselina oxálová, kyselina vinná, kyselina citrónová; ďalej sa skúšal alkohol, formaldehyd, lúh sodný; z katalýznych prípravkov „Sagén“ a z kvartérnych amónnych solí dimetyllaurylbenzyl amonium chlorid („Ajatin“).

Z antibiotík ako prísady k pracím vodám sa skúšali: penicilín-K, streptomycín-sulfát, chlortetracyklín, HCl, oxytetracyklín. Antibiotiká nám dal na pokusné účely k dispozícii Výskumný ústav antibiotík v Roztokách pri Prahe.

Použitie koncentrácie sú uvedené pri výsledkoch. Čas pôsobenia bol 2 hodiny, pri teplote 10°C. Potom boli kvasinky oddelené a opäť premyté čistou vodou.

Protimikróbná účinnosť chemikálií a antibiotík sa stanovovala metódou riedenia za použitia pevných a tekutých pôd. Postupovali sme tak, že sme do kultivačných pôd (zloženie ako v I. časti) postupne pridávali vo zvýšených koncentráciách sledované chemikálie, resp. antibiotiká (Köhler 1956). Ako inhibičná sa hodnotila koncentrácia, pri ktorej zaočkované testorganizmy (prípadne celková infekčná mikroflóra) už nevyrástli.

Koncentrácia, resp. prítomnosť antibiotík v substrátoch sme stanovovali biologickou platňovou metódou (reglement VÚA Roztoky).

Metódy stanovovania stupňa mikrobiologického znečistenia varných kvasiniek boli tie isté ako v prvej časti práce, kde sú aj bližšie opísané, uvedené sú tam aj pracovné postupy pri určovaní množstva kvasnej energie. Coli-titr bol stanovovaný obvyklou metódou.

Kvantitatívne sme rešpirácie, tj. kvasenie a dýchanie merali na Warburgovom aparáte metódou opísanou, resp. citovanou v prvej časti tejto práce.

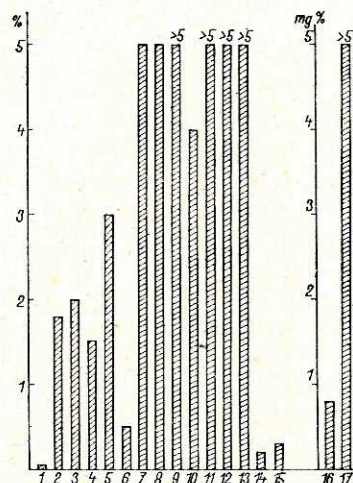
Poloprevádzkové pokusy urobili pracovníci Pokusného ústavu pivovarského v Braníku pri Prahe. Skúšky boli vykonané v kvasných kadiach obsahu 5 hl s dvoma druhmi kvasníc pranych vodou a paralelne s prídavkom chlortetracyklínu v koncentrácii 20 γ/ml prácej vody. Pri týchto pokusoch sa kvasinky už nevyprali čistou vodou, aby sa skúšala tá alternatíva, že sa má vyhnúť reinfekcii kvasiniek mikrobiologicky znečistenou vodou, ako to býva v praxi.

Počas kvasenia sa sledovali obvyklé ukazovatele (°S, °C, bilancia kvasníc, morfológický a fyziologický stav buniek,

podiel mŕtvých kvasiniek, kvalita a kvantita infekcie). Vyrobené pivo sa skúšalo na trvanlivosť, na stopy po antibiotikách a vykonali sa degustačné skúšky.

#### Výsledky

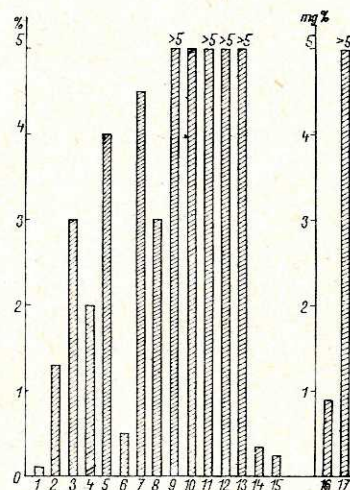
Výsledky stanovovania fungistatickej koncentrácie skúšaných chemikálií, pre pivovarské kvasinky (*Saccharomyces carlsbergensis*) sú zostavené do histogramu na obr. 1.



Obr. 1 — Histogram fungistatických koncentrácií chemikálií stanovených pomocou *Saccharomyces carlsbergensis*

na osi x stĺpce nad číslom 1 — kyselina fluorovodíková 2 — kyselina solná, 3 — kyselina dusičná, 4 — kyselina sirová, 5 — kyselina fosforečná, 6 — kyselina mravčia, 7 — kyselina octová, 8 — kyselina maselná, 9 — kyselina mliečna, 10 — kyselina oxálová, 11 — kyselina vinná, 12 — kyselina citrónová, 13 — alkohol, 14 — formaldehyd, 15 — lúh sodný, 16 — Ajatin, 17 — Sagén, na osi y = percentuálna stupnica, na osi y<sub>1</sub> = stupnica mg%.

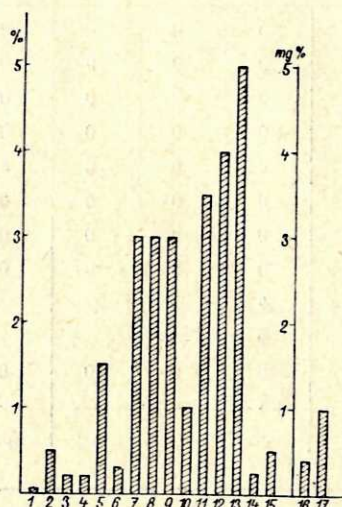
Priemerné výsledky paralelných pokusov s použitím divokých kvasiniek (*Saccharomyces pastorianus*, *Hansenula anomala*, *Candida albicans*, *Torulopsis berlese species*, *Pichia membranaefaciens*) ako testorganizmov sú uvedené v histograme na obr. 2.



Obr. 2 — Histogram fungistatických koncentrácií chemikálií stanovených na základe priemerných výsledkov na test-organizmoch: *Sacch. pastorianus*, *Hansenula anomala*, *Candida albicans*, *Torulopsis berlese species*, *Pichia membranaefaciens*. Údaje a hodnoty na stupniciach ako na obr. 1



Pokusy na stanovenie bakteriostatickej účinnosti sledovaných chemikálií na grampozitívnu časť testorganizmov (*Lactobacillus pastorianus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Sarcina lutea*) dávali priemerné výsledky graficky znázornené na obr. 3.



Obr. 3 — Histogram priemerných bakteriostatických koncentrácií chemikálií stanovených na testorganizmoch: *Lactobacillus pastorianus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Sarcina lutea*. Údaje a hodnoty na stupniciach ako na obr. 1

Obdobným spôsobom stanovené výsledky pre gramnegatívnu časť testorganizmov (*Acetobacter pasteurianum*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas cerevisiae*) vidieť z diagramu na obr. 4.

Vyhodnotenie výsledkov na stanovovanie protimikróbných účinkov chemikálií ukazuje na to, že sme prevážne až pri vyšších koncentráciách zistili inhibíciu testorganizmov, ako je uvedené v literatúre (Henneberg 1926, Compton, Cronyn, Read 1954). O použiteľnosti týchto dezinfekčných prostriedkov v praxi rozhoduje v prvom rade rozpätie medzi koncentráciou, ktorá inhibuje infekčnú mikroflóru a koncentráciou účinnou na produkčný mikroorganizmus, t.j. na pivovarské kvasinky. Z toho hľadiska obstáli kyselina soľná, kyselina dusičná, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina mliečna, kyselina oxalová a „Ajatin“. Tieto chemikálie sa použili pri ďalších pokusoch na stanovenie vplyvu prania z hľadiska kvasnej schopnosti. „Sagen“ sme vylúčili z ďalšieho sledovania pre slabý dezinfekčný účinok.

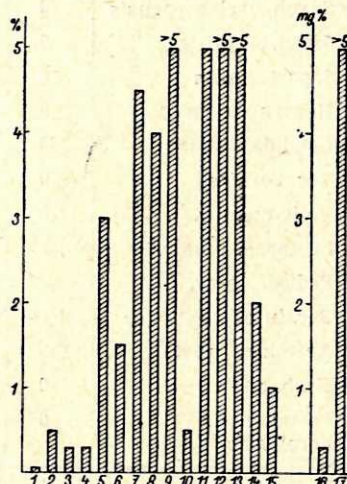
Výsledky testov stanovovania protimikróbného účinku antibiotík, sledovaný v rozpätí prakticky upotrebitelných koncentrácií, t.j. < 50  $\gamma$ /ml, je vyjadrený priemernými hodnotami inhibičnej dávky pre jednotlivé skupiny testorganizmov. Výsledky sú v tabuľke 1.

Výsledky sledovania účinkov prania na varných kvasinách, za použitia chemických a antibiotických dezinfekčných činidiel, vyjadrené na základe infekčného indexu (ii), ako aj podľa coli titru (po umelej infekcii), množivej (ME) a kvasnej energie (KE), ktoré sú hodnotené vo vzťahu k výsledkom príslušnej kontroly pranej vo vode, obsahuje tabuľka 2.

Výsledky ukazujú, že zo sledovaných dezinfekčných činidiel majú antibiotiká, a to najmä chlortetracyklín (CTC) a oxytetracyklín (OTC), relatívne najvýhodnejšie vlastnosti pri praní kvasiniek, lebo protimikróbnu účinnosť sprevádza zlepšenie fyziologického stavu varných kvasiniek, čo sa prejavuje relatívnym zvyšovaním ukazateľov ME a KE.

Z priemerných výsledkov stanovovania množivej energie (ME) kvasiniek (*Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae*) pranych rôznymi koncentraciami CTC a OTC dochádzame k poznatku, že použité antibiotické látky,

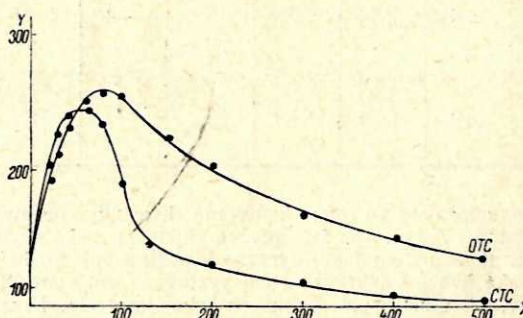
v istom rozpätí, účinkujú stimulačne na rast kvasiniek. Ako to ukazujú grafy na obr. 5 a 6, pohybujú sa optimálne stimulujúce koncentrácie pri CTC v hraniciach od 30 do 70  $\gamma$ /ml a pri OTC v hraniciach od 60 do 100  $\gamma$ /ml, pričom široké rozpätie optima sa javí ako zvýraznenie závislosti



Obr. 4 — Histogram priemerných bakteriostatických koncentrácií chemikálií stanovených pomocou testorganizmov: *Acetobacter pasteurianum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas cerevisiae*. Údaje a hodnoty na stupniciach ako na obr. 1

stimulácie od špecifických vlastností testorganizmu, resp. od podmienok fermentácie, ktorými je podmienená fyziológia kvasiniek.

Rastové krivky, zostrojené na základe výsledkov nefelometrických meraní, vyjadrujú závislosť rýchlosti začiatkovej fázy rastu kvasiniek od koncentrácie antibiotika v pravej vode. Ako vidieť z grafu na obr. 7, táto stimulácia (pri použití pravej vody s obsahom CTC 100  $\gamma$ /ml) je u pivovarských kvasiniek, vyjadrená relatívnym stupňom zákalu, okolo 25 %. Graf na obr. 8, ktorý zachytáva výsledky paralelných pokusov s kmeňom drożdžiarskych kvasiniek sa môže prakticky hodnotiť rovnako, t.j. ukazuje tiež na urýchlenie rastu kvasiniek v rozsahu do 25 %.



Obr. 5 — Vplyv koncentrácií CTC a OTC v pravej vode na množivú energiu *Saccharomyces carlsbergensis*

na osi x = koncentrácia v  $\gamma$ /ml,  
na osi y = číselná stupnica pre hodnoty ME

Z výsledkov manometrického stanovovania kvasenia a dýchania pod vplyvom antibiotík, najmä CTC, boli už niektoré aj publikované (Arpai, Janotková, Křižanová 1957, Arpai, Janotková 1957). Celkove ich môžeme rozdeliť na výsledky pokusov vykonaných v normálnej atmosfére a v kyslíkovom prostredí.

Výsledky kvasenia stanovené v normálnej atmosfére svedčia o tom, že kvasinky premyté chlortetracyklínom v prvých dvoch sledovaných hodinách kvasenia intenzív-



Tabuľka 1

Skupiny testorgan.	Mikroorganizmy	Množstvo antibiotika v $\gamma$ /ml									
		penicilín - K					streptomycin-sulf.				
		< 10	< 20	< 30	< 40	< 50	< 10	< 20	< 30	< 40	< 50
Kult. kvasinky	Sacch. carlsbergensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sacch. cerevisiae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Divoké kvasinky	S. pastorianus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hansen. anomala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Candida albicans	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tor. bjerlese	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pich. membr.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lactobac. pastor.	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
Bakt. skup. 1	Pedioc. cerev.	+	++	++	++	+++	+	+	++	++	++
	Sar. lutea	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++
Bakt. skup. 2	Acetobact. past.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esch. coli	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
	Pseudomon. cerevisiae	0	0	0	0	0	+	+	++	++	++

Tabuľka 1 (pokračovanie)

Množstvo antibiotika v $\gamma$ /ml														
chlortetracyklín					oxytetracyklín					aktidión				
< 10	< 20	< 30	< 40	< 50	< 10	< 20	< 30	< 40	< 50	< 10	< 20	< 30	< 40	< 50
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	+++
+	++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
++	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++	+++	0	0	0	0	0
++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+++	0	0	0	0	0
++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	0	0	0	0	0
++	++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	0	0	0	0	0

nejšie vylučovali plyn ako kontrolné kvasinky premyté vodovodnou vodou. Medzi pivovarskými a pekárskymi kvasinkami sa pritom javili výrazné kvantitatívne rozdiely. Pivovarské kvasinky, ktoré neboli vystavené vplyvom CTC roztokov, tj. slúžili pri pokusoch ako kontrola, kvasili zhruba za rovnakých podmienok priemerne až o 38 % intenzívnejšie než pekárske kvasinky. Rozdielnosť kvasných systémov sa však prejavovala ešte výraznejšie v reakcii, ktorá sa dostavila po praní CTC roztokmi. Ako vidieť aj z tabuľky 3 dosiahlo sa u pekárskych kvasiniek pod vplyvom CTC účinku 18 až 32 % zvýšenej kvasnej činnosti, kým u pivovarských kvasiniek sa dosiahnutá stimulácia pohybovala až v rozpätí od 22 do 59 %. Stimulácia, ako vyplýva z predložených výsledkov, mala charakter urýchlenia začiatkovej fázy kvasného pochodu. Výsledky vyhodnotené na účinnosť jednotlivých koncentrácií CTC roztokov poukazujú na to, že súhlasne s výsledkami predchádzajúcich pokusov, so stúpajúcou koncentráciou sa zvyšuje i relatívna intenzita stimulácie, pričom v rozpätí volených koncentrácií sa u pekárskych kvasiniek maximum stimulačnej účinnosti nezachytilo, kým u pivovarských kvasiniek sa optimum ukázalo pri koncentrácii

15  $\gamma$ /ml, čiže pri podstatne nižšej koncentrácii než bolo optimum stanovené pre stimuláciu rastu.

Paralelné stanovovania dýchania a kvasenia odhalili zaujímavé vzťahy medzi zmenami intenzity sledovaných metabolických prejavov u kultúr testorganizmov vystavených vplyvom CTC. Podobne ako pri kvasení aj pri sledovaní dýchania sme najprv stanovili vzájomné rozdiely medzi respiračnou intenzitou kontrolných resp. antibiotickým účinkom neexponovaných testorganizmov. Ako vidieť z tabuľky 4 namerané diferencie, ktoré v sledovanom intervale boli až + 50 % v prospech intenzity dýchania pivovarských kvasiniek, približne sa svojim rozťahom vyrovnali kvantitatívnej rozdielnosti kvasných systémov (prípadné rozdielnosti cytochromového spektra) stanovenej pri kvasení. Podobným spôsobom sa dali vyhodnocovať aj výsledky účinnosti prania CTC roztokmi. U pekárskych kvasiniek nastal v sledovanom intervale pokles intenzity dýchania v rozpätí od 24 do 41 %, kým u pivovarských kvasiniek, ktoré už aj pri kvasných skúškach ukázali výraznejšie zmeny, pohybovalo sa zníženie intenzity dýchania v hraniciach od 29 až do 65 %, podľa výšky koncentrácie CTC roztokov použitých na pranie.



Tabuľka 2

Dezinfekčné činidlo	Koncentrácia v %	Čas prania pri teplote 5 °C v hodinách	ii		koli titer		ME		KE v cm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> za hod.	
			0% oproti kontrole		0% oproti kontrole		0% oproti kontrole		(10 <sup>3</sup> buniek)	% oproti kontrole
1. kys. soľná	0,7	2	0,426	98	0,06	16,6	167	92	1,65	88
2. kys. dusičná	0,1	2	0,421	97	0,08	12,5	156	86	1,74	93
3. kys. sírová	0,3	2	0,426	98	0,10	10,0	189	104	1,84	97
4. kys. fosforečná	0,3	2	0,435	100	0,05	20,0	196	108	2,17	116
5. kys. mlieč-na	2,0	2	0,478	110	0,12	8,5	142	78	1,59	85
6. kys. oxálová	2,0	2	0,413	95	0,06	16,6	115	63	0,97	52
7. ajatín	0,001	2	0,356	82	1,5	0,66	82	45	1,07	57
8. CTC	0,001	2	0,378	87	> 2	0,5	238	131	2,21	123
9. OTC	0,001	2	0,400	92	> 2	0,5	204	112	1,94	106
10. vodovodná voda (kontrola)	—	2	0,435	100	0,01	100	182	100	1,88	100

Tabuľka 3

	Koncentrácia CTC - roztoku γ/ml	Priemerné hodnoty pribúdania plynu (kvasenie) μl/hod./10 <sup>8</sup> buniek	%
Sacch. cerevisiae	0	0,485	kontrola
	5	0,579	+ 18
	15	0,617	+ 29
	25	0,643	+ 32
Sacch. carlsbergensis Hansen	0	0,672	kontrola
	5	0,825	+ 22
	15	1,068	+ 59
	25	0,941	+ 40

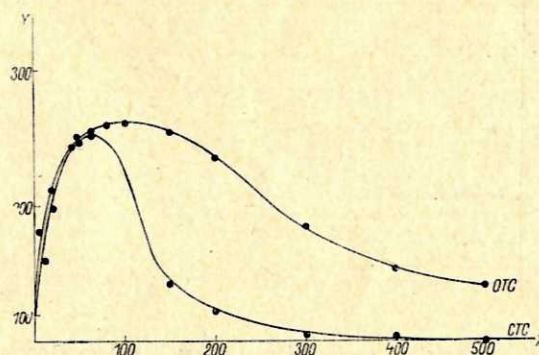
Z výsledkov na Warburgovom aparáte sa javí nepriama závislosť medzi stúpajúcimi CTC koncentraciami, resp. nimi vyvolanou špecifickou stimuláciou kvasenia a inhibíciou dychania, pričom však táto korelácia nemá vždy paralelný priebeh.

Tabuľka 4

	Koncentrácia CTC - roztoku γ/ml	Priemerné hodnoty úbytku plynu (dýchanie) μl/hod./10 <sup>8</sup> buniek	%
Sacch. cerevisiae	0	0,052	kontrola
	5	0,040	— 24
	15	0,037	— 29
	25	0,031	— 41
Sacch. carlsbergensis Hansen	0	0,078	kontrola
	5	0,057	— 27
	15	0,036	— 52
	25	0,025	— 65

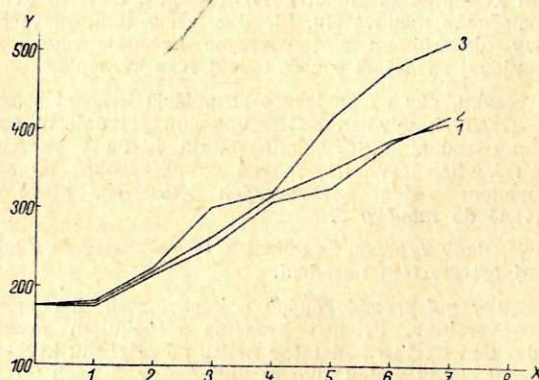
Výsledky manometrických meraní v kyslíkovom prostredí sa vyhodnocujú aj z hľadiska kvasenia a dýchania. Pri porovnávaní kvasnej schopnosti kultúr, ktoré sa

udržiavali v kyslíkovom prostredí rovnako dlho ako paralelné kultúry v normálnej atmosfére, sa ukázalo značné oslabenie kvasenia pod vplyvom kyslíka. Pozri graficky znázornené kvasné hodnoty na obr. 9. Chlórtetracyklín



Obr. 6 — Vplyv koncentrácií CTC a OTC v pravej vode na množivú energiu *Saccharomyces cerevisiae*

na osi x = koncentrácia v γ/ml,  
na osi y = číselná stupnica pre hodnoty ME



Obr. 7 — Závislosť rýchlosti rastu *Saccharomyces carlsbergensis* od koncentrácie CTC v pravej vode

č. 1 = praná vodou (kontrola), č. 2 = 25 γ CTC/ml, č. 3 = 100 γ CTC/ml,  
na osi x = čas v hodinách, na osi y = percento relatívneho zákalu

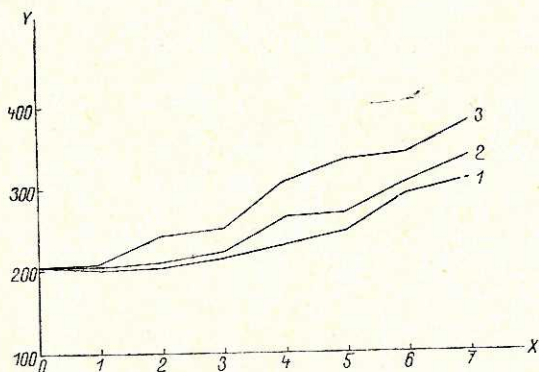


Tabuľka 5

Spôsob prania pred prvým nasadením	Q $\frac{O_2}{CO_2}$				
	I	II	III	IV	V
roztok CTC 20 $\gamma$ /ml	173	163	165	155	138
vodou (kontrola)	132	138	135	144	140

účinkoval protichodne brzdiacemu účinku kyslíka na kvasenie, a to rovnako pri pekárskejších, ako aj pri pivovarských kvasinkách, pričom vzájomné vzťahy respiračných zmien podmienených vplyvom kyslíka sa u sledovaných kmeňov len málo líšili. Rušivý zásah CTC do brzdiaceho účinku kyslíka na kvasenie sa zvýraznil až pri relatívne vyššej koncentrácii (25  $\gamma$ /ml).

Výsledky zo sledovania dýchania znázorňujú krivky na obr. 10. Ukazujú, že pod vplyvom kyslíka stúpa intenzita dýchania, čiže dochádza k opačnému účinku ako sme spozorovali pri kvasení. Pranie kvasiniek CTC roztokom pôsobilo však opäť protichodne od účinku kyslíka, čo malo za následok výrazne znížovanie krivky dýchania.



Obr. 8 — Závislosť rýchlosti rastu *Saccharomyces cerevisiae* od koncentrácie CTC v pravej vode. Údaje a hodnoty ako na obr. 7

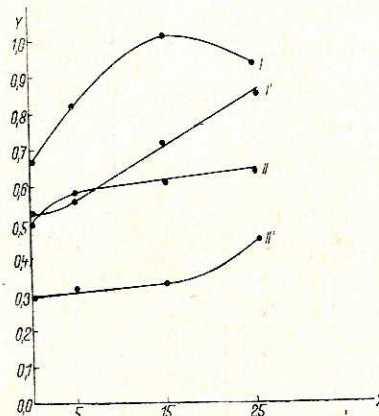
Rôznymi pracovnými postupmi dosiahnuté výsledky manometrických stanovení respiračných zmien vyvolaných praním kvasiniek za použitia CTC roztokov sa dajú uviesť na spoločného menovateľa, ktorý záleží v tom, že všetky prejavy ukazujú na zintenzívnenie kvasnej schopnosti, prejavujúcej sa najmä v začiatkovej fáze kvasenia.

Na otázku, ako sa prejavuje stimulácia kvasnej schopnosti kvasiniek vyvolanej CTC vplyvom pri ďalšom opätovnom nasadení kultúry, odpovedajú hodnoty metabolických koeficientov stanovených za päťnásobne po sebe opakovanom vedení pivovarských kvasiniek, ktoré sú zostavené do tabuľky 5.

Z výsledkov vyplýva, že účinok CTC sa prejavuje kladne ešte aj pri štvrtom nasadení.

Výsledky poloprevádzkových pokusov mali iba orientačný charakter. Priebeh kvasenia s inokulom pránym s prídavkom CTC sa podstatne nelíšil od priebehu kvasenia po pranie čistou vodou, ako to vidieť z grafických údajov na obraze 11. Výťažky kvasníc, práných CTC boli o niečo, t.j. v priemere o 5 % vyššie než u kvasníc práných vodou. Aj fyziologický stav kvasníc preparovaných CTC bol priaznivejší; podiel mŕtvych buniek a infekčnej mikroflóry bol nižší. Trvanlivosť piva v jednom prípade stúpala po CTC praní z 16½ dní na 19 dní, v druhom prípade

bola prakticky rovnaká, t.j. 15, resp. 14 a ½ dňa. Pri degustačných skúškach posudzovatelia nenašli podstatných rozdielov, t.j. vzorky získali z celkovo možných 75 bodov 71, resp. 71,6 a 69,5, resp. 67,7, kde na druhom mieste sú hodnoty pre piva vyrobené s kvasinkami pránymi pomocou CTC.



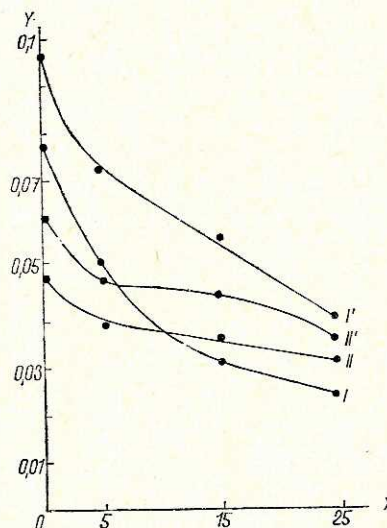
Obr. 9 — Priebeh kvasenia u pivovarských a pekárskejších kvasiniek v normálnej atmosfére a pod kyslíkom

pre *Saccharomyces carlsbergensis* (I = v normálnej atmosfére, I' = pod kyslíkom), pre *Saccharomyces cerevisiae* (II = v normálnej atmosfére, II' = pod kyslíkom).

na osi x = CTC koncentrácia v  $\gamma$ /ml,

na osi y = objem produkovaného plynu v ml/10<sup>5</sup> buniek

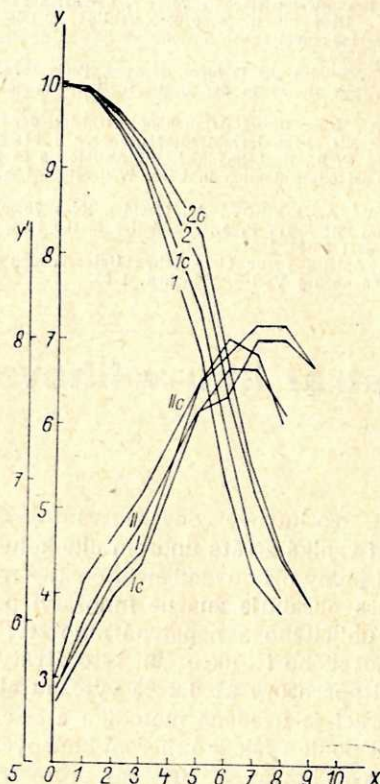
Vzorky pív boli zaslané na stanovovanie stôp, resp. zvyškov po CTC na Výskumný ústav antibiotík v Roztókách pri Prahe. Pri citlivosti testovacej metódy 0,2  $\gamma$ /ml dopadli všetky skúšky negatívne, t.j. v žiadnej vzorke sa CTC nedokázal. Je to v plnom súlade s našim experimentálnym poznatkom, že pracie vody dekantované po dvojhodinovej aplikácii majú 80–90 % pôvodnej koncentrácie CTC, čiže len 10–20 % celkového množstva CTC pridaného do pravej vody by mohlo zo zákvasom prejsť do záparov, resp. mladinky. To znamená, že aj v prípade ak vylúčime straty na CTC fyzikálnou alebo chemickou deštrukciou, dostáva sa zvyškový CTC len v takom riedení do kvasného substrátu, ktoré odpovie percentuálnemu pomeru zákvasu k substrátu, t.j. obvyčajne 1 : 250. Tým sa zníži možná koncentrácia CTC na 0,004–0,008  $\gamma$ /ml. Ale aj toto prakticky nedokázateľné množstvo CTC by mohlo



Obr. 10 — Priebeh dýchania u pivovarských a pekárskejších kvasiniek v normálnej atmosfére a pod kyslíkom. Spôsob vyznačenia ako na obr. 9



byť vo finálnom produkte, ako sme už uviedli, len za predpokladu, že CTC prechádza kvantitatívne celým výrobným procesom, čo je absolútne vylúčené. Z toho vyplýva, že aplikácia CTC pri praní prakticky nevznáša CTC do kvasného procesu a nemôže sa dostať do finálneho produktu a to ani v tom prípade, keď sa už kvasinky po preparácii antibiotikom viac nevyperú, ale sa priamo použijú na nasadenie. Je to dôležité vzhľadom na pomery v praxi, kde by ďalšie pranie mohlo vyvolať reinfekciu.



Obr. 11 — Priebeh kvasenia za poloprevádzkových pokusov

krivka 1 — sacharizácia (°S) pri kvasení vodou praných kvasiniek (1. pokus),  
1c — sacharizácia (°S) pri kvasení CTC praných kvasiniek (1. pokus),  
2 — sacharizácia (°S) pri kvasení vodou praných kvasiniek (2. pokus),  
2c — sacharizácia (°S) pri kvasení CTC praných kvasiniek (2. pokus),  
I — teplota (°C) pri kvasení vodou praných kvasiniek (1. pokus),  
Ic — teplota (°C) pri kvasení CTC praných kvasiniek (1. pokus),  
II — teplota (°C) pri kvasení vodou praných kvasiniek (2. pokus),  
Ilc — teplota (°C) pri kvasení CTC praných kvasiniek (2. pokus),  
na osi x = čas kvasenia v dňoch,  
na osi y = stupnica pre °S,  
na osi y' = stupnica pre °C

### Diskusia

V úvode sme spomenuli, že na sledovanie aplikačných možností dezinfekčných činidiel, tj. chemikálií a najmä antibiotík pri praní kvasiniek sme pristúpili pre nedostatkový čistiaci efekt prania s čistou vodou, najmä v tých prípadoch, keď táto nie je mikrobiologicky úplne bezchybná. Výsledky pokusov však ukázali, že pranie antibiotikami nemá význam len v odstránení bakteriálnej časti infekčnej mikroflóry, ale aj zlepšuje fyziologické vlastnosti kvasiniek, tj. stimuluje ich kvasnú schopnosť. Tento poznatok je zaujímavý ako z hľadiska mechanizmu stimulácie, tak aj z hľadiska praktických aplikačných možností v kvasnom priemysle. Najmä chlortetracyklín, ktorý sa u nás vyrába v takom rozsahu a pri takej cene, že sa s jeho technickou aplikáciou môže reálne kalkulovať, ukázal dobré technologické vlastnosti. Pri použití 20 γ na ml prácej vody by náklady na pranie inokula mohli byť 3 až 4 Kčs na 100 hl kvasného substrátu. Prípravu pracích roztokov by uľahčili dávkové balenia CTC. Antibiotiká by

sa pridávali výlučne k prvým pracím vodám. Obavy ohľadne možnosti, že by sa stopy antibiotika, najmä CTC, mohli dostať do piva, sú celkom neopodstatnené a boli jednoznačne vyvrátené. Týmto je v podstate zadostučinené požiadavka, aby potraviny neobsahovali dezinfekčné látky.

### Súhrn

Sledovali sme použiteľnosť rozličných chemikálií a najmä niekoľkých antibiotík ako prísad pri praní kvasiniek. Účinky týchto látok sa skúšali na kultúrnych a divokých kvasinkách, ako aj na baktériách vyskytujúcich sa ako infekčná mikroflóra varných kvasníc. Ukázali sa podstatné prednosti antibiotík, najmä chlortetracyklínu (CTC), ktorý okrem toho, že účinne inhibuje infekčné baktérie, pôsobil aj stimulačne na fermentačné schopnosti kvasiniek. Boli stanovené optimálne koncentrácie pre stimuláciu rastu a kvasenia pre pivovarnícke a pekárske kvasinky, ako aj zmeny, resp. presuny, ku ktorým dochádza v kvasení a dýchaní, resp. v ich vzájomnom vzťahu pod vplyvom CTC. Urýchlenie rastu dosahovalo približne 25 %, kým stimulácia začiatkovej fázy kvasenia sa pohybovala v rozpätí od 18 po 59 %, podľa druhu kvasiniek. Vplyv antibiotík sa prejavoval ešte aj po štvrtom pasážovaní.

Za poloprevádzkových pokusov výroby piva boli kvasinky, prané pomocou CTC, v lepšom fyziologickom stave ako paralelná kontrola praná vodou. Do piva sa CTC nedostal, aj keď sa kvasinky bez vyprania použili priamo ako násady, čo sa dokázalo biologickým testom o citlivosti 0,2 γ/ml, ako aj CTC — bilanciou početne podložené. Chutové vlastnosti sa nezmenili.

### Резюме

Авторы изучали возможность применения разных химических веществ, в первую очередь некоторых антибиотиков в качестве приправ при промывке дрожжей. Воздействию химических препаратов подвергались как чистые культуры, так и дрожжи дикие а кроме того и бактерии встречающиеся на дрожжах как инфекционная микрофлора. Опыты выявили весьма положительное влияние антибиотиков, главным образом хлортетрациклина (ХТЦ), который отличается не только ингибирующим действием на заражающие микробы, но и стимулирующим влиянием на бродильные свойства дрожжей. Были определены оптимальные концентрации химических веществ стимулирующие размножение и бродильные свойства дрожжей пивных и пекарских. Кроме того изучались изменения вызванные в ходе брожения и дыхания а также во взаимном отношении этих факторов прибавкой хлортетрациклина. Ускорение роста выражается показателем 25 %, стимуляция же начальной фазы брожения колеблется в пределах от 18 до 59 % в зависимости от вида дрожжей. Влияние антибиотиков имеет длительный характер.

При опытах поставленных в полупромышленном масштабе были дрожжи промытые хлортетрациклином и использованные на производстве пива в лучшем физиологическом состоянии чем параллельная проба промытая водой. В пиво препарат ХТЦ не попал даже в том случае когда дрожжи шли без промывки непосредственно в затор, что контролировалось точными анализами и расчетом. Вкусовые качества пива не изменились.

### Zusammenfassung

Wir verfolgten die Verwendbarkeit verschiedener Chemikalien und hauptsächlich einiger Antibiotika als Zugabe bei der Hefewässerung. Die Wirkung dieser Stoffe wurde auf Kulturhefen und wilden Hefen erprobt, sowie auch auf den Bakterien, welche die Infektionsmikroflora der Bierhefe bilden. Die Versuche führten zur Feststellung der wesentlichen Vorteile der Antibiotika, namentlich des Chlortetracyklins (CTC), das nicht nur wirksam die Infektionsbakterien inhibierte, sondern auch stimulierend auf die Fermentationsfähigkeit der Hefen wirkte. Ermittelt wurde weiter die Optimalkonzentration für Wachstum- und Gärungsstimulierung bei Brauerei- und Bäckereihefen, sowie auch die Veränderungen, bzw. Verschiebungen im Laufe der Gärung und Atmung, bzw. in ihrer Wechselbeziehung unter CTC-Einfluß. Die Wachstumbeschleunigung betrug ungefähr 25 %, die Stimulation der ersten Gärungsphase bewegte sich innerhalb der Spanne 18 bis 59 %, je nach der Art der Hefe. Der Einfluß der Antibiotika war noch nach der 4. Passagierung bemerkbar.

Bei den Kleinversuchen der Biererzeugung waren die mit Zugabe von CTC gewaschenen Hefen in einem bes-



seren physiologischen Zustand als das Parallelmuster, das nur mit Wasser gewaschen wurde. Im Bier wurde das CTC nicht gefunden, auch wenn die Hefen ohne Waschen direkt zum Anstellen benützt wurden, was durch biologische Teste von Empfindlichkeit 0,2 $\gamma$ /ml und durch die CTC-Bilanz bewiesen wurde. Der Geschmack blieb unverändert.

## Literatúra

- [1] ARPAI J., JANOTKOVÁ O., Chlortetracyklin als Gärungsstimulator. Brauwissenschaft 97 (10):246, 1957.
- [2] ARPAI J., JANOTKOVÁ O., KRIŽANOVÁ M., Respiračné zmeny kvasiniek pod vplyvom chlortetracyklínu. Biológia 12:821, 1957.
- [3] ARPAI J., JANOTKOVÁ O., Štúdium prania kvasiniek I. Vplyv prania čistou vodou, s prídavkami chemikálií a najmä antibiotík na mikrobiologickú čistotu varných kvasiniek (časť I.). Kvasný průmysl 4, 223, 1958.
- [4] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (edit. R. S. Breed, E. G. D. Murray, A. Parker Hitchema). The Williams and Wilkins Comp. Baltimore 1948.
- [5] CASE A. C., LYON A. I. L., Action of polymyxin on some common brewery bacteria. J. Inst. Brew. 62:477, 1956.
- [6] COMPTON J., CRONYN J. B., READ W. F., Some observations on washing ale yeasts with phosphoric acid. Wallerstein Lab. Com. 17:19, 1954.
- [7] HAAS G. J., Influence of antibiotics on some biological contaminants in the brewery. Wallerstein Lab. Comm. 18:253, 1955.
- [8] HENNEBERG W., Gärungsbakteriologisches Praktikum. Verlag Parey, Berlin 1909.
- [9] HENNEBERG W., Handbuch der Gärungsbakteriologie. Verlag Parey, Berlin, 1926.
- [10] KOCOWA E., Działanie penicyliny i aureomycyny na *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermobacterium cereale* i *Acetobacter rancens*. Acta microbiologica Polonica 6:11, 1955.
- [11] KÖHLER H., Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung. Akademie-Verlag, Berlin 1956.
- [12] KUTSCHER V., Beitrag zur Reinigung von Anstellhefen mit Phosphorsäure. Brauwirtschaft 78:4-7, 83-85, 1956.
- [13] MÜLLER A., Über die moderne Desinfektion mittels quaternärer Amoniumverbindungen. Lebensmittelindustrie für Brauerei und Mälzerei 5:107, 1953.
- [14] PASTEUR L., Etudes sur la bière. Masson, Paris 1876.
- [15] RAZGA Z., Infektionen in der Brauerei. Verpflegungs-Ind. 7:293, 1953.
- [16] STÖCKLI A., Über die Untersuchungsmethodik der biologischen Betriebskontrolle. Schweizer Brauerei-Rundschau 64:221, 1953.
- [17] SRANDSKOV F. B., BOCKELMANN J. B.: Antibiotics as inhibitors of microbiological contamination in beer. Wallerstein Lab. Comm. 17:25, 1954.
- [18] VAVRUCHOVÁ A., KOCKOVÁ A., Movidyn Kvas 78:301, 1950.
- [19] VISOR F. C., PRESCOTT F. J., Antibiotics in the brewing industry. Brewers Digest 29:49, 1954.
- [20] WILL H., Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung. Oldenbourg Verlag, München, 1909.