

Vplyv niektorých povrchove aktívnych látok na mikroflóru vinárskych prevádzok

Doc. Ing. E. MINÁRIK, CSc., Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, Bratislava

633.255:576.8
661.18

Do redakcie došlo 10. 9. 1970

Od aplikácie moderných sanitačných prostriedkov zabezpečujúcich maximálnu hygienu výroby závisí do istej miery aj stabilita vinárskych výrobkov. Sústavné znižovanie počtu nežiadateľných mikroorganizmov na minimum má preto v moderných vinárskych prevádzkach veľký význam [1].

Zo širšieho štúdia ekológie kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov druhothných stanovišť v prevádzkach vinárskych závodov v Československu, ktorého výsledky sme uverejnili skôr [2, 3, 4, 5], vyplynuli aj niektoré aktuálne problémy súvisiace s hygienou a sanitáciou v závodoch. Tieto problémy vyvstali hlavne z nutnosti hľadať vysokoaktívne mikrobiocídne prostriedky, ktoré by boli z hľadiska ochrany zdravia v potravinárskom priemysle nezávadné, účinné v minimálnych koncentráciách a neovplyvňujúce organoleptické vlastnosti vína. Týmto požiadavkám by mohli zodpovedať povrchove aktívne látky typu kvarterných amónnych zlúčenín a typu vyššie molekulárnych amínokyselín — amfotenzidov. U nás dosiahol dobré výsledky s prípravkom SEPTONEX, SPOFA Svz [11].

Materiál a metodika

V laboratórnych a prevádzkových podmienkach sme preskúšali účinnosť dvoch povrchove aktívnych látok: prípravku DIMANIN BAYER, ktorého účinnou látkou je v podstate kvarterná amónná zlúčenina a prípravku TAGONIN BYG-GULDEN LOMBERG, ktorý je založený na báze vyššie molekulárnych aminokyselín. Účinnosť oboch zahraničných prípravkov sme porovnávali s účinkom obchodného prípravku ľanového oleja, ktorý sa bežne používa na vonkajšie nátery drevených sudov, a hydroxydom sodným používaného na dekontamináciu zariadení vo vinárstve.

DIMANIN (alkyl-dimetylbenzylamóniumchlorid) je povrchove aktívny dekontaminačný prostriedok, ktorý je na trhu v podobe bieleho vo vode dobre rozpustného prášku. Podľa údajov výrobcu [6] je účinný už ako zriedený 0,1% vodný roztok. Povrchové napätie 0,1% roz-

toku je asi 35 dyn/cm, čo umožňuje dekontamináciu aj drsnejších plôch, prípadne plôch s rýhami. Spektrum účinnosti prípravku má byť široké, a zahŕňa kvasinky, baktérie i plesne. Aplikuje sa natieraním alebo rozprašovaním zriedených roztokov na ošetrované plochy.

TAGONIN (zmes dodecyl-di-aminoetylglýcinu, monolauryl-di-aminoetylglýcinu, metyldiglycinu a močoviny) je povrchove aktívny amfoterný dekontaminačný prostriedok obsahujúci výlučne nejedovaté molekuly vyšších aminokyselín. Chemické zloženie účinnej látky sa uvádza takto: $R_1NH.C_2H_4.NH.C_2H_4NH.CH_2.COOH$. Na trhu je v predaji ako žltá penivá tekutina s pH 9,1—9,4. Z koncentráty sa pripravujú zriedené aplikačné roztoky [7]. Ako uvádza výrobca, účinnosť proti mikroorganizmom možno dosiahnuť od 1% koncentrácie, pričom na 1000 m² plochy má stačiť asi 100 lit. 1% roztoku (= 1 lit. koncentráty). TAGONIN bol v ČSSR pripustený v potravinárskom priemysle hlavným hygienikom [8].

Laboratórne pokusy

Použili sa nasledujúce testorganizmy:

<i>Sacch. cerevisiae</i>	kmeň Hliník 1
<i>Sacch. oviformis</i> ,	kmeň Bratislava 1
<i>C. mycoderma</i> ,	kmeň 22-2-1
<i>T. famata</i> ,	kmeň 20-5-1
<i>P. notatum</i> ,	kmeň č. 8
<i>A. niger</i> ,	kmeň č. 12
<i>N. sitophila</i> ,	kmeň č. 17

Všetky použité mikroorganizmy boli zo zbierky mikroorganizmov VÚVV v Bratislave.

Rast mikroorganizmov

Postupovalo sa tak, že sa do Petriho misiek s 2% sladinkovým agarom a príslušným prípravkom pridala zriedená suspenzia 3dňovej kultúry (asi 1 ml) tak, aby v kontrolných miskách bez prípravku nevyrástlo viac ako 200 kolónií. Inokulovalo sa do ešte teplého celkom nestuhnutého agaru.

Používali sa 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 a 3,0% DIMANINU, TAGONINU a ľanového oleja, a 0,5 a 1,0 % roztok NaOH.

Rast kolónií mikroorganizmov pri 26 °C sme po-

zorovali po dobu 28 dní. Pri zhodnotení rastu sa interval spoľahlivosti I počítal zo vzťahu

$$I_{95} = 2 \frac{\bar{N}}{n}$$

kde \bar{N} je priemerný počet kolónií počítaný na n Petriho miskách. Tento vzťah možno použiť pri počte kolónií \bar{N} väčšom ako 30 na jednej miske [9, 10].

Kvasné skúšky

Vplyv preparátov DIMANINU a TAGONINU na fermentačnú aktivitu *Sacch. cerevisiae* a *Sacch. oviformis* sme sledovali kvantitatívne zo stanového úbytku CO_2 kvasiacich muštov, do ktorých sa pred kvasením pridalo 0,001 až 1,0 % jedného z oboch prípravkov. 250 ml sterilného muštu v 500 ml kvasných bankách sa očkovovalo 2,5 % 3dňovej kultúry kvasiniek. Banky sa uzavreli kvasnou trubicou s H_2SO_4 a zátky zaliali parafinom. Denným váženním baniek sa stanovoval úbytok kyslíčnika uhlíčitého, resp. priebeh kvasenia.

Prevádzkové pokusy

V pokusnej pivnici Výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave uskutočnili sme dekontamináciu stien a sudov uvedenými látkami. Kontrolné steny, resp. sudy sme ošetrovali obvyklým spôsobom (sudy ľanovým olejom, resp. utieraním, steny opláchnutím vodou).

DIMANIN a TAGONIN sme aplikovali postrekom ručnou vinohradníckou striekačkou na dosucha potierané sudy, resp. suché steny, ľanový olej sme nanášali na sudy štetcom.

Teplota pivnice počas pokusov vykonávaných od apríla do júla 1968 kolísala medzi 11 až 14 °C, relatívna vlhkosť medzi 78 až 84 %.

Výsledky a ich zhodnotenie

Laboratórne pokusy

Najvyšší inhibičný účinok na mikroorganizmy vykazoval prípravok DIMANIN, ktorý s výnimkou *A. niger* potlačil rast už pri 0,1% koncentrácií. TAGONIN bol za tých istých podmienok účinný od 1 % pri kvasinkách, od 1,5 % pri ostatných mikroorganizmoch s výnimkou *A. niger*, ktorého rast potlačil až pri 2% koncentrácií (tabuľka 1—2).

Ľanový olej nemá inhibičný vplyv na rast mikroorganizmov. Ani 3 % oleja v substráte rast nepotlačil. 1% NaOH inhiboval rast kvasiniek (s výnimkou *T. famata*) a *A. niger*. Rast *T. famata* a *N. sitophila* iba oneskoril (tabuľka 3). Pri 32 °C je mikrobicídny účinok NaOH vyšší: pri 60min. pôsobení 0,5% NaOH boli usmrtené všetky mikroorganizmy, pri 1% NaOH a 10min. pôsobení sa docielil ten istý efekt (tabuľka 4).

Do 0,0075% DIMANIN neovplyvňuje kvasnú aktivitu *Sacch. oviformis*. 0,01 a 0,025 % prípravku spôsobili spomalenie kvasenia a koncentrácie nad 0,5 % kvasenie úplne zablokovali (obr. 1). Vplyv DIMANINU a TAGONINU na produkciu alkoholu a prchavých kyselín v mušte vidieť v tabuľke 5.

Tabuľka 1. Vplyv Dimaninu na rast mikroorganizmov

Mikroorganizmus	0,1 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %	3,0 %	Kontrola
	Priemer počtu kolónií $\bar{N} \cdot \text{ml}^{-1} \pm I_{95}$						
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	—	—	—	—	124 ± 12
<i>S. oviformis</i>	—	—	—	—	—	—	116 ± 7
<i>C. mycoderma</i>	—	—	—	—	—	—	144 ± 18
<i>T. famata</i>	—	—	—	—	—	—	192 ± 6
<i>P. notatum</i>	—	—	—	—	—	—	130 ± 16
<i>A. niger</i>	105 ± 11	—	—	—	—	—	141 ± 7
<i>N. sitophila</i>	—	—	—	—	—	—	112 ± 5

Tabuľka 2. Vplyv Tagoninu na rast mikroorganizmov

Mikroorganizmus	0,1 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %	3,0 %	Kontrola
	Priemer počtu kolónií $\bar{N} \cdot \text{ml}^{-1} \pm I_{95}$						
<i>S. cerevisiae</i>	119 ± 10	110 ± 6	—	—	—	—	150 ± 6
<i>S. oviformis</i>	115 ± 4	—	—	—	—	—	132 ± 7
<i>C. mycoderma</i>	150 ± 11	139 ± 12	—	—	—	—	161 ± 6
<i>T. famata</i>	110 ± 7	105 ± 9	—	—	—	—	139 ± 9
<i>P. notatum</i>	115 ± 9	112 ± 8	63 ± 3	—	—	—	129 ± 5
<i>A. niger</i>	141 ± 11	132 ± 7	48 ± 4	29 ± 6	—	—	149 ± 6
<i>N. sitophila</i>	129 ± 10	110 ± 6	29 ± 3	—	—	—	151 ± 9

Tabuľka 3. Vplyv lanového oleja a hydroxidu sodného na rast mikroorganizmov

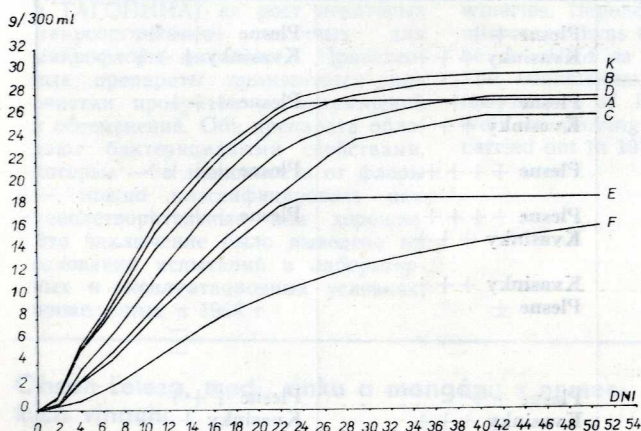
Mikroorganizmus	L a n o v ý o l e j						NaOH		Kontrola
	0,1 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %	3,0 %	0,5 %	1,0 %	
	Priemer počtu kolónií \bar{N} . ml ⁻¹ ± I ₉₅								
<i>S. cerevisiae</i>	160 ± 9	139 ± 7	153 ± 13	147 ± 9	**))	62 ± 17	29	—	171 ± 6
<i>S. oviformis</i>	152 ± 7	142 ± 9	138 ± 11	129 ± 8	98 ± 3	27	38	—	168 ± 8
<i>C. mycoderma</i>	185 ± 13	160 ± 11	128 ± 9	130 ± 9	111 ± 3	38 ± 3	24	—	131 ± 7
<i>T. famata</i>	149 ± 6	139 ± 9	140	128 ± 7	131 ± 6	101 ± 16	100 ± 16	±	148 ± 9
<i>P. notatum</i> *)	—	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i> *)	+	+	+	+	+	+	+	—	+
<i>N. sitophila</i> *)	+	+	+	+	+	+	+	±	+

Poznámka: *) vyhodnotený len rast (nespočítateľný počet kolónií)
**) kontaminácia

Oproti kontrole bola tvorba alkoholu vždy nižšia. Pri DIMANINE sa markantné zníženie produkcie alkoholu prejavilo od 0,01 %, pri TAGONINE od 0,0025 %. Pri 0,05 % DIMANINU a 0,075 % TAGONINU ku kvaseniu už vôbec nedošlo. DIMANIN mierne zvyšoval produkciu prchavých kyselín, TAGONIN, naopak, túto skôr znižoval.

Všeobecne možno konštatovať, že DIMANIN je voči rastu i kvasnej aktivite účinnejší ako TAGONIN. Zdá sa, že je aj proti plesniam účinnejší.

Lanový olej, ako sa aj očakávalo, nemá prakticky žiadny inhibičný účinok. Nátery na sudy síce zvyšujú trvanlivosť dreva, čo vyplýva z toho, že je vysychavým olejom, ktorý sa dôsledkom dvojných väzieb svojich nenasýtených kyselín ľahko oxiduje [12], pričom na povrchu dreva vytvára film, ktorý bráni presakovaniu vlhkosti cez póry; tým sa životnosť sudov predlžuje. Avšak na povrchu tohoto filmu môžu mikroorganizmy rásť, čo sa ukázalo pri sledovaní prevádzkových pokusov v plnej miere.



Obr. 1. Vplyv Dimaninu na kvasnú aktivitu *Saccharomyces oviformis*

A — 0,001 %, B — 0,0025 %, C — 0,005 %, D — 0,0075 %, E — 0,01 %
F — 0,025 % prípravku v mušte, K — kontrola.

Prevádzkové pokusy

Ošetrovanie sudov

K pokusom sme použili 12 drevených sudov (tabuľka 6); sudy č. 1—6 boli 10—12ročné, sudy č. 7—12 pomerne nové, 3—4ročné. Na 1 sud do obsahu

Tabuľka 4. Vplyv zvýšenej teploty (32 °C) a doby pôsobenia NaOH na mikroorganizmy

Mikroorganizmus	0,5 %			1,0 %			2,0 %		
	10'	30'	60'	10'	30'	60'	10'	30'	60'
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. oviformis</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. mycoderma</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. famata</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. notatum</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. niger</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>N. sitophila</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Tabuľka 5. Tvorba alkoholu a prchavých kyselín v muštach obsahujúcich Dimanin a Tagonin

Koncentrácia prípravku %	DIMANIN		TAGONIN	
	Alkohol obj. %	Prchavé kyseliny g/l	Alkohol obj. %	Prchavé kyseliny g/l
0,001	15,20	0,96	15,28	0,60
0,0025	16,00	0,90	15,37	0,61
0,005	14,75	0,98	15,11	0,60
0,0075	16,00	0,96	15,43	0,45
0,01	11,03	0,78	15,03	0,42
0,025	9,79	0,72	7,98	0,32
0,05	1,14	0,13	2,77	0,34
0,075	1,14	0,18	0,87	0,22
0,1	1,14	0,18	0,87	0,22
0,25	1,14	0,18	1,14	0,22
0,50	1,14	0,18	1,00	0,08
0,75	1,14	0,11	0,87	0,19
1,00	0,93	0,06	1,00	0,10
Kontrola	16,37	0,48	15,91	0,60

15 hl sa spotrebovalo priemerne asi 3 l dekontaminačného roztoku, na 1 sud do obsahu 25 hl asi 5 l. Po 1, 4 a 9 dňoch sme odobrali vzorky otlačkov z rôznych častí vonkajších stien sudov (priemerne 5—6) pomocou Duchoslavových otlačkových misiek so živným agarom. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 7.

Z pokusov je zrejmé, že 2% TAGONIN a 1 až 2% DIMANIN zabránili rastu kvasiniek a plesní na povrchu dreva sudov po dobu asi 10 dní. Lanový olej

rastu mikroorganizmov nezabránil. Po 11 až 12 dňoch bolo treba ošetrovanie vždy opakovať; pri kontrolných neošetrených sudoch bol rast mikroorganizmov na dreve zjavne už vizuálne po 48 hodinách.

Ošetrovanie steny v pivnici

Steny obložené alitkami s glazúrou sme ošetrovali 1% roztokmi jedného z oboch prípravkov. Po 1, 4 a 9 dňoch sme odoberali vzorky otlačkov ako sa už uviedlo. Výsledky vidieť v tabuľke 8.

Tabuľka 6. Prehľad ošetrovaných sudov

Číslo pokusu	Veľkosť suda hl	Spôsob ošetrovania
1	25	Kontrola (neošetr.)
2	24	Lanový olej
3	24	Tagonin 0,1 %
4	17	Tagonin 0,5 %
5	17	Tagonin 1,0 %
6	18	Tagonin 2,0 %
7	13	Kontrola
8	13	Lanový olej
9	13	Dimanin 0,1 %
10	13	Dimanin 0,5 %
11	13	Dimanin 1,0 %
12	13	Dimanin 2,0 %

1% DIMANIN vykazoval dobré mikróbicídne vlastnosti; TAGONIN nebol proti plesniam v tejto koncentrácii ešte účinný. Až 2—2,5 % prípravku zabránil vývinu plesní. Trvanlivosť ošetrovania stien 1% DIMANINOM bola asi 6—8 dní; potom sa postrek musel opakovať.

Doterajšie výsledky ukazujú, že sa v prevádzke vinárskych závodov kvarterné amonné zlúčeniny typu DIMANIN osvedčujú na dekontamináciu sudov, stien, ale ďalšie testy ukázali oveľa širšiu možnosť použitia, napr. pri dekontaminácii plniacich liniek, rôzneho pivničného zariadenia, dlážok a pod. Bolo by treba ešte preveriť otázky eventuálnej korózie materiálov, zmyteľnosti, hospodárnosti a pod. Zmysluplnosť DIMANINU má byť podľa výrobcu [6] zabezpečená prísadou organických látok v preparáte. Cenové relácie tohoto preparátu ťažko zhodnotiť vzhľadom nato, že ide o zahraničný prípravok. Isté však je, že by sa dekontaminačným prostriedkom typu povrchovo aktívnych látok mala aj vo vinárstve venovať v budúcnosti pozornosť, pričom by sa mali skúšať najmä dostupné domáce výrobky.

Súhrn

Skúšan sa vplyv dvoch povrchovo aktívnych dekontaminačných prípravkov zahraničného pôvodu (DIMANIN, TAGONIN) na rast niektorých mikroorganizmov vyskytujúcich sa vo vinárskych prevádzkach. DIMANIN a sčasti TAGONIN vykazujú

Tabuľka 7. Mikroflóra vonkajších stien drevených sudov po ošetrovaní rôznymi dekontaminačnými látkami

Číslo pokusu	Použitý dekont. prostriedok	Po dňoch		
		1	4	9
1	Kontrola (neošetr.)	Plesne ++++ Kvasinky +++	Plesne ++ Kvasinky +++	Plesne ++++ Kvasinky +++
2	Lanový olej	Plesne ++++	Plesne +++ Kvasinky +++	Plesne +++
3	Tagonin 0,1 %	Plesne ++++	Plesne ++++	Plesne ++++
4	Tagonin 0,5 %	Plesne ++	Plesne ++++ Kvasinky +++	Plesne ++++
5	Tagonin 1,0 %	Plesne +	Kvasinky +++ Plesne ±	—
6	Tagonin 2,0 %	—	—	—
7	Kontrola	Plesne +++ Kvasinky ++	Plesne ++ Kvasinky +++	Plesne +++ Kvasinky +++
8	Lanový olej	Plesne ++	Plesne ++	Plesne +++
9	Dimanin 0,1 %	Plesne +++	Plesne +	Plesne +++ Kvasinky ++
10	Dimanin 0,5 %	Plesne +	Kvasinky ++	Plesne +++
11	Dimanin 1,0 %	Plesne ±	Kvasinky ±	—
12	Dimanin 2,0 %	—	—	—

Poznámka: Plesne pozostávali z prevažnej časti z *Penicillium* sp.; len pri pokuse č. 1 sme našli aj *Mucor* sp. a pri pokuse č. 10 aj *Fusarium* a *Neurospora* sp. Kvasinky náležali botanicky do rodu *Torulopsis* sp.

Tabuľka 8. Dekontaminácia steny v pivnici

Použitý dekontaminačný prostriedok	P o d ň o c h		
	1	4	9
Dimanin 1 %	—	—	—
Tagonin 1 %	Plesne +++	Plesne +++	Plesne +++
Kontrola (neošetr.)	Kvasinky ++++ (Torulopsis)	Kvasinky ++++ (Torulopsis)	Kvasinky ++++ (Torulopsis)

Poznámka: Z plesní sme našli *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Neurospora* sp. a *Aspergillus* sp.
++++ silný rast, ++, +++ stredne silný rast +, ± slabý až pochybný rast, — nerastie (platí aj pre tabuľku 7)

dobré až vyhovujúce mikróbicídne vlastnosti v laboratórnych i prevádzkových podmienkach. Uvádzajú sa výsledky pokusov vykonaných v r. 1938.

Literatúra

- [1] SKOFIS, E. C. et al.: Symposium on the sanitation problems of the wine industry and their solution. 10th Annual Meeting of the American Society of Enologists. American Journal of Enology and Viticulture, **11**, 1960: 80—101.
- [2] MINÁRIK, E.: Zum Vorkommen von kontaminierenden Hefen und hefeartigen Mikroorganismen im Wein bei der Abfüllung. Die Wein-Wissenschaft, **24**, 1967: 67—74.
- [3] MINÁRIK, E.: Kontaminierende Hefen und hefeartige Mikroorganismen in den Betrieben. Mitteilungen Klosterneuburg, **18**, 1938: 10—16.
- [4] MINÁRIK, E.: K ekológii kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov vo vinárskych závodoch. Kvasný průmysl, **15**, 1969: 16C—16S.
- [5] MINÁRIK, E.: Ecology of yeasts and yeast like microorganisms on secondary habitats in Czechoslovakia. Proceedings of the 3rd International Symposium on Yeasts, Delft-The Hague, 1969.
- [6] — Dimanin (Pulver) das Desinfektionsmittel für Weinkellereien. Firemná literatúra BAYER, Leverkusen (NSR).
- [7] — Tagonin. Firemná literatúra BYK-GULDEN LOMBERG GmbH., Konstanz (NSR).
- [8] — Přípis hlavného hygienika ČSSR HE — 343.3 fy. Byk-Gulden Konstanz z 13. 6. 1937.
- [9] HALAMA, D.: Technická mikrobiológia, pp. 169—171, SVTL, Bratislava 1937.
- [10] HALAMA, D.: Základy vyhodnocovania experimentálnych výsledkov. Chemická fakulta SVŠT, Bratislava 1969 [cit. podľa 11].
- [11] SVOZIL, K.: Dekontaminácia vinárskej stáčacej linky. Diplómová práca. Chemická fakulta SVŠT, Bratislava 1970.
- [12] BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Leipzig 1955.