

Vliv dusitanů na pivovarské kvasinky

Ing. JAN ŠAVEL, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Ing. JIŘÍ ŠATAVA ml., Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

663.12:546.173

Smrtící účinek dusitanů na kvasinky je velmi dlouho znám. Později byl objeven mutagenní účinek kyseliny dusité, ale teprve nedávno se několik prací podrobně zabývalo účinkem dusitanu na hlavní kvašení při výrobě piva [1, 2].

Hlavní příčinou nezájmu pivovarských technologů o dusitany byla nepřítomnost těchto solí v pivovarských surovinách a varních vodách. Naproti tomu mnoho autorů zkoumalo vliv dusičnanů na průběh varního procesu i hlavního kvašení [1, 3, 4]. Vycházeli přitom ze skutečnosti, že pivovarské kvasinky neredukují ani neasimilují dusičnany a přestože někteří zaznamenali různé negativní vlivy dusičnanů (nižší varní výtěžek, vyšší barva piva, poruchy hlavního kvašení, cizí příchuti piva, autolýza kvasnic), nepřisuzovali je dusitanům vzniklým redukcí dusičnanů.

Weiner et al. [2] prokázali u svrchně kvašených piva redukcí dusičnanů mladinovými baktériemi. Rozdílným stupněm kontaminace je možné vysvětlit rozdílnost dřívějších zjištění širokých koncentrací dusičnanů udávaných jako přípustné obsahy ve varních vodách.

Vliv dusitanů na výrobu piva se proto musí posuzovat v souvislosti s obsahem dusičnanů, z nichž vznikají při výrobě piva. Tento problém se stává aktuální v souvislosti s intenzifikací zemědělské výroby, která přináší zhoršování kvality nejen povrchových, ale v menší míře i podzemních vod [5]. Současně se vysoký podíl dusičnanů objevuje i v jiných pivovarských surovinách, např. chmelu [6].

MATERIÁL A METODY

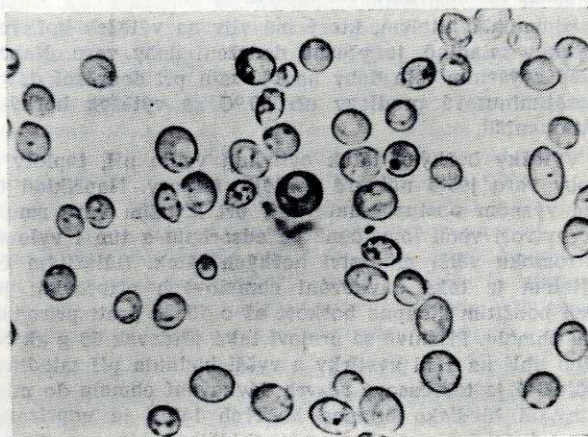
1. Kmeny *Saccharomyces carlsbergensis* pocházely ze sbírky VÚPS v Praze (č. 2, 5, 7, 9, 12 a 96 podle [8]).
2. *Disková metoda stanovení inhibice růstu kvasinek* Na plotny mladinového agaru, zaočkované suspenzí jednotlivých kvasničných kmenů (asi 10^6 – 10^7 buněk/plotnu) se přiložily kotoučky chromatografického papíru Whattman č. 3 (průměr kotoučku 14 mm). Kotoučky se napojily 0,05 ml 10% KNO_2 nebo KNO_3 a po 72 h kultivace se měřily průměry inhibičních zón.
3. *Hlavní kvašení* se modelovalo v kvasných válcích při 8 °C podle [7].
4. *Stanovení dusitanů*. Dusitany se stanovily spektrofotometricky reakcí s Griessovým činidlem podle Postella [6], metodou určenou pro stanovení dusičnanů (s vynecháním redukce kadmíem).
5. *Mladinové baktérie* se stanovily kultivací (37 °C, 48 h) na Endově agaru.

VÝSLEDKY POKUSŮ

1. Vliv NO_3^- a NO_2^- na růst a morfologii pivovarských kvasinek

Diskovou metodu se sledovala inhibice růstu různých kmenů pivovarských kvasinek. Průměry inhibičních zón se pohybovaly u kmenů č. 2, 5, 7, 12 v rozmezí 17 až 19 mm, inhibiční zóna kmene č. 9 byla větší, 20 až 22 mm. Dusičnan růst pivovarských kvasinek nepotlačoval.

Při sledování vlivu NO_3^- a NO_2^- v tekuté půdě se k sterilní mladině ve zkumavkách asepticky přidal roztok dusičnanu, popř. dusitanu draselného tak, že výsledná koncentrace těchto solí tvořila řadu 0, 10, 20, 30, 40 a 50 mg NO_2^- nebo NO_3^- v 1 l mladiny. Každá zkumavka se zakvasila 2 kapkami kvasničné kultury (48 h staré) a inkubovala při 20 °C. Vlivem dusitanu (30, 40 a 50 mg NO_2^-/l) se zvětšila velikost části buněk, u jednoho kmene (č. 2) se kvasičné buňky rovněž prodlužovaly a spojovaly v krátké řetězky (obr. 1 a 2).



Obr. 1. Kmen č. 2, 48 h v sterilní mladině při 20 °C

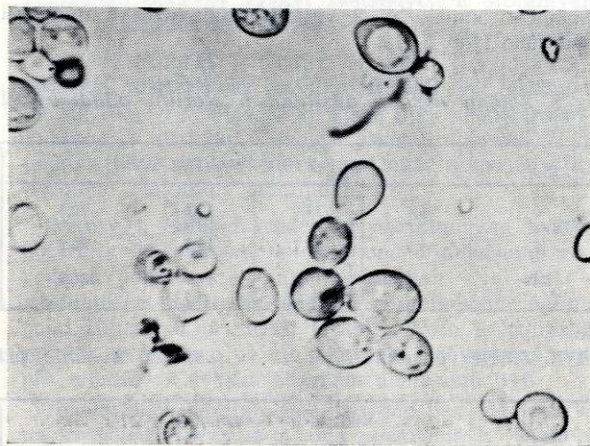
Množství tvarově odlišných buněk kolísalo mezi jednotlivými kmeny. Nejcitlivěji [největší podíl buněk se změněnou morfologií] reagovaly kmeny 7 a 12, méně kmeny 2, 9, nejméně citlivé kmeny byly kmeny 5 a 96.

2. Vliv teploty, aneareobních podmínek a množství kvasinek na účinek dusitanu

Vliv dusitanu na růst a kvašení pivovarských kvasinek silně závisí na teplotě. Při teplotě 20 °C prokvasil

kmen č. 2 12 % mladinu s 50 mg NO_2^-/l za 4 dny na 84 % zdánlivého prokvašení, při 8 °C se kvašení i růst ve stejné mladině prakticky zastavilo a po 15 dnech nepřesáhlo 5 % zdánlivého prokvašení.

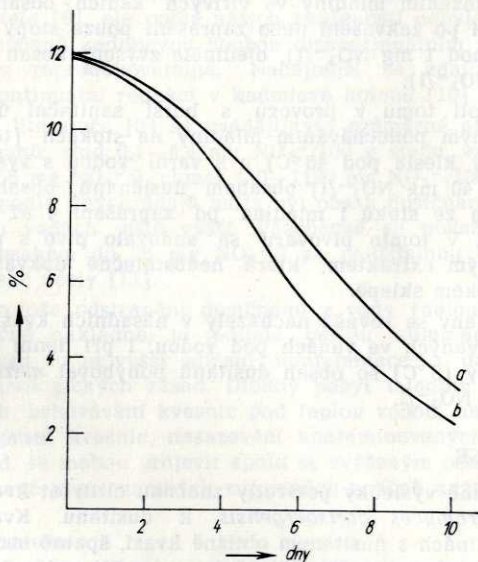
Inhibice kvašení a růstu klesá s rostoucím obsahem kvasničných buněk v mladině. Účinek dusitanu se rovněž snižuje s provzdušněním mladiny.



Obr. 2. Kmen č. 2, 48 h v sterilní mladině s 40 mg NO_2^-/l při 20 °C

3. Vliv NO_2^- na hlavní kvašení

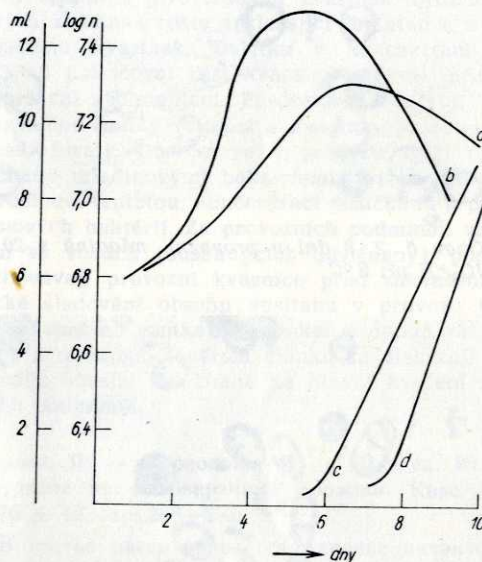
Vliv NO_2^- na průběh hlavního kvašení se sledoval v kvasných válcích při 8 °C. Válce se naplnily provozní mladinou, čerstvě zakvašenou ve spilce kmenem č. 2. K mladině se přidal dusitan draselný ve výsledné koncentraci 0,5, 10 a 20 mg NO_2^-/l . Použilo se provozní mladiny pivovaru s nízkou kontaminací a s nízkým obsahem dusičnanu ve varní vodě, aby se co nejvíce snížil vliv dusitanu vzniklého z dusičnanu v mladině.



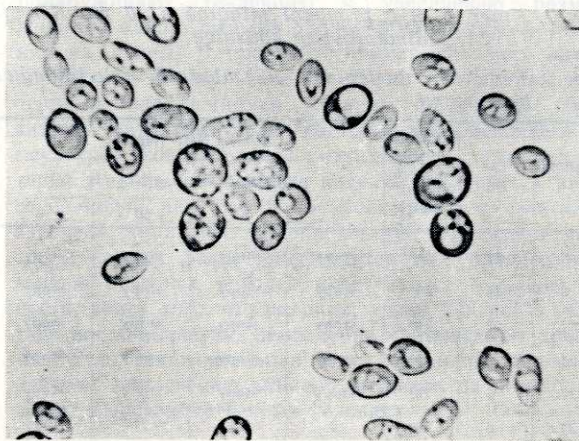
Obr. 3. Kvasné křivky kmene č. 2 v provozní mladině. Osa x čas (dny), osa y zdánlivé prokvašení (%). a: mladina + 20 mg NO_2^-/l , b: mladina bez NO_2^- .

Na obr. 3 a 4 jsou pro přehlednost zakresleny křivky zdánlivého extraktu, růstu a sedimentace kvasnic v mladině s přidavkem 20 mg NO_2^-/l a v mladině bez dusitanu. Křivky pro obsah 5 a 10 mg NO_2^-/l leží mezi těmito krajními hodnotami. Dusitan potlačuje růst kvas-

nic, snižuje prokvašení a zpožďuje sedimentaci. Piva kvašená s přidavkem dusitanu měla horší čírost a poskytovala nižší výtěžek kvasnic. Kvasničné buňky rostly v mladině s přidavkem 10 a 20 mg NO_2^-/l byly větší a protáhlejší. Tyto změny byly nejvýraznější v 3. až 4. dnu kvašení, ale morfologicky odlišné buňky se nacházely i v sedimentovaných kvasnicích (obr. 5 až 7). Naproti tomu se nezvýšil v sedimentovaných kvasnicích působením dusitanu obsah mrtvých buněk.



Obr. 4. Růstové a sedimentační křivky kmene č. 2 v provozní mladině. Osa x čas (dny), osa y log počtu buněk a ml sedimentu. a: růstová křivka v mladině s 20 mg NO_2^-/l , b: růstová křivka v mladině bez NO_2^- , c: sedimentační křivka v mladině bez NO_2^- , d: sedimentační křivka v mladině s 20 mg NO_2^-/l .



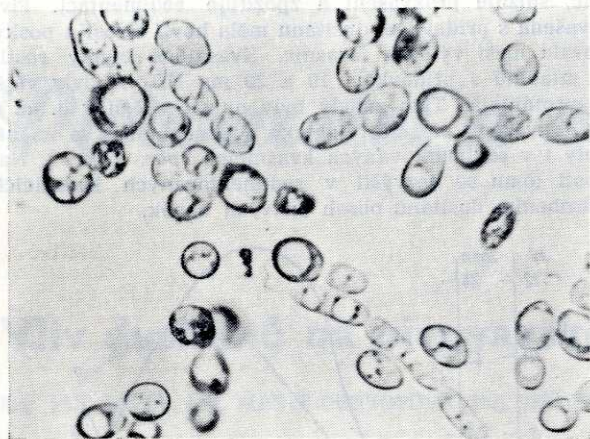
Obr. 5. Kmen č. 2, 8 dní v provozní mladině při 8 °C

4. Redukce dusičnanů na dusitany v mladině

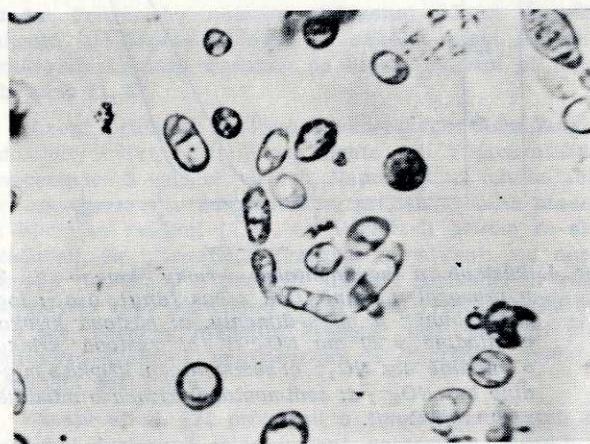
K provozní mladině [12 % hm.] se přidal dusičnan draselný v množství 30, 60 a 90 mg NO_2^-/l . Po sterilizaci a zchlazení se mladina zaočkovala suspenzí mladinových bakterií a v čase se sledovala tvorba dusitanu (tab. 1).

5. Redukce dusičnanů provozními kvasnicemi

20 g lisovaných provozních kvasnic (obsah mladinových bakterií $2 \cdot 10^5/\text{g}$) se asepticky přelilo 200 ml sterilního fyziologického roztoku obsahujícího 0,30, 60 a



Obr. 6. Kmen č. 2, 8 dní v provozní mladině s 20 mg NO_2^-/l při 8 °C



Obr. 7. Kmen č. 2 v provozní mladině s 20 mg NO_2^-/l (8 °C), sedimentovavé kvasnice

Tab. 1. Redukce dusičnanů v mladině mláčiinými baktériemi

Teplota [°C]	Čas [h]	Počet mladinnových bakt. [ml]	Tvorba NO_2^- (mg/l)			
			přidavek KNO_3 [mg NO_3^-/l]			
			0	30	60	90
8	24	10^2	stopy*	stopy	stopy	stopy
8	24	10^5	stopy	stopy	stopy	stopy
37	2	10^2	stopy	stopy	stopy	stopy
37	2	10^5	stopy	stopy	stopy	stopy
37	6	10^2	stopy	stopy	stopy	stopy
37	6	10^5	2	15	27	58

* méně než 1 mg NO_2^-/l

Tab. 2. Redukce dusičnanů mladinnými baktériemi v kvasnicích

Teplota [°C]	Čas [h]	Tvorba NO_2^- [mg/l]			
		přidavek KNO_3 [mg NO_3^-/l v kvasničné suspenzi]			
		0	30	60	90
8	24	0	1	2	3
8	48	0	5	7	8
8	120	0	8	16	10
20	24	0	5	10	15

90 mg NO_3^-/l ve formě KNO_3 . Při 8 °C a 20 °C se sledovala tvorba dusitanu (tab. 2).

6. Reakce dusitanu s mladinou a kvasinkami

Sterilní mladina (12 % hm.) se smísila s asepticky připraveným roztokem dusitanu draselného při 8 °C. V časových intervalech se sledovala koncentrace dusitanu. Podobně se sledovaly změny koncentrace dusitanu v suspenzi kmenu č. 2 ve sterilním roztoku dusitanu draselného (tab. 3, 4).

Tab. 3. Změny obsahu dusitanu v sterilní mladině při 8 °C

Čas [h]	Koncentrace dusitanu [mg NO_2^-/l]			
	6,7	11,0	17,0	20,5
0	6,7	11,0	17,0	20,5
5	6,5	10,7	15,7	20,0
24	6,0	10,2	14,3	16,0

Tab. 4. Změny obsahu dusitanu v suspenzi kvasnic při 8 °C

Čas [h]	Koncentrace dusitanu [mg NO_2^-/l]			
	[10^6 buněk/ml]		[10^8 buněk/ml]	
	12,3	21,5	9,8	18,0
0	12,3	21,5	9,8	18,0
5	11,5	21,5	8,7	12,0
24	11,1	20,7	6,7	13,5

7. Výskyt dusitanů v pivovarském provozu

V orientačních pokusech se po dusitanech pátralo pouze ve spílané mladině a v mladině na počátku hlavního kvašení, neboť s poklesem pH dusitan z mladiny rychle mizí [2]. V provozu s dobrou sanitační úrovní, s varní vodou s nízkým obsahem dusičnanů (do 10 mg NO_3^-/l) a s chlazením mladiny ve vířivých kádích obsahovala mladina po zakvašení nebo zaprášení pouze stopy dusitanů (pod 1 mg NO_2^-/l), ojediněle zvýšený obsah (2 až 3 mg NO_2^-/l).

Naproti tomu v provozu s horší sanitační úrovní, s dlouhým ponecháváním mladiny na stokách (teplota mladiny klesla pod 40 °C) a s varní vodou s vysokým (okolo 40 mg NO_3^-/l) obsahem dusičnanů, obsahovala mladina ze stoků i mladina po zaprášení 4 až 7 mg NO_2^-/l . V tomto pivovaru se sudovalo pivo s nižším zdánlivým extraktem, které nedostatečně dokvašovalo v ležáckém sklepě.

Dusitany se rovněž nacházely v násadních kvasnicích uchovávaných ve vanách pod vodou. I při denní výměně vody (8 °C) se obsah dusitanů pohyboval mezi 0 až 2,5 mg NO_2^-/l .

DISKUSE

Získané výsledky potvrdily značnou citlivost kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* k dusitanu. Kvasinky v mladinách s dusitanem obtížně kvasí, špatně sedimentují a poskytují nižší sklizeň kvasnic. Při zvýšení obsahu dusitanu v mladině se vlastnosti kvasnic mohou náhle zhoršit; v praxi se v tomto případě často hovoří o degeneraci kvasnic.

Průvodním znakem vlivu dusitanu na některé kmeny pivovarských kvasinek je změna morfologie kvasnic. Zvětšování kvasničných buněk lze vyvolat různými látkami, např. kafrem nebo DL-β-p-fluorfenylalaninem [9], zvětšení buněk při hlavním kvašení působením dusitanu popsali Weiner at al. [2].

Při mikroskopování provozních kvasnic se mohou zvětšené buňky snadno přehlédnout, neboť mikroskopický obraz se neporovnává s obrazem kvasinek kultivovaných v mladině bez dusitanu. Srovnávací kultura (z mladiny bez dusitanu) obsahuje rovněž buňky různých velikostí, přidavkem dusitanu však podíl větších buněk roste. Tvorba protáhlých buněk se objevila u jediného kmene; v pivovaru, v němž se tohoto kmene používá, jsme zaznamenali občasný výskyt zvětšených a protáhlých buněk v násadních kvasnicích.

Kvasné zkoušky potvrdily negativní vliv nízkých koncentrací dusitanu při hlavním kvašení. Při obsahu 10 až 20 mg NO_2^-/l v mladině se získá pivo nedostatečně prokvašené, s nízkým obsahem alkoholu. Občasný výskyt nedostatečně prokvašených piv může souviset s nižším obsahem dusitanu v mladinách.

Pokusy s redukcí dusičnanů mladinovými baktériemi potvrdily možnost vzniku dusitanů z dusičnanů za provozních podmínek. V mladině dusitany ve větší míře vznikají při vyšší kontaminaci mladinovými baktériemi (nad $10^4/\text{ml}$) a při vyšší teplotě. Proto je ponechávání mladiny na stokách po dlouhou dobu nebezpečné zejména pro mladiny s vyšším obsahem dusičnanů.

Nejsilnějším zdrojem mladinových baktérií jsou várečné kvasnice. Obsahuje-li voda používaná k jejich propírání dusičnany, mohou se snadno dusičnany redukovat na dusitany, zejména při vyšší teplotě. Postupně zhoršování vlastností kvasnic působením dusitanu popsali Weiner et al. [2].

Ve shodě s těmito závěry jsme dusitany prokázali v kontaminovaných provozních mladinách i kvasnicích. Dusitan se váže na mladinu i kvasnice; redukcí vznikající dusitan se proto ihned slučuje s kvasnicemi nebo mladinou a analyticky se prokáže pouze jeho část.

Tyto výsledky potvrzují nutnost sledovat v praxi obsah mladincvých baktérií i dusičnanů. Přestože bylo uveřejněno mnoho metod stanovení dusičnanů [10], je přesné stanovení dusičnanů v mladinách a pivu dosud problémem. Přezkoušeli jsme spektrofotometrickou metodu Postela [6], ale podle našich zkušeností nebyla redukce dusičnanů kadmiovou houbou diskontinuálním způsobem vždy reprodukovatelná. Nadějnější se zdají postupy s kontinuální redukcí v kadmiové koloně [10].

V literatuře [6] se uvádějí tyto průměrné obsahy dusičnanů: slad 0,1–4,4 mg $\text{NO}_3^-/100$ g sladu, varní voda 0–55 mg NO_3^-/l , chmel 480–1190 mg $\text{NO}_3^-/100$ g chmelle, podle jiných údajů může být obsah dusičnanů ve varních vodách ještě vyšší. Všeobecně se považuje voda s obsahem do 25 mg NO_3^-/l za použitelnou pro pivovarské účely [11].

Protože odstranění dusičnanů z vody (deionizace) je značně nákladné, je jedinou cestou eliminace jejich účinku co nejvyšší snížení kontaminace a dodržování technologických zásad. Dlouhý pobyt mladiny na stokách, uchovávání kvasnic pod teplou vodou, nedostatečné praní kvasnic, nasazování kontaminovaných kvasnic apod. se mohou projevit spolu se zvýšeným obsahem dusičnanů v pivovarských surovinách značně negativně.

Literatura

- [1] STONE, J. M., LASCHIVER, C., Saletan, L. T.: Wall, Lab. Comm. 31, 1968, č. 108, s. 193–200
- [2] WEINER, J. P., RALPH, D. J., TAYLOR, L.: Proc. EBC 1975, s. 565–579.
- [3] SCHILD, E., DIEMER, H.: Brauwiss. 15, 1962, č. 5, s. 125–139.
- [4] VOGL, K., SCHUMANN, G., PRÖPSTING, W.: Mschr. f. Brau. 20, 1967 s. 116.
- [5] ŠTĚPÁNEK, M., CHALUPA, J.: Vesmír 51, 1972 s. 301–308.
- [6] POSTEL, W.: Brauwiss. 29, 1976, č. 2, s. 39–44.
- [7] ŠAVEL, J.: Kvas. prům. 17, 1971, č. 10, s. 217–223.
- [8] Catalogue of cultures. 2 vyd., Czechoslovak collection of yeasts and yeast-like organisms

- [9] KLEYN, J. G.: Wall, Lab. Comm. 29, 1966, č. 98/99, s. 37–54.
- [10] HUBÁČEK, J., BERNATZIK, K.: Chem. listy 70, 1976, č. 5, s. 513–524.
- [11] HLAVÁČEK, F., LHOTSKÝ, A.: Pivovarství, Praha 1966.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Šatava, J.: Vliv dusitanů na pivovarské kvasinky. Kvas. prům. 22, 1976, č. 12, s. 268–272

Článek se zabývá působením dusitanů na hlavní kvašení spodních pivovarských kvasinek. Citlivost pivovarských kvasinek roste s klesající teplotou a s klesajícím obsahem kvasinek. Dusitan v koncentraci 5–20 mg NO_2^-/l potlačoval růst kvasnic, snižoval prokvašení a zhoršoval sedimentaci. Působením dusitanů zvětšovaly kvasničné buňky velikost a kvasinky jednoho kmene se prodlužovaly. Dusitan se v provozu tvoří redukcí dusičnanů mladinovými baktériemi, tvorba dusitanu roste s rostoucí teplotou, koncentrací dusičnanu a počtem mladinových baktérií. Za provozních podmínek vzniká dusitan ve vodách (obsahujících dusičnany), pod nimiž se uchovávají provozní kvasnice před zakvašením. Analytické sledování obsahu dusitanu v provozu je obtížné, neboť dusitan vznikající redukcí se ihned váže na kvasnice a mladinu. Závěrem článku se diskutují vlivy zvýšeného obsahu dusičnanů na hlavní kvašení za provozních podmínek.

Шавел, Я. — Прокопова, М. — Шатава, Ю.: Влияние нитритов на пивоваренные дрожжи. Квас. прум., 22, 1976 № 12, стр. 268–272.

В статье рассматривается влияние нитритов на ход главной ферментации при применении пивоваренных дрожжей низового брожения. Чувствительность пивоваренных дрожжей к присутствию нитритов увеличивается со снижающейся температурой и уменьшающимся количеством дрожжей. При концентрации в пределах от 5 до 20 мг NO_2^- на 1 л нитриты подавляют размножение дрожжей, ухудшают степень сбраживания и уменьшают седиментацию. Под влиянием нитритов клетки дрожжей обнаруживают тенденцию к увеличению размеров. У клеток одного штамма дрожжей наблюдалось увеличение их длины. В производственных условиях нитриты образуются в результате восстановления нитратов бактериями, находящимися в сусле. Количество образующихся нитритов увеличивается с повышающейся температурой, концентрацией нитратов и численностью бактерий в сусле. На заводах нитриты появляются в воде, содержащей нитраты, в которой хранятся дрожжи до закваски. Аналитическое определение содержания нитритов в разных фазах производственного процесса с помощью обычных методов представляет большие трудности, ввиду того, что нитриты, появляющиеся в результате восстановления, немедленно связываются дрожжами сусла. Заключительная часть статьи посвящена подробному объяснению влияния нитритов на низовое брожение в производственных условиях.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Šatava, J.: Effects of Nitrites Upon Brewing Yeast. Kvas. prům. 22, 1976, No. 12, pp. 268–272

The article deals with the effects nitrites have upon the main bottom fermentation of brewing yeast. Sensitivity of yeast to the presence of nitrites increases with decreasing temperature and also with decreasing number of yeast units. Nitrites in 5 to 20 mg of NO_2^- per 1 l concentration suppress yeast propagation, prevent thorough fermentation and deteriorate sedimentation. In the presence of nitrites yeast cells have generally tendency to grow in size, except one strain the cells of which grow also longer. In brewing process nitrites are produced through the reduction of nitrates by wort

bacteria. The higher is the temperature, concentration of nitrates and numbers of wort bacteria the higher is the amount of produced nitrites. In breweries nitrites originate in water containing nitrates, in which yeast is kept prior to starting. It is very difficult to trace nitrites in individual stages of brewing process by applying conventional analytic methods, since nitrites produced by reduction are immediately bound by wort yeast. In closing paragraphs effects of higher nitrites concentration upon the main fermentation are discussed in detail.

Šavel, J. - Prokopová, M. - Šatava, J.: Einfluß der Nitrite auf die Bierhefen. Kvas. prům. 22, 1976, No. 12, S. 268—272

Die Autoren befassen sich in dem Artikel mit der Wirkung der Nitrite auf die Hauptgärung der untergärigen Bierhefen. Die Empfindlichkeit der Bierhefen steigt mit der absinkenden Temperatur und mit dem

absinkenden Hefengehalt. Das Nitrit in der Konzentration 5 bis 20 mg NO_2^-/l wirkte hemmend auf das Wachstum der Hefen, und hatte eine niedrigere Vergärung und eine schlechtere Sedimentation zur Folge. Durch Einwirkung der Nitrite vergrößerten sich die Hefezellen und bei einem Hefestamm wurde die Verlängerung der Zellen beobachtet. Im Betrieb erfolgt die Nitritbildung aufgrund der Reduktion der Nitrate durch Würzebakterien; die Nitritbildung erhöht sich mit der ansteigenden Temperatur, Nitratkonzentration und Zahl der Würzebakterien. Unter Betriebsbedingungen entsteht das Nitrit in dem (nitrathaltigen) Wasser, unter dem die Betriebshefe vor dem Anstellen aufbewahrt wird. Die analytische Verfolgung des Nitritgehaltes im Betrieb ist schwierig, denn das durch Reduktion entstehende Nitrit bindet sich unmittelbar auf die Hefen und die Würze. In dem abschließenden Teil des Artikels werden die Einflüsse des erhöhten Nitritgehaltes auf die Hauptgärung unter Betriebsbedingungen diskutiert.