

Tvorba dusitanů v kontaminovaných várečných kvasnicích

Ing. JAN ŠAVEL, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Jihočeské pivovary, k. p., České Budějovice

683.12:546.173

ÚVOD

Vlivem dusičnanů a dusitanů na hlavní kvašení se zabývali různí autoři již od poloviny minulého století (přehled např. [1, 2]). Dusitany vznikají redukcí dusičnanů v kontaminovaných mladínách před zakvašením, ale mohou se tvořit i v prvních dnech hlavního kvašení [3]. Stanovením dusitanů a dusičnanů v pivovarství se v poslední době zabývali Postel [4] a Čejka [5].

Donhauser [6] považuje dusitany za jednu z příčin závad hlavního kvašení. Při redukcí dusičnanů na dusitany se uplatňují především gramnegativní bakterie, které se často v pivovarském provozu vyskytují ve velkém množství [7]. Jejich hlavním zdrojem jsou kontaminované kvasnice. Působením dusitanů na pivovarské kvasinky při kvašení jsme se zabývali v předešlém sdělení [8, 9].

MATERIÁL A METODY

Stanovení dusitanů

Po odstředění vzorku (10 min, otáčky 3000 min⁻¹) se k 0,5 ml supernatantu přidaly 2 ml destilované vody a 2,5 ml činidla na stanovení dusitanů. Po 15 min se mě-

řila absorbance při 530 nm. V slepém pokusu se místo činidla přidalo 2,5 ml 20% kyseliny octové. Absorbance (A) se měřila kolorimetrem Spekol 10, s šířkou kyvet 1 cm. Za těchto podmínek platil vztah: NO₂⁻ (mg.l⁻¹) = 12,21 · A.

Činidlo na stanovení dusitanů [4].

Stejně díly roztoků kyseliny sulfanilové (1,5 g se rozpustí za tepla v 50 ml ledové kyseliny octové a doplní dest. vodou na 250 ml) a α-naftylaminu (75 mg se rozpustí v 50 ml ledové kyseliny octové a doplní dest. vodou na 250 ml) se smísí těsně před měřením.

Stanovení gramnegativních bakterií v kvasnicích

Husté várečné kvasnice (sušina 130 až 150 mg.ml⁻¹) se zředily 100krát destilovanou vodou a očkovaly na MacConkeyův agar (Imuna, n. p., Šarišské Michalany) s aktidionem (25 mg.l⁻¹). Po třídní kultivaci při 28 °C se odečetl počet kolonií.

Uchovávání kvasnic v provozu

Kvasnice se uchovávaly v hliníkových vanách, 150 l hustých várečných kvasnic, pod 300 l zchlazené vodovodní vody, která se denně vyměňovala.

VÝSLEDKY

Obsah dusitanů v násadních kvasnicích

Z hliníkových van pro uchovávání kvasnic pod zchlazenou vodou se skleněnou trubičkou odebíraly vzorky sedimentovaných kvasnic a vody nad nimi. Odebrané kvasnice se odstředily (10 min, otáčky 3000 min⁻¹) a v supernatantu se stanovil obsah dusitanů. Z 5 ml hustých kvasnic se získalo asi 1,5 ml supernatantu. Stejným způsobem se po odstředění stanovily dusitany ve vodě nad kvasnicemi (tab. 1).

Tab. 1. Obsah dusitanů v násadních kvasnicích (teplota vody 3 °C)

Vana č.	pH		Baktérie . ml ⁻¹		Dusitany (mg . l ⁻¹)	
	voda	kvasnice	voda	kvasnice	voda	kvasnice
1	5,4	5,4	1 050	61 100	1,5	3,0
2	5,5	5,3	1 890	75 000	0,6	2,8
3	5,6	5,4	1 400	123 000	0,5	1,0
4	5,6	5,3	190	2 800	0,0	0,0
5	5,4	5,3	1 230	25 300	0,1	0,1
6	5,1	5,0	2 060	83 000	0,9	2,4

Tab. 2. Laboratorní test tvorby dusitanů v kontaminovaných kvasnicích

č.	Kvasnice po nasazení	Dusitany (mg . l ⁻¹)	
		2 dny 5 °C	1 h 52 °C
1	1,2	3,7	2,9
2	0,5	3,4	2,1
3	0,4	2,8	2,0
4	1,0	3,9	2,3
5	1,2	4,0	2,3
6	1,1	1,8	1,4
7	0,1	0,1	0,1
8	0,1	0,0	0,1

Tvorba dusitanů ve vářečných kvasnicích

200 g provozních vářečných kvasnic (150 000 bakterií . ml⁻¹) se v Erlenmeyerových baňkách přelilo 300 ml roztoku KNO₃ (15, 150 a 1500 mg NO₃⁻ . l⁻¹). Baňky se uchovávaly při teplotách 2,5 a 7 °C a ve vzorcích kvasnic a vody nad nimi se sledoval obsah dusitanů (obr. 1 a 2).

Reakce dusitanů s kvasnicemi

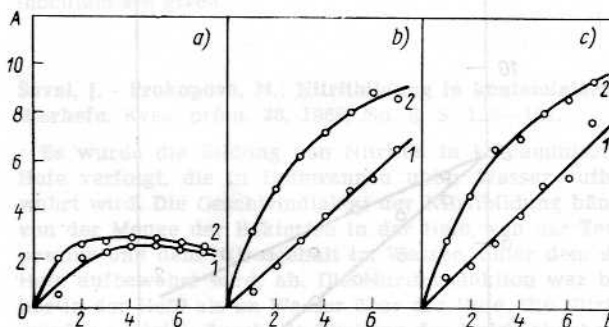
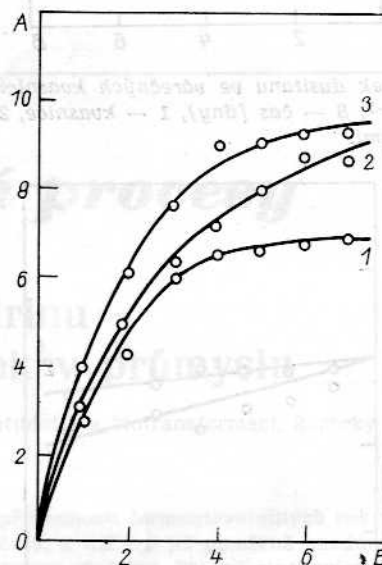
200 g hustých vářečných kvasnic se v Erlenmeyerových baňkách přelilo 300 ml roztoku NaNO₂ (15 mg NO₂⁻ . l⁻¹). Při 5 °C se sledovala spotřeba dusitanu. V souběžném pokusu se měřil úbytek dusitanu ve směsi s kvasnicemi inaktivovanými teplem (10 min při 70 °C), (obr. 3, 4). Protože se inaktivací zvyšuje pH kvasnic, nastavila se kyselost obou sledovaných vzorků na pH = 5,4.

Průkaz bakterií produkujících dusitany v kvasnicích

2 ml hustých vářečných kvasnic se pipetou s odříznutou špičkou vpravily do centrifugační kyvety a přidaly se 2 ml roztoku KNO₃ (150 mg NO₃⁻ . l⁻¹). Po promíchání se kyveta ponechala v klidu 2 dny při 5 °C, vzorek promíchal, odstředil a v supernatantu stanovily dusitany. Pro porovnání se dusitany stanovily ve stejném vzor-

ku ihned po zalití roztokem KNO₃, promíchání a odstředění.

Pro rychlý, orientační test se postupovalo stejně, ale suspenze kvasnic v KNO₃ se inkubovala 1 h při 52 °C místo 2 dnů při 5 °C. Výsledky stanovení s různými vzorky kvasnic uvádí tab. 2.

Obr. 1. Závislost tvorby NO₂⁻ na koncentraci NO₃⁻ ve vodě k uchovávání kvasnic (5 °C). A — mg NO₂⁻ . l⁻¹, B — čas (dny). 1 — voda nad kvasnicemi s a — 15, b — 150, c — 1500 mg NO₃⁻ . l⁻¹, 2 — kvasnice.Obr. 2. Vliv teploty na tvorbu NO₂⁻ v kontaminovaných kvasnicích. A — dusitany v kvasnicích (mg . l⁻¹), B — čas (dny), 150 mg NO₃⁻ . l⁻¹ v zalévací vodě. 1 — 2 °C, 2 — 5 °C, 3 — 7 °C.

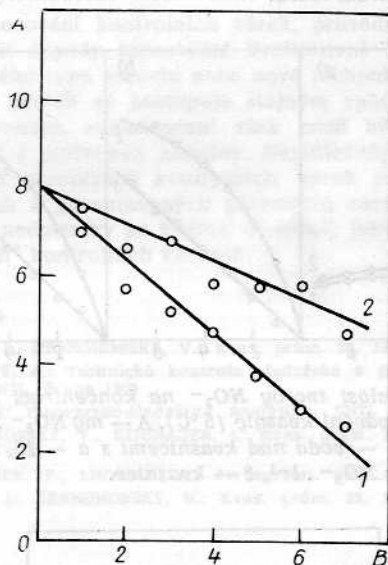
DISKUSE

Vlivem dusitanů na průběh hlavního kvašení se zabývalo několik autorů, ale jen málo sdělení se věnuje působení dusitanů na kvasnice před zakvašením. Kvasnice, kvasící v mladině s dusitanem, kvasily pomaleji i po převedení do nové mladiny bez dusitanů [3].

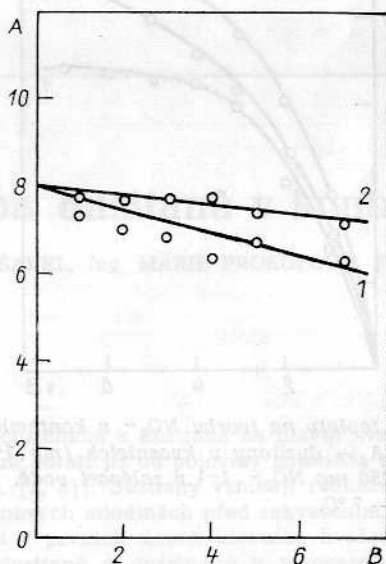
V pivovarské výrobě se kvasnice uchovávají ve vanách pod zchlazenou vodou, která obvykle obsahuje dusičnany. V sedimentovaných kvasnicích se i při relativně nízkých teplotách pomnožují gramnegativní bakterie, které redukuji dusičnany na dusitany. Při relativně čistých kvasnicích jsou koncentrace dusitanů nízké, ale se zvyšujícím se množstvím bakterií vzrůstá i koncentrace dusitanů. Mírná acidita kvasnic zaručuje i slabým roztokům dusitanů dostatečnou stabilitu (pH = 5 a více).

Modelové pokusy prokázaly vliv různých faktorů na tvorbu dusitanů ve vářečných kvasnicích. Rozhodujícím

faktorem je množství bakterií, ale záleží i na jejich druhu a schopnosti redukovat dusičnany. ON 56 6841 „Pivovarské kvasnice násadové“ považuje obsah bakterií $10\,000 \cdot \text{g}^{-1}$ za přípustný, ale toto množství postačuje k tvorbě dusitanů.



Obr. 3. Úbytek dusitanu ve várečných kvasnicích. A — $\text{mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$, B — čas (dny), 1 — kvasnice, 2 — voda nad kvasnicemi.



Obr. 4. Úbytek dusitanu v inaktivovaných várečných kvasnicích. A — $\text{mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$, B — čas (dny), 1 — kvasnice, 2 — voda nad kvasnicemi.

Velký význam má koncentrace dusičnanů ve vodě, pod kterou se uchovávají kvasnice. Při obsahu NO_3^- $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byla rychlost tvorby NO_2^- poměrně nízká, nad $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ se dále nezvyšovala. ČSN 83 0611 povoluje v pitné vodě $50 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$, což postačuje ke tvorbě miligramových množství dusitanů v litru kvasnic, kontaminovaných bakteriemi.

Významný je i způsob ošetřování kvasnic. V dobře vypraných kvasnicích, uchovávaných pod ledovou vodou, která se denně vyměňuje, je obsah dusitanů nízký. Avšak i za těchto podmínek mohou kvasnice obsahovat

dusitany. Údaje z tab. 1 pocházejí ze závodu s dobrou péčí o várečné kvasnice, zalévané vodou, obsahující $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{NO}_3^-$.

V závodech, v nichž se kvasnice uchovávají pod nezchlazenou vodou s vyšším obsahem NO_3^- a kde zůstávají ve vanách několik dní, mohou být kvasnice vystaveny podstatně vyšším koncentracím NO_2^- , blízcím se desítkám mg v litru.

Podrobný průzkum vlivu roztoku dusitanu při úschově kvasnic nebyl v pivovarské literatuře uveřejněn. Předpokládá se zpomalené hlavní kvašení, zvláště působí-li další vlivy, brzdící kvašení. K nim podle [6] především patří nevhodné složení mladiny, jako je nízký obsah zkvasitelných cukrů, aminodusíku, rozpuštěného kyslíku, některých minerálních látek (Zn) aj.

Koncentrace dusitanů v kvasnicích a ve vodě, pod kterou se uchovávají, se mohou podstatně lišit. Obvykle je koncentrace NO_2^- v kvasnicích vyšší než ve vodě. Po dokonalém proprání ledovou vodou bez dusitanů klesá obsah NO_2^- i v kvasnicích. Je zajímavé, že současně s tvorbou dusitanů bakteriemi se uplatňuje i jejich částečné odbourávání (NO_2^-) kvasnicemi [3, 5]. Pokles NO_2^- byl mnohem výraznější u živých kvasnic než u kvasnic inaktivovaných teplem.

Rychlost tvorby dusitanů v kontaminovaných kvasnicích i stupeň kontaminace se mohou měřit jednoduchým testem. Přítomnost bakterií redukujících NO_2^- prozradí již průkaz dusitanů ve várečných kvasnicích. Kvalitativně lze dusitany prokázat indikátorovým papírkem.

Měřítkem schopnosti bakterií redukovat dusičnany je měření rychlosti tvorby NO_2^- ve vodě s dostatečným množstvím NO_3^- ($150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) při 5°C , což odpovídá nepříznivým podmínkám uchovávání kvasnic v provozu.

Pro orientační stanovení se osvědčil 1h test při 52°C . Množství NO_2^- bylo o něco nižší než v delším testu při 5°C , ale oba testy shodně rozlišily kvasnice s nižší a vyšší kontaminací. Citlivost testu lze dále zvýšit úpravou pH na 6,2. Také přidavek 0,5 % kvasničného autolyzátu zvyšuje citlivost reakce.

Pro dosažení nízkého obsahu dusitanů ve várečných kvasnicích proto doporučujeme dodržovat všechny zásady správného ošetřování kvasnic [9, 10, 11] a uchovávat je pouze pod vodou s nízkým obsahem dusičnanů a prostou dusitanů. Jednoduchým testem je možné stanovit obsah NO_2^- v kvasnicích a množství bakterií, redukujících dusičnany.

Literatura

- [1] SCHILD, E. - DIEMER, H.: Brauwiss. 15, 1962, s. 125.
- [2] STONE, M. - LASCHIVEL, C. - SALETAN, L. T.: Wall. Lab. Comm. 31, 1968, č. 16, s. 193.
- [3] WEINER, J. P. - RALPH, D. J. - TAYLOR, L.: Proc. EBC, 1975, s. 565.
- [4] POSTEL, W.: Brauwiss. 29, 1976, s. 39.
- [5] ČEJKA, P.: Kvas. prům. 23, 1977, s. 102.
- [6] DONHAUSER, S.: Brauwelt 121, 1981, s. 616.
- [7] BENDOVÁ, O. - KURZOVÁ, V.: Kvas. prům. 27, 1981, s. 268.
- [8] ŠAVAL, J. - PROKOPOVÁ, M. - ŠATAVA, J.: Kvas. prům. 22, 1978, s. 268.
- [9] ŠAVAL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech, Praha 1980.
- [10] BENDOVÁ, I. - KAHLER, M.: Pivovarské kvasinky, Praha 1981.
- [11] HLAVÁČEK, F.: Pivovarské kvasnice. Praha 1958.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Tvorba dusitanů v kontaminovaných várečných kvasnicích. Kvas. prům., 28, 1982, č. 6, s. 128—131.

Sledovala se tvorba dusitanů v kontaminovaných kvasnicích, uchovávaných ve vanách pod vodou. Rychlost tvorby dusitanů závisela na množství bakterií v kvasnicích, teplotě a obsahu dusičnanů ve vodě, pod níž se kvasnice uchovávaly. Dusitanů vznikalo více v kvasni-

cích než ve vodě nad kvasnicemi. Současně se činností kvasnic dusitany odbourávaly. Popisuje se jednoduchý test k průkazu bakterií, redukujících NO_3^- v kvasnicích. Uvádějí se zásady pro dosažení co nejnižších hodnot v kvasnicích.

Шавел, Я., Проконова, М.: Образование нитритов в контаминированных варочных дрожжах. Квас. прум., 28, 1982, No. 6, стр. 128—131.

Исследовалось образование нитритов в контаминированных дрожжах, хранящихся в чанах под водой. Скорость образования нитритов зависела от количества бактерий в дрожжах, от температуры и содержания нитратов в воде, под которой дрожжи хранились. Нитритов возникало больше в дрожжах, чем в воде над ними. Одновременно деятельностью дрожжей нитриты разлагались. Описывается простой тип испытания для доказательства наличия бактерий, восстанавливающих трехоксида азота в дрожжах. Приводятся принципы для достижения самых низких величин в дрожжах.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Formation of Nitrites in Contaminated Yeast Inoculum. Kvas. prům. 28, 1982, No. 6, p. 128—131.

The formation of nitrites in contaminated yeast ino-

culum keeping under water was observed. The rate of the nitrite formation was dependent on a quantity of bacteria, temperature and a concentration of nitrates in water. In presence of yeasts, nitrites were degraded. A simple test for detection of bacteria reducing NO_3^- in a yeast inoculum is described. The principles for an achievement of the lowest level of nitrites in a yeast inoculum are given.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Nitritbildung in kontaminierter Bierhefe. Kvas. prům. 28, 1982, No. 6, S. 128—131.

Es wurde die Bildung von Nitriten in kontaminierter Hefe verfolgt, die in Hefewannen unter Wasser aufbewahrt wird. Die Geschwindigkeit der Nitritbildung hängt von der Menge der Bakterien in der Hefe, von der Temperatur und dem Nitratgehalt im Wasser, unter dem die Hefe aufbewahrt wird, ab. Die Nitritproduktion war höher in der Hefe als im Wasser über der Hefe. Die Nitrite wurden zugleich durch die Wirkung der Hefen abgebaut. In dem Artikel wird weiter ein einfacher Test zum Nachweis der Bakterien angeführt, die NO_3^- in der Hefe reduzieren. Es werden auch Richtlinien angeführt, deren Einhaltung zur Minimalisierung der Nitritwerte in der Hefe führt.