

Z výzkumu a praxe

JAK VZNIKAJÍ DUSITANY PŘI KVAŠENÍ

Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Ing. MARIE PROKOPOVÁ,
Budějovický Budvar, n.p. Č.Budějovice

Klíčová slova: pivo, dusitany, kvašení

546.173 546.175
663.43 663.12

1. ÚVOD

V předchozí studii jsme prokázali, že tvorba dusitanů při kvašení mladiny se může sledovat reakcí s m-fenylendiaminem (m-FDA). Tato sloučenina reaguje s dusitany, vznikajícími při kvašení činností bakteriální kontaminace za tvorby oranžového až červeného barviva s charakteristickým absorpčním maximem při 450 nm [1].

Kromě reakce m-FDA s polyfenoly a sacharidy, částečně rušících sledování tvorby dusitanů, působí na průběh reakce další vlivy. Z původních pokusů vyplývá, že tvorba dusitanu se v průběhu kvašení často zastaví ještě před vyčerpáním dusičnanu. Přitom při uchovávání kontaminovaných kvasnic ve vodě s dusičnanem reakce dále pokračuje.

Redukci dusičnanů v kvasící mladině i v kontaminovaných kvasnicích způsobují bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, např. rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus* apod. Známá je redukce dusičnanů bakteriemi *Obesumbacterium proteus* (*Hafnia protea*). V praxi se kontaminace do mladiny vnaší nečistými spílacími cestami a kontaminovaným povrchem kvasných nádob. Při kvašení mohou tyto bakterie flokulovat a sedimentovat spolu s kvasinkami a hromadit se ve várečných kvasnicích.

Opětovným nasazením várečných kvasnic se kruh uzavírá a množství bakterií v mladině stoupá. Obsahem tohoto sdělení je snaha blíže poznat mechanismus tvorby dusitanů při kvašení a skladování kvasnic.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a roztoky

Asepticky připravený 1% vodný roztok m-fenylendiaminu (Merck-Schuchardt), 20% roztoky glukosy, maltosy, laktosy (Lachema Brno), kvasničného extraktu a peptonu (Imuna, Šarišské Michalany), sterilované v autoklávu (120 °C, 10 min).

Endův agar a půda s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK agar, Imuna, Šarišské Michalany) se připravily podle návodu k použití a sterilovaly 20 min při 120 °C.

2.2 Citrátový tlumivý roztok s dusičnanem draselným

Citrátový tlumivý roztok (Mc Ilvaine) se připravil smíšením roztoků 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny citronové a 0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného (Merck Schuchardt). V tlumivém roztoku se rozpustil dusičnan draselný v koncentraci 150 mg NO₃⁻ .l⁻¹ [2].

2.3 Spektrofotometrická měření

Absorbance vzorků se měřila v 10 mm skleněných kyvetách proti destilované vodě v spektrofotometru CADAS 100 (Dr.Bruno Lange).

2.4 Test na tvorbu dusitanů ve várečných kvasnicích

Várečné kvasnice se vpraví pipetou nebo injekční stříkačkou do kyvety s plochým dnem (kyvety fy Dr.Lange pro kyvetové testy). Po odstředění 10 min (frekvence otáček 3000.min⁻¹) a slití supernatantu se k sedimentu přidají 4 díly sterilní vody a po promíchání tyčinkou za současného působení ultrazvukové lázně se kvasnice rozptýlí.

Do zkumavky s 10 ml citrátového tlumivého roztoku s dusičnanem draselným se pipetuje 0,25 ml 1% roztoku m-FDA a podle potřeby 0,1 nebo 1,0 ml kvasničné suspenze, tj. 0,2 nebo 2% kvasničného sedimentu. Těmito hodnotám přibližně odpovídají výsledné koncentrace 10⁷ nebo 10⁸ kvasničných buněk v 1 ml tlumivého roztoku.

Po inkubaci při 25 °C se intenzita barevné reakce posuzuje podle tohoto klíče: 1 - světle oranžová, 2 - oranžová, 3 - světle červená, 4 - tmavě červená.

Přes současná měření spektrofotometrem se v článku uvádějí subjektivně odečítané intenzity zbarvení, aby se posoudila použitelnost testů i při vizuálním hodnocení. Při spektrofotometrickém měření odpovídá intenzitě zbarvení stupně 2 absorbance při 450 nm asi 2 absorbanční jednotky (AU), při intenzitě 3 je absorbance již větší než 4 AU.

2.5 Koliformní bakterie ve várečných kvasnicích

Koliformní bakterie se stanovovaly kultivací naředěných várečných kvasnic na Endově agaru (10⁶ kvas. buněk na plotnu) 2 dny při 37 °C.

2.6 Celkové bakterie ve várečných kvasnicích

Celkové bakterie se stanovovaly kultivací naředěných várečných kvasnic na půdě GTK (10⁶ kvas. buněk na plotnu) 3 dny při 37 °C. Půda GTK se připravila rozpuštěním práškovitého základu v destilované vodě (pH 7,0), nebo v citrátovém tlumivém roztoku (pH 5,0). V obou případech se k půdám před sterilací přidal aktidion (40 mg.l⁻¹).

2.7 Redukující bakterie ve várečných kvasnicích

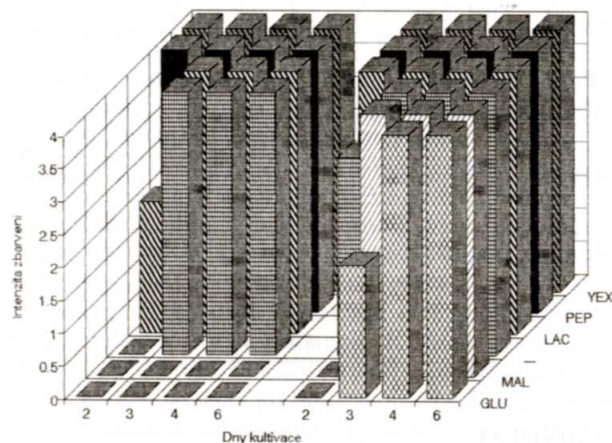
Redukující bakterie se stanovovaly kultivací naředěných várečných kvasnic na půdě GTK s přidavkem

dusičnanu draselného ($150 \text{ mg NO}_3^- \text{ l}^{-1}$) v citrátovém tlumivém roztoku (pH 5,0), aktidionu (40 mg.l^{-1}) a m-FDA ($0,25 \text{ g.l}^{-1}$). Roztok m-FDA se přidával před rozléváním roztažené půdy na misky. Po 3 dnech kultivace při 37°C se odečítaly pouze kolonie s hnědými zónami.

3. VÝSLEDKY

3.1 Vliv přidavku uhlíkatých a dusíkatých zdrojů na tvorbu dusitanů

V testu na tvorbu dusitanů (odst. 2.4) se k citrátovému tlumivému roztoku (pH 5,0) s dusičnanem draselným přidávaly 20% sterilní roztoky glukosy, maltosy a laktosy, kvasničního extraktu a peptonu ve výsledné koncentraci 1% (sacharidy) a 0,5% (kvasničný extrakt, pepton). Po přidavku m-FDA ($0,25 \text{ g.l}^{-1}$) a kontaminovaných kvasnic ($0,2\%$) se po kultivaci při 25°C hodnotilo zbarvení roztoku. Výsledky pro méně a více kontaminované kvasnice uvádí obr. 1. Méně kontaminované kvasnice obsahovaly 40 koliformních bakterií v 1 milionu kvasničných buněk (tj. $0,004\%$), stupeň kontaminace více kontaminovaných kvasnic byl $0,2\%$.



Obr.1. Tvorba dusitanů v méně (vlevo) a více (vpravo) kontaminovaných ($0,004\%$, $0,2\%$) kvasnicích v tlumivém roztoku (pH 5,0) s přidavkem roztoků glukosy (glu), maltosy (mal), laktosy (lac), peptonu (pep) a kvasničního extraktu (yex)

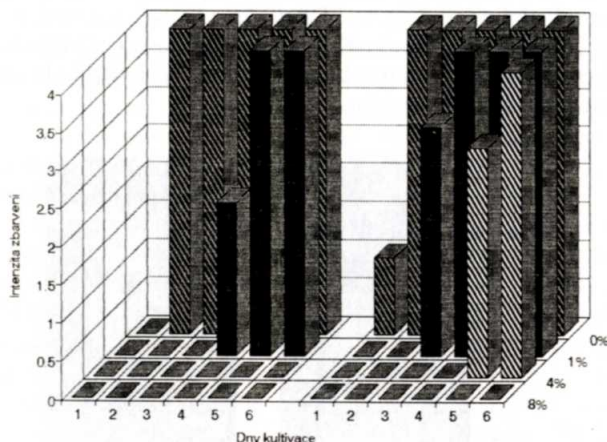
3.2 Vliv přidavku glukosy na tvorbu dusitanů

V testu na tvorbu dusitanů (odst. 2.4) se k citrátovému tlumivému roztoku (pH 4,5 nebo 5,0) s dusičnanem draselným přidal 20% roztok glukosy ve výsledné koncentraci 0 až 8% a m-FDA v koncentraci $0,25 \text{ g.l}^{-1}$. Po přidavku $0,2$ a 2% kvasničního sedimentu se při kultivaci při 25°C hodnotila intenzita zbarvení roztoku. Použité kvasnice obsahovaly $0,15\%$ koliformních bakterií (obr. 2,3).

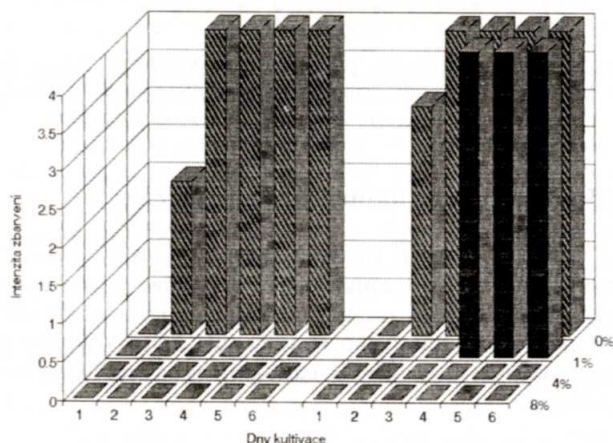
3.3 Vliv přidavku ethanolu na tvorbu dusitanů

V testu na tvorbu dusitanů (odst. 2.4) se k citrátovému tlumivému roztoku (pH 4,5 nebo 5,0) s dusičnanem draselným přidal 96% ethanol ve výsledné koncentraci 0 až

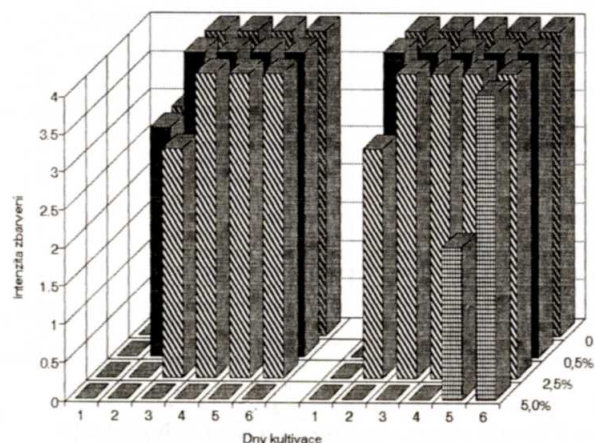
5% obj. a m-FDA v koncentraci $0,25 \text{ g.l}^{-1}$. Po přidavku $0,2$ a 2% kvasničního sedimentu se při 25°C hodnotila intenzita a zbarvení roztoku. Použité kvasnice obsahovaly $0,05\%$ koliformních bakterií (obr. 4,5).



Obr.2. Tvorba dusitanů v kontaminovaných ($0,15\%$) kvasnicích v tlumivém roztoku (pH 5,0) s přidavkem 0 - 8% glukosy. Vlevo $0,2\%$, vpravo 2% kvas. sedimentu.



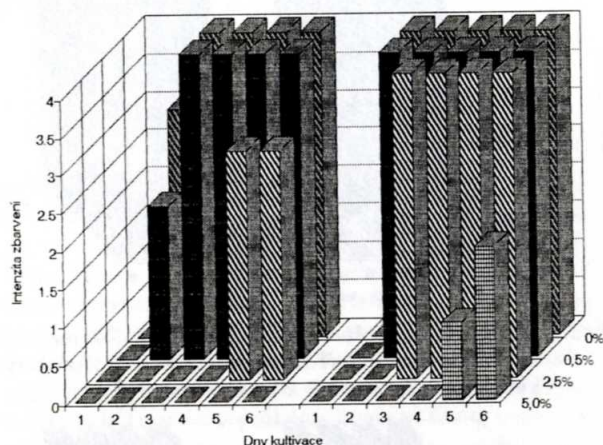
Obr.3. Tvorba dusitanů v kontaminovaných ($0,15\%$) kvasnicích v tlumivém roztoku (pH 4,5) s přidavkem 0 - 8% glukosy. Vlevo $0,2\%$, vpravo 2% kvas. sedimentu



Obr.4. Tvorba dusitanů v kontaminovaných ($0,05\%$) kvasnicích v tlumivém roztoku (pH 5,0) s přidavkem 0 - 5% obj. ethanolu. Vlevo $0,2\%$, vpravo 2% kvas. sedimentu

3.4 Vliv koncentrace dusičnanů na tvorbu dusitanů

V testu na tvorbu dusitanů (odst. 2.4) se k citrátovému tlumivému roztoku (pH 5,0) s různou koncentrací dusičnanu draselného (1,5 až 150 mg NO₃⁻·l⁻¹) přidal podle potřeby roztok glukosy 0,5%, m-FDA (0,25 g·l⁻¹) a 0,2 nebo 2,0% kvasničného sedimentu. Kvasnice obsahovaly 0,05 % koliformních bakterií. Intenzita zbarvení se hodnotila po kultivaci při 25 °C podle odst. 2.4 (tab. 1,2).



Obr.5. Tvorba dusitanů v kontaminovaných (0,05 %) kvasnicích v tlumivém roztoku (pH 4,5) s přídavkem 0 - 5 % obj. ethanolu. Vlevo 0,2 %, vpravo 2 % kvas. sedimentu

3.5 Test na tvorbu dusitanů bakteriemi z vody

100 ml vzorku výplachové vody po desinfekci provozního zařízení se přefiltrovalo membránovým filtrem s velikostí pórů 0,45 μm. Vždy 1/2 filtru se kultivovala v 10 ml citrátového tlumivého roztoku (pH 5,0) s přídavkem sacharidů nebo kvasničného extraktu a na pevné živné půdě (tab. 3).

Tab.1. Tvorba dusitanů v kontaminovaných kvasnicích (0,2 % sedimentu, pH 5,0)

Délka kultivace (dny)	Intenzita zbarvení					
	1	2	3	4	5	6
Koncentrace NO ₃ ⁻ (mg·l ⁻¹)						
a) bez glukosy						
1,5	0	0	1	1	1	1
15,0	0	0	2	2	2	2
150,0	0	0	3	4	4	4
b) s 0,5 % glukosy						
1,5	0	0	0	0	1	1
15,0	0	0	0	0	2	2
150,0	0	0	0	0	2	3

3.6 Vliv pH na růst bakterií na pevných půdách

Ve vzorcích várečných kvasnic se stanovily koliformní, redukující a celkové bakterie při pH 5,0 a pH 7,0. Výsledky uvádí tab. 4.

Tab.2. Tvorba dusitanů v kontaminovaných kvasnicích (2,0 % sedimentu, pH 5,0)

Délka kultivace (dny)	Intenzita zbarvení					
	1	2	3	4	5	6
Koncentrace NO ₃ ⁻ (mg·l ⁻¹)						
a) bez glukosy						
1,5	1	1	1	1	1	1
15,0	1	2	2	2	2	2
150,0	1	3	4	4	4	4
b) s 0,5 % glukosy						
1,5	0	0	1	1	1	1
15,0	0	0	2	2	2	2
150,0	0	0	3	4	4	4

Tab.3. Tvorba dusitanů bakteriemi z odkapové vody

Vzo- rek č.	Koliformní bakt./100 ml	Intenzita zbarvení po kultivaci (2 dny, 25 °C)			
		0 %	1 % glukosy	1 % laktosy	1 % kvas.extr.
1.	45	0	0	0	2
2.	300	2	2	2	4
3.	1	0	0	0	3
4.	160	3	3	3	4

Tab.4. Obsah bakterií ve várečných kvasnicích

Vzorek č.	Koliformní	Počet bakterií/10 ⁶ kvas.buněk		
		Celkové		Redukující
		pH 7	pH 5	
1.	3800	4200	155	89
2.	1600	1344	23	20
3.	800	780	10	5
4.	420	510	6	2

4. DISKUSE

V dříve uveřejněných studiích různých autorů se prokázalo, že hlavní příčinou tvorby dusitanů v kvasicích mladině jsou kontaminované kvasnice. Dusitany se tvoří zejména v počátečních fázích kvašení. Později jejich obsah v mladině rychle klesá. To se vysvětluje úbytkem dusitanů reakcí se složkami extraktu a jejich nestabilitou v kyselém prostředí.

Při kvašení sterilní mladiny mikrobiologicky čistými kvasnicemi dusitany nevznikají. Na druhé straně se může množství dusitanů, vzniklých během kvašení, lišit v širokém rozmezí. Sledování průběhu reakce vznikajících dusitanů s m-FDA umožnilo hodnotit tvorbu dusitanů během kvašení.

V modelovém systému, tvořeném citrátovým tlumivým roztokem s dusičnanem draselným, m-FDA s kontaminovanými kvasnicemi pokračovala tvorba dusitanu i při úpravě pH tlumivého roztoku na hodnotu kvasící mladiny, zatímco při nasazení stejných kvasnic do mladiny byla tvorba dusitanů potlačena [4].

Z těchto výsledků je patrné, že činnost kvasinek v počátcích kvašení může potlačit mikrobiální redukci dusičnanů. Proto se sledovala tvorba dusitanů v kontaminovaných kvasnicích za přídavku sacharidů a dusíkatých zdrojů, potřebných pro zahájení kvašení.

Přídavek zkvasitelných cukrů, jako jsou glukosa a maltosa velmi účinně potlačoval tvorbu dusitanů, zatímco laktosa naopak vznik dusitanů podporovala. Pivovarské kvasinky nemohou laktosu zkvašovat, na rozdíl od koliformních bakterií, redukujících dusičnany. Zkvašování laktosy je charakteristickým znakem těchto gramnegativních bakterií.

Podle očekávání se tvorba dusitanů zvýšila i přidavkem dusíkatých zdrojů, potřebných pro rozvoj bakterií i kvasinek. Inhibiční efekt zkvasitelných cukrů se podle očekávání silněji projevil u méně kontaminovaných kvasnic (*obr. 1*).

S rostoucí koncentrací glukosy rostl také inhibiční vliv na tvorbu dusitanů. Podle našich provozních pozorování vznikají dusitany snáze v mladínách s nízkou koncentrací extraktu. Zajímavý je vliv zákvasné dávky. Se zvyšující se dávkou kvasnic sice vzrůstá potlačení tvorby dusitanů, ale současně se do mladiny vnáší více bakterií. Proto se pokusy potlačit činnost kontaminujících bakterií zesílenou dávkou kvasnic často v praxi setkaly s neúspěchem.

Při sledování tvorby dusitanů v prostředí s pH 4,5 je dobře patrný vliv pH na tvorbu dusitanů. Při těchto zkouškách se volily dvě úrovně pH, přibližně odpovídající hodnotám pH zakvašené a kvasící mladiny. V prostředí bez přídavku glukosy však tvorba dusitanů probíhala i při hodnotách pH 4,5 (*obr. 2,3*).

Z možných příčin potlačení činnosti bakterií v počátcích kvašení přicházejí v úvahu náhlé oxyselení prostředí, absorpce živných látek a růstových faktorů kvasinkami, tvorba ethanolu a hypotetická tvorba zatím neznámé inhibující substance kvasinkami.

Vliv ethanolu byl méně významný, uváží-li se, že ze stejného množství glukosy vzniká přibližně poloviční množství ethanolu. Uvolnění vodíkových kationtů po přidání glukosy ke kvasnicím je dobře známé a souvisí s fyziologickými pochody v buňce (*obr. 4,5*).

Na stejném principu se zakládá tzv. acidifikační test vitality pivovarských kvasinek. K míchané suspenzi kvasnic se přidá roztok glukosy a měří se pokles pH. Během 20 min mohou hodnoty pH poklesnout až o 2 jednotky [3].

V prostředí se sníženým pH klesá počet bakterií, které by se mohly pomnožovat. Při stanovení gramnegativních bakterií ve várečných kvasnicích se na půdách s nižším pH získá nižší počet bakterií. Tyto bakterie však mohou účinně redukovat dusičnany.

Hodnoty pH vody, pod kterou jsou uchovávány kvasnice na zásobních vanách nebo v tancích kvasničního hospodářství se pohybují mezi 5,2 až 6,2. Za těchto podmínek se mohou gramnegativní bakterie dobře pomnožovat, uváží-li se ještě přítomnost dusíkatých látek a růstových faktorů, vylučovaných kvasnicemi.

Přes tyto skutečnosti se pravděpodobně při potlačení redukční schopnosti bakterií přidavkem glukosy výrazněji neuplatňuje oxyselení média. Na rozdíl od podmínek acidifikačního testu je koncentrace kvasnic podstatně nižší a navíc se nacházejí v médiu s velkou tlumící schopností. Ve shodě s tím se při měření pH média s kvasnicemi po přidavku glukosy neprokázal jeho výraznější pokles (*obr. 2,3*).

Bakterie se do mladiny uvolňují z povrchu spílacích cest a kvasných nádob. Na konci hlavního kvašení flokulují a sedimentují s kvasnicemi. Rozvoji bakterií v mladině brání počáteční pokles pH mladiny. Tak se i s použitím kontaminovaných kvasnic může tvorba dusitanů zastavit. Test s m-FDA i mikrobiologické rozborů mohou prokázat

přítomnost redukujících bakterií v kvasnicích, ale při kvašení mladiny nemusejí dusitany vznikat.

V prostředí bez kvasinek, nebo s jejich velmi nízkým obsahem, neovlivňuje přítomnost sacharidů průkaz dusitanů, jak je tomu např. při průkazu redukujících bakterií v odkapové vodě z provozního zařízení (*tab.3*).

Při posouzení možnosti tvorby dusitanů v provozních podmínkách se uplatňuje nejen kontaminace kvasnic gramnegativními bakteriemi, ale také počáteční pH kvasničné suspenze, vitalita kvasnic, zákvasná dávka a koncentrace mladiny. Všechny tyto faktory se mohou snadno posoudit reakcí s m-FDA.

Redukce dusičnanů v modelovém systému, tvořeném tlumivým roztokem s dusičnanem draselným, prokázala závislost množství vzniklého dusitanu na počáteční koncentraci dusičnanu. Bakteriální redukce probíhala i při velmi nízké koncentraci dusičnanu ($1,5 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$) (*tab. 1,2*). To se shoduje s pozorováním, že v praxi postačuje ke vzniku dusitanů a tvorbě netěkavých nitrosaminů (ATNC) velmi nízká koncentrace dusičnanů v mladině. Obsah dusičnanů v mladině může klesnout během kvašení kontaminovanými kvasnicemi až k nule.

Množství vzniklých dusitanů a tím i odpovídající množství ATNC závisí nejen na koncentraci dusičnanů, množství a druhu bakterií, ale také na fyziologickém stavu kvasnic a na složení okolního prostředí, zejména na přítomnosti zkvasitelných cukrů a na rychlosti zahájení kvasného procesu.

Jedním z možných vysvětlení je absorpce živných látek a růstových faktorů kvasinkami v začátku kvašení, takže tyto látky pak nemohou využívat bakterie, redukující dusičnany. Tím se potlačuje jejich rozvoj a mění se podmínky při kvašení (nižší pH, rostoucí koncentrace ethanolu) úplně inhibují redukci dusičnanů. Tak je možné nalézt v kvasnicích redukující bakterie a prokázat redukci dusičnanů v kvasnicích, ale v hotovém pivu se netěkavé nitrosaminy nevyskytují.

V praxi jsme zjistili, že při kvašení s kontaminovanými kvasnicemi s nízkou kvasnou aktivitou vzniká více dusitanů. O výsledném efektu redukujících bakterií nerozhoduje pouze jejich počet a aktivita, ale v podstatné míře také fyziologický stav kvasnic a podmínky kvašení.

Získané výsledky umožňují modelovat chování provozních kvasnic při kvašení. Na tomto základě lze připravit jednoduché mikrobiologické testy, sloužící k předpovědi tvorby dusitanů při provozním kvašení kontrolou odebraných várečných kvasnic. Tímto způsobem se také může velmi účinně kontrolovat mikrobiologická čistota úseku hlavního kvašení.

LITERATURA

- [1] ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ZDVÍHALOVÁ, D.: Kvas. prům., 39, 1993, s. 166.
- [2] ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ZDVÍHALOVÁ, D.: Kvas. prům., 38, 1992, s. 350.
- [3] KARA, B.W.-SIMPSON, W.J.-HAMMOND, J.R.M.: J.Inst.Brew., 94, 1988, s. 153.
- [4] Vlastní nepublikované výsledky

Lektoroval Ing. Jan Voborský
Do redakce došlo 21.12.1993

Šavel, J.-Zdvihalová, D.-Prokopová, M.: Jak vznikají dusitany při kvašení. Kvas.prům., 40, 1994, č.3, s. 70 - 74

Článek se zabývá tvorbou dusitanů v počáteční fázi kvašení. Tvorba dusitanů se sledovala v modelovém systému, skládajícím se z tlumivého roztoku s dusičnanem draselným (pH 5,0), kontaminovaných kvasnic a m-fenylendiaminu. Přidavek kvasničného autolýzáta a peptonu stimuloval redukci dusičnanů, zatímco zkvasitelné cukry potlačovaly redukci dusičnanů v přítomnosti kvasnic. Inhibici redukce dusičnanů při kvašení lze částečně vysvětlit poklesem pH a tvorbou ethanolu během kvašení, ale kromě toho se pravděpodobně uplatňuje další mechanismus, spojený s přednostním využitím živných látek a růstových faktorů kvasinkami.

Šavel, J.-Zdvihalová, D.-Prokopová, M.: How Originate Nitrites in the Course of Main Fermentation. Kvas.prům., 40, 1994, No.3, pp. 70 - 74

The article highlights some aspects in connection with nitrites formation in the initial fermentation stage. Nitrites formation was monitored in a model system, composed of buffer solution containing potassium nitrate (pH 5,0), contaminated yeast and m-phenylenediamine. Addition of the yeast autolysate and pepton stimulated nitrates reduction, whereas nitrates reduction was being suppressed by fermentable sugars in the presence of yeast. Nitrates inhibition reduction during fermentation can be partially explained by pH-value decrease and ethanol formation during fermentation process, but apart from this, there probably comes to effect another mechanics, connected with preferential utilization of nutrient substances and growth factors by the yeast.

Šavel, J.-Zdvihalová, D.-Prokopová, M.: Wie entstehen Nitrite während der Gärung. Kvas.prům., 40, 1994, Nr.3, S. 70 - 74

Der Artikel befaßt sich mit der Bildung von Nitriten in der Anfangsphase der Gärung. Zur Verfolgung der Nitritebildung wurde ein Modellsystem angewandt, bestehend aus Pufferlösung mit Kaliumnitrat (pH 5,0), kontaminierten Hefen und m-Phenylendiamin. Die Zugabe von Hefeautolysat und Pepton stimulierte die Nitratreduktion, wogegen die vergärbaren Zucker auf die Nitratreduktion in Anwesenheit der Hefe inhibierend wirkten. Die Inhibition der Nitratreduktion bei der Gärung kann teilweise durch die pH-Senkung und Äthanolbildung während der Gärung erklärt werden, aber neben diesen Einflüssen setzt sich hier wahrscheinlich ein weiterer Mechanismus durch, der mit der Vorrangsausnützung der Nährstoffe und Wachstumsfaktoren durch die Hefen verbunden ist.

Шавел, Я. - Здвигалова, Д. - Проконова, М.: Как возникают нитриты при брожении. Квас. прум., 40, 1994, 3, стр. 70 - 74

Статья занимается образованием нитритов в начальной фазе брожения. Образование нитритов исследовалось в модельной системе, состоящей из буферного раствора с азотнокислым калием (pH 5,0), загрязнённых дрожжей и м-фенилендиамина. Добавка дрожжевого автолизата и пептона стимулировала восстановление нитритов, тогда как сбраживаемые сахара подавляли восстановление нитритов в присутствии дрожжей. Ингибирование восстановления нитритов при брожении отчасти можно объяснить понижением pH и образованием этанола в процессе брожения, однако кроме того, по всей вероятности, здесь находит место и следующий механизм, связанный с преимущественным использованием питательных веществ и факторов роста дрожжами.