

Využití některých nových analytických metod ke kontrole znaků jakosti piva

Ing. JIŘÍ ŠROGL, Ing. JANA VACKOVÁ, výzkumná laboratoř, Západočeské pivovary, n. p., Plzeň

663.41 : 543

Předneseno na XII. pivovarsko-sladařském semináři v Plzni



Ve svém sdělení se zaměříme na některé analytické metody, které jsme v poslední době používali na našem pracovišti ve výzkumné laboratoři Západočeských pivovarů, n. p., v Plzni. Uvádíme zde několik metod, které se používají k stanovení obsahu kyslíku, resp. koloidní stability piva.

Negativní vliv kyslíku na jakost piva je obecně znám, a proto je kontrola provzdušnění jednou z nejdůležitějších. Pro stanovení kyslíku v pivě je vypracováno množství metod.

Dnes se kyslík v mladínách a pivech nejčastěji určuje některou z elektrochemických metod. Z nich je velmi rozšířena polarografická metoda. Spočívá v reakci kyslíku na katodě z některého vzácného kovu (stříbra, zlata apod.). Katoda je často kryta membránou, propouštějící kyslík (např. teflonovou, polypropylenovou apod.). Přístroje tohoto druhu se používají velmi často. Například přístroj *firmy Beckman* [1] pracuje se zlatou katodou, krytou teflonovou fólií. U nás vyráběný oxytest je konstruován na obdobném principu, používá však stříbrnou katodu krytou polypropylenovou membránou. *Galoway, Raabe a Bates* [2] popsali v roce 1967 přístroj, který se používá v mnoha pivovarech v USA. Použitá katoda je stříbrná, anoda zinková. Autoři porovnávají kolorimetrickou metodu s měřením uvedeným přístrojem. Konstatují poměrně velmi uspokojivou shodu. Obdobných přístrojů se vyrábí v různých zemích více.

Druhou skupinu tvoří kolorimetrické stanovení, založené většinou na reakci leukoformy indigokarminu s kyslíkem za vzniku modrého zbarvení. Tuto reakci popsali poprvé již v roce 1938 *Rotschild a Stone* [3]. Metoda se velmi rozšířila a je dnes známa v mnoha modifikacích. Ve většině dnes používaných metodik se vychází z indigodisulfonanu sodného. Ten se převede na žlutou leukoformu, která se kyslíkem reoxiduje za vzniku modrého zbarvení, jehož intenzita je úměrná obsahu kyslíku ve zkoumané kapalině.

Hiefner a Burwig [4] popsali metodu, kterou se zjišťuje obsah rozpuštěného kyslíku v lahvích piva, do nichž se před odběrem vzorku zavede ampulka s indikátorem a skleněnou kuličkou. Po stočení vzorku se ampulka uvnitř láhve rozbije a zkoumané pivo zbarví indikátor indigem podle obsahu jeho oxidované leukoformy.

V naší laboratoři používáme metodu, kterou navrhl *Kipphan* [5]. Používá se speciální injekční stříkačka, dodávaná firmou *Enzinger*. Indikátor se připraví rozpuštěním obchodního preparátu (indigodisulfonanu sodného) ve vodě s přídavkem glukózy a glycerolu. Roztok se zalkalizuje KOH a asi 7 ml se nasaje do injekční stříkačky. Hrot stříkačky se potom utěsní gumovou zátkou a celá stříkačka se ponoří do vodní lázně, ve které se zahřeje přibližně na 80 °C asi za 10 minut. Tím se modrý indigodisulfonan převede na žlutou leukoformu. Injekční stříkačka s indikátorem se potom ochladí na teplotu, při které se bude odebrat vzorek. Při odběru se zkoumaný vzorek nasaje do injekční stříkačky, při tom se smísí s 5 ml zredukovaného indikátoru, který je předem připraven v injekční stříkačce. Po smísení se vzorek zbarví modře, úměrně obsahu kyslíku přítomného ve zkoumané kapalině.

Popsaná metoda je poměrně spolehlivá a stanovení velmi jednoduché. Vyžaduje však přesnou přípravu. Je třeba vždy zkontrolovat obsah barviva v obchodním indigodisulfonanu titrací KMnO_4 (bývá kolem 80 %). Důležitý je též cvik při odběru vzorku. Injekční stříkačka se před použitím musí pečlivě vyzkoušet na těsnost a píst i závit jehly natřít silikonovou vazelinou. Překážkou většího rozšíření popsané metody je nedostatek injekčních stříkaček, které dodává speciálně pro tento účel přímo firma *Enzinger*.

Dalším velmi významným znakem jakosti pív, a to zvláště exportních, je jejich koloidní stabilita a z ní plynoucí nebiologická trvanlivost piva.

Názory na hodnocení koloidní stability piva nejsou dosud jednotné. Je to způsobeno značnou složitostí koloidního systému, který pivo představuje. Jako orientační hodnocení může sloužit obsah celkového dusíku. To je však hodnocení velmi hrubé a souvislost s nebiologickou trvanlivostí není jednoznačná. Poněkud vhodnější je hodnocení stanovením frakcí bílkovin podle *Lundina*. Lze říci, že Lundinova frakce A, představující největší bílkovinné molekuly, je v poněkud lepší korelaci s nebiologickou trvanlivostí zkoumaného piva. Tato metoda je však velmi pracná. Polarografické hodnocení koloidní stability piva Brdičkovou reakcí je velmi vhodné a při použití soudobé techniky i rychlé. Často však narážíme na technické obtíže, zvláště při opatřování vhodného přístroje. Šokovací zkouška podle *Schilda* [6, 7] podává patrně nejlepší hodnocení koloidní stability piva a poměrně dobře se shoduje se skutečnou nebiologickou trvanlivostí. U této metody, používané u nás ve větším měřítku ve VÚPS Praha, je nevýhodou značná časová i technická náročnost.

K provozním účelům se často používá test na síran amonný, zavedený do pivovarské praxe *Hartongem*. Test je velmi rychlý a jednoduchý. Pro závislost na subjektivitě analytika není však tak spolehlivý a nevyjadřuje též zcela přesně skutečnou nebiologickou trvanlivost. Lze říci, že je vhodný spíše pro orientační stanovení.

Nyní uvádíme stanovení vysokomolekulárních bílkovin, které nebylo v pivovarské praxi použito. Jeho princip spočívá v tom, že při chromatografii některých látek na nitrocelulózové membráně zůstávají vysokomolekulární bílkoviny u startu. Při kruhové chromatografii se rozestřou vysokomolekulární bílkoviny do stejnoměrné vrstvy kolem středu, takže vytvoří kruh, jehož plocha je přímo úměrná obsahu bílkovin v roztoku. Uvedeného jevu se využívá v hematologii [8, 9, 10] a předpokládali jsme možnost využití i v pivovarství, což se potvrdilo. Na našem pracovišti jsme vypracovali metodiku porovnání různých pív podle obsahu vysokomolekulárních bílkovin. Vlastní stanovení je velmi jednoduché a nevyžaduje žádný přístroj. Používá se nitrocelulózová membrána Synpor 6 (výrobce n. p. Synthesia, Uhřetěves), běžně používaná v našich laboratořích k membránové filtraci mikroorganismů. Membrána, vyvařená v destilované vodě, se ovlhčí pufrům pH asi 4 (v naší laboratoři používáme acetátový pufr pH = 3,8). Do středu membrány zavedeme zahnutou kalibrovanou kapilárou zkoumané pivo v množství asi 150 μ l. Do téhož bodu zavedeme potom stejné nebo o něco větší množství pufru. Takto „vyvolanou“ membránu ponoříme potom asi na 10 minut do 0,3% roztoku nigrosinu v 5% kyselině trichloroctové. Na membráně se objeví tmavomodrý kroužek, jehož plocha je úměrná určité frakci vysokomolekulárních bílkovin. Toto stanovení je velmi jednoduché a zcela snadné. Je dobře reprodukovatelné a postihuje bílkoviny, odpovídající přibližně Lundinově frakci A, avšak tato souvislost není přesná. Popsaným způsobem se zachytí bílkoviny i s molekulami o něco menšími, než odpovídají Lundinově frakci A. Na následujících číslech

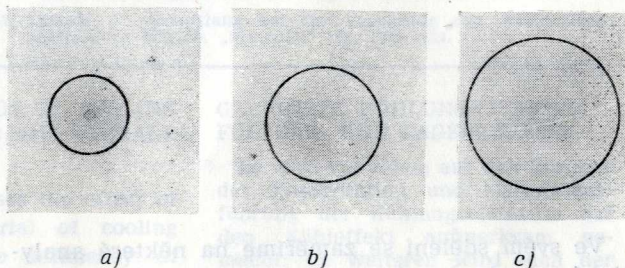
je patrna souvislost velikosti vzniklých kroužků s obsahem bílkovin.

1. 12° pivo, v mladíně 10% sacharózy, část bílkovin odstraněna přidavkem taninu,
 $N = 53,6$ mg/100 ml, Lundinova frakce A = 9 %, plocha zóny = 83,27 mm²,

2. 12° pivo, v mladíně 10 % sacharózy
 $N = 60,5$ mg/100 ml, Lundinova frakce A = 12,6 %, plocha zóny = 206,02 mm²,

3. 12° pivo, vyrobené ze sladu,
 $N = 70,3$ mg/100 ml, Lundinova frakce A 17,5 %, plocha zóny = 260,02 mm².

Ukázka vzniklých zón je patrna také na obrázku 1.



Obr. 1

a — 12° pivo, 150 μ l, surogace: 10% sacharóza, část bílkovin odstraněna přidavkem taninu

b — 12° pivo, 150 μ l, surogace: 10% sacharóza

c — 12° pivo, 150 μ l, bez surogace

Vzhledem k tomu, že je tato metoda málo pracná, domníváme se, že je jí možno v širokém měřítku využít pro stanovení vysokomolekulárních bílkovin, resp. koloidní stability piva. Prozatím však nemáme přesně identifikovanou frakci zachycovaných bílkovin, a nemůžeme proto vztáhnout množství zjišťovaných bílkovin na nějaký základ. Pro provozní kontrolu však absolutní hodnoty nejsou rozhodující, jde spíše o porovnání jednotlivých pív. Lepší teoretické vysvětlení zjišťovaných hodnot silně znesnadňuje též to, že není dosud objasněn druh vazeb, kterými se bílkoviny vážou na membránu. Existuje řada nepotvrzených hypotéz. Jedna z nich např. předpokládá, že aminoskupiny bílkovin se vážou na dusičnanové skupiny nitrocelulózy.

Ve skutečnosti se však popsáním postupem zachycuje určitá frakce vysokomolekulárních bílkovin a podle obsahu této frakce lze porovnávat jednotlivá piva. Zdá se, že u piva Prazdroj je tato hodnota nižší než u jiných pív, jak dokazují tato čísla:

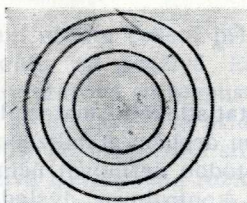
1. pivo Prazdroj — plocha zóny 254,34 mm²
2. pivo 1 — plocha zóny 283,39 mm²
3. pivo 2 — plocha zóny 346,19 mm²
4. pivo 3 — plocha zóny 390,36 mm²

Jde většinou o 12° piva a dávku vzorku 150 μ l.

Při sledování těchto čísel si je nutno uvědomit, že u pív 2 až 4 se na rozdíl od piva Prazdroj uplatňuje surogace cukrem v průměrné výši 20 %. Přesto je plocha měřených zón vždy větší u piva Prazdroj. Může to mít více důvodů (třířmutový způsob výroby, přímý otop atd.). V budoucnu se pokusíme vysvětlit uvedené rozdíly sledováním jednotlivých

fází výroby piva. Stanovení bílkovinné frakce v mladínách, popř. sladínách, je dobře proveditelné. Možno dokonce říci, že je v těchto případech rychlejší, protože se používá menších dávek vzorku (30 až 50 μ l). U sladín se zpravidla objevuje frakcí více (zpravidla 4).

Na obrázku 2 je ukázka bílkovinných frakcí ve sladíně.



Obr. 2. Stanovení bílkovinných frakcí ve sladíně

Metoda je použitelná také pro laboratorní hodnocení stabilizačních prostředků. Domníváme se, že toto použití je velmi výhodné. Pro informaci uvádíme jako příklad hodnocení enzymového stabilizačního prostředku, jehož vzorek jsme měli k dispozici v naší laboratoři. Odebrali jsme několik lahví stáčeného piva a stanovili popsanou metodou bílkovinnou frakci. Plocha vzniklé zóny byla 226,87 mm^2 . Potom jsme do piva dávkovali stabilizační prostředek v množství 0,1 g/l a nechali 24 hodiny v termostatu při 38 °C. Po této době jsme opět stanovili bílkovinnou frakci. Plocha zóny byla 102,02 mm^2 .

Šlo v podstatě pouze o orientační pokus, který měl prokázat vhodnost metody k uvedenému účelu. Domníváme se, že tohoto cíle se dosáhlo a že lze popsanou metodou posuzovat vhodnost toho kterého stabilizačního prostředku pro určitý druh piva. I zde si však jsme vědomi, že jde pouze o orientační zkoušky pro provozní pokusy, které jsou rozhodující.

V závěru děkujeme RNDr. T. I. Přistoupilovi z Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze

za všestrannou pomoc při přizpůsobování metody stanovení vysokomolekulárních bílkovin na nitrocelulózových membránách pro pivovarské účely.

Souhrn

Přednáška je zaměřena na sledování některých kvalitativních znaků hotových výrobků, zvláště provzdušnění piva v poslední fázi výroby a koloidní stability piva.

Je podán přehled nejpoužívanějších elektrochemických i chemických metod kontroly obsahu kyslíku v pivě. Modifikace, vypracovaná firmou Enzinger se osvědčila v laboratoři provozu Prazdroj.

Dále byl podán přehled metod na stanovení koloidní (popř. bílkovinné) stability piv, a to: síranový test, polarografická metoda, stanovení frakcí podle Lundina, popsaná nová metoda stanovení vysokomolekulárních bílkovin v pivě. Metoda je založena na stejnoměrné adsorpci vysokomolekulárních bílkovin na nitrocelulózových membránách. Technika provedení je založena na adsorpční kruhové chromatografii bílkovin na membránách. Byla dosud pokusně použita ve výzkumné laboratoři n. p. Západočeské pivovary v Plzni ke kontrole koloidní stability piv, kontrole aktivity stabilizačního prostředku a kontrole rmutování i chmelovaru.

Metoda bude pravděpodobně vhodná pro všechna uvedená stanovení. Pracuje se s nitrocelulózovou membránou Synpor 6 (výrobce VCHZ — Uhřetěves).

Literatura

- [1] SCHUR, F.: Schweiz. Brau. Rundschau **76**, 1965: 79—86.
- [2] GALLOWAY, H. M. - RAABE, E. A. - BATES, W.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 1967: 79—83.
- [3] ROTSCCHILD, H. - STONE, J.: J. Inst. Brew. **425**, 1938; cit. podle 1.
- [4] HIEFNER, R. - BURWIG, D.: Brauwiss. **21**, 1968: 11—13.
- [5] KIPPAN, H. a kol.: Enzinger Nachrichten, Heft 3/1969.
- [6] SCHILD: Brauwiss. **17**, 1964: 289—294; cit. podle 7.
- [7] BASAŘOVÁ, G.: Kvasný průmysl **15**, 1969: 57—61.
- [8] PŘISTOUPIL, T. I.: J. of Chromography **34**, 1968: 370—374.
- [9] PŘISTOUPIL, T. I.: Nature **212**, 1966: 75.
- [10] PŘISTOUPIL, T. I.: Chem. listy **63**, 1969: 577—595.