

10

říjen 1975

ročník 21

Kvasný průmysl

ODBOURNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÉM A NÁPOJOVÉM PRŮMYSLU

Pivovazství a sladažství

Objektivní stanovení koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného z piva („síranový test“)

663.41:543

Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, CSc. - Ing. IVANA ČERNÁ - JANA KOVAŘÍKOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha.

Ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze se řeší stálý úkol „Výběr a aplikace fyzikálně chemických a biochemických metod pro hodnocení meziproductů a piva“. V rámci tohoto úkolu se upravují, ověřují a vypracovávají nové metody jak pro výzkumnou práci, tak i pro použití v rozšířené kontrole výroby. Pracovníci podnikových a závodových laboratoří se na nás obraceli se žádostí o zasílání závěrečných zpráv k příslušnému úkolu, ve kterých jsou uvedeny předpisy nových a upravených metod. Protože však tyto zprávy jsou ve VÚPS k dispozici v omezeném počtu výtisků a obsahují vedle popisů metod i řadu speciálních měření, která pro praxi nejsou nutná, budeme postupně metody, o které byl projev největší zájem, publikovat v našem odborném časopise „Kvasný průmysl“. V tomto článku popisujeme objektivní stanovení tzv. „síranového testu“, kterým se registruje koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného.

Předpovědět trvanlivost piva a zhodnotit jeho tendenci vytvořit chladový nebo oxidační zákal se snažilo mnoho autorů. Některé z těchto pokusů shrnul ve své práci de Clerck [1] a Clarck [2].

Většina současných metod je založena na principu tzv. „šokovacích“ testů. Jejich výsledky je však možno získat nejdříve do týdne a navíc je lze jen obtížně uvést v relaci s dobou dokvašování a stabilizačními zásahy.

Je známo, že množství proteinů, jak jsou vyjádřeny při stanovení celkových dusíkatých látek, adekvátně ne-

určuje stabilitu piva. Jako další důležité faktory se zde uplatňuje spektrum velikosti molekulových hmot proteinů, přítomnost dalších sloučenin podporujících tvorbu zákalu jako polyfenoly, těžké kovy a sacharidy. Nedávné práce [3, 4, 5], využívající laboratorní techniky elektroforézy, sloupcové chromatografie na DEAE — celulóze a sephadexu, ukázaly složitost protein-polysacharidových frakcí piva a upozornily na fakt, že tato frakce je složitým systémem schopným reverzibilní asociace a disociace.

Hartong [6] je původním autorem techniky přidávání postupně se zvyšujících dávek nasyceného roztoku síranu amonného k 10 ml podílům piva v sérii zkušebních zkumavek. Minimální objem, který vytvořil zřetelný zákal, nazval „prahovou hodnotou vysrážení“.

De Clerck [1] upozornil na nesrovnalosti mezi výsledky Hartongovy původní metody a výsledky běžných testů stability. Zvýšení stability vůči chladu se neprojevilo paralelně v účinnosti síranu amonného.

Simmonds et al. [7] považovali za výhodné přidávat standardní množství nasyceného roztoku síranu amonného k standardnímu množství piva a udržovat konstantní teplotní podmínky. Hodnotu vytvořeného zákalu pak odečetli po určité době na nefelometru, např. na Radiometer Hazemeter, popsáném autory Thornerem a Beckleyem [8].

Laboratorní technika, využívající zákalu, vytvořeného síranem amonným v pivě umožňuje poměrně přesně odhadnout hladinu potenciálních zákalotvorných složek,

přítomných v pivu v kterémkoliv stupni procesu výroby piva.

Je nutno si však uvědomit rozdílné působení srážecích a enzymových přípravků na složení dusíkatých látek. Tanin stabilizuje pivo odstraněním vysokomolekulárních složek polypeptidů a polysacharidů z piva. Enzymové proteolytické přípravky snižují naopak velikost agregátů tvořených polypeptidy, polysacharidy a polyfenoly, aniž by je z piva odstraňovaly. Proto také příměním množstvím enzymového přípravku se neovlivní pěnотvorné vlastnosti piva jako taninem.

Zákal, vytvořený určitým objemem nasyceného roztoku síranu amonného, je ve vztahu k době dokvašování, přidavku stabilizačních přípravků jako je tanin, aktivitě proteolytických prostředků a době skladování piva po stočení do lahvi.

Metoda, založená na vysrážení dusíkatých látek síranem amonným, se může využít ke sledování ovlivnění reakcí potenciálních zákalotvorných látek stabilizačními postupy.

V podnikových laboratořích našich pivovarů i ve VÚPS se ke stanovení koncentrace potenciálních zákalotvorných dusíkatých látek používalo subjektivní stanovení „síranového testu“. Jak je však zřejmé, toto stanovení je značně závislé na rozlišovací schopnosti pracovníka, který analýzu provádí, dále na osvětlení místnosti, ve které se stanoví stupeň zakalení. Mezi laboratořemi jsou však značné rozdíly také v tom, zda za základ vyhodnocené metody se bere pouze počáteční opalescence vzorků nebo zřetelný zákal vyvolaný přidáním nasyceného roztoku síranu amonného. Významný vliv na zjištěnou hodnotu síranového testu má i způsob přípravy nasyceného roztoku síranu amonného.

Objektivní stanovení „síranového testu“ výše jmenované chyby vylučuje.

V čs. literatuře uvádí Šavel et. al. [9] stanovení síranového testu objektivně na kolorimetru a vyjadřuje jej jako světelnou absorpci piva s přidavkem nasyceného roztoku síranu amonného (37 ml na 100 ml piva) proti pivu se stejným přidavkem destilované vody. Hummel et al. [10] měřili intenzitu zákalu po 15 minutách od přidavku síranu amonného na přístroji značky Kovo, Vlašim.

Závodové laboratoře našich pivovarů nejsou vybaveny jednotnou přístrojovou technikou. Snažili jsme se propracovat takové aplikace metod, při kterých se používá stejných vztažných hodnot. Potom je možné srovnávat výsledky stanovení na různých přístrojích s různým množstvím vzorků.

Metodu tzv. „síranového testu“ jsme aplikovali těmito způsoby:

a) měřením stupně zákalu piva po přidání nasyceného roztoku síranu amonného v jednotkách EBC (formazinového zákalu) na přístroji Haze-Meter (Trübungsmesser Type UKM 1d, jehož výrobcem je dánská firma Radiometer A/S, Dánsko),

b) měřením procenta světelné propustnosti na spektrálním fotometru typ VSU 2-P s nástavcem pro blízkou infračervenou oblast; výrobcem přístroje je VEB Carl Zeiss, Jena, NDR,

c) měřením procenta světelné absorpce na fotokolorimetru Spekol s nástavcem pro měření zákalu ve zkumavkách typ TR; výrobcem je VEB Carl Zeiss, Jena, NDR,

d) pro doplnění se provádělo současně subjektivní stanovení síranového testu postupným zvyšováním dávky roztoku nasyceného síranu amonného do piva až do vytvoření postřehnutelné opalescence.

Příprava nasyceného roztoku síranu amonného

Nasycený roztok síranu amonného se připraví rozpouštěním krystalického síranu amonného při laboratorní teplotě za stálého míchání. Při teplotě 20 °C nasycený roztok obsahuje 43 g bezvodého síranu amonného ve 100 g roztoku. Přidá se mírný přebytek, a to takový, aby po ustálení roztoku po 48 hodinách zůstaly na dně baňky nerozpouštěné ojedinělé krystalky síranu amonného. Rozpouštění síranu amonného za tepla tím způsobem, že se přidává síran amonný tak dlouho, dokud se v kapalině rozpouští, není vhodné. Takto se připraví roztok, při jehož ochlazení na laboratorní teplotu se vyloučí značné množství krystalů síranu amonného. Toto vylučování je nejdříve rychlé, později pozvolné a je nutné nechat roztok ustálit minimálně 3 až 4 dny a potom dobře zfiltrovat, aby po stěnách a dnu láhve vyloučené množství síranu amonného nebylo při pipetování částečně přenášeno do analyzovaného piva.

Subjektivní metoda „síranového testu“

Do řady zkumavek se napipetuje po 10 ml piva zbaveného kyslíčnicku uhličitého a postupně se přidává od 0,5 do 4 ml nasyceného roztoku síranu amonného s rozdílem 0,1 ml. Současně se připraví řada zkumavek s 10 ml piva a s množstvím destilované vody odpovídajícím objemu v hlavní zkoušce přidávaného roztoku síranu amonného. Obsah zkumavky se vždy po přidání roztoku síranu amonného důkladně protřepe a přesně po 15 minutách se posuzuje čírost v porovnání k slepému pokusu. Hodnota síranového testu se vyjádří v ml spotřebovaného nasyceného roztoku síranu amonného po vytvoření zřetelné opalescence vzorku.

Stanovení „síranového testu“ na přístroji Haze-Meter

Do baňek se napipetuje po 200 ml piva zbaveného kyslíčnicku uhličitého a postupně zvyšující se množství nasyceného roztoku síranu amonného od 10 ml do 90 ml podle provedené stabilizační úpravy piva. Po 15 minutách od přidání síranu amonného a promíchání se změří v přístroji Haze-Meter čírost piva v jednotkách EBC. Směs piva s roztokem síranu amonného je nutné přelít z baňky do kyvety v přístroji alespoň 2 minuty před uplynutím reakční doby 15 minut, aby se vzorek dostatečně ustálil.

Přístroj se cejchuje standardním roztokem formazinového zákalu, jehož přípravu popisujeme dále.

Stanovení „síranového testu“ na přístroji Spekol

Do zkumavek se napipetuje 10 ml piva zbaveného kyslíčnicku uhličitého s postupně se zvyšující dávkou nasyceného roztoku síranu amonného. Současně se připraví obdobná řada zkumavek s 10 ml piva s množstvím destilované vody, odpovídajícím dávkám roztoku síranu amonného v řadě hlavní zkoušky. Měří se na přístroji Spekol při vlnové délce 570 nm. Nulová hodnota stupnice se nastaví destilovanou vodou při citlivosti 200. Hodnota 100 % absorpce na stupnici se nastaví na standard formazinového zákalu odpovídající dvacetiletým jednotkám EBC. Vlastní měření piva se provádí přesně 15 minut po nadávkování nasyceného roztoku síranu amonného proti vzorku piva se stejnou dávkou destilované vody při citlivosti 200.

Stanovení „síranového testu“ na spektrálním fotometru VSU 2-P

Do zkumavek se napipetuje po 10 ml piva zbaveného kyslíčnicku uhličitého a postupně zvyšující se dávka nasyceného roztoku síranu amonného. Měří se při absor-

banci 600 nm patnáct minut po nadávkování síranu amonného do piva. Hodnota 100 % propustnosti se nastaví na destilovanou vodu. Vlastní měření síranových testů se provádí v kyvetách 1 cm proti slepému pokusu, který se připraví smícháním piva s příslušnou dávkou vody. Stejně jako při měření v Haze-Metru je nutno plnit kyvetu před uplynutím doby 15 minut působení síranu amonného, aby se roztok v kyvetě ustálil.

Příprava standardního formazinového zákalu [11]

Postup přípravy standardního formazinového zákalového roztoku je tento:

a) 1 g hydrazinsulfátu ($N_2H_4 \cdot H_2SO_4$) se rozpustí v destilované vodě v 100 ml odměrné baňce a po doplnění po značku se tento roztok nechá minimálně čtyři hodiny ustát před dalším použitím;

b) 10 g hexametylentetraminu ($C_6H_{12}N_4$) (forminu) se naváží do 100 ml odměrné baňky, rozpustí v menším množství destilované vody a baňka se doplní po značku;

c) přesně odpipetované množství roztoků a, b, c se smíchá v poměru 1:1 a tento tzv. formazinový zákalový koncentrát se v láhvi uzavřené skleněnou zátkou nechá stát minimálně dvacet čtyři hodiny před dalším použitím. Stupeň zákalu roztoku odpovídá 1000 jednotkám EBC;

d) do 100 ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml koncentráta a baňka se doplní po značku destilovanou vodou. Získaný disperzní roztok má zákal, který odpovídá 100 jednotkám EBC.

Diskuse

Hodnoty změřené na jednotlivých přístrojích (procento světelné absorpce, propustnosti) jsme srovnávali s hodnotou standardního formazinového zákalu v jednotkách EBC. K tomu jsme nejdříve na každém přístroji proměřili formazinové zákalové roztoky, které odpovídaly 0,5, 0,6 až 12 jednotkám EBC proti destilované vodě. Za základ vyhodnocení jsme určili hodnotu dvou jednotek EBC. Zákalový formazinový roztok odpovídající dvěma jednotkám EBC vykazuje okem postřehnutelnou opalescenci.

Zákal formazinového standardu odpovídajícího jednotkám EBC při měření na přístroji Spekol za dříve definovaných podmínek dává hodnotu 10 % světelné absorpce a na spektrálním fotometru VSU-2P 95,5—96 % světelné propustnosti. Přístroj Haze-Meter je cejchován přímo v jednotkách EBC.

Dále jsme u řady vzorků pív s různým stupněm stabilizační úpravy stanovili hodnoty „síranových testů“ na všech třech přístrojích podle dříve popsaných postupů. Množství přidaného nasyceného roztoku síranu amonného do piva jsme přepočítali na 10 ml vzorku. Z těchto šetření vyplynuly následující závěry pro hodnocení výsledků „síranového testu“ ve vztahu ke koncentraci potenciálních zákalotvorných dusíkatých látek a k míře stabilizace piva:

a) piva nestabilizovaná dávají zákal 2 jednotky EBC a více při dávce 0,5—1,25 ml nasyceného roztoku síranu amonného na 10 ml piva. Hodnota testu je závislá na složení surovin a na vytvoření určité rovnováhy koloidních látek přirozencu „stabilizací“ v průběhu výroby piva;

b) piva stabilizovaná nízkými dávkami stabilizačních přípravků — kombinace srážecí nebo adsorpční prostředek a enzymový přípravek nebo jen normální dávka adsorpčního nebo srážecího prostředku — která jsou určena pro tzv. blízký export s předpokladem trvanlivosti tři až čtyři měsíce, mají vykazovat zákal dvě jednotky EBC při spotřebě 2,75 ml nasyceného roztoku síranu amonného na 10 ml piva;

c) piva určená pro skladování po dobu cca šesti měsíců mají být stabilizační technologií upravena tak, aby zákal dvě jednotky EBC se vytvořil po přidání 3,0 ml nasyceného roztoku síranu amonného do 10 ml piva;

d) piva s předpokládanou trvanlivostí osm měsíců a více mají být stabilizačními přípravky upravena tak, že zákal dvě jednotky EBC se vytvoří po přidání 3,5 ml nasyceného roztoku síranu amonného na 10 ml piva.

Kromě stabilizační technologie má na skutečnou trvanlivost piva vliv řada dalších faktorů, jako je složení sypání na várku a technologické podmínky výroby, které zajišťují stabilitu složení koloidů v pivu přirozenou cestou (intenzita chmelovaru s odpovídajícím stupněm koagulace, míra vysrážení tříslobílkovinných kalů při hlavním kvašení a hlavně při dokvašování za nízké teploty sklepa atd.). Proto si může každá laboratoř námi uvedené hranice podle vlastních praktických zkušeností upravit pro výrobky svého závodu.

Při sériové analýze vzorků pív odebraných před stáčením z ležáckých nádob není nutné u každého vzorku provádět celou postupnou řadu stanovení „síranového testu“. Stačí podle provedeného stabilizačního zásahu a požadované doby na trvanlivost piva udělat jednu analýzu s vymezenou dávkou nasyceného roztoku síranu amonného. Jestliže změřená hodnota síranového testu odpovídá více než dvěma jednotkám EBC, není pivo vhodné pro předpokládané garancie. Naopak, je-li rovna dvěma jednotkám EBC nebo nižší, stabilizační účinek je dobrý a může se předpokládat, že nedojde-li k prozdušnění při filtraci a stáčení, pivo vyhoví požadovaným lhůtám trvanlivosti.

V případech, že se v pivovare určují „síranové testy“ pravidelně u vzorků z každé ležácké nádoby, je výhodné, je-li k dispozici přístroj, kde pro plnění kyvet dostačuje množství získané ze směsi 10 ml piva a příslušného množství síranu amonného. Při větším objemu kyvet, jako je tomu u přístroje Haze-Meter nebo Langeho kolorimetru, je spotřeba vzorku i nasyceného roztoku síranu amonného značná.

Použitím formazinových standardních zákalů pro kalibraci stupnice přístrojů vhodných pro měření zákalů se zjistí jednotnost vztažné hodnoty vyhodnocení „síranového testu“ a tím i možnost porovnání výsledků mezi laboratořemi vybavenými různou přístrojovou technikou.

Literatura

- [1] DE CLERCK, J., Proc. EBC, 1953, s. 161
- [2] CLARK, A. G., J. Inst. Brew., 66, 1960, s. 318
- [3] D'URTOFT, R., Proc. EBC, 1961, s. 298
- [4] GUENTHER, K. R. - STUTLER, J. R., A.S.B.C. Proc., 1965, s. 30
- [5] SIMMONDS, D. H., J. Inst. Brew. 72, 1966, s. 305
- [6] HARTONG B. D., Wochschr. Brau., 51, s. 33, 321; Proc. EBC, 1949, s. 59; Brauwissenschaft, 12, 1951, s. 193
- [7] SIMMONDS, D. H., Wall. Comm., 29, č. 98/99, s. 55
- [8] THORNE, R. S. W. - BECKLEY, R. F., J. Inst. Brew., 64, 1958, s. 38
- [9] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M., Kvasný průmysl, 17, 1971, č. 11, s. 242
- [10] HUMMEL, J. - ŠAVEL, J., Kvasný průmysl, 19, 1973, č. 9, s. 194
- [11] DE CLERCK, J.: Lehrbuch der Brauerei, Band II, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, 1935, s. 637

Basařová, G. - Černá, I. - Kovaříková, J.: Objektivní stanovení koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného z piva („síranový test“). Kvas. prům., 21, 1975, č. 10, s. 217—220.

Autorky se zabývaly vypracováním objektivního stanovení koncentrace látek vysolitelných nasyceným roztokem síranu amonného v pivu, tzv. síranového testu. Touto metodou se stanoví koncentrace potenciálních zákalových látek, které ovlivňují tvorbu koloidních zákalů piva. Za základ vyhodnocení stupně zákalu způsobeného přidaným určitým množstvím nasyceného roztoku síranu amonného do piva byly stanoveny 2 jednotky EBC formazinového zákalového standardu. Zákal 2 jednotky od-

povídá opalescenci v pive postřehnutelně pouhým okem. Použitím jednotné vztažné hodnoty při určení stupně zákalu kalibrací přístrojů standardním formazinovým zákallem se zajistí objektivní hodnocení tzv. širavového testu na různých přístrojích vhodných pro měření stupně zákalu nebo propustnosti. Vyloučí se tím také chyby způsobené různou rozlišovací schopností pracovníka při subjektivním stanovení. Autorky uvedly příklady hraničních hodnot množství přidávaného nasyceného roztoku síranu amonného na 10 ml piva ve vztahu k hloubce provedeného stabilizačního zásahu a k předpokládané době trvanlivosti piva.

Басаржова, Г. — Черна, И. — Коваржикова, Я.: Объективное определение концентрации веществ, поддающихся высаливанию из пива с помощью насыщенного раствора сернистого аммония («сульфатное испытание»). Квас. прум. 21, 1975, № 10, стр. 217—220.

Авторы разработали объективный метод определения концентрации веществ, поддающихся высаливанию из пива насыщенным раствором сернистого аммония. Это определение известно под названием «сульфатное испытание». Оно дает возможность определить концентрацию веществ, могущих быть причиной мутн, ввиду влияния, оказываемого на коллоидное помутнение пива. Для оценки степени помутнения, вызываемого определенным количеством насыщенного раствора сернистого аммония, авторы в качестве показателя применяют две единицы формазинового стандарта помутнения в соответствии с правилами ЕВС. Степень помутнения, классифицированная двумя единицами отвечает опалесценции в пиве заметной невооруженным глазом. При условии единого стандарта степени помутнения и соответствующей калибровки приборов может быть обеспечена объективность определения мутности или прозрачности пива, независимо от типа и системы прибора. Это устранит ошибки неизбежные при субъективной оценке. Приведены предельные количества насыщенного раствора сернистого аммония в пересчете на 10 мл пива. Они зависят от метода стабилизации пива и от предусматриваемой длительности его хранения.

Basarjová, G. - Černá, I. - Kovaříková, J.: Determining Objectively the Concentration of Substances Which Can be Salted Out from Beer with Saturated Solution of Ammonium Sulphate („Sulphate Test“). Kvas. prum. 21, 1975, No. 10, pp. 217—220.

The authoresses have elaborated a reliable method for the determination of concentration of substances which can be salted out from beer with saturated solution of ammonium sulphate. The method known as „Sulphate Test“ indicates the concentration of com-

ponents which may be potential sources of colloid turbidity of beer. As a measuring unit used to classify the turbidity degree caused by a certain amount of saturated ammonia sulphate solution the authoresses accept 2 points of the EBC formazine turbidity standard. Turbidity reaching 2 points causes opalescence visually perceptible with unaided eyes. By using a standard reference value when determining the turbidity degree and by calibrating instruments by applying formazine standard it is possible to obtain objective results of the sulphate test, no matter what kind of instrument is used to measure turbidity or transmissivity. Errors typical for subjective evaluation will be eliminated. The article deals also with the maximum amounts of saturated ammonia sulphate solution which can be added to 10 ml of beer depending on the stabilization method and expected storing period of beer.

Basarjová, G. - Černá, I. - Kovaříková, J.: Objektive Bestimmung der durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung aus dem Bier aussalzbaeren Substanzen („Sulfatetest“). Kvas. prum. 21, 1975, No. 10, S. 217—220.

In dem Artikel wird über die Ausarbeitung der objektiven Bestimmung der durch gesättigte Ammoniumsulfatlösung aus dem Bier aussalzbaeren Substanzen (dem sog. Sulfatetest) berichtet. Mittels dieser Methode wird die Konzentration der potentialen Trübungsstoffe bestimmt, welche die Bildung der kolloiden Biertrübungen beeinflussen. Als Basis für die Auswertung des Grades der durch bestimmte dem Bier zugesetzte Menge der Ammoniumsulfatlösung verursachte Trübung wurden zwei EBC-Einheiten des Formazin-Trübungsstandards festgesetzt. Die 2-Einheiten-Trübung entspricht der Opaleszenz, die im Bier mit bloßem Auge feststellbar ist. Bei der Anwendung des einheitlichen Beziehungswertes für die Ermittlung des Trübungsgrades mittels Kalibrierung der Apparate durch die Standard-Formazintrübung wird die Objektivität der Bestimmung des sog. Sulfatetestes auf verschiedenen für die Messung des Trübungsgrades oder der Durchlässigkeit geeigneten Apparaten gewährleistet. Auf diese Weise können auch die Fehler vermieden werden, die durch die varifizierende Unterscheidungsfähigkeit des Menschen bei der subjektiven Bestimmung verursacht werden. Im weiteren werden Beispiele der Grenzwerte der Menge der zugesetzten Ammoniumsulfatlösung pro 10 ml Bier im Verhältnis zu der Tiefe des durchgeführten Stabilisierungseingriffes und zu der vorausgesetzten Haltbarkeit des Bieres angeführt.