

Ing. PAVEL ČEJKA, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Úvod

Problematické výskytu dusičnanů a dusitanů během pivovarského výrobního procesu je v poslední době věnována značná pozornost. Jedním z důvodů je prudký vzestup obsahu dusičnanů ve vodě a v určitých potravinách, zaznamenaný v poslední době a způsobený vlivem industrializace a intenzifikace zemědělské výroby a zvyšováním hustoty osídlení. Dalším důvodem je poznání, že dusitany, které mohou vznikat redukcí dusičnanů působením bakteriální kontaminace v průběhu hlavního kvašení, mají negativní vliv na probíhající fermentaci [1]. Redukce dusičnanů na dusitany je charakteristická pro gramnegativní bakterie *Enterobacteriaceae* a také pro *Obesumbacterium proteus* (nedávno reklasifikované na *Hafnia protea* [2]), které jsou běžné v pivovarské vodě, mladině a v pivovarských kvasnicích. Dusitany lze detekovat v počátečních stadiích kvašení při několikanásobném nasazení kvasnic, kdy lze také prokázat přítomnost bakterií redukujících dusičnany na dusitany. Přítomnost dusitanů je tedy známkou kontaminace kvasnic. Od určité koncentrace dusitanů v kvasící mladině se zpomaluje kvašení, je pozvolnější pokles pH, menší nárůst kvasničné hmoty, v hotovém pivu potom je vyšší obsah diacetylu a zvýšená barva s odstínem do červenohněda. Dochází rovněž k permanentním škodám na kvasinkách, což je podle autorů způsobeno následkem možnosti mutace, neboť kyselina dusitá je známá mutagenní látka. Šavel et al. [8] prokázali, že dusitan o koncentraci 5 až 20 mg NO₂⁻/l potlačuje růst kvasnic, snižuje prokvašení, zhoršuje sedimentaci a jeho působením zvětšují kvasničné buňky velikost. Další nepříznivou skutečností je značný toxický účinek kyseliny dusité, zvláště pak nitrosoaminů, které mohou vznikat reakcí sekundárních aminů s dusitany a jsou silně kancerogenní [3]. Jejich přítomnost v pivu však dosud nebyla prokázána.

Stálost dusitanů

V mladině jsou dusitany celkem stálé, v pivu se však poměrně rychle rozkládají a nejrychleji se rozkládají v průběhu kvašení.

O množství dusitanů nalezených po určité době v běžném 10 % pivu, do něhož byl přidán dusitan v množství 1,00 mg NO₂⁻/l, podává informativní přehled tabulka 1:

Tabulka 1.

	20 °C	4 °C
1 h	0,82	0,83
3 h	0,59	0,68
6 h	0,50	0,60
24 h	0,17	0,42

Mnohem výraznější vliv na rozklad dusitanů v pivu má však hodnota pH. Tabulka 2 udává množství dusitanů nalezených po 2 hodinách stání při 20 °C v 10 % pivu, do kterého byl přidán dusitan v množství 1,00 mg NO₂⁻/l a ve kterém bylo pH upraveno HCl nebo NaOH:

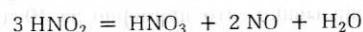
Tabulka 2.

pH	2,1	3,0	3,9	4,8	6,0	7,0	8,1
mgNO ₂ ⁻ /l	0	0,18	0,44	0,80	0,95	0,94	0,95

Jak je z tabulky 2 patrné, jsou dusitany stálé v pivu při hodnotě pH 6 a vyšší, s klesajícím pH se rychle rozkládají. Toto zjištění velmi dobře souhlasí se zjištěním Weinera et al. [1], který zjistil, že již při pH 5,5 jsou dusitany v mladině prakticky stálé. Z tabulky 2 je však také patrné, že se nepodaří stanovit 100 % množství přidávaného dusitanu, což nemusí být způsobeno nedokonalostí analytické metody, ale tím, že jistá nepatrná část se rozštěpí ihned po přidání dusitanu do piva. Nutno také uvážit, že dusitanový ion je poměrně reaktivní a že koncentrace přidávaného dusitanu 1 mg NO₂⁻/l je velmi nízká.

Rozsah změn závisí také na druhu piva. Podle Stona [4] je rozpad rychlejší v pivech nestabilizovaných než ve stabilizovaných. Rozpad dusitanového iontu působí oxidací piva a vzrůst hodnoty ITT.

Rozklad dusitanů je vysvětlován rozpadem kyseliny dusité na kyslíčnický dusnatý podle rovnice



kteří reaguje s různými komponentami mladiny nebo piva. Při kvašení uniká NO v kvasných plynech. Podle Weinera [1] reagují dusitany převážně s některými látkami polyfenolového typu. Zajímavé je zjištění, že při pH 4 prakticky nereagují s aminokyselinami (viz dobře známá Van Slykeova metoda stanovení aminokyselin [5]). Další možné reakce dosud nebyly dostatečně prozkoumány.

V kvasícím médiu je však štěpení dusitanů ještě rychlejší, což lze vysvětlit spíše aktivitou kvasinek než reakcí s komponentami mladého piva nebo únikem NO v kvasných plynech.

Metody stanovení dusitanů v mladině a pivu

Odborná pivovarská literatura se dosud podrobně nezabývala stanovením dusitanů v mladině nebo v pivu. Byly publikovány metody na stanovení dusičnanů v pivu Stonem [4], nověji Postelem [6], neboť výzkum vlivu dusičnanů je v poslední době stále více aktuální. Weiner et al. [1] aplikovali pro svoji práci redukční kadmiovou metodu na stanovení dusitanů a dusičnanů v organických látkách [7]. Všechny tyto metody jsou založeny na stejném principu: první fází je redukce dusičnanů na dusitany a druhou fází stanovení dusitanů. Tento způsob však pro vlastní stanovení dusitanů není vhodný, neboť jednak se zbytečně zředuje vzorek a dále neumožňuje měřit aktuální koncentraci dusitanů, např. během kvašení, protože značná nestálost dusitanů by zkreslovala výsledek. Weiner [1] používal pro semikvantitativní indikaci dusitanů během kvašení speciální indikační papírky firmy Merck, Darmstadt.

Cílem tohoto příspěvku bylo najít jednoduchou a přitom spolehlivou metodu na stanovení dusitanů v mladině, popř. v pivu. Vzhledem k tomu, že výskyt dusitanů je převážně omezen na úsek počátečních stadií kvašení (v hotovém pivu se prakticky nevyskytují), byla metoda vypracována se zaměřením na toto upotřebení. Přínosem, resp. podstatou spolehlivosti metody je konzervace dusitanů v odebraném vzorku pro jeho udržení v původním stavu po určitou dobu. Přidané konzervační činidlo ovšem nezabrání všem změnám (dusitany se rozkládají poměrně rychle i v destilované vodě), takže analýza musí být provedena druhý, nejvýše třetí den po odběru.

Množství dusitanů, nalezených po určité době v kva-

sící mladině bez použití a s použitím konzervačního činidla vyplývá z tabulky 3. Z laboratorní kvasící mladiny byl odebrán vzorek, a to ve fázi, kdy rychlost štěpení dusitanů je vyšší než rychlost jejich vzniku. Ve vzorku byl stanoven obsah dusitanů (vzorek I). K části tohoto vzorku byl ještě přidán dusitan v množství 1,0 mg NO_2^-/l (vzorek II). Část prvního i druhého vzorku byla zpracována bez konzervace a část po přidání konzervačního činidla.

Tabulka 3.

Vzorek I: 0,32 mg NO_2^-/l t = 20 °C Vzorek II: 1,32 mg NO_2^-/l				
	Vzorek I		Vzorek II	
	bez konzervačního činidla	s konzervačním činidlem	bez konzervačního činidla	s konzervačním činidlem
ihned po odebrání	0,30	0,32	1,12	1,26
3 h	0,16	0,32	0,51	1,26
24 h	0	0,31	stopy	1,25
72 h	0	0,30	0	1,22
1 týden	—	0,26	—	1,14

Z tabulky 3 je patrné, že přidáním konzervačního činidla lze účinně zpomalit rozklad dusitanů v mladině, popř. v pivu.

Metodika stanovení dusitanů v mladině a pivu

Princip metody: Vzorek se konzervuje ihned po odebrání roztokem HgCl_2 a jeho pH se upraví na hodnotu přibližně 6,5. Před vlastním stanovením se vzorek odbarví aktivním uhlím. Dusitan se pak stanoví kvantitativně fotometricky diazotací kyseliny sulfanilové v prostředí kyseliny octové a kopulací s α -naftylaminem. Vzniklé červenofialové zbarvení je vysoce specifické a reprodukovatelné.

Činidla

1. Konzervační roztok A: Chlorid rtuťnatý, 2,5 % roztok: 2,5 g HgCl_2 p. a. se rozpustí v destilované vodě a doplní do 100 ml.

2. Konzervační roztok B: hydroxid sodný, 5,2 % roztok: 5,2 g NaOH p. a. se rozpustí v dest. vodě a doplní do 100 ml.

3. Kyselina sulfanilová, 1 % roztok: 2,5 g kyseliny sulfanilové p. a. se rozpustí asi v 200 ml horké destilované vody, po ochlazení se převede do 250 ml odměrné baňky, přidá se 25 ml ledové kyseliny octové a doplní destilovanou vodou po značku.

4. α -naftylamin, 0,15 % roztok: 150 mg α -naftylaminu p. a. se rozpustí ve 20 ml ledové kyseliny octové, převede do odměrné baňky 100 ml a doplní destilovanou vodou po značku. Roztok se časem zakalí a je třeba jej přefiltrovat přes bavlněnou tkaninu. Je stálý při 4 °C 2 až 3 měsíce.

5. Činidlo pro stanovení dusitanů: získá se smíšením 60 ml roztoku kyseliny sulfanilové (roztok 3) a 20 ml roztoku α -naftylaminu (roztok 4) a 20 ml ledové kyseliny octové (celkem 100 ml). Činidlo musí být bezbarvé. Stopy NO ve vzduchu, popřípadě vlastní znečištění chemikálií dusitanů stačí k vyvolání reakce, činidlo se zbarví červeně a nelze je použít.

6. Kyselina octová, 25 % roztok: 25 ml ledové kyseliny octové p. a. se převede do 100 ml odměrné baňky a doplní destilovanou vodou po značku.

7. Aktivní uhlí: druh je nutno si prakticky ověřit, osvědčil se např. Normal C.

Spektrofotometr nebo kolorimetr, vlnová délka 525 nm, pro rozsah 0,02–0,1 mg NO_2^-/l kvjeta 5 cm, pro rozsah 0,1–1,0 mg NO_2^-/l kvjeta 1 cm.

Postup stanovení

a) Odebrání a konzervace vzorku

Vzorek (kvasící mladina nebo pivo), odebraný nejlépe do Erlenmayerovy baňky, se ihned po odebrání zbaví protřepáním v ruce větší částí CO_2 . Odměrným válečkem se odměří 100 ml a co nejrychleji se přidá 1 ml konzervačního činidla A, 1 ml konzervačního činidla B a řádně se promíchá. Vznik zákalu není na závadu. Zpracovávali se nezkvašená mladina, jejíž pH není nižší než 5,5, použije se 1 ml konzervačního činidla A a 1 ml destilované vody. Konzervovaný vzorek se doporučuje uložit v chladničce.

Poznámka: pH konzervovaného vzorku by se mělo pohybovat mezi hodnotami 6 až 7. Vzhledem k tomu, že k úpravě pH není užito pufru, jehož aplikace by byla z hlediska další úpravy pH pro diazotační reakci nevýhodná, nýbrž hydroxidu sodného, je nebezpečí, že u velmi silně kyselého vzorku se konzervací nedosáhne hodnoty pH 6. V tom případě je nutné použít větší množství konzervačního činidla B. Vyšší pH než 7 není na závadu, vzorek se pouze hůře odbarvuje.

b) Vlastní stanovení

K cca 50 ml konzervovaného vzorku se přidá aktivní uhlí, řádně se třepe asi 1 min a přefiltruje se přes filtr s modrou páskou. První podíl filtrátu se vrátí zpět na filtr. Vzorek má být téměř bezbarvý, nejvýše slabě nažloutlý a čirý. Jinak je nutno použít vyšší dávky aktivního uhlí, popřípadě vyzkoušet jiný druh.

K 10 ml odbarveného vzorku (nebo zředěného vzorku) se přidá 5 ml činidla (roztok 5) a řádně se promíchá. Po 15 minutách se měří extinkce proti slepému pokusu při 525 nm. Slepý pokus se připraví smíšením 10 ml vzorku a 5 ml 25 % kyseliny octové (roztok 6). Množství dusitanů se odečte z kalibrační křivky.

Příprava kalibrační křivky

a) Standardní roztok NaNO_2 o koncentraci 100 mg NO_2^-/l

0,1497 g NaNO_2 p. a., vysušeného při 105 °C, se rozpustí v dest. vodě a doplní na 1000 ml. Konzervuje se přidavkem 1 ml chloroformu. Při 4 °C je roztok stálý asi měsíc. Ředěním destilovanou vodou se připravují čerstvé pracovní roztoky těsně před použitím.

b) Příprava pracovních roztoků

Ředěním standardního roztoku se připraví řada pracovních roztoků od 0,02 až 1,00 mg NO_2^-/l ve 100 ml odměrkách, ke kterým se přidá 1 ml roztoku konzervačního činidla B a 1 ml dest. vody. Po promíchání se pipetuje 10 ml roztoku, přidá se 5 ml činidla (roztok 5) a řádně se promíchá. Po 15 min se měří extinkce při 525 nm proti slepému pokusu, který se získá smíšením 10 ml dest. vody a 5 ml činidla (roztok 5). Vynesením zjištěných hodnot do grafu se sestaví kalibrační křivka.

Závěr

Uvedenou metodou lze spolehlivě stanovit obsah dusitanů v mladině, v kvasící mladině, popřípadě v pivu, a to i ve velmi nízkých koncentracích. Není nutné vzhledem k nestálosti dusitanů zahájit analýzu ihned po odběru vzorku. Užitím konzervačního činidla, aplikovaného ihned po odběru vzorku, lze rozklad dusitanů účinně zpomalit a stanovení provést až po určité době.

Těto metody je možno též použít pro stanovení dusi-

tanů ve vodě. V tom případě se užije postupu uvedeného v odstavci „Příprava kalibrační křivky“ a se vzorkem vody se zachází jako s pracovním roztokem.

Literatura

- [1] WEINER, J. P., RALPH, D. J., TAYLOR, L.: Proc. Europ. Brew. Conv., 15th Congr., Nice, 1975, Elsevier, Amsterdam 1975, s. 155
- [2] PRIEST, F. G., SOMERVILLE, H. J., COLE, J. A., HOUGH, J. S.: Gen. Microbiol. 75, 1973, s. 295
- [3] SAKSHAUG, J., SOGNER, E., HANSEN, M. A., KOPPANY, N.: Nature 206, 1965, s. 1261
- [4] STONE, I. M., LASCHIVER, C., SALETAN, L. T.: Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 1968, s. 125
- [5] VAN STYKE, D. D.: J. Biol. Chem. 9, 1911, s. 185
- [6] Postel, W.: Brauwissenschaft 29, 1976, č. 2, s. 39
- [7] Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11th. ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1970, s. 126
- [8] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ŠATAVA, J., ml.: Kvasný průmysl 22, 1976, č. 12, s. 268

Čejka, P.: Metodika stanovení dusitanů v mladině při kvašení. Kvas. prům. 23, 1977, č. 5, s. 102—104.

V článku je uvedena metodika stanovení dusitanů v kvasící mladině, které mohou vznikat v počátečních stadiích kvašení redukcí dusičnanů působením bakteriální kontaminace a mají od určité koncentrace nepříznivý vliv na probíhající kvašení. Vzhledem ke značné nestálosti dusitanů byl vypracován způsob konzervace vzorku ihned po odebrání. Zpomalí se tak účinně rozklad dusitanů a vlastní stanovení lze provést až po určité době.

Чейка, П.: Метод определения содержания нитритов в сбраживаемом сусле. Квас. прум. 23, 1977, № 5, стр. 102—104

В статье рассматривается метод, дающий возможность определения содержания нитритов в сбраживаемом сусле. Нитриты могут образоваться в сусле в первых фазах брожения в результате восстановления нитратов,

вызванного действие обсемененных сусло загрязняющих бактерий. При определенной концентрации нитриты влияют отрицательно на ход брожения. Ввиду крайней нестойкости нитритов был разработан метод непосредственного консервирования взятых проб. Консервирование замедляет разложение нитритов и анализы можно поэтому производить позже.

Čejka, P.: Determination of Nitrite Concentration in Fermenting Wort. Kvas. prům., Vol. 23, 1977, No. 5, pp. 102—104.

In initial stages of wort fermentation bacterial contamination can reduce nitrates present in the wort into nitrites, which above a certain concentration have a negative influence upon the fermentation process. Since nitrites are very unstable, it is necessary to stabilize them immediately after sampling and prevent their rapid decomposition. Analyses can be then carried out later. The author outlines methods which have been elaborated to stabilize nitrites and determine their concentration.

Čejka, P.: Methodik der Nitritebestimmung in der Würze im Verlauf der Gärung. Kvas. prům. 23, 1977, No. 5, S. 102—104.

In dem Artikel wird die Methodik der Nitritbestimmung in der gärenden Würze beschrieben. Die Nitrite können in der Anfangsstadien der Gärung durch Reduktion der Nitrate unter Einwirkung der bakteriellen Kontamination entstehen und üben von einer bestimmten Konzentration einen ungünstigen Einfluß auf den Verlauf der Gärung aus. Mit Hinsicht auf die beträchtliche Unstabilität der Nitrite wurde ein Verfahren zu ihrer Konservation unmittelbar nach der Probenahme ausgearbeitet. Auf diese Weise kann die Zersetzung der Nitrite effektiv verlangsamt werden und die Bestimmung kann erst nach bestimmter Zeit durchgeführt werden.