

Změna barvy piva působením dusitanů

Ing. JAN ŠAVEL, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, B. Budvar, Č. Budějovice

Klíčová slova: pivo, barva, dusitany

663.45

1. ÚVOD

Obsah dusičnanů a jejich změny mají velký význam při výrobě piva [1-4]. Vlivem gramnegativní bakteriální kontaminace se dusičnany redukuje na dusitany, které reagují se složkami mladiny za tvorby N-nitrososloučenin. Z netěkavých nitrososloučenin mohou vznikat karcinogenní těkavé nitrosaminy [5, 6].

Stanovení netěkavých N-nitrososloučenin je obtížné. Jejich koncentrace se zpravidla vyjadřuje jako ATNC (apparent total N-nitrosocompounds). Všeobecně se uznává jako povolená koncentrace ATNC 20 ppb, t.j. $20 \mu\text{g.l}^{-1}$. V pivech se ATNC mohou vyskytovat do obsahu 390 ppb [7].

N-nitrosaminy obecně vznikají reakcí aminokyselin s jakýmkoliv nitrosacími činidlem, např. dusitanem. Kromě toho mohou dusitany reagovat s dalšími složkami piva [7].

Protože stanovení ATNC je náročné a drahé, usuzuje se na přítomnost těchto látek z obsahu dusičnanů, popř. jejich změn během výroby piva a z přítomnosti bakterií, schopných redukovat dusičnany. V prvních fázích kvašení lze přímo prokázat dusitany v kvasící mladině, nebo ve vřečných kvasnicích [1, 3].

Velmi dlouho je známo, že piva vyráběná z vody s vysokým obsahem dusičnanů jsou červeně zbarvená [8]. Nedávno se prokázala lineární závislost mezi koncentrací ATNC a absorbcí piva při 450 nm [6].

Je zřejmé, že tvorba barevných sloučenin souvisí s reakcí vzniklého dusitanu se složkami mladiny a piva.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra se prověřovala v 10 mm skleněných kyvetách proti destilované vodě v spektrofotometru CADAS 100 (Dr. Bruno Lange), řízeném osobním počítačem s použitím software PCSCAN [9].

2.2 Acetátový a citrátový pufr

Acetátový pufr se připravil smísením roztoků octanu sodného ($c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) a kyseliny octové ($c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) podle požadovaného pH [10]. Citrátový pufr (Mc Ilvaine) se připravil smísením kyseliny citrónové ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) a hydrogenufosforečnanu sodného ($c = 0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) [10].

2.3 Citrátový pufr s dusičnanem draselným ($150 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$)

V základních roztocích pro přípravu citrátového pufru (odst. 2.2) se rozpustil dusičnan draselný v koncentraci $150 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$. Pufr s požadovaným pH se připravil smísením obou roztoků.

2.4 Stanovení dusitanu v mladině a pivu

Čirý vzorek s obsahem dusitanu do $10 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$ se desetkrát zředil (1 ml vzorku + 9 ml dest. vody) a po zředění smísl s činidlem pro stanovení dusitanů [3, 11]. Po 15 min se měřila absorpce při 530 nm v 10 mm kyvetě. V slepém pokusu se k zředěnému vzorku místo činidla přidalo stejné množství 20% kys. octové. Za těchto podmínek platil pro obsah dusitanů vztah:

$\text{NO}_2\text{-(mg.l}^{-1}\text{):18,44.A} + 0,1$. Správnost stanovení se ověřovala kyvetovým testem LCK 341 Nitrit (Dr. Lange).

2.5 Reakce aminokyselin a fenolů s dusitanem sodným

10 mg zkoušené látky se rozpustilo v 10 ml acetátového pufru ($\text{pH}=4,5$), k roztoku se přidalo 0,1 ml roztoku NaNO_2 ($10 \text{ g NO}_2\text{.l}^{-1}$) a roztok se zahříval 1 h při 60°C . Po rychlém ochlazení se proměřilo absorpční spektrum roztoku v rozmezí 380 až 800 nm (po 10 nm) proti destilované vodě.

Stejným způsobem se proměřovaly vzorky, připravené bez přidavku dusitanu. Tomuto postupu odpovídá reakce 1 g.l^{-1} zkoušené látky s dusitanem v koncentraci $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$.

2.6 Barva piva v souřadnicích L, a, b

Barva piva se měřila spektrofotometrem CADAS 100 v 10 mm kyvetách s programem PCFARB s touto konfigurací: druh světelného zdroje C, 2° úhel pozorovatele, šířka kyvety 10 mm [9].

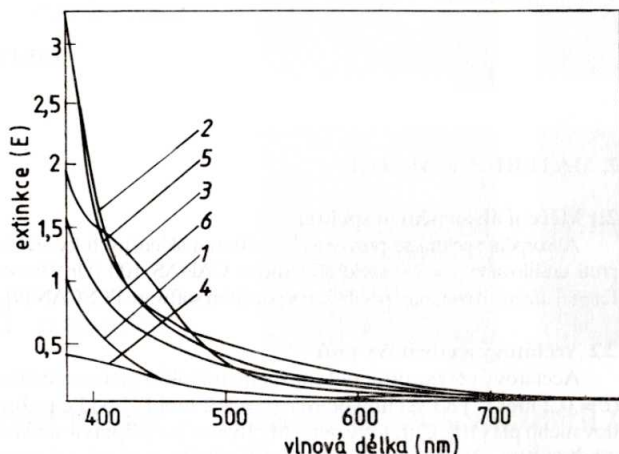
2.7 Průkaz redukce dusičnanu v pivovarských kvasnicích

2 ml hustých várečných kvasnic se ve zkumavce smísí s 8 ml citrátového pufru ($\text{pH}: 5,0$) s přidavkem $150 \text{ mg.NO}_3\text{.l}^{-1}$. Přidá se na špičku nože m-fenylendiamin a kultivuje se při 37°C 24 až 48 hodin. Oranžové až červenohnědé zbarvení je důkazem tvorby dusitanu.

3. VÝSLEDKY

3.1 Reakce fenolů s dusitanem

Tvorba barevných produktů se ověřovala při reakci dusitanu sodného s roztoky fenolu, pyrokatechinu, pyrogallolu, kys. salicylové a taninu (obr. 1). Zvolené koncentrace sice několikanásobně překračovaly koncentrace fenolických látek v pivě (asi 200 mg.l^{-1}) a reálné koncentrace dusitanu při kvašení, intenzita reakčních produktů však značně převyšovala obvyklé zbarvení piva.



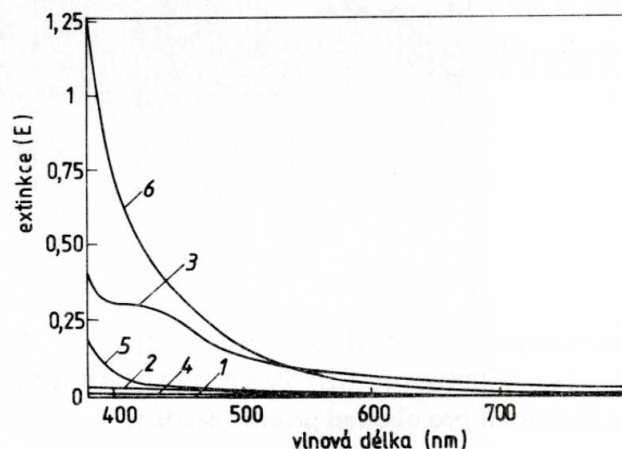
Obr.1. Reakce fenolických látek (1 g.l^{-1}) s dusitanem sodným ($100 \text{ mg NO}_2\text{.l}^{-1}$) po 1 h při 60°C a $\text{pH} 4,5$. 1 - fenol, 2 - pyrokatechin, 3 - pyrogallol, 4 - kys. salicylová, 5 - tanin, 6 - 12% pivo (bez dusitanu)

Vzniklé barevné roztoky měly žlutou až hnědou barvu. Reakce souběžných roztoků, zahřívaných bez přidavku dusitanu poskytovala velmi málo zbarvené produkty (obr.2).

Ze zkoušených roztoků nejintenzivněji barvily produkty dusitanu s pyrokatechinem a taninem, přičemž intenzita produktů reakce s pyrokatechinem dále vzrůstala i po ochlazení roztoku na pokojovou teplotu.

3.2 Reakce aminokyselin s dusitanem

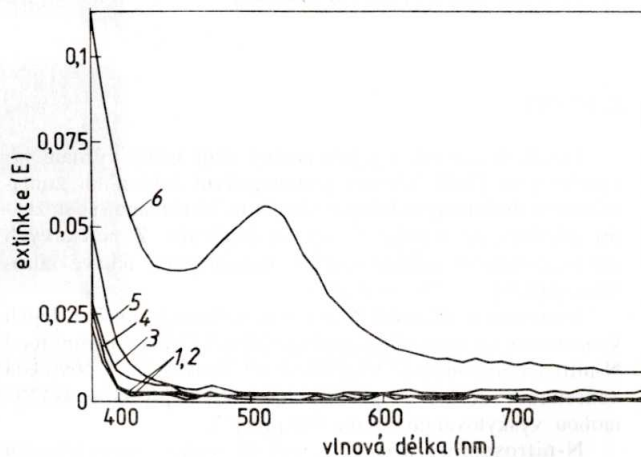
Tvorba barevných produktů se ověřovala při reakci dusitanu sodného s roztoky argininu, fenylalaninu, prolinu, threoninu, tryptofanu a tyrosinu. Proti roztokům reakčních produktů dusitanu s fenoly poskytovaly aminokyseliny jen velmi málo barevné roztoky, roztoky bez přidavku dusitanu se prakticky nebarvily (obr.3). Slabě se barvil i 1% roztok želatiny po reakci s dusitanem (absorbance 0,08 při 430 nm).



Obr.2. Reakce fenolických látek (1 g.l^{-1}) po 1 h při 60°C a $\text{pH} 4,5$ bez přidavku dusitanu. 1 - fenol, 2 - pyrokatechin, 3 - pyrogallol, 4 - kys. salicylová, 5 - tanin, 6 - 12% pivo

12% pivo obsahuje asi 70 mg.l^{-1} aminokyselin, přičemž většinu tvoří zpravidla prolin.

Z výsledků reakce fenolů a aminokyselin s dusitanem sodným je zřejmé, že k tvorbě barevných produktů přispívá v rozhodující míře reakce fenolických látek, patrně reakce anthokyanogenů, jednoduchých fenolů a polyfenolů s dusitanem.



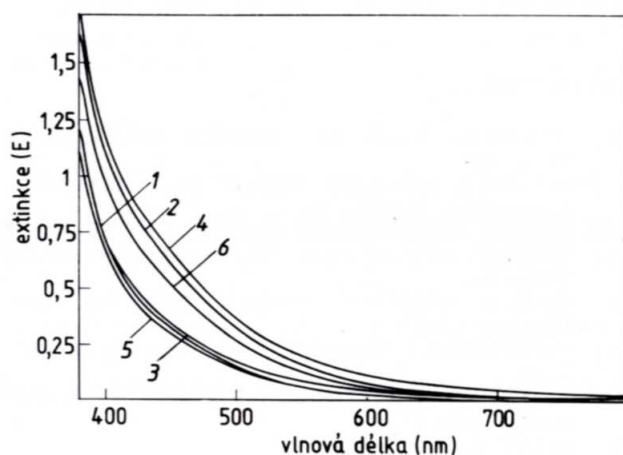
Obr.3. Reakce aminokyselin (1 g.l^{-1}) s dusitanem sodným ($100 \text{ mg NO}_2\text{.l}^{-1}$) po 1 h při 60°C a $\text{pH} 4,5$. 1 - arginin, 2 - fenylalanin, 3 - prolin, 4 - threonin, 5 - tryptofan, 6 - tyrosin

3.3 Vliv adsorpčních stabilizačních prostředků

Pro potvrzení předchozích závěrů se v 12% pivu snížil obsah bílkovin třepáním s 200 g.hl^{-1} Stabiquicku 83, nebo obsah tříslovin třepáním se 100 g.hl^{-1} Polyclaru R. Po zahřívání se $100 \text{ mg NO}_2\text{.l}^{-1}$ po 1 h při 60°C se proměřila absorpční spektra (obr.4).

Po reakci s dusitanem se pivo se sníženým obsahem polyfenolů přibarvilo méně než kontrolní pivo, pivo se sníženým obsahem bílkovin mělo proti srovnávacímu pivu naopak mírně zvýšenou barvu.

Měření potvrzuje předchozí závěry o tvorbě barevných produktů při reakci dusitanů. Pravděpodobně se dusitan částečně váže na bílkoviny, částečně na polyfenoly, přičemž z polyfenolů vznikají barevné produkty.

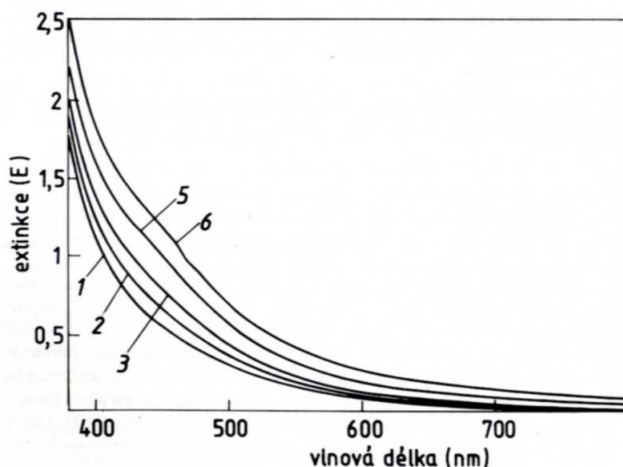


Obr. 4. Reakce 12% piva, upraveného adsorpčními stabilizátory s dusitanem sodným ($100 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$) po 1 h při 60°C . 1 - 12% pivo, 2 - 12% pivo + NaNO_2 , 3 - 12% pivo + Stabiquick 83 (200 g/hl), 4 - 12% pivo + Stabiquick 83 (200 g/hl) + NaNO_2 , 5 - 12% + Polyclar R (100 g/hl), 6 - 12% pivo + Polyclar R + NaNO_2

Při změnách barvy se rovněž uplatňují oxidační vlivy. Pro potvrzení tohoto vlivu se pivo vytřepané za přítomnosti vzduchu ($6,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) a vytřepané pivo s nízkým obsahem kyslíku ($0,8 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) zahřívalo rovněž 1 h při 60°C a 24 h při 50°C . Přírůstek zbarvení byl při obou teplotách nízký (o $0,2 \text{ jEBC}$).

3.4 Vliv pH na reakci dusitanu s 12% mladinou

12% mladina (počáteční $\text{pH}=5,5$) se kys. fosforečnou upravila na hodnoty pH 4,7 až 5,2. Po přidavku $0,1 \text{ ml}$ roztoku dusitanu sodného ($10 \text{ g NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$) a zahřátí 1 h při 60°C se



Obr. 5. Reakce 12% mladiny s dusitanem sodným ($100 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$) po 1 h při 60°C . pH : 1 - 5,5, 2 - 5,2, 3 - 5,2, 5 - 4,7, 6 - 4,5

proměřilo absorpční spektrum (obr. 5). Podle získaných výsledků vzrůstá intenzita zbarvení s klesající hodnotou pH . Vyšší hodnoty

absorbance č. 5 a 6 při vlnových délkách nad 700 nm souvisí s tvorbou jemného zákalu, který se nepodařilo odstranit.

3.5 Pokles barvy při kvašení

Během hlavního kvašení klesá barva piva. Tab. 1 uvádí změny barvy 12% piva po 8 dnech hlavního kvašení provozních várek s maximální teplotou $9,5^\circ \text{C}$.

Tab. 1. Změny barvy mladiny (j. EBC)

Várka č.	Mladina po zakvašení	Mladina po 8 dnech kvašení	Stočené pivo
1	16,73	14,70	9,58
2	14,18	13,23	9,25
3	14,28	14,05	10,21
4	14,03	13,12	9,20
5	13,72	15,25	10,52

Tab. 2. Reakce piva s dusitanem sodným ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$)

Den	$\text{mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$		A 430 nm		A 450 nm	
	10°C	25°C	10°C	25°C	10°C	25°C
0	9,9	9,2	0,435	0,434	0,338	0,339
1	8,0	5,7	0,511	0,529	0,410	0,427
2	7,1	3,1	0,557	0,567	0,453	0,462
3	5,8	1,7	0,599	0,596	0,492	0,485
4	4,1	1,0	0,620	0,613	0,511	0,496
po 4 dnech bez dusitanu			0,449	0,465	0,351	0,365

Tab. 3. Reakce piva s dusitanem sodným ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NO}_2^-$)

Den	$\text{mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$		A 430 nm		A 450 nm	
	10°C	25°C	10°C	25°C	10°C	25°C
0	96,8	102,1	0,438	0,440	0,345	0,348
1	68,2	49,8	0,973	1,010	0,816	0,841
2	58,2	46,8	1,290	1,210	1,090	1,000
3	52,9	40,1	1,480	1,380	1,240	1,140
4	53,6	38,5	1,560	1,440	1,310	1,190

Tab. 4. Barva 12% piva po reakci s dusitanem (4 dny při 10°C)

Původní koncentrace $\text{NO}_2^- \cdot \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	Souřadnice			j.EBC $25^\circ \text{A}430$
	L	a	b	
0	91,26	-3,14	30,44	11,2
10	87,37	-1,83	40,64	15,5
100	68,62	6,34	57,64	39,5

3.6 Kinetika reakce 12% piva s dusitanem

K vytřepanému 12% pivu se přidal roztok dusitanu sodného ($10 \text{ g NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$) do výsledné koncentrace 10 a $100 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{l}^{-1}$.

Při teplotách 10 a 25 °C se sledoval úbytek dusitanu a změny barvy jako absorbance při 430 a 450 nm (*tab.2, 3*). Po 4 dnech se stanovila barva v souřadnicích L, a, b (*tab.4*).

Měření prokázalo, že rychlost tvorby barevných produktů je úměrná koncentraci dusitanového iontu i koncentraci barvotvorných složek. Při spotřebě asi 6 mg. $\text{NO}_2\text{-I}^{-1}$ při 10 °C se barva zvýšila o 4,3 j.EBC.

3.7 Průkaz tvorby dusitanů v pivovarských kvasnicích

Při sledování závislosti barevné reakce s m-fenylendiaminem (odst. 2.7) na pH se zjistilo, že k barevné reakci dochází za podmínek pokusu v poměrně úzkém rozmezí pH 4,5 až 5,2, s optimem 5,0. Pozitivní reakce je rozeznatelná už po 8 h, výsledek doporučujeme hodnotit až po 24 a 48 h.

4. DISKUSE

Po vzniku dusitanu činností mikrobiální kontaminace v mladině a pivu probíhají nitrosací reakce a přeměny dusitanového iontu. Pouze malá část těchto reakcí je spojena se vznikem ATNC. Předpokládá se, že z každých zredukovaných 10 mg $\text{NO}_3\text{-I}^{-1}$ se přibližně tvoří 90 $\mu\text{g.l}^{-1}$ ATNC, čemuž přibližně odpovídá nárůst absorbance při 450 nm o 0,036 [6]. Tvorba barevných produktů tvoří patrně významnou část nitrosacích reakcí. Podle tvorby barevných sloučenin z jednoduchých fenolů lze usuzovat, že barevné sloučeniny vznikají z polyfenolů mladiny a piva. Aminokyseliny a bílkoviny netvoří výrazné barevné sloučeniny, ale jejich nitrosace je podle literatury spojena s tvorbou ATNC [7]. Při tvorbě barevných sloučenin se teoreticky mohou uplatňovat i aminy, jejich koncentrace v pivu je však nízká.

Protože tvorba barevných sloučenin souvisí s nitrosací polyfenolových látek, lze předpokládat, že by tyto látky mohly tvořit určitou ochranu při tvorbě ATNC účastí v reakci, soutěžící s nitrosací sekundárních aminů.

Vážnou překážkou využití nárůstu barvy piva k průkazu nitrosacích reakcí je skutečnost, že během kvašení výrazně klesá barva piva, ať již vazbou barevných látek na kvasničné buňky, poklesem pH, nebo vlivem redukčního prostředí při kvašení. Tak je možné pouze sledovat rozdíl poklesu barvy mezi mladinou a mladým pivem u stejných várek, tato metoda však zřejmě není příliš spolehlivá.

S tvorbou barevných nitrosacích produktů se odstín barvy posouvá ze žlutozeleného do žlutočerveného, jak prokázala podrobná analýza barvy. O využití tohoto efektu je však možné rozhodnout teprve po další experimentální práci.

Při tvorbě barevných sloučenin a při nitrosacích reakcích, spojených s kvasným procesem se uplatňují různé vlivy. Pomnožení gramnegativních bakterií v zakvašené mladině závisí nejen na stupni kontaminace, ale také na okamžité aktivitě enzymového systému bakterií, redukujících dusičnany, na obsahu látek, schopných nitrosace a zejména na poklesu pH, spojeného s množstvím a aktivitou várečných kvasnic.

S klesajícím pH sice stoupá rychlost nitrosacích reakcí, ale také přeměna dusitanového iontu na oxidy dusíku a naopak se potlačuje růst a aktivita gramnegativních bakterií.

Výsledná tvorba ATNC je proto závislá na těchto vlivech, přičemž znalost koncentrace dusičnanu i dusitanu v kvasící mladině a množství mladinových bakterií nemusí být vždy postačující k posouzení rizika tvorby ATNC. Vznikající dusitan je typický meziprodukt, který se napřed hromadí v kvasící mladině, ale pak jeho koncentrace klesá.

Z těchto důvodů jsme se pokusili navrhnout test, při kterém by se vznikající dusitan vázal za tvorby charakteristické barevné sloučeniny při podmínkách, odpovídajících počátku kvašení mladiny.

Pro tento účel jsme zvolili přírůstek m-fenylendiaminu k várečným kvasnicím, popř. k zakvašené mladině v prostředí se zvýšeným obsahem dusičnanu a v pufru s pH 5,0. Tvorba oranžového až červenohnědého zbarvení svědčí o přítomnosti konta-

minace, která se může uplatnit při provozním kvašení. Navržený test je ovšem pouze orientační a jeho podrobnému zhodnocení se budeme věnovat v další práci.

Dosud patrně nejvhodnější rychlou metodou k orientačnímu nepřímému posouzení tvorby ATNC je sledování změn obsahu dusičnanů v mladině během kvašení papírky firmy Merck [6, 12]. Tomuto směru výzkumu se chceme věnovat ve spolupráci s Ústavem kvasné chemie a bioinženýrství na VŠCHT v Praze a s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Praze.

LITERATURA

- [1.] WEINER, J.P. - RALPH, D.J. - TAYLOR, L: Proc. Congr. EBC, 1975, s. 565.
- [2.] ČEPIČKA, J. - BAUDYŠ, D. - VÍZNEROVÁ, E. - KRAUSOVÁ, J., Kvas. prům., 37, 1991, s. 230
- [3.] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M., Kvas. prům., 28, 1982, s. 128.
- [4.] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M. - ŠATAVA, J., Kvas. prům. 22, 1976, s. 268.
- [5.] KARA, B. - GODBER, S. - HAMMOND, J.R.M., Proc. Congr. EBC, 1987, s. 663.
- [6.] CALDERBANK, J. - HAMMOND, J.R.M., J. Inst. Brew, 95, 1989, s. 277.
- [7.] KELLNER, V. - ČULÍK, J. - VESELÝ, L. - ŠPINAR, B., Kvas. prům., 37, 1991, s. 193.
- [8.] BRIANT, L., J. Inst. Brew,
- [9.] ŠAVEL, J., Kvas. prům., 38, 1992, s. 173.
- [10.] SÝKORA, V. - ZÁTKA, V., Příruční tabulky pro chemiky. 1. vyd., Praha 1956.
- [11.] POSTEL, W., Brauwissenschaft., 29, 1976, s. 39.
- [12.] ČEPIČKA, J., ústní sdělení.

Lektoroval Ing. Jan Voborský

Šavel, J. - Prokopová, M.: Změna barvy piva působením dusitanů. Kvas. prům., 38, 1992, č.11, s. 321 - 325

Sledovaly se změny barvy 12% mladiny a piva při reakci s dusitanem sodným v koncentraci 10 a 100 mg $\text{NO}_2\text{-I}^{-1}$ při 10 a 25 °C. Výsledná barva se vyjadřovala v hodnotách absorbance při 430 a 450 nm a v souřadnicích L, a, b. Reakcí jednoduchých fenolů s dusitanem vznikaly barevné produkty, aminokyseliny tvořily jen málo zbarvené produkty. Zvýšení barvy piva po reakci s dusitanem pravděpodobně souvisí s reakcí dusitanu s polyfenolickými látkami. Navrhl se test pro průzkum kontaminace redukujícími dusičnany v pivovarských kvasnicích, založený na kultivaci kvasnic v pufru (pH:5,0) s přírůstkem dusičnanu draselného a m-fenylendiaminu.

Шавел, Я. - Прокопова, М.: Изменение цвета пива под действием нитритов. Квас. прум., 38, 1992, №11, стр. 321 - 325.

Исследовались изменения цвета 12 % охмеленного сусла и пива при реакции с нитритом натрия в концентрации 10 и 100 мг $\text{NO}_2\text{-I}^{-1}$ при 10 и 25 °C. Результативный цвет выражался в величинах абсорбации при 430 и 450 нм и в координатах L, a, b. При реакции простых фенолов нитритом возникали цветные продукты, аминокислоты образовали только мало окрашенные продукты. Усиление цвета пива после реакции с нитритом связано, по всей вероятности, с реакцией нитрита с полифенольными веществами. Был предложен тест для доказывания контаминации, восстанавливающей нитраты в пивоваренных дрожжах, основанный на культивировании дрожжей в буфере /pH : 5,0/ с добавком нитрата калия и м-фенилендиамин.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Change of Beer Colour due to Effect of Nitrite. Kvas. prům. 38, 1992, No.11, pp 321 - 325

Colour changes of 12% hopped wort and beer during the reaction with sodium nitrite in concentrations of 10 and 100 mg $\text{NO}_2\text{-I}^{-1}$ at 10 and 25 °C were determined. The final colour was given in the extinction values obtained at 430 and 450 nm and in the coordinates of L, a, b. Coloured

products were formed in reactions of simple phenols with nitrite while amino acids formed only slightly coloured products. An increase in beer colour after its reaction with nitrite is probably connected with the reaction of nitrite with polyphenolic compounds. The test for the determination of a contamination reducing nitrates in brewing yeast was developed. During this test yeasts were cultivated in buffer (pH 5.0) with the addition of potassium nitrate and m-phenylenediamine.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Durch Nitrite verursachte Änderung der Bierfarbe. Kvas. prům. 38, 1992, Nr.11, S. 321 - 325

Es wurden die Änderungen der Farbe bei 12% Würze und Bier in Reaktion mit Natriumnitrit in der Konzentration von 10 und 100 mg

$\text{NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ bei 10 und 25 °C verfolgt. Die resultierende Farbe wurde in den Absorbanzwerten bei 430 und 450 nm und in den Koordinaten L, a, b ausgedrückt. Durch Reaktion der einfachen Phenole mit dem Nitrit entstanden farbige Produkte, Aminosäuren bildeten nur schwach gefärbte Produkte. Die Erhöhung der Bierfarbe nach der Reaktion mit Nitriten hängt wahrscheinlich mit der Reaktion des Nitrits mit den polyphenolischen Substanzen zusammen. Es wurde ein Test für den Nachweis der Nitratreduzierenden Kontamination in der Bierhefe vorgeschlagen, der auf der Kultivation der Hefen im Puffer (pH = 5,0) mit Zugabe von Kaliumnitrat und m-Phenyldiamin basiert.