

Z výzkumu a praxe

Sledování tvorby dusitanů v zakvašené mladině reakcí s m-fenylendiaminem

Ing. Jan ŠAVAL, Ing. Marie PROKOPOVÁ, Ing. Dana ZDVIHALOVÁ
Budějovický Budvar, České Budějovice

Klíčová slova: mladina, kvašení, dusitany, m-fenylendiamin, bakterie

663.45

1. ÚVOD

Významu dusičnanů při výrobě piva se věnuje velká pozornost [1,2,3]. V české literatuře se autoři zabývají výskytem dusičnanů, jejich přeměnami i účastí při tvorbě netěkavých nitrosaminů [4,5,6,7].

Dusičnany se mohou redukovat bakteriální kontaminací již při mletí, přičemž vznikají dusitany a postupně i oxidy dusíku. Současně se tvoří netěkavé nitrosaminy, známé pod zkratkou ATNC (Apparent Total N-Nitrosocompounds) [8,9].

Za hlavní zdroj dusitanů lze však považovat zakvašenou mladinu, v níž se během počátečních fází kvašení tvoří dusitany činností gramnegativních bakterií. Také zde reagují dusitany se složkami mladiny za tvorby ATNC [10].

Dusitany jsou v mladině typickým meziproduktem, který z ní rychle mizí. Současně se zvyšuje barva mladiny a piva [10]. Využití této reakce k průkazu nitrosacích reakcí brání přirozený pokles barvy piva během kvašení [11].

V předchozím sdělení jsme navrhli jednoduchý test k průkazu bakterií, redukujících dusičnany. Test se zakládá na reakci vznikajícího dusitanu s m-fenylendiaminem (dále m-FDA) [11].

Reakce dusitanu s m-FDA v přítomnosti silné kyseliny je všeobecně známa, ale chybí údaje o možnosti využití tohoto testu přímo při kvašení piva. Vlivem různých faktorů na intenzitu této barevné reakce se zabývá naše sdělení.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra se měřila v 10 mm skleněných kyvetách proti destilované vodě v spektrofotometru CADAS 100 (Dr. Bruno Lange), řízeném osobním počítačem s použitím software PCSCAN. Stejný přístroj se používal pro ostatní spektrofotometrická stanovení.

2.2 Citrátový tlumivý roztok

Citrátový tlumivý roztok (Mc Ilvaine) se připravil smísením roztoků 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny citronové (21,01 g.l⁻¹ monohydrátu) a 0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného (35,62 g.l⁻¹ dihydrátu) [12]. Například pro přípravu 2 l tlumivého roztoku o pH 5,0 se smísilo 970 ml roztoku 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny citronové a 1030 ml roztoku 0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného. Tlumivý roztok se steriloval v autoklávu (15 min při 120 °C).

2.3 Citrátový tlumivý roztok s dusičnanem draselným

V základních roztocích pro přípravu citrátového tlumivého roztoku (odst. 2.2) se rozpustil dusičnan draselný v koncentraci 150 mg NO₃.l⁻¹ (0,244 g KNO₃.l⁻¹). Tlumivý roztok s požadovaným pH se připravil smísením obou roztoků. Tlumivý roztok se steriloval autoklávováním (15 min při 120 °C).

2.4 Průkaz mikrobiální kontaminace s redukujícím účinkem ve vředných kvasnicích

2 ml hustých vředných kvasnic se smísí s 8 ml citrátového tlumivého roztoku (pH 5,0) s přídavkem dusičnanu draselného,

přidá se 0,25 ml 1% roztoku m-FDA v destilované vodě a kultivuje se při požadované teplotě.

2.5 Průkaz mikrobiální kontaminace s redukujícím účinkem v zakvašené mladině

5 ml čerstvě zakvašené mladiny se smísí s 10 ml citrátového tlumivého roztoku (pH 5,0) s přídavkem dusičnanu draselného (odst. 2.3), přidá se 0,4 ml 1% vodného roztoku m-FDA a kultivuje se při požadované teplotě.

2.6 Mladinový agar s dusičnanem draselným a m-FDA

12% provozní mladina se zfiltruje, zředí stejným dílem tlumivého roztoku s dusičnanem draselným (odst. 2.3) a po přídavku 30 mg.l⁻¹ aktidionu a 2% agaru se steriluje 15 min při 120 °C. Před rozléváním na misky se přidá 0,50 ml 1% roztoku m-FDA na 10 ml půdy.

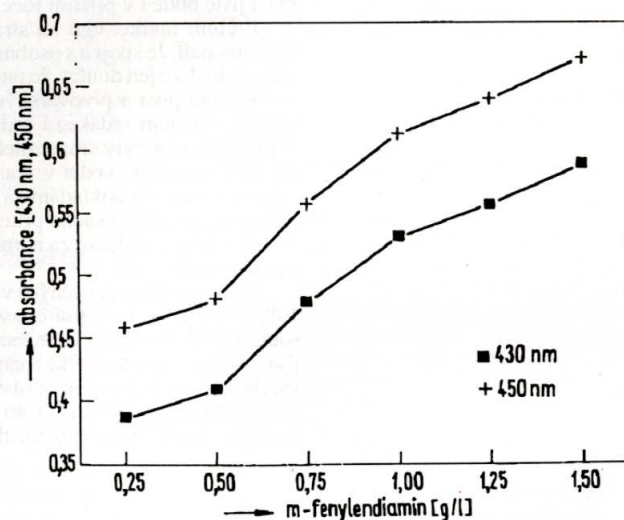
2.7 m-FDA

Ve všech pokusech se použil m-fenylendiamin hydrochlorid.

3. VÝSLEDKY

3.1 Vliv množství m-FDA na intenzitu barevné reakce

K směsi citrátového tlumivého roztoku (pH 5,0) a 1% vodného roztoku m-FDA s výsledným objemem 10 ml se přidalo 0,1 ml roztoku dusitanu sodného (0,1 g NO₂.l⁻¹) a směs se zahřívala 1 h při 60 °C. Výsledná koncentrace m-FDA byla 0,25 až 1,50 g.l⁻¹, výsledná koncentrace dusitanu sodného 1 mg NO₂.l⁻¹. Závislost intenzity zbarvení na množství m-FDA uvádí obr. 1.



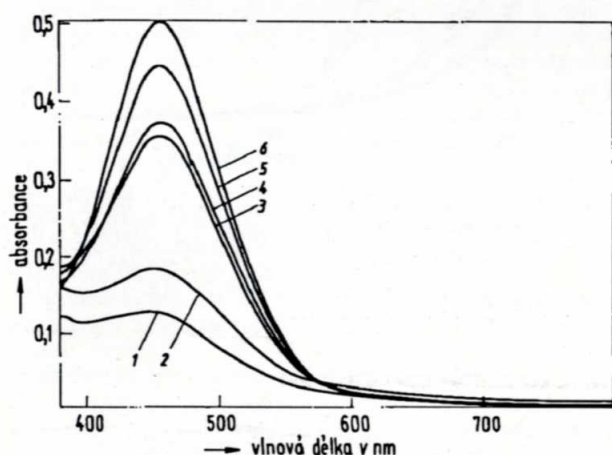
Obr. 1. Závislost intenzity barevné reakce (absorbance při 430 a 450 nm) na množství m-FDA (g.l⁻¹). 1 mg NO₂.l⁻¹, pH 5,0, 1 h při 60 °C

Intenzita barevné reakce závisí v širokém rozmezí na množství m-FDA, přičemž je nutno volit co nejnižší množství, aby se přirozené podmínky při redukcí dusičnanů v mladině ovlivnily co nejméně.

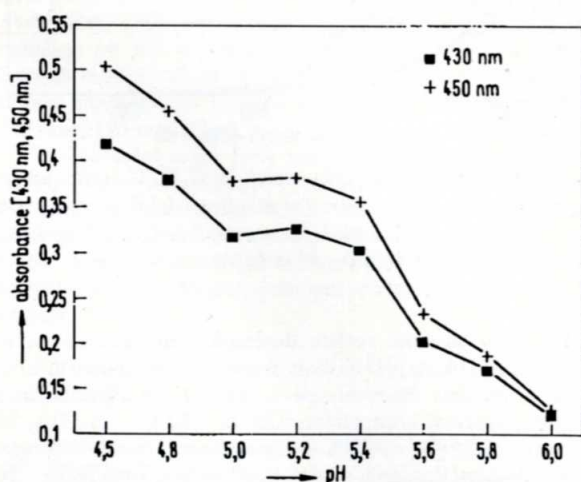
Pro měření intenzity zbarvení se zvolila vlnová délka 450 nm, která je v těsné blízkosti absorpčního maxima a při níž se podle některých analytických postupů měří rovněž barva piva. Pro porovnání se absorbance měřila i při vlnové délce 430 nm, která se všeobecně používá při měření barvy piva.

3.2 Vliv pH na intenzitu barevné reakce

Do 10 ml citrátových tlumivých roztoků (pH 4,5 až 6,0) se přidal m-FDA (0,25 g.l⁻¹) ve formě 1% vodného roztoku a dusitan sodný ve výsledné koncentraci 1 mg NO₂·l⁻¹. Po 1 h reakce při 60 °C se změřila absorbance při 450 nm. Výsledky měření uvádí obr. 2 a 3.



Obr. 2. Absorpční spektra produktů reakce m-FDA (0,25 g.l⁻¹) s dusitanem sodným (1 mg NO₂·l⁻¹) po 1 h při 60 °C. 1 - pH 6,0, 2 - pH 5,8, 3 - pH 5,4, 4 - pH 5,0, 5 - pH 4,8, 6 - pH 4,5

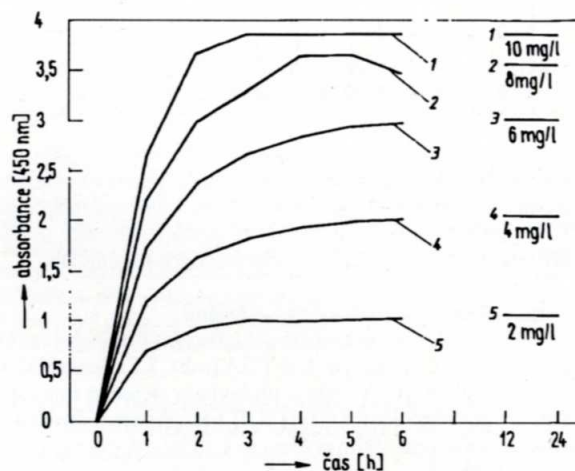


Obr. 3. Závislost intenzity barevné reakce (absorbance při 430 a 450 nm) na pH. 0,25 g.l⁻¹ m-FDA, 1 mg NO₂·l⁻¹, 1 h při 60 °C

Podle výsledků měření je intenzita zbarvení závislá na pH, přičemž výrazně klesá nad pH 5,4. Většina pivovarských substrátů, od sladiny až po pivo se pohybuje v rozmezí pH 5,5 až 4,5.

3.3 Kinetika barevné reakce

K směsi citrátového tlumivého roztoku (pH 5,0) a 0,25 ml 1% vodného roztoku m-FDA se přidal roztok dusitanu sodného (0,1 g.l⁻¹) do výsledného objemu 10 ml. Výsledná koncentrace m-FDA byla 0,25 g.l⁻¹, dusitanu sodného 2,0 až 10,0 mg NO₂·l⁻¹. Při 10 a 25 °C se měřila absorbance při 450 nm v různých časových intervalech. Výsledky měření při 25 °C uvádí obr. 4.



Obr. 4. Závislost absorbance (450 nm) reakce m-FDA (0,25 g.l⁻¹) s dusitanem sodným (1 mg NO₂·l⁻¹) při pH 5,0 a 25 °C na čase (h)

Podle výsledků měření postačuje pro tvorbu barevného produktu při laboratorní teplotě doba 3 až 4 h k dokončení reakce. Při teplotě 10 °C byla doba k ukončení reakce delší asi o 2 až 3 h při stejné výsledné intenzitě zbarvení.

3.4 Tvorba dusitanu ve várečných kvasnicích

Vzorky várečných kvasnic se po zalití citrátovým tlumivým roztokem s přidavkem dusičnanu draselného a m-FDA kultivovaly při 10, 37 a 45 °C (tab. 1). Intenzita zbarvení se hodnotila podle tohoto klíče: 1 - žlutá, 2 - slabě oranžová, 3 - oranžová, 4 - červenooranžová.

Tab. 1. Tvorba dusitanu ve várečných kvasnicích

Intenzita zbarvení									
Vzorek	10 °C, den			37 °C, den			45 °C, den		
č.	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	2	2	3	1	1	3	1	1	1
2	1	2	3	3	4	4	1	4	4
3	2	2	3	0	4	4	0	1	2
4	2	2	3	1	1	2	2	3	3
5	2	2	3	2	4	4	2	4	4

Tab. 2. Tvorba dusitanu v zakvašené mladině při 37 °C

Intenzita zbarvení									
Vzorek	tlumivý roztok + KNO ₃ , den			tlumivý roztok, den			bez tlumivého roztoku, den		
č.	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	3	4	4	3	3	3	2	3	3
2	3	4	4	3	3	3	2	3	3
3	3	4	3	3	3	3	2	3	3
4	4	4	3	3	4	3	2	3	4
5	4	4	3	3	3	3	2	4	4

Tab.3. Tvorba dusitanu v zakvašené mladině při 10 °C

Vzorek č.	Intenzita zbarvení								
	tlumivý roztok + KNO ₃ , den			tlumivý roztok, den			bez tlumivého roztoku, den		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0	1	2	0	1	2	0	1	2
2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
3	0	1	2	0	1	2	0	1	2
4	0	2	4	0	2	2	0	2	2
5	0	2	3	0	2	2	0	2	2

Ve všech případech se prokázala tvorba dusitanů v kontaminovaných kvasnicích. Barevná reakce byla nejsilnější při 37 °C, což odpovídá teplotnímu optimu gramnegativních mladinných bakterií, vyskytujících se ve vřecných kvasnicích.

3.5 Tvorba dusitanů v zakvašené mladině

Zakvašená mladina se smísila s citrátovým tlumivým roztokem, s dusičnanem draselným a m-FDA (odst. 2.5). Souběžně se zakvašená mladina kultivovala s přidavkem stejného množství m-FDA a tlumivého roztoku (pH 5,0) bez přidavku dusičnanu draselného. Ve srovnávacím pokusu se k 10 ml zakvašené mladiny přidalo 0,25 ml 1% roztoku m-FDA bez přidavku tlumivého roztoku.

Vzorky se kultivovaly při 37 a 10 °C. Intenzita zbarvení těchto reakcí se hodnotila podle odstavce 3.4.

Podle výsledků testů je možno v provozních kontaminovaných mladinách prokázat tvorbu dusitanů v prostředí tlumivého roztoku s dusičnanem draselným již po 24 h při 37 °C. Intenzita zbarvení rovněž závisí na množství dusičnanů v mladině a na změnách pH mladiny při kvašení. Při 10 °C je intenzita zbarvení nižší, ale test prokazuje probíhající redukci již po 2 dnech, což odpovídá běžným provozním podmínkám.

3.6 Vliv m-FDA na kvašení

K zakvašeným mladinám (5.10^6 kvasinek. ml^{-1}) s různým množstvím mladinných bakterií (1:20, 2 a 3:200 bakterií. ml^{-1}) a s počátečním obsahem $25 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ se přidal 1% roztok m-FDA ve výsledné koncentraci 0,25 a $0,50 \text{ g.l}^{-1}$.

Ve srovnávacím pokusu se přidalo stejné množství sterilní vody. Po 2 a 5 dnech kvašení při 25 °C se stanovilo zdánlivé prokvašení piva a změřila absorpční spektra zfiltrovaných mladin (tab. 4, obr. 5.6).

Tab.4. Vliv m-FDA na kvašení piva při 25 °C

Vzorek č.	Den kvašení	Zdánlivé prokvašení (%), g.l^{-1} m-FDA		
		0	0,25	0,5
1	2	53,0	60,7	66,9
2	2	42,9	45,6	48,5
3	5	85,1	81,9	82,8

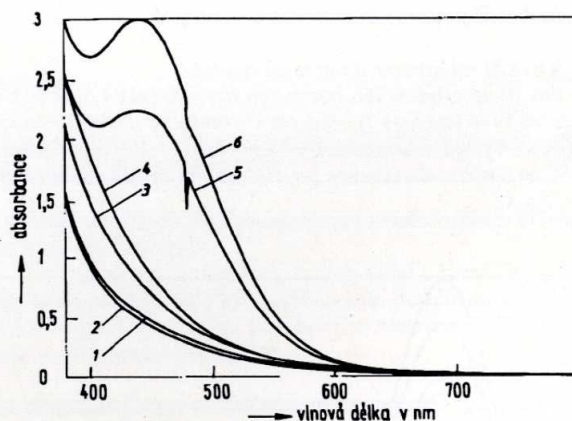
3.7 Průkaz mladinných bakterií redukujících dusičnany

Na mladinný agar s dusičnanem draselným (odst. 2.6) a m-FDA se očkovaly vzorky zakvašené kontaminované mladiny a kultivovaly 24 a 48 h při 37 °C. Po kultivaci se bakterie redukující dusičnany vyznačovaly tmavohnědou zónou.

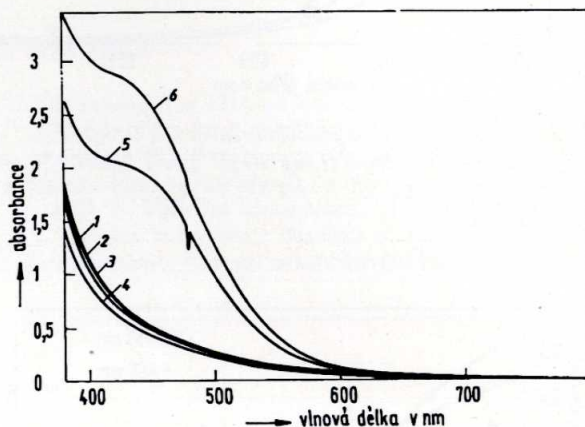
V této části zkoušek se podle získaných výsledků nelišily počty kolonií na kontrolním mladinném agaru bez přidavku m-FDA. Podrobnější mikrobiologické hodnocení je předmětem dalšího studia.

4. DISKUSE

V předchozím sdělení jsme navrhli m-FDA k průkazu tvorby dusitanů ve vřecných kvasnicích a v kvasící mladině [11]. K praktickému využití této reakce je nutné podrobně prozkoumat její podmínky.



Obr.5. Absorpční spektra kvasících mladin po 2 dnech kvašení při 25 °C. 1 - vzorek 1, 2 - vzorek 2, 3 - vzorek 1 + 0,25 g.l^{-1} m-FDA, 4 - vzorek 1 + 0,50 g.l^{-1} m-FDA, 5 - vzorek 2 + 0,25 g.l^{-1} m-FDA, 6 - vzorek 2 + 0,50 g.l^{-1} m-FDA



Obr.6. Absorpční spektra původních a při 25 °C prokvašených mladin. 1,2,3 - původní mladiny, 4,5,6 - prokvašené mladiny. 4 - vzorek 3, 5 - vzorek 3 + 0,25 g.l^{-1} m-FDA, 6 - vzorek 3 + 0,50 g.l^{-1} m-FDA

Intenzita barevné reakce dusitanů s m-FDA závisí na množství m-FDA, na pH i na čase. S rostoucí koncentrací m-FDA stoupá i intenzita zbarvení, ale z praktických důvodů doporučujeme používat koncentrace 0,25 až $0,50 \text{ g.l}^{-1}$ m-FDA. Při koncentraci $0,25 \text{ g.l}^{-1}$ m-FDA se již dosahuje výrazného zbarvení s koncentracemi dusitanů, pohybujícími se pod $1 \text{ mg NO}_2\text{-l}^{-1}$.

Tvorba dusitanů probíhá především po zakvašení mladiny, před poklesem pH, neboť pro rozvoj mladinných bakterií je příznivé vyšší pH. Naproti tomu klesající pH a tvorba alkoholu inhibují činnost mladinných bakterií, ale současně roste rychlost nitrosace látek, přítomných v mladině.

Ve shodě s literárními údaji postačují k tvorbě dusitanů i nízké koncentrace dusičnanů [10]. Z těchto důvodů zvýšený obsah dusičnanů zvýší intenzitu reakce s m-FDA, ale dusičnany

přítomné v běžných mladínách zcela postačují k proběhnutí reakce. Proto se přidavek dusičnanu a tlumivého roztoku volí spíše pro průkaz kontaminace, zatímco reakce bez těchto přísad slouží k monitorování redukce za přirozených podmínek.

Z těchto důvodů je sledování barevných změn mladiny s přísadkou m-FDA vhodnou metodou k monitorování nitrosací reakcí při kvašení piva. Podle kvasných zkoušek neovlivňuje přísadka m-FDA činnost kvasinek, naopak mladina s m-FDA kvasila rychleji, což je možno vysvětlit rychlou vazbou dusitanů na m-FDA. Dusitany pak pravděpodobně nemohly již působit jako buněčný jed.

Podle předběžných mikrobiologických testů nepotlačoval m-FDA růst mladinových bakterií a naopak bylo možno tuto sloučeninu použít k průkazu mladinových bakterií, redukujících dusičnany. Na mladinovém agaru s přísadkou dusičnanu draselného a m-FDA poskytovaly tyto bakterie tmavohnědé zóny, a to již po 24 h kultivace při 37 °C.

Při kvašení kontaminovaného piva se nejdříve činností bakterií redukuje dusičnan na dusitan, který je možno přechodně prokázat jako meziprodukt jinými analytickými metodami. V dalších fázích kvašení se dusitan váže na složky mladiny a volný dusitan rychle mizí z mladiny. Lze předpokládat, že rychlost reakcí dusitanu s různými složkami mladiny se liší v širokém rozmezí.

Rychlost reakce dusitanu s m-FDA je relativně značná a intenzita barevné reakce je proto vhodným ukazatelem redukce dusičnanů. Předpokládáme, že vytvořený dusitan se na m-FDA váže přednostně a množství vzniklé barevné látky je úměrné celkovému množství zredukovaného dusičnanu. Souběžně, jak stoupá rychlost nitrosace složek mladiny při klesajícím pH, stoupá také intenzita zbarvení produktů reakce s m-FDA.

Citlivost stanovení lze zvýšit spektrofotometrickými metodami. Podle tvaru absorpčních spekter na obr. 5 lze postihnout tvorbu dusitanů rozlišením spekter kvasící mladiny bez a s přísadkou m-FDA. Při větších koncentracích vzniklého dusitanu je znatelné již absorpční maximum při 450 nm, nižší koncentrace znamenají výrazné posunutí absorpčního spektra ve viditelné oblasti. Pro tyto účely se osvědčil spektrofotometr CADAS 100 s programovým vybavením PCSCAN.

Z provedených měření lze alespoň odhadnout maximální citlivost reakce. V reakci, probíhající při pH 5,0 odpovídá změna absorbance při 450 nm o jednotku tvorby 2 mg NO₂·l⁻¹, tj. při rozlišení o 0,01 jednotky absorbance tvorby 0,02 mg NO₂·l⁻¹. Je tedy možno i při uvážení nežádoucích vlivů počítat s citlivostí pod 0,1 mg NO₂·l⁻¹.

Vysoké citlivosti reakce odpovídají i výsledky kvasné zkoušky, při níž se spolehlivě prokázala tvorba dusitanu po 2 dnech kvašení při 25 °C v mladině s relativně nízkou kontaminací mladinovými bakteriemi (20 ml⁻¹) a nízkým obsahem dusičnanů (25 mg NO₃·l⁻¹).

V dosavadní práci jsme nesledovali souvislost s tvorbou ATNC. Zde je možno pouze vycházet z literárního údaje, podle něž se z každých 10 mg NO₂·l⁻¹ tvoří 90 ug l⁻¹ ATNC [10]. Z teoretického hlediska lze tedy postihnout velmi nízkou tvorbu ATNC. V případě potvrzení těchto závěrů je možno získat jednoduchý test k předběžnému, rychlému posouzení tvorby ATNC při kvašení.

LITERATURA

- [1] POSTEL, W., Brauwissenschaft, 29, 1976, s.39.
- [2] WEINER, R.C.-RALPH, D.J.-TAYLOR, L., Proc. EBC Congr., Nice 1975, s.565.
- [3] CERUTTI, G.-VECCHIO, A.-FINOLI, C., Mschr. Brauwissenschaft, 36, 1983, s.217.
- [4] ČEPIČKA, J.-BAUDYŠ, P.-VÍZNEROVÁ, E.-KRAUSOVÁ, J., Kvas.prům., 37, 1991, s.230.
- [5] ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ŠATAVA, J., Kvas.prům., 22, 1976, s.268.
- [6] ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M., Kvas.prům., 28, 1982, s.128.

- [7] KELLNER, V.-ČULÍK, J.-VESELÝ, L.-ŠPINAR, B., Kvas. prům., 37, 1991, s.193.
- [8] SMITH, N.A., Proc.EBC Congr., Lisbon 1991, s.561.
- [9] ŠROGL, J.-KOŘÁN, M.-ČEPIČKA, J., Kvas.prům., 38, 1992, s.201.
- [10] CALDERBANK, J.-HAMMOND, J.R.M., J.Inst.Brew., 95, 1989, s.277.
- [11] ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M., Kvas.prům., 38, 1992, s.321.
- [12] ŠYKORA, V.-ZÁTKA, V., Příruční tabulky pro chemiky. 1. vyd., Praha 1956.

Lektorovala Prof.Ing.G.Basařová, DrSc.

ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ZDVIHALOVÁ, D.: Sledování tvorby dusitanů v zakvašené mladině m-fenylendiaminem. Kvas.prům., 38, 1992, č.12, s. 350 - 353

Článek pojednává o podmínkách reakce m-fenylendiaminu (m-FDA) s dusitanem, vznikajícím redukcí dusičnanů mladinovými bakteriemi v zakvašené mladině. Do zakvašené mladiny se přidal m-FDA, který vázal vznikající dusitan za tvorby barevné sloučeniny s absorpčním maximem při 450 nm. m-FDA nepotlačoval činnost kvasinek, ani mladinových bakterií. Intenzita reakce rostla s rostoucím množstvím m-FDA, klesajícím pH a s rostoucí koncentrací dusičnanů. Reakce se může využít i pro rychlý průkaz mladinových bakterií, redukujících dusičnany, v tekutých i ztužených mikrobiologických půdách.

Шавел, Я. - Прокопова, М. - Здвигова, Д.: Исследование образования нитритов в заквашенном охмеленном сусле м-фенилендиамин. Квас. прум., 38, 1992, №12, стр. 350 - 353

Статья рассматривает условия реакции м-фенилендиамина (м-ФДА) с нитритом, возникающим восстановлением нитратов бактериями охмеленного сусла в заквашенном охмеленном сусле. В заквашенное охмеленное сусло добавили м-ФДА, который связывал возникающий нитрит с образованием цветного соединения с абсорбционным максимумом при 450 nm. м-ФДА не подавлял действие дрожжей ни бактерий охмеленного сусла. Интенсивность реакции возрастала с повышающимся количеством м-ФДА, понижающимся pH и с растущей концентрацией нитратов. Реакцию можно использовать и для быстрого доказательства бактерий охмеленного сусла, восстанавливающих нитраты, в жидких и усиленных микробиологических средах.

ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ZDVIHALOVÁ, D.: Nitrite Formation in Inoculated Hopped Wort Using m-Phenylenediamine. Kvas.prům., 38, 1992, No. 12, pp 350 - 353

The article describes the reaction of m-phenylenediamine (m-FDA) with nitrite which is formed via the reduction of nitrate by bacteria presented in hopped wort. m-FDA was added into inoculated hopped wort. This compound was bound with the nitrite. The final coloured compound that was formed in this reaction was measured at 450 nm. m-FDA suppressed neither the activity of the yeast nor that of the bacteria. The reaction was more intensive in higher m-FDA quantities, lower pH and with increasing nitrate concentration. The reaction can be used for a quick estimation of the bacteria presented in hopped wort, both in liquid and solid microbiological media.

ŠAVEL, J.-PROKOPOVÁ, M.-ZDVIHALOVÁ, D.: Verfolgung der Bildung von Nitriten in angegärter Würze mittels m-Phenylenediamin. Kvas.prům., 38, 1992, Nr.12, S. 350 - 353

Der Artikel behandelt die Bedingungen der Reaktion des m-Phenylenediamins (m-FDA) mit dem Nitrit, das durch Reduktion der Nitrate durch Würzebakterien in der angegärten Würze entsteht. Der angegärten Würze wurde das m-FDA beigesetzt, das die Bindung des entstehenden Nitrits bei Bildung einer Farbverbindung mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm bewirkte. Das m-FDA behinderte die Tätigkeit weder der Hefen noch der Würzebakterien. Die Intensität der Reaktion wuchs mit der wachsenden m-FDA-Menge, mit dem herabsinkenden pH und mit der wachsenden Konzentration der Nitrate. Die Reaktion kann auch für den schnellen Beweis der Nitrat-reduzierenden Würzebakterien in flüssigen und gefestigten mikrobiologischen Böden angewendet werden.