

STANOVENIE ETANOLU V PIVE BIOSENZOROM

Ing. JURAJ ŠVITEL, CSc., Ing. ONDREJ ČURILLA

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Bratislava

Kľúčové slová: pivo, etanol, stanovenie, biosenzor

1. ÚVOD

Obsah etanolu v pive je dôležitý akostný ukazovateľ tohto výrobku. Služi tiež na výpočet pôvodného extraktu mladiny, ktorý je jednou zo základných charakteristík piva, od ktorej sa odvodzuje názov výrobku a je tiež podkladom na výpočet dane z piva. Z toho vyplývajú nároky na presnosť a správnosť stanovenia obsahu alkoholu v pive.

Referenčnou metódou stanovenia alkoholu v pive stále zostáva destilačná metóda, ktorá poskytuje spoľahlivé výsledky, avšak kvôli pracnosti a časovej náročnosti býva v prevádzkových laboratóriách často nahradzovaná inými metódami. Medzi ne patrí predovšetkým metóda refraktometrická a metódy založené na využití ultrazvuku. Ďalšie možné spôsoby stanovenia, ako sú napr. spektrofotometria alebo plynová chromatografia, sa v praxi neujali. Enzymová metóda sa využíva na stanovenie alkoholu v nealkoholických pivách.

V odbornej literatúre sa v poslednom období objavujú postupy stanovenia rôznych látok v potravinárskych výrobkoch biosenzormi. Tento trend je nesporne moderný, avšak v súčasnosti je paleta analytov stanovitelných biosenzorom pomerne úzka [1]. Z potravinársky významných látok sú to predovšetkým etanol, glukóza, sacharóza, laktóza, kyselina mliečna. Výhody použitia biosenzorov sú vysoká citlivosť, špecifita, malé nároky na úpravu vzorky. Nevýhody sú predovšetkým problémy s reprodukovateľnosťou a stabilitou, čo je i hlavný dôvod malého komerčného rozšírenia biosenzorov.

Biosenzor obsahuje imobilizovaný enzým, alebo iný biokatalyzátor (intaktné, alebo permeabilizované bunky) v tesnom kontakte s fyzikálno-chemickým prevodníkom, napr. pH elektródou, kyslíkovou elektródou, optosenzorom atď. Meranie koncentrácie analytu sa takto prevádza na meranie iného parametra, napr. zmeny pH, koncentrácie kyslíka, teploty, alebo absorpcie svetla [2]. Na prípravu etanolového senzoru sa používajú biokatalyzátory spotrebúvajúce kyslík (alkoholoxidáza, alebo bunky s obsahom alkoholdehydrogenázy), imobilizované na povrchu kyslíkovej elektródy. Táto kombinácia biokatalyzátor-senzor je veľmi frekvencovaná, hlavne preto, že sa technicky ľahko realizuje. Meracia časť polarografickej kyslíkovej elektródy je uzavretá semi-permeabilnou membránou, cez ktorú difunduje kyslík. Na túto membránu sa umiestňuje enzým spotrebúvajúci kyslík na oxidáciu etanolu. Pokles v odozve elektródy na kyslík (ΔI) je preto úmerný koncentrácii etanolu. Dosiaľ boli popísané postupy

na prípravu etanolového senzoru s použitím alkoholoxidázy [3, 4, 5], membránovej alkoholdehydrogenázy s akceptorom elektrónov [6], alkohol dehydrogenázy s koimobilizovaným NAD [7], s bunkami *Pseudomonas sp.* [8], s permeabilizovanými bunkami *Pichia pastoris* [9].

Naším cieľom bolo pripraviť biosenzor a postup stanovenia etanolu s maximálne zjednodušeným postupom, ľahko dostupnými materiálmi a minimálnymi finančnými nákladmi. Ako vhodný biokatalyzátor sme zvolili intaktné bunky *Gluconobacter oxydans* intenzívne oxidujúce etanol a imobilizáciu s použitím želatíny.

2. MATERIÁL A METÓDY

2.1 Mikroorganizmus a jeho kultivácia

Na prípravu biosenzora bol použitý kmeň *Gluconobacter oxydans* CCM 1783 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno). Na kultiváciu bolo použité médium obsahujúce: 5 g/l kvasničného autolyzátu (Imuna, Šarišské Michaľany); 5 g/l glycerolu (Lachema, Brno) a vodu. Kultúra bola kultivovaná na rotačnej trepačke pri 30 °C. Po 16 h kultivácie boli bunky centrifugované, suspendované vo fyziologickom roztoku a táto suspenzia bola použitá na prípravu biosenzora.

2.2 Príprava biosenzora s imobilizačnými bunkami

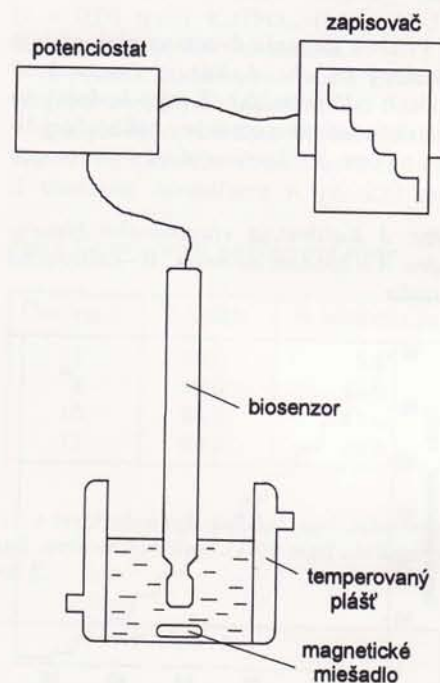
Bunky *G. oxydans* uchovávané vo fyziologickom roztoku sa sцентриfugovali a sediment sa suspendoval v 10 % roztoku želatíny potravinárskej čistoty. Na suché sklo sa umiestnila viskózová tkanina hrúbky 0,15 mm a na tkaninu sa naniesla rovnomerná vrstva želatínovej suspenzie. V prezentovaných výsledkoch sme použili dávkovanie 0,002 g/cm² želatíny a 4,3×10⁷ buniek/cm². Po vyschnutí želatíny (cca h) sa sklo s prilepenou tkaninou namočilo do roztoku 4% glutardialdehydu na 2 minúty. Po zosieťovaní želatíny glutardialdehydom sa membrána opláchlá vodou a opatrne strhla zo skla. Takto pripravená membrána sa uschovávala v chladničke pri 4 °C. Pred meraním sa z membrány vystrihol terč priemeru 0,6 cm, ktorý sa pripevnil na kyslíkovú elektródu hladkou stranou (odlepenou zo skla) smerom ku katóde.

2.3 Meranie s biosenzorom

Na meranie bola použitá polarografická kyslíková elektróda SOPS 533 (Chemoprojekt, Satalice) s polypropylénovou membránou hrúbky 30 µm, na ktorú bol pred skompletovaním elektródy pripevnený terč s imobilizovanými bunkami. Na meranie

signálu elektródy bol použitý merací blok regulátora kyslíku z fermentora LF-2 (Vývojové dílny ČSAV, Praha). Meranie sa zaznamenávalo zapisovačom TZ 4620 (Laboratorní přístroje, Praha), merania prezentované v tejto práci boli zaznamenané počítačom s A/D prevodníkom (Computer Boards Inc., USA). Vlastné meranie prebiehalo v dvojplášťovej nádobke s magnetickým miešadlom temperovanej na 30 °C, schéma celého zariadenia je uvedená na obr. 1. Pred vlastným meraním sa nádobka naplnila 40 ml 0,01 mol/l acetátového pufru (pH=5,5), po vytemperovaní a nasýtení kyslíkom sa pridalo 10 µl vzorky, resp. štandardu etanolu a meranie sa zaznamenávalo na zapisovači.

Obr. 1 Schéma zariadenia na meranie koncentrácie etanolu biosenzorom



2.4 Stanovenie etanolu plynovou chromatografiou

Etanol bol stanovený plynovým chromatografom CHROM 4 (Laboratorní přístroje, Praha). Na stanovenie bola použitá kolóna s náplňou Porapak Q, dĺžka 1,4 m pri teplote 180 °C, teplota nástrikového priestoru 200 °C. Etanol bol stanovený metódou štandardného prídavku.

2.5 Pivo

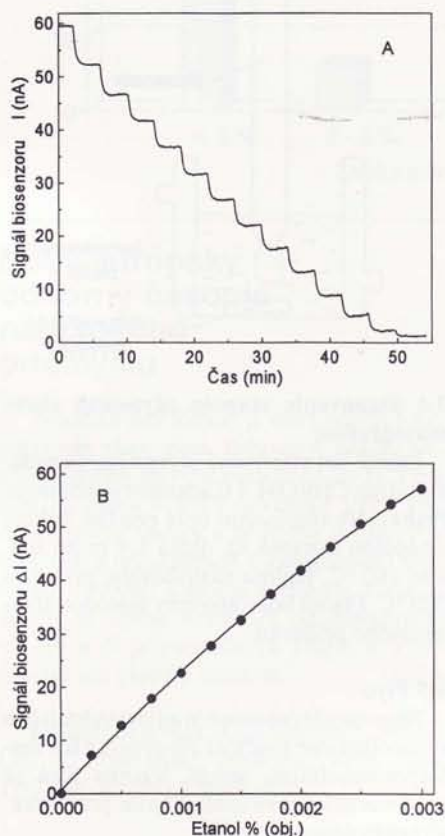
Na overenie presnosti si autori vybrali dve svoje obľúbené značky 12% piva A a B v malospotrebitelskom balení. Vzorky piva sa pred meraním pretrepali 20 min pri laboratórnej teplote a nariedili.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pred meraním vzoriek piva bol biosenzor kalibrovaný. Pri meraní odozvy biosenzora na etanol bolo pridávané po 100 μ l štandardného roztoku 0,1% (obj) etanolu v ekvidistančných časových úsekoch. Toto meranie je prezentované na obr. 2A. Na presné odčítanie odozvy je potrebná doba ustálenia signálu 2–3 minúty. Kalibračnú krivku zodpovedajúcu meraniu na obr. 2A, uvádzame na obr. 2B. Na osi koncentrácií sú uvedené výsledné koncentrácie etanolu v pracovnom pufrí. Zistili sme vysokú citlivosť na etanol, avšak odozva biosenzora nie je lineárna v celom pracovnom rozsahu. Vzorky piva je potrebné pred meraním riediť. Používali sme také riedenie, aby meranie prebiehalo približne v polovici pracovného rozsahu. Z hľadiska praktického použitia je obvykle pre biosenzory kritická stabilita. K úplnej inaktivácii dochádza po 8 dňoch pri uchovávaní senzora pri laboratórnej teplote (obr. 3). Pri uchovávaní v chladničke sme zistili iba zanedbateľné predĺženie životnosti. Okrem znížovania aktivity sme zistili aj zvýšenie nelinearity kalibračnej čiary, preto pre presné meranie je vhodné biosenzor používať iba prvé dva dni.

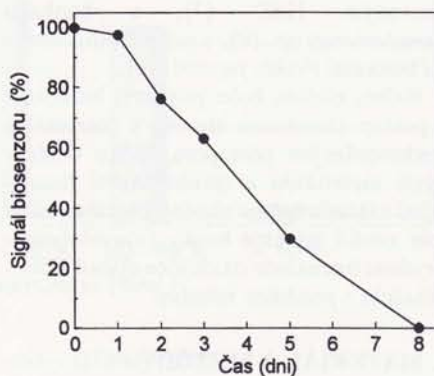
Priebeh merania dvoch vzoriek piva je uvedený na obr. 4, kde je i naznačený spôsob odčítania ΔI . Z tejto hodnoty sa zistí koncentrácia etanolu z kalibračnej čiary na obr. 2B. Správnosť stanovenia sme

Obr. 2 Kalibrácia etanolového biosenzoru. A – záznam merania; B – kalibračná krivka



overili na dvoch vzorkách piva. Sme si vedomí, že pred prípadným použitím v praxi by bolo vhodné presnosť a správnosť overiť na širšom súbore vzoriek. Pri meraní bola zistená veľmi dobrá zhoda so stanovením obsahu etanolu plynovým chromatografom. V pive A bol stanovený obsah etanolu biosenzorom 4,63% a plynovým

Obr. 3 Stabilita etanolového biosenzoru

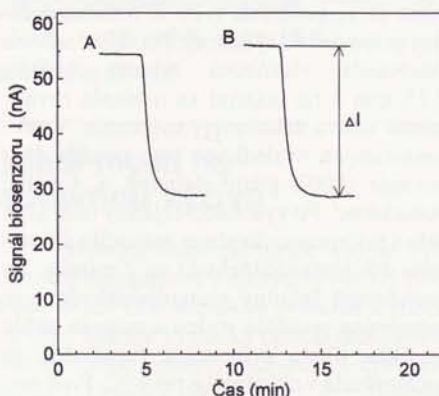


chromatografom 4,68%. V pive B boli namerané hodnoty 4,67% biosenzorom a 4,65% plynovým chromatografom. Nepresnosti biosenzora s imobilizovanými bunkami *Gluconobacter oxydans* môže spôsobiť prítomnosť viacerých dehydrogenázových aktivít v týchto bunkách. Do úvahy prichádza predovšetkým glukóza, ktorú sme ale v pive nedetegovali. Ďalšou možnou interferujúcou látkou je glycerol, ale vzhľadom k veľkému rozdielu saturčných konštánt enzýmov (pre etanol

zanedbateľný vplyv, vzhľadom k malému objemu pridávanej vzorky. Je známe, že meranie kyslíkovou elektródou môžu ovplyvňovať i parametre miešania. Pri meraní s biosenzorom sme vplyv miešania nepozorovali, čo súvisí s pomerne veľkou hrúbkou membrány biosenzora (0,15 mm) v porovnaní s membránou samotnej kyslíkovej elektródy (30 mikrometrov) a z toho vyplývajúcich mechanických a difúzných vlastností.

Tento článok si kladie za cieľ informovať pivovarskú verejnosť o jednej z perspektívnych možností stanovenia etanolu v pive. Na trhu je už v súčasnosti i komerčne dostupný biosenzor na stanovenie etanolu s imobilizovanou alkohol oxidázou (Gonotec GMBH, Nemecko). Stanovenie etanolu biosenzorom môže predstavovať zaujímavú alternatívu dosiaľ používaných postupov kvôli svojej presnosti, rýchlosti i nízkym nákladom. Náklady na spotrebný materiál v našej práci (želatína, kultivačné média...) boli takmer zanedbateľné. Dĺžka jedného stanovenia je asi 5 minút, nevýhodou je ale zdĺhavá príprava na meranie (príprava membrány a kalibrácia). Vhodná úspora pracnosti pri rutinnom použití biosenzora je príprava väčšieho množstva membrán, ktoré možno skladovať dlhú dobu v zmrazenom alebo v lyofilizovanom stave.

Obr. 4 Záznam merania vzoriek piva A a B



$K_S = 5,0 \times 10^{-4}$ mol/l; pre glycerol $K_S = 0,122$ mol/l, a k malému obsahu glycerolu v pive je táto interferencia zanedbateľná. Nároky na presnosť hodnoty pH pracovného pufru sú minimálne, pretože sme zistili rovnakú odozvu v rozsahu pH od 5 do 6. Dôležité je dodržiavať konštantnú teplotu meracej nádoby počas merania, pretože teplota výrazne ovplyvňuje činnosť kyslíkovej elektródy. Obsah kyslíka v pive má

LITERATÚRA

- [1] SEVER, A. H.: Trends Food Sci., 5, 1994, s. 230
- [2] BYFIELD, M. P., ABUKNESHA, R. A.: Biosens. Bioelectron., 9, 1994, s. 373
- [3] VARADI, M., ADANYI, N.: Analyst, 119, 1994, s. 1843
- [4] REBELO, M. J. F. et al.: Analytical Lett., 27, 1994, s. 3027
- [5] GILBAULT, G. G. et al.: EC-1.1.3.13., Anal. Chem., 55, 1983, s. 1582
- [6] SHIIMI, M., NANBA, A.: Ethanol sensor using alcohol dehydrogenase. Jap. Pat. 9270558, 1992
- [7] MIYAMOTO, S. et al.: Biosens. Bioelectron., 6, 1991, s. 563
- [8] BIRCH, S. W. TURNER, A. P. F., ASHBY, R. E.: Process Biochem., 22, 1987, s. 37–42
- [9] CHEN, C. J., NAGLAK, T. J., WANG, H. Y.: Progress, 8, 1992, s. 161–164

Lektoroval Ing. P. Čejka
Do redakcie došlo 10. 4. 1996