

NOVÉ SMĚRY V LABORATORNÍ KONTROLE

NEW WAYS IN THE LABORATORY CONTROL

JAN ŠAVEL – Budějovický Budvar, n.p. Karoliny Světlé 4, 370 21 České Budějovice

Klíčová slova: laboratoř, kontrola, stárnutí piva, volné radikály

Key words: laboratory, control, beer ageing, free radicals

1 ÚVOD

Nové směry v laboratorní kontrole se vyvíjejí v závislosti na vlastnostech výrobků, meziproduktů a surovin a na stupni poznání těchto vlastností. Tyto vlastnosti je možné rozdělit na charakteristiky důležité pro spotřebitele a na vlastnosti, důležité pro výrobce. Spotřebitel se orientuje především na výrobek hodnocením smyslových znaků, popř. jejich závad, výrobce zajímají veličiny, které může řídit, aby získal co možná nejvyšší kvalitu výrobek s co nejvyšší hospodárností.

Ačkoliv spotřebitelé snadno hodnotí skutečné charakteristiky výrobku, jejich převedení do objektivní formy, použitelné k řízení výroby, je značně obtížné. Celkový dojem z barvy piva nelze vyjádřit pouze hodnotou absorbance při 430 nm, podobně jako vzhled pěny nahradit měřením rychlosti jejího poklesu. Měření náchylnosti piva k přepěňování (gushing) nebo měření složitějších závad je ještě obtížnější a obtíže při hledání jejich příčin vzrůstají směrem k počátku výrobního procesu a k surovinám.

Ještě obtížnější úlohu představují komplexní vlastnosti důležité pro výrobce, zahrnující např. zkvasitelnost sladin, aktivitu kvasnic, filtrovatelnost piva nebo dostatečně přesné nastavení složitějších analytických hodnot. Snadné není ani splnění požadavků na zdravotní nezávadnost výrobků a v současné době na přesnost plnění obalů, což opět souvisí s hospodárností výroby.

V průmyslové praxi se vhodné kombinují postupy dávkové kontroly, založené na odběru vzorků z velkých nádob a kontinuální kontroly, využívající provozních analyzátorů. Mezi sebou soutěží přání změřit co nejvíce hodnot s požadavkem co nejpresnějších výsledků. Vysoká přesnost zůstává vyhrazena laboratorní, která může měřit při zachování většího počtu konstantních podmínek, než je tomu v provozním měření.

Je zajímavé, že podobný problém se pak přenáší do laboratoře, kde mezi sebou často bojují složité manuální analýzy s jednoduššími metodami s použitím automatických dávkovacích analyzátorů, na jejichž vstup se vkládají vzorky odebírané z jednotlivých provozních dávek. Velmi důležitá je cena analýzy i její skutečná hodnota. Tyto skutečnosti vedou k systémové analýze provozní a laboratorní kontroly. Tím vzniká relativně mladá průmyslová disciplína, zabývající se účinností sběru,

zpracování a vyhodnocování kontrolních dat. K jejím základům např. patří optimalizace společného zpracování a hodnocení provozních a laboratorních dat. S úspěchem se přitom využívají metody statistické kontroly procesů [1,2].

V minulosti jsme navrhli rychlé a jednoduché testy, vhodné pro kontrolu vlastností, orientovaných na výrobce [3,4]. Z vlastností významných pro spotřebitele zaujímá v současnosti čelné místo požadavek stability výrobku po jeho stočení, zejména zachování senzorických vlastností při skladování. Zkušenost a historie výzkumu učí, že účinné kontrolní metody lze vyvinout teprve po co nejpresnějším objasnění mechanismu procesů, vedoucích k zhoršování jejich kvality. Přispívá k tomu i řada destruktivních metod, založených na urychlení stárnutí piva.

Při hledání nových směrů v laboratorní kontrole je nutné sledovat fyzikální a chemické změny při výrobě piva. Fyzikální změny se zakládají na působení slabých nevazebných interakcí, které se často uplatňují při změnách koloidního stavu piva a hrají důležitou roli nejen během jeho koloidního stárnutí, ale také při filtraci a v dalších výrobních procesech.

2 NEENZYMOVÉ REAKCE V PIVU

Na většině vlastností piva se podílejí chemické vazebné síly, k jejichž překonání je zapotřebí podstatně více energie. Enzymové i neenzymové chemické reakce se uplatňují v průběhu výroby sladu i piva, zatímco po stočení převládají neenzymové reakce. Neenzymové reakce ovlivňují také mechanismus procesů v lidském těle a je zajímavé, že způsoby jejich působení lze využít jak v lékařství, tak v potravinářském průmyslu.

V současné době se pivovarský výzkum orientuje na objasnění mechanismů neenzymových reakcí při stárnutí piva a změn jeho senzorických vlastností. S tím souvisí i terminologie, neboť stárnutí piva zahrnuje kupodivu stejné mechanismy, jako stárnutí živých organismů. Při stárnutí piva se uplatňuje tepelná degradace sacharidů za i bez účasti dusíkatých sloučenin, změny aminokyselin v průběhu Maillardovy i Streckerovy reakce, neenzymové oxidace alkoholů a lipidů.

Výsledkem těchto reakcí je tvorba karbonylových sloučenin, které ovlivňují senzorické vlastnosti piva často ve zcela nepatrných koncentracích. Stejný základ mohou mít i aktivace zákalotvorných slo-

žek, bílkovin a polyfenolických sloučenin, přičemž se může měnit barva piva a její tón.

Neenzymové reakce v pivu jsou z převážné většiny oxidačně-redukční reakce, zahrnující přenos elektronů mezi sloučeninami piva. Na tomto místě je vhodné zmínit zcela výjimečné postavení kyslíku, které vyplývá z jeho možných konformačních stavů. Běžně se vyskytující molekulární kyslík je svou konfigurací biradikál, k jehož redukci je zapotřebí 4 elektronů na 1 molekulu kyslíku. Podstatné je, že během této redukce mohou vznikat výrazně aktivnější formy kyslíku, než je molekulární kyslík. Tyto sloučeniny zahrnují jak volné radikály kyslíku (OFRs – Oxygen Free Radical(s)), tak reaktivní formy kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species). Při reakci těchto sloučenin se snadno oxidují nebo redukují v pivu přítomné organické sloučeniny, které jsou jinak ve styku s molekulárním kyslíkem velmi stálé.

Názorný příklad nízké reaktivity vzdušného kyslíku představuje dobře známá jednoduchá reakce mezi molekulárním kyslíkem a vodíkem. Za laboratorní teploty je rychlost vzájemné reakce obou složek nepatrná, což se dramaticky změní po aktivaci směsi zapálením. Také biochemické oxidace aerobních organismů by nemohly probíhat bez účasti katalyzátorů, přičemž vznikají volné radikály a reaktivní formy kyslíku, které musí organismus odstraňovat.

Důležité je, že na rozdíl od klasických, vratných oxidačně-redukčních reakcí, které se s oblibou využívají v analytické chemii, způsobuje radikálová oxidace nebo redukce nevratný rozpad molekuly substrátu, což je často spojené s rozštěpením molekuly na několik částí. Nevratnost reakcí a výskyt nejrůznějších štěpů a derivátů bývá proto nepřímým důkazem průběhu radikálových reakcí. Navíc postupná redukce molekuly kyslíku umožňuje vznik různých meziproduktů i reakčních mechanismů. Tak mohou oxidační procesy výrazně měnit svůj mechanismus zejména při nízkém obsahu rozpuštěného kyslíku, jako např. ve stočeném pivu.

Při reakci kyslíku s pivem bývá málokdy po naplnění obalu pivem parciální tlak kyslíku v plynné fázi a kapalině v rovnováze, ale i v tomto případě kyslík vytváří v horní vrstvě piva při vstupu do kapaliny koncentrační gradient, takže v poměrně krátké vzdálenosti od uzávěru se může kyslík redukovat složkami piva.

3 MECHANISMUS STÁRNUTÍ PIVA

Tento proces lze snadno znázornit s použitím methylenové modře. Přídáním methylenové modře do čerstvě stoučeného piva se při nízkém celkovém obsahu kyslíku v pivu vytvoří barevný gradient v podobě 1–2 cm vysoké modré vrstvy pod uzávěrem. Kyslík vstupuje netěsnostmi na těsnící ploše uzávěru do piva, váže se na methylenovou modř za vzniku modrého barviva, které se opět redukuje na bezbarvou leukoformu vlivem redukčních látek piva, schopných reagovat s kyslíkem. Při vyšším zatížení piva kyslíkem gradient barvy vůbec nevznikne a pivo zůstane po přidavku methylenové modře trvale zbarvené. Zajišťuje také je, že ani silikonová vložka v kloboučkovém uzávěru, ani těsnění v korunkách nedokážou zabránit vstupu kyslíku do piva, jak lze pozorovat na základě této reakce.

Redukční látky piva zahrnují polyfenoly, oxid siřičitý, hořké látky, reduktory a melanoidiny redukující kyslík za tvorby OFRs a ROS, které napadají další sloučeniny, jako aminokyseliny, lipidy a alkoholy za vzniku senzorycky aktivních sloučenin.

Za zmínku rovněž stojí, že OFR a ROS mohou vznikat i jinými mechanismy, např. fotochemickými reakcemi za účasti fotosenzitizérů, katalytickými reakcemi za účasti kovů apod. Pro experimentální ověření těchto mechanismů se s výhodou používají radikálové iniciátory, jako jsou dichlorid 2,2-azo-bis-(2-amidinopropanu) (AAPH) nebo peroxidisíran draselný.

Průkaz radikálových reakcí zahrnuje několik fyzikálních i chemických technik, např. elektronovou spinovou rezonanční spektroskopii (ESR), nukleární magnetickou rezonanci (NMR), pulsní radiolýzu apod. Na metodě ESR se zakládá měření tzv. lag fáze při vystavení piva kyslíku za zvýšené teploty. Mezi chemické metody patří měření chemiluminiscence a stanovení reakčních produktů radikálových reakcí s použitím nejrůznějších laboratorních technik jako vysokoúčinné

kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) apod.

Při nedostatku finančních prostředků je možné použít jednoduché testy k průkazu radikálů. Pivovarství většinou využívá měření redukční schopnosti sladiny, mladiny a piva v různých modifikacích, z nichž nejznámější je bezpochyby ITT (Indicator Time Test). Nové modifikace zahrnují schopnost redukčních látek zhaset radikály organických barviv, např. DPPH (1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-)-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) aj.

4 JEDNODUCHÉ TESTY STÁRNUTÍ PIVA

V našem výzkumu jsme se věnovali destrukčním testům organických barviv, zejména oxidačně-redukčních indikátorů. Tato barviva mohou totiž podléhat vratným oxidačně-redukčním změnám barvy, nebo nevratným změnám spojeným často s rozpadem molekuly barviva. Výběru barviv předcházela podrobná studie založená na rozpadu barviv radikálovými iniciátory. S překvapením jsme přitom zjistili, že podobné narušení barviv nastává během tepelné degradace cukrů [5].

Je dobře známé, že při zahřívání sacharidů vznikají reduktory, nebo za účasti dusíkatých látek melanoidiny. Rozhodující vliv mají ionty kovů, teplota, pH, popř. obsah dusíkaté složky a sacharidů. V průběhu podrobného studia jsme zjistili, že reduktory mohou reagovat s kyslíkem za vzniku radikálů kyslíku a patrně i sacharidů, které mohou zachycovat i generovat další radikály. Přitom se může vyskytnout poměrně komplikované chování reakčního systému, včetně vzniku oscilačních reakcí.

Ukazuje se, že tepelná degradace sacharidů má při stárnutí piva klíčový význam. Méně je známo, že jeho výsledkem je tvorba produktů, reagujících ochotně se známým činidlem TBA (thio-barbiturovou kyselinou), které se původně používalo k průkazu dialdehydů,

vznikajících rozpadem nenasyčených mastných kyselin.

V současnosti se tedy zaslouženě obrací pozornost pivovarských chemiků na enzymové reakce sacharidů, což představuje nadějnou alternativu k dosud studovaným reakcím lipidů a nenasyčených mastných kyselin.

Jako příklady nově vyvinutých metod v naší laboratoři, např. ve spolupráci s firmou SKALAR, jsou aplikace spojené se stanovením produktů rozpadu sacharidů, např. furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF). Oba postupy umožňují zpracovat až 25 vzorků za 1 hodinu.

Stanovení tzv. furfuralového ekvivalentu se zakládá na přehánění vzorku s vodní párou, nebo rychlodestilací vzorku, přičemž FE představuje podíl mezi absorbancí destilátu a absorbancí standardního roztoku furfuralu při 277 nm. Existují manuální i automatické verze této analýzy.

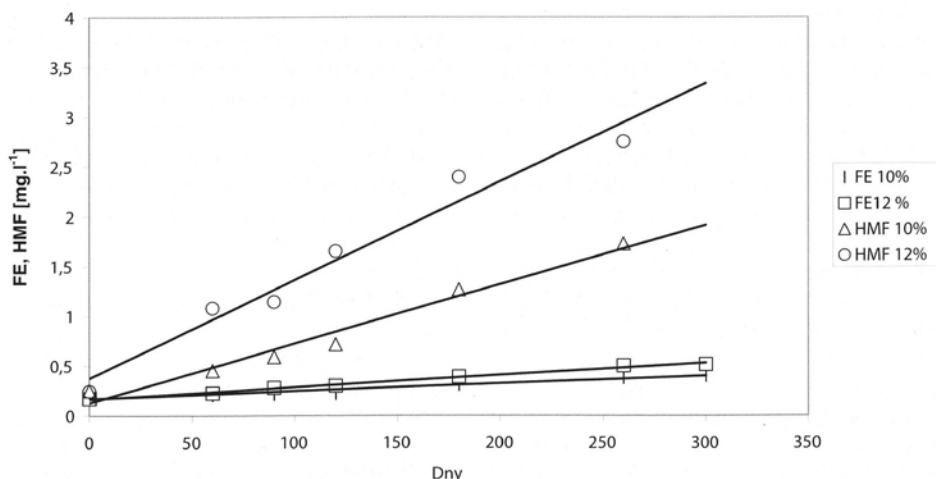
Stanovení FE i HMF se mohou použít pro posouzení standardnosti varního procesu i kvašení nebo dokvašování, neboť rychlost redukce furfuralu i HMF silně závisí na redukční kapacitě kvasnic. Již klasické využití představuje měření rychlosti stárnutí piva (obr. 1).

Další jednoduché testy se zakládají na spektrofotometrické analýze těkavých produktů rozpadu sacharidů s použitím několika vybraných vlnových délek, což představuje pokrok proti dosud užívanému absorpčnímu integrálu, jež lze stanovení nelze snadno automatizovat.

Pro analýzu neenzymového stárnutí piva jsme vyvinuli několik testů, využívajících různého stupně vratnosti barevných oxidačně-redukčních reakcí. Přitom se zjistilo, že methylenová modř dobře odolává působení radikálů, zatímco indigokarmín se za účasti radikálů nevratně oxidačně redukuje na bezbarvé produkty. Podobně se methylová červeně může za účasti radikálů nevratně redukovat. Kromě toho mohou tato barviva podléhat vratným oxidačně-redukčním změnám.

Zdánlivě jednoduché rozlišení vychází přitom z pozorování, že silný reduktor jako kyselina askorbová může za účasti měďnatých iontů odbarvit nevratně methylovou červeně jen za nepřístupu vzduchu, zatímco k nevratnému odbarvení indigokarmínu je zapotřebí vzduch.

Podrobnější pokusy ukázaly, že zejména v oblasti nízkých koncentrací rozpuštěného kyslíku pod 0,1 mg/l se může redukční síla náhle výrazně zvýšit a s dalším poklesem koncentrace rozpuštěného kyslíku opět poklesnout. Kromě toho je možné ve směsi radikálového iniciátoru peroxidisíranu draselného, kyseliny askorbové a methylové červeně vyvolat oscilační reakce ve zku-mavce, pozorovatelné jako tvorbu čer-



Obr. 1 Furfuralový ekvivalent (FE) a HMF při skladování 10% a 12% piva při 20 °C

vených a žlutých proužků. Tyto komplikované druhy chování pravděpodobně zodpovídají za senzorické stárnutí piva i při extrémně nízkém obsahu rozpuštěného kyslíku v pivu.

Literatura

- [1] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 36, 1990, s.193
- [2] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 46, 2000, s.71
- [3] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 46, 2000, s.241
- [4] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 45, 1999, s.340
- [5] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. 47, 2001, s.69

*Zpracováno podle přednášky na
19. Pivovarsko-sladařských dnech,
Brno, říjen 2001
Do redakce došlo
13. 11. 2002*

Šavel, J.: Nové směry v laboratorní kontrole. Kvasny Prum. 48, 2002, č. 2, s. 31–33.

V současné době prodává laboratorní kontrola ve velkých i v malých pivovarech podstatné změny. Systémový přístup vyžaduje nasazení analyzátorů včetně kontroly jejich přesnosti i správnosti a zavedení laboratorních metod, více orientovaných na spotřebitele. Jednoduché testy meziproduktů se zaměřují na posouzení průběhu technologických operací, jako vaření piva, filtraci či stáčení. Největší pozornost se nyní zaměřuje na posouzení senzorických vlastností a jejich stálosti snadno dostupnými metodami. Radikálová teorie senzorického stárnutí piva umožnila vyvinout testy stárnutí piva i posouzení antioxidačních vlastností sloučenin přítomných v pivu. Volné radikály napadají v podstatě všechny sloučeniny přítomné v pivu, a proto lze hodnotit jejich účinek podle snadno měřitelných změn vhodného indikátoru, citlivého na radikály a přidaného do piva. K nastartování radikálových reakcí lze použít vhodný typ radikálového iniciátoru. Jinou strategií představuje detekce vznikajících sloučenin nebo úbytku sloučenin v pivu původně přítomných.

Diskutují se dvě skupiny jednoduchých metod kontroly stárnutí piva. Jedna z nich využívá degradaci organických barviv přidaných do piva, druhá využívá analýzy snadno izolovatelných těkavých složek piva. Důležité jsou změny oxidačně-redukčního potenciálu piva a meziproduktů a výskyt oscilačních reakcí v pivu. Výsledky jsou konfrontovány s dosud pozorovatelnými zkušenostmi při stárnutí piva, jeho transportu a skladování.

Šavel, J.: New Ways in the Laboratory Control. Kvasny Prum. 48, 2002, No. 2, p. 31–33.

Due to application of new kinds of analysers at present time the laboratory control both in big and small breweries significantly changes. It is necessary to check analyser accuracy as well as the introduction of new methods more oriented to customer's need. Simple intermediate tests are developed to determination of the correct course of different technological operations, e.g. wort production, filtration, beer bottling etc. The most attention is paid to determination of the beer sensory properties by easy available methods. Radical theory of beer ageing enabled a development both beer ageing tests and determination of antioxidant properties of compounds present in beer. Free radicals at-

tack all compounds present in the beer that enables to determine the effect by measuring changes of some suitable radical sensitive indicator added to the beer. For radical reactions starting is possible to use some suitable kind of radical initiator. The detection of forming or decrease compounds originally presented in the beer could be kept as some another beer ageing test.

Two groups of simple methods of beer ageing tests are discussed. First one measures the degradation of organic dyes added to the beer, second method analysis beer compounds easy able to isolate. The oxidation-reduction beer and intermediate potential changes as well as the oscillation reaction occurrence in beer are very important. The results are discussed with experiences obtained by beer ageing, beer transport or its storage.

Šavel, J.: Neue Trends in der Laborkontrolle. Kvasny Prum. 48, 2002, Nr. 2, S. 31–33.

Zur Zeit in den grossen und mittelständigen Bierbrauereien wird die Laborkontrolle wesentlich verändert. Man fordert einen Einsatz von Analysatoren einschliesslich ihrer Genauigkeits- und Richtigkeitskontrollen und eine Einführung von neuen Labormethoden, die mehr den Verbrauchsanforderungen entsprechen. Einfache Tests von Zwischenprodukten sind mehr zur Bestimmung des Verlaufes der technologischen Operationen orientiert, z.B. zur Kontrolle des Biersiedens, Bierfiltration oder Bierabfüllung. Die grösste Aufmerksamkeit ziehen jetzt die einfache und schnell zugängliche Tests zur Bestimmung der sensorischen Eigenschaften des Bieres und der Geschmacksstabilität. Freie Radikale greifen in Prinzip alle im Bier anwesende Verbindungen ein, deswegen konnte die Radikalswirkung durch messbare Veränderungen von in das Bier zugegebenen radikalempfindlichen Indikatoren gemessen werden. Zum Starten der Radikalsreaktionen kann ein geeigneter Typ des Radikalsinitiators angewandt werden. Andere Strategie stellt Bestimmung der Zu- oder Abnahme der im Bier ursprünglich anwesenden Verbindungen dar.

Es werden zwei Gruppen von einfachen Kontrollmethoden zur Bestimmung des Biergeschmacks diskutiert. Die erste Methode arbeitet mit einer Degradation der ins Bier zugegebenen Farbstoffen, die andere Methode nutzt eine Analyse der leicht isolierbaren flüchtigen Bierkomponenten aus. Wichtig sind die Änderungen des oxidations-reduktion Bierpotenzials oder seinen Zwischenprodukten. Ergebnisse werden mit den bis jetzt gewonnenen Erfahrungen mit Biergeschmacksänderung, seinem Transport und Lagerung.

Шавел, Й.: Новые направления в лабораторном контроле. Kvasny Prum. 48, 2002, No. 2, стр. 31–33.

В настоящее время происходят в лабораторном контроле на крупных пивзаводах и в минипивоварах существенные изменения. Системный подход нуждается в использовании анализаторов, включая контроль их точности и правильности, и во введении лабораторных методов, более ориентированных на потребителя. Простые тесты промежуточных продуктов направлены на обсуждение прохождения технологических операций, как кипячение, фильтрование или розлив пива. Большое внимание уделяется обсуждению сенсорических свойств и их стабильности нетрудно доступными методами. Теория радикалов, объясняющая сенсорическое старение пива, позволила разработать тесты старения пива и обсуждения антиокислительных свойств соединений присутствующих в пиве. Свободные радикалы поражают все в пиве присутствующие соединения, что позволяет оценить их влияние по нетрудно измеримым изменениям подходящего индикатора, чувствительного к радикалам добавленным в пиво. Для спуска радикальных реакций можно использовать подходящий тип радикального инициатора. Возможно также использовать детекцию возникающих соединений или убыли соединений раньше присутствующих в пиве. Описываются две группы несложных лабораторных тестов процесса старения пива. Первая из них употребляет деградирование органических красителей добавленных в пиво, вторая употребляет анализ нетрудно изолируемых летучих компонентов пива. Важную роль играют изменения окислительно-восстановительного потенциала пива и промежуточных продуктов и появление осцилляционных реакций в пиве. Результаты сравниваются с до сих пор полученным опытом при старении пива, его транспорте и хранении.

Alfa Laval hledá kandidáta na pozici:

PROJEKTANT/ ACAD kreslič (Brewery zařízení)

Požadujeme:

- VŠ vzdělání technického směru
- dobré komunikační schopnosti a zkušenosti s vedením obchodních jednání
- komunikativní znalost AJ
- znalost práce s PS – MS Office, ACAD

Nabízíme:

- práci v mladém kolektivu zahraniční firmy
- možnost profesního růstu
- školení u nás i v zahraničí
- možnost využití zaměstnaneckých výhod

V případě zájmu zašlete svůj životopis
na e-mail: klara.soukupova@alfalaval.com, fax: 02/22 86 36
05 nebo na adresu: **Alfa Laval spol. s r.o.,**
U nákladového nádraží 6, 130 00 Praha 3

Alfa Laval je jedna z nejvýznamnějších švédských společností, která působí na českém trhu již od roku 1920. Alfa Laval je dodavatelem zařízení (odstředivky, výměníky tepla, čerpadla, ventily, aj.) do energetického, chemického, potravinářského, farmaceutického průmyslu, ochrany životního prostředí a dalších oblastí. Firma Alfa Laval má téměř 100 regionálních zastoupení v 50 zemích světa.



www.alfalaval.com