

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ РАЗЛОЖЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ В ПИВЕ

В статье затронута важная проблема нормирования и контроля побочных продуктов брожения (ППБ), образующихся на этапах ферментации пива и во многом определяющих его качество. На основе современных данных выполнен анализ существующих методов контроля ППБ. Предложен химический метод раздельного определения диацетила и ацетоина, позволяющий вне лабораторных условий определять концентрации указанных веществ и анализировать динамику их разложения. Проведена серия определений отдельных сортов пива. Для количественной оценки сходимости также проведена серия определений известным спектрофотометрическим методом. Полученная информация позволит своевременно корректировать параметры технологического процесса приготовления пива.

С вступлением в силу закона «О техническом регулировании» в ранг основных показателей качества становятся критические параметры (показатели) продукции, контроль над которыми будет осуществляться соответствующими контрольно-надзорными службами государства. В связи с этим возрастают требования к набору номенклатуры данной группы показателей, с одной стороны, и к безопасности продукции – с другой.

Показатели качества пива в России регламентированы национальным стандартом ГОСТ Р 51174-98 [1] и гигиеническими требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01 [2]. В число показателей безопасности данного продукта согласно [2] включены:

- тяжелые металлы (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть);
- N-нитрозамины (сумма НДМА и НДЭА);
- радионуклиды (цезий 137, стронций 90);
- бактерии группы кишечных палочек (колиформы);
- патогенные микроорганизмы.

Не умаляя важности нормирования перечисленных показателей безопасности, остановимся на этапах ферментации пива и связанных с ними побочными – токсичными продуктами брожения. Именно побочные (вторичные) продукты брожения (ППБ) и разложения углеродных соединений в настоящее время не охвачены спектром санитарно-гигиенического контроля. Национальным стандартом [1] нормируется содержание этанола – продукта основного брожения. Его процентное содержание является объектом пристального внимания пивоваров, а также налоговых и соответствующих фитосанитарных служб страны. В то время как известно [3, 8] более пагубное воздействие на организм именно ППБ: они в основном относятся к группе гепатотропных ядов.

В свете задач борьбы с «пивным алкоголизмом» и агрессивной рекламой пивных продуктов в настоящее время особенно важно силами самих пивоваров осуществлять контроль за образованием ППБ именно в процессе производства.

Такая постановка вопроса подразумевается и в известном выступлении главного санитарного врача России Г.Г. Онищенко.

Для того чтобы поставленная и являющаяся национальной задачей была решена, пивовары отрасли, с одной стороны, должны иметь гигиенически и технологически обоснованные нормативы наиболее токсичных из ППБ, а с другой – должны быть вооружены относительно дешевыми, доступными и достоверными методами их контроля в процессе производства.

Своеобразным противоречием существующих стандартов на пиво и ликеро-водочную продукцию выступает то, что они являются «стандартами вкуса и аромата». Стандарты не учитывают токсичное воздействие на организм сопутствующих процессу брожения высших спиртов, альдегидов, эфиров и других вторичных продуктов брожения [3, 8]. И в большей степени это относится именно к пиву: лучшее вкусовое качество пива увязывают с содержанием в нем большего количества высших спиртов – ППБ, которые действуют на организм как гепатотропные яды. Так считается [6], что концентрация высших спиртов свыше 100 мг/л ухудшает вкус и полезные свойства пива, а содержание диацетила отрицательно влияет на вкус и аромат в концентрациях свыше 0,1 мг/л. Следует отметить, что ПДК рассматриваемых веществ могут быть на границе или, что особенно опасно, ниже порогового значения вкуса: для диацетила он составляет 0,1-0,3 мг/л, а для основного из присутствующих в пиве высших спиртов – изопропанола – 0,3 мг/л.

Среди побочных продуктов брожения различают:

– вещества, формирующие букет молодого пива (диацетил, альдегиды, сернистые соединения). Они придают пиву нечистый зеленый, незрелый вкус и запах. При повышенной концентрации эти вещества отрицательно влияют на качество пива. В ходе брожения и созревания они могут быть удалены из пива биохимическим путем, в чем и состоит сущность созревания пива;

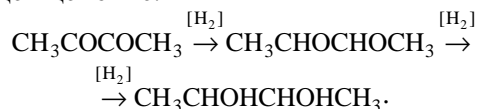
– вещества, формирующие букет готового пива (высшие спирты, эфиры). Они в значительной мере определяют аромат пива: их наличие в определенных концентрациях является предпосылкой для получения качественного пива.

Эти вещества, в отличие от первой группы, не могут быть удалены, по мнению большинства пивоваров и ученых, из пива технологическим путем. Хотя снижение содержания токсичных продуктов второй группы, возможно прежде всего за счет соответствующего измельчения солода и несоложенного сырья. При этом уменьшается наличие фурфурольных соединений, содержащихся в оболочках, а значит, и синтезируемых из них высших спиртов и эфиров.

Баланс температуры и времени во многом определяет диацетильную проблему. Считается, что оптимальными являются следующие технологические параметры: температура главного брожения – (8-9)°С – для высших спиртов, для диацетила интенсивное образование происходит при температуре около 18°С, а восстановлению диацетила и ацетоина способствует температура около 8°С [6].

Типичные представители второй группы – вицинальные дикетоны: диацетил ($\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$) и ацетоин ($\text{CH}_3\text{COCNONCH}_3$) – являются продуктами обмена веществ дрожжей (в основном аминокислот) и других микроорганизмов (лактобактерий, пивной сарцины и особенно педиококков). Являясь летучими компонентами, образующимися в процессе брожения и созревания пива, они участвуют в формировании его аромата и вкуса. Повышенное содержание диацетила придает пиву не свойственный ему и классифицируемый (по разным источникам) как медовый [4], сладкий, творожистый, имеющий аромат зеленых яблок запах [5, 6]. Такая множественная палитра запахов возникает именно из-за разнообразия причин, порождающих повышенные концентрации диацетила.

Под влиянием дрожжей происходит восстановление диацетила до ацетоина, а последнего – до 2,3 бутандиона (2,3 бутиленгликоля) по следующей цепочке:



Целью данной статьи является анализ факторов, влияющих на токсичность продукта в процессе брожения. При этом появляется возможность снижения токсичных примесей группы вицинальных дикетонов за счет своевременного и достоверного контроля в процессе приготовления пива и принятия соответствующего адекватного решения о изменении технологических режимов процесса пивоварения.

В литературе [9, 11] описаны различные способы определения диацетила и ацетоина. Наиболее распространенными являются химический, спектрофотометрический, газохроматографический, ионоселективный и сенсорный методы.

Широко известный газохроматографический метод при его достоинствах (возможность разделения и идентифицирования практически всех веществ, высокая точность, чувствительность и достоверность) предусматривает длительную подготовку пробы с точной ее дозировкой и постоянство условий анализа. Кроме этого, метод является дорогостоящим, поэтому вряд ли может использоваться в начинающих производствах и мелких пивоваренных заводах. Следует также добавить, что результаты хроматографического анализа из-за их длительности остаются ретроспективными, и полученная информация не может быть своевременно использована для управления параметрами технологического процесса.

Спектрофотометрическое определение диацетила, являющееся более динамичным, основано на его способности образовывать окрашенное соединение с а-нафтолом. Образующийся диацетат а-нафтол фотометрируется при длине волны 490 нм. Для проведения определений строится калибровочный график с концентрациями диацетила от 0,1 до 2,0 мг/л. Предварительно проводится отгонка диацетила из сбраживаемого суслу по методике, описанной в [11]. Концентрация ацетоина определялась по разнице полученных параметров.

Авторами были исследованы образцы пива «Емельян Пугачев», «Гофман», «Жигулевское» и «Иваныч». Результаты определений приведены в таблице 1.

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что содержание диацетила в исследуемых образцах готового пива, взятых из торговой сети, несколько превышает его ориентировочное значение [6,11]. Как было отмечено выше, отечественными нормативными документами в настоящее время содержание диацетила не регламентируется, хотя немецкие и чешские пивовары нормируют предельно допустимую концентрацию диацетила: не более 0,1 мг/л продукта [6]. Содержание ацетоина по тем же источникам не должно превышать норму ПДК, равную 3 мг/л.

Для изучения динамики изменения концентрации диацетила в ходе процесса нами также был проведен спектрофотометрический анализ проб молодого пива, отобранных из танков брожения последовательно, т. е. по дням брожения. Данному исследованию подвергались пробы молодого пива, отобранные в ООО «Торгово-промышленное предприятие «Иваныч»» при производстве пива «Иваныч».

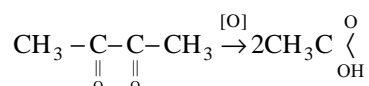
Результаты определения диацетила в пяти пробах представлены в таблице 2.

Зависимости изменения концентрации диацетила во времени показывают, что наиболее значительные изменения происходят между вторыми и третьими сутками. Это подтверждает теорию о восстановлении диацетила в ацетоин [6].

При последующем сбраживании сусла (3-6 сутки) происходит дальнейшее снижение концентрации диацетила, но более медленно.

Это позволяет сделать вывод, что быстрое образование диацетила в первые трое суток брожения обусловлено малым содержанием аминокислот и, как следствие, их синтезированием дрожжами с последующим быстрым возрастанием содержания ацетогидроксикилот (предшественников диацетила), а также высокой активностью дрожжей при внесении их в сусло. Попадание в сусло кислорода при аэрации также способствует быстрому образованию диацетила.

Одновременно были проведены опыты по химическому определению диацетила. Сущность предлагаемого авторами метода основывается на способности диацетила окисляться под действием сильного окислителя с расщеплением молекулы до уксусной кислоты по схеме:



В качестве окислителя использовалась перекись водорода (H_2O_2). Ее применение удобно тем, что в ходе реакции не образуется окрашенных продуктов и, кроме того, система остается гомогенной. Отпадает необходимость в фильтровании при пробоподготовке. Окисление производится в присутствии избыточного количества перекиси (с учетом ее разложения и улетучивания) при комнатной температуре. По окончании смесь подвергается перегонке с отбором фракции 75-85°С, в которой в составе азеотропа присутствует образовавшаяся кислота. Аликвота 50 мл титруется из микробюретки 0,1 М раствором едкого натра (NaOH) в присутствии фенолфталеина. Результаты определенных представлены в таблице 3.

Предлагаемая методика не имеет аналогов в литературе и испытывается авторами впервые. В связи с этим было выполнено сопоставление по точности предлагаемого метода с известным и апробированным, описанным выше спектрофотометрическим.

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что результаты химического определения согласуются с результатами спектрофотометрического.

Выполнена сравнительная количественная оценка предлагаемого химического метода и известного спектрофотометрического.

Точность метода, как известно [9], описывается следующими метрологическими показателями:

- среднее арифметическое значение результатов серии измерений;
- стандартное отклонение;
- относительное стандартное отклонение, или коэффициент вариации;
- сходимость;
- воспроизводимость.

Среднее арифметическое значение результатов серии измерений, проведенных одним методом в одной лаборатории, определялось по известной формуле [9]:

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) / n, \quad (1)$$

где x_i – результат отдельного измерения (определения);

n – число определений в серии.

Стандартное отклонение s серии определенных рассчитывается по формуле (2):

$$s = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right) / (n - 1)}. \quad (2)$$

Относительное стандартное отклонение, или коэффициент вариации V_K , определяется как стандартное отклонение, выраженное в процентах, по отношению к среднему арифметическому значению [9]:

$$V_K = (s \cdot 100) / \bar{x} \quad (3)$$

Показатель сходимости s_r определялся по формуле (4):

$$s_r = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \right)} \quad (4)$$

При доверительной вероятности $P = 0,95$ сходимость метода равна:

$$r = K \cdot s_r, \quad (5)$$

где K – коэффициент, определяемый доверительной вероятностью, при $P = 0,95$, $K = 3,83$.

Аналогично был выполнен анализ результатов спектрофотометрического определения диацетила с целью оценки точности этого метода.

За результаты исследования были приняты средние арифметические результаты параллельных определений диацетила в пробах пива, отобранных из танков брожения в один день и при одних условиях. Данные для определения показателей точности и результаты их определения по формулам (1-5) приведены в таблице 4.

Средняя сходимость метода, определяемая как среднее арифметическое сходимостей, соответствующих определению диацетила в каждый день брожения, составила:

$$r = (0,24+0,35+0,64+0,59+0,47+0,28)/6 = 0,43.$$

Это означает, что при доверительной вероятности $P = 0,95$ результаты двух параллельных определений в серии не будут различаться более чем на 0,43 в 95% случаев.

Данные для определения показателей точности химического метода и их результаты представлены в таблице 5.

Средняя сходимость химического метода равна 0,28. Это свидетельствует о том, что химический метод обладает лучшей сходимостью по сравнению со спектрофотометрическим, хотя чувствительность химического метода несколько ниже.

Таким образом, для оперативного управления технологическими режимами скорее подходят химический и спектрофотометрический методы. Предлагаемый химический метод определения обладает высокой сходимостью,

Таблица 1. Содержание диацетила и ацетона в исследуемых образцах пива

Наименование пива	Экстрактивность начального сусла, %	Объемная доля спирта, %	Содержание диацетила, мг/л	Содержание ацетона, мг/л
Емельян Пугачев	13	3,3	0,133	1,942
Гофман (особое)	14	4,8	0,097	0,967
Жигулевское	11	4,0	0,123	1,316
Иваныч	12	4,5	0,160	-

Таблица 2. Содержание диацетила в сусле в ходе главного брожения

Оптическая плотность D_i	Концентрация диацетила C_i , мг/л	Ход брожения, дни					
		1	2	3	4	5	6
D1		0,62	0,49	0,34	0,28	0,21	0,17
	C1	1,20	0,93	0,62	0,49	0,35	0,26
D2		0,67	0,44	0,28	0,26	0,19	0,11
	C2	1,32	0,83	0,49	0,45	0,31	0,14
D3		0,64	0,42	0,24	0,18	0,16	0,09
	C3	1,24	0,78	0,41	0,28	0,24	0,10
D4		0,71	0,37	0,16	0,11	0,07	0,07
	C4	1,38	0,68	0,24	0,14	0,06	0,06
D5		0,65	0,38	0,17	0,10	0,07	0,07
	C5	1,27	0,70	0,27	0,12	0,06	0,06

Таблица 3. Результаты химического определения диацетила

Объем NaOH V_i , мл	Концентрация диацетила C_i , мг/л	Ход брожения, дни					
		1	2	3	4	5	6
V1		0,61	0,45	0,25	0,23	0,18	0,13
	C1	1,21	0,91	0,63	0,51	0,37	0,28
V2		0,65	0,41	0,23	0,22	0,16	0,07
	C2	1,30	0,81	0,50	0,45	0,31	0,14
V3		0,63	0,38	0,20	0,13	0,12	0,06
	C3	1,25	0,78	0,40	0,26	0,23	0,10

Таблица 4. Расчет показателей точности спектрофотометрического метода определения диацетила в пиве

x_i	\bar{x}	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	s	V_K	s_R	K	r
1,20	1,282	-0,082	0,0067	0,070	5,460	0,063	3,83	0,24
1,32		-0,038	0,0014					
1,24		-0,042	0,0018					
1,38		0,098	0,0096					
1,27		-0,012	0,0001					
0,93		0,146	0,0213					
0,83	0,784	0,046	0,0021	0,120	12,960	0,091	3,83	0,35
0,78		-0,004	0					
0,68		-0,104	0,0108					
0,70		-0,084	0,0071					
0,62		0,306	0,0936					
0,49		0,176	0,0310					
0,41	1,314	0,096	0,0092	0,188	59,835	0,168	3,83	0,64
0,24		-0,074	0,0055					
0,27		-0,044	0,0019					
0,49		0,194	0,0376					
0,45		0,154	0,0237					
0,28		-0,016	0,0003					
0,14	0,296	-0,156	0,0243	0,171	57,754	0,153	3,83	0,59
0,12		-0,176	0,0310					
0,35		0,146	0,0213					
0,31		0,106	0,0112					
0,24		0,036	0,0013					
0,06		-0,144	0,0207					
0,06	-0,144	0,0207						
0,26	0,124	0,136	0,0185	0,083	66,989	0,074	3,83	0,28
0,14		0,016	0,0003					
0,10		-0,024	0,0006					
0,06		-0,064	0,0041					
0,06		-0,064	0,0041					
0,06		-0,064	0,0041					

позволяет отдельно определять диацетил и ацетоин, относительно прост, экономичен и позволяет быстро получать и обрабатывать результаты. К его недостаткам следует отнести: меньшую чувствительность и достоверность результатов, а также необходимость перегонки веществ. Анализ преимуществ и недостатков химического метода позволяет выбрать его в качестве ориентировочного (оценочного) и экспрессного метода, который позволит в условиях поточного производства отслеживать тенденцию динамики трансформации диацетила и ацетоина. Он не требует построения калибровочного графика. Здесь отсутствуют погрешности из-за неточности установки длины волны, влияния случайных лучей и рассеивания света (свойственные спектрофотометрическому методу).

Выбор, сделанный в пользу химического метода измерения, позволил авторам данной

Таблица 5. Расчет показателей точности химического метода определения диацетила в пиве

x_i	\bar{x}	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	s	V_k	s_R	K	r
1,21 1,30 1,25	1,253	-0,043 0,047 -0,003	0,0018 0,0022 0	0,045	3,569	0,037	3,83	0,14
0,91 0,81 0,78	0,833	0,077 -0,023 -0,053	0,0059 0,0005 0,0028	0,068	8,142	0,055	3,83	0,21
0,63 0,50 0,40	0,510	0,120 -0,010 -0,110	0,0144 0,0001 0,0121	0,115	22,613	0,094	3,83	0,36
0,51 0,45 0,26	0,410	0,100 0,040 -0,150	0,0100 0,0016 0,0225	0,131	31,848	0,107	3,83	0,41
0,37 0,31 0,23	0,303	0,067 0,007 -0,073	0,0045 0 0,0053	0,070	23,102	0,057	3,83	0,23
0,28 0,14 0,10	0,170	0,110 -0,030 -0,070	0,0121 0,0009 0,0049	0,095	55,650	0,077	3,83	0,30

работы определить кинетику трансформации диацетила и ацетоина в зависимости от различных факторов. Предлагаемая методика проходит апробацию на других образцах пива.

Список использованной литературы:

- ГОСТ 51174-98. Пиво. Общие технические условия. Введ. с 01.07.99. – М.: Изд-во стандартов, 1998. – 7 с.
- СанПин 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. М.: ФГУП Интер СЭН, 2002. – 168 с.
- Третьяк Л.Н., Герасимов Е.М. Новый взгляд на проблему пивоварения // Вестник ОГУ, 2003, №2. – С. 153-162.
- ТИ-18-6-47-85. Технологическая инструкция по производству солода и пива. Введ. С 01.07.86. – М.: НПО ПБП, 1985. – 163 с.;
- Ермолаева Г.А. Технология и оборудование производства пива и безалкогольных напитков. М.: ИРПО: Академия, 2000. – 416 с.
- Кунце В., Мит Г. Технология солода и пива: пер. с нем. – СПб.: Изд-во Профессия, 2001. – 912 с.
- Хорунжина С.И. Биохимические и физико-химические основы технологии пива и солода. – М.: Колос, 1992. – 446 с.
- Нужный В.П. Пиво. Химический состав, пищевая ценность, биологическое действие и потребление // Токсикологический вестник. Москва. /http://www.redchem.msk.ru.
- Ермолаева Г.А. Справочник работника лаборатории пивоваренного предприятия. – СПб.: Профессия, 2004. – 350 с.
- Инструкция по технологическому контролю пивоваренного производства. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 280 с.
- Химико-технологический контроль производства солода и пива /Учебник для вузов /Под ред. Мальцева П.М. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 280 с.