

## **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПИВА В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕННО ОБОРУДОВАННЫХ ПИВОВАРЕННЫХ ЛАБОРАТОРИЙ**

**Представленный для публикации материал является развитием вопроса о необходимости контроля побочных продуктов брожения (ППБ) и содержит конкретные инструменты для повышения его оперативности при определении концентраций диацетила на стадии ферментации пива. Показана связь между содержанием ППБ в пиве, его микробиологическими свойствами, степенью гидролиза белка и количеством образовавшихся аминокислот. Низковольтным горизонтальным электрофорезом определены аминокислоты в некоторых сортах пива, произведенного в Оренбургской области. Приведены экспериментальные кривые гидролиза белка в различных сортах пива. Предложен экспресс-метод определения диацетила, позволяющий контролировать его во время брожения и дображивания и способствующий своевременной корректировке параметров технологического процесса производства пива.**

Ужесточение требований к качеству и безопасности пива как традиционного национального продукта предопределило в настоящее время в связи с принятием закона «О техническом регулировании» задачу снижения токсичности столь популярного в народе «освежающего» напитка.

Статистика 2002-2004 годов показывает, что употребление пива увеличилось в среднем на 10-12%, и рост пивного алкоголизма, продолжающийся в России, обеспечивается прежде всего за счет молодежи. Пиво продолжает оставаться у нас в стране элементом субкультуры, а это значит, что повышение качества и снижение токсичности пива, производимого в нашей стране, становится в ранг национальных задач.

В таких условиях отечественный производитель пива должен осознать свою миссию в проблеме, связанной с токсичностью напитка, обусловленной пагубным воздействием на организм побочных продуктов брожения [1].

Токсичность пива, как показали специальные исследования [1, 2], оказалась в тесной зависимости от стойкости напитка.

В соответствии с ГОСТ 29018 – 91 «Пивоваренная промышленность. Термины и определения» стойкость пива – это показатель способности пива сохранять прозрачность при определенных условиях. Стойкость делится на обратимую, т. е. белковую (коллоидную), и биологическую. Если первая делает продукт несоответствующим по органолептическим показателям, то вторая приводит к тому, что напиток становится опасным для употребления, при этом визуальная потеря прозрачности, то есть помутнение, может и не наблюдаться. Оба вида стойкости, обусловливающие и предопределя-

ющие друг друга, связаны с условиями хранения готового продукта.

Кроме проблемы создания специальных температурных условий хранения и продажи пива, которые в настоящее время во многих «горячих точках» реализации не соблюдаются, актуальными являются способы, позволяющие стабилизировать микробиологические и токсичные свойства конечного продукта пивоварения.

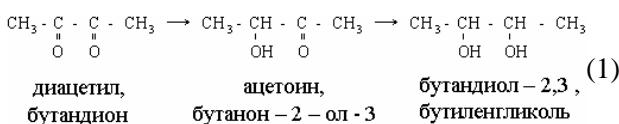
Микробиологическое состояние молодого и готового пива, в силу различных причин может меняться в процессе брожения и дображивания, а также в зависимости от условий хранения связано с содержанием диацетила. Присутствие белка, причем как в связанной, так и свободной формах, и дрожжевого остатка, особенно для нефильтрованного («живого») пива, является благоприятной питательной средой для размножения микроорганизмов. Можно утверждать, что при производстве «живого» пива диацетильная проблема приобретает еще большее значение.

Диацетил, как известно, относится к типичным представителям вицинальных дикетонов и является побочным продуктом брожения. Установлено, что содержание диацетила существенно влияет на стойкость пива [4, 10]. Инфицирование пива молочнокислыми бактериями сопровождается дополнительным образованием диацетила и ацетоина при его хранении и в анаэробных условиях (в бутылках и кегах). Образование значительного количества диацетила является характерным признаком и для педиококков [10]. К микроорганизмам, которые образуют нежелательные побочные продукты, относятся прежде всего *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus frigidus* и *Pediococcus damnosus*. Кроме того, некоторые

расы пивоваренных дрожжей тоже способны образовывать диацетил [4].

С другой стороны, гидролиз остаточного белка, продолжающийся и в готовом пиве с течением времени, оказывает влияние на скорость превращений диацетила в ацетон, а последнего – в бутандиол, которые также протекают в анаэробных условиях.

Схема указанных превращений отражена в уравнении (1):



Интенсивность такого образования зависит от концентраций предшественников вицинальных дикетонов – ацетогидрокислот, к которым относятся  $\alpha$ -ацетолактат и  $\alpha$ -ацетогидрооксибутират.

Диацетильная проблема заслуживает особого внимания еще и по другим причинам:

- содержание диацетила в пиве (его концентрация) является критерием созревания готового продукта;
- предельная концентрация диацетила ограничена пороговой (0,1 мг/л), ощущаемой органолептически.

По международной терминологии, принятой Европейской пивоваренной конвенцией (European brewery convention – EBC), при определении вкуса пива отдельно выделяют подкласс 0620 – «Диацетил», который обусловлен именно повышенным содержанием (более 0,1 мг/л) диацетила [5]. В послевкусии такого пива ощущается маслянистый, прогорклый привкус.

На пивоваренной компании «Балтика» введена международная система органолептической оценки качества пива, принятая ЕВС, нормы которой жестче требований российского ГОСТ Р 51174 – 98 [3]. Так, в обязательном порядке проводится тестирование пива на диацетил (запах жженого сахара и масла).

На образование и редукцию диацетила по приведенной выше схеме влияют технологические факторы, характеристики используемых дрожжей и аминокислотный состав сусла. Установлено, что те штаммы дрожжей, которые медленно потребляют аминокислоту валин, способны синтезировать диацетил в высоких концентрациях, которые снижаются за счет реакции, протекающей по уравнению (1).

Данная реакция, как показывают термодинамические расчеты, характеризуется отрицательной величиной изменения изобарного потенциала  $\Delta G$ , определяемого из уравнения (2), и малой энергией активации  $E^*$ .

$$\Delta G_{298}^0 = \Delta H_{298}^0 - \Delta S_{298}^0, \quad (2)$$

где  $\Delta H_{298}^0$  – тепловой эффект реакции, кДж/моль;

Т – температура реакции, К;

$\Delta S_{298}^0$  – изменение энтропии системы кДж/(моль·К)

Для указанных выше превращений диацетила в ацетон  $\Delta H_{298}^0 = -181,36$  кДж/моль,  $\Delta S_{298}^0 = -8,72$  кДж/(моль·К), то есть  $\Delta G_{298}^0 = -278,76$  кДж/моль, что доказывает большую выгодность реакции как энергетического процесса. Кроме того, энергия ее активации  $E^*$  составляет всего лишь 34 кДж/моль. Рассчитанные значения показывают, что реакция (1) протекает полностью.

Из аргументов, приведенных выше, следует, что превращение диацетила в другие вещества в фазе ферментации (брожения) пива должно регулярно контролироваться, и холодное дубаживание (созревание или, как его еще называют, матuration) рекомендуется начинать не раньше, чем содержание диацетила упадет ниже уровня 0,1 мг/л.

В отечественном пивоварении определение диацетила относится к числу дополнительных анализов, которые в последнее время стали выполнять некоторые пивоваренные компании, прежде всего ОАО «Балтика». К числу таких относятся и расположенные в нашей области «Пивоварни Ивана Таранова», работающие совместно с немецкими пивоварами. В их практике определяется общее содержание диацетила по известным международным методикам.

Однако используемые в практике таких предприятий методики контроля (в том числе и международные – Аналитической комиссии по пивоварению Центральной Европы, МЕБАК, и ЕВС) относятся к лабораторным и предполагают наличие хорошей инструментальной базы. Так, в Германии определение содержания диацетила и вицинальных дикетонов проводят фотометрическим методом Гетцеля – Гьертзена (Hertzel – Gjertsen) в аппарате Парнаса (Parnas) [3]. При этом происходит дистилляция исследуемого раствора вместе с добавленным реагентом. При реакции образуется производное диацетила, которое определяется на спектрофотометре, так как оно проявляется

ет специфическое поглощение при длине волны 335 нм [4].

В практике отечественных лабораторий применяется метод, основанный на реакции диацетила с  $\alpha$ -нафтоловом, при этом продукт реакции определяется спектрофотометрически. Метод позволяет раздельно определять диацетил и ацетоин при длине волны 490 нм, при этом ацетоин определяется после окисления хлорным железом в диацетил. Высокая чувствительность такого способа дает возможность изучать кинетику быстрых реакций и степень очистки вещества. Это позволило нам модифицировать известный метод и использовать менее дорогой фотоэлектроколориметр КФК-2, который дешевле применяемого спектрофотометра более чем в два раза. Точность определения концентрации диацетила при этом не уменьшается.

О том, что такое лабораторное оснащение не под силу малым и развивающимся пивоварням, мы уже писали [7]. Но основная проблема заключается еще и в том, что анализы, выполненные в лаборатории, носят ретроспективный характер. Несмотря на их точность, лабораторные методы все же не обеспечивают оперативности, необходимой для управления качеством конечного продукта. Так, описанный спектрофотометрический метод требует построения калибровочного графика и перегонки исследуемого образца.

Из сказанного следует, что экспрессное определение диацетила с целью выработки управляющего воздействия по приведению режимов технологического процесса производства пива к стандартным представляет собой актуальную задачу.

Необходимость разработки экспрессных методов для контроля процессов ферментации и созревания пива, позволяющих своевременно корректировать технологические параметры этих этапов, в специальной литературе обсуждается давно [2, 4, 7, 8, 9].

Для решения поставленной задачи нами были проанализированы существующие методы контроля диацетила. Критериями выбора явились:

- возможность контроля диацетила в потоке;
- точность (минимальные погрешности, определяющие сходимость и воспроизводимость методов);
- простота анализа, определяемая требованиями к пробоподготовке и квалификации оператора;
- достоверность полученных результатов.

Ранее авторами были описаны метод химического определения диацетила и кинетика его трансформации [7]. Данный способ характеризуется достаточной чувствительностью и точностью, что было подтверждено при сравнении с результатами, полученными при спектрофотометрическом определении, сущность которого приведена выше. Однако, учитывая, что оренбургские пивоваренные компании не контролируют диацетил в процессе брожения и созревания пива и не имеют оборудования, в задачу входила разработка экспрессного метода. В связи с этим был опробован тестовый способ, применяемый в микробиологии, основанный на способности кетонов образовывать в кислой среде окрашенное соединение с  $\alpha$ -нафтоловом по схеме 3.

Реакционная способность гидроксильных групп ароматических соединений и карбонильных групп вицинальных дикетонов позволяет утверждать, что реакция образования окрашенного соединения (2,3-ди- $\alpha$ -нафтилоксибутадиен-1,3) протекает однозначно.

Интенсивность окраски образовавшегося химического соединения зависит от концентрации диацетила и изменяется от желтой до интенсивно красной. Измерение концентрации диацетила проводилось на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 490 нм. Методика построения калибровочного графика описана авторами в [7]. На основании выполненных измерений была создана колориметрическая шкала («шкала цветности») с концентрациями диацетила 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мг/л. Выбор данных значений обусловлен тем, что именно в этих пределах происходит изменение концентрации диацетила в процессе созревания пива [4].

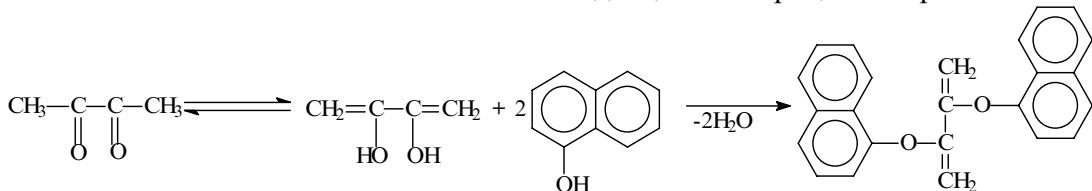


Схема 3. Диацетил ацетоин  $\alpha$ -нафтоль 2,3-ди- $\alpha$ -афтилоксибутадиен-1,3

Как было показано ранее нами [7] и подтверждено другими авторами [4, 8], концентрация диацетила, пройдя через максимальную, падает до уровня до 0,08 – 0,10 мг/л.

Разработанная нами «шкала цветности» позволяет с помощью тест-полосок, например чешской фирмы La-Xema, и раствора  $\alpha$ -нафтона методом сравнения окраски быстро, непосредственно у танков брожения и дображивания, определять концентрации диацетила. Данная разработка является авторской и в настоящее время находится на стадии патентования.

Эксплуатационные затраты на внедрение экспресс-метода могут быть сведены до минимума при замене дорогостоящих спектрофотометрического, хроматографического или химического методов определения диацетила и ацетоина на метод с использованием, например, тест-полосок типа ВП или стрипированного набора реактивов на 120 определений ацетоина. Такой набор по прайс-листу фирмы La – Хема на 10.01.04 стоит 13,26 у. е.

Кроме того, известно [9], что аминокислоты участвуют в реакциях, ведущих к созданию так называемых компонентов старого вкуса пива, причем окислительные и неокислительные реакции, в результате которых пиво стареет, начинаются уже при прорацивании солода и продолжаются в готовом пиве. Глубина химических и вкусовых изменений, происходящих в пиве, зависит от температуры и продолжительности его хранения, проникновения света и не в последнюю очередь от аминокислотного состава напитка. Так, чешские пивовары считают оптимальным содержание аминокислот в готовом пиве около 600 мг/л. При хранении такого пива в течение шести месяцев в стандартных условиях происходит шестипроцентное снижение общего количества аминокислот. Такое пиво, как описано в [9], по общему впечатлению, после дегустации практически ухудшилось максимум на один градус (по девятибалльной системе оценки).

Аминокислоты, относящиеся к монопептидам, а также пептиды различной молярной массы, вплоть до высокомолекулярных полипептидов, имеют большое значение для развития микроорганизмов. Некоторые из монопептидов пива отсутствуют в сусле, следовательно, они выделяются дрожжами во время брожения. С

другой стороны, многие бактерии (например, молочнокислые) слабо развиваются при отсутствии в среде некоторых аминокислот. Это доказывает, что аминокислоты являются питательной средой для микроорганизмов и влияют на биологическую стойкость пива [10]. Следовательно, необходимо контролировать аминокислотный состав как сусла, так и готового пива.

В настоящее время для этой цели с успехом применяются преимущественно газовая хроматография (ГХ) и электрофорез.

С целью определения взаимосвязи между содержанием диацетила и аминокислот авторами были проведены исследования по изменению их концентраций во времени. Из особенностей химических превращений, приведенных выше, следует, что содержание аминокислот оказывает влияние на концентрации предшественников диацетила и скорость реакции, ведущих к образованию так называемых компонентов «старого вкуса» [9]. В связи с этим в последнее время аминокислоты были включены в группу так называемых компромиссных элементов.

В работе определение концентраций аминокислот проводилось низковольтным электрофоретическим методом с помощью прибора Поток-1 с использованием платиновых электродов типа ЭТПЛ – 02 М. Прибор позволяет прикладывать к платиновым электродам потенциал при силе тока от 2,0 до 50 мА с последующим проявлением разделяемых ацетоновым раствором нингидрина аминокислот. При этом качественный аминокислотный состав устанавливался по эталонам и величинам  $\xi$ -потенциала, рассчитанным по уравнению (4):

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot v \cdot l \cdot 300^2}{U \cdot \epsilon}, \quad (4)$$

где  $\eta$  – вязкость пива, Па·с;

$v$  – скорость перемещения границы, см/с;

$l$  – расстояние между электродами, см;

$U$  – напряжение, В;

$\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды.

Каждой экстремальной точке соответствует рассчитанное значение  $\zeta$ -потенциала, которое представлено в таблице. Определение качественного состава аминокислот выполнялось путем сопоставления полученных значений  $\zeta$ -потенциала со справочными данными, а опре-

Таблица. Результаты определения аминокислотного состава пива ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Пиво	Гофман (пастеризованное)	Гофман «живое»	Гофман особое «живое»	Holsten	Гофман (пастеризованное)	Гофман «живое»	Гофман особое «живое»	Holsten
Амино- кислота	$\zeta$ – потенциал, мВ				Концентрация, мг/л			
Аргинин	0,0605	0,0608	0,0603	0,0798	26,0	25,4	25,9	34,3
Валин	0,0658	0,0621	0,0718	0,0868	28,6	25,9	35,3	37,7
Глицин	0,0671	0,0661	0,0612	0,0885	29,8	27,3	35,0	39,3
Лейцин	0,0688	0,0608	0,0609	0,0907	32,1	25,4	26,2	42,3
Триптофан	0,0704	0,0621	0,0662	0,0929	34,2	25,9	27,0	45,1
Прочие*	Разделения нет				20,0	22,3	19,6	29,4

\*Прочие аминокислоты определялись по разности общего белка и сумме приведенных в таблице аминокислот.

деление концентраций – сравнением площадей пиков с площадями эталонных образцов.

Исследованию подвергались образцы следующих сортов пива: «Гофман особое» (нефильтрованное), «Гофман» (пастеризованное), «Гофман» (нефильтрованное), «Балтика» (безалкогольное), «Пит» (безалкогольное). Все эти сорта за исключением «Балтики» (безалкогольное) производятся на оренбургских пивоварнях. Было разделено 10 аминокислот: аспарагин, аргинин, глицин,  $\beta$ -аланин, тирозин, валин, метионин, триптофан, фенилаланин, лейцин. Определенные нами аминокислоты и их кон-

центрации для пива, производимого ЗАО «ОР-ПИК», представлены в таблице.

Кривые идентификации аминокислот, построенные по экспериментально определенным значениям силы тока, полученным с помощью низковольтного горизонтального электрофореза, представлены на рисунке 1.

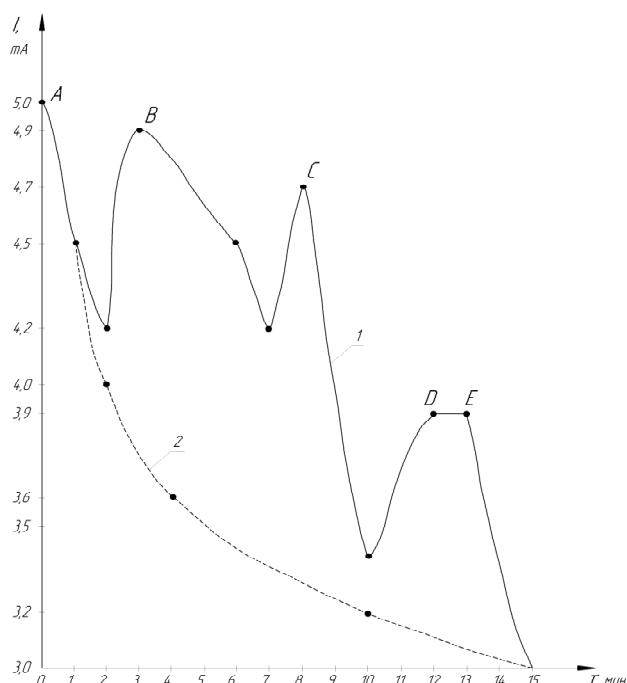
По разности концентраций общего белка и приведенных в таблице аминокислот с достаточным основанием можно утверждать, что аминокислоты, не подвергшиеся в данных условиях разделению, присутствуют по отдельности в небольших количествах.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что в пастеризованном пиве «Гофман» преобладает триптофан, относящийся к классу незаменимых аминокислот, тогда как в «Гофман» (нефильтрованное) и «Гофман» (особое) его содержание значительно меньше. Очевидно, при пастеризации, проводимой при температуре 70–72 °С, гидролиз белка происходит более полно, о чем свидетельствует и общее количество аминокислот в данном образце.

Другим подтверждением данного факта являются полученные кинетические кривые по изменению содержания общего белка, приведенные на рисунке 2.

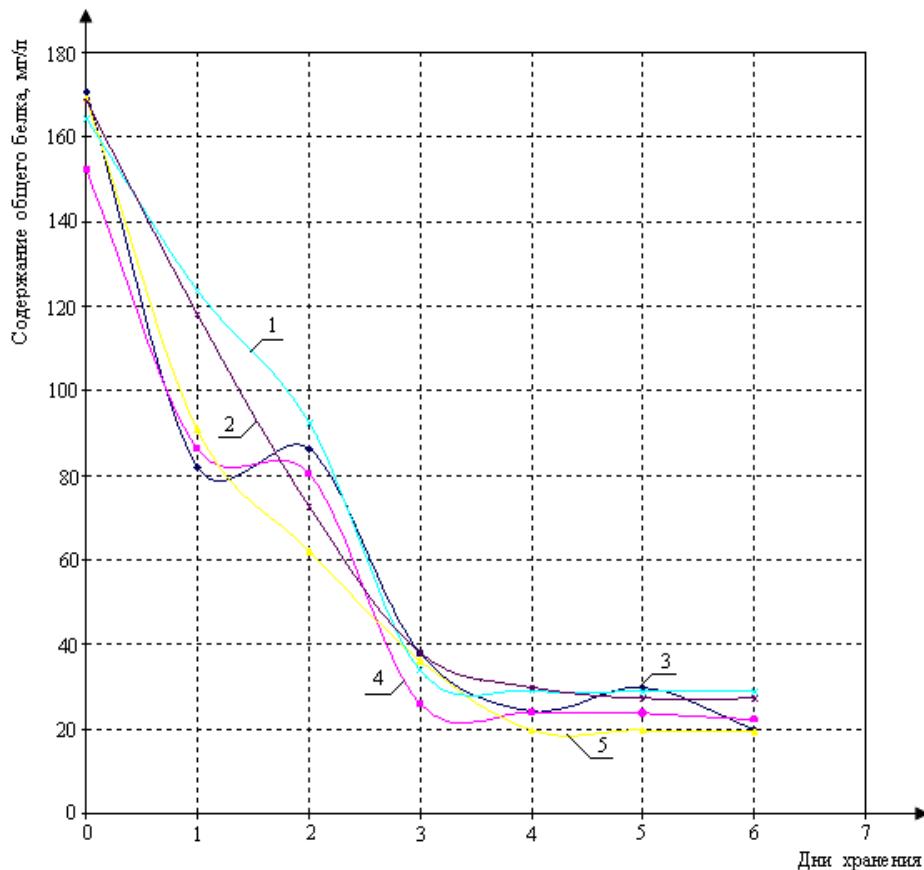
Для ускорения процесса протекания окисительно-восстановительных реакций измерения концентраций аминокислот проводились после того, как исследуемые образцы пива были подвержены прямому контакту с окислителем.

Нахождение зависимостей концентраций каждой аминокислоты по мере разложения белка от продолжительности хранения пива является задачей регрессионного анализа.



1 – Экспериментальная кривая идентификации аминокислот;  
2 – Экспериментальные значения силы тока; А – аргинин,  
В – глицин, С – валин, Д – триптофан, Е – лейцин.

Рисунок 1. Результаты идентификации аминокислот горизонтальным электрофорезом в нефильтрованном пиве «Гофман»



1 – «Уральский мастер»; 2 – «Жигулевское»; 3 – «Гофман» (пастеризованное); 4 – «Гофман» (нефильтрованное); 5 – «Гофман особое» (нефильтрованное).

Рисунок 2. Кинетические кривые гидролиза белка в различных сортах пива.

**Список использованной литературы:**

1. Нужный В.П. Пиво: Химический состав, пищевая ценность, биологическое действие и потребление // Токсикологический вестник. Москва. / <http://www.propivo.ru> – 2003. – 9 с.
2. Третьяк Л.Н., Герасимов Е.М. Новый взгляд на проблемы пивоварения // Вестник ОГУ, 2003, №2. – С. 153 – 162.
3. ГОСТ Р 51174 – 98. Пиво. Общие технические условия. Введ. с 01.07.99. – М.: Изд-во стандартов, 1998. – 7 с.
4. Кунице В., Мит Г. Технология солода и пива: пер. с нем. – СПб.: Изд – во Профессия, 2001. – 912 с.
5. Меледина Т.В. Сырье и вспомогательные материалы в пивоварении / Т. В. Меледина. – СПб.: Профессия, 2003. – 304 с.
6. Меледина Т.В. Роль штаммовых характеристик дрожжей в формировании вкуса и аромата пива // Brauwelt, Мир пива. – 1997. – №1. – С. 35 – 37.
7. Третьяк Л.Н., Лосев Ю.А., Халиуллин В.Р. Анализ динамики разложения вторичных продуктов брожения в пиве // Вестник ОГУ, 2004, №12. – С. 152 – 156.
8. Ананьева И.А. и др. Использование хроматографических методов анализа для контроля качества пива // Партнеры и конкуренты, 2002, №12. – С.36 – 40.
9. Басаржова Г., Яноушек Я. Значения аминокислот в технологии и качестве пива / <http://www.propivo.ru>
10. Покровская Н.Д., Каданер Я.Д. Биологическая и коллоидная стойкость пива. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 272 с.