

Исследование срока годности пива. Методы измерения параметров антиоксидантной активности пива методом ЭПР-анализ.



Введение

Сохранение качества продукта, таких как пиво, в процессе хранения определяется в первую очередь эффективностью и потенциалом содержащихся в них антиоксидантов (АО) – активных молекул, нейтрализующих активные радикалы (супероксиды) возникающие в ходе окислительно-восстановительных реакций в продукте. Перехватывая активные радикалы, антиоксиданты блокируют окислительно-восстановительные реакции на начальном этапе, не позволяя радикалам инициировать последующие каскады реакций, и не допуская лавинообразного производства радикалов. Потому свойства продукта сохраняются до тех пор, пока запас антиоксидантов не будет израсходован полностью.

Считается, что «картонный» привкус, который приобретает несвежее пиво, вызывают *свободные радикалы*, способствующие окислению различных его компонентов. Специфические запах и вкус обусловлены продуктами разложения, сопутствующими процессу образования свободных радикалов. Подобное происходит во многих пищевых продуктах, но в пиве потребитель ощущает наличие таких примесей при весьма низких их концентрациях.

Такие добавки как экстракты, консерванты, увеличивают потенциал (резерв) антиоксидантной системы в продукте, и тем самым улучшают как его потребительскую ценность, так и сроки хранения. В то же время, эти вещества существенно различаются по составу и свойствам активных составляющих, в том числе по их собственным антиоксидантным свойствам и способности влиять на антиоксидантную эффективность других компонент. Поэтому в таких пробах совокупная активность АО обычно не является простой суммой АО активностей (или концентраций) отдельных компонент, и не может быть рассчитана на основании известного состава, а должна измеряться непосредственно в конечном продукте. По мере роста объемов выпуска пива и увеличении дальности его транспортировки, возможности поддержания надлежащих условий его хранения сокращаются. Поэтому, методы измерения и контроля степени окисления пива, с целью обеспечения стабильного его уровня, становятся жизненно поскольку напрямую влияют на прибыль компании.

Для измерения устойчивости пива к окислению свободными радикалами немецкие, голландские пивоваренные компании широко используют метод ЭПР-анализа (электронный парамагнитный резонанс, называемый также ESR).

ПОЧЕМУ ЭПР-анализ?

При исследовании антиоксидантных свойств продуктов измерения проб проводят с помощью ЭПР-спектроскопии или оптической спектроскопии. Но, ЭПР-метод обеспечивает прямое детектирование концентрации радикалов тестового реагента, независимо от плотности и оптических свойств продукта, а для метода оптической спектроскопии обычно требуется предварительное разбавление проб в сотни и тысячи раз для обеспечения их оптической прозрачности.

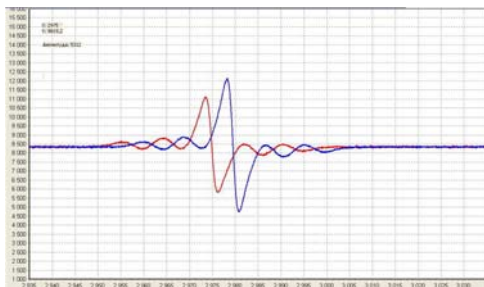
Кроме того, разбавление проб в 100-1000 раз применяется также и с целью существенного снижения концентрации исследуемых антиоксидантов и тестового реагента, что приводит к подавлению реакций второго, третьего и более высоких порядков между антиоксидантами и тестовым реагентом, и потому упрощает анализ результатов измерений.

Следует указать, что многие из известных природных антиоксидантов взаимодействуют с радикалами именно путем реакций высокого порядка, потому сильно разбавление исследуемых проб фактически "выключает" такие антиоксиданты, что приводит к некорректным результатам.

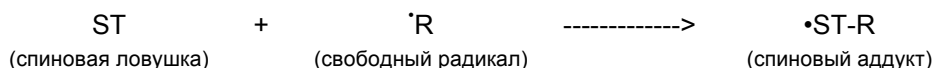
Основы теории электронного парамагнитного резонанс (ЭПР)

ЭПР представляет собой разновидность магниторезонансной спектроскопии, которая оперирует непарными «свободными» электронами. Пробы, содержащие свободные электроны, (такие как свободные радикалы) помещают в магнитное поле и подвергают воздействию СВЧ излучения постоянной частоты X-диапазона. Свободные электроны имеют слабые собственные магнитные поля, которые ориентируются строго параллельно силовым линиям магнитного поля, создаваемым магнитом спектрометра. В ходе ЭПР-процесса, поле магнита спектрометра имеет линейную развёртку. При определённой напряжённости поля, СВЧ-излучение побуждает некоторые из свободных электронов «переворачиваться», ориентируясь против магнитного поля спектрометра. В этот момент спектрометр регистрирует ЭПР-поглощение.

Метод спинового захвата

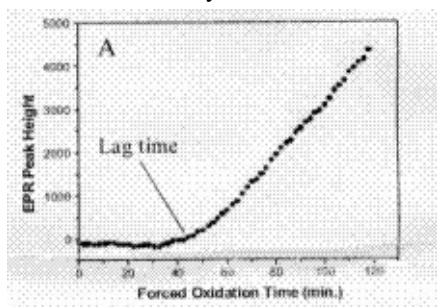


Спиновой захват – это метод, с помощью которого можно обнаруживать весьма короткоживущие свободные радикалы. Принцип заключается во введении «спиновой ловушки» в пробу (к примеру, в пиво), в которой предполагается наличие свободных радикалов. Если свободные радикалы присутствуют в исследуемой пробе, спиновая ловушка (которая сама по себе не может быть обнаружена посредством ЭПР) вступает во взаимодействие со свободным радикалом и образует стабильную химическую связь с ним. Это соединение радикала и спиновой ловушки всё ещё сохраняет свойства свободного радикала, но является значительно более стабильным, чем первоначальный свободный радикал. Такое соединение, часто именуемое «спиновый аддукт»¹ или «радикальный аддукт» обнаруживается с помощью ЭПР анализа. Общая формула химической реакции для процесса спинового захвата приведена ниже.



ЭПР-анализ выдержки

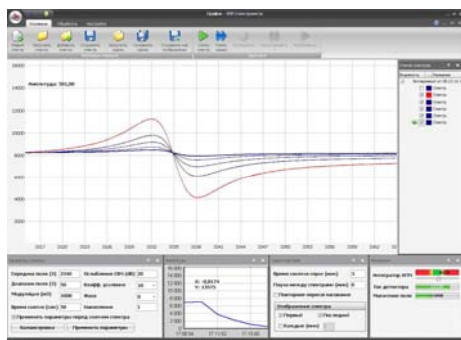
Для исследования образования свободных радикалов, в пиво добавляют вещество, являющееся спиновой ловушкой, затем нагревают до 60° С и удерживают заданную температуру непосредственно в ЭПР спектрометре с помощью системы термостабилизации образца. В результате, процесс окисления, обусловленный свободными радикалами, ускоряется и достижение степени окисления, поддающейся измерению, сокращается до относительно короткого периода (1–2 часа). При образовании свободных радикалов, они захватываются спиновыми ловушками, вследствие чего формируются спиновые аддукты. Через определённые интервалы времени снимают спектры (измеряют ЭПР спиновых аддуктов).



По окончании анализа получают временные кривые, характеризующие процесс образования свободных радикалов в пробе пива так называемой «Lag time» (выдержки). Определённо установлено, что время, измеряемое в минутах, (выдержка) до всплеска ЭПР-сигнала коррелирует с временем, измеряемым в сутках, которое требуется для обнаружения сенсорной панелью специфического «картонного» привкуса [1, 2–5].

Метод с помощью тестового реагента.

Другая категория методик – методики, в которых оценивают эффективность и потенциал антиоксидантной системы, содержащейся в исследуемом продукте, с помощью референтного тестового реагента с окислительными свойствами. К настоящему времени в многочисленных исследованиях, проведенных многими научными организациями различных стран, было установлено, что оптимальным тестовым реагентом является дифенилпикрилгидразин (ДФПГ) – коммерчески доступное соединение, которое взаимодействует с большинством известных антиоксидантов аналогично радикалам окислительно-восстановительных реакций. На основе этого реагента была определена шкала величин используемая для оценки активности и емкости антиоксидантов.



Эта методика позволяет обеспечить оценку параметров активности и потенциала интегральной (совокупной) системы антиоксидантов в пробе. При этом активность – параметр характеризующий скорость (быстроту) реакции системы антиоксидантов с радикалами, потенциал – емкость (резерв) антиоксидантной системы, показывающий какое количество радикалов способна нейтрализовать антиоксидантная система. Эти параметры позволяют непосредственно оценивать запас

¹ Другое наименование – «продукт присоединения».

антиоксидантов в продукте, оценивать их расход в процессе хранения продуктов. Тем самым возможно сравнение различных партий продуктов, качества продуктов от разных производителей, возможно оценивать влияние технологических производственных процессов на состояние системы антиоксидантов в конечном продукте, оценивать эффективность пищевых и технологических добавок.

Выводы

Как указано в нескольких статьях (*Утида и др.*) [1, 3, 5, 6] измерение так называемой «выдержки» с помощью спинового ЭПР-захвата позволяет надёжно контролировать процессы окисления в пиве и прогнозировать сохранность его вкуса. Это возможно вследствие того, что выдержка пива непосредственно связана с данными его сенсорного анализа. Также указывалось [1, 5, 6], что выдержка характеризует «эндогенную антиоксидантную активность» определённого сорта пива. Процессы, сопровождающие анализ выдержки, можно упрощённо представить следующим образом:

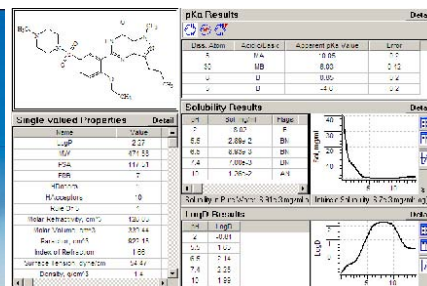
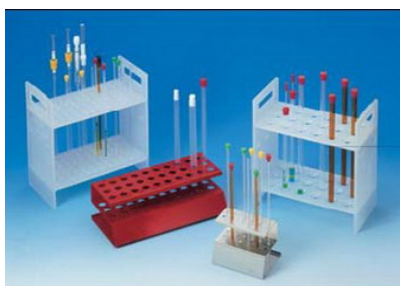
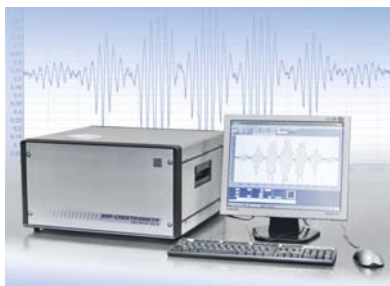
1. При нагревании пива, его окисление свободными радикалами ускоряется. Считают [7], что в данном процессе происходит накопление перекиси водорода, которая затем вступает в реакцию с такими переходными металлами, как железо или медь, присутствующими, в крайне малых концентрациях, в пиве. Это происходит, обычно, по истечении определённого срока, но значительно медленнее если пиво хранится при низкой температуре.

2. Процесс окисления представляет собой цепную реакцию, обусловленную свободными радикалами, которая инициируется лишь одной молекулой и, затем, вовлекает большое их количество. В результате образуются радикалы кислорода и углерода, реагируют с другими молекулами и весьма быстро преобразовывают их.

3. Спиновая ловушка – это лишь одна из молекул в среде, где она может вступать в реакцию со свободными радикалами. В то же время, оказывается, что другие компоненты пива (так называемые «эндогенные антиоксиданты») действуют благоприятно. Таким образом, можно сказать, что «эндогенные антиоксиданты», присутствующие в пиве, «подавляют» образование свободных радикалов в течение его выдержки. При истощении этих антиоксидантов, наблюдается явный спад ЭПР-сигнала, вызванный захватом свободных радикалов спиновой ловушкой. Чем длиннее выдержка, тем выше «эндогенная антиоксидантная активность» и, соответственно, срок годности пива.

Сведения о выдержке крайне важны для пивоваренного производства. Они используются не только для контроля качества пива при розливе, но и как инструмент исследования, направленного на улучшение его сохранности. Можно смоделировать несколько вариантов изменений технологического процесса пивоваренного производства. ЭПР-метод позволит оперативно оценить эффективность таких изменений. В конечном счете, применение ЭПР-контроля антиоксидантных свойств продуктов питания позволит оптимизировать технологию производства и улучшить качество производимой продукции.

Ранее основной проблемой затруднявшей использование ЭПР метода являлось громоздкость оборудования, сложность работы с ним и конечно же цена. Производственные лаборатории нуждались в недорогом компактном приборе, выполняющим рутинные функции автоматически. ЭПР спектрометр ESR 70-03 XD/2 именно такой спектрометр который отвечает этим задачам. Это компактный моноблочный прибор, который можно разместить на любом столе лаборатории. Настройки на исследуемый образец в приборе выполняются автоматически. Встроенная система термостабилизации образца, облегчает использование спектрометра в качестве анализатора антиоксидантных свойств пива. Специализированное программное обеспечение облегчит процесс обработки полученных данных и формирование отчета.



www.epr-spectrometer.ru

Литература

1. Uchida M., Ono M. Журнал Американского общества химиков пивоваренного производства. (*The Journal of the American Society of Brewing Chemists*). 1996. № 54. с. 198–204. *на англ. яз.*
2. Anersen M.L., Skibstead L.F.. Журнал по агрохимии и химии пищевых продуктов. (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*). 1998. № 46. с. 1272–1275. *на англ. яз.*
3. Takaoka S., Kondo H., Uchida M., Kawasaki U. Ежеквартальное техническое издание Ассоциации американских пивоваров. (*Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*). 1998. № 35. с. 157–161. *на англ. яз.*
4. Forster K., Schweiger J., Harziss L., Bak U., Uchida M., Ono M. Ежемесячный журнал по пивоваренной промышленности. (*Monatsschrift Fuer Brauwirtschaft*). 1999. № 5/6. с. 86-93. *на нем. яз.*
5. Uchida M., Ono M. Журнал Американского общества химиков пивоваренного производства. 2000. № 58. с. 8–13. *на англ. яз.*
6. Uchida M., Ono M. Журнал Американского общества химиков пивоваренного производства. 2000. № 58. с. 30–37. *на англ. яз.*
7. Uchida M., Ono M. Журнал Американского общества химиков пивоваренного производства. 1999. № 57. с. 145–150. *на англ. яз.*