

SLEDOVÁNÍ AKRYLAMIDU V PRŮBĚHU SLADOVÁNÍ A V PIVU

MONITORING OF ACRYLAMIDE IN THE COURSE OF MALTING AND IN BEER

RENATA MIKULÍKOVÁ, ZDENĚK SVOBODA, SYLVA BĚLÁKOVÁ, SIMONA MACUCHOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno / *RIBM Plc, Malting Institute, Mostecká 7, CZ-614 00 Brno*; e-mail: mikulikova@brno.beerresearch.cz

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S. – Macuchová, S.: Sledování akrylamidu v průběhu sladování a v pivu. Kvasny Prum. 54, 2008, č. 6, s. 181–185.

Akrylamid v potravinách vzniká v průběhu Maillardovy reakce a jeho prekurzory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. Reakční mechanismus vzniku akrylamidu v potravinách závisí na složení potravin a na podmínkách zpracování.

Akrylamid vzniká ve významném množství tepelnou úpravou potravin nad 120 °C, maximum akrylamidu vzniká při 150–180 °C. Při vyšších teplotách je vznik akrylamidu podstatně nižší, protože eliminační reakce je rychlejší než reakce vzniku akrylamidu.

Surovinou pro výrobu sladu je ječmen, rostlina s obsahem dusíkatých sloučenin a s vysokým obsahem škrobu. V průběhu sladování se ve sladu působením enzymů zvyšuje obsah redukujících cukrů, během hvozdnění dochází vlivem teploty k biochemickým změnám a vznikají melanoidinové látky. Tyto podmínky jsou velmi výhodné pro tvorbu akrylamidu. Změny hladin akrylamidu byly sledovány ve sladu a následně ve vyrobeném pivu.

Obsah akrylamidu se v závislosti na typu sladu pohyboval v rozmezí 0,2–3,0 mg.kg⁻¹ a bylo potvrzeno teplotní maximum jeho vzniku (160–170 °C). Přes jeho poměrně vysoký obsah ve sladu nebyl akrylamid detekován v žádném z analyzovaných vzorků piva.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S. – Macuchová, S.: Monitoring of acrylamide in the course of malting and in beer. Kvasny Prum. 54, 2008, No. 6, p. 181–185.

Acrylamide in food is produced in the course of Maillard's reaction and its precursors are reducing saccharides and amino acid asparagin. Reaction mechanism of the acrylamide formation in food depends on food composition and processing conditions.

Acrylamide is formed in a significant quantity by heat treatment of food above 120 °C, the highest quantity of acrylamide is created at 150–180 °C. At higher temperatures acrylamide creation is substantially lower as the elimination reaction is faster than that producing acrylamide.

Raw material for malt production is barley, a plant with content of nitrogen compounds and high content of starch. During malting enzymes increase the content of reducing saccharides in malt, during kilning biochemical changes are induced by temperature, and melanoid substances originate. These conditions are favorable for acrylamide creation.

Changes of acrylamide levels were followed in malt and subsequently in the produced beer.

Acrylamide content varied depending on the type of the malt in the scope of 0.2–3.0 mg.kg⁻¹ and thermal maximum of its origin (160–170 °C) was confirmed. Despite its relatively high content in malt (from 0.2 to 3.0 mg.kg⁻¹), no acrylamide was detected in any of the analyzed samples of beer.

Mikulíková, R. – Svoboda, Z. – Běláková, S. – Macuchová, S.: Die Akrylamidverfolgung während des Malzbereitungsprozesses und im Bier. Kvasny Prum. 54, 2008, Nr. 6, S. 181–185.

In den Lebensmitteln entsteht das Akrylamid während der Maillardreaktion und seine Prekursoren sind die reduzierende Kohlenhydrate und die Aminosäure Asparagin. Der Reaktionsmechanismus der Akrylamidherausbildung hängt von der Lebensmittelzusammensetzung und von Verarbeitungsbedingungen ab. Das Akrylamid entsteht in einer bedeutenden Menge unter termischer Verarbeitung im Temperaturbereich über 120 °C, die maximale Herausbildung ist bei den Temperaturen 150–180 °C. Unter Anwendung von höheren Temperaturen ist die Akrylamidherausbildung schon wesentlich niedriger, weil die Eliminationsreaktion ist schneller als die Herausbildungsreaktion. Der Rohstoff für eine Malzproduktion ist die Gerste, eine Pflanze mit einem hohen Stärkegehalt und reich an die Stickstoffverbindungen. Während der Keimung im Malzprozess nimmt der Gehalt an die reduzierende Kohlenhydrate unter Enzymenwirkung zu, weil während des Darrens unter dem Einfluss der hohen Temperatur finden die biochemische Veränderungen statt und entstehen die Melanoidinstoffen. Diese Bedingungen sind für eine Akrylamidherausbildung sehr verteilhaft. Weiterhin wurden die Akrylamidwerte im Malz und danach auch im Bier verfolgt.

Der Akrylamidgehalt lag in der Abhängigkeit an der Malzsorte im Bereich 0,2–3,0 mg.kg⁻¹, weiterhin wurde der Temperaturhöchstwert (160 °C bis 170 °C) für seine Entstehung bestätigt. Trotz dem verhältnismäßig hohen Akrylamidgehalt im Malz wurde kein Akrylamid in den danach hergestellten Bieren entdeckt.

Микуликова, Р. – Свобода, З. – Велакова, С. – Мацухова, С.: Наблюдение акриламида в периоде солодоращения и в пиве. Kvasny Prum. 54, 2008, No. 6, стр. 181–185.

Акриламид в пищевых продуктах образуется в ходе реакции Маилларда и его прекурсорами являются редуцирующие сахара и аминокислота аспарагин. Механизм образования акриламида в пищевых продуктах зависит от состава продуктов и от условий обработки. Акриламид образуется в значительном количестве тепловой обработкой продуктов над 120 °C, максимальное количество образуется при 150–180 °C. При высшей температуре реакция исключений является более быстрой чем реакция образования акриламида.

Сырьем для производства солода скаывается ячмень, растение содержащее азотистые соединения и много крахмала. В периоде солодоращения в солоде воздействием ферментов повышается содержание редуцирующих сахаров, в периоде сушки происходят воздействием температуры биохимические перемены и образуются меланоидные вещества. Эти условия являются очень благоприятными для образования акриламида. Изменения уровней акриламида наблюдались в солоде и впоследствии в изготвленном пиве.

Содержание акриламида в зависимости от типа солода колебалось в пределах от 0,2 до 3,0 mg.kg⁻¹ и был подтвержден температурный максимум его образования (160–170 °C). Вопреки относительно высокому содержанию в солоде акриламид не был определен в анализированных пробах пива.

Klíčová slova: akrylamid, GC/MSD, slad, pivo

Keywords: acrylamide, GC/MSD, malt, beer

1 ÚVOD

V dubnu 2002 zveřejnil Švédský národní úřad (NFA – National Food Administration) spolu se stockholmskou univerzitou nález akrylamidu, neurotoxicke a potenciálně karcinogenní látky, v potravinách zpracovávaných při teplotách nad 120 °C [1–3]. Zejména vysoký obsah akrylamidu byl nalezen v potravinách s vysokým obsahem škrobu, jako jsou potraviny z brambor a obilí [4].

Akrylamid (*obr. 1*) je bílá krystalická látka, bez barvy a zápachu [1], teplota tání je 84,5 °C, bod varu 125 °C. Je dobře rozpustný ve

1 INTRODUCTION

In April 2002 the Swedish National Food Administration together with Stockholm University published the finding of acrylamide, neurotoxic and potentially carcinogenic substance, in food processed at the temperatures over 120 °C [1–3]. High acrylamide content was found especially in food with high starch content, such as food from potatoes and cereals [4].

Acrylamide (*Fig. 1*) is a white crystalline substance, colorless and odourless [1], with melting temperature 84.5 °C and boiling point

vodě (2155 g.l⁻¹ při 30 °C), methanolu (1550 g.l⁻¹ při 30 °C), ethylacetátu (126 g.l⁻¹ při 30 °C), nerozpustný je v heptanu a benzen. Pevný akrylamid je stabilní při laboratorní teplotě, ale může polymerizovat při zahřívání nebo při oxidačním působení.

Akrylamid v potravinách vzniká v průběhu Maillardovy reakce a jeho prekurzory jsou redukující cukry a aminokyselina asparagin. Reakční mechanismus vzniku akrylamidu v potravinách závisí na složení potravin a na podmínkách zpracování [5].

Za hlavní mechanismus vzniku akrylamidu jsou považovány reakce mezi volnou geneticky kódovanou neesenciální aminokyselinou asparaginem a redukujícími cukry při teplotách nad 120 °C, kdy vzniká celá řada velmi reaktivních karbonylových sloučenin [5, 6] (obr. 2).

Rozeznávají se tři fáze reakcí [7, 8]:

- Počáteční fáze zahrnuje tvorbu glykosylaminu, následovanou Amadoriho přesmykem.
- Ve střední fázi dochází k dehydrataci a fragmentaci sacharidů doprovázející Streckerovu degradaci aminokyselin.
- V závěrečné fázi prochází Streckerův aldehyd dalšími redukčními a dehydratačními reakcemi za vzniku akrylamidu.

Vedle těchto možností bylo na modelových systémech prokázáno, že za určitých podmínek se na tvorbě akrylamidu podílí i akrolein a kyselina akrylová po reakci s asparaginem v potravinách bohatých na lipidy [8].

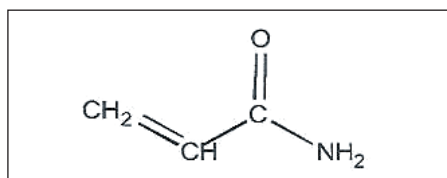
Při zkoumání modelového systému směsi glukosy a asparaginu byl zjištěn vliv teploty a také doby zahřívání. Tvorba akrylamidu byla nízká v teplotním rozsahu 120–140 °C, pokud se zvýšila na 160–180 °C, obsah akrylamidu se v matrici dramaticky zvýšil. Po dosažení teploty 180 °C dochází k následnému poklesu tvorby akrylamidu. Pokles tvorby akrylamidu při vyšších teplotách lze vysvětlit tím, že akrylamid jako meziprodukt Maillardovy reakce dále reaguje za vzniku jiných sloučenin [9].

Surovinou pro výrobu sladu je ječmen, rostlina s obsahem dusíkatých sloučenin a s vysokým obsahem škrobu. V průběhu sladování se v ječmeni působením enzymů zvyšuje obsah redukujících cukrů, během hvozdnění dochází vlivem teploty k biochemickým změnám a vznikají melanoidinové látky. Tyto podmínky jsou velmi výhodné pro tvorbu akrylamidu [10].

Nejvíce používanými metodami pro stanovení akrylamidu jsou [11]:

- vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Před analýzou akrylamidu metodou GC/MS byly vzorky sladu derivatizovány bromací [12, 13]. Výhodou bromace akrylamidu je, že produktem je více těkává a méně polární sloučenina s lepšími hmotnostními charakteristikami. Výsledný derivát je snáze extrahován z vodných roztoků a může být lépe detekován GC/MS metodou. Konverze akrylamidu na 2,3-dibrompropionamid byla provedena přidáním bezvodého bromidu draselného, kyseliny bromovodíkové a nasyceným roztokem bromové vody. Přidáním triethylaminu byl nestabilní 2,3-dibrompropionamid převeden na stabilnější derivát 2-brompropenamid [13].



Obr. 1 / Figure 1 Strukturní vzorec akrylamidu (C₃H₅NO, CAS 79-06-1) / Structural formula of acrylamide (C₃H₅NO, CAS 79-06-1)

125 °C. It dissolves readily in water (2155 g.l⁻¹ at 30 °C), methanol (1550 g.l⁻¹ at 30 °C), ethylacetate (126 g.l⁻¹ at 30 °C), it is insoluble in heptane and benzene. Solid acrylamide is stable at the laboratory temperature but it can polymerize upon heating or oxidation acting.

Acrylamide in food originates in the course of Maillard's reaction and its precursors are reducing sugars and amino acid asparagine. Reaction mechanisms of acrylamide formation in food depends on food composition and processing conditions [5].

Reactions between free genetically coded nonessential amino acid asparagine and reducing sugars at temperatures above 120 °C are considered a main mechanism of acrylamide formation, a number of very reactive carbonyl compounds originates [5, 6] (Fig. 2).

There are three phases of reactions [7, 8]:

- initial phase includes glycosylamine, followed by Amadori rearrangement
- In the middle phase, dehydration and fragmentation of saccharides accompanying Strecker degradation of amino acids occur.
- In the final phase, Strecker aldehyde undergoes further reduction and dehydration reactions and acrylamide is created.

Besides this, model systems proved that under certain conditions also acrolein and acryl acid participate in acrylamide formation after reaction with asparagine in food rich in lipids [8]. Research on the model system of the mixture of glucose and asparagine showed the effect of temperature and time of heating. Acrylamide formation was low within the temperature range of 120–140 °C; if increased to 160–180 °C the acrylamide content in matrix increased dramatically. After reaching the temperature of 180 °C acrylamide production subsequently declines. The decline in acrylamide formation at higher temperatures can be explained by the fact that acrylamide as an intermediate product of Maillard's reaction further reacts and other compounds originate [9].

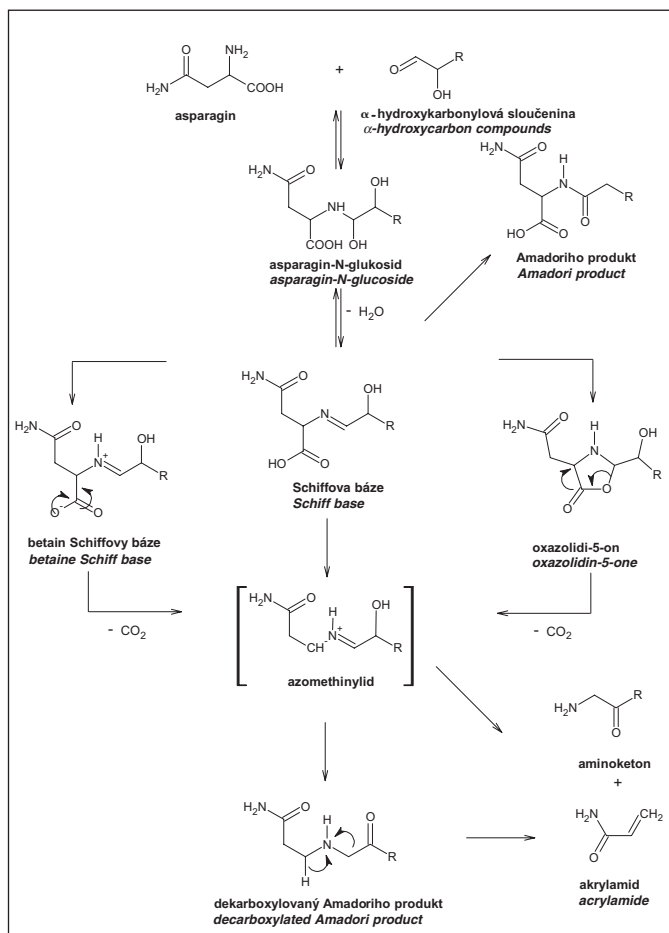
Raw material for production of malt is barley, a plant with content of nitrogenous substances and high starch content. In the course of malting, activity of enzymes increases content of reducing sugars in malt, during kilning biochemical changes are induced by temperature and melanoidin substances originate. These conditions are favorable for acrylamide formation [10].

The most frequently methods used for acrylamide determination are [11]:

- High-performance liquid chromatography with mass spectrometry
- Gas chromatography with mass spectrometry.

Before the analysis of acrylamide with the GC-MS method, the malt samples were derivatized by bromination [12–13].

The advantage of acrylamide bromination is that the product is a more volatile and less polar compound with better mass characteristics. The resulting derivative is readily extracted from aqueous solutions and it can be better detected with the GC-MS method. Conversion of acrylamide to 2,3-dibromopropionamide is usually performed by addition of anhydrous potassium bromide, hydrobromic acid and saturated solution of bromine water. By adding triethylamine, unstable 2,3-dibromopropionamide was converted to more stable derivative 2-bromopropenamid [13].



Obr. 2 / Figure 2 Mechanismus tvorby akrylamidu z asparaginu v přítomnosti α -hydroxykarbonylových sloučenin [1] / Mechanism of acrylamide formation from asparagine in the presence of α -hydroxycarbonyl compounds [1]

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Standardy a chemikálie

Standardy: akrylamid (1 mg.ml⁻¹) v methanolu (Absolute Standards, USA), (¹³C₃) akrylamid (1 mg.ml⁻¹) v methanolu (Cambridge Isotope Laboratories, USA), 2,3-dibromopropionamid (1 mg.ml⁻¹) v methanolu (Absolute Standards, USA).

Chemikálie: bróm, bromid draselný, kyselina bromovodíková, thio-síran sodný a triethylamin (Merck, Německo).

Rozpouštědla: methanol, ethylacetát v čistotě pro HPLC (Chromservis, s. r. o., Česká republika).

2.2 Vzorky sladu

Vzorky sladu pro analýzu akrylamidu byly odebírány v průběhu sladování (hvozdění). První vzorek byl odebrán při 60 °C a poslední při 210 °C. Teplotní interval při odebírání sladovaných vzorků byl 10 °C. Dále byly analyzovány vzorky speciálních a barevných sladů (tab. 1).

2.3 Vzorky piva

Vzorky piv pro analýzu akrylamidu byly zakoupeny v obchodní síti. Bylo analyzováno 17 vzorků světlého výčepního piva, 10 vzorků ležáků a 12 vzorků tmavého piva.

2.4 Příprava pevných vzorků

K pomletému vzorku sladu (5 g) bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (akrylamid – ¹³C₃) a 50 ml destilované vody o teplotě 60 °C. Po dvacetiminutové sonifikaci v ultrazvukové lázni byl homogenát kvantitativně převeden do centrifugačních zkumavek a odstředován při 8000 min⁻¹ po dobu 30 minut. K 5 ml supernatantu byly přidány 2 g bromidu draselného a kyselina bromovodíková (výsledné pH 0–1). Po vychlazení byly přidány 2 ml bromové vody. Obsah v baňce byl promíchán a baňka umístěna do nádoby s ledovou drtinou na 10 hodin do lednice. Po ukončení bromace byl přebytečný brom titrován thio-síranem sodným (1 M roztok) do odbarvení. Obsah baněk byl převeden do teflonových centrifugačních zkumavek, do každé zkumavky bylo přidáno 5 ml ethylacetátu a suspenze byla protřepána. Poté byl obsah zkumavek odstředěn při 5000 min⁻¹ po dobu 5 minut. Po odstředění byl z organické fáze odpipetován 1 ml do plastové mikroz-kumavky a přidán triethylamin (0,2 ml). Mikroz-kumavky byly protřepány a po 15 minutách odstředěny při 5000 min⁻¹ po dobu 5 minut. Po odstředění byl obsah zkumavek převeden do skleněných vialek a analyzován na GC/MS.

2.5 Příprava vzorků piva

K 50 ml odpěněného piva (20 minut sonifikace na ultrazvukové lázni) bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (akrylamid – ¹³C₃). Z takto upraveného piva bylo odebráno 5 ml, ke kterým byly přidány 2 g bromidu draselného a kyselina bromovodíková (výsledné pH 0–1). Po vychlazení bylo dále postupováno jako u analýzy pevného vzorku.

2.6 Instrumentace a chromatografické stanovení

Pro stanovení obsahu bromoderivátů akrylamidu ve vzorcích sladu a piva byl použit plynový chromatograf Trace GC Ultra Finnigan, kombinovaný s hmotnostním detektorem Trace DSQ Thermo Finnigan. Separace byla provedena na kapilární koloně DB – WAX (délka kolony 30 m x 0,25 mm vnitřní průměr, tloušťka filmu 0,25 µm; J&W Scientific, USA), kolona udržována při 50 °C (1 min), poté teplotní program 15 °C.min⁻¹ do 150 °C (5 min). Teplota PTV (teplotně programovatelný injektor) 200 °C – Splitless mód (1 min). Teplota transfer line byla 200 °C. Hmotnostně selektivní detektor pracoval v SIM módu, s pozitivní elektron iontací (EI) ionizací. Použitý nosný plyn: helium s průtokem 1,5 ml.min⁻¹. V těchto podmínkách byl retenční čas akrylamidu a (¹³C₃) akrylamid derivátů 16,34 min.

Identifikace 2-brompropenamidu byla provedena na základě retenčního času a pro 2-brompropenamid specifických iontů *m/z* 149 a 151, kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky. Pro spolehlivost výsledků a dosažení maximální selektivnosti byl použit jako vnitřní standard izotopicky značený akrylamid (1,2,3-¹³C₃), *m/z* 152 a 154.

Tab. 1 Přehled analyzovaných vzorků speciálních a barevných sladů / Survey of the analyzed samples of special and colored malts

Druh sladu / Kind of malt	
Světý slad / Pale malt	Plzeňský / Pilsener Mnichovský / Munich
Speciální slad / Special malt	Kouřový / Smoked Melanoidinový / Melanoidin
Karamelový slad / Caramel Malt	CARAPILS® CARAHELL® CARARED® CARAAMBER® CARAMUNICH® CARAAROMA®
Pražený slad / Roasted malt	CARAFAP® CAAFAP®SPECIAL
Pšeničný slad / Wheat malt	Pšeničný – světlý/ Wheat – pale Pšeničný-tmavý / Wheat – dark CARA – WHEAT Pšeničný-pražený / Wheat – roasted
Žitný slad / Rye malt	Žitný-světlý / Rye – pale Žitný-karamelový / Rye – caramel Žitný-pražený / Rye – roasted

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Standards and Chemicals

Standards: acrylamide (1 mg.ml⁻¹) in methanol (Absolute Standards, USA), (¹³C₃) acrylamide (1 mg.ml⁻¹) in methanol (Cambridge Isotope Laboratories, USA), 2,3-dibromopropionamide (1 mg.ml⁻¹) in methanol (Absolute Standards, USA).

Chemicals: bromine, potassium bromide, hydrobromic acid, sodium thiosulphate and triethylamine were all obtained from Merck (Germany).

Dissolvents: methanol, ethylacetate in purity for HPLC (Chromservis s.r.o., Czech Republic).

2.2 Samples of malt

Samples of barley malt for the analysis of acrylamide were taken in the course of malting (kilning). The first sample was taken at 60 °C and the last one at 210 °C. Thermal interval of sampling was 10 °C. In addition, samples of special and colored malts were taken (Tab. 1).

2.3 Samples of beer

Samples of beers for the analysis of acrylamide were bought in retail stores. 17 samples of pale dispensed beer, 10 samples of lager beer and 12 samples of dark beer were analyzed.

2.4 Preparation of solid samples

10 µl of internal standard (¹³C₃ acrylamide) and 50 ml of distilled water 60 °C were added to the sample of ground malt (5 g). After sonification (20 min) in ultrasonic bath the homogenate was transferred quantitatively into centrifugal tubes and centrifuged at 8000 rpm for 30 minutes. Two grams of potassium bromide and hydrobromic acid (resulting pH 0–1) were added to 5 ml of supernatant. After cooling, 2 ml of bromine water was added. Content in the flask was stirred and the flask was placed in a container with crushed ice for 10 hours into the refrigerator. After bromination the excess bromine was titrated with sodium thiosulphate (1 M solution) to discoloration. Content of the flasks was transferred to teflon centrifugal tubes, 5 ml of ethylacetate was added to each tube and the suspension was shaken. Afterwards the content of tubes was centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. After centrifugation, 1 ml of organic phase was delivered with a pipette to a plastic microtube and triethylamine (0.2 ml) was added. Microtubes were shaken and after 15 minutes centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. After centrifugation the tube content was delivered to glass vials and analyzed on GC/MSD.

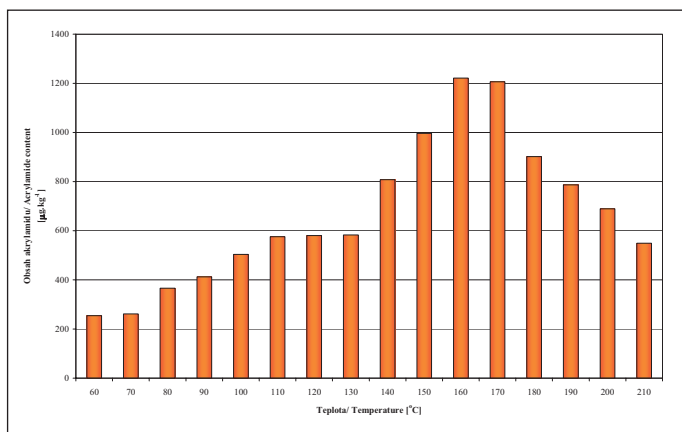
2.5 Preparation of liquid samples or preparation of beer samples

Ten µl of the inner standard (acrylamide – ¹³C₃) were added to 50 ml of defoamed beer (20 min of sonification in an ultrasonic bath). Two grams of potassium bromide and hydrobromic acid (resulting pH 0–1) were added to 5 ml of the treated beer. After cooling, the procedure was the same as in the analysis of the solid sample

2.6 Instrumentation and chromatographic determination

Gas chromatograph Trace GC Ultra Finnigan with the mass detector Trace DSQ Thermo Finnigan was used for the assessment of bromine derivate in malt and beer samples. Separation was carried out on the column was a DB – WAX capillary column (30m x 0.25mm i.d., 0.25 µm film thickness; J&W Scientific, USA), the column was held at 50 °C (1 min), then programmed at 15 °C.min⁻¹ to 150 °C (5 min). The temperature of the PTV (Programmable Temperature Vaporizing) injector was 200 °C – Splitless mode (1 min). Transfer line temperature was 200 °C. Mass selective detector operated in selected ion monitoring (SIM) mode with positive electron impact (EI) ionization. The carrier gas used: helium with a flow 1.5 ml.min⁻¹. Under these conditions, the retention time of acrylamide and (¹³C₃) acrylamide derivatives was 16.34 min.

Identification of 2-brompropenamide was conducted on the basis of retention time and for 2-brompropenamide specific ions *m/z* 149 and 151, quantification was performed using a calibration curve. To attain reliable results and maximum selectivity, isotopically marked acrylamide (1,2,3-¹³C₃) /*m/z* 152,154 was used as an internal standard.



Obr. 3 / Figure 3 Závislost tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění / Dependence of acrylamide formation on kilning temperatures

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 30–620 µg.kg⁻¹ (koncentrace akrylamidu v reálném vzorku) s korelačním koeficientem 0,9989, mez stanovení 25 µg.kg⁻¹. Výtěžnost vzorků obohacených izotopicky značeným (¹³C₃) akrylamidem se pohybovala v rozmezí 72–86 %.

Výsledky závislosti tvorby akrylamidu na teplotě hvozdění ukazuje obr. 3. V průběhu hvozdění dochází k tvorbě akrylamidu již od 60 °C. Vysvětlením vzniku akrylamidu při teplotách od 60 do 110 °C je dlouhodobé působení teplot nad 60 °C. Slad se předsuší až 10 hodin při teplotách od 55–65 °C, poté následuje vyhřátí na dotahovací teplotu, která je pro daný slad specifická (80–225 °C), trvající od 1,5 h do 2,5 h. Maximální tvorba akrylamidu byla zjištěna v teplotním intervalu 150–170 °C. Pak následuje pokles tvorby akrylamidu. Snížení tvorby akrylamidu při vyšších teplotách lze zdůvodnit tím, že akrylamid jako meziprodukt Maillardovy reakce dále reaguje za vzniku dalších sloučenin reakcí neenzymatického hnědnutí [7, 8].

Obsah akrylamidu u speciálních a barevných sladů znázorňuje obr. 4. Tvorbu akrylamidu v barevných a speciálních sladech, které se typicky připravují pražením sušeného sladu, je možné srovnávat s procesem pražení kávy [14]. U světlých sladů se obsah akrylamidu pohyboval v rozmezí hodnot 630–660 µg.kg⁻¹. Obsah akrylamidu ve speciálním melanoidinovém sladu byl 2210 µg.kg⁻¹. Melanoidinový slad má stejný obsah akrylamidu jako slad odebraný v průběhu hvozdění při 130 °C.

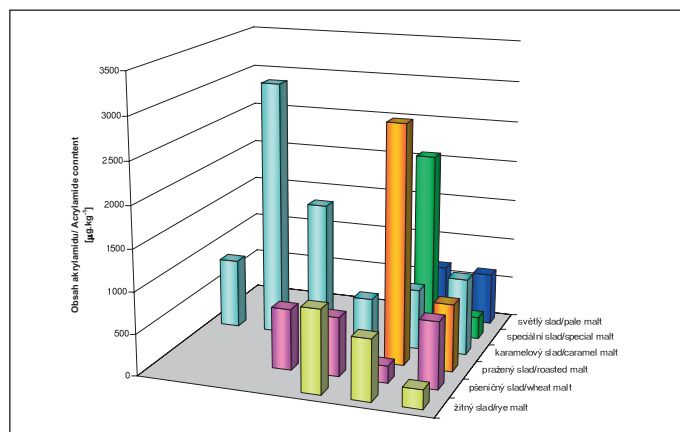
Tento vysoký obsah akrylamidu odpovídá podmínkám přípravy melanoidinového sladu, kdy je podporován vznik sloučenin Maillardovy reakce v průběhu hvozdění. Žitný slad má nižší hodnoty akrylamidu v karamelovém i praženém sladu, než ječné slady připravované při stejných teplotách. Nižší obsah akrylamidu je způsoben jiným obsahem asparaginu a redukcujících cukrů v rozluštěném žitném sladu. Stejným způsobem lze vysvětlit nižší obsah akrylamidu v pšeničných sladech.

V praženém ječném sladu je nejvyšší obsah akrylamidu u sladu CARAFA® SPECIAL. Nejvyšší obsah akrylamidu ze všech analyzovaných sladů byl zjištěn u sladu typu CARAMÜNICH (3084,15 µg.kg⁻¹). Tato vysoká hodnota akrylamidu odpovídá způsobu výroby karamelového sladu (teplota hvozdění 150–170 °C) a je v souladu se zjištěnou teplotní závislostí tvorby akrylamidu v průběhu hvozdění.

Přes vysoký obsah akrylamidu ve sladech byl u všech analyzovaných vzorků piva jeho obsah pod mezí stanovitelnosti (< 25 µg.l⁻¹). Tato skutečnost zřejmě souvisí s procesem výroby piva, kdy na výstírku se použije 2–4 hl vody na 100 kg sypaní.

4 ZÁVĚR

Analýzy sladu prokázaly závislost obsahu akrylamidu na teplotě hvozdění. Se zvyšující se teplotou hvozdění narůstal obsah akrylamidu ve sladu až do teploty 180 °C. Při ještě vyšších teplotách obsah akrylamidu klesá, což je způsobeno vstupem akrylamidu do dalších reakcí neenzymatického hnědnutí. Vyšší obsahy akrylamidu byly zjištěny ve speciálních a barevných sladech, což souvisí s vyšší teplotou hvozdění při jejich výrobě. Obsah akrylamidu v analyzovaných vzorcích piva byl pod mezí detekce použité GC/MS metody (< 25 µg.l⁻¹).



Obr. 4 / Figure 4 Obsah akrylamidu ve speciálních sladech / Acrylamide content in special malts

3 RESULTS AND DISCUSSION

Calibration curve was linear in the range from 30 to 620 µg.kg⁻¹ (acrylamide concentration in a real sample) with the correlation coefficient of 0.9985, Limit of Quantification (LOQ) was 25 µg.kg⁻¹. Recovery of samples enriched with marked (¹³C₃) acrylamide varied within the range from 72–86 %.

Fig. 3 shows the results of the dependence of acrylamide formation on kilning temperature. During kilning acrylamide is already created from 60 °C. Formation of acrylamide at temperatures from 60 to 100 °C can be explained by a long-term effect of temperatures above 60 °C for. Malt is pre-dried for even 10 hours at temperatures of 55–65 °C, then malt is kilned at temperatures for the given type of malt (to 225 °C) lasting from 90 minutes to 2.5 hours follows. Maximum acrylamide formation was detected in the thermal interval 150–170 °C. Then decline in acrylamide formation follows. Decline in acrylamide formation with higher temperatures can be explained by the fact that acrylamide as an intermediate product of Maillard's reaction further reacts and this reaction of non-enzymatic browning produces other compounds [7-8].

Fig. 4 shows acrylamide content in special and colored malts.

Formation of acrylamide in colored and special malts which are typically prepared by roasting kilned malt, can be compared to the coffee roasting process [14]. In pale malts acrylamide content moved in the range of 630–660 µg.kg⁻¹. Acrylamide content in special Melanoidin malt was 2210 µg.kg⁻¹. Melanoidin malt has the same acrylamide content as the malt sampled in the course of kilning at 130 °C.

This high content of acrylamide corresponds to the Melanoidin malt preparation conditions that support creation of compounds of Maillard's reaction in the course of kilning. Rye malts have lower acrylamide values in caramel and roasted malts compared to barley malts prepared at the same temperatures. Lower acrylamide content is caused by different contents of asparagines and reducing sugars in modified rye malt. Similarly, lower acrylamide content in wheat malts can be explained.

In roasted barley malts, the highest acrylamide content is in the malt CARAFA® SPECIAL. The highest acrylamide content of all the malts analyzed was detected in malt of the type CARAMÜNICH (3084.15 µg.kg⁻¹). This high value of acrylamide corresponds to the method of caramel malt production (kilning temperature 150–170 °C) and is in compliance with the found thermal dependence of acrylamide formation during kilning.

Despite high acrylamide level in malts, its content in all the analyzed samples of beers was under the LOQ (< 25 µg.l⁻¹). This fact is apparently connected with the process of beer production, when for mashing 2–4 hl of water per 100 kg of grist is used.

4 CONCLUSION

Malt analyses proved the dependence of acrylamide content on the kilning temperatures. With the increasing temperature of kilning, the acrylamide content in malt increased to the temperature of 180 °C. With temperatures above 180 °C the acrylamide content declines, this is caused by the involvement of acrylamide into further reactions of non-enzymatic browning.

Higher acrylamide contents were found in special and colored

Poděkování

Výsledky uvedené v této práci byly získány v rámci projektu Výzkumného záměru MSM 6019369701.

Lektorovali Ing. Jiří Šusta, Sladovna Bernard, a. s.
a Mgr. Vilém Reinöhl, CSc., MZLU Brno
Do redakce došlo 5. 5. 2008

malts. This fact is connected with higher temperatures of kilning during production of these malts. Acrylamide content in the analyzed samples of beer was under the limit of detection of the GC/MS method used ($< 25 \mu\text{g.l}^{-1}$).

Acknowledgements

The results presented in this study were acquired in the framework of the Research Plan of MSM 6019369701.

Translated by Vladimíra Nováková

Literatura / Literature

1. Ciesarová, Z.: Minimalizace obsahu akrylamidu v potravinách. Chem. Listy **99**, 2005, 483–491.
2. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M.: Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. J. Agric. Food Chem. **50**, 2002, 4998.
3. Tyl, R. W. M., Frieman, A., Losco, P. E., Fischer, L. C., Johnson, K. A., Strother, D. E., Wolf, C. H.: Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. Reproductive Toxicology **14**, 2000, 385–401.
4. Murkovic, M.: Acrylamide in Austrian foods. J. Biochem. Biophys. Methods **61**, 2004, 161–167.
5. Wicklund, T., Østlie, H., Lothe, O., Knutsen, S. H., Brithen, E., Kita, A.: Acrylamide in potato crisp – The effect of raw material and processing. LWT **39**, 2006, 571–575.
6. Nielsen, N. J., Granby, K., Hedegaard, R. V., Skibsted, L. H.: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagines and reducing sugars in bread. Anal. Chim. Acta **557**, 2006, 211–220.
7. Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T.: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature **419**, 2002, 448.
8. Sradler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., Riediker, S.: Acrylamide from Maillard reaction products. Nature **419**, 2002, 449–450.
9. Brithen, E., Knutsen, S. H.: An effect of temperature time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. Food Chem. **92**, 2005, 693–700.
10. Coghe, S., Adrianssensens, B., Delvaux, F. R.: Fractionation of Colored Maillard Reaction Products from Dark Specialty Malts. J. Am. Soc. Brew. Hem. **62**, 2004, 79–86.
11. Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, Y.: Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. J. Chromatogr. A **1075**, 2005, 1–21.
12. Castle, L.: Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. J. Agric. Food Chem. **41**, 1993, 1261–1263.
13. Pittet, A., Perisset, A., Oberson, J. M.: Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A **1035**, 2004, 123–130.
14. Gökmen, V., Senyuva, H. Z.: Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. Food Chem. **99**, 2006, 238–243.



NABÍZÍ:

DODÁVKY LABORATORNÍ PŘÍSTROJOVÉ TECHNIKY VČETNĚ ZAŠKOLENÍ:

- vzorkovače sloupové a do potrubí, vzorkovací pomůcky, teploměry, ...
- šrotovníky, prosévadla, míchačky, třepačky, ...
- obilní vlhkoměry pro obch. styk a provozní (vlhkost, teplota, objem, hmotnost)
- NIR analyzátoři (vlhkost, NL, lepek, škrob, Zelený, tuk, ...)
- přístroje na analýzy rozhodčími metodami – extrakce tuků, Kjeldahl, vláknina, ...

SERVIS:

- záruční a pozáruční na všechny firmou prodávané přístroje
- technický včetně speciálních kalibrací na prodávané přístroje (pádové číslo, extrakční přístroje, laboratorní prosévací přístroje)
- on-line přes internet pro NIR analyzátoři (připojené k internetu)
- kruhové testy pro NIR analyzátoři



ŠKOLENÍ A SEMINÁŘE:

Qualima – k aktuálním otázkám jakosti
potravinářských a krmivářských
produktů

