

## Chromatografické sledování cukrů při lihovém kvašení

663.15:545.84

M. ROSA

Je obecně známo, že kvasinkami *Sacharomyces cerevisiae*, rasa lihovarská a droždářská, jsou přímě zkvasitelné jen monosacharidy o určité prostorové konfiguraci jako d-glukosa, d-fruktosa, d-mannosa, složené sacharidy, sacharosa, maltosa, laktosa, rafinosa a jiné, teprve po hydrolytickém rozštěpení na své složky — monosacharidy. Toto štěpení probíhá v kyselém prostředí nebo enzymaticky.

Rychlost štěpení (inverse) a průběh odkvašování jednotlivých cukrů nám dává nahlédnout do tohoto složitějšího biochemického procesu a je důležitým vodítkem pro zhodnocení technologického postupu výroby lihu.

Rozdělovací chromatografie na papíru nám dovozuje s velkou přesností sledovat průběh inverse i odkvašování cukrů, což bylo dříve jinými metodami obtížné a zdlouhavé.

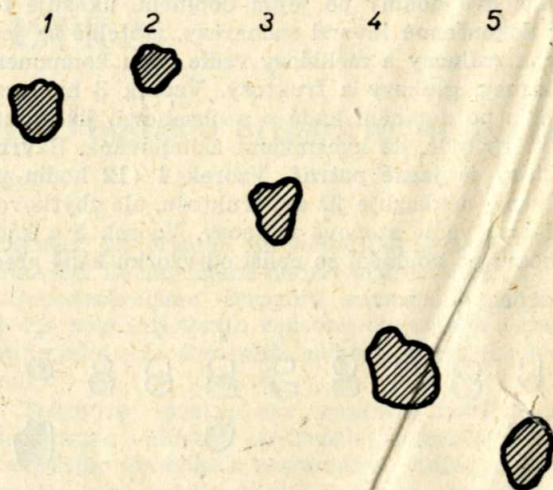
Surovinou našich průmyslových lihovarů je řepná melasa surovárenská i rafinérská. Obsahuje v průměru 50 % sacharosy, do 2 % kolísající množství rafinosy vedle invertu, vzniklého inverzí sacharosy (invert obsahuje hlavně melasy rafinérské) a necukry, jako anorganické soli, organické látky dusíkaté (jako aminokyseliny) i nedusíkaté vedle asi 20 % vody. Disacharid sacharosa není kvasinkami přímo zkvašován, ale působením kyselého prostředí a v kvasinkách obsaženého enzymu invertázy se štěpí ve své složky, glukosu a fruktosu, které jsou kvasinkami lehce asimilovány. Další cukr v melase obsažený, rafinosa, je trisacharidem složeným z fruktosy, glukosy a galaktosy. Při lihovarském kvašení nastává štěpení pouze do prvního stupně, to jest odštěpuje se jedna molekula fruktosy a resultuje disacharid složený z jedné molekuly glukosy a jedné galaktosy, melibiosa. Melibiosa tvoří v prokvašené lihovarské zápaře t. zv. zbytkový cukr, neboť není kvasinkami asimilovatelná a k její hydrolyse nedochází, jelikož pro tento pochod potřebný enzym, melibiázu, produkují pouze kvasinky spodního kvašení, jako na příklad pivovarské.

### Metodika

Při práci bylo použito sestupné rozdělovací chromatografie na papíru. Dřevěná chromatografická skříňka se zasklenou čelní a zadní stěnou byla pečlivě vyparafinována a hermeticky utěsněna gumou. V ní zavěšená vanička byla porcelánová. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na anglickém papíru „Whatman č. 1“. Odebrané vzorky po filtraci byly nanášeny kapilární pipetou v množství 0,01 ml na papír v kapkách o průměru do 0,5 cm vzdálených 2,5 cm od sebe a sušeny pod infračervenou lampou.

Z několika zkoušených rozpouštědel byla nakonec použita jako nejlépe rozdělující směs n-butanolu + ledové kyseliny octové + vody (4 : 1 : 5). Směs po pečlivém protřepání rozdělěna v dělicí nálevce a spodní vrstva v misce na dně chromatografické skříňky sloužila k nasycení atmosféry, vrchní vrst-

va použita do vaničky k dělení cukrů. Doba působení rozpustidla se pohybovala od 48 do 72 hodin při teplotě místnosti asi 20 °C. Po vyjmutí ze skříňky byl zavěšený papír usušen infračervenými lampami. K detekci bylo použito směsi 0,2 molární kyseliny šťavelové a 0,2 mol. roztoku anilinu v ethylalkoholu v poměru 1 : 1. Detekční činidlo bylo nastříkáno na usušený papír skleněným rozprašovačem za použití stlačeného vzduchu a chromatogram vyvolán v sušárně při 100 °C. Testování čistými cukry bylo provedeno v jedné kapce, neboť pořadí skvrn jednotlivých cukrů bylo vyšetřeno samostatnými chromatogramy (Chromatogram 1). Skvrna fruktosy je nejbližší čelu rozpouštědla, nad ní glukosa, sacharosa, melibiosa a nejvýše rafinosa. V chromatogramech není testována melibiosa, neboť malé množství, které bylo k dispozici, stačilo na přípravné práce a chromatogramy standardních cukrů. Pro vlastní práci nebylo možno melibiosu opatřit. Jak bylo výše uvedeno, skvrna melibiosy leží pod rafinosou v těsné její blízkosti.



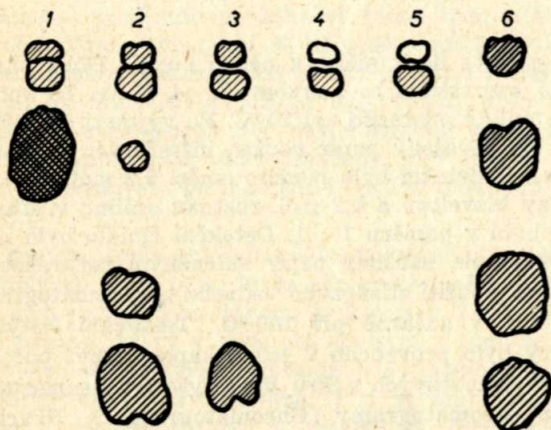
Chromatogram 1.

Čisté cukry: 1 melibiosa, 2 rafinosa, 3 sacharosa, 4 glukosa, 5 fruktosa.

Sledování bylo provedeno v kampani 1953—54 ve třech našich průmyslových lihovarech, z nichž lihovar označený A pracuje klasickým způsobem Jacqueminovým a lihovary označené B a C způsobem podle patentu Boinotova. Tyto dva způsoby se liší v zásadě tím, že při způsobu Jacqueminově pomnožují se kvasinky pro každou kád' (zákvasovým způsobem v propagační stanici), kdežto při kvašení podle Boinota se kvasinky z prokvašené zápaře odseparují a znovu použijí po kyselé preparační lázni. Jednotlivé kádě byly sledovány od přidání posledního přítoku sladké zápaře (zředěné melasy) do začátku separace kvasnic, případně do odtahování zá-



pary k destilaci. V lihovaru A byly vzorky odebrány vždy jednorázově z několika kádí v různém stadiu dokvašení.



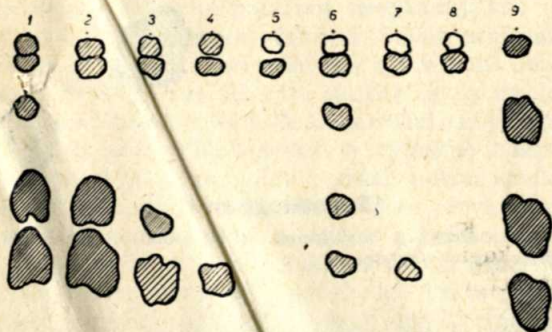
Chromatogram 2.

1. sladká zápara, 2. kád' 2 hodiny po doplnění, 3. kád' 6 hodin po doplnění, 4. kád' 12 hodin po doplnění, 5. kád' 18 hodin po doplnění, 6. standardní cukry.

### Výsledky sledování kvašení

#### Lihovar A (chromatogram 2).

Sladká zápara neobsahovala invertu, ale vedle sacharosy rafinosu a melibiosu. Vzorek 2, vzatý z kádě dvě hodiny po jejím doplnění, ukazuje téměř dokončenou inverzi sacharosy, zřetelně se jeví skvrna rafinosy a melibiosy vedle obou komponent sacharosy, glukosy a fruktosy. Vzorek 3 byl vzat 6 hodin po doplnění kádě a neobsahoval již glukosu, která byla již kvasinkami asimilována. Skvrna fruktosy je jasně patrná. Vzorek 4 (12 hodin po doplnění) neukazuje již ani fruktosu, ale zbytkovou melibiosu vedle stopové rafinosy. Vzorek 5 z kádě 18 hodin po doplnění se neliší od vzorku kádě předcházející.



Chromatogram 3.

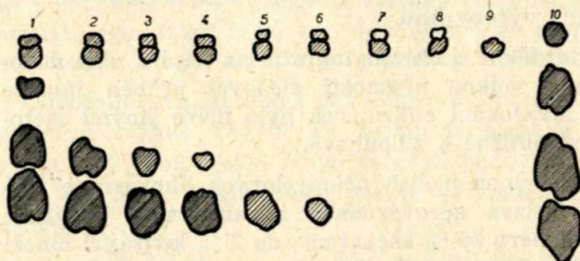
1. kád' 1 hodinu po doplnění, 2. kád' 3 hodiny po doplnění, 3. kád' 6 hodin po doplnění, 4. kád' 9 hodin po doplnění, 5. kád' 12 hodin po doplnění, 6. vzorek po přidání sladké zápary, 7. kád' 1 hodinu po přidání sladké zápary, 8. kád' 2 hodiny po přidání sladké zápary, 9. standardní cukry.

#### Lihovar B (chromatogram 3).

Ve vzorku odebraném jednu hodinu po doplnění kádě se jeví ještě zřetelně skvrna sacharosy. Glukosa a fruktosa jsou v přibližně stejné koncentraci, kterýžto poměr se drží až do ukončení inverze sacharosy. Ve vzorku, odebraném 6 hodin po do-

plnění kádě, úbytek glukosy je nepoměrně větší než fruktosy. Po dalších třech hodinách je glukosa kvasinkami úplně protrávena. Zbytek fruktosy vymizel během dalších tří hodin, kdy byl vzat další vzorek (12 hodin po doplnění). Zbytkový cukr je převážně melibiosa vedle stopové rafinosy.

Kád', dokvašující 12 hodin, nemohla být separována pro nadbytek odseparované zápary ve sběrné kádí a proto udržují v tomto závodě přidavkem 5 hl sladké zápary do zralé kádě o obsahu 530 hl kvasinky v dobrém fyziologickém stavu a zabraňují jejich usazování na dně kádě. Pět minut po přidání sladké zápary odebraný vzorek vykazoval podle chromatogramu již asi 50 % inverze sacharosy. Ve vzorku odebraném jednu hodinu po přítoku tohoto přidavku byl již jen zbytek fruktosy a za další hodinu byl přidavek prokvašen.



Chromatogram 4.

1. kád' ihned po doplnění, 2. kád' 2 hodiny po doplnění, 3. kád' 4 hodiny po doplnění, 4. kád' 6 hodin po doplnění, 5. kád' 8 hodin po doplnění, 6. kád' 10 hodin po doplnění, 7. kád' 12 hodin po doplnění, 8. kád' 14 hodin po doplnění, 9. kád' 16 hodin po doplnění, 10. standardní cukry.

#### Lihovar C (chromatogram 4).

První vzorek odebraný ihned po doplnění kádě vykazoval skvrny všech kvašení zúčastněných cukrů. Inverse proběhla do dvou hodin po doplnění kádě, neboť vzorek odebraný po této době neobsahoval sacharosu. V dalším průběhu sledování ubývala glukosa rychleji než fruktosa, takže ve vzorku odebraném 8 hodin po doplnění kádě glukosa vymizela. Dvanáct hodin po doplnění vymizela i fruktosa. Další vzorky odebrané 14 a 16 hodin po doplnění nevykazovaly změny. V chromatogramu je patrné ubývání rafinosy za vzniku melibiosy.

Ve vzorku z této sledované kádě, odebraném 16 hodin po jejím doplnění, prakticky vymizela rafinosa. Jak však ukázaly jiné chromatogramy, zhotovené v tomto závodě, vymizení rafinosy delším stáním kádě (i přes 20 hod.) nebylo možno vždy konstatovat. Proti tomu, co chromatogramy kádí sledovaných v lihovaru B dokazovaly dokonalé prokvašení 12 hodin po doplnění, chromatogramy některých kádí v závodě C stabilně ukazovaly přítomnost fruktosy ještě 16 hodin po jejich doplnění.

### Závěr

Z tohoto předběžného zjištění vyplývá, že průběh zkvašování a inverze cukrů závisí podstatně na fyziologickém stavu kvasinek, ať již připravených zákvasem nebo separací spojenou s kyselou preparační lázní, a na dodržování technologického postupu. Závislost používané rasy na rychlost kva-



šení, inverzi a s hlediska t. zv. zbytkového cukru je předmětem dalšího podrobnějšího zjišťování.

Sledování, provedené v lihovaru A, dokazuje, že při dodržování technologického postupu v kvasírně (vyvedení zákvasu, plnění kádí, dodržování teploty) je zápara po dvanácti hodinách dokvašování zralá a může být separována nebo destilována. Poněvadž lihovar A, jak již bylo uvedeno, pracuje podle Jacquemina a odseparované kvasnice (jestliže se vůbec separují) se nepoužívají zpět na kvašení, ale suší na krmné droždí, delší stání kádě, mající za následek zhoršení fyziologického stavu kvasinek a jejich usazování není s hlediska technologického postupu tolik na závalu jako při způsobu podle Boinota. Ovšem nutno vzít v úvahu, že další stání kádě umožňuje rozmnožování infekce a s ní zhoršení jakosti lihu i snížení výtěžnosti.

V závodech B a C, které pracují způsobem podle Boinota, je zvláště důležité udržet kvasinky v dobrém fyziologickém stavu a zabránit jejich usazování na dně kádě. Proto udržování kádě v kvašení přídatkem sladké zápary v závodě B po dvanácti-hodinovém dokvašování je správným postupem. Zjištění v lihovaru C bylo provedeno ke konci kampaně, a to je příznačné, že anomální průběh kvašení

se opakoval vždy u téže kádě. Bohužel nebylo v tomto závodě možno zkusit aplikovat v lihovaru B prováděný přídatek do prokvašené kádě, ale podle shodného průběhu hlavního kvašení se dá předpokládat, že i v závodě C u dobře jdoucích kádí dvouhodinové dokvašení přídatku by bylo dostačující. Delším stáním kádě zhoršený fyziologický stav kvasinek a jejich usazování se projevuje stále se stupňujícím zpomalováním kvašení a samozřejmě i zde je závažný možný vzrůst infekce. U separátorů pak resultuje kvasničné mléko o nízké hustotě. Stoupá spotřeba kyseliny sírové do preparační lázně a kvašení následkem toho probíhá při abnormální kyselosti prostředí.

Provedené předběžné sledování rychlosti inverse a odkvašování cukrů při lihovém kvašení potvrzuje správnost stále opakovaného požadavku dodržovat technologický postup v našich lihovarech.

### Literatura:

1. Kolektiv VŠCH (F. Šorm): *Chromatografie*, Praha 1952.
2. V. Jonáš: *Technologie drožďařství II*, Praha 1951.
3. G. Foth: *Handbuch der Spiritusfabrikation*, Berlin 1929.