

Chromatografické zisťovanie cukrov pri pivovarskom varnom procese

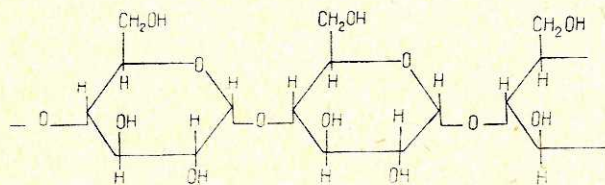
ROBERT WINKLER

Katedra technickej mikrobiológie a biochemie chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej a Západoslovenské pivovary, n. p., závod 1 v Bratislave

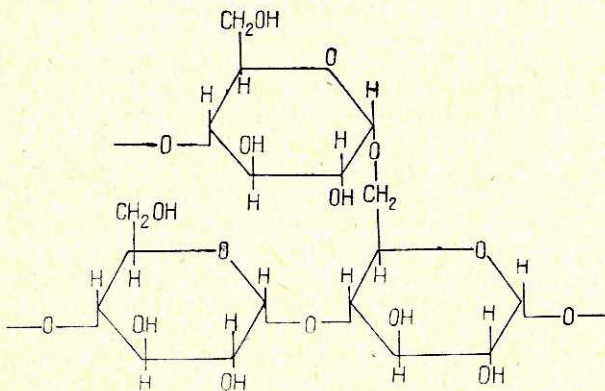
Diplomovú prácu viedla Dr Anna Kocková-Kratochvílová

545.84 : 664.1

Pri pivovarskom varnom procese pokračuje rozklad makromolekulárnych látok, započatý už pri sladovaní, v látky jednoduchšie. Najdôležitejšou z týchto štepených látok je škrob. Jeho molekula sa skladá z glukózových jednotiek, spájaných v α -1,4 polohe u priamych reťazí amylozy a tiež v α -1,6 polohe u amylopektínu, keď sa naväzujú postranné reťaze.



Štruktúra amylozy



Štruktúra amylopektínu

Počet glukózových zvyškov, účastnených na výstavbe amylozy sa ráta na 60 — 600. Tomu odpovedá molekulová váha 10 000 — 100 000. Veľkosť molekuly sa odráža v rôznej viskozite, rozpustnosti, štabilita a koloidnej povahe. Jej množstvo v škrobe býva 10—20 %. Je vo vode rozpustná. Amylopektín netvorí jednoduché reťaze, ale vetvené a jeho molekula dosahuje veľkej váhy 100 000—1 000 000. To odpovedá 600—6 000 glukózovým zvyškom. Amylopektín mazovatie a tvorí gel.

Pri sladovaní a najmä pri rmutovaní prebieha enzymatické štiepenie škrobových molekúl. Hlavným katalyzátorom tohto štepneho procesu sú hydrolytické enzýmy: α -amyláza ako enzým dextrínovotvorný a β -amyláza ako enzým cukrovtvorný. Rozdiel v ich účinku spočíva v tom, že β -amyláza katalyzuje štiepenie škrobových reťazí tak, že sa oddelujú glukózové zvyšky po dvoch, za účinku α -amylázy po šiestich. Napadanie makromolekuly škrobu α -amylázou po šiestich glukózových zvyškoch sa prelína, takže môžu odpaďať aj nižšie jednotky (1). Výsledkom spoločnej činnosti α - a β -amylázy je predovšetkým maltóza a potom nižšie dextríny a oligosacharidy, ako maltotrióza s tromi glukózovými zvyškami, maltotetraóza so štyrmi alebo aj izomaltóza.

Vznikajúca maltóza môže byť enzymatickou hydrolýzou štepená v glukózu, avšak väčšinou býva pivovarskými kvasinkami skvasovaná priamo fosforylačným pochodom. Maltotrióza, maltotetraóza, ako aj nízko molekulárne dextríny bývajú skvasované pivovarskými kvasinkami len núdzovo až pri dokvasovaní.

Pretože α -amyláza a β -amyláza majú odlišné optimálne podmienky svojho pôsobenia, najmä pri rôznych teplotách, vedie sa proces rmutovania cieľavedome postupným zvyšovaním teplôt a vydržiavaním pri určitých stupňoch. Postupné scukrovanie sa môže sledovať všeobecne stanovením redukujúcich cukrov v určitých intervaloch. To však nehovorí mnoho o akosti jednotlivých zložiek, tvorených štepým procesom z molekuly škrobu. V tejto práci sme sa pokúsili o kvalitatívne rozlíšenie cukrov papierovou chromatografiou a o stanovenie ich množstva kolorimetrickou metódou s antronom. Súčasne bola aplikácia týchto metód uverejnená Stöcklím (2,3).

Experimentálna časť

1. Papierová chromatografia

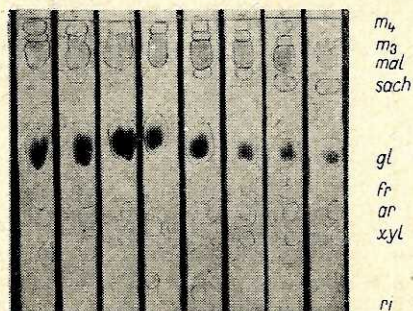
Vzorky odoberané počas rmutovania nebolo treba upravovať. Nanášali sa na filtračný papier Whatman č. 1 ako pozdĺžne, 1 cm dlhé prúžky vo vzdialenosti 3 cm od seba. Nanášanie tej istej vzorky sa robilo dvojmo množstvom 0,01—0,015 ml a niekoľkonásobným opakovaním vždy po dokonalom vysušení predchádzajúceho prúžku. Pred vložením papiera do skrine sa jeho spodný okraj zúbkovite vystrihal, aby rozpúšťadlo rovnomerne odkvapávalo. Ako rozpúšťadlo bolo použité zmesi n-butanol, kyselina octová, voda v pomere 4 : 1 : 5. Ak sa malo dosiahnuť dokonalé oddelenie cukrov, najmä trióz a tetraóz, bolo treba nechať rozpúšťadlo dlhšiu dobu pretiekať, až niekoľko dní. Tým bol aj jednoznačne určený spôsob zostupnej chromatografie. Vedľa vzoriek sladiny boli tiež nanášané aj čisté cukry, naokoľko pri mnohonásobnom pretiekaní sa nemohlo posudzovať podľa obvyklého spôsobu stanovením R_F .

K detekcii boli vyskúšané rôzne zmesi, napr. amoniakálny roztok dusičnanu strieborného (4), činidlo anilín-oxálové (5) a zmes difenylaminu, anilínu a kyseliny fosforečnej (6,2). Pre naše použitie sa hodili posledné dve zmesi. Zmes 0,2 m roztoku anilínu v alkohole a 0,2 m kyseliny šťavelovej v pomere 1 : 1 poskytuje rôzne vyfarbené škvrny s redukujúcimi aj neredukujúcimi cukrami:

rafinóza — žltohnedá
maltóza — zelenohnedá
glukóza — červenohnedá
xylóza — červená
fruktóza — hnedá
sacharóza — žltohnedá
arabinóza — červená
ribóza — červená

Nevýhodou je, že intenzita zfarbenia je rôzna, je napr. najväčšia u glukózy, zatiaľ čo maltóza ostáva

slabo vyfarbená. Toto činidlo sa dobre hodí, ak sa majú dokazovať pentózy (obr. 1). Ak sa má identifikovať maltóza, maltotrióza a maltotetraóza, odporúča



Obr. 1 — Uvedený chromatogram bol striekaný anilín-oxalovým činidlom. Najintenzívnejšie sa javia škvrny glukózy. Zachytuje tiež pentózy v sladine
 m_4 — maltotetraóza; m_3 — maltotrióza; mal — maltóza; sach — sacharóza; gl — glukóza; fr — fruktóza; ar — arabinóza; xyl — xylóza; ri — ribóza; ? — neznámy neidentifikovaný cukor.

sa použiť zmesi: 5 dielov 2 % difenylamínu v etanóle, 5 dielov 2 % roztoku anilínu v etanóle a 1 diel 85 % kyseliny fosforečnej. Poskytuje toto vyfarbenie:

sacharóza — žltosivá
fruktóza — žltá
xylóza — zelená
glukóza — sivá
maltóza a vyššie polyméry glukózy — modrovioletové

Chromatogram po postriekaní sa suší pri 80 °C po dobu 30 minút lebo pri vyššej teplote rýchle tmavne. Nevýhodou tejto metódy je, že hotové chromatogramy rýchle tmavnú. Preto je treba vyhotovený chromatogram odfoťografovať alebo ho uchovávať rozložený v papieroch v tme pod sklenenou doskou.

2. Kolorimetrické stanovenie cukrov antronom

Dvojmo robené chromatogramy boli rozstrihané na pásy, ktoré sa medzi jednotlivými škvrnami rozstrihali. Vyluhovanie sa previedlo v 10–20 ml vody v skúmavkách vo vodnom kupeli pri 70 °C po dobu 30 minút.

Cukry boli stanovované antronom, metódou vypracovanou Morrisom (7). Táto metóda je založená na princípe, že vplyvom Dreywoodovho činidla dochádza k dehydratácii pentóz na furfurál alebo hexóz na oxymetylfurfurál, ktoré potom s antronom poskytujú intenzívne zelenú látku. Z vylúženého roztoku sa odpipetovali 4 ml do skúmavky chladenej vo vode a pridalo sa 8 ml Dreywoodovho činidla: 0,2 g antrónu v 100 ml koncentrovanej kyseliny sírovej (8). Potom sa skúmavky ponorili do vriaceho vodného kúpeľa na dobu 10 minút ± 15 sek, ako sme vyskúšali za najvhodnejšie. Skúmavky sa rýchle ochladia na teplotu miestnosti a obsah sa kolorimetruje. Robí sa aj slepý pokus v 4 ml vody. Stanovenie sa prevádza pri červenom filtri. Vyhodnocovanie sa robilo kalibračnou krivkou, vopred zostrojenou podľa presne známych koncentrácií glukózy od 50 do 200 γ.

3. Stanovenie obsahu redukujúcich cukrov

Redukujúce cukry boli stanovené metódou podľa Schoorla (10).

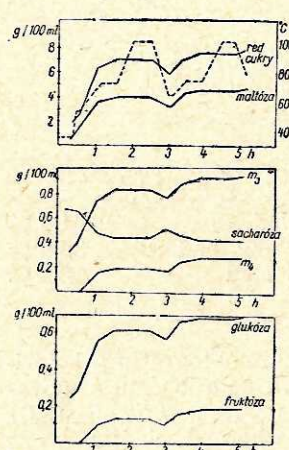
4. Sledovanie varného procesu

Vo várni závodu 1. Západoslovenských pivovarov v Bratislave bol uvedenou metódou analyzovaný dvojrmutový varný pochod pri varení svetlej 7^o, svetlej 10^o a tmavej 10^o várky. Mimo to bol tiež rmutovací pochod sledovaný týmto spôsobom v laboratóriu kongresovou metódou. Vzorky sa odobrali vždy pri charakteristickej teplote, napr. po vystrení zaparení, po vyhriatí na cukrotvornú teplotu, po scukrení atď. Odfiltrovalo sa z nich mlato a nanášali sa na chromatografovací papier.

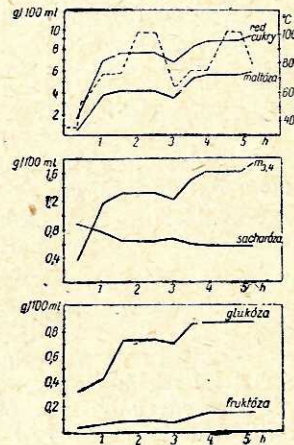
Výsledky pokusov

1. Sledovanie rmutovacieho procesu pri výrobe 7^o svetlého piva (obr. 2).

Použité suroviny: český slad 3365 kg
farebný slad 15 kg
ryža 490 kg



Obr. 2 — Zmeny cukrov pri výrobe 7^o svetlého piva, rmutovací proces

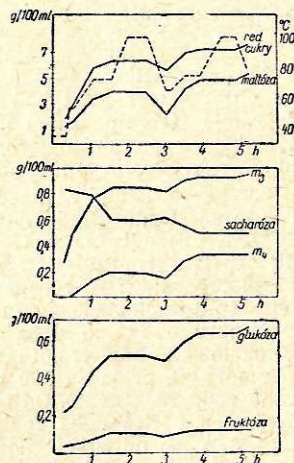


Obr. 3 — Zmeny cukrov pri výrobe 10^o svetlého piva, rmutovací proces

2. Sledovanie rmutovacieho procesu pri výrobe 10^o tmavého piva (obr. 3).

Použité suroviny: český slad 4260 kg
ryža 630 kg

Zaparovanie bolo prevedené prevarenou ryžou.

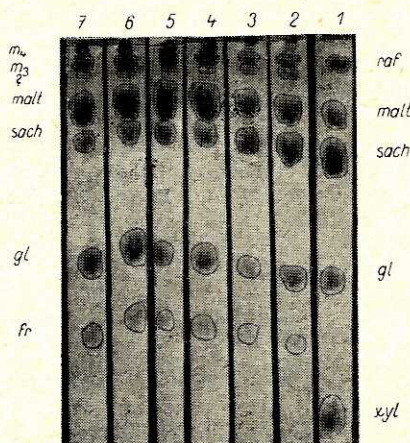


Obr. 4 — Zmeny cukrov pri výrobe 10^o tmavého piva, rmutovací proces

3. Sledovanie rmutovacieho procesu pri výrobe 10^o tmavého piva (obr. 4 a 5).

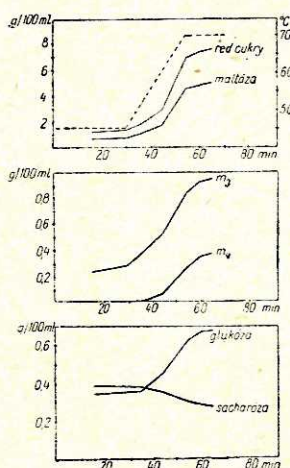
Použité suroviny: český slad 2580 kg
karamelový slad 1500 kg
farebný slad 120 kg

4. Sledovanie kongresovej metódy s českým sladom (obr. 6 a 7).

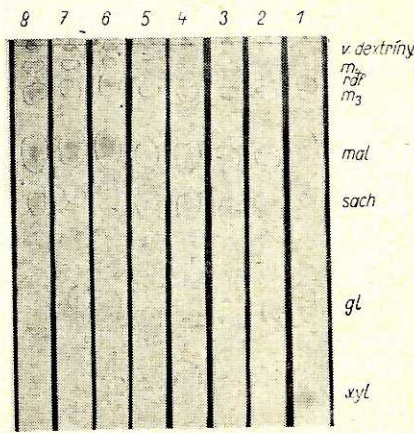


Obr. 5 — Chromatogram 10% tmavej sladiny počas rmutovania

1 — čisté cukry, 2 — výsterka (14), 3 — záparka (14), 4 — prvý rmut vyhriaty na 72 °C (14), 5 — prvý rmut scukrený (14), 6 — druhý rmut scukrený (16), 7 — sladina (11)



Obr. 6 — Kongresová metóda s českým sladom



Obr. 7 — Chromatogram kongresovej metódy s českým sladom

1 — čisté cukry (rafinóza, maltóza, sacharóza, glukóza, xylóza, 2 — po vystrení 15 min — 45 °C (14), 3 — po vystrení 30 min — 45 °C (11), 4 — zvyšovanie teploty — 53 °C (11), 5 — zvyšovanie teploty — 62 °C (12), 6 — vyhriatie rmutu na 70 °C (11), 7 — po 5 min na 70 °C (11), 8 — po 10 min na 70 °C (11)

5. Sledovanie kongresovej metódy s českým, karamelovým a farebným sladom (obr. 8 a 9).

Použité suroviny: český slad 61,4 %
karamelový slad 35,8 %
farebný slad 2,8 %

Súhrn výsledkov

1. Použili sme papierovú chromatografiu a kolorimetrickú metódu antrónovú k podrobnému sledovaniu pivovarského varného procesu. *Stöckli* (2,3) aplikoval tieto metódy len na hotovú mladinu a vystavované pivo. Táto rýchla metóda, použitá k sledovaniu varného procesu môže ozrejmiť akosť sypa, varný technologický postup a môže predložiť

perspektívu pre ďalšiu výrobu, najmä pre hlavné kvasenie a dokvasovanie. V analýze hlavného kvasenia týmto spôsobom pokračujeme.

2. V priebehu skúšaných spôsobov výroby a laboratórnej kontroly sa ukazuje, že všetky analyzované cukry: maltóza, glukóza, fruktóza, maltotrióza a maltotetraóza pri rmutovaní pribúdajú, len sacharóza ubúda. Podlieha pravdepodobne enzymatickej hydrolýze a len z nepatrnej časti aj chemickej. Ubúda dokonca i pri kongresovej metóde s českým sladom, kde sa fruktóza chromatograficky nezachytia. Tento úbytok je však o veľa menší ako pri kongresovej metóde s prísadou karamelového a farebného slad, kde sa fruktóza dokazuje.

Stockholmská dohoda o rozborech ječmene a sladů

(5. pokračování)

V každej kádince se šrot rozmíchá s 200 ml destilované vody teploty 45 až 46 °C skleněnou tyčinkou, aby se zabránilo tvoření žmolků. Skleněná tyčinka se potom opláchne malým množstvím destilované vody.

Potom se kádinky ihned vloží do rmutovací lázně předem vyhřáté na 45 °C a mýchadla se uvedou do chodu. Teplota rmutu 45 °C se udržuje přesně 30 minut. Po této době se teplota rmutovací lázně zvyšuje vždy za 1 minutu o 1 °C po dobu 25 minut. V okamžiku, kdy teplota rmutu dosáhne 70 °C, přidá se 100 ml destilované vody 70 °C teplé. Od tohoto okamžiku se počítá doba zcukření. Teplota 70 °C se udržuje 1 hodinu, načež se rmut ochladí tak, že během 10 až 15 minut dosáhne teploty místnosti. Mýchadla se opláchnou, vnější strana kádinky se osuší a její obsah se dováží destilovanou vodou na 650 g.

Obsah kádinky se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou a všechen obsah se ihned vlije na filtr.

Používá se skládaného filtru průměru 30 až 32 cm těchto (nebo rov-

nocenných) výrobních značek:

Skládaný filtr č.	Neskládaný filtr č.
Schleicher a Schüll . . . 560	597
Eaton-Dikeman . . . 509	609
„Delta“ . . . 314 3/4	314
Macherey, Nagel & Co. . 616 1/4	—
Munktell . . . 9100	—

Filtr nesmí přesahovat přes okraj nálevky. Prvních 100 ml zfiltrované sladinu se vrátí na filtr. Filtrace se přeruší, jakmile filtrační vrstva se zdá být suchá nebo při pomalu probíhající filtraci za 2 hodiny. Dobře promíchaná sladina se ihned plní do pyknometru.

5. Stanovení specifické váhy sladinu: Ke stanovení specifické váhy sladinu se používá Reischauerových pyknometrů, které mají tyto rozměry: Obsah pyknometru asi 50 ml

Celková výška pyknometru . . .	140 až 160 mm
Délka hrdla . . .	65 až 85 mm
Světlost hrdla . . .	2,5 až 4,0 mm
Vzdálenost značky od horního okraje . .	25 až 35 mm

Specifická váha se stanoví při 20 °C. Dokonale vyčištěné pyknometry se před plněním vypláchnou dvakrát asi 10 ml sladinu.

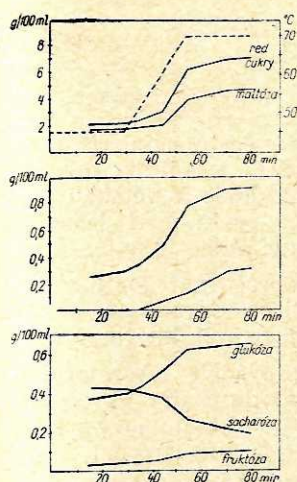
Pyknometry se naplní sladinou a vloží se na půl hodiny do vodní lázně s konstantní teplotou 20 °C ± 0,05 °C, při čemž má voda dosahovat nad značku na hrdle pyknometru.

Po 25 minutách se odsaje sladina nad značkou a po dalších pěti minutách se hladina nastaví přesně ke značce. Vnější povrch pyknometru se osuší a po pětiminutovém stání se pyknometr zváží.

6. Vypočítání extraktu ze specifické váhy: Extrakt se vypočítá ze specifické váhy, k níž se najde odpovídající hodnota v úřední cukerné tabulce (Platova tabulka) při 20 °C. Specifická váha se stanoví na pět desetinných míst. Přepočet na vzduchoprázdnostu se neprovádí. Získají-li se při dvojitým stanovení hodnoty, které se liší více než o dvě jednotky na 4. desetinném místě, musí se stanovení opakovat. Extrakt sladu se udává jen na jedno desetinné místo.

Výpočet se provede podle vzorce:

$$E = \frac{P(W+800)}{100-P} = \text{extrakt v } \frac{\text{p}}{\text{v}} \text{ vodním sladu a}$$



Obr. 8 — Kongresová metóda s českým karamelovým a farebným sladom

3. Najväčšie zmeny v koncentrácii cukrov nastávajú pri vyhrievaní zo zaparovacej teploty na teplotu cukrotvornú. Vtedy sa prechádza teplotou, pri ktorej sa javí najväčšie pribudnutie maltózy, glukózy a maltotriózy.

4. Maltotetraóza vzniká až po zaparovaní. Pri kongresovej metóde vzniká maltotetraóza až pri stúpaní teploty nad 60 °C, čo je vidieť z obr. 7. Domnievame sa, že maltotrióza sa tvorí už pri sladovaní, pretože sa na chromatograme objavuje zakrátko po vystrení. Na chromatogramoch z kongresovej metódy sa objavujú zložitejšie dextríny hneď pod škvŕnou štartu.

5. Pri sledovaní várky 10⁰ tmavej mladiny pribudnul na chromatograme nový cukor, obr. 5 zn. ?, ktorý nebol bližšie identifikovaný.

6. Pri sledovaní kongresovej metódy s českým, karamelovým a farebným sladom sa objavila fruktóza. Objavil sa tu tiež neidentifikovný cukor. Jeho množstvo so stúpajúcou teplotou kleslo. V porovnaní s normálnou kongresovou metódou, kde scukrenie trvalo 10 minút, bolo u tohto postupu 25—30

$$\frac{E \times 100}{100 - W} = \text{extrakt v sušine sladu,}$$

kde:

E = extrakt v pôvodnom vzorku
P = extrakt v gramech ve 100 g sladiny (Plato)
W = vláha sladu v %.

7. Zcukrení

Zcukrení se zkouší 10 minut po dosažení teploty 70 °C tak, že se kapka rozmíchaného rmutu vyjme na sádrovou destičku a přidá se k ní kapka N/50 jodového roztoku (2,54 g jodu + 5 g jodidu draselného se doplní vodou na 1 liter). Zkouška se opakuje vždy po 5 minutách až nastane zcukrení, t. j. až kapka rmutu dáva s kapkou jodového roztoku na sádrové destičce čistě žlutou skvrnu.

Doba zcukrení se udává „pod 10 minut“, „10—15 minut“ atd.

Nedosáhne-li se zcukrení po jedné hodině, opakuje se zkouška na zcukrení v novém pokusu, při kterém se zvýší teplota na 75 °C. Tento pokus slouží pouze ke stanovení zcukrení, nikdy ke stanovení extraktu.

Sádrová destička se zhotoví tak, že se 135 g sádry důkladně rozmíchá se 100 ml vody a vlije do vhodné ploché formy.

8. Vůně sladu

Zjišťuje se při rmutování a označí se jako „normální“, odpovídá-li danému typu sladu. Chybí-li u tmavého sladu normální aromatická vůně, označí se slad jako „nearomatický“. Cizí vůně se označují tak, jak byly zjištěny.

9. Stékání

Stékání sladiny se označuje jako normální, je-li skončeno za 1 hodinu. U sladů, které stékají pomalu, se používá označení „pomalu“. Jiná označení jsou nevhodná.

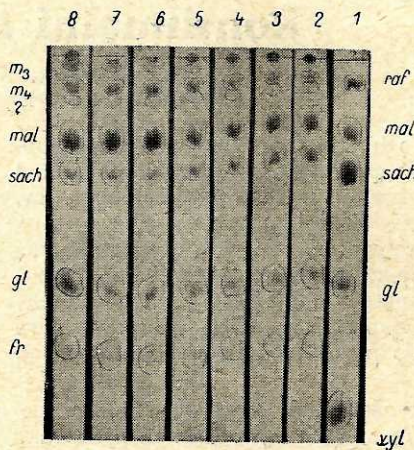
10. Čiřost sladiny

K vyjádření čiřosti se používají tyto výrazy: „čirá“, „opalisující“ a „kalná“. Zcukrení, stékání, čiřost a barva se stanoví vždy jen u jemného mletí.

Rozpustné dusíkaté látky

Rozpustné dusíkaté látky se stanoví ve 20 ml laboratorní sladiny podle Kjeldahla s připojenou destilací. Může se použít buď rychlé metody podle Lundina-Ellburga [Wochschr. Brau., (1919), 133], nebo se ke sladince přidají 2—3 ml kyseliny sírové a opatrně se odpaří téměř do sucha, při čemž se musí dávat pozor na pění.

Potom se provede vlastní spálení.



Obr. 9 — Chromatogram kongresové metody s českým, karamelovým a farebným sladom
1 — čisté cukry, 2 — po vystrení 15 min — 45 °C (13), 3 — po vystrení 30 min — 45 °C (11), 4 — zvyšovanie teploty — 62 °C (12), 5 — zvyšovanie teploty — 61 °C (10), 6 — vyhriatie rmutu na 70 °C (14), 7 — po 12 min na 70 °C (11), 8 — po 25 min na 70 °C (13)

minút. Tým sa stalo, že pribúdanie jednotlivých cukrov nejavi tak strmý priebeh.

Literatúra

- [1] Kocková-Kratochvílová A.: Úvod do biochemie pre potravinárov, Bratislava, 1956
- [2] Stöckli A.: Schweiz. Brau. Rundschau 67 (1956), 1
- [3] Stöckli A.: Schweiz. Brau. Rundschau 67 (1956), 51
- [4] Hais J. M., Macek K.: Papírová chromatografie, Praha, 1954
- [5] Vavruch I.: Cukrovarnické listy 68 (1952), 29
- [6] Mc Farlane W. D., Held H. R.: European Brewery Convantion, Nizza 67 (1953)
- [7] Morris D. L.: Science 107 (1948), 254
- [8] Dreywood R.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18 (1946), 499
- [9] Pawlowski-Schild: Die Brautechnischen Untersuchungsmethoden, Norimberg, 1953
- [10] Jureček M.: Organická analyza, Praha, 1950

Počítáme nejlépe podle tohoto příkladu:

Slad obsahuje:

80,8 % extraktu v sušine,
1,70 % dusíkatých látek v sušine,
8,48 % extraktu v laboratorní sladince,
71,4 mg rozpustných dusíkatých látek ve 100 ml laboratorní sladiny.

Sladina s 8,48 % extraktu obsahuje podle Platovy tabulky 8,77 g extraktu ve 100 ml.

Je-li extrakt sladu v sušine 80,8 %, je v sušine sladu obsaženo:

$$\frac{0,0714 \cdot 80,8}{8,77} = 0,658 \%$$

rozpustných dusíkatých látek, což odpovídá

$$\frac{0,658 \cdot 100}{1,70} = 38,7 \%$$

rozpustných dusíkatých látek v poměru k veškerým dusíkatým látkám sladu (Kolbachovo číslo).

Stanovení barvy

Barva se stanoví srovnáním s E. B. C. stupnicí barevných skel [L. R. Biskop, I. Just, Brewing, (1950), 373].

(Pokračování)