

# Chromatografické stanovení cukrů při pivovarském hlavním kvašení a dokvašování

JIRÍ VLČEK

Katedra technické mikrobiologie a biochemie chemické fakulty Slovenské vysoké školy technické v Bratislavě.

(Diplomovou práci vedla Dr. Anna Kocková-Kratochvílová.)

545.84:547.456/458:663.45

Při pivovarském kvasném procesu se zkvašuje extrakt mladiny, jehož hlavní podíl tvoří cukry, menší množství bílkovin, anorganických látek, hořkých chmelových kyselin a tříslovin a zanedbatelné množství nejruznějších jiných látek. Ze všech glycidů v mladině má největší podíl maltosa jako produkt enzymatického štěpení ječného škrobu, která je nejpodstatnějším činitelem při alkoholickém kvašení ve spilce a dokvašování v ležáckém sklepě. Kromě maltosy se v extraktu uplatňují i malá množství jiných zkvasitelných cukrů, na př. glukosa, fruktosa, sacharosa, rafinosa a j., které pocházejí již ze sladu anebo také z chemického nebo enzymatického štěpení. Enzymatický rozklad ječného škrobu až na maltosu není úplný, neboť kromě maltosy vzniká i určité množství dextrinů různě velkých molekul. Vyšší dextriny, které jsou svými vlastnostmi i molekulovou váhou jistě blízké škrobu, se pivovarskými kvasinkami nezkašují a jsou jednou z hlavních příčin chlebnatosti piva. Důležitou skupinou dextrinů jsou nejnížší, t. zv. hraniční dextriny. V literatuře se obvykle uvádí [2, 4, 5, 15] jako nejnížší hraniční dextrin hexaosa, skýtající mez zkvasitelnosti složitějších cukrů. Nižší jednotky, maltotetraosu nebo maltotriosu podobající se spíše maltose, lze některými kvasinkami zkvašovat. Pivovarské kvasinky prokvašují tím hlouběji, čím lépe tyto cukry dovedou zkvašovat. Divoké kvasinky mají ještě větší schopnost tyto cukry zkvašovat.

K této práci se použily a porovnaly celkem čtyři typy provozních kvasnic; typ „Plzeň“, „Smíchov“, „Holešovice B“ a „Holešovice C“. Podle charakteristických vlastností čistých kultur v jednotné mladině lze je zařadit do tří skupin. Rozlišovacími znaky jsou velikost buněk, poměr délek a šířek, tvarová vyrovnanost, způsob prokvašování, rychlost a mohutnost sázení. Smíchovské kvasnice mají buňky velké, poměr šířky k délce 1,2 až 1,6, vyrovnanost buněk 40 %, schopnost aglutinovat mají méně dobrou, kvašení je střední s nízkým a dlouhým maximem. Plzeňské kvasnice a holešovické B jsou středně velké kulaté s poměrem šířky k délce 1,1 až 1,2 s vyrovnaností buněk 50 až 60 %, prokvašující středně, s vysokým a krátkým maximem a s dobrou aglutinační schopností. Holešovické kvasnice C jsou středně oválné kvasinky s poměrem šířky k délce 1,2 až 1,4, s vyrovnaností buněk 50 až 60 %, středně prokvašující, s vysokým, ale krátkým maximem a s dobrou aglutinační schopností [15].

## Experimentální část

### Papírová chromatografie cukrů

Postupovalo se v podstatě podle metody papírové chromatografie cukrů, které použil a vyzkoušel Winkler [8] při pivovarském varném procesu. Pouze úprava zkoumaného vzorku, jehož nanášené množství a kvantitativní vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno jinak:

Vzorek, odebraný během kvasného procesu, se třepáním zbavil kysličníku uhličitého a odfiltroval se od suspendovaných kvasnic, které by mohly při vyšší teplotě nanášení pozměnit jeho složení. Množství vzorku bylo 0,035 ml, tedy o něco vyšší než používal Winkler, pro nízkou koncentraci cukrů na konci hlavního kvašení a v hotovém pivu.

Pro kvantitativní stanovení cukrů se porovnaly některé metody (stanovení antronem, planimetrická metoda, densitometrická metoda a metoda vizuálního srovnávání se standardní řadou). Nejvhodnější byla vizuální metoda srovnávání se standardní řadou doplněná kolorimetrickou metodou antrokovou [8]. Při metodě vizuálního porovnání se skvrny cukrů na chromatogramech zkoumaných vzorků porovnávají se skvrnami na chromatogramech standardních cukrů přesně známé koncentrace. Porovnává se velikost i intenzita skvrn. Předností této metody je, že je přesná (na 6 až 7 %) a rychlá a že lze každý cukr stanovit v jeho vlastní koncentraci. Naproti tomu planimetrická metoda není tak přesná, protože plochu skvrn nelze tak přesně ohraničit.

### Pokusy

Všechny pokusy byly provedeny při hlavním kvašení a dokvašování  $10^0$  světlého piva a dělí se na několik úseků:

*Porovnání přeměny glycidů při hlavním kvašení a dokvašování těžé mladiny zakvašené různými typy vřečných (pivovar v Brně)*

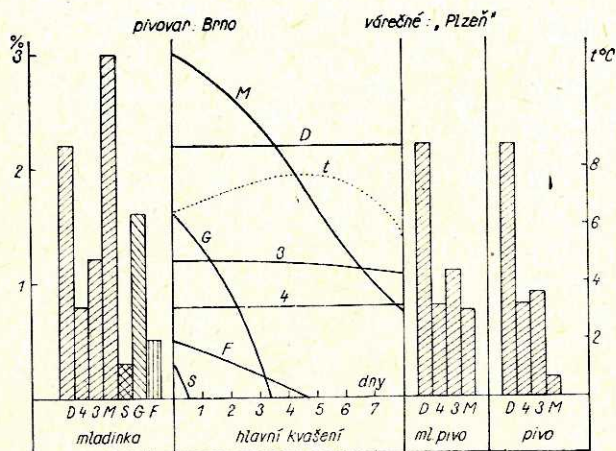
Použité suroviny: plzeňský slad — 2940 kg, rýžová moučka — 560 kg, chmel — 57 kg, vřečné — „Plzeň“, „Smíchov“, „Holešovice B“, „Holešovice C“.

Běžným dvourmutovým způsobem s přidavkem rýže bylo uvařeno 244 hl mladiny se stupňovitostí 9,95 % váh. Mladina se sespíjala do čtyř kvasných kádí a, zakvasila „na ujato“ čtyřmi typy vřečných kvasnic (nasazených po prvé) v množství 0,17 kg

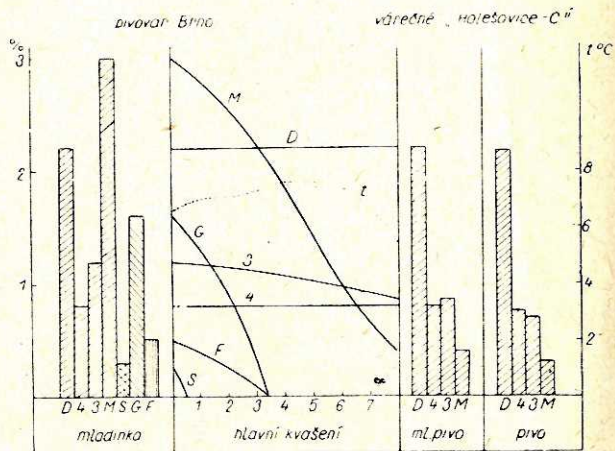


lisovaných kvasnic na 1 hl mladiny. Hlavní kvašení trvalo 8 dnů, dokvašování 33 dnů. Během celého kvasného procesu se odebíraly vzorky, v nichž se

chromatograficky analysoval cukr a podle JAM stanovil alkohol, skutečný extrakt a pH (obr. 1, 2, 3, 4).



Obr. 1



Obr. 4

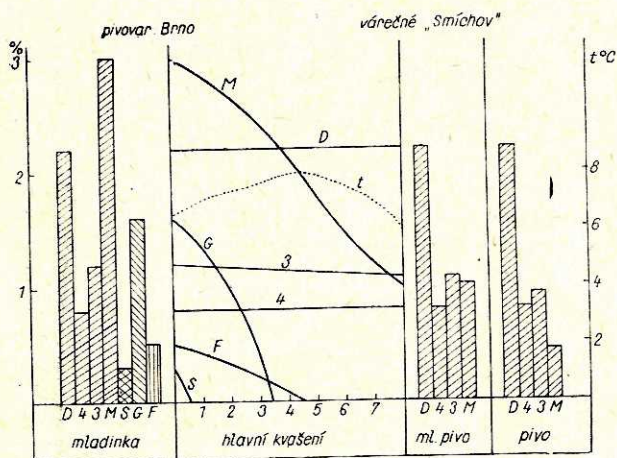
#### Sledování přeměny glycidů při hlavním kvašení a dokvašování na malé pokusné várcce (VÚPS Brno)

Použité suroviny: plzeňský slad — 4,25 kg, chmel — 65 g, vářečné — „Holešovice B“.

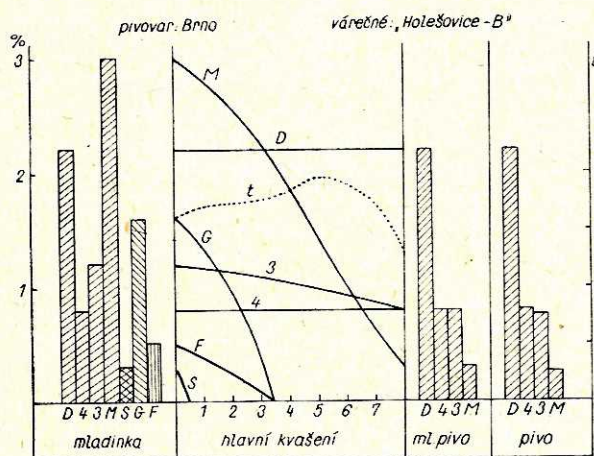
Běžným dvourmutovým způsobem bez přídavku rýže se uvařilo 30 l mladiny se stupňovitostí 8,70 % váh. Mladina se sespílala do skleněné kvasné kádě a zakvasila normálním způsobem vářečnými kvasnicemi „Holešovice B“ nasazenými po druhé, v množství hustých vářečných. Hlavní kvašení trvalo 8 dnů, dokvašování 31 dnů. Během celého kvasného procesu se prováděla chromatografická analýza cukrů. (Obr. 5.)

#### Sledování přeměny glycidů při hlavním kvašení v uzavřených kvasných kádích v pivovaru v Bytči

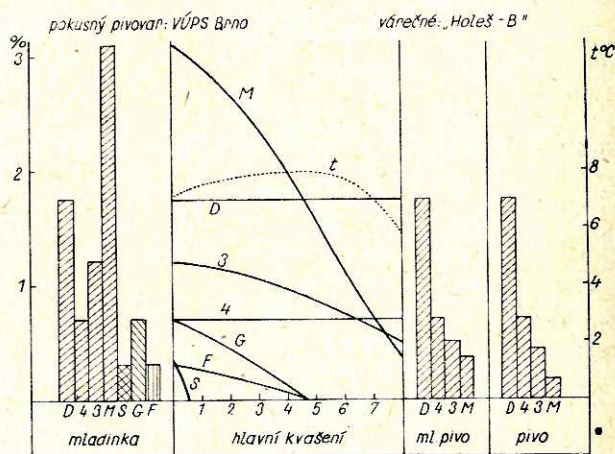
Použité suroviny: plzeňský slad — 2430 kg, rýžová moučka — 250 kg, chmel — 45 kg, vářečné — „Holešovice B“.



Obr. 2



Obr. 3

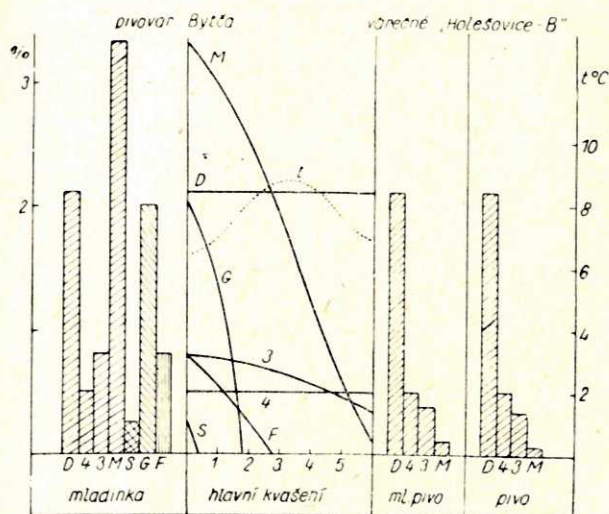


Obr. 5

D — vyšší dextriny, 4 — maltotetraosa, 3 — maltotriosa, M — maltosa, S — sacharosa, G — glukosa, F — fruktosa, t — teplota kvašení mladiny

Třírmutovým způsobem za přídavku rýže se uvařilo 194 hl mladiny stupňovitosti 9,98 % váh.





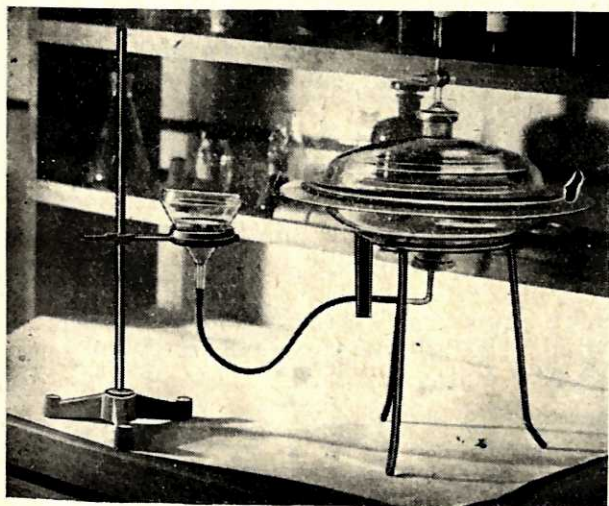
Obr. 6

extraktu. Uvařená mladina se sespírala do železobetonové uzavřené kvasné kádě a zakvasila normálním způsobem várečnými „Holešovice B“ nasazenými po čtvrté, v množství 0,5 l hustých várečných na 1 hl mladiny. Hlavní kvašení trvalo 6 dnů; kysličník uhlíčitý se jímá, čistil, komprimoval a v ocelových lahvích dodal spotřebitelům. Dokvašování trvalo 20 dnů. Během kvasného procesu se prováděla chromatografická analýza cukrů (obr. 6).

#### Návrh na kruhovou chromatografii pro pivovarské laboratoře

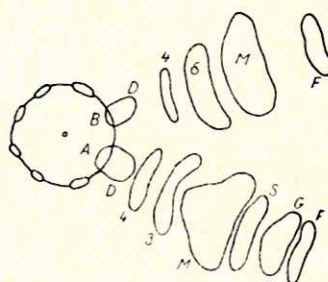
Papírová chromatografie pro svou jednoduchost a přesnost má naději na větší rozšíření v našem pivovarském průmyslu. Vyzkoušela se a navrhuje se úprava chromatografické metody, aby jí bylo lze použít i v pivovarských laboratořích, které nemají chromatografické zařízení. Zvolila se kruhová chromatografie, která nejlépe vyhovuje požadavku jednoduchosti a přesnosti analýsy.

Zařízení pro kruhovou chromatografii je na obr. 7. Skládá se ze dvou vík od exikátoru přil-



Obr. 7 — Zařízení pro kruhovou chromatografii

hajících na sebe, mezi nimiž je kruhový chromatografický papír, který má o 2 cm větší poloměr než víka. Rozpouštědlo se přivádí ze skleněné nálevky (která je zároveň jeho zásobníkem) gumovou hadičkou a skleněnou kapilárkou do středu chromatografického papíru. Zařízení je založeno na principu spojitých nádob. Zvyšováním nebo snižováním nálevky se řídí rychlost přívodu rozpouštědla. Pracovalo se t. zv. metodou několikavýsečovou; zkoumané vzorky se nanosily v podobě osmi podélných skvrn na start — v tomto případě soustředný kruh s poloměrem 2 cm. Rozpouštědlo, vyvíjení, sušení, detekce a vyhodnocení chromatogramů bylo stejné jako u chromatografie sestupné [8], pouze doba vyvíjení byla podstatně kratší, a to jenom 1 až 2 dny. Pro velmi nízký koeficient  $R_f$  cukrů v rozpouštědlové soustavě bylo nutno použít způsobu „na přetečení“. Rozpouštědlo však s papíru neodkapávalo, ale s vyčnívajícího kraje se na vzduchu samo odpařovalo (obr. 8).



Vzorek „A“ rozdělen šikmo dolů, je 10<sup>9</sup> mladina, vzorek „B“, rozdělen šikmo nahoru, je též mladina dva dny po zakvašení.

Obr. 8 — Část hotového kruhového chromatogramu

#### Závěr

Porovnáním čtyř uvedených typů várečných kvasnic se ukázalo, že původní značné rozdíly v prokvašování se dlouhým vedením v propagačních stanicích značně zmenšily. U použitých kvasnic nejsou již tak ostré rozdíly v hloubce prokvašování, neboť v podstatě jde o maximální rozdíl 2 % ve skutečném prokvašení. Je nutno poznamenat, že uvedené druhy várečných kvasnic byly nasazeny po prvé, ale přibližně stejný obraz dávaly i při dalším vedení v provozu pivovaru.

Ukázalo se, že vyšší dextriny a maltotetraosa nejsou pivovarskými kvasinkami zkvasitelné. V jednom případě nastal velmi nepatrný úbytek maltotetraosy, což může být způsobeno i analytickými chybami.

Pokud se týče maltotriosy, v literatuře [9] se uvádí, že ji nezakvašují všechny druhy pivovarských kvasinek, nýbrž jen kmeny, které patří mezi hlubokoprokvašující. Pokusy však ukázaly, že maltotriosa se zkvašovala všemi typy použitých kvasnic, ačkoli nebyly všechny hlubokoprokvašující. V literatuře s rovněž uvádí, že největší část ze zkvasitelného podílu maltotriosy se zkvašuje teprve při dokvašování piva. V pokusech se však ukázalo, že část maltotriosy se zakvašuje již při hlavním kvašení, tedy ještě za přítomnosti jednodušších cukrů. Zjistilo se, že se celkem zkvašuje asi třetina původního obsahu maltotriosy.

Obsah maltosy v mladině byl 3,0 až 3,3 %, její převážná část zkvasila během hlavního kvašení



a dokvašování. V hotovém pivě jí bylo 0,1 až 0,4 %. Nejnížší množství maltosy bylo ve vystavovaném pivě pivovaru v Bytči, nejvyšší v pivě pivovaru v Brně u várečných „Smíchov“. Hlubší prokvašení maltosy v prvním závodě lze vysvětlit poměrně vysokou teplotou hlavního kvašení a dokvašování.

Při výrobě piva za přídavku rýže se objevuje na chromatogramu mladiny mezi maltosou a sacharosou fialově zbarvená skvrna neznámého cukru. Z jeho polohy a zbarvení detekčním činidlem usuzujeme, že jde o cukr, který je maltose strukturně blízký. Od maltosy se však odlišuje tím, že není pivovarskými kvasinkami zkvasitelný a přechází proto v původním množství až do hotového piva. Poněvadž tento cukr nebyl identifikován v mladině vyrobené bez přídavku rýže, vznikla domněnka, že vznikl působením amylázy na nesladový škrob. Týž cukr se objevil též zcukřováním rozpustného škrobu při stanovení diastatické mohutnosti podle Windische-Kolbacha, čímž byla domněnka potvrzena. Nepodařilo se však zjistit, ve kterém stadiu tento cukr ve varně vzniká, neboť ho na chromatogramu pravděpodobně překrývá maltosa, která je obsažena ve velké koncentraci.

Při pokusech se zjistilo, že veškerá v mladině obsažená sacharosa mizí již v prvních několika hodinách po zakvašení. Tento zjev potvrzuje údaje literatury [19], že kvasnice kromě invertázy obsahují ještě sacharosovou fosfatázu, která umožňuje přímé kvašení sacharosy.

Glukosu a fruktosu obsahují všechny zkoumané mladiny, při čemž poměr glukosy k fruktose je 2:1. Velmi malý obsah glukosy byl v mladině uvařené v pokusném pivovaru, což se vysvětluje tím, že se používalo vyšších cukrotvorných teplot a že se při této varce nepoužilo rýže. Glukosa i fruktosa zkvasila ve všech pokusech již v první polovině hlavního kvašení. Ačkoli je fruktosa v mladině méně, zkvašovala pomaleji než glukosa a přetrvávala již v některých případech až o den déle. Tuto okolnost lze vysvětlit tím, že fruktosa difun-

duje buněčnou blanou kvasinek pomaleji než glukosa [5].

Z porovnání výsledků mezi hlavním kvašením v kádích otevřených a uzavřených (pivovar v Bytči), je zřejmé, že není podstatných rozdílů při zkvašování glycidů. Menší zjištěné difference lze vysvětlit odlišnými teplotami hlavního kvašení a různým složením mladiny.

Kruhová chromatografie se v literatuře zavrhuje pro udánlivě malou přesnost kvalitativních a kvantitativních stanovení. Z výsledků této práce lze však usoudit, že několikavýšečová kruhová chromatografie upravená podle popisu by mohla být vhodným doplňkem pro pivovarskou analytiku glycidů a pro běžnou kontrolu výrobních postupů. Jejimi přednostmi jsou jednoduchost, přesnost a rychlost při kvalitativním stanovení glycidů.

#### Literatura

- [1] LUERS H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei, Norimberk 1950.
- [2] Kolektiv autorů: Technologie sladu a piva, Praha 1954.
- [3] HAIS I. M., MACEK K.: Papírová chromatografie, Praha 1954.
- [4] STOCKLI, A.: Die Papierchromatographie und ihre Bedeutung für die brauereibiologische Forschung. Shw. Brauerei Rundschau 67 (1956) 1.
- [5] PHILLIPS, A. W.: Zužitkování uhlohydrátů ve sladinně kvasinkami. J. Inst. Brew. LXI (1955) 122.
- [6] VENNERT, H.: Rychlá metoda stanovení redukujících cukrů papírovou chromatografií. Naturwiss. 42, 179—180.
- [7] PEACH, K., TRACY, M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin 1955.
- [8] WINKLER, R.: Chromatografické zjišťování cukrů při pivovarském varním procesu. Kvasný průmysl 2 (1956) 196.
- [9] GREEN, STONE: Zkvasitelnost trisacharidů mladiny, jakožto příčina kolísajícího stupně prokvašení. Wall. Lab. Con. (1952) 347.
- [10] JIROTKA, J.: Výroba sladu a piva. Praha 1956.
- [11] Kolektiv autorů: Chromatografie. Praha 1952.
- [12] LODDER, J.: The Yeasts a taxonomic study. Amsterdam 1952.
- [13] LHOTSKÝ, A.: Technická kontrola sladařské a pivovarské výroby. Praha 1957.
- [14] MALCEV, P. M.: Technologie i oborodovanie pivovarenovo proizvodstva. Moskva 1948.
- [15] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A., VAVRUCHOVÁ A., NOVÁKOVÁ D.: Význam správného pěstování technických mikroorganismů. Průmysl potravin 2 (1951) 305.
- [16] KUDRÍAVCEV, V. I.: Systematika droždí, Moskva 1954.
- [17] HORST MEY: Handbuch der Mälzerei-Technologie. Norimberk 1951.
- [18] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasenie oligosacharidov. Kvasný průmysl 3 (1957) 3.
- [19] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Úvod do biochemie pre potravinarov. (Vysokoškolské skriptá), Bratislava 1956.