

Polarimetrické stanovení sacharosy a rafinosy v melase dvojí enzymatickou hydrolysou

JAN LACINÝ, Pražské lihovary n. p., Praha

547.458.2/3:535.568

V řepné melase jsou kromě sacharosy a rafinosy přítomny i jiné opticky aktivní látky, které při starší metodě Creydtově [1] (s jednou kyselou hydrolysou a polarisací v kyselém prostředí) a metodě podle Jacksona a Gillisové [4] (s jednou kyselou hydrolysou a polarisací v neutrálním prostředí) a konečně při metodě podle Hudsona [2] a j. (s jednou enzymatickou hydrolysou) znemožňují správné polarimetrické stanovení obou cukrů.

Článek proto podrobně popisuje metodu, u které je tento nedostatek odstraněn. Její princip navrhli Hudson a Harding r. 1915 [3] a pro rozbor řepných produktů ji rozpracovali Paine a Balch r. 1925 [6]. Podle Mezinárodní komise pro jednotné metody cukrovarnické analytiky (Brusel 1949 [18] a Paříž 1954 [21]) je tato t. zv. dienzymatická metoda („two-enzyme method“) doporučena jako jediná standardní metoda pro stanovení sacharosy a rafinosy v řepné melase. V současné době se všeobecně považuje za nejspolehlivější známou metodu a slouží ke kontrole správnosti výsledků ostatních metod.

Přestože dienzymatická metoda byla vypracována již před třemi desetiletími a je oficiálně uznávána, proniká do analytické praxe v některých zemích velmi pomalu.

V naší literatuře o ní nenalezneme podrobné informace a zmínky jsou vzácné. Souvisí to především s neujasněnými představami o dostupnosti účinných enzymatických preparátů. Proto podávám takový popis provedení, podle něhož lze pracovat v běžně vybavené lihovarské laboratoři s dostupnými potřebami.

Podotýkám ještě, že značná část dosud činěných závěrů o různých vlivech na výtěžek lihu z melasy a hodnocení různých technologických postupů není přesvědčivá, protože není podložena spolehlivými analytickými údaji o skutečném obsahu sacharosy a rafinosy v melase. Důsledky toho jsou dalekosáhlé a dosud nedostatečně kriticky zhodnocené.

Použití metody

Dienzymatickou metodou se kontroluje správnost ostatních metod a je to základní metoda pro stanovení sacharosy a rafinosy v řepné melase. Žádný důležitý rozbor melasy nelze bez ní provádět.

Vzhledem k rozptylu výsledků a relativní chybě nedoporučuje se ke stanovení rafinosy při obsahu pod 0,5 %

(lze-li pracovat přesnější metodou), jinak je její použití neomezené.

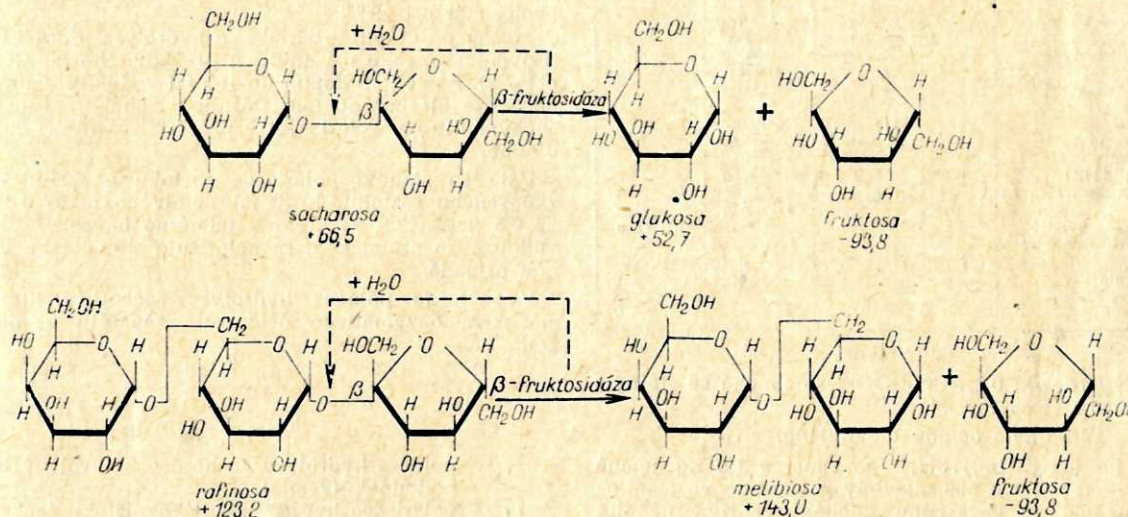
Zjišťuje se jí též polarisace „necukrů“ melasy. Stanovený obsah sacharosy a rafinosy je podkladem k výpočtu zkvasitelného cukru i výtěžku lihu.

Charakteristika metody

Ve vyčísleném roztoku melasy se stanoví přímá polari-

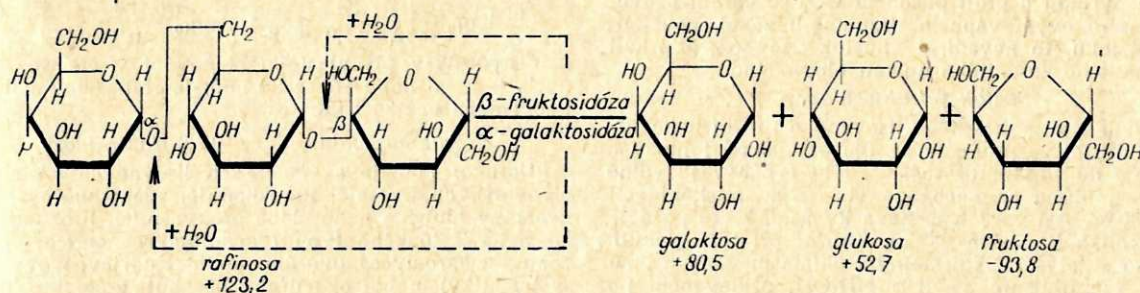
sace a dvě polarisace po hydrolyse cukrů dvěma různými enzymatickými preparáty.

První enzymatický preparát obsahuje účinnou součást β -fruktosidázu (= invertázu, sacharázu), která katalysuje hydrolysu β -fruktosidických vazeb přítomné sacharosy a rafinosy. Sacharosa se hydrolysuje na fruktosu a glukosu, rafinosa na fruktosu a melibiosu.



V druhém enzymatickém preparátu jsou účinnou součástí dva enzymy — β -fruktosidáza a α -galaktosidáza (= melibiáza, rafináza), takže se jím štěpí kromě β -fruktosidických vazeb i α -galaktosidická vazba v rafinose.

Tímto kombinovaným účinkem obou enzymů vzniká z rafinosy fruktosa, glukosa a galaktosa. Sacharosa se hydrolysuje stejně jako v prvním případě na fruktosu a glukosu.



Protože jednodušší cukry vznikající hydrolysou mají jinou polarisaci než cukry původní, lze ze tří zjištěných údajů — přímé polarisace a dvou polarisací po enzymatické hydrolyse — vypočítat tři neznámé: koncentraci sacharosy (Z), rafinosy (R) i optickou otáčivost ostatních přítomných opticky aktivních látek, nazývaných zkráceně též „opticky aktivní necukry“ (N)*.

Výpočet spočívá na třech úvahách:

a) Přímá polarisace (P) je součtem polarisací přítomné sacharosy, rafinosy a „necukrů“:

$$Z + 0,01 a R + N = P$$

b) Hydrolysou sacharosy a rafinosy se změní polarisace roztoku. Výsledná polarisace po hydrolyse β -fruktosidázou (F) je součtem polarisací „necukrů“ a produktů hydrolysy obou cukrů. Změna polarisací sacharosy a rafinosy hydrolysou je známa a tuto závislost lze vyjádřit rovnici:

$$0,01 BZ + 0,01 bR + N = F$$

c) Rozdíl mezi polarisacemi po hydrolyse cukrů β -fruktosidázou (F) a po hydrolyse oběma enzymy (G) závisí jedině na různé otáčivosti směsi cukrů vzniklých částečným a úplným rozkladem rafinosy. Tentýž rozdíl je úměrný koncentraci přítomné rafinosy:

$$0,01 (b - c) R = F - G$$

Číselné hodnoty a význam koeficientů v rovnících vysvětluje tabulka 1.

Polarisace sacharosy, rafinosy a produktů jejich hydrolysy

Látka	Polarisace	$^{\circ}V$	Označení
sacharosa	přímá *	+ 100,00	—
	po enzymatické hydrolyse	— 32,00	B
rafinosa	přímá *	+ 185,2	a
	po částečné enzymatické hydrolyse	+ 96,5	b
	po úplné enzymatické hydrolyse	+ 22,6	c

* Roztok cukru o koncentraci 26,026 g ve 100 ml polarisován v trubici 200 mm dlouhé při 20 °C.

Tabulka 1

Z uvedených tří rovnic se získají, po dosazení konstant a vyřešení, vzorce pro výpočet.

*) Termín „necukry“ nelze brát doslova, protože je v této hodnotě zahrnuta i polarisace po př. přítomných cukrů, jako na př. glukosy a fruktosy (invertního cukru).

Potřeby
Chemikálie a roztoky

Potřebné kvasinky a nejdůležitější chemikálie	Stupeň čistoty	ČSN	Spotřeba	
			pro přípravu enzym. roztoků	pro 1 rozběr
droždí	—	56 6810	1 kg	—
pivovarské kvasnice	—	55 6840	1 kg	—
toluen	č.	66 2110	< 400 ml	asi 0,3 ml
amoniak 25–27 %	č.	68 4275	< 50 ml	—
octan olovnatý	č.	68 6545	asi 200 g	asi 50 g
šfavelan draselný	č.	68 6667	< 50 g	—
kyselina octová	—	—	—	—
ledová	č.	—	≤ 10 ml	—
octan sodný	č.	68 6546	asi 3 g	—
sacharosa	č.	68 6872	13 g	—
rafinosa 5 H ₂ O	č.	—	0,2–0,5 g	—
uhlíkat sodný	—	—	—	—
kalce.	č.	68 5551	asi 1,5 g	—
kyslík olovnatý	p. a.	68 5148	—	asi 17 g
fosforečnan amonný	—	—	—	—
kyselý	č.	68 4600	0,1 g	asi 3 g
aktivní uhlí	—	—	—	—
odbarvovací,	—	—	—	—
carboraffin	—	66 8420	—	asi 0,4 g

Tabulka 2

Thumivý roztok: 0,2N-CH₃COOH se smíchá se stejným objemem 0,2N-CH₃COONa.

Roztok zásaditého octanu olovnatého:

3,0 kg Pb (CH₃COO)₂·3H₂O se smísí s 1,0 kg jemně práškovitého PbO a 500 ml vody a směs se ve smaltované nádobě za občasného míchání zahřívá několik hodin (do zbělení) ve vroucí vodní lázni. Potom se přidají asi 4 l horké vody, zásaditý octan olovnatý se rozpustí, roztok se ochladí a zředí vodou na hustotu 1,26 (55 °B_g). Zpravidla zůstává nevelký nerozpustný zbytek, který se odfiltruje. Roztok se uchovává v láhvi s připojenou byretou a proti působení CO₂ se chrání uzavřením s. natronovým vápnem. Vznikne-li zákal, použitelnost roztoku to neovlivní. — Roztok lze též připravit z práškovitého zásaditého octanu olovnatého.

Roztok β-fruktosidázy

Příprava: 1 kg pekařského lisovaného droždí nebo nasádního droždí se prohněte se 100 až 200 ml toluenu a napěchuje do širokohrdlé asi 5 l láhve. Láhev se volně přikryje a obsah se nechá za občasného míchání stát asi při 30 °C. Asi po 3 h nastává kvašení, které po dalších několika hodinách ustane. Droždí při tom ztekutí. Potom se autolysát zředí stejným objemem vody a opatrně se zneutralisuje asi 3 % NH₄OH, přidávaném po malých dávkách, do pH 6,5–7,0 (zkouší se indikátory, na př. s bromtymolovou modří). Autolysát se nechá stát při 30 °C ještě asi 5 dní, při čemž se neustále udržuje neutrální reakce.

K autolysátu se potom za míchání přidává roztok neutrálního octanu olovnatého (350 g/l) po dávkách asi 20 ml, až se vytvoří sraženina. Olovnaté soli má být malý přebytek, jinak filtrace probíhá velmi pomalu.

Úplnost vysrážení se zkouší v malém zfiltrovaném vzorku nebo tečkovací reakcí s jodidem: na kousek filtračního papíru, pod kterým je papírek napojený roztokem jodidu draselného, se nanese kapka vzorku; vznikne-li zřetelná žlutá skvrna na spodním papírku, ukazuje to na dostatek olovnaté soli.

Vysrážený autolysát se zfiltruje cukrováckými filtry nebo asi desetinasobným filtrem na Büchnerově nálevce.

Ve filtrátu se srazí přebytečná olovnatá sůl (která má inaktivující účinek na enzym) malým přebytkem koncentrovaného (nasyceného) roztoku K₂C₂O₄. Vysrážení olovnaté soli se kontroluje jak již bylo popsáno. Místo K₂C₂O₄ lze použít též H₂S nebo Na₂SO₄, nikoli však fosforečnanů, neboť fosforečnan olovnatý adsorbuje enzym. Sražený roztok se zfiltruje a filtrát se okyslí zředěnou kyselinou octovou na pH 4,7 až 5,0.

Hotový preparát se uchovává pod slabou vrstvou toluenu v lahvích se zabroušenou zátkou ve tmě při normální laboratorní teplotě. Časem se poněkud kalí a později se vylučuje malá sraženina a roztok tmavne. To však nemá vliv na jeho použitelnost k rozběrům. Roztok si uchovává dostatečnou účinnost déle než rok.

Další čištění preparátu je pro daný účel zbytečné. Velmi účinné roztoky nejsou stálejší a jsou potřebné pouze ve zvláštních případech (velmi rychlá hydrolysa). Získají se, na př. ultrafiltrací [5, 11, 16].

Polarimetrické stanovení účinnosti β-fruktosidázy: 6,50 g sacharosy se rozpustí v odměrné baňce na 100 ml ve 40 ml vody, přidá se 10 ml octanového thumivého roztoku a 10 ml zkoušeného roztoku enzymu. Baňka se nechá stát při 20 °C.

Přesně po uplynutí 60 min se hydrolysa přeruší zalísaváním roztoku 0,4 až 0,5 g práškovitého Na₂CO₃ (do pH > 9). Roztok se doplní do 100 ml vodou, promíchá se, nechá se alespoň 10 min stát; je-li zakalen, zfiltruje se suchým filtrem. Polarisuje se při 20 °C v trubici 200 mm dlouhé.

Dále se stanoví polarisace roztoku enzymu: 10 ml zkoušeného roztoku + 10 ml thumivého roztoku + 0,4 až 0,5 g Na₂CO₃ se zředí v odměrné baňce na 100 ml vodou a po promíchání se polarisuje stejně jako v prvním případě.

Vypočte se poločas hydrolysy sacharosy, který je měřítkem enzymatické účinnosti preparátu za daných podmínek:

$$\tau = \frac{18}{\log_{10} \frac{33}{p_1 - p_2 + 8}}$$

τ — poločas hydrolysy sacharosy za zvolených podmínek (v min),

p_1 — polarisace hydrolysovaného roztoku sacharosy

p_2 — po 60 min (ve °V).

polarisace zředěného roztoku enzymu (ve °V).

Příklad: Při stanovení bylo zjištěno $p_1 = -6,10$ °V; $p_2 = +1,00$ °V.

$$\tau = \frac{18}{\log_{10} \frac{33}{-6,1 - 1,0 + 8}} = \frac{18}{\log_{10} \frac{33}{0,9}} = 11,5 \text{ min.}$$

U hydrolysy při vlastním stanovení v melase „přes noc“, t. j. po dobu 16 až 24 hod, je třeba, aby poločas nebyl delší než 30 min.

Roztok α-galaktosidázy + β-fruktosidázy

Příprava: Použije se čerstvých lisovaných nasádních pivovarských kvasnic; nerozhoduje, zda jsou to spodní kvasinky hluboce nebo slabě prokvašující, Frobergského nebo Žateckého typu (*Sacharomyces carlsbergensis* nebo *Sacharomyces uvarum* podle Kudrjavcevy [23] systematicky), neboť oba druhy obsahují α-galaktosidázu.

Je-li třeba předběžně zjistit obsah tohoto enzymu v kvasinkách, postupuje se takto [8]: 4 g zkoušených kvasnic se roztírá s asi 15 kap. toluenu do úplného ztekutí a potom se zjistí účinnost pomocí roztoku melibiosy nebo rafinosy (popis viz dále). Příprava enzymatického roztoku je stejná jako u roztoku β-fruktosidázy.

Stanovení účinnosti β-fruktosidázy je stejné jako u předešlého roztoku.

Stanovení účinnosti α-galaktosidázy redukční metodou — 0,20 g hydrátu rafinosy a 0,1 g NH₄H₂PO₄ se rozpustí v odměrné baňce na 100 ml v asi 40 ml pitné vody, přidá se asi 0,5 g droždí v podobě suspence v 5 až 10 ml vody a roztok se nechá kvasit při 25 až 30 °C 1 až 2 dny. Zkvasí fruktosa a v roztoku zůstane nezkvašená melibiosa.

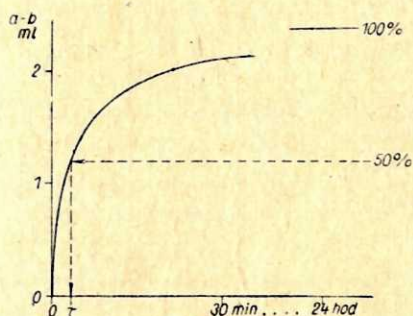
Kvasinky se potom usmrtí 10 min sterilací v páře, roztok se vychladí na 20 °C, doplní do 100 ml vodou a promíchá.

50 ml roztoku se odpipetuje (bez vyplachování pipety — musí zbyť rovněž 50 ml) do menší suché baňky, přidá se asi 0,3 g práškovitého Na₂CO₃ a po rozpuštění ještě 5,0 ml zkoušeného preparátu (roztok musí mít nakonec pH > 9). Po promíchání se z tohoto roztoku pipetuje 5 ml ke stanovení redukujících látek upravenou titrační metodou podle Nizovkina + Jemeljanovové [22]. (Redukující látky lze stanovit i jinou vhodnou metodou.) Při titraci se spotřebuje α ml zkvašeného roztoku cukru.

Ke zbývajícím 50 ml zkvašeného roztoku v odměrné baňce se přidá 5,0 ml zkoušeného preparátu, asi 5 kap.

toluenu, roztok se promíchá a nechá stát v zakryté baňce při 20 °C. Melibiosa se postupně hydrolyzuje na glukosu a galaktosu a tím vzrůstá redukční schopnost roztoku. Po asi 10, 30, 60 min a na konec zpravidla druhý den, se z roztoku odebírají malé podíly (5 ml) ke stanovení redukujících látek. Hydrolysa se zakončí přímo při stanovení v okamžiku, kdy se vzorek přidá k vroucímu alkalickomědnatému roztoku. Při titraci se spotřebuje b ml standardního roztoku cukru.

Rozdíly spotřeb $a - b$ jsou úměrné množství hydrolysované melibiosy. Průběh hydrolysy se znázorňuje diagramem, v kterém se na jednu osu nanese doba hydrolysy a na druhou osu rozdíly $a - b$. „Poločas“ (zjištěný z diagramu) nemá být při hydrolyse „přes noc“ delší než 30 min.



Průběh hydrolysy melibiosy α -galaktosidázou.
Zjištění „poločasu“ τ z diagramu

Chromatografická kontrola účinnosti α -galaktosidázy: 0,5 g hydrátu rafinósy se rozpustí v 10 ml vody, přidá se 1 ml octanového tlumivého roztoku, 1,0 ml zkoušeného preparátu a asi 3 kapky toluenu. Roztok se zamíchá a nechá stát při 20 °C. Vzorky se odebírají asi po 2, 4, 8, 16 a 24 hod a nanášejí se na chromatografický papír třikrát po sobě; skvrna se vždy podrží chvíli nad hrdlem láhve s amoniakem a usuší pod infralampou. Na papír se nanese ještě vzorek standardních cukrů (rafinósy, sacharósy, glukósy). Rozpouštědlem je na př. horní fáze směsi n -butanol+kys. octová+voda (4+1+5); rozdělení je dobré po 3 dnech. Detekce se provede některým činidlem s reakcí na aldósy, na př. kyselým ftalanem anilinu [20].

Na chromatogramu se nesmí objevit skvrny melibiosy a rafinósy a ani ve vzorcích hydrolysovaných jen polovinu doby používaných při rozborech.

Není-li k dispozici čistá rafinosa, kontroluje se účinnost enzymatického preparátu chromatografickým sledováním hydrolysy cukrů přímo ve vzorku melasy s vyšším obsahem rafinósy. Při tomto sledování účinnosti je třeba vzít v úvahu citlivost chromatografické metody.

Nádoby a přístroje

Odměrné baňky Kohlrauschovy (nebo Stiftovy) na 400 ml a 100 ml (ČSN 70 3161). Odměrné baňky na 100 ml, určené ke stanovení polarisace po hydrolyse, je nutno předem překalibrovat odpipetováním dvakrát po 50 ml vyčísleného roztoku melasy 20 °C teplého. Na hrdle baňky se tento zjištěný obsah označí zvláštní značkou (je o něco menší než 100 ml).

Pipety na 10 ml a 50 ml I. třídy; *byreta* na 100 ml (bez kohoutku; pro roztok zásaditého octanu olovnatého).

Filtrační sklenky (ČSN 70 3319 a 70 3320) a cukrovarnické nálevky (ČSN 70 3074).

Teploměry tyčinkové nebo obalové 0 + 50 °C, dělení 0,5–1 °; teploměry normálové (přezkoušené) 0 + 50 °C, dělení 0,1 °.

Polarimetr klinový (sacharimetr) se stupnicí podle Ventzkeho s příslušenstvím. Překontroluje se (při teplotě blízké 20 °C) správnost nulového bodu a polarisace okolo +50 °V a –100 °V (standardními křemennými deskami). [17]

Polarisační trubice 200 mm: obvyčejné (nejlépe s tubusem) a s temperovacím pláštěm. Délka trubic musí být přezkoušena (200 ± 0,05 mm). Sklíčka k polarisačním trubicím musí být též přezkoušena: nesmí polarisovat sama

o sobě, ani při normálním přitažení hlavici, ani při otáčení trubice kolem podélné osy. [17]

Ultrathermostat Höpplerův nebo jiné spolehlivé zařízení, umožňující temperovat polarisační trubici s přesností 0,1 °C. Pro měření teploty se doporučuje zařadit těsně za polarisační trubici malou izolovanou průtokovou nádobku s normálovým teploměrem.

Skříňový *thermostat* pro teplotu asi 30 °C.

Pracovní postup

Příprava vzorku: Vzorek melasy se důkladně promíchá. Neobsahuje-li melasa mnoho usazeného vykrystalovaného cukru a není-li příliš zpěněná, použije se zamíchaného vzorku k rozboru přímo. Obsahuje-li však usazený cukr, který nelze spolehlivě rozmíchat, nebo je příliš zpěněná, připraví se zprvu roztok 1 váh. díl melasy + 1 váh. díl vody z alespoň 300 g melasy nebo z celého vzorku.

Čeření melasy: Naváží se 104,10 g (4 N-množství) nefeděné melasy nebo dvojnásobné množství melasy zředěné 1 + 1 vodou. Navážka se kvantitativně spláchne do odměrné baňky na 400 ml studenou nebo teplou vodou a za kroužení se dokonale rozpustí (na dně nesmí zůstat nerozpuštěný zbytek). Příliš alkalické melasy nebo melasy kyselé se přibližně zneutralisují zředěnou kyselinou nebo hydroxydem. Je-li roztok zpěněný, odpění se zahříváním v teplé vodní lázni. Pěna na povrchu roztoku se odstraní několika kapkami přiboudliny.

K odpěněnému roztoku melasy se přidá za kroužení 80 ml roztoku zásaditého octanu olovnatého. Potom se roztok vytemperuje na 20 °C, doplní do 400 ml vodou a po důkladném promíchání převrácením a třepáním se zfiltruje suchým cukrovarským filtrem. První podíl filtrátu (asi 20 ml) se odlije.

K filtrátu se přidá po malých dávkách a za míchání jemně práškovitý $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v malém přebytku — spotřebuje se asi 1 g pro 100 ml filtrátu. Úplnost vysrážení olovnatých iontů se zkouší kapkovými reakcemi na papírku s jodidem (nesmí vznikat žlutá skvrna). Po vysrážení olovnatých solí se roztok zfiltruje suchým cukrovarským filtrem. První podíl filtrátu se odlije. Je-li filtrát zakalen, svědčí to zpravidla o nedostatku fosforečnanu. Filtrát má mít pH asi 5 — je regulováno přidáním $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — jak to odpovídá optimu působení obou enzymů.

Stanovení přímé polarisace: Filtrátem se naplní polarisační trubice 200 mm dlouhá a roztok se polarisuje při 20 °C. Polarise se nastavuje a odečítá vícekrát po sobě s přesností 0,05 °V tak dlouho, až se dosáhne nejméně pěti čtení, která se od sebe neliší více než 0,05 °V. Ze všech čtení se vypočte průměr na dvě desetinná místa (= P). Má-li první čtení značnou odchylku, vyloučí se a do průměru se nepočítá (neúplná adaptace zraku při prvním nastavení). Tento způsob měření se lodružuje i při všech dalších polarisacích.

Poznámka: U zínvertovaných melas (nad 5 % red. látek) se stanoví přímá polarisace ve vyčísleném roztoku, zředěném 1 + 1 vodou (50/100 ml). Polarise se velmi pečlivě (10×) a průměr se vynásobí dvěma.

Stanovení polarisace po hydrolyse β -fruktosidázou: 50 ml filtrátu se napipetuje do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 10 ml roztoku β -fruktosidázy a asi 3 kapky toluenu. Baňka se přikryje a nechá stát asi při 30 °C do druhého dne (přesněji: tak dlouho, aby hydrolysa proběhla zaručeně do konce). Teplota 30 °C není závazná — nedoporučuje se však hydrolysovat pod 20 °C. (Optimální účinek enzymů je asi při 50 °C.)

Po ukončení hydrolysy se roztok vytemperuje na 20 °C, doplní vodou k oprávené značce a přidá se asi 0,2 g aktivního uhlí. Roztok se důkladně promíchá a zfiltruje suchým cukrovarnickým filtrem. První podíl filtrátu se odlije.

Filtrátem se naplní 200 mm polarisační trubice s temperovacím pláštěm. Asi po 15 min temperování protékající vodou na 20,0 ± 0,1 °C se zjistí polarisace. Průměr čtení (= F') se vypočte na dvě desetinná místa.

Stanoví se polarisace 10 ml roztoku β -fruktosidázy, zředěného na 100 ml, ve 200 mm trubici při 20 °C. (Pozor na znaménko!) Vypočte se průměr čtení (= f).

Polarisace po hydrolyse β -fruktosidázou (= F) se vypočte podle vzorce:

$$F = 2(F' - f)$$

Hodnoty F' a f se sčítají algebraicky.

Příklad: Při stanovení bylo zjištěno $F' = -7,43^{\circ}\text{V}$ a $f = +1,10^{\circ}\text{V}$. $F = 2(-7,43 - 1,10) = -17,06^{\circ}\text{V}$.

Stanovení polarisace po hydrolyse oběma enzymy: 50 ml filtrátu se napipetuje do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 10 ml roztoku α -galaktosidázy + β -fruktosidázy a dále se postupuje stejně jako v předchozím případě. Obě hydrolysy se provádějí souběžně.

Vypočte se průměr čtení při polarisaci na dvě desetinná místa (= G').

Polarisace samého roztoku enzymů se stanoví rovněž stejně jako v předešlém případě, avšak s roztokem α -galaktosidázy + β -fruktosidázy. (Pozor na znaménko!) Vypočte se průměr čtení (= g).

Polarisace po hydrolyse α -galaktosidázou a β -fruktosidázou (= G) se vypočte podle vzorce:

$$G = 2(G' - g)$$

Hodnoty G' a g se sčítají algebraicky.

Výpočet

Koncentrace sacharosy a rafinosy v melase i polarisace „necukrů“ se vypočte podle těchto vzorců:

$$Z = 0,7575 P - 1,667 F + 0,9097 G + 0,004 (80 - S)$$

$$R = 1,354 (F - G)$$

$$N = P - Z - 1,852 R$$

Z — koncentrace sacharosy v melase (%)

R — koncentrace rafinosy v melase (%)

P — přímá polarisace ($^{\circ}\text{V}$)

F — polarisace po hydrolyse cukrů β -fruktosidázou ($^{\circ}\text{V}$)

G — polarisace po hydrolyse cukrů oběma enzymy ($^{\circ}\text{V}$)

S — sacharisace melasy (%). Její vliv je často zanedbatelný

N — polarisace „necukrů“ melasy za podmínek stanovení přímé polarisace P ($^{\circ}\text{V}$). Je-li v melase glukosa a fruktosa, je jejich polarisace zahrnuta též v této hodnotě.

S hodnotami F a G se počítá algebraicky. Vzhledem k rozptylu se výsledky při běžné práci zaokrouhlují na jedno desetinné místo.

Příklad výpočtu: Při rozboru byla zjištěna přímá polarisace $P = 50,50^{\circ}\text{V}$ a polarisace po hydrolyse: $F = -17,06^{\circ}\text{V}$; $G = -18,00^{\circ}\text{V}$. Sacharisace melasy je 79 %, takže její vliv je možno zanedbat.

$$Z = 0,7575 \cdot 50,50 + 1,667 \cdot 17,06 - 0,9097 \cdot 18,00 = 50,32 \%$$

$$R = 1,354 (-17,06 + 18,00) = 1,27 \%$$

$$N = 50,50 - 50,32 - 1,852 \cdot 1,27 = -2,17^{\circ}\text{V}$$

Stanovený obsah sacharosy a rafinosy může sloužit jako podklad k výpočtu t. zv. *zkvasitelného cukru*:

$$C = Z + 0,34 R + 0,95 A$$

C — zkvasitelný cukr vyjádřený ekvivalentním množstvím sacharosy (%)

A — obsah zkvasitelných monosacharidů v melase (= glukosy, fruktosy — %). Neobsahuje-li melasa redukující látky, nejsou v ní glukosa a fruktosa přítomny a zkvasitelný cukr se vypočte pouze ze sacharosy a rafinosy. V opačném případě je nutno glukosu a fruktosu stanovit nějakou spolehlivou metodou, na př. chromatograficky.

Spolehlivost metody

Shodnost výsledků. Odchyly od průměru nemají být větší než $\pm 0,15\%$ u sacharosy a rafinosy a než $\pm 0,15^{\circ}\text{V}$ u polarisace „necukrů“. To znamená, že mezi dvěma souběžnými stanoveními nemá být rozdíl větší než $0,3\%$ u sacharosy a rafinosy a než $0,3^{\circ}\text{V}$ u polarisace „necukrů“. U zkvasitelného cukru nemá být za nepřítomnosti hexos rozdíl větší než $0,25\%$.

Zdroje chyb. Výsledky jsou z pěti nebo čtyř polarisací a jsou značně závislé na chybách jednotlivých měření. Pro lepší objasnění vztahu mezi chybami při stanovení a mezi chybami ve výsledku slouží *tabulka 3*. Analytik v ní snadno vyhledá, jak přesný má být ten který úkon.

V tabulce jsou chyby při jednotlivých úkonech, z nichž každá sama o sobě by měla při průměrném složení melasy za následek stejnou chybu ve výsledcích ($0,1\%$ nebo $0,1^{\circ}\text{V}$).

Souvislost chyb

Úkon	Chyba při provádění, která způsobí chybu:			
	+ 0,1 % sacharosy	+ 0,1 % rafinosy	+ 0,1 $^{\circ}\text{V}$ polarisace „necukrů“	+ 0,1 % zkvasit. cukrů
váhaování melasy (4 N)	+ 0,25 g	+ 5 g	+ 3 g	+ 0,2 g
doplnění baňky (400 ml)	— 1 ml	— 20 ml	— 15 ml	+ 0,25 ml
pipetování pro F (50 ml)	+ 0,2 ml	— 0,2 ml	+ 0,3 ml	— 1 ml
doplnění baňky pro F (100 ml)	— 0,4 ml	+ 0,4 ml	— 0,7 ml	— 0,5 ml
pipetování pro G (50 ml)	— 0,3 ml	+ 0,2 ml	— 4 ml	— 0,6 ml
doplnění baňky pro G (100 ml)	+ 0,6 ml	— 0,4 ml	+ 0,8 ml	+ 1,3 ml
odečtení přímé polarisace	+ 0,13 $^{\circ}\text{V}$	nezávisí	+ 0,4 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,13 $^{\circ}\text{V}$
odečtení přímé polarisace	— 4 $^{\circ}\text{C}$	nezávisí	— 12 $^{\circ}\text{C}$	— 4 $^{\circ}\text{C}$
odečtení polarisace F'	— 0,03 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,04 $^{\circ}\text{V}$	— 0,06 $^{\circ}\text{V}$	— 0,04 $^{\circ}\text{V}$
temperování při stanovení F'	— 0,2 $^{\circ}\text{C}$	+ 0,25 $^{\circ}\text{C}$	— 0,4 $^{\circ}\text{C}$	— 0,3 $^{\circ}\text{C}$
odečtení polarisace f	+ 0,03 $^{\circ}\text{V}$	— 0,04 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,06 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,04 $^{\circ}\text{V}$
odečtení polarisace g	+ 0,05 $^{\circ}\text{V}$	— 0,04 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,03 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,11 $^{\circ}\text{V}$
temperování při stanovení G'	+ 0,4 $^{\circ}\text{C}$	— 0,25 $^{\circ}\text{C}$	+ 0,2 $^{\circ}\text{C}$	+ 0,8 $^{\circ}\text{C}$
odečtení polarisace g	— 0,05 $^{\circ}\text{V}$	+ 0,04 $^{\circ}\text{V}$	— 0,03 $^{\circ}\text{V}$	— 0,11

Tabulka 3

Kromě těchto vyčíslených vlivů mohou být i jiné zdroje chyb. Nejčastěji to je nestejnorodost vzorku způsobená vykřystalizovaným cukrem nebo zpěněním melasy. Polarimetr, trubice i sklička musí být přezkoušeny; sklička se nesmí hlavicí silně přitahovat, protože vnitřní pnutí může způsobit polarisaci. Polarise se nesmí odečítat pouze jednou, ale vícekrát. I nepatrně zkalené roztoky značně zhoršují pozorování při polarisaci. Nesmí se použít velkého množství aktivního uhlí při odbarvování roztoku — roztok musí zůstat vinově žlutý — neboť by se tím mohla změnit polarisace. Teploměr k temperování u polarisaci F' a G' musí být správný; teplotu nutno měřit tak, aby skutečně odpovídala teplotě polarisovaného roztoku. Při hydrolyse je nutno použít takového času, aby proběhla bezpečně do konce; při tom je nutno dodržovat aseptické podmínky. Je nepřijatelné používat enzymatických roztoků, jejichž účinnost nebyla přezkoušena.

Správnost výsledků. Různí autoři potvrdili (viz citované práce), že výsledky dienzymatické metody odpovídají skutečnému obsahu sacharosy a rafinosy v melase. Rozdíl mezi použitými a nalezenými množstvími těchto cukrů, přidávaných k necukrům melasy, jsou v mezích rozptylu metody. Metodě tedy nevádí přítomnost aminokyselin ani jiných látek, běžně obsažených v řepných melasách.

Jedinou známou látkou, která způsobuje ve výsledcích chyby, je kestosa (= trisacharid složený ze dvou zbytků fruktosy a jednoho zbytku glukosy), která byla zjištěna v menších množstvích v některých melasách. Přítomnost $0,1\%$ kestosy se projeví zdánlivým zvýšením obsahu sacharosy o $0,08\%$; na stanovení rafinosy kestosa vliv nemá. Protože je kestosa úplně zkvasitelná, znamená přítomnost $0,1\%$ zdánlivé zvýšení zkvasitelného cukru pouze o $0,023\%$. (Tyto vztahy byly vypočteny na základě Runecklesových údajů.) [19]

Trvání stanovení

Připraví se vyčíslený roztok, stanoví se přímá polarisace a polarisace f a g , nasadí se vzorky k hydrolyse, což trvá asi 2 hod. Druhý den se stanoví polarisace F' a G' a provedou se výpočty (asi za 1 hodinu). Mezitím je doba nutná k hydrolyse — zpravidla 16 až 24 hod.

ВЫВОДЫ

В статье описан метод, которым можно определить действительное содержание сахарозы и рафинозы в свеклосахарной патоке. Для гидролиза сахаров применяются энзиматические препараты, которые готовятся простым способом из пекарских дрожжей и пивоваренных дрожжей низового брожения. Гидролиз продолжается около 16 часов (в течение ночи). Колебания между результатами параллельных определений не должны превышать 0,3 %.

Содержание сахарозы и рафинозы необходимо знать для расчета сбраживаемого сахара. Описанным методом получаются более надежные результаты для определения выхода спирта из разных свеклосахарных патоk, чем методами применяемыми до настоящего времени.

ZUSAMMENFASSUNG

In dem Artikel wird eine Methode beschrieben, mittels welcher der wirkliche Inhalt an Saccharose und Raffinose in der Rübenzuckermelasse bestimmt werden kann. Zur Hydrolyse der Zucker werden enzymatische Präparate verwendet, welche aufgrund eines einfachen Verfahrens aus der Bäckereihefe und der untergärigen Bierhefe hergestellt werden. Die Hydrolyse dauert cca 16 Stunden (über Nacht). Die Differenz zwischen den Ergebnissen paralleler Bestimmungen soll 0,3 % nicht überschreiten.

Der Saccharose- und Raffinosegehalt ist für die Berechnung des vergärbaren Zuckers unentbehrlich. Durch Anwendung der beschriebenen Methode werden exaktere Grundlagen für die Bestimmung der Spiritus-Ausbeuten aus verschiedenen Rübenzuckermelassen erzielt als mit den bisher benützten Methoden.

Literatura

- [1] CREYDT R.: Die quantitative Bestimmung der Raffinose in den Produkten der Zuckerfabrikation; Deutsch-Zuckerind. 11 (1886) 758
- [2] HUDSON C. S.: Quantitative determination of cane sugar (sucrose); J. Soc., chem. Ind. Lond. 29 (1910) 443
- [3] HUDSON C. S. + HARDING T. S.: The estimation of raffinose by enzymotic hydrolysis; J. amer. chem. Soc. 37 (1915) 2193—2198
- [4] JACKSON R. + GILLIS C. L.: Die doppelte Polarisationsmethode zur Bestimmung der Saccharose und der Wert des Clerget-Divisors; Z. Ver. deutsch. Zucker-Ind. 70 (1920) 521—594
- [5] REYNOLDS F. W.: The rapid analysis of sugars. Purification and concentration of enzyme solutions; Ind. engng Chem. 16 (1924) 169—172
- [6] PAINE H. S. + BALCH R. T.: Application of enzymes to beet sugar factory control; Ind. engng Chem. 17 (1925) 240—246
- [7] PAINE H. S. + BALCH R. T.: Clerget-invertase hydrolysis constants of sucrose and raffinose; J. amer. chem. Soc. 49 (1927) 1019—1028
- [8] WEIDENHAGEN R.: Zur Kenntnis der Melibiase I.; Z. Ver. deutsch. Zucker-Ind. 77 (1927), 696—708
- [9] KINDT G. G.: Formula di Clerget per l'inversione diastatica e sua applicazione nel controllo analitico dei prodotti di lavorazione; Ind. saccar. Ital. 28 (1935) 571—574
- [10] SALANI R. + KINDT G. G. + D'ORAZI G.: La determinazione del saccarosio nei prodotti di zuccherificio; Ind. saccar. Ital. 31 (1938) 265—273
- [11] BROWNE C. A. + ZERBAN F. W.: Physical and chemical methods of sugar analysis; Willey (New York) 1941 — Chapman et Hall (London) 1941
- [12] SALANI R. + KINDT G. G. + PULIGA M.: La determinazione del saccarosio reale, del raffinose e delle sostanze otticamente attive in melassi di provenienza varia; Ind. saccar. Ital. 34 (1941) 29—34
- [13] SALANI R. + KINDT G. G. + MAGNANI M.: La determinazione del saccarosio nelle soluzioni zuccherine impure; Ind. saccar. Ital. 34 (1941) 164—172
- [14] SALANI R. + KINDT G. G.: La determinazione del contenuto in saccarosio reale nei melassi di bietola; Ind. saccar. Ital. 34 (1941) 279—288
- [15] ZABLINSKY K. — WOLF A.: Die Ermittlung des wirklichen Saccharose- und Raffinosegehaltes und der Drehung der Nicht-zuckerstoffe in Melasse unter besonderer Berücksichtigung des enzymatischen Inversionsverfahrens; Z. Wirtschaftgr. Zucker-industrie. 92 (1942) 160—178
- [16] LEPPER H. A. et al. (red.): Official and tentative methods of the Association of Official Agricultural Chemists, 6th ed., A. O. A. C. (Washington) 1945
- [17] ŠANDERA K.: Polarisční přístroje v analytické, tovární a vědecké laboratoři; Vesmír (Praha) 1946
- [18] International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, Report of the proceedings of the tenth session; Internat. Sugar. J. 52 (1950) 187
- [19] DE WHALLEY H. C. S.: Kestose and sugar losses; Internat. Sugar J. 54 (1952) 127
- [20] HAIS I. M. + MACEK K. a spol.: Papirová chromatografie; Nakl. ČSAV (Praha) 1954
- [21] International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, Report of the proceedings of the eleventh session; Internat. Sugar. J. 57 (1955) 290
- [22] LACINÝ J.: Stanovení redukujících látek v dokvašené melasové zápaře; Kvasný průmysl 2 (1956) 232—233
- [23] KUDRIJAVEV V. I.: Sistematika drožžej; Izd. AN SSSR (Moskva) 1954
- [24] GOLDFARB R. I., DANILENKO P. L., NAUMENKO V. G.: Opre-delenije sacharov v patoke; Trudy KF VNIISP, 2 (1955) 129—140