

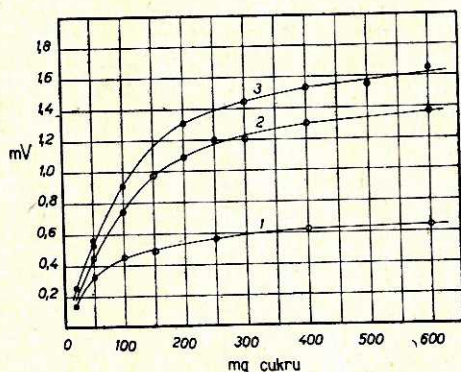
Biokonduktometrická detekce zkvasitelných cukrů při výrobě piva

JOSEF DYR, JOSEF MOŠTEK

Vysoká škola chemicko-technologická, katedra kvasné chemie a technologie, Praha 663.4:545.38:547.456/458

M. Drachovská a K. Šandera [1, 4] zjistili při sledování účinku organických a anorganických látek a jedů na suspensi droždí, že v živném roztoku má suspence droždí krátkou latenční periodu (1 až 10 min), po ní následuje 10 až 15 min úbytku vodivosti a pozvolný vzestup vodivosti začíná v okamžiku počínajícího kvašení. Upozornili na možnost využití tohoto nového zjevu k indikaci zkvasitelných cukrů a k prohloubení studia počátečních fází kvašení. Naši snahou bylo sledovat biokonduktometrickou detekci zkvasitelných cukrů jejich změny při výrobě piva.

Závislost elektrické vodivosti na čase vyjadřují tzv. MK-křivky, kde M je čas v minutách a K elektrická vodivost (konduktivita), která se zaznamenává převážně v úměrných hodnotách (mV , převratné hodnoty ohmů nebo v absolutních jednotkách).



Obr. 1 — Kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení zkvasitelných cukrů biokonduktometrickou detekcí mV — pokles vodivosti v milivoltech na křivce MK po přidání zkvasitelných cukrů.

- 1 — kalibrační křivka glukosy, pekařské droždí.
- 2 — kalibrační křivka maltosy, pivovarské kvasinky.
- 3 — kalibrační křivka glukosy, pivovarské kvasinky.

Pro vyjádření účinku prostředí na konduktivitu K za dobu M (v minutách) použili citovaní autoři vztahu:

$$K = A (1 - e^{-(a \cdot M)^b}) + K_0$$

kde:

- A — konečná hodnota elektrické vodivosti,
 - a, b — faktory určující polohu inflexního bodu (a) a strmost křivky (b),
 - M — čas v minutách,
 - K_0 — původní vodivost samotné suspence droždí.
- Konečnou limitní vodivost*

$$K = K_0 + A$$

lze vyjádřit buď v %, v $\text{ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, nebo v hodnotách úměrných (mV).

Vzrůst vodivosti s časem

$$\frac{dK}{dM} = \text{ukazatel účinnosti prostředí, s omezením}$$

dříve diskutovanými výhradami [2].

Část experimentální

Měřicí aparatura:

Bylo použito aparatury popsané a schematicky znázorněné v práci [1].

Metodika:

Do elektrodové nádoby bylo odměřeno 110 ml destilované vody a přidáno 20 g droždí (sušina 28 až 30 %). Při indikaci pivovarskými kvasinkami se používalo takového množství, aby obsahovalo rovněž 5,5 až 6 g sušiny. Po vyrovnání vodivosti (3 až 5 min) přidáván asimilovatelný (různé zkvasitelné cukry) nebo neasimilovatelný (škrob, glycerol a nezkvasitelné cukry) substrát, resp. jejich směs.

Všechna dále uvedená data se vztahují:

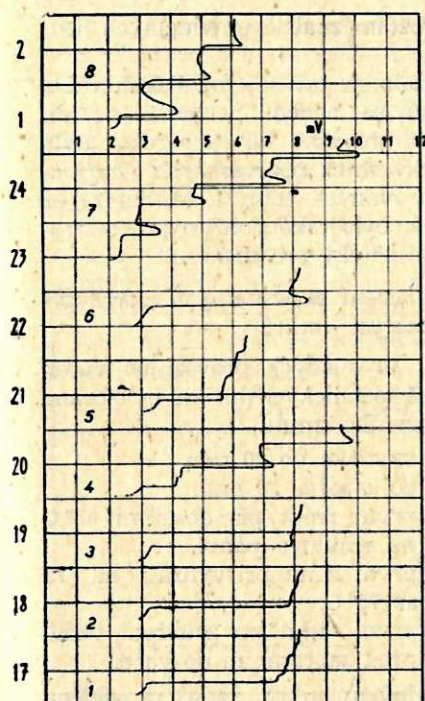
1. asi na 110 ml roztoků + 20 g čerstvého pekařského droždí (28 až 30 % sušiny, tj. 5,5 až 6 g sušiny droždí);
2. na stejný konečný objem 130 ml s odpovídajícím množstvím sušiny hustých, dobře propraňých pivovarských kvasinek (40 až 50 g).

Zkoušení detekce zkvasitelných cukrů:

Různá množství a různé druhy cukrů dávají typické MK-křivky. Nezkvasitelné cukry a alkoholy (manitol, sorbitol, glycerol apod.) nemají vliv na tvar křivky elektrické vodivosti v mezích 10 až 600 mg (obr. 2, křivka 1, 2, 3) a zejména nepůsobí konduktometrickou depresi [1, 2]. Galaktosa kvasí neochotně (obr. 2, křivka 4). Škrob, pokud není znečištěn např. glukosou, pochopitelně nevyvolává konduktometrickou depresi (obr. 2, křivka 5). Je-li škrob nebo jiný nezkvasitelný substrát znečištěn jen nepatrným množstvím zkvasitelných cukrů, poklesne během 6 až 10 min vodivost na 5 až 10 min, načež pozvolně nebo rychleji stoupne (obr. 2, křivka 6).

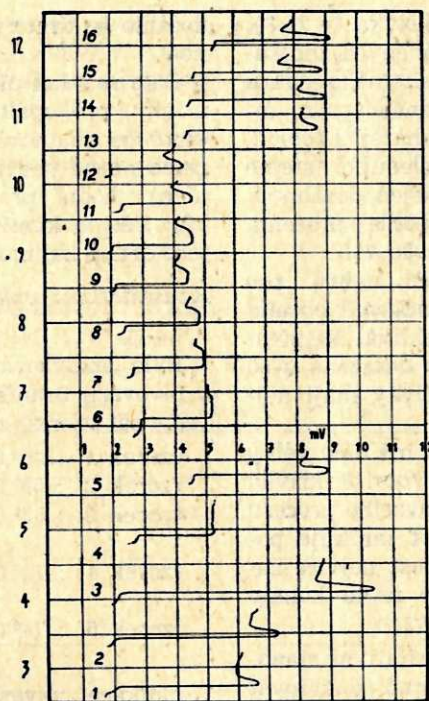
Desítky pokusů prokázaly, že konduktometrickou depresi zkvasitelnými cukry prohlubuje malé množství některých elektrolytů, např. fosforečnanových iontů (10 až 30 mg ve 130 ml suspence). Byl vyzkoušen KH_2PO_4 a $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Druhý z nich působil výrazněji.

Ve snaze stimulovat účinky kvasničných enzymů hexokinázy, transfosforylázy a enolázy přidával se pokusně $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ve stejných dávkách jako $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Ukázalo se však, že kladný účinek hořečnatých iontů se zřetelně projevuje až v přítomnosti 150 mg zkvasitelných cukrů a ve větších dávkách. Do 150 mg cukrů byly konduktometrické deprese MK-křivek méně strmé a menší, než při stejném množství $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Ke zkoušce bylo použito pivovarských kvasinek (Smíchov). Při všech dalších indikacích zkvasitelných cukrů byl proto přidáván $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.



Obr. 2 — MK-křivky mannitolu, sorbitolu, glycerolu, galaktosy, bramborového škrobu, sacharosy a mladiny

- 1 — 16,⁵⁰ : 1 g mannitolu + 70 mg DAP; 17,¹³ : 1 g mannitolu. (DAP = diamoniumfosfát)
- 2 — 17,⁵² : 3 g sorbitolu
- 3 — 18,⁴⁶ : 1 g glycerolu; 19,¹³ : 3 g glycerolu
- 4 — 19,⁴² : 50 mg galaktosy + 10 mg DAP
19,⁵⁶ : 100 mg galaktosy + 30 mg DAP
20,¹⁶ : 200 mg galaktosy + 30 mg DAP
- 5 — 20,⁵⁶ : 2 g bramborového škrobu + 15 mg DAP
21,¹⁶ : 2 g bramborového škrobu;
21,³⁸ : 2 g bramborového škrobu;
- 6 — 22,¹⁷ : 5 g bramborového škrobu + 100 mg glukosy + 50 mg DAP
- 7 — ve všech čtyřech případech měřeno 250 mg sacharosy s 10, 20, 30 a 30 mg DAP
- 8 — tři stejné dávky po 25 ml 70 světlé mladiny a 20 mg DAP.
Ke všem indikacím použito 20 g pekařského droždí (Libáň).



Obr. 3 — MK-křivky mladiny, glukosy a maltosy

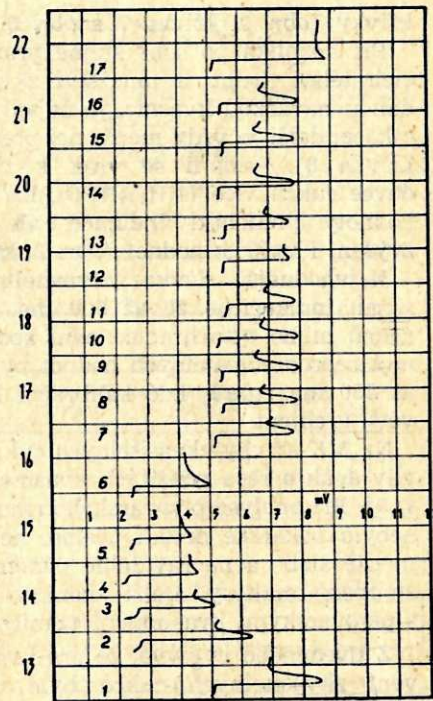
- 1 — 30 ml 70 mladiny světlé (bez DAP)
- 2 — 30 ml 70 mladiny světlé + 10 mg DAP
- 3 — 30 ml 70 mladiny světlé + 50 mg DAP
- 4 — 100 mg maltosy + 20 mg DAP
- 5 — 100 mg maltosy + 20 mg DAP
- 6 — 20 mg glukosy + 20 mg DAP
- 7 — 50 mg glukosy + 20 mg DAP
- 8 — 100 mg glukosy + 20 mg DAP
- 9 — 150 mg glukosy + 20 mg DAP
- 10 — 250 mg glukosy + 20 mg DAP
- 11 — 400 mg glukosy + 20 mg DAP
- 12 — 600 mg glukosy + 20 mg DAP
- 13 — 50 mg maltosy + 20 mg DAP
- 14 — 100 mg maltosy + 20 mg DAP
- 15 — 200 mg maltosy + 20 mg DAP
- 16 — 400 mg maltosy + 20 mg DAP

K indikaci u křivek 5, 13, 14, 15 a 16 bylo použito 50 g pivovarských kvasinek (Smíchov), u zbývajících indikací 20 g pekařských kvasinek (Libáň).

Pokrač. popisu k obr. 4.

- 17 — 10 ml 100 světlého vystavovaného piva + 20 mg DAP.

K indikaci u křivek 2—6 bylo použito 20 g pekařského droždí (Libáň), u zbývajících indikací 50 g pivovarských kvasinek (Smíchov).



Obr. 4 — MK-křivky maltosy, rmutovacího procesu a piva.

- 1 — 600 mg maltosy + 20 mg DAP
- 2 — 10 ml vystírky (100 světlá) + 20 mg DAP
- 3 — 5 ml zapárky (100 světlá) + 20 mg DAP
- 4 — 2 ml I. rmutu při 650 C + 20 mg DAP
- 5 — 2 ml I. rmutu při 730 C + 20 mg DAP
- 6 — 2 ml I. rmutu při 740 C před varem + 20 mg DAP
- 7 — 8,75 ml vystírky (140 světlá) + 20 mg DAP
- 8 — 3,56 ml po zapárce (140 světlá) + 20 mg DAP
- 9 — 2,86 ml I. rmutu při 650 C + 20 mg DAP
- 10 — 1,52 ml I. rmutu při 730 C + 20 mg DAP
- 11 — 1,38 ml I. rmutu při 740 C před varem + 20 mg DAP
- 12 — 1,42 ml vystírky (140 světlé) + 20 mg DAP
- 13 — 2 ml po zapárce (140 světlé) + 20 mg DAP
- 14 — 2 ml I. rmut při 650 C (140 světlé) + 20 mg DAP
- 15 — 2 ml I. rmut při 730 C (140 světlé) + 20 mg DAP
- 16 — 2 ml I. rmut při 740 C před varem + 20 mg DAP

Pokrač. popisu viz vlevo.

Zkoušení kvantitativního zastoupení cukrů

Práce [2, 3] upozorňují na to, že absolutní velikost vlny poklesu vodivosti je přibližně úměrná množství přítomných zkvasitelných cukrů při téměř druhu kvasinek a téže metodice, v určitém — poměrně úzkém — koncentračním rozmezí.

Snažili jsme se proto stanovit podmínky a závislosti pro určení kvantitativního zastoupení cukrů,

popř. ve vztahu k jejich jakosti. K indikaci jsme nejprve používali pekařského droždí. Bylo zjištěno, že průběh elektrické vodivosti u téhož cukru a množství závisí i na dodaném množství $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a na pořadí zkoušky indikace zkvasitelného cukru při téže jakosti, druhu a navážce droždí (obr. 2, křivka 7, 8). Pozorovali jsme, že stoupající množství $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zvyšuje až do určité meze indikace zkvasitelných cukrů příznivým ovlivněním MK-

křivky (obr. 2, křivka 7 a obr. 3, křivka 1, 2, 3).

Při několika po sobě stejně prováděných indikacích téhož druhu a množství zkvasitelného cukru danou navázkou kvasnic, je nejvýraznější první indikace; další je vždy menší než předcházející (obr. 2, křivka 8). Přidá-li se však k následující stejné dávce cukru více $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, lze nejen dosáhnout hodnoty předchozí indikace, ale podle procenta zvýšení i vyšších hodnot (obr. 2, křivka 7).

Nejvhodnější dávka zkvasitelných cukrů pro jednu indikaci je 20 až 600 mg. Indikace obsahu cukrů mimo tyto hranice není spolehlivá. Nej přesněji reprodukovatelných hodnot bylo dosaženo u 50 až 250 mg cukrů, kde kalibrační křivky mají největší gradient.

Na MK-křivky zkvasitelných cukrů má dále velký vliv druh a rasa použitých kvasinek (obr. 3, křivka 4, 5). Při analýze pivovarského rmutovacího procesu nebylo pekařské droždí účelné, neboť indikuje poměrně slabě a nepravidelně přítomnost nejvíce zastoupené maltosy. Další zkoušky se proto konaly s pivovarskými kvasinkami (Smíchov).

Z uvedeného vyplývá, že pro kvantitativní stanovení zkvasitelných cukrů bylo nutno dodržovat určité konstantní podmínky:

1. pro celou jednu sérii měření používat stejného množství, jakosti a druhu kvasinek a ke každé zkoušce nové navážky kvasinek;
2. před přidáním $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a vzorku cukru ponechat 3 až 5 min ustálit vodivost suspence droždí v nádobce;
3. pro celou sérii měření přidávat stejné množství $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ v určitou stejnou dobu měření;
4. množství zkoumané látky (rmut, mladina, pivo) volit tak, aby veškerý obsah cukrů byl 20 až 600 mg, nebo lépe podle možnosti 50 až 250 mg;
5. zachovat stejnou intensitu míchání ve vodivostní nádobce a dodržovat stejnou teplotu ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Kalibrační křivky glukosy a maltosy:

Pro sestrojení kalibrační křivky glukosy za těchto podmínek bylo použito pekařského droždí. Jak je z obr. 3, křivka 6 až 12 a kalibrační křivky patrné,

dosáhlo se tímto droždím značně pravidelných hodnot.

Dále se však ukázalo, že pro sestrojení kalibrační křivky pro maltosu se nehodí pekařské droždí, které je adaptováno převážně na sacharosu. Bylo proto nutné použít kvasinek pivovarských (provozních) vhodně preparovaných (obr. 3, křivka 13 až 16). Těchto kvasinek bylo také použito pro sestrojení druhé kalibrační křivky pro glukosu.

Kvantitativní vyhodnocení zkvasitelných cukrů při analýze rmutů

Bylo analysováno 10 různých provozních várek v pivovaru Braník. Z technických důvodů bylo bráno vždy pět vzorků z prvního rmutu:

- vzorek 1 : 35°C , vystírka po 20 min,
- vzorek 2 : 50°C , po zapáře 10 min,
- vzorek 3 : 65°C , první rmut při dosažení 65°C na rmutové pánvi,
- vzorek 4 : 73°C , první rmut při vyhrátí na 72 až 75°C ,
- vzorek 5 : 74°C , první rmut po zcukření, těsně před zahříváním do varu.

Indikace zkvasitelných cukrů byla prováděna dvojím způsobem:

- a) Pro přesnost a snadnou reprodukovatelnost hodnot bylo k indikaci zkvasitelných cukrů v jednotlivých fázích rmutování použito takového objemu vzorku, aby obsahoval přibližně 100 mg redukujících cukrů. Redukující cukry byly paralelně stanoveny Schoorlovou metodou [5].
- b) Ze všech stadií rmutovacího procesu byly analysovány stejné objemy (vystírky před zapárou úměrně méně), aby bylo možno zjistit absolutní přírůstek zkvasitelných cukrů.

Při obou analýsách bylo použito 50 g pivovarských kvasinek se sušinou kolem 12 % a přidáváno 20 mg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Kromě pivovarských kvasinek bylo v některých případech použito i pekařského droždí. Na obsah zkvasitelných cukrů se zkoušelo i vystavované pivo

Druh várky: 10° světlá (pekařské droždí):									
Druh rozboru	Číslo vzorku	Druh vzorku:	Počet použ. ml.	mV	Σ mg maltosy	Σ mg glukosy	maltosa g/100ml	glukosa g/100ml	red. cukry g/100ml
po 100 mg redukujících cukrů	1	vystírka	10	1,17	—	přes mez kalibr. kř.	—	přes mez kalibr. kř.	0,92
	2	po zapáře 10'	5	0,68	—	„	—	„	1,97
	3	I. rmut při dosažení 65°C na rmut. pánvi	2	0,25	—	35	—	1,75	4,90
	4	I. rmut při dosažení 73°C na rmut. pánvi	2	MK-křivka bez minima	—	MK-křivka bez minima	—	MK-křivka bez minima	6,25
	5	I. rmut zcukřený před varem	2	„	—	„	—	„	6,70

Tabulka I.

(obr. 4, křivka 17). Obsah zkvasitelných cukrů v pivě byl dokázán pivovarskými i pekařskými kvasinkami. Tyto MK-křivky nebyly však kvantitativně vyhodnocovány. Množství zkvasitelných cukrů biokonduktometricky stanovených bylo vypočítáno z výšky vlny odpovídající MK-křivky podle příslušné kalibrační křivky.

Celou práci s nevšedním zájmem sledoval prof. Ing. Dr. K. Šandera, doktor chem. věd, člen korespondent ČSAV.

Přehled výsledků

- a) indikace pekařským droždím:
po 100 mg redukujících cukrů (vářka 10° světlá): obr. 4, křivky 2 až 6, (tab. I).
- b) indikace pivovarskými kvasinkami:
1. po 100 mg redukujících cukrů (vářka 14° světlá): obr. 4, křivky 7 až 11, (tab. II.).
 2. po 2 ml rmutu (vářka 14° světlá): obr. 4, křivky 12 až 16, (tab. III.).

Druh vářky: 14° světlá (provozní pivovarské kvasinky - Smíchov)								
Druh rozboru	Číslo vzorku	Počet použ. ml	mV	Σ mg maltosy	Σ mg glukosy	maltosa g/100ml	glukosa g/100ml	red. cukry g/100ml
po 100 mg red. cukrů	1	8,75	0,88	95	125	1,08	1,43	1,14
	2	3,56	1,18	155	255	4,35	7,17	2,81
	3	2,86	1,40	260	700	9,10	24,4	4,95
	4	1,52	1,22	188	330	11,64	21,7	6,62
	5	1,38	1,01	117	163	8,43	11,8	7,23

Tabulka II.

po 2 ml rmutu	1	1,44	0,16	15	16	0,75	0,8	1,44
	2	2,0	0,76	77	103	3,85	5,10	2,81
	3	2,0	1,30	198	405	9,90	20,25	4,95
	4	2,0	1,30	198	505	9,90	20,25	6,62
	5	2,0	1,27	185	355	9,25	17,75	7,23

Tabulka III.

Závěr:

Z MK-křivek a tab. I až III lze činit tento závěr:

1. Indikaci pivovarskými kvasinkami bylo ve většině případů nalezeno vyšší množství zkvasitelných cukrů, než chemickým nálezem. Nejblíže tomu jsou hodnoty analys vystírek a zcukřených rmutů před varem.
2. Maximum snadno zkvasitelných cukrů (ve stejných objemech rmutů) je u světlých várek v oblasti teplot 63 až 73°C. Potvrzuji to biokonduktometrické zkoušky pekařskými i pivovarskými kvasinkami a analysa se 100 mg redukujících cukrů za použití pouze pivovarských kvasinek.
3. Ze 100 dílů redukujících cukrů stanovených chemicky je nejvíce snadno zkvasitelných, indikovaných pekařským droždím, ve vystírce. Toto je v souladu i s paralelně prováděnou chromatografickou analysou (na níž se dále pracuje), která ukázala, že podstatnou část cukrů ve vystírce tvoří glukosa, fruktosa a neredukující sacharosa. Rovněž MK-křivky maltosy tomu nasvědčují.

Literatura

- [1] DRACHOVSKÁ M., ŠANDERA K.: Konduktometrická charakteristika suspence droždí, Čs. biologie 4, (1955) 542-549
- [2] ŠANDERA K., DRACHOVSKÁ M.: Konduktometrie, Praha, 1957
- [3] DRACHOVSKÁ M., ŠANDERA K.: Konduktometrická detekce zkvasitelných cukrů, Listy cukrovarnické, 72 (1956) 174
- [4] DRACHOVSKÁ M., ŠANDERA K.: Nové fyzikálně chemické metody v biologii-konduktometrie, Preslia, 27 (1955) 354-367
- [5] JUREČEK M.: Organická analysa, Praha, 1950
- [6] J. de Clerck: Lehrbuch der Brauerei I., Berlin 1950

ВЫВОДЫ

1. Индикация при помощи пивных дрожжей показала в большинстве случаев более высокое содержание сбраживаемого сахара чем химический анализ. Наиболее приближенные значения были получены при анализе вытяжки и засахаренного затора перед его варкой.
2. Максимальное количество легко сбраживаемого сахара (в одинаковых объемах затора) обнаружено у светлого пива в температурных пределах 63° — 73°С. Этот факт подтверждают биокондуктометрические испытания при помощи пивных и пекарных дрожжей а также анализ 100 мг редуцирующего сахара при применении лишь пивных дрожжей.
3. Из 100 долей редуцирующего сахара определенного химическим методом находится наиболее высокое содержание легко сбраживаемого сахара (индигированного пивными дрожжами) в вытяжке. Эти результаты полностью подтверждает хроматографический анализ показывающий, что значительную долю сахара в вытяжке представляют глюкоза, фруктоза и не редуцирующая сахароза. МК — кривые мальтозы являются дальнейшим доказательством правильности приведенных выводов.

Zusammenfassung

- Aus den wiedergegebenen MK-Kurven und den Tabellen I bis III kann die folgende Schlussfolgerung gezogen werden:
1. Mittels Indikation durch Bierhefen wurde in den meisten Fällen ein höheres Quantum der vergärbaren Zucker nachgewiesen als bei der chemischen Analyse. Naheliegender sind die Werte der Analysen des Einmischgutes und der verzuckerten Maischen vor dem Sieden.
 2. Das Maximum der leichtvergärbaren Zucker (in den gleichen Maische-Volumina) liegt bei hellen Suden im Temperaturumfang von 63° bis 73°С. Das bestätigen biokonduktometrische Proben mittels Back- und Bierhefen und auch die Analyse von 100 mg reduzierender Zucker, wobei nur Bierhefen verwendet wurden.
 3. Aus 100 Teilen der reduzierenden, chemisch bestimmten Zucker befindet sich der größte Teil der leichtvergärbaren, mittels Backhefe indizierten, im Einmischgut. Diese Feststellung wird durch die chromatographische Analyse bestätigt, welche ergab, daß den Hauptteil der Zucker im Einmischgut Glukose, Fruktose und nichtreduzierende Saccharose bildet. Auch die MK-Kurven bestätigen die erwähnten Ergebnisse.