

Polyfenolické látky v máčecích vodách sladoven

ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ a MILENA LUKÁŠOVÁ-NOVOTNÁ
Katedra biologie Vysoké školy pedagogické v Bratislavě a Olšanské papírny, n. p., Olšany

663.432 : 547.56

Polyfenolické substance byly objeveny v základních pivovarských surovinách již dávno. Především je obsahuje ječmen a jiné obiloviny ve vnějších obalech obilek. Původně je *Moufang* (1) nazval souhrnně testinovou kyselinou. Zjistil, že se tato kyselina může vyloužit z ječmene vodou anebo lépe vodou slabě zalkalizovanou přísadou 0,2 % KOH. Později se ukázalo, že testinová kyselina není látkou jednotnou, ale tříslobílkovinným komplexem. Tento tříslobílkovinný komplex ze sladu a chmele může přejít do hotového výrobku, který za určitých technologických podmínek zakaluje. Pivní zákaly byly mnohokrát podrobovány zkoumání a zjistilo se, že mnohé z nich obsahují polyfenolické substance, shrnuté pod pojem taninu. Patří k nim např. tříslobílkovinný zákal oxydační, kovový-cínový nebo zákal chladový.

Lebreton a spolupracovníci (2) studovali cínový zákal a našli v tomto tříslobílkovinném komplexu vedle kyseliny gallové také floroglucin, kyselinu protokatechovou a leukoantokyaniny. Chladový zákal v pivě zkoumali *Wyse a Mc Farlane* (3) i *Lhoest a spolupracovníci* (4), kteří jej pokládají také za tříslobílkovinný komplex.

Seikelová a Geissman (5) pozorovali, že ječmen roste ve vodě rychle a bujně jen určitý čas a produkuje přitom flavonoidní pigmenty. Převládají mezi nimi antokyany (6, 7, 8, 9). Fialové a černé pigmenty jsou nejvíce zastoupeny v klasech, a to především v pluchách obilek.

Po chemické stránce nejsou polyfenolické látky jednotné. Zahrnují velkou skupinu látek se základní strukturou $C_6-C_3-C_6$. Tyto látky se uvádějí pod společným názvem „flavonoidy“. Avšak tato základní forma se vyskytuje také ve stavu kondenzovaném a polymerovaném. Tak vzniká skupina látek o velké molekulové váze, které bývají doprovázeny jednoduchými sloučeninami, nemajícími ani základní flavonoidní strukturu ani velkou molekulu, jako např. kyselinou skořicovou a jejími deriváty, kyselinou chlorogenovou, kávovou apod. Polyfenolické látky se proto rozdělují do čtyř skupin podle molekulové váhy:

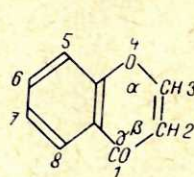
1. Tříslloviny
2. Leukoantokyaniny
3. Vlastní flavonoidy
4. Kyseliny, doprovázející tříslloviny.

Na přechodu mezi třísllovinami a flavonoidními látkami je skupina leukoantokyaninů, což jsou látky bezbarvé, které varem s kyselinou solnou

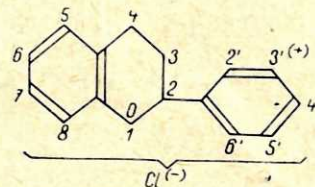
červenají. Skládají se z většího počtu jednoduchých molekul základní struktury. Jejich přesné složení však neznáme.

Skupinu flavonoidů můžeme rozdělit v jednotlivé třídy, lišící se od sebe rozdílem ve stupni oxydace tří středních uhlíků, spojujících obě aromatická jádra A a B (10 až 15). Oxydace postupuje od nejvíce redukováného katechinového typu po nejvíce oxydovaný typ flavonový, mezi nimiž je řada přechodů (16).

Flavonoidní látky se v rostlinách nevyskytují samostatně, ale většinou jsou vázány na cukerné složky a tvoří s nimi glykosidický komplex. Takový komplex má potom část cukernou — glykosyl a část necukernou — aglykon. Cukry jsou v těchto látkách vázány s určitou pravidelností hydroxylovými skupinami. Nejčastěji bývají přítomny tyto cukry: d-glukosa, l-rhamnosa, výjimečně i l-arabiosa a kyselina d-glukuronová. Zvláštním cukrem je apiosa. Z disacharidů to bývá primaverosa (6- β -d-xylosido-d-glukosa), rutinosa (6- β -l-rhamnosido-d-glukosa) (48, 49), robinobiosa (3- α -l-rhamnosido-d-galaktosa) (50). Z trisacharidů byl zatím nalezen jen jediný, rhamninososa (51). U antokyaninů přicházejí zejména d-galaktosa a d-xylosa (63). Je-li cukernou složkou glukosa, hovoří se o glukosidech, je-li jiný cukr, o glykosidech. Cukerným složkám se dnes věnuje v těchto látkách velká pozornost i tam, kde byly získány genetické mutanty (52). Glykosidická vazba se velmi snadno štěpí. Většinou postačuje půlhodinový var s 15% ním HCl. Jsou známy i takové případy, kdy hydrolysa proběhla za studena v 1% ním roztoku HCl po delší době stání (33). Hydrolysu mohou provést i plísňové enzymy (53, 54).



γ -benzopyron



flaviliumchlorid

Podle základní struktury tvoří vlastní flavonoidy dvě velké skupiny:

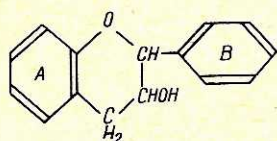
První skupina má ve své molekule základní kostru γ -benzopyronu, substituovanou buď v poloze 2 nebo 3 fenylovým radikálem. Jsou to katechin, flavanon, flavanonol, flavon a flavonol. Tvoří početnou skupinu glykosidů žlutě až oranžově zbar-

*) Experimentální část byla provedena na Katedře technické mikrobiologie SVST v Bratislavě.

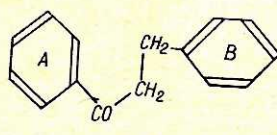
vených, které se vyskytují v květech, v listech i jiných orgánech dvojděložných rostlin. Jejich výzkumem v rozmanitých rostlinách se zabývalo mnoho autorů [17 až 39].

Druhou skupinu látek tvoří antokyaniny, které jsou také v rostlinné říši velmi bohatě zastoupeny. Jsou zbarveny červeně, modře nebo fialově. Aglykony těchto glykosidů jsou odvozeny od flaviliumchloridu pravidelnou substitucí hydroxylovými skupinami.

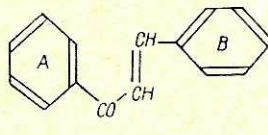
Barevnost těchto derivátů se vysvětluje vodivým uspořádáním elektronů flaviliového kruhu [40 až 47].



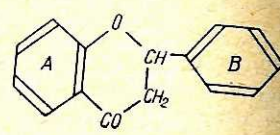
1. Katechin



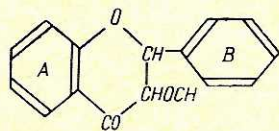
2. Dihydrochalkon



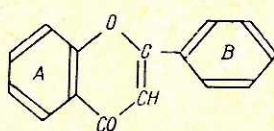
3. Chalkon



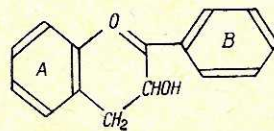
4. Flavanon



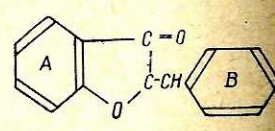
5. Flavanonol



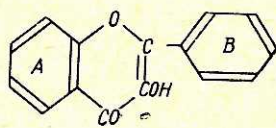
6. Flavon



7. Antokyanin



8. Auron



9. Flavonol

Mimo tyto dvě skupiny stojí samostatně dihydrochalkon, chalkon a auron.

Z kyselin, které doprovázejí větší molekuly polyfenolických látek, byly zjištěny hlavně kyselina skořicová a různé její deriváty, jako kyselina oxyskořicová typu kyseliny ferulové, kyselina sinapová (4-oxy-3,5-dimethoxyskořicová), kávová (3,4-dioxyskořicová), kyselina p-kumarová, chlorogenová, protokatechová (3,4-dioxybenzoová) a další. Kyseliny oxyskořicové jsou uloženy v rostlinách hlavně jako estery a dají se v hydrolyzátech snadno dokázat [64, 65]. Kyselina kávová a chlorogenová jsou v přírodě velmi rozšířeny. Jsou vedle katechinů a 3,4-dioxyfenylalaninu vhodnými substráty pro polyfenoloxydasy [66, 67]. Kyselina chlorogenová se vyskytuje ve dvou isomerech podobně jako kyselina isochlorogenová [68]. Jeví se jako konkurující inhibitor oxydasy kyseliny indolyloctové. Tak jen za její nepřítomnosti probíhá nerušená syntéza nebo rozklad heteroauxinu [69].

Z chemických vlastností všech těchto látek je nejdůležitější jejich redukční schopnost, neboť se samy snadno okysličují [55, 56, 57, 58]. Z tříslovin potom vznikají tmavě zbarvené flobafeny, které dávají s bílkovinami v pивě sraženiny za studena nerozpustné [59]. Tyto látky jsou rozpustné ve vodě a této vlastnosti jsme využili v naší práci k jejich stanovení v máčecích vodách.

Použité metody a materiál

Původ surovin

Máčecí vody byly zkoumány ve sladovně závodu 1 Pivovarů a sladoven, n. p. Bratislava. Vody byly odebrány z náduvníku po prvním, dvanáctihodinovém máčení 100 q ječmene ve 200 hl vody. Také byly konány laboratorní pokusy s máčením našeho, jugoslávského a syrského ječmene.

Úprava výchozího materiálu

Z obalových částí zrna se vyluhují ve vodě nejen látky polyfenolické, ale i jiné látky organické

a minerální. Do vody přecházejí i vnitřní součásti obilky ze zrn poškozených. Poněvadž po dvanáctihodinovém máčení je také obsah polyfenolických látek v máčecí vodě malý, bylo nutno vodu vakuově zahustit a proto byl 1 hl vody vakuově zahustěn při 28 °C.

V laboratorním pokuse byl také máčen ječmen v alkalické vodě s 0,2 % KOH. Přitom bylo 10 kg běžného sladovnického ječmene nejdříve namočen v 25 l 0,2%ního roztoku KOH ve vodě, po 12 h byla voda vyměněna a máčení ječmene se znovu opakovalo s 10 a později se 7 l vody. Tato voda byla intenzivněji zbarvena než voda z provozního náduvníku. Podobně byly také zpracovány vzorky ječmene syrského a jugoslávského. Zbarvení vody po jugoslávském ječmenu bylo nejintenzivnější.

Extrakce

Polyfenolické látky z máčecích vod byly extrahovány. Volba extrakčního postupu závisí na tom, zda se mají získat jen aglykony, nebo mají-li být vyextrahovány i přítomné glykosidy [77 až 83]. V druhém případě je třeba postupovat opatrně, vyhýbat se extrakci alkoholem, okselování roztoků a hydrolyse [16]. Mnohem jednodušší je extrakce aglykonů. Této extrakci obvykle předchází hydrolysa kyselinami, čímž se všechny přítomné deriváty polyfenolů převedou na formy aglykonů. Byla vyzkoušena extrakce třemi různými rozpouštědly, které se s vodou nemíchají:

1. butanol [60]
2. ether [61]
3. octan ethylnatý a pentanol [3].

Nejllepší výsledky dával poslední způsob, jestliže se před tím zahustěná voda upravila acetonem:

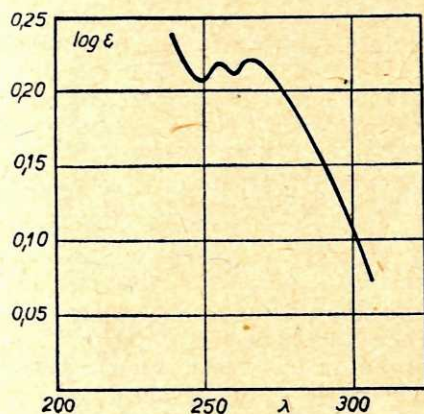
Ke 300 ml zkoumané kapaliny se přidá stejný

objem acetonu. Roztok se promíchá a nechá přes noc stát při 0°C. Vzniklá sraženina se odstředí, roztok se zahustí na 100 ml, načež se k němu přidá čtyřnásobné množství acetonu. Po 12 h klidu se oddělí obě vrstvy: horní acetonová a spodní vodní, obsahující krystalickou sraženinu. Po oddělení vrstev se sraženina z vodní vrstvy odstraní odstředěním. Vodní vrstva má objem asi 25 ml a je zbarvena tmavohnědě. Zbylými 75 ml se nasýtí horní acetonová vrstva, která se zbarví jasně oranžově. Acetonová vrstva se zahustí ve vakuu na 25 ml a dále se podobným způsobem zpracují obě vrstvy.

Acetonová vrstva se extrahuje nejdříve pětkrát octanem ethylnatým (15, 10, 10, 5, 5 ml), potom postupně pentanolem v témže množství, jakého bylo použito u octanu ethylnatého. Obě vyextrahované fáze, acetonová i vodní, se dále hydrolysuji koncentrovanou HCl:

25 ml vzorku se povaří pod zpětným chladičem se 3 ml koncentrované HCl 20 min. Ochladené roztoky se odstředí od vzniklé červenohnědé sraženiny a extrahují třikrát pentanolem (10, 8, 5 ml). Po hydrolyse se snadněji odděluje organická vrstva od extrahované vrstvy vodní, takže není nutné odstřeďovat jako při extrakci před hydrolysou.

Všechny získané extrakty se zpracují dále takto: Získané frakce se promyjí opatrně vodou, odstředí a vysuší nad 0,5 g $MgSO_4$. Rozpouštědlo se odstraní ve vakuu na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,7 ml 1% HCl v methanolu a nanáší na chromatografický papír.



Graf 1.

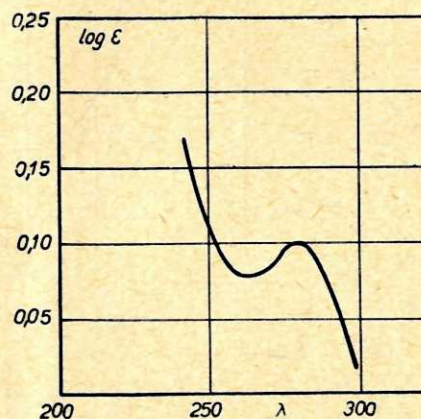
Chromatografie

K rozdělení směsi polyfenolů, získaných extrakcí zahusťovaných máčecích vod, bylo použito papírové chromatografie. Upravené vzorky extraktů se po nanesení na chromatografický papír Whatman č. 3 (W 3) vyvíjely vzestupně. Papír se před nanášením vzorků promývá v 1,0 N HCl a potom v použitém rozpouštědle. Předběžné promývání papíru je nutné proto, aby se zabránilo vymývání nečistot z papíru do čela chromatogramu. Nečistoty v čele fluoreskují v ultrafialovém světle a tak brání detekci.

K vzestupnému vyvíjení chromatogramu na papíře W 3 bylo použito Forestalova rozpouštědla — kyselina octová, voda a kyselina solná v poměru 30 : 10 : 3. Vyvíjení probíhalo při 28°C po dobu 15 h. V této době postoupilo rozpouštědlo asi 30 cm od startu. Forestalovo rozpouštědlo se ukázalo pro

dělení směsi fenolů nejvhodnějším z 18 zkoušených rozpouštědel. Ačkoli v něm látky postoupily až k čelu, byly zřetelně odděleny a netvořily šmouhy.

Každý vzorek byl nanesen čtrnáctkrát ve vzdálenosti 3 cm od sebe a od spodního okraje. Jednotlivé oddělené skvrny byly po vystřížení vylouženy v 70%ním methanolu, výluhy ve vakuu odpařeny do sucha, načež byl zbytek rozpuštěn v 1%ním methanolu a nanášen znovu na chromatografický papír Whatman č. 1 (W 1). Tento chromatogram



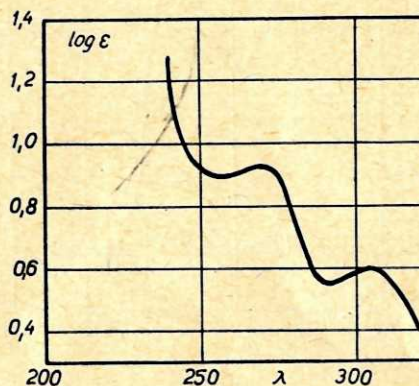
Graf 2.

byl pak vyvíjen v rozpouštědlové směsi z butanolu, kyseliny octové a vody v poměru 4 : 1 : 2,2 sestupně. V mnohých případech se jedna skvrna, oddělená ve Forestalově rozpouštědle, rozčlila ještě v další skvrny.

Detekce byla provedena v ultrafialovém světle podle druhu fluorescence.

Spektrofotometrie

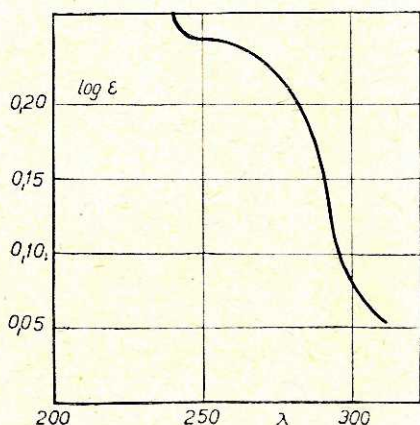
K identifikaci polyfenolů, rozdělených papírovou chromatografií, bylo použito jejich absorpčních spekter, které dávají v ultrafialové oblasti vlnov-



Graf 3.

ých délek (72 až 76). Vzorky skvrn byly eluovány 96%ním čistým ethanolem po dobu 6 h v naprosté tmě. Měření bylo provedeno na spektrálním fotometru typu UVISPEK fy Hilger v rozmezí 230—340 $m\mu$, v některých případech i dále směrem k viditelné oblasti vlnových délek. Světelným zdrojem byla vodíková lampka, v oblastech blízkých viditelnému světlu (nad 300 $m\mu$) normální žárov-

ka. Měřilo se s průměrnou spektrální hustotou 5 Å a vlnová délka byla stanovena s přesností ± 1 m μ . K tomuto stanovení bylo použito 14 zon každého derivátu po rozdělení v druhém rozpouštědle.

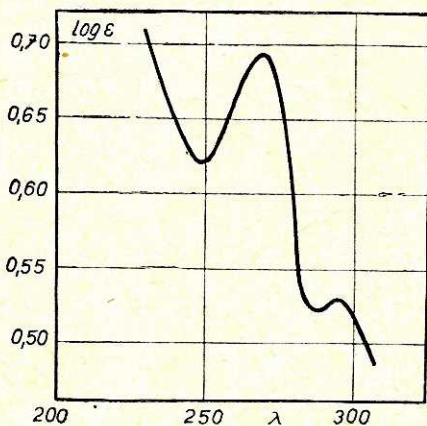


Graf 4.

Stanovení cukrů

U vzorků, získaných z extraktů před hydrolysou zahuštěných vod, byl proveden pokus o stanovení cukerných složek polyfenolických derivátů [62, 63].

14 zon z každého derivátu se vyloužilo 25 ml horké vody. K vodnému výluhu se přidala konc. HCl nebo H₂SO₄ tak, aby roztoky byly 10 N. Vařilo se pod zpětným chladičem 90 minut. Po ochlazení se ze zhydrolysovaného roztoku vyextrahovaly aglykony polyfenolů trojnásobnou extrakcí pentanolem. Zbytek, který zůstal po extrakci z hydrolyzátu s HCl, byl ve vakuu zahuštěn úplně do sucha, aby se odstranila kyselina. Odparek se rozpustil v horké vodě a nanášel na chromatografický papír W 1. Vzorky po hydrolyse kyselinou sírovou



Graf 5.

se neutralisovaly hydroxydem barnatým. Vzniklý síran barnatý se odstranil filtrací a filtrát se zpracoval jako vzorek předchozí. Detekce cukrů byla provedena alkalickým roztokem tetrazoliové modři [70].

Účinek vyloužených derivátů na klíčivost ječmene

500 zrn běžného sladovnického ječmene se namočilo ve vyloužených skvrnách z chromatogramu. K tomu účelu se 14 zon vyloužilo v 100 ml vody.

Klíčivost se zkoumala podle metody Aubryho. Každý den se počítala vyklíčená zrna a nevyklíčená opět se vkládala do klíčidla. Sledování trvalo 6 dní. Výsledky se porovnávaly s klíčivostí ječmene v čisté vodě.

Identifikace barevnými skvrnami

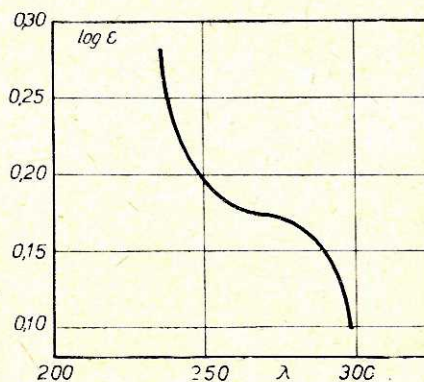
K částečné identifikaci polyfenolů, rozdělených papírovou chromatografií, použilo se také barevných reakcí s různými chemickými činidly vedle již uvedené spektrofotometrie. Pro tento účel byly barevné skvrny eluovány 96% ním ethanolem.

Barevná reakce s chloridem železitým (FeCl₃-test)

Dvouprocentní alkalický roztok chloridu železitého se přidává do alkalického roztoku vyloužených skvrn.

Reakce s vanilinem

5 ml čerstvě připraveného 2% ního roztoku vanilinu v koncentrované HCl se přidá k 1 ml alkoholu



Graf 6.

lického roztoku vyloužené skvrny. V přítomnosti polyfenolických derivátů se objeví jasné červené zbarvení.

Redukční test

K 1 ml alkoholického roztoku vyloužených skvrn se přidá něco hořčického prášku a po kapkách koncentrované HCl. V přítomnosti flavonoidních látek se objeví růžové zbarvení.

Amoniový test

Tento test se dá provést přímo na chromatografickém papíře se směsí polyfenolů. Papír se vystaví působení par amoniaku. V místech, kde se nacházejí polyfenolické substance, se objeví fluorescence.

Barevné reakce k identifikaci kyseliny chlorogenové

1. Postříkáme-li chromatogram 1% ním roztokem dusitanu sodného v 10% ním roztoku kyseliny octové, vznikne v přítomnosti kyseliny chlorogenové žluté zbarvení. Toto zbarvení se změní v cihlově červené, postříká-li se chromatogram hned nato 1,0 N KOH. S amoniakálním roztokem dusičnanu stříbrného vznikne hnědé zbarvení, které se změní ve žluté ve Fehlingově roztoku [24].

2. Sedm skvrn, vyloužených z chromatogramu horkou vodou (25 ml), vaří se s 3 ml koncentrované HCl. Po ochlazení se roztok protřepe ethe-

Přehled polyfenolických derivátů v máčecích vodách

Tabulka 1

Poř. čís.	V ý s k y t	R_f v rozpouštědlech				Absorpční maxima $m\mu$	Fluorescence		Poznámka
		podle Forestala	b:o:v* 4:1:2,2	voda	2% octová		v UV světle	UV NH_3	
1	Ve všech vzorcích vod a frakcích kromě pentanolových před hydrolysou z acetonových vrstev	.775	.692	—	—	255 265	—	žlutá	Absorpční maxima leží v oblasti flavonolů (graf 1)
2	Ve všech frakcích všech druhů vod	.832	.580 .892	—	—	280	modrá	modrá	Průběh absorpční křivky je shodný s průběhem křivky katechinu (graf 2)
3	V extraktech octanem ethylnatým horních vrstev před hydrolysou v pentanolových extraktech po hydrolyse spodních vrstev	.875	.176	.520	.440	270 305	—	modrá	(graf 3)
4	Ve všech frakcích kromě pentanolové před hydrolysou horních vrstev	.875 .897	.888	.520 .387	.492 .397	255	modrá	zeleno-žlutá	Dává reakce kyseliny chlorogenové (graf 6)
5	Ve všech frakcích všech druhů vod	.943	.886	.280 .640	.765 .665	270 295	oranžová	oranžová	Je viditelná i na denním světle (graf 5)
6	V pentanolovém extraktu před hydrolysou acetonových vrstev a v obou pentanolových extraktech vodních vrstev	.743	.764	—	—	272 300	modrá	modrá	(graf 7)
7	Ve všech frakcích vod kromě pentanolových před hydrolysou vodní vrstvy	.980	.945	.035 .450	.097 .494	272	hnědá	hnědá	Viditelná i na denním světle. Jeví některé vlastnosti taninu (graf 4)

* butanol, kyselina octová a voda

rem. K extraktu se přidá vodný roztok uhličitanu sodného a chloridu železitého. Po protřepání zůstane vodní vrstva opět hnědá a horní etherová žlutá.

Výsledky pokusů

K extrakci byly použity tyto vzorky máčecích vod:

1. Voda odebraná z náduvníku ve sladovně po namočení běžného sladovnického ječmene.
2. Voda z laboratorního pokusu téhož sladovnického ječmene v 0,2% ním roztoku KOH.
3. Voda po namočení syrského ječmene v 0,2% ním roztoku KOH.
4. Voda po namočení jugoslávského ječmene v 0,2% ním roztoku KOH.

Úpravou acetonem se rozdělily dvě vrstvy, které se extrakcí opět rozdělily do pěti frakcí:

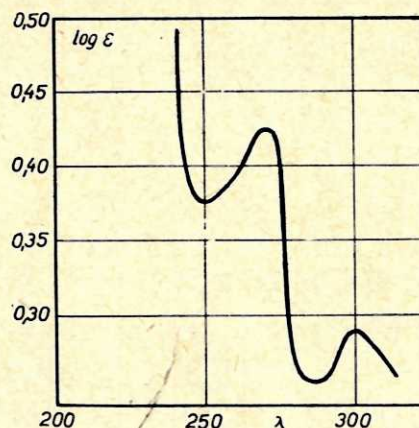
Původní zahuštěná voda

horní vrstva (acetonová)			spodní vrstva (vodní)	
1.	2.	3.	4.	5.
octan ethylnatý před hydrolysou	pentanol před hydrolysou	pentanol po hydrolyse	pentanol před hydrolysou	pentanol po hydrolyse

Chromatograficky se rozdělilo sedm skvrn, jejichž charakteristika je uvedena v tab. 1. Náčrt rozdělení skvrn ve Forestalově rozpouštědle z extraktu normální máčecí vody po namočení syrského ječmene je uveden na obr. 1 a 2.

Forestalovo rozpouštědlo nedělilo polyfenolické látky dostatečně, jak ukázalo chromatografování vyloučených vystříhaných skvrn. Jednotlivé druhy vod po namočení ječmene běžného, syrského a jugoslávského se obsahem druhů jednotlivých derivátů neliší. Forestalovo rozpouštědlo nedělilo však různé druhy těchto vod stejně. Srovnáme-li mezi sebou extrakty před hydrolysou a po ní, je patrné,

že se shodují ve všech vodách. To nasvědčuje, že zde není přítomen žádný glykosid. Při stanovení cukrů u jednotlivých derivátů před hydrolysou nebyl ani žádný dokázán.



Graf 7.

Identifikace skvrn, rozdělených na papíře, byla poměrně obtížná už proto, že tato skupina látek je tak rozmanitá a že jsme neměli k dispozici standardní látky pro porovnání vlastností jednotlivých získaných derivátů, a také proto, že koncentrace těchto sloučenin byla ve skvrnách tak malá, že většinou nestačila k vyvolání barevných reakcí s chemickými činidly. Identifikaci jsme provedli srovnáním polohy jednotlivých skvrn, vyskytujících se v různých extraktech a různých rozpouštědlech. Srovnání jejich R_f hodnot s literárními údaji je dosti obtížné pro jejich značnou variabilitu. Použili jsme proto také některých barevných reakcí. Jsou však jen hrubou orientační pomůckou, neboť charakterizují obvykle celou skupinu látek. Použito bylo i absorpčních spekter, která polyfenolické deriváty dávají v ultrafialové oblasti vlnno-

vých délek. Absorpční spektra jsou zakreslena v grafech 1 až 7, jejichž čísla jsou shodná s čísly derivátů v tab. 1.

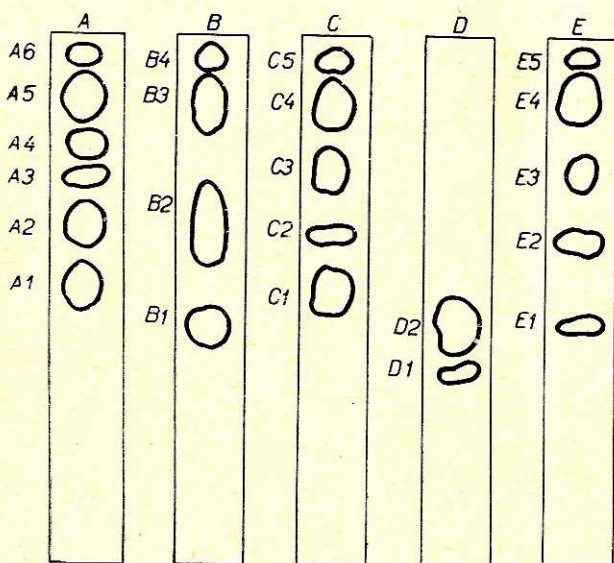
Účinek na klíčení ječmene

Polyfenoly, rozdělené papírovou chromatografií, byly zkoušeny v účinku na klíčení ječmene. Výsledky těchto pokusů byly srovnány s účinky máčecích vod samotných a jejich extraktů. V tab. 2 je přehled průběhu klíčovosti ječmene, namočeného ve vyloužených skvrnách chromatogramů. Pro

srovnání je uvedena též klíčovost v čisté vodě. Označení skvrn je shodné s označením v tab. 1. Údaje tabulky jsou vyneseny do diagramů 8 a 9.

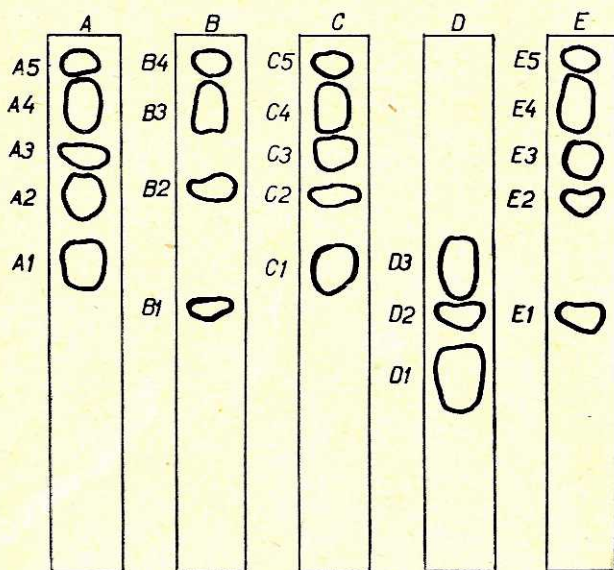
Tabulka 2

Dny	Počet nevyklíčených zrn ve vyluhu skvrny číslo							V čisté vodě V
	1	2	3	4	5	6	7	
1	22	24	23	29	24	23	29	23
2	20	22	21	27	23	21	26	20
3	17	18	15	21	20	15	22	16
4	10	14	12	20	14	13	20	10
5	8	11	10	15	12	10	17	8
6	6	8	6	11	9	6	11	5



Obr. 1. Rozdělení skvrn na chromatogramech z extraktů zahuštěné máčecí vody syrského ječmene

- A — frakce octanu ethylnatého před hydrolyzou (z vodné vrstvy)
- B — frakce pentanolu před hydrolyzou (z vodné vrstvy)
- C — frakce pentanolu po hydrolyse (z vodné vrstvy)
- D — frakce pentanolu před hydrolyzou (z acetonové vrstvy)
- E — frakce pentanolu po hydrolyse (z acetonové vrstvy)

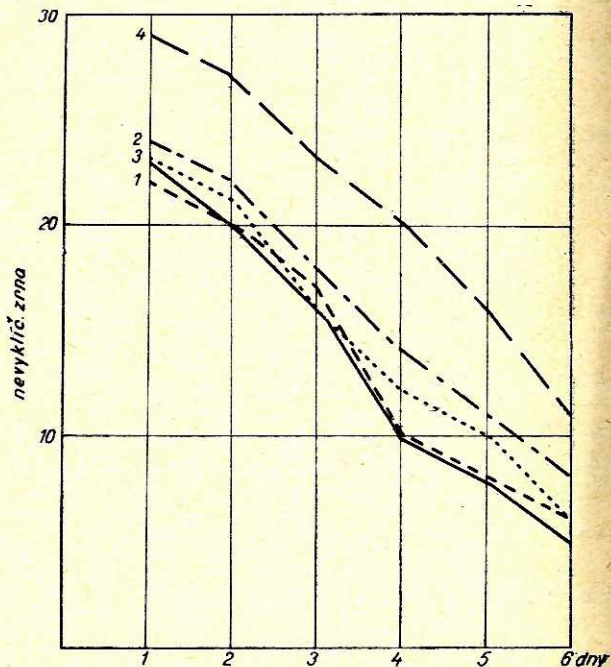


Obr. 2. Rozdělení skvrn na chromatogramech zahuštěné máčecí vody ze sladovny

- A — frakce octanu ethylnatého před hydrolyzou (z acetonové vrstvy)
- B — frakce pentanolu před hydrolyzou (z acetonové vrstvy)
- C — frakce pentanolu po hydrolyse (z acetonové vrstvy)
- D — frakce pentanolu před hydrolyzou (z vodné vrstvy)
- E — frakce pentanolu po hydrolyse (z vodné vrstvy)

Souhrn výsledků

Polyfenolické látky, obsažené v základních pivovarských surovinách, přecházejí z nich do hoto-
vého výrobku, jemuž dodávají nežádoucí vlastnosti. Zvláště se takto uplatňují třísloviny ječmene. Je proto žádoucí, aby se tyto látky pokud možno z největší části vyloužily již při jeho máčení ve



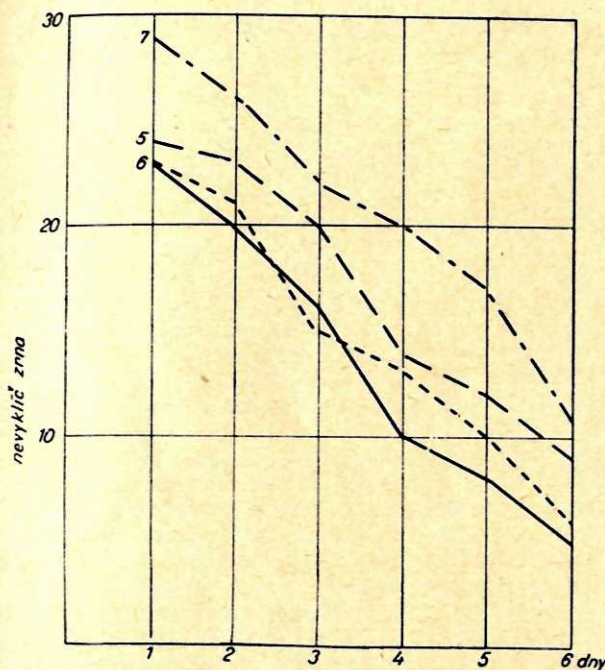
Graf 8. Diagram klíčovosti ječmene, namočeného ve vyloužených skvrnách chromatografického papíru

sladovně. Pokusy s máčením ječmene v alkalické vodě ukázaly, že se takto dá vyloužit větší množství polyfenolických substancí. Chromatogramy z extraktů těchto vod dávaly skvrny větší a jasnější fluorescence než chromatogramy extraktů vod odebraných ve sladovně.

Tato práce byla pokusem o izolaci a identifikaci polyfenolických látek ve vodách po máčení ječmene.

1. Byl vyzkoušen nejvhodnější způsob extrakce polyfenolických látek a jejich rozdělení na skupiny podle způsobu extrakce.

2. Jednotlivé frakce po extrakci byly rozdělovány papírovou chromatografií.



Graf 9. Diagram klíčivosti ječmene, namočeného ve vy-loužených skvrnách z chromatografického papíru

3. Byly izolovány jednotlivé deriváty vylouže-ním skvrn z chromatogramů a opětovným rozdě-lením na papíře.

4. Takto získané skvrny byly pokládány za che-micky čisté látky a za tohoto předpokladu byly předběžně určovány spektrofotometricky.

5. Z máčecích vod bylo izolováno sedm polyfe-nolických derivátů. Při identifikačních zkouškách dává jedna substance reakce kyseliny chlorogeno-vé. Dále je přítomna látka, která má shodný prů-běh absorpčního spektra s absorpčním spektrem katechinu. Vyskytuje se také látka s průběhem absorpčního maxima v oblasti flavonoidů, která nebyla však blíže identifikována. Konečně je pří-tomna látka, jejíž vlastnosti odpovídají literárním údajům pro tanin.

6. Deriváty, rozdělené papírovou chromatografií, byly zkoušeny v jejich účinku na klíčení ječmene. Brzdící účinek vykazovala především látka s vlast-nostmi kyseliny chlorogenové a sloučeniny, sou-hlasící s literárními údaji pro tanin v pivovarských surovinách. Menší, ale znatelně brzdící účinky dává i substance s průběhem absorpční křivky ka-techinu a ještě jedna substance, vyskytující se na chromatogramech jako oranžově fluoreskující skvr-na, obsažená ve všech kapalinách.

Došlo do redakce 27. 3. 1939.

Literatura

- [1] Lüers H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen von Brauerei und Mälzerei. Norimberk 1948
- [2] Lebreton P. A. a spolupracovníci: Brauwissenschaft 11, 58 (1958)
- [3] Wye E., Mac Farlane W. D.: Studies on the Flavonoid compounds in wort and beer. I., II. European brewery convention, str. 298. Amsterdam 1955

- [4] Blank F.: Bot. Rev. 13, 241 (1947)
- [5] Seikel M. K., Geissman T. A.: Arch. biochem. biophys. 71, 17 (1957)
- [6] Suzuki S.: Bull. Coll. Agr. Tokyo 7, 29 (1906); C. A. 2, 150 (1908)
- [7] Lewicki S.: Mém. inst. natl. polonais écon. rurale Pulawy 10, 342 (1929); C. A. 27, 5098 (1933)
- [8] Gassner G., Straib W.: Angew. Botan. 19, 225 (1937); C. A. 31, 342 (1939)
- [9] Schulz K. G.: Wochenschrift Brau. 52, 33, 41, 51 (1935); C. A. 27, 8224 (1935)
- [10] Eugelkemeir D. W.: J. Am. Chem. Soc. 69, 155 (1947)
- [11] Geissman T. A.: J. Am. Chem. Soc. 71, 3893 (1949)
- [12] Shaw B. L., Simpson T. H.: J. Am. Chem. Soc. 81, 5027 (1959)
- [13] Hergert H. L., Kurt E.: J. Am. Chem. Soc. 75, 1022 (1953)
- [14] Johnson L. M.: J. Pharm. 118, 169 (1946)
- [15] Adam a spolupracovníci: J. Am. Chem. Soc. 53, 727 (1931)
- [16] Geissman T. A.: Antocyanins, Chalcones, Aurones, Flavones and related Water-soluble Plant Pigments. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse díl 3., str. 450 (Peach K., Tracey M. V., Berlin 1955)
- [17] Freudenberg K.: J. Am. Chem. Soc. 54 (1932)
- [18] Laurente W. J. C. a spolupracovníci: Biochem. J. 32, 1661 (1938)
- [19] Knapp A. W. a spolupracovníci: Analyst 64, 475 (1939)
- [20] Forsyth W. G. C.: Biochem. J. 51, 511 (1952)
- [21] Kursanov A. L.: Sintéz i prevrácenie dubilných věšestv v čajnom rastení. SSSR 1952
- [22] Forsyth W. G. C.: Biochem. J. 60, 108 (1955)
- [23] Forsyth W. G. C.: Biochem. J. 53, 332 (1953)
- [24] Roberts E. A., Wood D. J.: Biochem. J. 53, 332 (1953)
- [25] Kieser M. E. a spoluprac.: Chem. and Ind. 1260 (1953)
- [26] Kieser M. E. a spoluprac.: Chem. and Ind. 540 (1952)
- [27] Bate-Smith, Swain: Chem. and Ind. 337 (1953)
- [28] Smidt O.: Natürliche Gerbstoffe. Moderne Methoden der Pflanzen-analyse díl 3., str. 517 (Peach K., Tracey M. V., Berlin 1955)
- [29] Wilson C.: J. Am. Chem. Soc. 61, 2303 (1939)
- [30] Tanböck K.: Naturwissensch. 30, 439 (1942)
- [31] Kursanov A. L., Zapromětov M. N.: Biochimija 14, 467 (1945)
- [32] Robinson G. M., Robinson R.: Biochem. J. 26, 1647 (1932)
- [33] Robinson G. M., Robinson R.: Biochem. J. 25, 1687 (1931)
- [34] Gulati K. C., Ray I. N.: Kurrent Sci 5, 75 (1936)
- [35] Gomm A. S., Nyerentlin M. J.: J. Am. Chem. Soc. 53, 4408 (1931)
- [36] Beker W., Robinson R.: J. Am. Chem. Soc. 3117 (1928)
- [37] Rao K. V., Seshadri T.: Pr. Ind. Acad. Sci 22A, 383 (1945); C. A. 40, 4061 (1946)
- [38] Neu R.: Naturwissensch. 43, 82 (1956)
- [39] Haack E., Kaiser F., Cube M., Spingler H.: Naturwissensch. 43, 301 (1956)
- [40] Collie J. N., Ticke T.: Chem. Soc. 75, 710 (1889)
- [41] Hewitt J. T.: Z. Physik. Chem. Soc. 75, 210 (1889)
- [42] Perhyn W. H. a spoluprac.: J. Am. Chem. Soc. 93, 1085 (1908)
- [43] Hantersch A.: Ber. 52, 1544 (1919)
- [44] Diltthey W.: Ber. 53, 261 (1920)
- [45] Diltthey W., Quint F.: J. Prakt. Chem. 131, 1 (1931)
- [46] Diltthey W., Höschen W.: J. Prakt. Chem. 138, 42 (1933)
- [47] Hill D. W., Melhuish R. R.: J. Chem. Soc. 1161 (1935)
- [48] Rabatě a spoluprac.: Bull. Soc. Chem. Biol. 20, 459 (1938)
- [49] Freudenberg K. a spoluprac.: Ber. 84, 144 (1904)
- [50] Wiliashko N.: Arch. Pharm. 242, 284 (1904)
- [51] Tauret Ch.: Compt. rend. 129, 725 (1889)
- [52] Harborne J. B., Sherratt H. S. A.: Biochem. J. 65, 23p (1957)
- [53] Harborne J. B., Sherratt H. S. A.: Biochem. J. 65, 24p (1957)
- [54] Huang H. T.: J. agric. Fd. Chem. 3, 141 (1954)
- [55] Hathway D. E., Seakins J. W. T.: Biochem. J. 65, 32p (1957)
- [56] Hathway D. E., Seakins J. W. T.: Biochem. J. 65, 23p (1957)
- [57] Lhoest W. a spoluprac.: Bull. Assoc. Etud., Ecole super brass., univ. Louvain 3 (1953)
- [58] Vystřelil A.: Rostlinné glykosidy, str. 84. Praha 1957
- [59] Stevens R.: J. Inst. Brew. 64, 470 (1958)
- [60] Masquelier J.: Bull. Soc. chim. biol. 38, 65 (1956)
- [61] Pacheco H.: Bull. Soc. chim. biol. 39, 971 (1957)
- [62] Harborne J. B., Sherratt H. S. A.: Biochem. J. 65, 23 (1957)
- [63] Forsyth W. G. C., Quesnel V. C.: Biochem. J. 65, 177 (1957)
- [64] Herrmann K.: Naturwissensch. 45, 111 (1958)
- [65] Börner H.: Naturwissensch. 45, 138 (1958)
- [66] Herrmann K.: Naturwissensch. 43, 109 (1956)
- [67] Einouke Wada, Masanao Ihida: Archiv biochem. biophys. 71, 393 (1957)
- [68] Wolf J.: Naturwissensch. 45, 130 (1958)
- [69] Rabin R. S., Klein R. M.: Archiv biochem. biophys. 70, 11 (1957)
- [70] Hais, Macek: Papírová chromatografie. Praha 1953
- [71] Schon S. A.: Helv. 10, 150 (1939)
- [72] Gènevois M. J.: Bull. Soc. chim. biol. 38, 7 (1956)
- [73] Skarzinski B.: Biochem. Z. 301, 150 (1939)
- [74] Hayastra K.: C. A. 30, 8024 (1935)
- [75] Sontheymer E., Kerters Z. I.: Analyt. Chem. Soc. 70, 3476 (1948)
- [76] Sontheymer E.: J. Am. Chem. Soc. 75, 1507 (1953)
- [77] Shimishu M. a spoluprac.: J. Pharm. Soc. Japan 71, 875 (1951); C. A. 46, 4004 (1952)
- [78] Shimishu M. a spoluprac.: J. Pharm. Soc. Japan 71, 882 (1951); C. A. 46, 4004 (1952)
- [79] Shimishu M. a spoluprac.: J. Pharm. Soc. Japan 71, 1488 (1951); C. A. 46, 4004 (1952)
- [80] Ice G. H., Wender H. S.: J. Am. Chem. Soc. 75, 50 (1953)
- [81] Hörhammer, Rao S. B.: Arch. Pharm. 287, 34 (1954)
- [82] Willstädter R., Zolliger E. H.: Ann. 412, 168 (1916)

ПОЛИФЕНОЛОВЫЕ ВЕЩЕСТВА В ВОДЕ ПРИМЕНЯЕМОЙ ДЛЯ ЗАМОЧКИ ЯЧМЕНЯ В СОЛОДИЛЬНАХ

Полифеноловые вещества находящиеся в исходном сырье пивоваренных заводов переходят в конечный продукт и влияют там отрицательно на его качество. Это относится в первую очередь к дубильным веществам ячменя. Желательно поэтому в максимально возможной степени выщелочить такие вещества при замочке ячменя в солодильне. Эксперименты по применению щелочной воды показали, что этим образом можно выщелочить существенную часть полифеноловых веществ. Хроматограммы экстрактов из щелочной воды отличались пятнами с более интенсивной и яркой флуоресценцией чем хроматограммы экстрактов из обычной воды применяемой в солодильнях.

Исследовательская работа, целью которой была изоляция и определение полифеноловых веществ в воде сточающей после замочки дала следующие результаты:

1. Был установлен наиболее рациональный метод экстрагирования полифеноловых веществ и их классификации по группам.

2. Отдельные фракции определялись при помощи распределительной хроматографии.

3. Индивидуальные дериваты были изолированы путем выщелачивания пятен из хроматограмм и их дальнейшего разделения на бумаге.

4. Полученные таким образом пятна считались химически чистыми веществами и подвергались спектрофотометрическому определению.

5. Из мочильной воды было изолировано семь полифеноловых дериватов. При идентификационном анализе одно из веществ дает реакцию отвечающую хлорогеновой кислоте. Далее было обнаружено вещество абсорбционный спектр которого сходен со спектром катехина. Присутствует также вещество с абсорбционным максимумом в области флавоноидов, которое однако не было точно идентифицировано. Кроме того присутствует вещество, которое по свойствам можно, на основании данных из литературы, считать таннином.

6. Дериваты распределенные при помощи бумажной хроматографии испытывались с точки зрения их влияния на прорастание ячменя. Тормозящий эффект был обнаружен лишь у вещества имеющего свойства хлорогеновой кислоты а также у вещества отвечающего таннину. Более слабое, однако заметное, тормозящее влияние оказывает также вещество с абсорбционной кривой отвечающей катехину а кроме того еще дальнейшее вещество появляющееся на хроматограммах в форме флуоресцентного оранжевого пятна и обнаруженное во всех растворах.

POLYPHENOLSTOFFE IN DEM WEICHWASSER DER MÄLZEREIEN

Die in den Brauereirohstoffen enthaltenen Polyphenolsubstanzen gehen in das Fertigprodukt über, dem sie unerwünschte Eigenschaften erteilen. Auf diese Art kommen besonders die Gerbstoffe der Gerste zur Geltung. Es ist demnach erstrebenswert, dass schon in der Gerstenweiche ein möglichst hoher Anteil dieser Stoffe ausgelaugt wird. Die Versuche mit der Gerstenweiche in alkalisiertem Wasser bestätigen, dass auf diese Art die Polyphenolstoffe grösstenteils ausgelaugt werden können. Die Chromatogramme der Extrakte dieser Wässer zeigten Flecken grösserer und hellerer Fluoreszenz als die Chromatogramme der Extrakte normaler Betriebsweichwässer.

In der Arbeit wird die Isolation und Identifikation der Polyphenolstoffe in Wässern nach der Gerstenweiche versucht:

1. Das passendste Extraktionsverfahren für die Polyphenolstoffe wurde erprobt, sowie auch die Einteilung dieser Substanzen in Gruppen nach dem Extraktionsverfahren.

2. Die einzelnen Fraktionen nach der Extraktion wurden mittels Papierchromatographie getrennt.

3. Durch Auslaugung der Flecken auf den Chromatogrammen und ihre Weiterverteilung auf Papier wurden die einzelnen Derivate isoliert.

4. Die so erzielten Flecken wurden für chemisch reine Stoffe gehalten und unter dieser Voraussetzung vorläufig spektrophotometrisch bestimmt.

5. Aus den Weichwässern wurden sieben Polyphenolderivate isoliert. Bei den Identifikationsversuchen wies eine Substanz die Reaktionen der Chlorogensäure auf. Weiter ist ein Stoff anwesend, welcher einen identischen Verlauf des Absorptionsspektrums mit Katechin zeigt. Eine weitere Substanz, die näher nicht identifiziert werden konnte, wies den Verlauf des Absorptionsmaximums auf dem Gebiet der Flavonoide auf. Endlich ist eine Substanz anwesend, deren Eigenschaften den Literaturangaben für Tannin entsprechen.

6. Die mittels Papierchromatographie geteilten Derivate wurden auf ihre Wirkung auf die Gerstenkeimung geprüft. Einen keimungshemmenden Effekt wies vor allem die durch Eigenschaften der Chlorogensäure gekennzeichnete Substanz auf; weiter die Verbindung, welche mit den Literaturangaben für Tannin im Braumaterial übereinstimmt. In geringerem, aber doch deutlichem Masse wirkte auch die Substanz mit katechinähnlichem Verlauf der Absorptionskurve keimungshemmend, sowie auch ein weiterer Stoff, der auf den Chromatogrammen als ein orange-gelb fluoreszierender-Flecken auftritt, und welcher in allen Flüssigkeiten enthalten ist.

POLYPHENOLIC SUBSTANCES IN MALT STEEPING WATER

Polyphenolic substances which are present in raw materials used by breweries find their way into final product and deteriorate its properties. In the first place tanning matter from barley should be mentioned. It is therefore desirable to leach the greatest possible part of such matters by steeping process in malt plants. The experiments with steeping barley in alcalic water indicate that the method is efficient and can remove a substantial proportion of polyphenolic substances. Chromatograms of extracts from alcalic water are distinguished by spots of more intensive and brighter fluorescence than chromatograms of conventional water.

The results of research work aimed at isolation and identification of polyphenolic substances in the steeping water can be summed up as follows:

1. An efficient method has been worked out for extracting polyphenolic compounds and classifying them into groups.

2. After extraction individual fractions were divided by paper chromatography.

3. Various derivatives were isolated by leaching the spots on chromatograms and repeated application of paper.

4. The secondary spots were supposed to be pure substances and were consequently identified by means of spectrophotometric methods.

5. Seven polyphenolic derivatives were isolated from steeping water. The reaction of one of the compounds is identical with the chlorogenic acid. The absorption spectrum of the second matter is very much the same as that of catechine. Another substance has its absorption maximum in the region of flavonoids. This substance was not identified more precisely. Yet another matter may be determined, using criteria recommended in various papers, as tannic acid.

6. Derivates differentiated by paper chromatography were studied from the point of view of their influence upon germination-process of barley. The substance with properties of chlorogen acid has an inhibiting effect. So does the substance identified as tannic acid. Less perceptible effect has the substance with the absorption curve similar to catechine and yet another substance present in each of the tested solutions characterized on chromatograms as orange fluorescent spot.