

# Stanovení poměru redukující oligosacharidy/monosacharidy ve sladidně

663.443  
547.455/.458

Ing. MIROSLAV ČERVINKA, HŠS Branišovice

Do redakce došlo 7. 6. 1971

Biochemie a biofyzika rozvinuly pro svou potřebu řadu technik, kterých se úspěšně používá při řešení otázky osudu vysokomolekulárních látek ječmene při sladování a rmutování. Je samozřejmé, že těmto technikám zůstane vyhrazeno v základním výzkumu první místo, pokud se nevyskytnou metody dokonalejší.

Pro šlechtitele jarních ječmenů mají tyto výsledky mimořádný význam, i když k jejich plnému pochopení a využití bude třeba nahradit nynější systémem práce, spočívající převážně na intuici a intimní znalosti materiálů, systémem založeným na hlubokých znalostech genetiky, biochemie a biofyziky.

Těmito technikami nelze ovšem hodnotit všechna novošlechtění, neboť jsou časově náročné a často přístrojově nedostupné. Proto je nutno spokojit se alespoň s hrubým obrazem, tak jak jej např. pro bílkoviny vyjadřuje množství rozpustného dusíku a z něho vypočtené Kolbachovo číslo. Pro obraz a hladinu sacharidů ve sladidně neexistuje podobná provozně analytická metodika, nepočítá-li se problematické stanovení stupně prokvašení. Z toho důvodu vznikla tato práce, která ve spojení s předchozí [6], je pokusem vyplnit tuto mezeru.

Obraz a hladina sacharidů ve sladidně jsou předmětem obsáhlého výzkumu za použití nejrůznějších metodik. Nejpožívanější jsou prozatím metody založené na *rozdělovací* [1, 2, 11, 12, 16, 17, 19, 20, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 40] a *adsorpční* [23, 41] rovnováze, popřípadě na jejich kombinaci [31, 37] v klasickém provedení. Možné aplikace elektroforézy uvádí *Gastiani* [4] a *Stocker* [38, 39]. V pracích *Clappertona* a *Hollidaye* [5] a *Tuninga* [42] našla uplatnění plynová chromatografie. Mikrobiologickou metodu rozpracovala a prakticky použila *weihenstephanská škola* [3, 28, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 55, 56]. *Harris* a *Mac William* [13] použili enzymů a jejich specifického účinku. Podstatně dokonaleji je tato myšlenka rozpracována u *Drawerta* a *Hagena* [8, 9]. Velmi vzácně se objevují jiné fyzikálně chemické metodiky. *Dyr* a *Moštek* se pokusili zavést do praxe konduktometrii [10]. Polarografie našla uplatnění v práci

*Hummelově* [21] a *Červinkově* [6]. Hummelova práce se týká sice piva, ale je velmi pravděpodobné, že by ji bylo možno aplikovat i na sladidnu. *Sampietro* a *Invernizzi* [34] využili optické aktivity a redukčních vlastností cukrů k analýze sladidny.

Z uvedených prací a dále z prací *Hudsona* [15], *Frankeho* [18], *Harrise*, *Mac Williama* a *Halla* [21], *Weyha* [52] a *Mac Williama* [53] lze vyvodit tyto závěry:

1. Hlavními představiteli redukujících oligosacharidů ve sladidně jsou maltóza a maltotrióza.

2. Hlavní podíl monosacharidů tvoří glukóza a fruktóza.

3. Poměr redukující oligosacharidy (monosacharidy) u normálně připravených sladidny leží v intervalu

$$10:1 < \frac{RO}{MO} \leq 1:1$$

kde  $RO$  = redukující oligosacharidy tvořené maltózou a maltotriózou a  $MO$  = monosacharidy tvořené glukózou a fruktózou.

4. Množství maltulózy, maltotetraózy atd. lze zanedbat proti množství maltózy a maltotriózy. Totéž platí pro pentózy vzhledem ke glukóze a fruktóze.

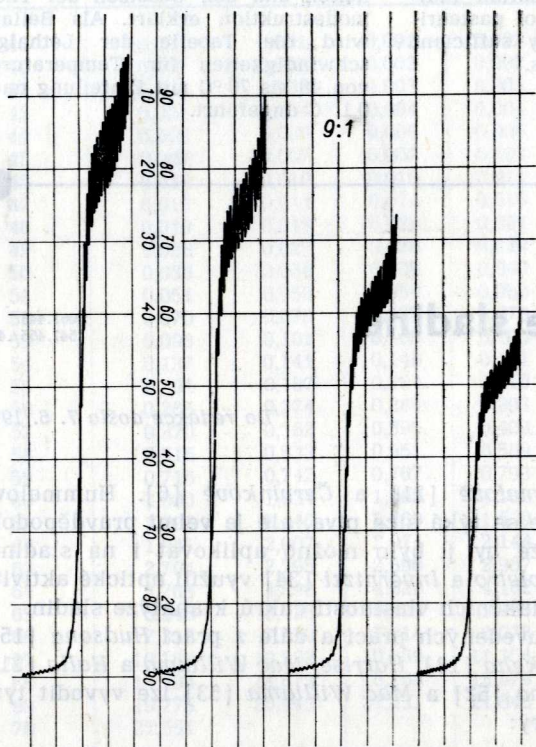
Pro všechna měření je použito maltózy ( $M$ ) jako reprezentanta redukujících oligosacharidů a glukózy ( $G$ ) ve stejném smyslu za monosacharidy.

## Princip metodiky

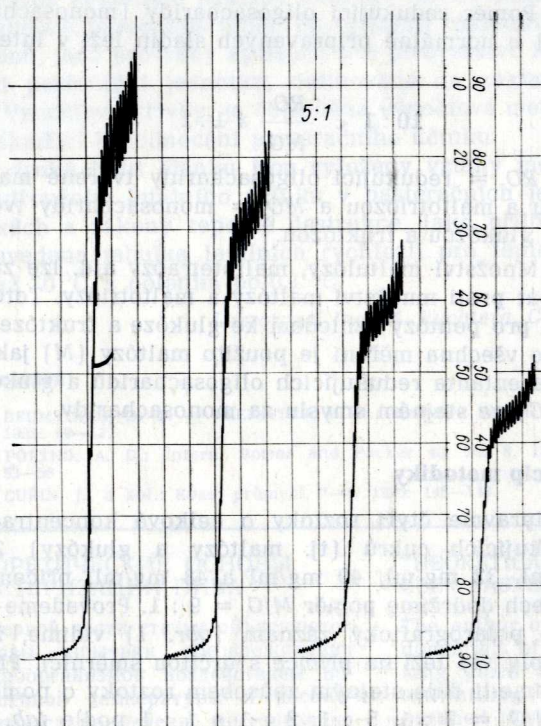
Připravme čtyři roztoky o celkové koncentraci redukujících cukrů (tj. maltózy a glukózy) 24 mg/ml, 32 mg/ml, 40 mg/ml a 48 mg/ml, přičemž u všech dodržíme poměr  $M/G = 9:1$ . Provedeme-li nyní polarografický záznam (*obr. 1*) vidíme, že vrcholy vln leží na přímce s určitou směrnici. Připravíme-li dále stejným způsobem roztoky o poměru  $M/G = 7:1$ ,  $5:1$ ,  $3:1$  a  $1:1$  podle *tab. 1* (*tab. 1*) a registrujeme-li vlny (jako příklad jsou uvedeny polarogramy pro poměr  $5:1$  a  $1:1$ ) (*obr. 2 a 3*), pak přímky, spojující vrcholy vln mají



směrnice, jejichž velikost závisí na poměru  $M/G$ . Přehledně je to vidět z obrázku 4 (obr. 4), na němž jsou tyto přímky pro větší názornost vyneseny z jednoho bodu.



Obr. 1. Polarogram pro poměr  $M/G = 9 : 1$  při celkové koncentraci cukrů 24 mg/ml, 32 mg/ml, 40 mg/ml a 48 mg/ml



Obr. 2. Polarogram pro poměr  $M/G = 5 : 1$  při celkové koncentraci cukrů 24 mg/ml, 32 mg/ml, 40 mg/ml a 48 mg/ml

Tabulka 1.

Poměr $M : G$	Číslo odměrné 100 ml baňky	Maltóza	Glukóza
		ml	ml
9 : 1	1	21,6	2,4
	2	28,8	3,2
	3	36,0	4,0
	4	43,2	4,8
7 : 1	5	21,0	3,0
	6	28,0	4,0
	7	35,0	5,0
	8	42,0	6,0
5 : 1	9	20,0	4,0
	10	26,6	5,3
	11	33,3	6,66
	12	40,0	8,0
3 : 1	13	18,0	6,0
	14	24,0	8,0
	15	30,0	10,0
	16	36,0	12,0
1 : 1	17	12,0	12,0
	18	16,0	16,0
	19	20,0	20,0
	20	24,0	24,0

Směrnice přímky dané dvěma body je

$$k = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Položíme-li:  $y_i = h_i$  (výška vln v mm),

$x_i = c_i$  (celková koncentrace redukujících cukrů v mg/ml),

potom

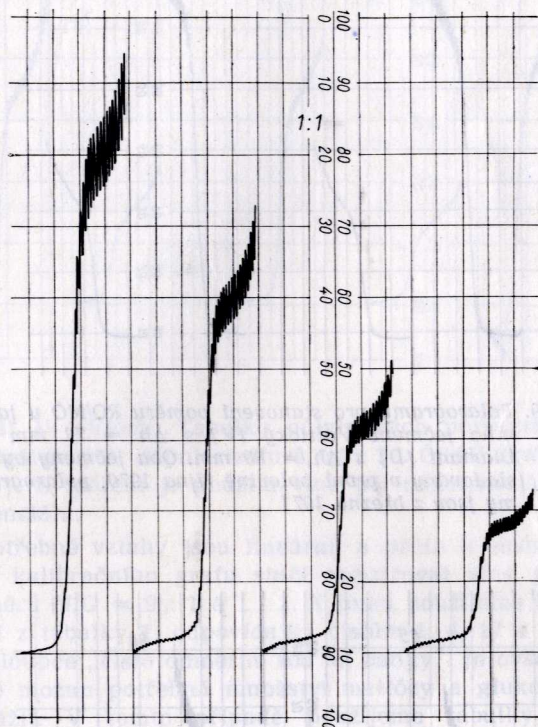
$$k = \frac{h_2 - h_1}{c_2 - c_1} = \frac{\Delta h}{\Delta c}$$

kde  $\Delta h$  je rozdíl výšek vln a  $\Delta c$  rozdíl koncentrací v mg/ml.

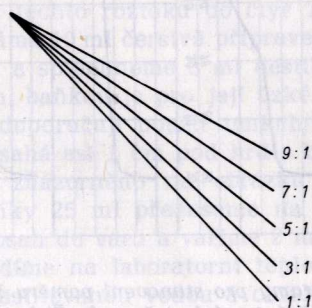
Směrnice přímky nezávisí na rozdílu koncentrací, nýbrž jen na jejich podílu, což bylo dokázáno tímto pokusem. Byly připraveny roztoky o poměru  $M/G = 9 : 1$  a  $1 : 1$ , a to pro celkovou koncentraci redukujících cukrů 40 mg/ml a 48 mg/ml a jejich hodnot polovičních, tj. 20 mg/ml a 24 mg/ml podle tab. 2 (tab. 2). Rozdíl koncentrací je v prvním případě 20 mg/ml a ve druhém 24 mg/ml, kdežto jejich podíl je v obou případech 0,5. Polarogramy



jsou na obrázcích 6 a 7 (obr. 6 a 7). Rozdíly výšek vln uvedených v tabulce 2 ve sloupcích  $(h_2 - h_1)_{40}$  a  $(h_2 - h_1)_{48}$  jsou v mezích analytické chyby konstantní.



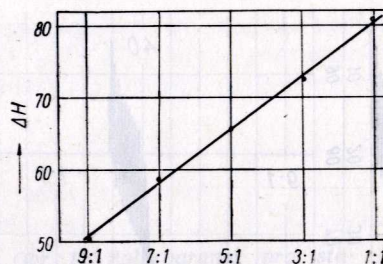
Obr. 3. Polarogram pro poměr M/G = 1 : 1 při celkové koncentraci cukrů 24 mg/ml, 32 mg/ml, 40 mg/ml a 48 mg/ml



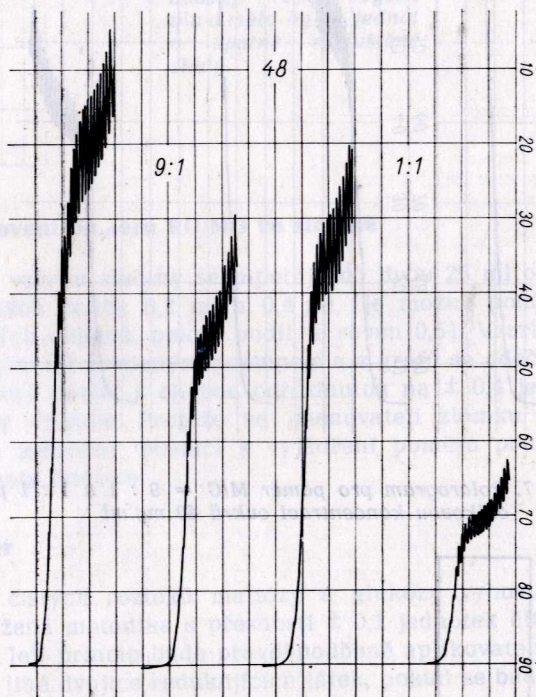
Obr. 4.

Tabulka 2.

Poměr M/G	Výška vlny mm	Celková konc. red. cukrů 40 mg/ml	Celková konc. red. cukrů 48 mg/ml	$(h_2 - h_1)_{40}$	$(h_2 - h_1)_{48}$
9 : 1	168	156		59	56
	109	100			
1 : 1	165	128		84	86
	81	42			



Obr. 5. Kalibrační přímka pro odečítání poměru RO/MO ze zjištěného rozdílu výšek vln

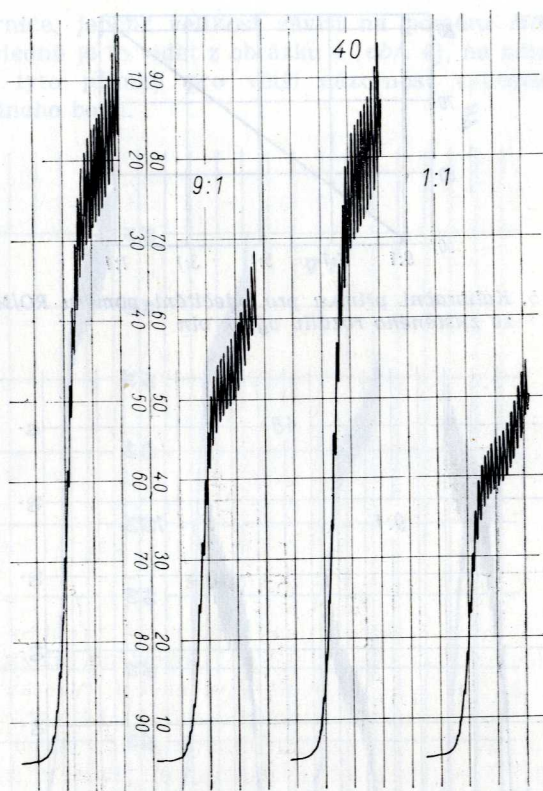


Obr. 6. Polarogram pro poměr M/G = 9 : 1 a 1 : 1 pro celkovou koncentraci cukrů 48 mg/ml

Na základě předchozího je možno vyslovit tento závěr: Směrnice přímky pro daný poměr M/G je závislá pouze na tomto poměru a vypočte se jako podíl z rozdílu výšek vln a poměru koncentrací. Pracujeme-li při stále stejném podílu koncentrací, potom směrnice a tím také podíl M/G je určen pouze rozdílem výšek vln. Tento závěr lze zobecnit a hovořit o poměru RO/MO, přičemž stanovení v tomto případě bude zatíženo větší chybou, neboť se zanedbává vliv pentóz, některých oligosacharidů a ostatních redukujících látek sladiny na směrnici. Kalibrační graf pro stanovení poměru RO/MO ze zjištěného rozdílu výšek vln je na obr. 5 (obr. 5) a platí pro podíl koncentrací 0,5.

Praktická měření na sladidě vyžadují tento postup. Z téhož vzorku sladiny se odměří 0,2 ml a 0,4 ml do 25 ml odměrných baněk. Vzorky se zpracují způsobem popsaným dále a ze změřeného rozdílu výšek vln se odečte poměr RO/MO. Jedné z obou vln lze použít ke stanovení redukujících látek sladiny [6] a tím je dána možnost vyjádřit množství redukujících oligosacharidů a monosacharidů v g/100 ml sladiny v maltózových nebo jiných jednotkách.





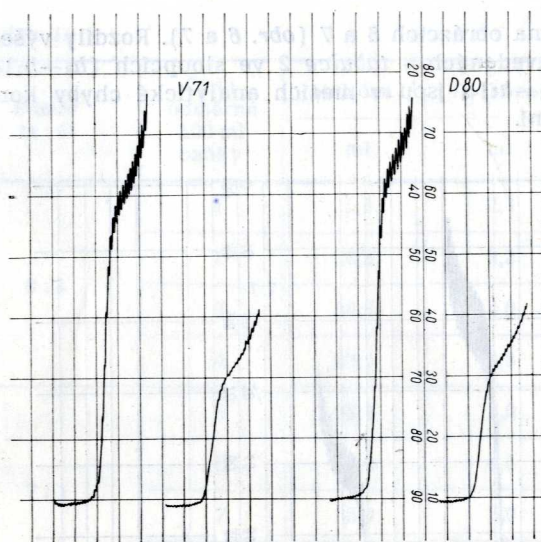
Obr. 7. Polarogram pro poměr M/G = 9 : 1 a 1 : 1 pro celkovou koncentraci cukrů 40 mg/ml



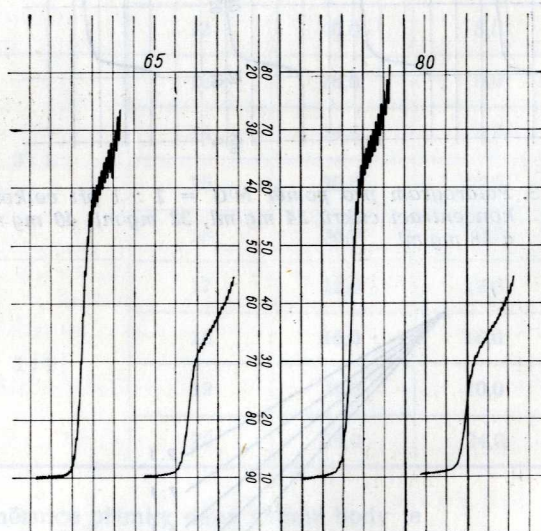
Obr. 8. Schéma úpravy pro plnění odměrných baněk 25 ml

Tabulka 3. Navážky be vodě maltózy a glukózy pro sestavení kalibračního grafu

Poměr M/G	Maltóza	Glukóza
9 : 1	2,16	0,24
	4,32	0,48
1 : 1	1,2	1,2
	2,4	2,4



Obr. 9. Polarogramy pro stanovení poměru RO/MO u jarního ječmene Valtický (V) s  $\Delta h = 71$  mm a Diamant (D) s  $\Delta h = 80$  mm. Oba ječmeny byly sladovány v první polovině října 1970, polarogramy jsou z března 1971



Obr. 10. Polarogramy pro stanovení poměru RO/MO u novošlechtění jarních ječmenů. Čísla udávají rozdíl výšek vln. Podle literatury uvedené v závěru jsou to dobře rozluštěné slady.

#### Základní roztoky a kalibrační graf

1. D—(+)—maltóza kryst. Erg. B.6 fy Merck. Základní roztok obsahuje 100 mg/ml. Ředění podle tab. 1.

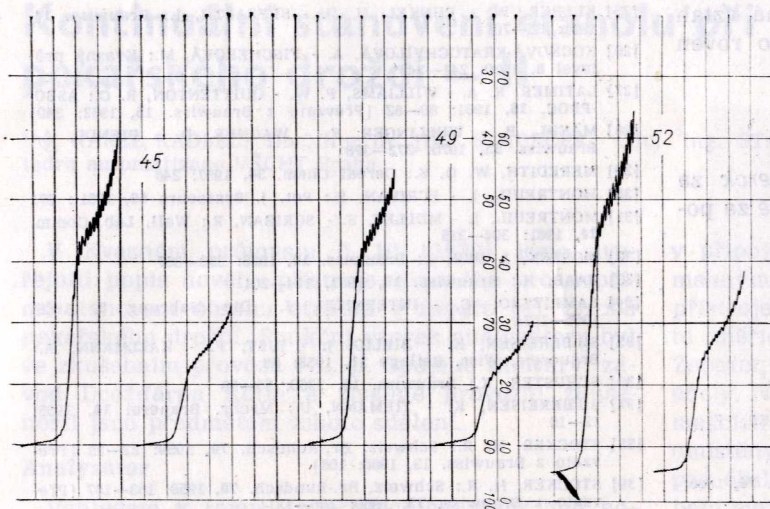
2. D—glukóza p.a. fy Lachema, n. p. Základní roztok obsahuje 100 mg/ml. Ředění podle tab. 1.

3. Fehling I: 69,2 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ .

4. Fehling II: 364 g Seignettovy soli a 100 g NaOH v 1 litru destilované vody. Těsně před použitím se smísí roztoky I a II v poměru 1 : 1.

5. Základní elektrolyt: 1M Seignettovy soli a 1M KOH v jednom litru destilované vody. V tomto roztoku dává měř dvě vlny, a to při  $-0,55$  V a při





Obr. 11. Polarogramy pro stanovení poměru RO/MO u novošlechtění jarních ječmenů. Čísla udávají rozdíl výšek v'n a mělo by se jednat o špatně rozluštěné slady.

—0,81 V. [Vlček: Tabulky půlvlnových potenciálů anorganických depolarizátorů, str. 32. ČSAV Praha 1956]. K měření je použita vlna při negativnějším potenciálu.

Potřebné vztahy jsou lineární, a proto k sestavení kalibračního grafu stačí registrovat vlny při poměru  $M/G = 9 : 1$  a  $1 : 1$ . K tomu použijeme ředění z tabulky 1, odpovídající číslům 1, 4, 17 a 20 ze sloupce „číslo odměrné 100 ml baňky“. Je ovšem také možno potřebná množství maltózy a glukózy odvážit. V tomto případě použijeme tabulky 3 [tab. 3].

Postupujeme tak, že ze základního roztoku odměříme do 100 ml baňky přesně počet ml uvedených v tabulce 1 (respektive odvážíme podle tabulky 3) a doplníme po značku. Po důkladném promíchání pipetujeme z těchto roztoků do čtyř 25 ml baňek po 1 ml, přidáme 10 ml čerstvě připraveného Fehlingova roztoku a spláchneme 3 ml destilované vody. Práce s 25 ml baňkou je pro její úzké hrdlo obtížná, a proto doporučuji použít tenkohrdlé nálevky, jejíž stopka sahá asi 1 cm pod hrdlo baňky, jak je schématicky znázorněno na obrázku 8 [obr. 8]. Odměrné baňky 25 ml přeneseme na vodní lázeň, zahřejeme obsah do varu a vaříme 2 minuty. Potom rychle ochladíme na laboratorní teplotu, doplníme po značku destilovanou vodou a obsah vlijeme naráz na filtr Sch.Sch. 602 průměru 12,5 cm. Filtrát se jímá do kónických baňek se zabroušenou zátkou. Dobře uzavřené roztoky jsou stále nejméně 10 dní při normální laboratorní teplotě a na světle.

K registraci polarografických vln bylo použito polarografu LP 60 s lineárním zapisovačem EZ 2. Do Novákových nádobek se pipetuje 5 ml základního elektrolytu a 1 ml filtrátu. Kyslík se odstraňoval vodíkem. Všechna měření jsou provedena za stejných podmínek jako v předchozí práci [6], tj.  $h = 85$  cm,  $1/100$ ,  $200$  mV/min,  $mt^{-1} = 2,8$  mg, tlumení  $1,20$  mm/min.

Ze změřených výšek vln se určí  $\Delta h$  jako průměr dvou nebo tří nezávislých měření (doporučuji opakovat celý postup dvakrát nebo třikrát, aby se vyloučila chyba nesprávným odměřením roztoku nebo ochlazením na laboratorní teplotu). Ve vhodném měřítku se potom sestrojí kalibrační graf.

### Stanovení poměru RO/MO ve sladidně

Ze vzorku sladiny se pipetuje do dvou 25 ml odměrných baňek 0,2 ml a 0,4 ml (je možné použít i jiných objemů, pokud podíl je roven 0,5). Vzorky se zpracují uvedeným postupem a z grafů se odečte hledaný poměr s chybou odhadnutou na  $\pm 0,4$  jednotky čitatele. Protože ve jmenovateli zlomku je stále jednotka, postačí k vyjádření poměru pouze hodnota čitatele.

### Závěr

U čistých roztoků maltózy a glukózy vyhovuje navržená metodika s přesností  $\pm 0,1$  jednotek čitatele. Její princip bude pravděpodobně aplikovatelný i na jiné dvojice redukujících látek, pokud se budou lišit svou redukční mohutností.

I když bude třeba další práce, aby se poměr RO/MO uvedl do vztahu k běžným technologickým parametrům, lze již dnes zjistit z literatury, že souvisí se stupněm rozluštění sladu. Například Greig [20] připravil ze skotských ječmenů normálně a špatně rozluštěné slady. V prvním případě je poměr RO/MO 5,9:1 a ve druhém 7:1. Podobně Weinfurter a kol. [44] připravili normálně rozluštěné (a), přelštěné (b) a špatně rozluštěné (c) slady. V případě (a) je poměr 5,97—6,4 : 1, u (b) je 6,4 : 1 a u (c) je 9,32 : 1. Z toho lze předběžně usoudit, že je-li poměr RO/MO větší než 7 : 1, jde o slad špatně rozluštěný.

### Souhrn

Předložená práce spolu s předcházející [6] představuje pokus o hrubé zjištění obrazu a hladiny sacharidů ve sladidně pro šlechtitelské účely. Spočívá na skutečnosti, že hlavními zástupci redukujících oligosacharidů sladiny jsou maltóza a maltotrióza a monosacharidů glukóza a fruktóza. Jejich poměr RO/MO lze jednoduše stanovit z rozdílu výšek polarografických vln, registrovaných při poměru koncentrací 0,5. Prakticky to znamená registrovat dvě vlny pro objem 0,2 ml a 0,4 ml téhož vzorku sladiny a odečíst z kalibračního grafu hodnotu RO/MO.



Předběžně se ukázalo, že tento poměr má vztah ke stupni rozluštění sladu. Je-li větší nebo roven 7 : 1, potom jde o slady špatně rozluštěné.

### Poděkování

Děkuji p. prof. Dr. Markovi a firmě Merck za ochotné poskytnutí maltózy a s. J. Hlouchové za pomoc při analýzách a nakreslení obrázků.

### Literatura

- [1] AMORE, M. G.: Birra e Malto 17, 1970: 3—13
- [2] ARKIMA, V. - RINTALE, P.: Brauwiss. 12, 1939: 182
- [3] AUFHAMMER, G. - WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 19, 1936: 7—2
- [4] CASTIAN, M.: b. i. f. 3, 1930, 9—15
- [5] CLAPPERTON, J. F. - HOLLIDAY, A. G.: J. Inst. Brew. 74, 1968: 164—169
- [6] ČERVINKA, M.: Kvasný průmysl 17, 1971: 82—84
- [7] DELLWEG, H. - TRÉNEL, G. - JOHN, . - EMEIS, C. C.: Mschr. Brauerei 22, 1969: 177—181
- [8] DRAWERT, F. - HAGEN, W.: Brauwiss. 23, 1970: 1—6
- [9] DRAWERT, F. - HAGEN, W.: Brauwiss. 23, 1970: 95—101
- [10] DYR, J. - MOŠTEK, J.: Kvasný průmysl 4, 1958: 50—53
- [11] DYR, J. - MOŠTEK, J.: Brauwiss. 18, 1965: 297—306
- [12] ERDAL, K.: Brygmesteren 21, 1964: 281—286 [Převzato z Brauwiss. 18, 1965: 228]
- [13] HARRIS, G. - MAC WILLIAM, I. C.: Inst. Brew. 66, 1960: 147—150
- [14] HUDSON, J. R. - MAC WILLIAM, I. C.: Brauwelt 102, 1962: 470—472
- [15] HUDSON, J. R.: Brew. Gard. 97, 1968: 143—146
- [16] MC FARLANE, W. D. - HELD, H. R.: EBC - Proc. 67, 1953
- [17] GJERTSEN, P.: EBC - Proc. 37, 1955
- [18] FRANKE, G.: Brauwelt 104, 1964: 1017—1024
- [19] GREEN, S. R. - STONE, J.: Wallerstein Lab. Comm. 15, 1952: 347
- [20] GREIG, C. C.: J. Inst. Brew. 68, 1962: 48—51
- [21] HARRIS, G. - MAC WILLIAM, I. C. - HALL, R. D.: J. Inst. Brew. 65, 1959: 489—493
- [22] HUMMEL, J.: Kvasný průmysl 6, 1960: 123—124
- [23] JONES, J. K. N. - WALL, R. A. - PITTET, A. O.: Canad. J. Chem. 38, 1960: 2285—2289
- [24] KLEBER, W. - SCHMID, P. - SEYFARTH, I.: Brauwiss. 16, 1963: 1—4
- [25] KLEBER, W. - RUNKEL, U. D. - SEYFARTH, I.: Brauwiss. 14, 1961: 65—70
- [26] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. - FISCHEROVÁ, M.: Kvasný průmysl 6, 1960: 241—243
- [27] LATIMER, R. A. - WILLIAMS, P. W. - QUITTENTON, R. C.: ASBC-PROC. 16, 1961: 80—82 [Převzato z Brauwiss. 15, 1962: 340]
- [28] MÄNDL, B. - WULLINGER, F. - WAGNER, D. - PIENDL, A.: Brauwiss. 23, 1970: 372—378
- [29] MEREDITH, W. O. S.: Cereal Chem. 34, 1957: 246
- [30] MONTREUIL, J. - SCRIBAN, R.: Pet. J. Brasseurs 59, 1951: 671
- [31] MONTREUIL, J. - MULLET, S. - SCRIBAN, R.: Wall. Lab. Comm. 24, 1961: 304—315
- [32] MOŠTEK, J. DYR, J.: Brauwiss. 19, 1966: 358—367
- [33] RAAB, H.: Brauwiss. 16, 1963, 194—201
- [34] SAMPIETRO, C. - INTERNIZZI, I.: Die Nahrung 3, 1959: 1065—1074
- [35] SILBEREISEN, K. - BIELIG, J. - JUST, F. - KALLMANN, A.: Brauereit. Wiss. Beilage 11, 1958: 66
- [36] SCHUSTER, K.: Brauwiss. 13, 1960: 53—59
- [37] SILBEREISEN, K. - TIEMANN, U.: Mschr. Brauerei 18, 1935: 12—16
- [38] STOCKER, H. R.: Schweiz. Br.-Rundsch. 70, 1959: 22—25 [Převzato z Brauwiss. 13, 1960: 106]
- [39] STOCKER, H. R.: Schweiz. Br.-Rundsch. 70, 1959: 163—167 [Převzato z Brauwiss. 13, 1960: 130—131]
- [40] STÖCKLI, A.: Schweiz. Br.-Rundsch. 67, 1956: 1
- [41] TRÉNEL, G. - JOHN, M.: Mschr. Brauerei 23, 1970: 6—10
- [42] TUNING, B.: Int. T. Brouw. Mont. 28, 1968/69: 113—115
- [43] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 104, 1964: 342—349
- [44] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 17, 1964: 201—212
- [45] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 104, 1964: 948—959
- [46] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 105, 1965: 1857—1867
- [47] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 19, 1966: 312—316
- [48] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 105, 1965: 1361—1370
- [49] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 106, 1966: 405—412
- [50] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 19, 1966: 209—217
- [51] WEINFURTER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt 106, 1966: 345—352
- [52] WEYH, H.: Brauwiss. 19, 1966: 93—103
- [53] MC WILLIAM, I. C.: J. Inst. Brew. 74, 1938: 38—54
- [54] WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 17, 1964: 295—309
- [55] WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwelt, 67/68, 1964: 1285—1291
- [56] WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. 19, 1966: 187—195