

# Stanovení bílkovin ve sladu a sladíně metodou Kunitake-Kobayshiho

663.439.1:543.865  
663.443:543.865

Dr. ALICE DOLEŽALOVÁ - Ing. MARIE NENTWICHOVÁ, VÚPS Brno

Do redakce došlo 16. dubna 1977

Tendence zvyšování bílkovin v základní surovině — ječmenu vede k výrobním problémům spojeným s kvalitou sladu. Je třeba věnovat zvýšenou pozornost nejen přejímce ječmene, ale také výrobnímu procesu. K tomu mají sloužit jednoduché a rychlé metody, které mohou být použity provozními laboratořemi. Naší snahou je předat takové metody praxi a umožnit tak kontrolu nejen hotového sladu, ale průběžně i technologického procesu.

Praxi byla již předána metoda na stanovení bílkovin v ječmeni metodikou Kunitake - Kobayshiho (dále K+K). Tato jednoduchá a přesná metoda může být použita v každé laboratoři s minimálním finančním nákladem. Samotná metoda je vypracována japonskými autory výhradně pro ječmen. Jednoduchost a vhodnost metody nás vedla k tomu, že jsme se snažili využít principu i pro jiné stanovení dusíkatých látek, konkrétně ve sladu a sladíně.

Metoda nepracuje na přesných analytických základech, předpokládá jen vytěsnění 1/3 dusíkatých látek, které lze uvolnit silnými alkáliemi. Proteolytický enzymový proces mění strukturu bílkovin během sladování, a protože není elementárně stanoven, které molární vazby dusíkatých látek jsou vytěsňovány, mění se i poměr uvolněného dusíku sladu oproti ječmenu. Zkoušeli jsme metodu na různě rozluštěných sladech s rozdílnou hladinou bílkovin. Stanovení jsme vyzkoušeli i ve sladíně, kde problematika štěpení bílkovin je obdobná.

## Stanovení bílkovin ve sladu

Pro stanovení bílkovin ve sladu jsme vyzkoušeli dávkování louhu, délku destilace a rozluštění sladu od extrémně nízkých hodnot (KČ 31,8) až po slady přeluštěné (KČ 50,2). Žádná ze sledovaných veličin neovlivnila výsledky stanovení.

Navážka 2 g, používaná pro stanovení bílkovin v ječmenu, dávala trvale nižší hodnoty. Byla postupně vyzkoušena celá škála navážek od 2,0 do 2,5 g sladu. Nejlépe vyhovovala navážka 2,2 g sladu, kde rozdíly kolísaly mezi plus a minus hodnotami. Nejprve byla metoda porovnána s klasickou metodou Kjeldahlovou. Rozdíly byly minimální a pohybovaly se většinou v mezích chyby metody Kjeldahlové. Pro konečné hodnocení metody bylo vybráno 40 sladů z provozu s rozmezím obsahu bílkovin 9,9 až 11,1%. V době, kdy byly vzorky analyzovány, byl již v provozu přístroj na stanovení bílkovin Kjel-Foss a protože chyba stanovení u tohoto přístroje je minimální, byly srovnávací vzorky analyzovány na uvedeném přístroji. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Tato tabulka byla použita k matematickému hodnocení. Pro hodnocení rozdílu bylo užito *t*-testu pro závislé výběry. Na základě *t*-testu bylo zjištěno, že metoda není zatížena chybou náhodnou, ale systematickou. Tu lze odstranit úpravou metody, tj. v našem případě úpravou navážky.

Protože však metoda má sloužit výhradně praxi, volili jsme takovou navážku, která nevyžaduje vysokou přesnost vážení, to znamená na setiny nebo tisíce gramu. Tímto směrem by musela být upravena metoda pro zvýšení přesnosti. Zůstáváme tedy při navážce 2,2 g. Chyba, kterou je metoda zatížena, je pro provozní stanovení mi-

Tabulka 1. Stanovení bílkovin ve sladu metodou K+K v porovnání s metodou Kjeldahlovou prováděnou na přístroji Kjel-Foss

Vzorek číslo	Bílkoviny (%)			Vzorek číslo	Bílkoviny (%)		
	K+F	K+K	rozíl		K+F	K+K	rozíl
1	10,1	9,9	-0,2	21	10,8	11,0	+0,2
2	10,2	9,9	-0,3	22	10,9	10,6	-0,3
3	10,3	10,2	-0,1	23	10,3	10,3	0
4	10,5	10,3	-0,2	24	10,2	10,0	-0,2
5	10,0	9,8	-0,2	25	10,5	10,4	-0,1
6	10,6	10,6	0	26	10,7	10,5	-0,2
7	10,9	10,9	0	27	10,4	10,5	+0,1
8	11,1	10,6	-0,5	28	10,5	10,5	0
9	11,1	11,1	0	29	10,4	10,5	+0,1
10	11,0	11,0	0	30	10,3	10,2	-0,1
11	10,9	10,4	-0,5	31	10,0	9,9	-0,1
12	10,7	10,5	-0,2	32	10,9	11,0	+0,1
13	10,0	10,2	+0,2	33	10,8	10,7	-0,1
14	10,3	10,3	0	34	10,6	10,7	+0,1
15	10,4	10,4	0	35	11,3	11,0	-0,3
16	10,2	10,2	0	36	10,8	10,8	0
17	10,1	10,1	0	37	10,8	11,1	+0,3
18	10,5	10,4	-0,1	38	10,8	10,4	-0,4
19	9,9	9,7	-0,2	39	10,8	10,4	-0,4
20	10,9	10,6	-0,3	40	10,9	11,0	+0,1

nimální, protože neovlivňuje podstatně konečný výsledek.

Pro stanovení reprodukovatelnosti byl zvolen dobře rozluštěný slad s Kolbachovým číslem 38,2. Stanovení bylo provedeno 10krát. Hodnota bílkovin se pohybovala od 10,4 do 10,7 % — průměrná hodnota byla 10,61 %. Směrodatná odchylka 0,105 ukazuje, že metoda pracuje s přesností, která se vyrovná metodě Kjeldahlové.

## Pracovní postup

2,2 g sladové moučky se vnese do suché Kjeldahlové baňky obsahu cca 300 ml. Do baňky se přidá 40 g pevného louhu sodného, obsah baňky se protřepe a těsně před zapojením do systému přístroje K+K se přidá odměrným válečkem 30 ml 35 % NaOH. Zapojí se přívod páry a unikající NH<sub>3</sub> se jímá do předlohy s 2 % kyselinou boritou. Rychlost destilace musí být upravena tak, aby za 20 minut se vydestilovalo 100 až 150 ml destilátu. Ten se titruje přesným roztokem N/17,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na Tashirův indikátor. Tato přesná kyselina se dá koupit jako normanál. Spotřeba v ml odpovídá přímo procentu bílkovin v původním sladu.

Tabulka 2.

Vzorek číslo	Závod	K+K závod	VÚPS Brno	
			K+K	K+F
1	Podnikové laboratoře Prostějov	10,9	11,2	11,2 % bílkovin
2		12,1	12,1	12,3
3		12,0	12,5	12,2
4		12,1	12,4	12,4
5		10,9	10,9	11,0
1	Pivovar Jihlava	14,3	14,2	14,1
2		11,3	11,4	11,5
3		13,0	12,7	12,8
4		12,2	11,7	11,7
5		11,6	11,9	11,8
1	Pivovar Jarošov	12,0	11,9	11,7
2		12,2	11,9	11,8
3		11,8	11,4	11,5
4		12,0	11,4	11,4
5		12,2	12,0	12,0



Pro porovnání metody v praxi požádali jsme několik provozních laboratoří o spolupráci. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky.

Jak výsledky ukázaly, metodu lze plně uplatnit v praxi a shoda mezi dvěma laboratořemi je stejná jako u metody Kjeldahlovy.

#### Stanovení rozpustného dusíku ve sladině

Při tomto stanovení musela být nejdříve vyřešena otázka kombinace: pevný NaOH + roztok NaOH + roztok sladiny. Vyzkoušeli jsme různé dávkování NaOH a na základě výsledků jsme použili pro stanovení jen pevného NaOH. Vyzkoušeli jsme rovněž různé dávkování sladiny od 40 do 60 ml, nejlépe vyhovoval objem 55 ml. Pro matematické zpracování jsme stanovili rozpustný dusík ve 40 různě rozluštěných sladech v rozmezí rozpustného dusíku 60 až 84 mg ve 100 ml sladiny.

Tabulka 3. Stanovení rozpustného dusíku metodou K+K v porovnání s metodou Kjeldahlovou prováděnou na přístroji Kjel-Foss (K+F)

Vzorek číslo	Rozpustný dusík			Vzorek číslo	Rozpustný dusík		
	(mg/100 ml sladiny)		rozdíl		(mg/100 ml sladiny)		rozdíl
	K + F	K + K			K + F	K + K	
1	70	72	+2	21	82	80	-2
2	72	78	+6	22	66	66	0
3	70	73	+3	23	67	71	+4
4	72	74	+2	24	84	87	+3
5	64	66	+2	25	79	78	-1
6	66	68	+2	26	67	65	-2
7	74	74	0	27	78	79	+1
8	70	74	+4	28	63	63	0
9	68	68	0	29	68	66	-2
10	66	65	-1	30	66	69	+3
11	71	76	+5	31	75	75	0
12	69	68	-1	32	62	66	+4
13	72	76	+4	33	72	76	+4
14	66	65	-1	34	74	75	+1
15	66	64	-2	35	68	68	0
16	72	72	0	36	69	69	0
17	72	69	-3	37	62	62	0
18	70	69	-1	38	63	64	+1
19	71	73	+2	39	69	70	+2
20	60	63	+3	40	69	70	+1

Tabulka 3 zahrnuje výsledky v porovnání s metodou Kjel-Foss (K+F). Použití *t*-testu pro závislé výběry rovněž ukazuje průkaznou systematickou chybu. Stejně tak jako u sladu jsme u sladin nepokračovali v dalším dělení pipetování, které by bylo nižší než 5 ml. Několikrát pipetováním by zdroje chyb narůstaly a přesnost stanovení by byla daleko více ovlivněna.

Reprodukovatelnost byla stanovena 10krát z jedné sladiny dobře rozluštěného sladu a obsah rozpustného dusíku se pohyboval od 68 do 70 mg/100 ml. Směrodatná odchylka 0,660 ukazuje, že reprodukovatelnost je přesnější než u klasické metody Kjeldahlovy a asi tak přesná jako u přístroje Kjel-Foss.

#### Pracovní postup

55 ml čerstvé sladiny se odpipetuje do Kjeldahlovy baňky obsahu asi 300 ml, ve které je naváženo 40 g pevného NaOH. Baňka se rychle zapojí do systému K+K a zapojí se přívod páry. Destilace probíhá stejně jako u stanovení ve sladu. Předdestilovaný roztok se titruje N/17,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na Tashirův indikátor. Spotřeba v ml vynásobená 10 odpovídá mg dusíku ve 100 ml sladiny.

Je nutno upozornit, že sladina musí být zpracována do 5 hodin po sermutování, delším stáním se mění složení dusíkatých látek a stanoví se nižší hodnoty rozpustného dusíku zhruba o 4 až 5 mg rozp. dusíku na 100 ml.

Metoda je přesná, rychlá a reprodukovatelná a lze ji použít v kterékoliv provozní laboratoři.

#### Závěr

Metoda Kunitake-Kobayshiho pro stanovení bílkovin ve sladu a rozpustného dusíku ve sladině vyhovuje všem požadavkům na provozní metody. Pracuje s přesností stejnou jako metoda Kjeldahlova. Rozdíly proti uzanční metodě mají sice charakter systematické chyby, ale pro jednoduchost stanovení bylo od dalších úprav upuštěno. Odchylky od Kjeldahlovy metody jsou v rozmezí analytické chyby nebo ji jen mírně překračují. Získané výsledky jsou dostatečně přesné pro hodnocení výrobních sladů na základě proteolytického rozštěpení.

Přesunutí kontroly závažných kritérií jakosti přímo na závodní laboratoře má nejen význam v tom, že sladař si může ne-li denně, pak alespoň v důležitém období (změna počasí, změna suroviny apod.) kontrolovat zvolený technologický postup, ale může i kontrolovat uložený slad v sílech, popřípadě ukládat slad podle jakosti a vzorkovat ty partie, které chce uložit pro náročné odběratele. Stanovení těchto kritérií podnikovou laboratoří nebo výzkumným ústavem je již jen dokladem o expedovaném sladu.

Je samozřejmé, že předložená metodika neodpovídá klasické metodě, ale její reprodukovatelnost a vztah k metodě uzanční je v rámci povolené chyby. Předpokládáme, že metody svou jednoduchostí mají především sloužit závodním laboratořím pro informaci o jakosti vyrobeného sladu. Jejich používáním se vyloučí případy expedice zboží s jakostí nevyhovující nejen požadavkům zákazníka, nýbrž mnohdy i běžnému standardu.

Doležalová, A. - Nentwichová, M.: Stanovení bílkovin ve sladu a sladině metodou Kunitake-Kobayshiho. Kvas. prům. 23, 1977, č. 7, s. 150—152.

V návaznosti na dřívější práce týkající se stanovení bílkovin v ječmenu, byla vyzkoušena metodika Kunitake-Kobayshiho také na vzorcích sladu a sladiny. Byly provedeny úpravy navážky vzorku (2,2 g sladu) a množství pipetované sladiny (55 ml), jinak byl princip metody zachován. Chyby stanovení se pohybují v mezích analytických chyb Kjeldahlovy metody, reprodukovatelnost se vyrovná téměř stanovení na přístroji Kjel-Foss. Metodika Kunitake-Kobayshiho na stanovení bílkovin ve sladu a rozpustného dusíku sladiny je rychlá, jednoduchá, přesná a dobře reprodukovatelná a lze ji použít ve všech provozních laboratořích sladoven i pivovarů.

Долёжалова, А. — Нентвихова, М.: Применение метода Кунитак-Кобайши для определения белков в солоде и сусле. Квас. прум. 23, 1977, № 7, стр. 150—152.

В своих прежних исследовательских работах, результаты которых были в журнале К. п. уже отпечатаны, авторы занимались проблемой определения содержания белков в ячмене. В настоящей статье рассматривается возможность применения метода Кунитак-Кобайши для определения содержания белков в солоде и сусле. Величина проб была несколько изменена, т. е. проба солода весила 2,2 г, а для анализа сусла отбирали пипеткой 55 мл, но основной принцип метода строго соблюдался. Погрешности не выходят за пределы обычные при применении метода Келдала, а воспроизводимость равняется воспроизводимости обеспечиваемой приборами Келл-фосса. Метод Кунитак-Кобайши можно рекомендовать всем лабораториям на пивоваренных заводах и солодовнях, так как он дает возможность точного определения содержания белков в солоде и растворенного азота в сусле с минимальной затратой времени. Несмотря на свою простоту метод обеспечивает надлежащую воспроизводимость.

Doležalová, A. - Nentwichová, M.: Application of the Kunitake-Kobayshi Method for the Determination of



**Proteins in Malt and Wort.** Kvas. prům. **23**, 1977, No. 7, 150—152.

The authoresses have already published in Kvasný průmysl the results of their research works into the determination of proteins in barley. The present article deals with the application of the Kunitake-Kobayshi method for the determination of proteins also in malt and wort. The principle of the method was strictly adhered to, though the size of samples was adjusted (2,2 g of malt, 55 ml of wort taken with a pipette). Errors in the obtained data do not exceed those typical for the Kjeldahl method and the reproducibility is practically the same as with the Kjel-Fosse instruments. The Kunitake-Kobayshi method can be used to advantage for the determination of proteins in malt and of dissolved nitrogen in wort, since it is simple, saves much time, gives accurate results and is reproducible. It can be therefore recommended to all laboratories in brewing and malting industries.

**Doležalová, A. - Nentwichová, M.: Bestimmung der Eiweißstoffe in Malz und Süßwürze mittels der Methode Kunitake - Kobayshi.** Kvas. prům. **23**, 1977, No. 7, S. 150—152.

Anknüpfend an frühere Arbeiten, die sich mit der Bestimmung der Eiweißstoffe in der Gerste befaßten, wurde die Methode Kunitake-Kobayshi auch auf Malz- und Süßwürzeproben appliziert. Es wurde die Einwaage der Probe (2,2 g Malz) und die Menge der pipettierten Würze (55 ml) modifiziert, im übrigen wurde das Prinzip der Methode eingehalten. Die Fehler der Bestimmung bewegen sich innerhalb der Grenzen der analytischen Fehler der Kjeldahl-Methode, in der Reproduzierbarkeit nähert sich die geprüfte Methode der Bestimmung auf dem Kjel-Fosse-Apparat. Die Methodik nach Kunitake-Kobayshi zur Bestimmung der Eiweißstoffe in Malz und des löslichen Stickstoffs in ungehopfter Würze ist schnell, einfach, genau und gut reproduzierbar und kann in allen Betriebslaboratorien der Mälzereien und Brauereien angewandt werden.