

Poznatky získané pri sledovaní fenolov v zadymenom slade pre zahraničných odberateľov

863.439.1
547.56

Ing. MARGITA ONDŘÍŠKOVÁ, Ing. VIERA SEĎOVÁ, Pivovary a sladovne GRT, Bratislava, Výskumné pracovisko pre pivo a nealkoholické nápoje

Predneseno na XX. pivovarsko-sladařském seminári v Plzni 13. a 14. listopadu 1980

Zavedením výroby zadymovaného sladu na whisky v našej VJH pre zahraničných odberateľov vznikol problém vyhovujúcej analytickej kontroly tohoto výrobku.

Meradlom kvality zadymovaného sladu rašelinovým dymom je obsah fenolov. Fenoly sú aromatické hydroxylzlučeniny, u ktorých na benzénové jadro je naviazaná jedna alebo viac hydroxylových skupín. Často sa nachádzajú ako zložky koncentrátov arómy tepelne spracovaných potravín. Boli dokázané vo whisky, rume, víne, pive a údenárskych výrobkoch. Termickou dekarboxyláciou fenolkarbonových kyselín vzniká celý rad fenolických zlúčenín, ktoré patria v spektre arómy uvedených potravín. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce zlúčeniny patria orto-, meta-, para-krezoly, 4-vinylfenol, 4-hydroxybenzaldehyd, izoeugenol, 4-metylguajakol, 4-ethylguajakol, guajakol a 4-etylfenol.

Na požiadanie Koospolu odberateľ sladu poskytli analytické metódy na stanovenie fenolov, a to jednak metódu na stanovenie celkových fenolov v slade kolorimetrickou metódou podľa McFarlena modifikovanú odberateľom a taktiež plynovochromatografickú (PCH) metódu. Nakoľko kolorimetrická metóda podľa McFarlena je rýchlejšia a po odporúčaní odberajúcou firmou sa predpokladala i dostatočná presnosť, po zavedení výroby zadymovaného sladu sa obsah fenolov zisťoval touto metódou. Pretože vznikli rozpory medzi vstupnou hraničnou kontrolou a našimi výsledkami, bolo na našom pracovisku odskúšané stanovenie fenolov v zadymovanom slade PCH metódou. Odkúšanie metódy bolo značne sťažené tým, že sa pôvodne nepočítalo s PCH stanovením fenolov, a preto hlavným problémom bolo obstaranie potrebných chemikálií kvalitou vyhovujúcich pre PCH.

Kópia zaslaného návodu pre prípravu a PCH analýzu vzoriek zadymovaného sladu bola neúplná, manipulačným nedopatrením nebola priložená metóda vyhodnocovania, a preto bolo nutné experimentálne vyskúšať najvhodnejší spôsob vyhodnocovania, taktiež bolo nutné urobiť určité úpravy pri príprave vzorky. Podľa zaslanej schémy sa fenoly zo zadymovaného sladu získavali destiláciou s vodnou parou a po úprave pH destilátu sa extrahovali diethyléterom a zahusťovali na nastrekové množstvo pre PCH analýzu. V prvej fáze prípravy vzorky bolo odporúčané východzie množstvo 500 g zadymovaného sladu pre destiláciu, ktoré sa ukázalo vysoké, vzhľadom k nedostatočnému prestúpeniu sladu vodnou parou pri destilácii. Preto bolo nutné pri zachovaní uvedeného množstva vhodne upraviť prestup pary, ktorý sme dosiahli navrhnutím destilačnej nádoby z kovu. Vo výške 1/3 nádoby je perforovaná prepážka, ktorá zaručí rovnomerný prestup vodnej pary privedenej spodným kohútikom do nádoby. Obohatená vodná para o fenolické zlúčeniny sa vrchom odvádza do chladiča, kde kondenzuje a zachytáva sa do predlohy. Destilačná nádoba bola vyrobená po dodaní nákresu v mechanizačnej dielni Slovenských sladovní, n. p., Trnava.

V záverečnej fáze prípravy vzorky nebol uvedený spôsob zahusťovania. Bola odskúšaná vákuová destilácia, ako i destilácia za normálneho tlaku, vzhľadom k značnej prchavosti fenolických zlúčenín môže byť táto časť prípravy najväčším zdrojom chýb.

Po vyriešení problémov pri príprave vzorky pre PCH analýzu sme sa ďalej zamerali na hľadanie vhodných podmienok chromatografovania s dostupnými chemikáliami ako aj na hľadanie najvhodnejšej metódy vyhodnocovania. Prvé stanovenie fenolov na náplni so zakotvenou fázou 10% Carbowax 20 M na nosiči Chromatone N-AW-HMDS boli uskutočnené izotermálne, pričom bola odskúšaná teplota kolony 170–200 °C. Najvhodnejšia teplota pre delenie fenolov a ich izomerov sa ukázala 170 °C. Vzorky pripravené zo zadymovaného sladu stanovené izotermálnou PCH boli pripravené bez vnútorného štandardu zahustením do acetónu. Pomerne dobrá reprodukovateľnosť zistená u takto vyšetřovaných vzoriek ukázala na vhodnosť použitia menej prchavého rozpúšťadla ako je dietyléter. Vyhodnotenie týchto vzoriek bolo urobené podľa kalibračnej krivky predstavujúcej závislosť plochy píku od množstva látky. Táto metóda zlyhala pri malom obsahu zložiek vo vzorke. Obsah fenolov bol vyhodnotený ako suma fenolických látok, a to fenol + krezoly vyjadrených v mg/kg zadymovaného sladu.

Metódu vnútornej kalibrácie (štandardný prídavok) boli stanovené ďalšie 4 vzorky. Pri tejto metóde sa ku vzorke prídávalo definované množstvo tej istej látky ako je stanovovaná. Z veľkosti odozvy stanovenej látky pred a po prídavku sa vypočítalo pôvodné množstvo. Ako východzia hodnota — výška píku bez prídavku bola braná priemerná hodnota z 3 paralelných vzoriek. Metóda vnútornej kalibrácie je značne pracná, k získaniu jedného výsledku je potrebné pripraviť samostatnú vzorku a vzorku so známym prídavkom hľadanej látky. Tým sa zväčšuje potreba chemikálií i čas potrebný na prípravu na dvojnásobok. Preto sme v ďalšej časti našej práce pristúpili k hľadaniu vhodného vnútorného štandardu.

Ako vnútorný štandard v prvom prípade bol použitý naftalén. Jeho malá rozpustnosť vo vode pri príprave vzorky a minimálna odozva detektora pri vyhodnocovaní sťažovali prácu. Preto bolo nutné hľadať ďalšiu vhodnú látku pre použitie na vnútornú štandardizáciu. Po dlhšom časovom odstupe sa nám podarilo zabezpečiť xylenol, ktorý svojou štruktúrou a fyzikálnymi vlastnosťami je podobnejší fenolu, jeho elučná krivka sa neprekrýva so žiadnou elučnou krivkou stanoveného sladu. Hodnoty fenolov za použitia vnútorného štandardu xylenolu boli vypočítané podľa tohto vzorca:

$$m / \text{kg fenolu} = \frac{A_i \cdot f_i \cdot w_s \cdot 1000}{E \cdot A_s}$$

kde A_i je plocha alebo iné vyjadrenie veľkosti elučnej krivky zložky i ,

f_i — korekčný faktor zložky i ,

w_s — množstvo pridaného vnútorného štandardu v mg,

E — celkové množstvo sladu vzatého k analýze v g,

A_s — plocha alebo iné vyjadrenie veľkosti elučnej krivky vnútorného štandardu;

zvýšení pH při izomeraci mělo za následek zhoršení chuti piva drsnou hořkostí, přibarvování mladiny a jiné závady.

Katalytickou přeměnou humulonů na izohumulon se zabýval v r. 1948 také *Salac* [65]. Seznal, že při izomeraci je prakticky použitelné pH sladin 6,95 až 7,00. Podle tehdejšího patentu upravoval pH vody, ve které se prováděla izomerace, vodním roztokem sody. Postupovalo se tak, že do prázdného varní nebo rmutovací pánve (u jednoduché varny), po vyčerpání posledního rmutu do scezovací kádě, napustila se vařící voda, odpovídající asi 1/8 objemu mladiny čerpané na stoky. Objem vody se volí podle výšky výhřevné plochy. Do vroucí vody se nasypaly 2/3 — 3/4 chmele hmotností odpovídajícího 15 až 20 % úspory na normální dávku na várku podle jakosti a uchovalosti. Potřebné pH se upravuje zředěným roztokem sody.

Var vody s chmelem trval 15 min. Poté byla vroucí voda s chmelem přečerpána ke zbylému rmutu obsahujícímu původní chmelové mláto. Jak již bylo naznačeno, vtip zvýšeného pH spočíval v tom, že objem vodního izomerovaného roztoku, které se pohybovalo kolem 7,00, se vrácením k původnímu pH mladiny, díky dostatečnému množství ústojných látek, snížilo na normální pH. Podle této metody pracoval převážný počet čs. pivovarů, čímž se uspořilo nejméně 15 % chmele. Tento původní, dosti primitivní způsob, byl zdokonalen a znovu přezkoušen kolektivem *Salac*, *Vančury* a *Bednáře* [66]. K pokusům bylo použito indexu hořkosti a výsledkem byl ještě příznivější než dříve. Ve snaze o lepší využití chmele, opakovali autoři ještě i jiné způsoby izomerace. Přicházeli tu v úvahu i účinek ultrazvuku a tlaku. Pokud jde o působení ultrazvuku, nejlépe se osvědčilo oddělení chmelového výluhu při teplotě 50–60 °C s udržováním po dobu 15 minut. Vodní výluh se oddělil od chmele a přidat se k mladině. Zbylý chmel se ještě vařil 20 až 25 minut. Z výsledných pokusů se projevil za použití ultrazvuku úspora 10 % chmele.

Izomerace chmelového výluhu zahříváním pod tlakem byla provedena při různých tlacích při stejné teplotě. Právě tak jako u dřívějších způsobů izomerace bylo použito pouze 4/5 původního chmele, kdežto zbývající 1/5 byla přidávána 30 minut před koncem chmelovaru. Nejlépe se osvědčilo vyluhovávat chmel 30 minut a výluh zahřívát v autoklávu při 0,54 MPa (5,5 at). Úspory dosahovaly asi 15–20 % chmele.

Snahy o využití hořkých chmelových látek z odpadních pivovarských surovin

Po uvedení různých chemických katalytických způsobů přeměny především komplexu α -hořké kyseliny na izosloučeniny i fyzikálních možností jejich přechodu do rozpustné formy budily pozornost také pro lepší využití zbylých surovin, které při chmelovaru a také po něm odcházejí z pivovaru celkem nevyužitý. Přicházelo tu především v úvahu chmelové mláto zbavené mladiny a obohacené kily koagulovaných bílkovin a potom hořké kaly a kvasničné deky.

Především chmelové mláto je surovinou, kterou nelze podceňovat, neboť obsahuje podle *Heinze* [67] v 1 kg mláta 51 mladiny. Je to již hodně starý, kdysi patentovaný způsob *Hessbergův* na využití chmelového mláta. Podle *Hessberga* se mláto po scezení mladiny přečerpává do vyslazeného sládového mláta a po rozmíchání se společně vyhazuje z varny ke zkrmování. *Salac*

Tab. 2.

Číslo vzorku	Odečtené polarimetrické stupně	% α -hořké kyseliny v měkkých pryskyřicích (polarimetrická metoda)	% β -hořké kyseliny podle srážecí metody
1	0,26	3,73	4,22
2	0,33	4,73	5,12
3	0,26	3,73	4,22
4	0,26	3,73	4,24
5	0,23	3,30	3,04
6	0,28	4,02	4,08
7	0,28	4,02	4,00
8	0,27	3,87	4,01
9	0,25	3,59	3,65
10	0,25	3,59	4,05
11	0,30	4,30	4,30
12	0,23	3,30	3,10
13	0,33	4,73	5,22
14	0,32	4,59	4,99
15	0,25	3,59	3,91
16	0,32	4,59	4,96

pohybuje jódové číslo počítané na 100 g chmele v rozhraní 18–20 a u starých chmelů klesá až i pod 5.

Nakonec možno se také ještě zmínit o dalších existujících metodách na stanovení hořkých chmelových látek na podkladě bakteriostatických nebo kolonimetrických vlastností, které jako předchozí jsou zatíženy stejnými chybami [10].

Pokud jde o úsek tvrdých pryskyřic, existuje i metoda na jejich určení, vypracovaná *Jaksonem* a *Walkerem* [40] nebo *Silbereisenem et al.* [41] a také *Vančurou* [42].

Stanovení analogů hořkých chmelových látek a jejich šlešných produktů ve chmelu

Jak bylo již řečeno, v nové době se ukázalo, že jak humulon, tak i lupulon mají nejméně po třech příbuzných sloučeninách. Tím se analytika rozšířila na rozdělování původních α - a β -kyselin ještě na jejich analogy. K tomu účelu se především hodí *Craigova* metoda upravená *Rigbym* a *Bethunem* [43]. Kromě této techniky jsou používány ještě i jiné různé způsoby určování na podkladě spektrofotometrické i hmotové spektrofotometrie a další.

Myšlenkou jak stanovit analogy α - a β -hořké kyseliny za použití *Wölmerovy* metody se zabývala také *Kotrlá-Hapalová* [44]. Další metoda na stanovení analogů hořkých látek vypracoval *Roberts* [45] za použití plynové chromatografie. Úpravou podobné myšlenky se zabýval také *Hautke* [46]. *Kascó a Muranyi* [47] provedli plynové chromatogramy, *Kokuba, Kowaka a Kuroiwa* [48] vypracovali novou metodu, která dovoluje použitím jaderné rezonanční spektroskopie zjis-

tit relativní složení α -hořké kyseliny podle humulonů, kolhumulonů a adhumulonů, a to rychle a jistě. Pro kvantitativní vyhodnocení NMR-spekter byly vzaty za základ výsledky z plynové chromatografie.

Kromě popsanych analytických metod na stanovení analogů existují také metody spektrofotometrické. Spočívají však jen na měření optické hustoty roztoku α - a β -kyselin v ultrafialovém světle. Jednou z takových metod je metoda *Aldertonova, Bailejova, Lewisova a Stilleova* [49].

Další metody jsou metody rozdělovací chromatografie s obrácenými fázemi. Pro určování hořkých chmelových látek ve chmelu vypracovali novou metodu *Schur a Pfenninger* [50]. Jak patrně z metody *Verzele* [51] lze pro frakcionaci chmelových pryskyřic použít buď chromatografie na tenké vrstvě nebo papírové chromatografie. Tato metoda se značně rozšířila. Měla však své nevýhody v přípravě papírových proužků, které však byly potom autory nahrazeny plastickými fóliemi.

Z dalších metod počali určovat *Krueger, Rehberger a Bayne* [52] izohumulon A, humulon a lupulon a kyselinu humulinovou na křemičitém gelu-G-desek za použití bis-trimeylsilyléterových derivátů získaných působením tetrahydrofuranu.

V posledních letech se osvědčila upravená metoda na stanovení univerzální hořkosti chmele a chmelových preparátů podle *Pfenningera a Schura* [82].

Princip je tento:

Vzorek chmele nebo chmelového preparátu se vaří 60 min v ústojném roztoku o pH 5,55. Z vodního roztoku se extrahuji chloroformem hořké látky, které se stanoví spektrofotometricky.

Výpočet:

$$\text{UH v mg/g} = \frac{115 \cdot E \cdot 279}{a}$$

kde je: E — extinkce při 279 nm,

a — návážka chmele nebo chmelového preparátu.

Kvantitativní určování chmelové silice

Určování chmelové silice a hlavně jejích význačných podílů je dosti obtížné a celkem málo informativní. Dosud se tak děje destilací chmelové drtě ve vroucí vodě. Z chmelů z různých pěstelských oblastí se získávají různá množství chmelové silice, avšak fyzikální a chemické vlastnosti jejích podílů poskytnou dosud jen chabé informace o jejích aromatických jakostech.

Příkladem takového postupu je metoda *Lambertova* [53].

Saláčova metoda

Pokroku bylo dosaženo vypracováním metody *Saláčovy* [54]. Tou lze určit několik informativních dat pro posuzování silice. Pro metodu byl autorem předeem sestaven speciální destilační nástavec, jímž je možno získat procentní obsah silice a jejích různé destilátové podíly. Byla také autorem vypracována metoda na určování alylnatých sloučenin ve chmelu, jako u elisaských chmelů, které svým nepříznivým pachem charakterizují některé hrubé chmely.

Při průzkumu chmelové třísloviny možno ještě poukázat i na vyšší biologickou trvanlivost pív, k jejichž výrobě bylo použito hořkých látek a chmelové třísloviny na rozdíl od pív vyrobených pouze za přidavku hořkých látek.

Při sledování účasti chmelové třísloviny při výrobě piva bylo pozorováno, že mají vliv na chuť piva nejen hořké látky a chmelová tříslovina, ale i samotná chmelová drť zbařená obou jmenovaných látek. *Saláč, Koričá a Vančura* [63] prokázali na řadě pokusů, že při chmelovaru, při němž byl přidáván dvojnásobek dkladně vyvařeného chmelové drtě, projevil se nakonec ve vyrobeném pivu nižší biologickou trvanlivostí, slabším udržováním hořkých látek v roztoku a hlavně méně uspokojivou chutí. Získané výsledky tedy upozornily na nepříznivý vliv dlouhodobého vaření sládky s chmelem.

Zkoumáním vhodného dávkování chmele při chmelovaru zabývala se řada autorů. Možno především poukázat na obsáhlou práci *Kolbachovu* [30], který vyzkoušel při chmelovaru různé dávky chmele od jedné až do pěti. Nejlépe se mu osvědčily tři dávky, a to prvá hned do předku, druhá při začátku nebo krátce po začátku varu a třetí asi 45 až 15 min před koncem chmelovaru. Druhá dávka, kterou *Kolbach* dával většinou jako největší, měla za úkol proplážit pívu dostatečnou hořkost.

Výsledky *Kolbachových* pokusů byly *Saláčem, Koričou a Vančurou* [63] převěřeny podle indexu hořkosti. Ukázalo se, že číslo pohybující se kolem 1 je pro budoucí jakostní pivo nejvhodnější právě tak jak to zjistil *Kolbach*. Je to dávkování, při němž čtvrtina se dává na začátku varu, polovina po 40 minutách a poslední dávka — čtvrtina 40 minut před koncem varu.

Pokusy o stabilizování hořkosti piva

Během let se zjistilo, že *Wöllmer* ve svém vzorci $\alpha + \frac{2}{9}$ neoprávněně podceňoval vydatnost hořkosti β -hořké kyseliny a mnozí autoři, jako *Šatava, Saláč a Dyr, Saláč, Koričá a Vančura a Mikschik*, řadou opakovaných pokusů zjistili vyšší hořkost β -hořké kyseliny, a proto opravili *Wöllmerův* vzorec na

$$\alpha + \frac{\beta}{3}.$$

Úsilí o lepší převedení hořkých a tříslovinných chmelových látek do mladiny a piva

Pivovarský průmysl je si dobře vědom nevhodného využití α - a β -hořkých kyselin, a proto se stále hledají cesty, jak toto využití poněkud zvýšit. *Windisch, Kolbach a Schleicher* uvádějí, že α -hořká kyselina se během chmelovaru mění na pryskyřici A, kterou *Verzele a Govaert* nazvali izohumulon. Tato izomerace, jak bylo již řečeno, postupuje se stoupajícím pH, přičemž α -hořká kyselina se mění ještě na řadu dalších sloučenin. Izomerace nastává již při normálním pH mladiny, avšak se stoupající hodnotou se zvyšuje.

Nevyšší izomerace probíhá v rozmezí pH nad 7 až snad na 8—10.

Windisch, Kolbach, Schleicher a Dietrich [64] získali na tento katalytický způsob přeměny humulonů na izohumulon v alkalickém prostředí patent. Rovněž *Verzele a Govaert* měli podobný způsob patentován. Ovšem značné

Vody s převažující tvrdostí trvalou nad přechodnou poskytly následkem nižšího pH piva s nižším obsahem hořkých chmelových látek, avšak ve formě adsorpční a tím i lahodnější chuti.

V předchozích kapitolách bylo pojednáno o vztahu chmelové a z části sladové třísloviny k hořkým látkám a k jiným sladovým a chmelovým koloidům. O objasnění těchto vztahů pokusila se práce *Salače, Kotrlé a Vančury* [62]. Uvedené vztahy sledovali jak po stránce technologické, tak i analytické. Byly provedeny celkem 4 skupiny pokusných várek, z nichž namátkou možno poznamenat na třetí skupinu, která byla nejdůležitější. V pokusných várkách byly vyzkoušeny α - a β -hořké kyseliny, každá po 7 % a zároveň 2 a 5 % chmelové třísloviny. Pokusy ukázaly, že vyšší procento chmelové třísloviny zvyšovalo obsah hořkých látek v roztoku. Samotná α -hořká kyselina převedla do roztoku při zvýšení obsahu chmelové třísloviny ze 2 na 5 % asi o 14 % hořkých látek více a samotná β -hořká kyselina také relativně asi o 14 % více.

Jsou-li obě hořké kyseliny pohromadě, zvýší se hořkost asi o 10 %. Vzhledem k tomu, že β -hořká kyselina popřípadě její produkty vzniklé varem nedosahuje rozpustnosti α -hořké kyseliny, dalo by se předpokládat, že má pouze menší pivovarský význam, avšak její postupná oxidace ukazuje, že v tom případě se zvyšuje hořkost. Procentině lze hodnotit rozpustnost β -hořké kyseliny v poměru k α -hořké kyselině za přítomnosti 2 % chmelové třísloviny v pivo

jako $\frac{\alpha}{4,56}$ a za přítomnosti 5 % třísloviny jako $\frac{\alpha}{2,32}$ a v průměru tedy

$$\frac{\alpha}{2,5}$$

Vzhledem k tomu, že v odborné literatuře se uvádí hořkost β -kyseliny ve srovnání s hořkostí kyseliny α - velmi kolísavě, od $\frac{\alpha}{1}$ až do $\frac{\alpha}{9}$, jsou uvedené výsledky zajímavé, a to ještě se neuvažují kyseliny α i β různé pozměněné.

Z dalších pokusných sérií várek č. 2 vyplynul ještě výraznější význam chmelové třísloviny, a to od 2,5 až do 7,5 %. Je zajímavé, v množství 4–5 % třísloviny projevuje se nejpříznivěji jak ve výrobě samotné, tak i v chuti piva. Nižší dávky třísloviny postrádaly výraznost chuti, kdežto vyšší ji činily příliš drsnou a tak se nejlépe osvědčil obsah kol 5 % chmelové třísloviny, jímž se vyznačují právě chmely žatecké.

Z dalších pokusů série č. 1 se ukázalo, že hořké chmelové látky vylučují vysokomolekulární bílkovinnou frakci A podle Lundina i středně molekulární frakci B. Naproti tomu samotná chmelová tříslovina vylučuje do značné míry vysokomolekulární frakci A, kdežto na středně molekulární frakci B působí málo. Jsou-li však obě chmelové složky, hořké chmelové látky a tříslovina pohromadě, tvoří zřejmě vzájemně hořko-tříslo-bílkovinný komplex, takže do značné míry udržují obě koloidní frakce v pivo pohromadě.

Na rozdíl od chmelové třísloviny se sladová tříslovina téměř neuplatňuje ve sladlině a mladině ani za spoluúčasti hořkých chmelových látek.

Jedná-li se však o stabilizovaná piva, v nichž se zámyslně snižuje obsah koloidních látek, především bílkovin, podobně jak bylo již naznačeno v jedné z předcházejících prací *Salače, Kotrlé a Vančury* [62], ubývá tím hořkých látek vázaných adsorpcí.

V pozdější době vypracoval Salač spolu s *Kotrlou-Hapalovou* [55] zajímavou metodu na stanovení těkavosti [oxidačního čísla] chmelle za použití probublávání chmelové drti CO_2 do destilované vody a stanovením těkavých podílu oxidací 0,01 N manganistanem draselným. Byla také zkoušena viskozita vody nasycené siličnými podíly v Höpplerově viskozimetru za použití zlaté kuličky. Z těchto výsledků nebylo však možno odvodit žádné podstatné závěry.

Zcela neuspokojivé výsledky poskytla metoda *Rigbyho* a *Bethune* [56] stanovení chmelové sílice za použití heptanu a metanolu v rozličných zředěních při protiproudém roztrpčování a papírovou chromatografii.

V novější době je chmelová sílice ze chmelle vytěšována jednak vodní párou a zachycována v pentanu a jednak podle *Narziše, Reichenedera* a *Forsze* [57] zkoušena na lehce těkavé složky metodou head-space.

Zajímavý způsob určování vůně chmelle metodou plynové chromatografie je mikrometoda podle *Hautkeho* a *Petríčka* [58].

Kvantitativní určování chmelové třísloviny

Metod na určování chmelových polyfenolů, triviálně řečeno chmelové třísloviny, je při chemickém rozboru neprávem opomíjeno. Metod na stanovení chmelové třísloviny byl vypracován značný počet, a to vázkových, titračních, polarimetrických, kolorimetrických, nefelometrických a v poslední době i spektrofotometrických. U většiny metod se přepočítává chmelová tříslovina na tanin, jakožto tříslovinu nejlépe známou a také připravenou v čistém stavu.

Jednou z nejosvědčenějších metod je stanovení [30a] podle *Jerumanise*, při níž se celkové fenoly určují spektrofotometricky.

Otázka vypěstování jakostních odrůd chmelle a současně vyšetření nevhodnější doby česání

Po kritickém zhodnocení pivovarsky nejdůležitějších chmelových látek a způsobech, jakými je lze stanovovat, přistoupilo se k chemickému posuzování chmelle při technologickém zpracovávání, při dávkování a úsporném dávkování vůbec. Nejdříve bylo třeba zjistit pro chmelovar nevhodnější odrůdu chmelle. Z řady výzkumných prací tuzemských i zahraničních lze z posledních let ocenit výzkumnou práci *Kotrlé-Hapalové* [44]. Autorka využila vlastních analytických metod, jimiž možno sledovat nejen celkový obsah hořkých látek ve chmelu, ale i jednotlivých analogů, dále i sílice a třísloviny. To potom umožňuje podrobnější pohled do změn v jednotlivých pryskyřičných frakcích a ostatních specifických látkách vzhledem k té které jakostní odrůdě chmelle. Tento způsob umožňuje také posoudit zralost chmelle.

Chemie chmelovaru

Pivovarsky nejdůležitějším podílem ve chmelu jsou určité hořké látky. O chemických změnách těchto sloučenin bylo podrobně pojednáno již dříve. Bylo přitom poukázáno na řadu složitých vědeckých výzkumů, které se těmito změnami zabývaly. Při chmelení se ztrácí minimálně 50 % hořkých látek. Tyto ztráty nastávají neúplným vyloučením hořkých látek z chmelle a jednak koagulací bílkovin, přičemž se hořké látky současně vylučují. Při nízkém pH kle-

sá obsah hořkých látek podstatně více než při vyšším, takže v pívě je jich obsaženo pouze kolem 20–25 %. Povrchová aktivita a koloidní disperzia konglomerátů hořkých a bílkovinných látek má značný vliv na pěnivost a chuť piva. Intenzita hořkosti uplatňující se v mladině a v pívě je závislá také na stupni izomerace a oxidace. Oxidaci je možno jediné uvažovat přímo ve chmele a snad během chlazení mladiny na stokách, kdežto během chmelovaru nepřichází styk mladiny se vzduchem prakticky v úvahu.

Nejlépe jsou ovšem prozkoumány izomerační změny analogů α -hořké kyseliny, avšak uvěží-li se práce *Reganová*, ukazuje se, že i v tomto směru je mnoho neznámého. Zdá se, že na začátku chmelovaru nenastává přímo izomerace komplexu α -hořké kyseliny, nýbrž stav mezi ní a původními látkami. Izomerace analogů α -hořké kyseliny není tedy jednoduchým pochodem a lze ji dosáhnout nesterpě za různých podmínek. Přitom tedy vznikají různé sloučeniny rozličných chutových i jiných vlastností.

V dřívějších citacích bylo zaznamenáno, že řada chmelových pryskyřic nechutná hořce nebo jen nepatrně, avšak působí v pívě přiznivě na pěnivost a také, což je velmi důležité, uděluje mu nikoliv hořkou chuť, nýbrž teprve ve spojitosti s ostatními chmelovými látkami tvoří hladký podklad chuti na rozdíl od látek silně až drsně hořkých.

Izohumulony jsou slabě kyselinny, které podle *Mellgarda* a *Trolleho* [59] jsou ve vodných roztocích jen z části disociovány, aby uvolňovaly proton a negativně nabitý ve vodě vysocce rozpustný anion a z části přítomné jako více nebo méně rozpustné nedisociované kyselinny v molekulární formě. *P_K* hodnoty izohumulonů se pohybují kol 5,2; to znamená, že v mladině je 50 % disociovaných a 50 % nedisociovaných molekul; kdežto v pívě při pH 4,2 je přibližně 10 % disociovaných a 90 % nedisociovaných molekul.

Při sledování jakosti hořkosti piva se vrátili *Saláč*, *Kotrlá* a *Vančura* [55] k dříve uvedené metodě na třídění hořkých látek v mladině a v pívě, k tzv. indexu hořkosti.

Ve snaze ověřit oprávněnost vztahu hořkých látek k obsahu různě rozštěpených bílkovin v mladině a v pívě vyjádřenému tzv. indexem hořkosti, provedli *Saláč*, *Kotrlá* a *Vančura* [60] další pokusy. Bílkovinný obsah jedné a téže sladiny byl záměrně štěpen různými proteolytickými preparáty. Z proteolytických preparátů byl vyzkoušen pepsin, Crystallasa B, Polydasa a papain, avšak nejlépe se pro daný účel osvědčil Collupulin. Jako příklad pokusu uvádějí se výsledky (tab. 3):

Ukázalo se, že s úbytkem Lundinovy frakce A, především ve prospěch frakce C, se změnil také vztah hořkých chmelových látek. Se stoupajícími dávkami Collupulinu ubývá ve sladinách vysokomolekulární frakce A a tak se také udržuje při chmelovaru v roztoku více hořkých látek na frakci B a C, která je v roztoku stálejší. Tento postup štěpení bílkovin, i když zcela neodpovídá štěpení ve varné, se však nemůže vést do krajnosti, neboť jak patrně z várky č. 4 a zvláště č. 5 by byl nedostatek hořkých látek v adsorbované formě, což se potvrzuje zvláště u piv z várky č. 4 a 5. Pivo č. 2 vyrobené z mladiny, k níž bylo použito sladiny s neštěpenými bílkoviny, se dostalo chutově na druhé místo a je ořázkou, nemělo-li by být hodnoceno jako třetí. Chuť tohoto piva, zvláště pak hořkost, byla poněkud plochá, čemuž odpovídá příliš nízký index

Tab. 3.

Várka č.	Stupňovitost	pH	Tříslovinny v mg/100 g	Hořké látky		Index hořkosti	Cukey, (maltóza) mg/100 g	Dextriny mg/100 g	Formolové číslo mg/100 g
				celková	ve filtrátu po Mo.				
1	10,76	4,70	—	—	—	—	712,5	2 044,4	118,7
2	10,89	4,75	8,97	4,54	2,05	0,82	772,9	2 063,8	115,4
3	10,95	4,77	8,89	4,78	3,69	3,38	797,5	2 204,7	112,5
4	10,88	4,68	10,45	5,43	4,91	9,40	1 034,2	1 953,8	119,8
5	10,81	4,60	10,46	6,49	6,01	12,50	948,0	1 914,7	116,8

Várka č.	Celkový dusík v mg/100 g	Frakce A		Frakce B		Frakce C	
		mg/100 g	%	mg/100 g	%	mg/100 g	%
1	63,18	15,94	25,2	11,03	17,5	36,21	57,3
2	65,92	13,54	20,5	11,03	16,7	41,35	62,7
3	68,28	10,97	16,0	12,06	17,7	45,25	66,3
4	70,87	7,41	10,4	12,17	17,3	50,50	71,3
5	71,99	6,88	9,6	12,17	16,9	52,94	73,5

hořkosti, neboť jsou v něm hořké látky vázány z větší části adsorpcně. Nejvyšším počtem bodů bylo podle hořkosti chutově hodnoceno pivo č. 3.

Při studiu indexu hořkosti byla ověřována použitelnost i u várek s vodami různého chemického složení. *Saláč*, *Kotrlá* a *Vančura* [61] byli si vědomi řady předchozích prací, v nichž byl sledován vliv chemického složení vody na výrodu mladiny a piva. Je však především zajímavé množství hořkých látek a jejich druh v pivovarských kapalinách. Pro ten účel byla vybrána řada vod různého chemického složení, od vod téměř měkkých k vodám velmi tvrdým, a to vždy v poměru tvrdosti přechodné k trvalé, 1 : 1, 2 : 1 a 1 : 2. Při převaze toho poměru bylo také přihlíženo k obsahu Ca^{2+} a Mg^{2+} . Kromě toho byly vybrány 4 druhy vod typického chemického složení, jejichž chemický rozbor a jejich účinek jsou uvedeny ve zvláštních tabulkách.

Z rozborů je patrné, že nepřiznivý účinek hydrogenuhlíkatů žíravých zemin ve vodách neprojevuje se pouze zvláště při převaze přechodné tvrdosti k trvalé, nýbrž spíše v poměru hydrogenuhlíkatu hořeknatého k vápenatému. Je-li hydrogenuhlíkat hořeknatý přítomen v poměru k uhlíkatu vápenatému ve vodě ve větší míře, i když se jedná celkem o vodu měkkou, zvyšuje se síle celkový obsah hořkých látek v pívě, avšak značná část ho zůstává ve volné, molekulární (neadsorbované) formě, což se pochopitelně projevuje vyšším indexem hořkosti a s drsně hořkou chutí. Je-li Mg^{2+} vázán na SO_4^{2-} , Cl^- , případně NO_3^- , nemusí se Mg^{2+} projevovat tak škodlivě, jako je-li vázán pouze na CO_3^{2-} .

$$\text{korečňný faktor } f_i = \frac{A_s \cdot w_i}{A_i \cdot w_s}$$

kde A_s je plocha alebo iné vyjadrenie elučnej krivky vnútorného štandardu,

A_i — plocha alebo iné vyjadrenie veľkosti elučnej krivky zložky i ,

w_s — navážka štandardu v mg,

w_i — navážka látky v mg.

Elučné krivky fenolu a xylenolu tvorili vysoké a ostré píky s pomerom výšky a polovičnej šírky píku 0,1. Pre voľbu vhodného výpočtu bolo urobené štatistické porovnanie výsledkov získaných u tej istej vzorky podľa výšky píkov a podľa plochy píkov. Taktiež boli vypočítané:

- a) priemerná odchýlka súboru pre výšku píku,
- b) priemerná odchýlka súboru pre plochu píku,
- c) smerodajná odchýlka.

Hodnoty priemernej odchýlky a smerodajnej odchýlky vychádzali priaznivejšie pre súbor 1 (hodnotenie výsledkov podľa výšky píkov). Preto získané chromatogramy boli vyhodnocované podľa výšky elučných kriviek. Po dodaní kompletnej metódy (s vyhodnocovaním) od japonskej firmy Suntory a konzultácii so s. r. aditeľkou VÚPS, Brno dr. Doležalovou upresnili sme PCH metódu vyhodnocovaním podľa japonského odberateľa.

Tento systém vyhodnocovania spočíva vo vyhodnotení pomeru výšky fenolu + ortokrezolu k výške štandardného píku fenolickej látky nachádzajúcej sa v nezadymovanom slade, ktorým je pravdepodobne guajakol. Obsah tejto látky je štandardný pred a po zadymovaní v slade. Odoberatelia požadujú, aby pomer výšky fenolu + ortokrezolu k výške štandardnej fenolickej látky prítomnej v slade bol väčší ako 1,6.

Uvedenou metódou prípravy a vyhodnocovania boli spracované všetky vzorky exportných zásielok. Počas práce boli odskúšané dva druhy náplne pre delenie fenolických látok. Prvé pokusy urobené izotermálnou chromatografiou boli urobené na náplni 10% Carbowax 20 M na nosiči Chromatone N-AW-HMDS, ktorá má tepelné rozmedzie 50–200 °C. Pretože na tejto náplni sa kryjú elučné krivky fenolu s ortokrezolom, hľadali sme polárnejšiu náplň, kde by tieto dve látky bolo možné oddeliť. Taktiež nebolo možné pracovať s uvedenou náplňou v doporučenom pracovnom rozmedzí, ktorú predpisovala metóda (50–250 °C). Dostupnou a polárnejšou náplňou bola 10% FFAP (polyetylén glykol 20M s kyselinou n-trotereftalovou), ktorá má tepelné rozmedzie 50–275 °C. Ukázalo sa, že elučné krivky fenolu na FFAP sú zreteľnejšie, fenol sa však neoddelil ani na tejto náplni od ortokrezolu. Tento fakt však nebol na závalu pri vyhodnotení podľa uvedenej metódy. Výhodou tejto náplne bola možnosť pracovať do 250 °C. Všetky pokusy okrem izotermálnej chromatografie boli robené na tejto náplni.

Počas kontroly zadymovaných sladov na obsah fenolov pre japonského odberateľa metódou PCH neboli zaznamenané žiadne reklamácie, takže je možné záverom povedať, že naša práca splnila svoj účel.

Literatúra

- [1] CHHABRA, B. R., GULATI, R. S., DHILLON, R. S., KALSI, P. P.: Journal of Chromatography, **135**, 1977, s. 521–522.
- [2] BARTLE, K. D., ELSTIEB, J., NOVOTNÝ, M., ROBINSON, R. J.: Journal of Gas Chromatography, **135**, 1977, s. 351–358.
- [3] WILLIAM A. COURT: Journal of Chromatography, **130**, 1977, s. 287–291.
- [4] FELL, V., LEE, C. R.: Journal of Chromatography, **121**, 1976, s. 41–77.
- [5] VANDE, K., CASTEELE, P., COHER, SUMERE, C. F.: Journal Chromatography, **121**, 1976, s. 49–63.
- [6] LILLE, U., KUNDEL, H., EISEN, O.: Journal of Chromatography, **116**, 1976, s. 1–7.
- [7] BHATTACHARJEE, A., BHAUMIK, A.: Journal of Chromatography, **113**, 1975 s. 250–255.

- [8] KIENINGER, BOECK: Brauwissenschaft **12**, 1977, s. 357–360.
- [9] BATHGATE, G. N., TAYLOR, A. G.: Kvalitatívne a kvantitatívne meranie rašelinového dymu v zadymenom slade. Slovenský preklad bez udania pôvodného zdroja.
- [10] PRIBELA, A. a kolektív: Analýzy cudzorodých látok v požívatinách, Bratislava, Alfa 1974.
- [11] BINA a kolektív: Malá encyklopédia chémie, Praha, SNTL 1978.
- [12] DAVÍDEK, J. a kolektív: Laboratorní příručka analýzy potravin, Praha, SNTL 1977.
- [13] Fremná literatúra firmy Suntory.

Ondříšková, M. - Sedová, V.: Poznatky získané pri sledovaní fenolov v zadymenom slade pre zahraničných odberateľov. Kvas. prům. **27**, 1981, č. 3, s. 58–64.

Výsledky uvádzané v tejto správe treba považovať za upresnenie metodiky stanovenia fenolov v zadymenom slade dodanej odberateľom, kde sa uvádzala len neúplná schéma.

Z tohto dôvodu bolo treba detailne rozpracovať jednotlivé stupne prípravky vzorky chromatografovania a vyhodnocovania, aby sa získali optimálne výsledky.

Najvhodnejšie sa ukázali tieto podmienky PCH: kolona FFAP (10%) na Chromosorbe W HMDS (60–80 mesh), dĺžka kolony 1,5 m; priemer 4 mm, teplota kolony 70–250 °C (10 °C/min), teplota injektora 300 °C, detektor FID, teplota detektora 300 °C, nosný plyn dusík.

Prerok nosného plynu sa volil tak, aby štandardný pik sa dosiahol za 17 min po nástreku. Výška píku fenolu sa porovnáva s výškou štandardného píku, ktorý je pravdepodobne odozvou guajakolu a jeho obsah sa zadymením vôbec nemení. Slad sa považuje za vyhovujúci, ak výška píku fenolu + ortokrezolu je väčšia ako 1,6 násobok výšky štandardného píku.

Pri tomto spôsobe vyhodnocovania obsahu fenolových látok neboli zo strany odberateľov žiadne reklamácie.

Ондрішкова, М., Седьова, В.: Сведения, полученные при исследовании фенолов в задымленном солоде для зарубежных заказчиков. Квас. прум. **27**, 1981, № 3, стр. 58–64.

Результаты, приводимые в этом сообщении надо считать уточнением методики установления фенолов в задымленном солоде, доставленной фирмой Сантори, где приводилась только неполная схема.

По этой причине было необходимо подробно разработать отдельные степени подготовки пробы хроматографирования и обработки, чтобы получить оптимальные результаты. Самыми благоприятными оказались следующие условия газохроматографического метода:

колона FFAP (10%) на Хромосорбе HMDS (60–80 mesh),

длина колонны 1,5 м; диаметр 4 мм, температура колонны 70–250 °C (10 °C/мин),

температура инжектора 300 °C, детектор FID, температура детектора 300 °C, газ-носитель -азот.

Расход газа носителя был избран таким образом, что бы стандартный пик был достигнут через 17 мин. после вбрызга. Высота пика фенола сопоставляется с высотой стандартного пика, являющегося правдоподобно откликом гуаякола и его содержание с задымлением не совсем не изменяется. Солод считается удовлетворительным, если высота пика фенола + ортокрезол выше 1,6 кратного высоты стандартного пика.

При применении этого метода оценки содержания фенольных веществ со стороны фирмы Сантори не было никаких претензий.

Ondříšková, M. - Sedová, V.: Information Obtained by Studying Phenolic Compounds in Smoked Malts Ordered for Foreign Consumers. Kvas. prům. **27**, 1981, Nr. 3, pp. 58–64.

The results presented in this report should precise the method of phenolic compound estimation in smoked malt

since its description rendered by the firm Suntory has not given full particulars.

Owing to that it was necessary to work out single steps of sample preparation, chromatographic process and its evaluation to obtain the optimal results. The most suitable conditions of gas chromatography are as follows:

FFAP column (10 %) on Chromosorbe HMDS (60—80 mesh), column length 1,5 m, diameter 4 mm, column temperature 70 to 250 °C (10 °C/min), injector temperature 300 °C, detector FID, detector temperature 300 °C, carrying gas — nitrogen.

Flow rate of the carrying gas was adjusted so that the standard peak might be obtained 17 min after the feed. The phenol peak height is compared with the height of the standard peak, which represents probably the guaiacol response and its area does not depend on that how the malt was been smoked. The malt is supposed to be satisfactory when phenol + ortho-cresol peak is higher than the standard peak height multiplied by 1,6.

Using this way of phenolic compound content determination there were no complaints from the firm Suntory.

Ondříšková, M. - Sedová, V.: Erkenntnisse aus dem Studium der Phenole in dem angeräucherten Malz für ausländische Abnehmer. Kvas. prům. 27, 1981, No. 3, S. 58—64.

Die in dieser Veröffentlichung angeführten Ergebnisse

stellen eine Ergänzung und Konkretisierung der Methodik zur Bestimmung der Phenole in angeräuchertem Malz dar, die in Form eines unvollständigen Schemas von der japanischen Firma Suntory geliefert wurde.

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse mußten deshalb die einzelnen Phasen der Probenaufbereitung, der chromatographischen Untersuchung und der Auswertung ausführlich durchgearbeitet werden.

Für die gaschromatographischen Methoden zeigten sich die folgenden Bedingungen am geeignetsten:

Kolonne FFAP (10 %) auf Chromosorb HMDS (60—80 mesh), Länge der Kolonne 1,5 m; Durchmesser 4 mm, Temperatur der Kolonne 70—250 °C (10 °C/min), Temperatur des Injektors 300 °C, Detektor FID, Temperatur des Detektors 300 °C, Trägergas Stickstoff.

Der Durchfluß des Trägergases wurde so gewählt, daß die Standard-Eloxionskurve in 17 min nach dem Anspritzen erreicht wurde. Die Höhe der Phenolkurve wird mit der Höhe der Standardkurve verglichen, die wahrscheinlich mit der Reaktion auf Guajacol zusammenhängt und sein Gehalt wird durch die Behandlung des Malzes mit Rauchgasen nicht beeinflusst. Das Malz wird als entsprechend beurteilt, wenn die Höhe der Kurve des Phenols + Orthokresols größer als das 1,6 fache der Höhe der Standardkurve ist.

Bei Einhaltung der beschriebenen Methoden der Auswertung des Phenolgehalts waren von Seiten der Firma Suntory keine Reklamationen.