

ODBORNÝ ČASOPIS PRO VÝROBU NÁPOJŮ A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE
VYDÁVÁJÍ PIVOVARY A SLADOVNY, státní podnik vědeckotechnických a obchodních služeb, Praha
SPOFA, s.p. a KOOSPOL, akciová společnost

Z výzkumu a praxe

Enzymové stanovení ethanolu v pivu

663.5 663.4

Ing. JAN KÁŠ, DrSc., Ing. TEREZA BURIANOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, 166 28 Praha
Ing. PAVEL PRŮCHA, Plzeňské pivovary, s.p., 304 97 Plzeň

Klíčová slova: pivo, ethanol, stanovení, enzym

ÚVOD

Možnosti aplikace enzymů v analytice jsou v současné době poměrně široké. Prakticky se využívají enzymové analytické metody v řadě oblastí — v klinické biochemii při diagnostice chorob, při kontrole nezávadnosti životního prostředí, při kontrole biotechnologických procesů, a v neposlední řadě v analytice potravin, při kontrole jejich jakosti, nezávadnosti a dodržení správného výrobního postupu. Předností enzymových analytických metod je především jejich vysoká specifita, citlivost a rychlost.

Jednou z mnoha aplikací enzymů v analýze potravin je i možnost stanovení ethanolu v potravinářských výrobcích, zejména v pivu, destilátech, vínu, ale i v cukrovinkách, džemech a dalších potravinách.

Stanovení ethanolu je založeno na specifické oxidaci acetaldehydu, vzniklého oxidací ethanolu alkoholdehydrogenasou (EC 1.1.1.1.), pomocí aldehyddehydrogenasy (NAD⁺) (EC 1.2.1.3.).

Klasické stanovení ethanolu se provádí destilační metodou s následným pyknometrickým stanovením hustoty destilátu [1]. Závislost hustoty destilátu na obsahu ethanolu ve vzorku je tabelovaná [2]. Tento způsob stanovení ethanolu je pracnější a podstatně časově náročnější než enzymové stanovení.

V této práci je uvedeno stanovení ethanolu u několika druhů piva, jak metodou destilační, tak enzymovou a výsledky obou postupů jsou statisticky vyhodnoceny.

MATERIÁL A METODY

Množství ethanolu bylo stanovováno u několika druhů piva — 8% Plzeňské pivo, 10% exportní Plzeňský Prazdroj a 12% Plzeňský Prazdroj. Jednalo se o vzorky ze státního podniku Plzeňské pivovary. Rozbory byly prováděny i u nízkoalkoholového piva Pito. Vzorky Pita byly zakoupeny v obchodní síti.

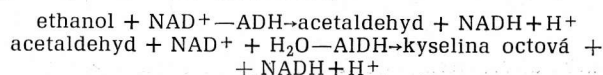
Stanovení ethanolu destilační metodou

Stanovení ethanolu destilační metodou bylo prováděno podle československé státní normy ČSN 56 0186, část 5 — Metody zkoušení piva — stanovení ethanolu [1].

Enzymové stanovení ethanolu

Princip metody

Enzymový pochod probíhá ve dvou následných reakcích. V první reakci je ethanol oxidován alkoholdehydrogenasou (ADH) na acetaldehyd, který je v druhé reakci kvantitativně oxidován aldehyddehydrogenasou (AIDH) až na kyselinu octovou.



Přenašečem elektronů je v obou reakcích NAD⁺. Množství vznikajícího redukovaného koenzymu (NADH + H⁺) je ekvivalentní množství ethanolu ve vzorku a zjišťuje se spektrofotometricky na základě změny absorbance při vlnové délce 340 nm [3].

Příprava vzorku

Ze vzorku piva byl před analýzou odstraněn oxid uhličitý filtrací. Vzorky piva byly ředěny destilovanou vodou v poměru 1:999, vzorky Pita v poměru 1:9.

Postup stanovení

Ke stanovení ethanolu byla použita komerční analytická souprava firmy Boehringer Mannheim, která je uvedena ve firemním katalogu pod číslem 176 290 [4]. Souprava obsahuje roztok fosfátového pufru pH 9,0 se stabilizátory, tablety obsahující NAD⁺ a enzym AIDH, dále suspenzi enzymu ADH se stabilizátory a standardní roztok ethanolu.

Do spektrofotometrické kyvety bylo pipetováno 0,1 ml vhodně naředěného vzorku, 0,3 ml fosfátového pufru a byla vložena 1 tableta (NAD⁺ a AIDH). Paralelně byl prováděn slepý pokus, kde místo vzorku byl pipetován stejný objem destilované vody.

Po zamíchání obsahu obou kyvet a ustálení reakce (asi 3 min) byla změřena hodnota absorbance A. Během analýzy musí být kyvety neprodyšně uzavřeny víčkem, dodávaným výrobcem, nebo parafilmem. Odečtením rozdílů absorbancí slepého pokusu od rozdílů absorbancí vzorku byla získána hodnota ΔA, představující absorbanční rozdíl NAD⁺ a NADH + H⁺, který je úměrný množství ethanolu ve vzorku.

Výpočet lze obecně provádět podle vzorce:

$$c = \frac{V \cdot Mr}{e \cdot d \cdot v \cdot 2 \cdot 100} \cdot \Delta A \cdot F \quad (\text{g.l}^{-1})$$

kde: V je celkový objem reakční směsi

v — objem vzorku

e — absorpční koeficient $\text{NADH} + \text{H}^+$
[$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

Mr — relativní molekulová hmotnost ethanolu

d — šířka květy

F — zředovací faktor

ΔA — rozdíl absorbancí vlastního stanovení a slepého pokusu

Pro podmínky v práci uvedené lze vzorec zjednodušit na tvar: $c = 0,115175 \cdot F \cdot \Delta A$.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve vzorcích piva bylo provedeno opakované stanovení ethanolu jak destilačně, tak enzymově (tab. 1).

Tabulka 1. Obsah ethanolu v jednotlivých vzorcích piva

Serie vzorků	Druh piva	Obsah ethanolu (% hmotn.)		
			destilačně	enzymově
I	8%	0,5 l	1,95	1,969
	10%	0,3 l	2,82	2,844
	12%	0,5 l	3,26	3,258
	12%	0,3 l	3,36	3,352
	Pito	0,5 l	0,85	0,846
II	8%	0,5 l	2,00	1,783
	10%	0,3 l	2,63	2,492
	12%	0,3 l	3,19	3,184
	Pito	0,5 l	0,65	0,647
III	8%	0,5 l	1,97	2,024
	10%	0,3 l	2,68	2,594
	12%	0,5 l	3,16	3,210
	Pito	0,5 l	0,61	0,597

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu ethanolu v jednotlivých vzorcích.

Tabulka 2. Průměrný obsah ethanolu ve vzorcích piva

Druh piva		Průměrný obsah ethanolu (% hmotn.)	
		destilačně	enzymově
8%	0,5 l	1,97	1,925
10%	0,5 l	2,71	2,643
12%	0,5 l	3,21	3,234
12%	0,3 l	3,28	3,268
Pito	0,5 l	0,70	0,697

Stanovení ethanolu v různých typech piva bylo provedeno ve třech sériích analýz, a to destilační metodou běžně zavedenou v našich pivovarech a enzymově. Bylo statisticky prokázáno, že obě metody vzájemně koreluji s pravděpodobností 99 % (korelační koeficient 0,997 na hladině významnosti 99 %) a se stejnou pravděpodobností nebyl mezi nimi prokázán průkazný rozdíl [5]. Z hlediska časových nároků je mnohem výhodnější enzymová analýza, kterou lze zvládnout za třicet minut včetně přípravy vzorku. Další předností enzymového stanovení je možnost současné analýzy většího počtu vzorků, čímž se průměrná doba, potřebná k analýze, dále zkracuje.

Nevýhodou enzymového stanovení je v současné době poměrně vysoká cena a devizová náročnost enzymové soupravy.

Vzhledem k tomu, že enzymové metody se v řadě zemí stávají zcela běžnými (některé jsou dokonce považovány za uznané), je třeba, abychom i v ČSFR měli praktické zkušenosti s jejich používáním.

Literatura

- [1] KÁŠ J., MAREK M.: Chem. prům. **34/59**, 1984, s. 12
- [2] Chemické tabulky, Státní pedagogické nakladatelství, 1. vyd. Praha 1965
- [3] ČSN 56 0186, část 5, Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, Praha 1986
- [4] Boehringer Mannheim GmbH: Methoden der biochemischen Analytik und Lebensmittelanalytik, Biochemica 1986
- [5] Firma STATGRAPHICS, USA, Program STATGRAF

Lektoroval doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Káš, J. - Průcha, P. - Burianová, T.: Enzymové stanovení ethanolu v pivu. Kvas. prům., **36**, 1990, č. 4, s. 97–98.

V článku je porovnáváno enzymové stanovení ethanolu pomocí komerčních souprav firmy Boehringer s běžně používaným stanovením ethanolu destilační metodou podle ČSN 56 0186. Analyzovány byly vzorky 8, 10, 12 % piva a Pito. Bylo statisticky prokázáno, že obě metody spolu koreluji, na hladině významnosti 99 % s korelačním koeficientem 0,997, přičemž enzymové stanovení je rychlejší a jednodušší.

Каш, Я. - Пруха, П. - Бурианова, Т.: Ферментативное определение этанола в пиве. Квас. прум., **36**, 1990, № 4, стр. 97–98.

В статье сопоставляется ферментативное определение этанола с помощью коммерциальных наборов фирмы Боерингер с классическим способом определения этанола методом дистилляции.

Проведен анализ нескольких проб пива: 8, 10, 12 % пиво и Пито. Статистически доказано, что оба метода находятся в корреляции с коэффициентом 0,997, но ферментативное определение этанола быстрее и проще классического.

Káš, J. - Průcha, P. - Burianová, T.: Enzymic Determination of Ethanol in Beer. Kvas. prům., **36**, 1990, No. 4, pp. 97–98.

The enzymic determination of ethanol using commercial kits of Boehringer has been compared with the commonly used distillation method according to Czechoslovak standard ČSN 56 0186. Samples of 8, 10, 12 % beers and low alcoholic beer Pito were analyzed. It was statistically proved that both methods correlate on significance level 99 % with the correlation coefficient 0,997. The enzymic determination is, however, advantageous in its rapidity and simplicity.

Káš, J. - Průcha, P. - Burianová, T.: Die Enzymatische Bestimmung des Äthanol in Bier. Kvas. prům., **36**, 1990, Nr. 4, S. 97–98.

In dem Artikel vergleicht man die Enzymatischebestimmung des Ethanol mit der klassischen Destillationsmethode der Ethanolbestimmung. Die Enzymatischebestimmung des Ethanol hat man mittels Komertionalsatz der Firma Boehringer durchgeführt. Man hat einige Proben des Biers vorgenommen und zwar: 8, 10, 12 % Bier und ein alkoholfreies Bier Pito. Man hat statistisch bewiesen, dass beide Methoden miteinander korelieren (mit dem Korelationskoeffizient 0,997). Die Enzymatischebestimmung ist aber schneller und einfacher als die klassische Bestimmung.

UPOZORNĚNÍ ČTENÁŘŮM

Praktická příručka autorů Ing. M. Kahlera, CSc. a Ing. T. Lejska, CSc. **Cylindrické tanky v pivovarství** bude ukončena v čísle 6/1990.

Vzhledem k tomu, že je o tento text velký zájem, objednejte si včas potřebný počet výtisků na adrese: SNTL, odtý časopisů, Krakovská 8, 113 02 Praha 1.