

Z výzkumu a praxe

STANOVENÍ KYSELINY ŠŤAVELOVÉ VE SLADU A PIVU

RNDr. PAVLA HAVLOVÁ, ING. JIŘÍ ŠUSTA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Sladařský ústav, Brno

Klíčová slova: slad, sladina, pivo, izotachoforéza, enzymatické metody, kyselina šťavelová

1. ÚVOD

Kyselina šťavelová hraje negativní roli jak z hlediska fyziologie výživy, tak i v pivovarské technologii. V lidské výživě je výskyt kyseliny šťavelové nežádoucí, neboť může mít ve větším množství (4–5 g) zjevné toxické účinky. Živoťně důležité ionty vápníku se totiž vysrážejí ve formě odpovídajících nerozpustných a neúčinných solí, zapříčiňujících tvorbu ledvinových kamenů. Kyselina šťavelová má rovněž nepříjemnou drsnou chuť.

V přírodě vzniká tato dikarboxylová kyselina při přeměně glukosy přes kyselinu pyrohroznovou, která vstupuje do cyklu kyseliny citronové.

Množství kyseliny šťavelové v pivu se pohybuje v rozmezí 4 až 32 mg/l. I když se nejedná o vysokou koncentraci, může způsobit, zvláště ve formě šťavelanu vápenatého, známou formu tzv. „oxalátového zákalu“ [1, 2, 3]. Kyselině šťavelové je také připisován podíl na přepěňování piva (gushing) [4]. Oba jevy vznikají náhle, aniž by se změnil výrobní proces při zpracování nové úrody. Na základě těchto poznatků se došlo k závěru, že obsah šťavelanu v pivu je určen převážně obsahem šťavelanu ve sladu, kde je ovlivněn nejen ročníkem, ale i odrůdou [3, 5]. Ovlivnit množství šťavelanu může i obsah vápníku v pivovarské vodě a ve sladu [5, 6]. Obsah šťavelanu ve chmelu, který je v literatuře udáván 2 750–9 700 mg/kg, hraje vzhledem k malé dávce ve srovnání se sladem jen podřadnou roli [2].

Obsah oxalátů ve sladu sledovali a možnosti jejich snížení změnou technologie výroby sladu a piva zkoumali ve své práci Narziss et al. [1]. Ve sladech ze tří sklizní, různých odrůd i oblastí našli koncentrace oxalátů v hodnotě 56–228 mg/kg sušiny sladu, přičemž rozdíl mezi odrůdami byl výraznější, než rozdíl mezi různými místy pěstování. Dále došli k závěru, že snížení obsahu oxalátů v mladině a v pivu může být dosaženo během sladování při intenzivním růstu, tzn. vyšším stupněm domočení a delším časem klíčení. Autoři sledovali obsah oxalátů nejen v ječmeni, ale i v pšenici. U pšeničného sladu se hodnoty oxalátů pohybovaly v rozmezí mezi 308 až 503 mg/kg sušiny sladu.

2. METODY STANOVENÍ

Nežádoucí vlivy kyseliny šťavelové a pivovarský produkt a potřeba zajištění preventivních opatření k jejímu snížení vedly

k intenzivnímu vypracování postupu jejího stanovení ve sladu a v pivu.

2.1. Klasické postupy

K tomu účelu sloužil postup založený na principu vysrážení šťavelanu jako soli vápníku [2]. Avšak i nedávno provedená modifikace této metody vykazuje některé podstatné nevýhody [3]. Metoda je náročná na čas a materiál, stanovení mohou rušit jiné ionty.

Velmi jednoduchá a rychle proveditelná metoda je spektrofotometrická, s činidlem pyridylazoresorcinem [4]. Uvedený postup vyzkoušeli pro stanovení šťavelanu v pivu Anderegg et al. [7]. Řada analýz ale ukázala, že metoda neposkytuje uspokojivě reprodukovatelné a spolehlivé výsledky.

Byly vyvinuty také metody s použitím plynové chromatografie [7, 8, 9], při nichž se organická kyselina nejdříve zakonzcentruje, separuje na iontoměničích a potom stanoví chromatograficky po methylovaní či silylaci.

Souhrnem se dá říci, že většina popsaných metod vykazuje řadu nedostatků, jako obšírné a zdoluhavé pracovní postupy, nedostatečnou reprodukovatelnost a přesnost.

2.2. Enzymatické metody

V poslední době se dostávají do popředí metody enzymatické, kde se nabízejí dvě možnosti. Buď přeměna šťavelanu prostřednictvím oxalát-oxidasy, nebo pomocí oxalát-dekarboxylasy [10, 11, 12]. Tyto postupy nemají nedostatky výše uvedených metod. Jsou rychlé a dobře reprodukovatelné, pokud se použijí vysoce čisté enzymy bez cizích aktivit. Při stanovení šťavelanu v pivu se doporučuje odstranění rušivých faktorů piva, jako jsou např. polyfenoly, barviva apod., a to pomocí PVP (polyvinylpyrrolidon).

2.3. Izotachoforéza

Izotachoforéza je jednou z elektroforetických metod, pomocí níž lze separovat anionty a kationty. Jedná se tedy o metodu separační, při níž se v důsledku nestejně iontové pohyblivosti daná směs těchto látek rozdělí [13].

Pohyblivost iontů závisí na mnoha faktorech, jako např. hodnoty pH, pK, teplota, koncentrace, náboj iontů a jiné. Mnohé z nich je možné vhodně a jednoduše měnit s cílem optimálního rozdělení separované směsi.

Vlastní analýza probíhá v zařízení, které se skládá ze separační a analytické kapilární kolony (průměr kapilár 0,8 a 0,3 mm), injektoru, dvou elektrodových prostorů a detektorů. Elektrody jsou přímě spojeny na stabilizovaný zdroj proudu. K detekci se používají především vodivostní a UV detektor.

Identifikace jednotlivých látek po předchozí analýze na ITP se vyhodnocuje ze získaného grafického integrálního záznamu, který má schodovitý charakter (izotachoforeogram). Jedné látce při stejných podmínkách separace odpovídá vždy stejná hodnota charakteristické konstanty, bez zřetele na to, zda se vyskytuje daná látka samostatně nebo ve směsi [13, 14].

Izotachoforéza se jeví jako velmi vhodná metoda na identifikaci a stanovení kyseliny šťavelové. Osvědčila se již při stanovení organických kyselin ve víně, velké uplatnění má při analýze pitných a povrchových vod [15, 16]. Má mnohé výhody proti jiným metodám, a to především minimální spotřebu vzorků, a možnost analýzy bez předchozí úpravy vzorků, kromě eventuálního zředění. I čas potřebný k analýze se pohybuje od 5 do 25 minut. Vlastní stanovení kyseliny šťavelové trvá asi 20 minut, s předchozí úpravou sladu celkem asi jednu hodinu. U piva, případně sladiny, jde pouze o naředění vzorků před nástřikem a je možné současně stanovit vedle kyseliny šťavelové i jiné organické kyseliny, které jsou obsaženy v pivu a ve sladu.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro stanovení kyseliny šťavelové byla použita metoda enzymatická a kapilární izotachoforéza. Sledovala se koncentrace kyseliny šťavelové ve sladu a v pivu.

3.1. Izotachoforéza.

U metody kapilární izotachoforézy se kyselina šťavelová stanovuje jako aniont v dvoukolonovém přístroji, kdy v separační kapiláře se oddělí od jiných složek a v analytické části přístroje se stanoví její množství. Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení se snímá detektory a přenáší na grafický záznam zapisovače. Tak je možno, na základě porovnání pořadí a délky zón standardního roztoku kyseliny a zkoušeného vzorku, zjistit množství šťavelanu ve vzorku. Při měření iontů se používají vodící a zakončující elektrolyty o různém složení s rozdílným pH, podle druhu sledovaných iontů.

Při stanovení šťavelanů bylo odzkoušeno několik pracovních systémů při různých hodnotách pH:

1. HCl + kys. α -aminokapronová, pH=4,7
2. HCl + β -alanin, pH=3,5
3. HCl + kys. α -aminokapronová, pH=4,0
4. HCl + histidin, pH=6,0

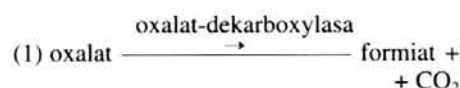
Jako nejvýhodnější se ukázal systém ad 3. s pH=4,0 a systém ad 4. při pH=6,0. Podrobné složení uvedených systémů je uvedeno v tab. 1.

Tab. 1 Složení systémů pro stanovení kys. šťavelové v pivu a ve sladu metodou kapilární izotachofórey

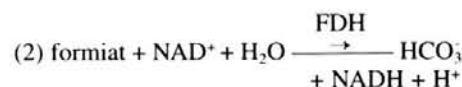
Složení systému	Elektrolyt	
	vodící	zakoňující
Systém 3 anion protiion pH aditivum	Cl ⁻ [c = 10 ⁻² mol.l ⁻¹] kys. α -aminokapronová 4,0 0,1% HEC	CH ₃ COOH [c = 2.10 ⁻² mol.l ⁻¹] TRIS 4,5
Systém 4 anion protiion pH aditivum	Cl ⁻ [c = 10 ⁻² mol.l ⁻¹] BISTRIS propan 6,0 Mowiel [c = 0,2 %] (polyvinylalkohol)	kaprylán [c = 5.10 ⁻² mol.l ⁻¹] TRIS 8,0

3.2. Metoda enzymatická

Enzymatická metoda je založena na principu štěpení kyseliny šťavelové v přítomnosti oxalat-dekarboxylasy při pH 5,0 na kyselinu mravenčí a CO₂:



Vzniklá kyselina mravenčí se oxiduje na nikotinamid-adenin dinukleotidem (NAD) v přítomnosti enzymu formiat-dehydrogenasy (FDN) při pH 7,5 na HCO₃⁻.



Množství NADH, vzniklé během reakce (2), je ekvivalentní množství kyseliny šťavelové. NADH se stanovuje na základě své absorpce při 334, 340 nebo 365 nm. Firma Boehringer (Manheim, SRN) dodává set pro deset stanovení, který obsahuje potřebné enzymy a další reagenty nutné k reakci.

Při stanovení šťavelanů v pivu byl vzorek smíchán s polyvinylpyrrolidonem (PVP) kvůli odstranění vlivu rušivých látek. Vzorek piva se používal nezředěný, objem pro jedno stanovení se pohyboval v rozmezí 0,2 – 0,5 ml.

Pro analýzu sladu bylo zapotřebí 50 g sladové moučky, která byla rozmíchána s destilovanou vodou ve 250 ml baňce, pH roztoku bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou a vzorek se inkuboval 15 min při teplotě 60 °C. Po vychladnutí na pokojovou teplotu bylo pH zvýšeno roztokem hydroxidu sodného na 5,0 a směs byla přefiltrována.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro stanovení kyseliny šťavelové ve sladu a v pivu byly zavedeny dvě metody: izotachofóza a enzymatická metoda.

Reprodukovatelnost stanovení kyseliny šťavelové izotachofórou byla ověřena na jednom vzorku sladu a piva. Odhad směrodatné odchylky ze 30 stanovení pro vzorek sladu byl 0,86 a pro vzorek piva 1,09. Potvrdily se výhody, zmíněné při popisu metody: jednoduchost úpravy vzorku a rychlost stanovení.

spíše pro větší počet stanovení nebo rutinní analýzy.

Enzymy je nutné uchovávat v chladu (pod 4 °C), především FDH (enzym formiat-dehydrogenasa), jehož roztok se musí ihned chladiť v ledové vodní lázni, neboť uchováváním při teplotě místnosti ztrácí již po několika hodinách aktivitu, což vede k naměření nižších hodnot.

Výsledky obou metod byly vzájemně porovnány (tab. 2) a statisticky vyhodnoceny. Jejich srovnáním se zjistilo, že hodnoty naměřené oběma metodami jsou v blízké korelaci. Korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,99. Na základě získaných výsledků a jejich vzájemného porovnání jsou obě metody vhodné na stanovení koncentrace kyseliny šťavelové ve sladu a v pivu, případně ve sladině.

LITERATURA

- [1] NARZIŠ, L., REICHENDER, E., IWAN, H. J.: Brauwissenschaft, **39**, 1986, s. 4.
- [2] BURGER, M., BECKER, K.: ASBC Proc., Congr., 1949, s. 102.
- [3] GREIF, P., SCHILDBACH, R.: Mschr. Brauerei, **31**, 1978, s. 275.
- [4] BERNSTEIN, L., KHAN, A.: Proc. Amer. Soc. Brew., **31**, 1973, s. 20.
- [5] MULLER, J.: Diss. VLB Berlin, 1982
- [6] SCHUR, F. et al.: Schw. Br. Rdsch. **91**, 1980, s. 201
- [7] ANDEREGG, F., SCHEU, F., PFENNINGER, H.: Brauerei-Rundschau, Jg., 1980, s. 133
- [8] DRAWERT, F., LEUPOLD, G., LESING, V.: Brauwissenschaft, **29**, 1976, s. 345.
- [9] ALAVI, Z.I.: Brauwissenschaft, **39**, 1982, s. 233.
- [10] JAKOBY, W.B., BERGMAYER, M.V.: Methoden der enzymatischen Analyse Bd., II, 3. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie 1976, s. 1588.
- [11] BEUTLER, H.O., BECKER, J., MICHAL, G., WALTER, E., FRESENIUS, Z.: Anal. Chem., **301**, 1980, s. 186.
- [12] DRAWERT, F., PAUL, H., HAGEN, W.: Brauwissenschaft, **34**, 1981, s. 57.
- [13] ZYKA, J. a kol.: Nové směry analytické chemie, Praha, 1984.
- [14] KANIANSKÝ, D.: Základní kurz izotachofórey, Spišská Nová Ves, 1985.
- [15] FARKAŠ, J., KOVAL, M.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 256
- [16] PRŮŠA, K., SMEJKAL, O.: Kvas. prům., **29**, 1983, s. 7.

Tab. 2 Srovnání enzymatické a izotachoforetické metody při stanovení šťavelanů ve sladu a v pivu

Vzorek č.	koncentrace šťavelanu	
	met. enzymatická	izotachofóza
[mg.l ⁻¹]		
pivo		
1.	21,2	21,6
2.	21,2	21,6
3.	23,6	23,8
4.	22,6	22,5
5.	19,8	20,1
[mg.kg ⁻¹ suš.]		
slad		
6.	141	145
7.	139	141
8.	86	89
9.	185	190
10.	213	215
11.	96	99
12.	141	138
13.	126	129
14.	148	153
15.	212	207