

PŘÍMÁ ANALÝZA MAKROMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ PIVA NOVOU METODOU DIFERENCIÁLNÍ NEFELOMETRICKÉ TITRACE

DIRECT ANALYSES OF BEER MACROMOLECULAR COMPLEXES BY MEANS OF A NEW DIFFERENTIAL NEPHELOMETRIC TITRATION METHOD

PETR SLADKÝ, HANA CÍSAŘOVÁ, MIROSLAV DIENSTBIER, PETR GABRIEL, Katedra chemické fyziky a optiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2

Klíčová slova: pivo, makromolekulární komplex, titrace

Keywords: beer, macromolecular complex, titration

1 ÚVOD

Základní chuťové charakteristiky a fyzikálně-chemické vlastnosti piva a meziproductů, jako např. plnost, chuťová a koloidní stabilita, pěnivost a zákal jsou určeny makromolekulami extraktu, zvláště pak proteiny, nezkvasitelnými polysacharidy, polyfenoly a jejich komplexy [14, 16]. Makromolekulární komplexy pivovarsko-sladařských produktů a meziproductů ovlivňují rovněž v zásadní a dosud ne plně poznané míře řadu dílčích technologických procesů, počínaje sladováním a konče čířicí filtrací a stabilizací finálního produktu včetně jeho stárnutí [5].

Pro analýzu složení makromolekulárních komplexů v roztocích byla vyvinuta řada moderních nepřímých metod, založených na dělicích principech s citlivou detekcí, jako např. HPLC, SDS PAGE aj., a vyznačujících se vysokým analytickým rozlišením jedinců a detekční citlivostí řádu pikogramů. Nevýhodou těchto metod je, že neumožňují analýzu makromolekulárních komplexů a jejich vzájemných interakcí v nativních koncentracích roztoků primárního složení v minimálně porušených stavech rozlišnou analytickou předpřípravou [25].

Neúčinnější přímou metodou analýzy makromolekulárních komplexů v roztocích je měření rozptylu světla v průběhu jejich rozpouštění resp. srážení a dalších reakcí [11, 21, 26]. Mezi analyticky a ekonomicky nejvýhodnější praktické provedení uvedené metody patří tzv. turbidimetrické resp. nefelometrické titrace [21, 22, 38, 39].

V současné pivovarsko-sladařské analýze jsou turbidimetrické resp. nefelometrické metody titrační analýzy tradičně redukovány do podoby několika specifických srážecích testů zaměřených převážně na rychlou orientační předpověď koloidní stability finálního produktu. V praxi jsou prováděny vesměs manuální titrací, založenou často na vizuálním hodnocení zákalu a umožňující většinou získání jednoho analytického „bodu“ resp. číselného údaje a nikoli mnohonásobné analytické infor-

mace v podobě charakteristické funkční závislosti [6, 36].

Cílem předložené práce je uvést poznatky o přímém pozorování pásem hlavních frakcí makromolekulárních komplexů piva i meziproductů novou metodou diferenciálních nefelometrických titrací a provést jejich základní kvalitativní fyzikálně-chemickou interpretaci a srovnávací analýzu s dosavadními poznatky, získanými jinými metodami, zvláště pak metodami molekulárně-filtrací chromatografie (tzv. SEC).

Výsledky měření jsou hodnoceny převážně z hlediska kmitové-setrvačných vlastností makromolekul a komplexů v roztoku určených molekulovou hmotností. Vliv elektrických interakcí (např. [31]) na průběh diferenciálních nefelometrických titračních charakteristik bude zmíněn jen stručně a bude mu věnována podrobněji samostatná studie.

Vzhledem ke společné fyzikálně-chemické podstatě interakcí makromolekul a jejich komplexů ve vodných roztocích [13, 34] se omezíme z metodických důvodů na nefelometrické titrace jedním druhem soli, jmenovitě síranem amonným, který patří stále mezi nejpoužívanější v pivovarsko-sladařské i obecně biochemické analytice vodných roztoků a disperzí makromolekulárních komplexů [3, 4, 7 – 10, 30, 33, 42].

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a roztoky

Vzhledem k metodické povaze této studie byly na analytické parametry některých roztoků vzorků kladeny požadavky menší než pro biochemickou analýzu, s výjimkou nasycených roztoků síranu amonného p.a. čistoty od fy FLUKA a MERCK (Německo) ve vodě pro chromatografii.

Vzorky PVP byly získány darem od fy International Specialty Products (USA).

Vzorky potravinářské želatiny byly získány darem od fy CONNECO CHEMICALS s. r. o. (ČR).

Modelové roztoky BSA a telecího gamaglobulinu (BOEHRING Werke A.G.,

Německo) laskavě připravil a věnoval pro potřeby této práce RNDr. J. Mácha z Přírodovědecké fakulty UK v Praze.

Jako vzorek piva byl vybrán typický ležák plzeňského typu, avšak ošetřený hloubkovou mikrobiologickou filtrací a mírnou silikagelovou stabilizací na tříměsíční trvanlivost dle etikety. Pivo bylo zakoupeno v maloobchodě.

2.2 Přístroje a pomůcky

Nefelometrické titrace se měřily automaticky analyzátozem turbidity nápojů BETA mod. 2000. Přístroj byl vyvinut na základě ověřené modulární koncepce speciálně pro turbidimetrickou analýzu technologií a kontrolu jakosti produkce v pivovarsko-sladařském a nápojovém průmyslu. Jeho zvláštní předností je, že umožňuje, na rozdíl od jiných laboratorních pivovarských zákalometrů, měření nejen velkých objemů vzorků nad 100 ml v lahvích či kyvetách, ale též objemů vzorků menších než 5 ml přímo v běžných chemických zkumavkách i v průtokovém provedení, což je pro automatické titrace mimořádně ekonomicky i analyticky výhodné.

Automatická měření a základní zobrazování a hodnocení naměřených dat provádí přístroj BETA 2000 ve spojení s PC na základě uživatelského SW. Další nadstavbové zpracování dat lze provést běžnými SW produkty, jako např. EXCEL fy MICROSOFT (USA).

Koncepce i funkce přístroje BETA 2000 je shodná s přístrojem popsáním v práci [36–41].

2.3 Postupy měření nefelometrických titračních křivek

Při klasické titraci se většinou ručně přidává roztok titračního činidla do míchaného vzorku. Přitom se po každé dávce titrantu měří ustálená hodnota odezvy, např. pH. V případě nefelometrických titrací se pak měří tzv. nefelometrický zákal, který je úměrný intenzitě světla rozptýleného vzorkem do pravého úhlu [1, 2, 23, 29]. Pro získání přesnějších hodnot ekvivalentních nebo prahových bodů, určujících stechiometrii reakce, se hodnoty titrační odezvy na

jednotlivé dávky titrantu zobrazují do grafu v podobě titračních charakteristik (obr. 1). Ekvivalentní nebo prahové body titračních křivek je výhodné stanovit asymptoticky, jak je ukázáno podrobně v [36, 38, 39].

Vzhledem k velké pracnosti a nepřesnosti se ruční titrace vyznačují malým analytickým rozlišením a používají se pro orientační, často pouze vizuální odhady ekvivalentních či prahových bodů. Podstatně většího analytického účinku dosahují titrace s prakticky kontinuálním dávkováním titrantu a s automatickým řízením, snímáním, případně i hodnocením a zobrazováním měřených dat, jak na obr. 2 ilustruje příklad nefelometrické srážecí titrace vodního roztoku BSA. Bílkovina bovin serum albumin – BSA – je často používána v pivovarské analytice jako srovnávací standard pro stanovení vysokomolekulárních bílkovin v pivo chromatografickými metodami či pomocí barviva Coomassie Blue dle [4, 5, 25].

2.4 Vyjadřování naměřených titračních závislostí

Primární nezávisle proměnnou veličinou je při titraci objem titračního činidla, který je dán součinem rychlosti dávkování (např. $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$) a času. Děje-li se dávkování rovnovážně rychlostí mnohem menší, než rychlostí probíhající reakcí, můžeme vynášet jako nezávisle proměnnou přímo velikost objemu titrantu přidaného do výchozího objemu vzorku. Na osu Y se vynášejí odpovídající měřené veličiny – tj. hodnota potenciometrické, konduktometrické, kalorimetrické odezvy či v našem případě hodnota zákalu v nefelometrickém modu.

Užší vymezení charakteristik titračních závislostí se zvláště v případě popisu ustálených analytických testů piva provádí obvykle dohodou, jak je tomu např. i u srážecích testů piva a meziproduktů, při kterých se konvenčně (např. [17–22, 23, 29]) vyjadřuje titrační nezávisle proměnná v ml dávky titrantu do výchozích 10 ml vzorku (obr. 1 resp. 2).

2.5 Hodnocení rozpustnosti na základě nefelometrických titrací

Při hodnocení používaném zvláště v biochemii při teoretické analýze rozpustnosti bílkovin, je množství roztoku soli titrovaného do vzorku vyjádřeno jeho iontovou silou např. v jednotkách $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [13, 44], přičemž pro přímé srovnání s křivkami rozpustnosti bílkovin v závislosti na iontové síle lze přirovnat hodnoty rozpustnosti na ose Y k záporně vzatým hodnotám logaritmu zákalu nefelometrických titračních křivek, jak ilustruje příklad nefelometricky naměřeného titračního vysolování BSA z roztoku na obr. 3.

Často se rovněž jak v biochemické, tak i v pivovarsko-sladařské analytice

hodnotí nezávisle proměnná rozpouštěcích resp. srážecích titrací makromolekulárních komplexů v hmotnostních procentech saturace roztoku soli, nadávkované do vzorku (obr. 4).

2.6 Teoretická podstata titrací vodných roztoků makromolekul s olemi

Jednotlivé makromolekuly a jejich komplexy reagují v roztoku s dávkovaným titrantem specificky, v důsledku rozdílných molekulových hmotností, velikosti a prostorového uspořádání nábojů, struktury a dalších vlastností. To charakteristicky ovlivňuje průběh nefelometrické titrační křivky. Ta v prvním přiblížení koreluje s rozpustností v závislosti na množství soli v roztoku.

Přibližně platí, že průměrně 1 mol různé bílkoviny je v roztoku hydratován řádově 0,5 mol H_2O . Podobně je tomu u PVP, kde přibližně 0,5 molu H_2O připadá na jednu monomerní jednotku. Neutrální sůl „vysušuje“ resp. sráží makromolekuly polymeru z roztoku přibližně stechiometricky v závislosti na jejich molekulární hmotnosti.

S rostoucí saturací soli v roztoku klesá afinita vody k polymeru [24] a zdánlivě roste jeho koncentrace, až dosáhne kritické asociační resp. agregační hodnoty CAC (z anglického Critical Aggregation Concentration) V případě, že makromolekuly resp. jejich komplexy agregují do podoby micel, se používá zkratky CMC (Critical Micellar Concentration) [45]. Na křivkách nefelometrických titrací dochází k CAC resp. CMC při odpovídajícím množství titrantu v roztoku, což se vesměs projevuje více či méně ostrou změnou hodnot nefelometrického zákalu, označovanou jako titrační práh [34].

Na celý proces srážení polymeru z homogenního roztoku se můžeme dívat jako na fázový přechod. Tomu odpovídá i skutečnost, že práh srážení nezávisí v prvním přiblížení na koncentraci, ale na molekulové hmotnosti polymeru [3, 13, 34].

2.7 Princip nové metody diferenciální nefelometrické titrace

V případě piva i jiných komplexních makromolekulárních roztoků lze pozorovat na křivkách nefelometrických titrací před dosažením saturace zákalu prahovou a inflexní strukturu. Tuto strukturu prvně pozoroval u piva Chapon a kol. [6, 21], avšak dosud nebyla hodnocena.

Abychom alespoň empiricky popsali a blíže objasnili strukturu křivek nefelometrických titrací obecně roztoků makromolekulárních komplexů včetně piva a meziproduktů, zavedli jsme novou metodu, jejíž princip spočívá v měření titračních křivek s vysokým rozlišením a v jejich diferenciální matematické analýze.

Princip a analytický účinek nové metody je názorně patrný z příkladu na obr. 4. Tam je současně ukázán průběh nefelometrické titrační křivky spolu s její první derivací pro modelovou soustavu, sestávající ze směsi více než dvou skupin komplexních makromolekulárních jedinců v roztoku, jmenovitě PVP K15 a bílkoviny BSA. Jak je vidět na obr. 4, jsou na diferenciální nefelometrické křivce výrazně patrná jednotlivá maxima, odpovídající makromolekulárním pásům komplexů jednotlivých složek směsi, tj. PVP K15 a BSA, které se spolu skládají prakticky bez vzájemného působení.

2.8 Citlivost a rozlišovací schopnost

Automaticky řízené a snímané nefelometrické titrace se vyznačují velkou citlivostí s koncentrační úrovní detekce až 10^{-7} hmotnostního zlomku komplexu v roztoku (cca 0,1 μg na ml roztoku).

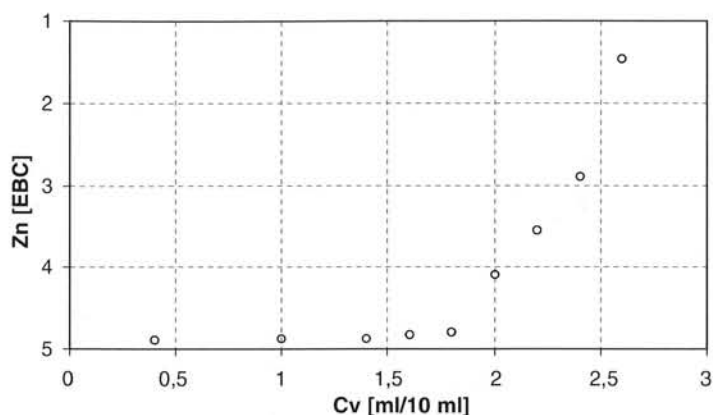
Na obr. 5 je ukázána odezva nefelometrického zákalu na znečištění roztoku BSA (0,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) roztokem PVP K15 (cca 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) detegované srážecí titrací s íranem amonným. Srovnatelné hodnoty detekční citlivosti nefelometrických titrací bílkovinných komplexů piva uvádí i Chapon [17–21].

Rozlišovací schopnost automatických nefelometrických titrací je především určena chemickou čistotou titrantu, přesností dávkování titračního objemu a přirozené reakční kinetikou. Experimentálně stanovené rozlišení resp. reprodukovatelnost měření je v běžné laboratorní praxi lepší než $\pm 2,5\%$. Metodou diferenciálních nefelometrických titrací lze měřit i s rozlišením lepším než 1 %.

3 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

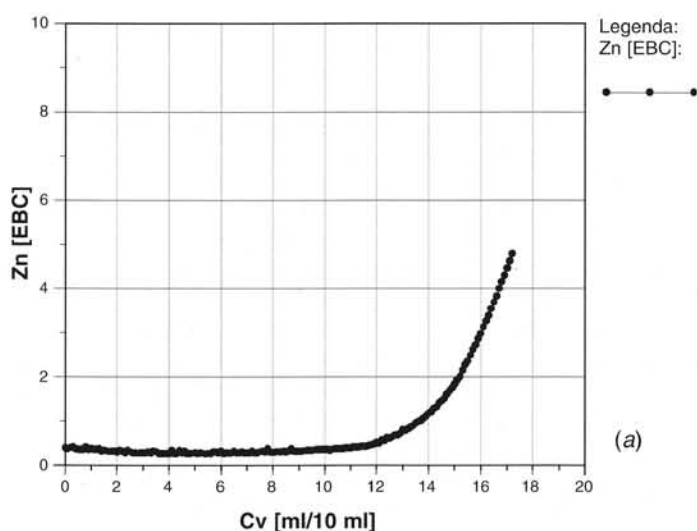
3.1 Vliv koncentrace titrovaného roztoku

Na obr. 6 je ukázán vliv koncentrace rozpuštěného makromolekulárního komplexu na průběh nefelometrických titračních křivek. V našem případě se jedná o modelový roztok PVP K90 s fiktivně udávaným pásmem molekulárních hmotností 1–200 kDa. Jsou uvedeny křivky nefelometrických titrací roztokem síranu amonného pro tři koncentrace roztoku PVP K90. Jak je patrné z obr. 6, nefelometrická titrační odezva roste s koncentrací rozpuštěného polymeru a lze ji analyticky hodnotit resp. kalibrovat při stejných podmínkách experimentální křivkou zvláště v oblasti koncentrací menších než 1 %. V této oblasti práh nefelometrické titrace nezávisí na koncentraci přibližně v intervalu chyby měření. Za saturačním maximem dochází obvykle ke zpětnému rozpouštění případně ředění vysrážených komplexů makromolekul (obr. 6).

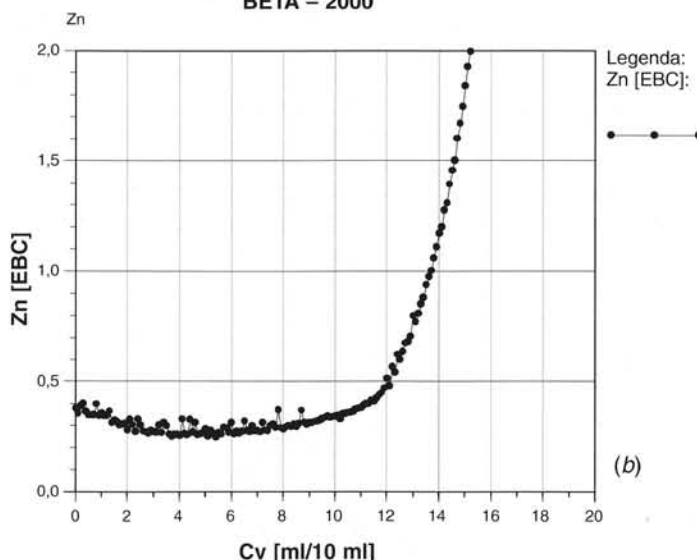


Obr. 1 Graf vývoje hodnot nefelometrického zákalu (Zn) v závislosti na objemové dávce nasyceného roztoku síranu amonného ve vzorku piva (Cv) v průběhu ručně prováděné titrace.

BETA – 2000



BETA – 2000

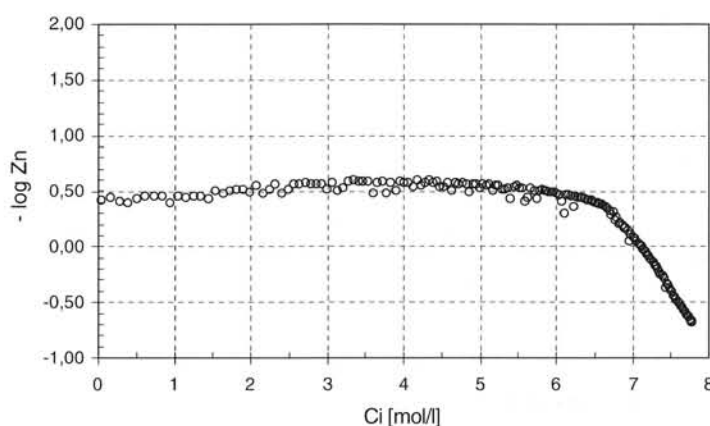


Obr. 2 Křivka nefelometrické titrace BSA naměřená automaticky při spojitém dávkování titrantu (nasyceného roztoku síranu amonného) aparaturou BETA – 2000 a zobrazená uživatelským SW (a) – prvotní graf, (b) – zvětšený výřez v ose Zn (zoom). (Zn ... nefelometrický zákal, Cv ... objem nasyceného roztoku síranu amonného v 10 ml vzorku piva).

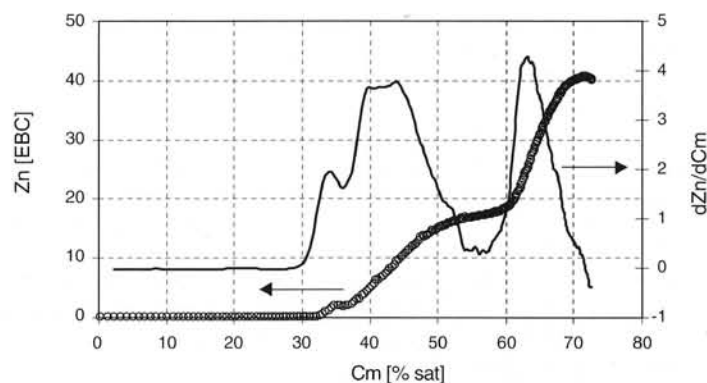
3.2 Vliv molekulární hmotnosti

Základní ovlivnění průběhu nefelometrických titračních charakteristik jsme nejprve studovali na modelových vod-

ných roztocích PVP v několika pásmech molekulárních hmotností udaných výrobcem (obr. 7). Jak plyne z průběhu nefelometrických titračních křivek PVP sí-

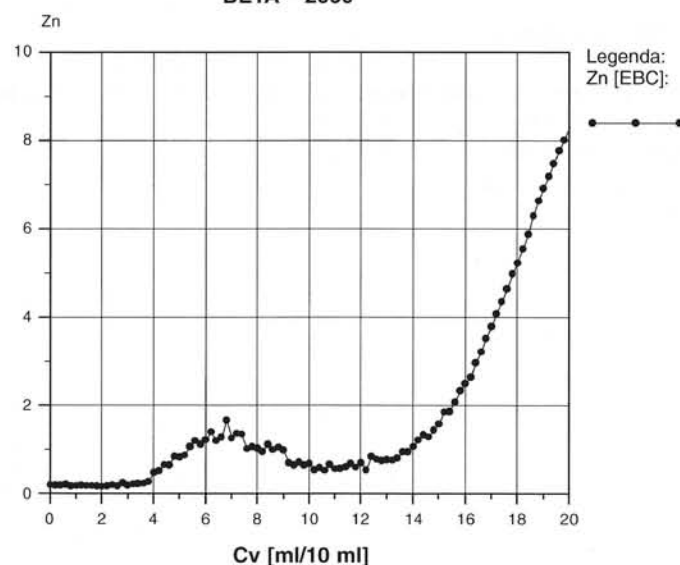


Obr. 3 Průběh nefelometrické titrační charakteristiky BSA v závislosti na iontové síle titrantu síranu amonného v roztoku, vyjádřený pro srovnání s teoriemi rozpustnosti bílkovin v závisle proměnné – log Zn (resp. log 1/Zn).



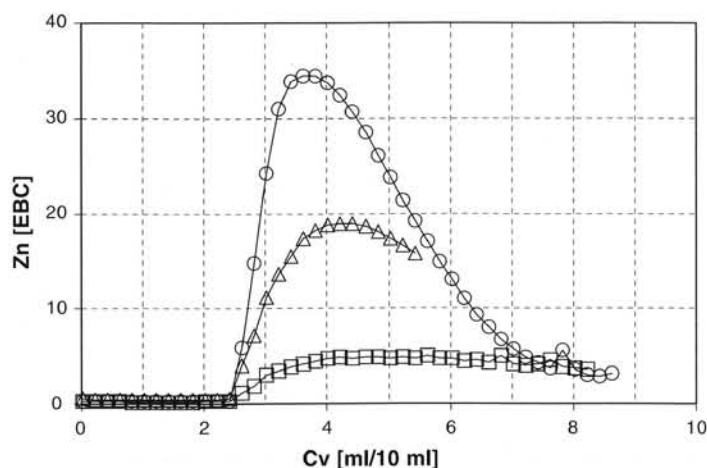
Obr. 4 Křivka diferenciální nefelometrické titrace modelového roztoku směsi BSA (1 g.l⁻¹) a PVP K15 (1 g.l⁻¹) síranem amonným (—) spolu s výchozí nefelometrickou titrační křivkou (ooo). (Cm ... koncentrace síranu amonného ve vzorku piva vyjádřená v jednotkách % saturace soli v roztoku)

BETA – 2000

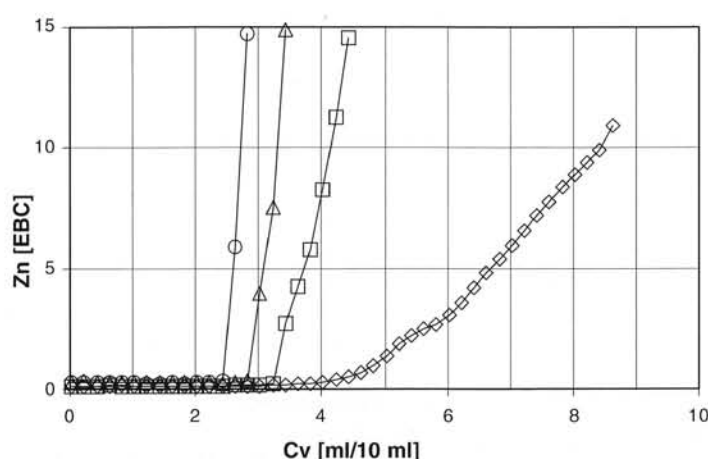


Obr. 5 Křivka nefelometrické titrace síranem amonným vodného roztoku bovin serum albuminu (BSA – 0,5 g.l⁻¹) znečištěného stopovým množstvím PVP K15 (~ 1 mg.l⁻¹)

ranem amonným, s rostoucí molekulární hmotností roste i hodnota titračního prahu. Přitom lze zvláště na nefelometrické titrační charakteristice PVP K15



Obr. 6 Vliv koncentrace vodného roztoku vysokomolekulárního PVP K90 (MW ~ 1 200 kDa) na hodnotu prahu precipitace nasyceným roztokem síranu amonného □ – 0,1 g.l⁻¹ Δ – 0,2 g.l⁻¹ o – 0,5 g.l⁻¹.



Obr. 7 Vliv molekulární hmotnosti (hmotnostních průměrů) komerčních typů PVP ve vodném roztoku (0,5 g.l⁻¹) na počáteční průběhy křivek nefelometrických titrací síranem amonným; ◇ – K15 ; (9,7 kDa); □ – K30 (58 kDa) Δ – K60 (340 kDa) o – K90 (1 200 kDa).

pozorovat při nadprahových dávkách titrantu inflexní průběh přecházející v další titrační práh. To by nasvědčovalo, při vyšší iontové síle titrantu v roztoku, existenci resp. tvorbě dalšího komplexu v pásu menších molekulárních hmotností.

K pravděpodobnému potvrzení vysloveného předpokladu jsme použili diferenciální analýzu prvního řádu, tj. derivaci uvažované nefelometrické titrační křivky v závislosti na dávce resp. relativní hodnotě saturace titrantu v roztoku (obr. 8). Na diferenciální nefelometrické titrační charakteristice PVP K15 v závislosti na saturaci solí jsou zřetelně patrná minimálně dvě maxima, která lze, jak ukážeme níže, přiřadit komplexům rozdílných molekulárních hmotností.

3.3 Vliv agregace

K posouzení vlivu agregace makromolekul jsme metodou diferenciální nefelometrické titrace síranem amonným analyzovali roztok zestárlého vzorku telecího gamaglobulinu (obr. 9). Již při

podprahových hodnotách saturace vykazoval roztok vysoký zákal, což svědčí o existenci mírně se rozpouštějících agregovaných komplexů. Diferenciální analýza pak vyjevila na pásu nízkomolekulárního komplexu na straně vyšší saturace ještě rameno nasvědčující existenci pásu dalšího komplexu, odpovídající pravděpodobně méně asociovaným makromolekulám s menší hmotností.

3.4 Vliv štěpení

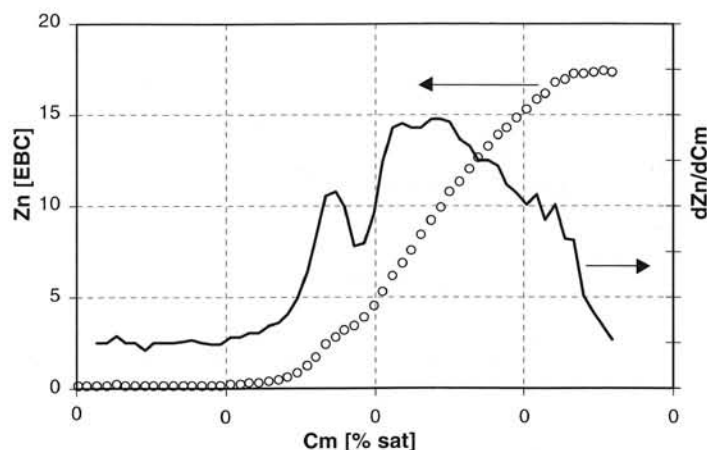
Důležitý vliv chemického štěpení makromolekul a jejich komplexů na průběh nefelometrických titračních křivek jsme studovali na modelových roztocích nehydrolyzované a hydrolyzované želatiny. Jak primární, tak zvláště pak diferenciální nefelometrické titrační charakteristiky ukázaly příkladný vliv hydrolyzy nejen na velikost titračního prahu, který se posunul k podstatně vyšší hodnotě oproti nehydrolyzovanému vzorku, ale též na vznik strukturních pásem (obr. 10). Zatímco vzorek nehydrolyzované

želatiny charakterizuje jeden titrační pás resp. maximum, vyznačuje se želatinový hydrolyzátní dvěma charakteristickými pásy (obr. 10).

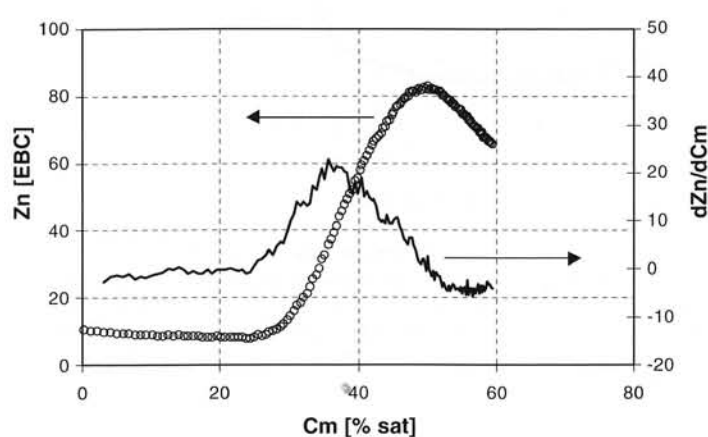
3.5 Diferenciální nefelometrická titrační analýza piva

Po sérii diferenciálních nefelometrických titračních analýz modelových makromolekulárních roztoků, pomocí kterých jsme prakticky ověřovali významné analytické možnosti vyvinuté metody v souladu se základní makromolekulární termodynamikou, jsme přistoupili k měření vzorků piva. Typická nefelometrická titrační charakteristika piva a její první derivace jsou ukázány na obr. 11 jako funkce saturace solí titrantu do hodnoty cca 50 %.

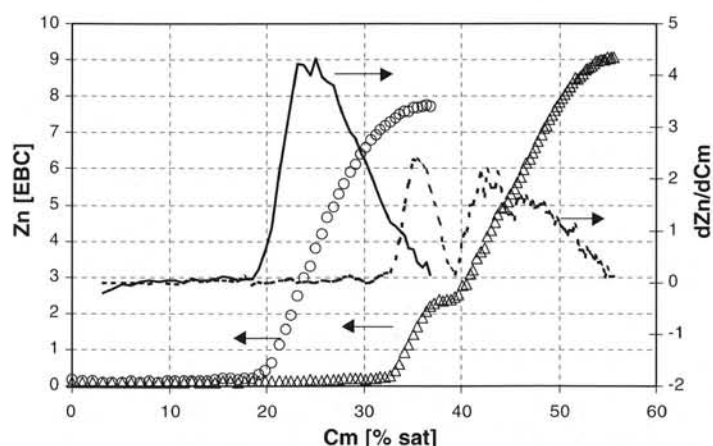
Po krátké fázi „vsolování“, tj. rozpouštění piva roztokem solného titrantu, charakterizované zápornou derivací, dochází k prudkému nárůstu hodnot derivací křivky v oblasti prahu titrace do prvního maxima, následovaného druhým, podstatně širším maximem slož-



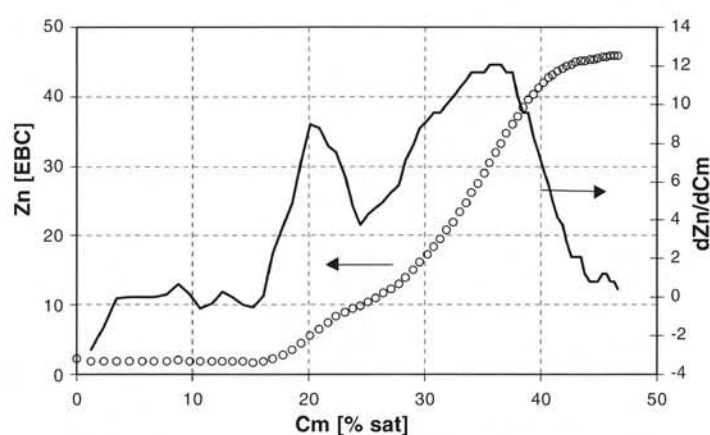
Obr. 8 Diferenciální analýza (křivka —) nefelometrické titrace síranem amonným vodného roztoku 0,5 g.l⁻¹ PVP K15 (křivka ooo)



Obr. 9 Křivka nefelometrické titrace síranem amonným vodného roztoku (0,5 g.l⁻¹) vzorku telecího gamaglobulinu (ooo) spolu s diferenciální nefelometrickou titrační křivkou (—)



Obr. 10 Srovnání nefelometrických a diferenciálních nefelometrických titrací síranem amonným roztoků potravinářské nehydrolyzované (křivky ooo resp. —) a hydrolyzované (křivky ΔΔΔ resp. - - -) želatiny



Obr. 11 Typický průběh nefelometrické charakteristiky piva titrovaného nasyceným roztokem síranu amonného a průběh diferenciální křivky 1. řádu

ným minimálně z pásem dvou komplexů, o čemž svědčí existence výrazného ramena před jeho samotným vrcholem. Jinými slovy, diferenciální křivky nefelometrické titrace piva solí síranu amonného ukazují v prvním přiblížení na existenci tří stěžejních frakcí makromolekulárních komplexů rozdílných molekulárních hmotností přibližně v pásmech saturace SAM menší než 25 % (PH frakce), SAM rovno 30–40 % (PM frakce) a SAM větší než 40 % (PL frakce). Poznamenejme, že posledně uvedená frakce se nachází s největší pravděpodobností převážně za hranicí 40 % saturace SAM. V soulase s publikovanými poznatky [4, 8, 10, 12, 15, 25, 28, 30, 32, 43], získanými na základě nepřímých analytických metod hmotnostní gelové filtrace a SDS PAGE elektroforézy lze precipitovaným proteinovým komplexům v pozorovaných pásmech saturace síranem amonným předběžně přiřadit pásma molekulových hmotností MW větší než 100 kDa (frakce PH), MW cca 40 kDa (frakce PM) a MW menší než 15 kDa (frakce PL), (pro přehled viz tab. 1).

3.6 Vliv pH

Z teorie rozpustnosti čistých bílkovin v roztocích platí, že rozpustnost je menší při hodnotě pH rovné pl, tj. v izoelektrickém bodě [3, 13, 44]. S poklesem i růstem pH od izoelektrického bodu se rozpustnost bílkoviny zvětšuje. Jinými slovy, v izoelektrickém bodě roztoku dosahuje hodnota prahu titračního srážení minima a roste s poklesem i růstem pH od hodnoty pl.

V pivo bude pravděpodobně závislost na pH nefelometrických titračních charakteristik síranem amonným i solemi obecně složitější, neboť pivo obsahuje bílkovinné frakce a další elektrostaticky aktivní komplexy s různými hodnotami pl [3, 13, 30]. Nicméně alespoň v případě prvního diferenciálního nefelometrického titračního píku, který odpovídá komplexům bílkovin a polysacharidů v pásmu 100 a více kDa se rozpustnost resp. hodnota odpovídajícího prahu srážení mění v soulase s teorií, tj. prochází minimem v okolí izoelektrického bodu, jak potvrzují výsledky ukázané na obr. 12. Obr. 12 rovněž ukazuje, že se izoe-

lektrický bod těchto nejtěžších a nejsráživějších komplexů nachází v blízkosti přirozeného pH piva a proto zůstávají v pivo rozpustěny.

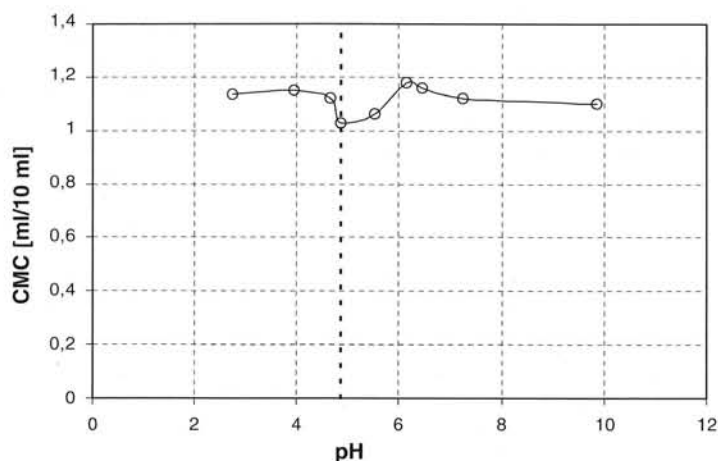
4 MOŽNOSTI APLIKACÍ

Metodu diferenciálních nefelometrických titrací je zvláště výhodné použít k přímé analýze pivovarsko-sladařských meziproduktů v procesu jejich technologických přeměn včetně kontroly sladařských surovin a technologií. To potvrzují výsledky našich nefelometrických titračních analýz rozpustnosti různých makromolekulárních komplexů ječných a sladových výluhů podobně jako analýzy sladin a mladiny připravených za různých technologických podmínek [33, 43].

K diferenciální nefelometrické titrační analýze piva a meziproduktů lze vedle síranu amonného použít i jiné titrany, specificky afinní resp. reagující s makromolekulárními komplexy extraktu či piva v jiných pásmech molekulárních hmotností a nebo pH. Kromě v pivovarsko-sladařské analytice známých precipi-

Tab. 1 Pásma molekulových hmotností stěžejních frakcí (převážně) bílkovinných komplexů piva

Pásma [kDa resp. kg per mol]			Reference
Frakce PLW	Frakce PMW	Frakce PHW	
< 15 (cca 2–20 %)	25–40 (cca 70–95 %)	> 100 (cca 3–4 %)	Pelzl et al. [32]
~ 9,7	~ 43	odfiltrována	Evans et al. [10]
10 (9,7 – nosič lipidů)	~ 40 (protein Z) ~ 20–170 mg/l	odfiltrována	Mills et al. [30]
8–18	~ 40	odfiltrována	Douma et al. [8]
10–12	~ 40	odfiltrována	Lusk et al. [28]
10–20	~ 40	110–250	Kano, Kanimura [25]
<15	~ 40	> 90	Hollemans, Tonies [15]
< 15	~ 40	90–100	Assano, Hashimoto [4]
< 15 (albuminy)	40 (albuminy)	75–150 (globuliny)	Grabar et al. [12]
< 17 (albuminy)	40 (hordeiny plus albuminy)	~ 95 (globuliny a „gelproteiny“)	Van der Berg et al. [43]



Obr. 12 Závislost rozpustnosti resp. hodnoty prahu srážení nasyceným roztokem síranu amonného makromolekulárních komplexů piva v pásmu největších molekulárních hmotností na pH

tantů bílkovinných komplexů (např. síran hořečnatý, molybdenan sodný nebo kyselina trichloroctová) to jsou ethanol a další organická srážedla. Mezi moderní specifická titrační činidla analýzy makromolekulárních komplexů piva patří roztoky polyelektrolýtů, ať už neutrálních, jako v práci studované roztoky PVP, nebo kladně či záporně nabitých iontových typů. Tyto titranty pak interagují s pivem analogicky jako iontové afinní chromatografické náplně [35].

5 ZÁVĚR

Pomocí nově vyvinuté metody diferenciálních nefelometrických titrací byly poprvé přímo pozorovány a analyzovány stěžejní makromolekulární komplexy piva z hlediska pásem molekulových hmotností porovnáním se stávajícími literárními údaji získanými převážně dělicími chromatografickými metodami.

Byly popsány zevrubně teoretické i praktické základy metody, přístrojové provedení, citlivost a rozlišovací schopnost, i postupy měření včetně vyjadřování a hodnocení naměřených dat.

Metoda byla podrobně prakticky ověřena pomocí modelových vodných roztoků vybraných bílkovin (BSA, gama-globulin, želatina) a PVP známých molekulových hmotností. Bylo prokázáno, že přinejmenším v případě diferenciálních nefelometrických titrací uvedených roztoků v oboru malých koncentrací ($\leq 10^{-3}$) nasyceným roztokem síranu amonného korelují pásy saturace diferenciálních nefelometrických charakteristik s pásy molekulových hmotností přítomných makromolekulárních komplexů v roztoku.

Zvláštní předností nově vyvinuté metody je, že umožňuje na základě rozpustnosti a specifických reakcí s vybranými titračními činidly při různých hodnotách pH přímou analýzu makromolekulárních komplexů piva a mezi produktů v závislosti na jejich technologickém zpracování bez nutnosti předběžné přípravy vzorků.

V neposlední řadě přináší diferenciální nefelometrická titrace nové experimentální poznatky o interakcích makromolekulárních komplexů v roztoku se síranem amonným, omezené dosud v pivovarské analytice pouze na tzv. síranový test.

Literatura

- [1] American Society of Brewing Chemists: Methods of analysis, 9th ed. Beer – 27, Physical stability. The Society, St. Paul, MN, 1992.
- [2] Analytica EBC: Brauerei und Getränke – Rundschau. Method 9.29, Haze in Beer: Calibration of Haze Meters. Method 9.30, Prediction of Shelf-Life of Beer. Verlag Hans Carl, 5th edition, 1997.
- [3] Arakawa, T., Timasheff, S. N.: Theory of protein solubility. *Methods Enzymol.* **114**, 1985, s. 49.
- [4] Asano, K., Hashimoto, N.: Isolation and characterization of foaming proteins of beer. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.* **23**, 1980, s. 1.
- [5] Bamforth, Ch. W.: Beer haze. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 1999, s. 81.
- [6] Batchvarov, V., Chapon, L.: Vorausbestimmung der Kolloiden Bierhaltbarkeit. *Monatschr. Brauwiss.* **38**, 1985, s. 331.
- [7] Djurtoft, R.: Fractionation of beer constituents by gel – filtration. *Proc. Eur. Brew. Conv. 8th Cong., Vienna*, 1961, s. 298.
- [8] Douma, A. C., Mocking-Bode, H. C. M., Kooijman, M., Orsel, R., Bekkers A. C. A. P. A., Angelino S. A. G. F.: Identification of foam-stabilizing proteins under condition of normal beer dispense and their bio-chemical and physico-chemical properties. *Proc. Eur. Brew. Conv. 26th Cong., Maastricht*, 1997, s. 671.
- [9] Drawert, F., Radola, B., Müller, W., Görg, A., Bedar, J.: Charakterisierung von Proteinen aus Gerst, Malz, Würze, Bier und Hefe mit der Hilfe der Dünnschicht-Isoelektrischen Fokussierung. *Proc. Eur. Brew. Conv. 14th Cong., Salzburg*, 1973, s. 463.
- [10] Evans, D. E., Hejgaard, J.: The impact of malt derived proteins on beer foam quality, Part I.: The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *J. Inst. Brew.* **105**, 1999, s. 159.
- [11] Fabelinskij, I. M.: Molecular scattering of light. Plenum Press, New York, 1968.
- [12] Grabar, P., Daussant, J., Enari, T. M., Nummi, M.: L'origine des troubles au froid. *Proc. Eur. Brew. Conv. 11th Cong., Madrid*, 1967, s. 379.
- [13] Green, A. A., Hughes, W. L.: Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic systems. *Methods Enzymol.* **1**, 1955, s. 67.
- [14] Hlaváček, F., Lhotský, A.: Pivovarství. SNTL – Tech. Lit. Publishing, Praha, 1966.
- [15] Hollemans, S. M., Tonies, A. R. J. M.: The role of specific proteins in beer foam. *Proc. Eur. Brew. Conv. 22nd Cong., Zurich*, 1989, s. 561.
- [16] Hough, J. S.: The biotechnology of malting and brewing. Second edition, Cambridge University Press, 1991.
- [17] Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 1: Fällung der Bierweiß Stoffe durch Tannine, *Monatschr. Brauwiss.* **48**, 1995, s. 300.
- [18] Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 2: P/T Wechselwirkung – Allgemeine, *Monatschr. Brauwiss.* **49**, 1996, s. 12.
- [19] Chapon, L.: Der Begriff Eiweißempfindlichkeit der Biere. Der heutige Stand der Forschung, Teil 3: Auswertungversuch, *Monatschr. Brauwiss.* **49**, 1996, s. 111.
- [20] Chapon, L.: Der Begriff Tannoide. *Monatschr. Brauwiss.* **46**, 1993, s. 263.
- [21] Chapon, L.: Nephelometry as a method for studying the relation between polyphe-nols and proteins. *J. Inst. Brew.* **99**, 1993, s. 49.
- [22] Chapon, L., Chemardin, M.: Etude sur le trouble au froid. *Proc. Eur. Brew. Conv. 11th Cong., Madrid*, 1967, s. 389.
- [23] Institute of Brewing Methods of Analyses: The Institute of Brewing, London, Jan. 1997
- [24] Jenkins, W. T.: Three solutions of the protein solubility problem. *Protein Science* **7**, 1998, s. 376.
- [25] Kano, Y., Kanimura, M.: Simple methods for determinations of the molecular weight distribution of beer proteins and their application to foam and haze studies. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**, 1993, s. 22.
- [26] Kerker, M.: The scattering of light and other electromagnetic radiation, Academic Press, New York – London, 1969.
- [27] Leitzement, M., Dodds, J. A., Leclerc, D., Lenoel, M., Moll, M.: Hydrodynamic chromatography. A method for submicron particle sizing applied to beverages. *Proc. Eur. Brew. Conv. 20th Cong., Helsinki*, 1985, s. 475.
- [28] Lusk, L. T., Goldstein, H., Ryder, D.: Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 1995, s. 93.
- [29] MEBAK: Brautechnische Analysen Methoden, Band II, 2.19 Trübungsneigung, 3. Aufgabe. Ed. H. Pfenninger, Selbstverlag der MEBAK, D-85350 Freizing-Weihenstephan, 1993, s. 155.
- [30] Mills, E. N. S., Kauffman, J. A., Morgan, M. R. A., Field, J. M., Hejgaard J., Prudlove M. O., Onishi A.: Immunological study of hydrophobic polypeptides in beer. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, s. 4475.
- [31] Nozaki, Y., Tanford, Ch.: Examination of titration behaviour, *Methods Enzymol.* **11**, 1967, s. 715.
- [32] Pelzl, B., Zanker, G., Natter, M., Huber, A.: Vergleichende Untersuchungen oligomerer und polymerer Bierschaumkomponenten, *Proc. Eur. Brew. Conv. 27th Cong., Cannes*, 1999, s. 149.
- [33] Rondelet, J., Lontie, R.: Le fractionnement continu des albumines et globulines de l'orge, *Proc. Eur. Brew. conv. 4th Cong., Nice*, 1953, s. 22.
- [34] Seymour, R. B., Carraher Jr., Ch. E.: Polymer Chemistry – An Introduction, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1981.
- [35] Schneider, G.: On line – Kontrolle der Wirkung von Bier – Stabilisierungs – Verfahren. *Brauwelt* **42**, 1995, s. 2089.
- [36] Sladký, P., Císařová, H.: A new method of objective measurement of beer tests with Ammonium Sulphate in usual chemical test tubes. *Kvasny Prum.* **45**, 1999, s. 156.
- [37] Sladký, P., Císařová, H., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Development of colloidal hazes in bottled pale lager beer during ageing. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 322.
- [38] Sladký, P., Dienstbier, M.: Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS, part 1. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 122.
- [39] Sladký, P., Dienstbier, M.: Improved procedures for complex monitoring beer colloidal stability by means of dual angle turbidimetric and titration system DATTS, part 2. *Kvasny Prum.* **47**, 2001, s. 195.
- [40] Sladký, P., Dienstbier, M.: Modular turbidimetry for the practical education in brewing and beverage industry, part 1. *Kvasny Prum.* **46**, 2000, s. 280.