

Ke stanovení zbytkového cukru v melasových lihovarech

MILAN ROSA a KAREL ANTONY,
Výzkumný ústav kvasného průmyslu

Jedním z faktorů ovlivňujících výtěžnost alkoholu je stupeň prokvašení zápary, která nemá při destilaci obsahovat žádný zkvasitelný cukr.

V našich závodech se zbytkový cukr v prokvašených melasových záparách stanoví metodami, založenými na schopnosti aldehydických a ketonických skupin cukrů redukovat alkalický roztok síranu měďnatého na kyslíčnick měďný. Při metodě Bertrandově [1] se množství mědi ve vyredukovaném Cu_2O stanoví vážkově nebo titračně. Metoda kapičková [2] a doporučovaná metoda Obergarda, Ljubina a Šuljatikové [3], stejného principu, se liší tím, že alkalický komplex měďnatý se titruje analysovaným cukerným roztokem do vyloučení veškeré mědi. Při některých provozních pokusech Výzkumného ústavu kvasného průmyslu byl zbytkový cukr v prokvašené melasové zápaře stanovován upravenou metodou Somogyiho [4], jejímž základem je též redukce měďnaté soli v alkalickém prostředí na sůl měďnou, která s přítomným jodidem draselným reaguje v těžce rozpustný jodid měďnatý. Tato jodometrická modifikace se doporučuje pro sériová stanovení.

Sacharosa obsažená v melase se štěpí kvasničnou invertázou ve zkvasitelnou glukosu a fruktosu, trisacharid rafinosa ve fruktosu a melibiosu. Disacharid melibiosu lihovarské typy kvasinek nezkašují a za dnešní technologie zůstává v zápaře jdoucí k destilaci. Způsoby jejího využití navrhované pro zvýšení výtěžku lihu nebyly u nás zavedeny [5, 6, 7].

Zmíněnými metodami lze stanovit přímo pouze glukosu, fruktosu a melibiosu. Rafinosa ani sacharosa neredukují alkalický komplex měďnatý a jsou stanovitelné teprve po kyselé hydrolyse. Tyto způsoby stanovení cukrů u prokva-

šené melasové zápary jsou zatíženy chybou. Jiné redukující látky obsažené v melase nebo vzniklé kvašením zvyšují stanovenou hodnotu zbytkového cukru. Kolísání množství nezkašeného zbytku při výrobě melasového lihu stanoveného některou z metod, nemusí být ukazatelem různé hloubky prokvašení, ale může být způsobeno nestejným obsahem rafinosy zpracovávané melasy, necukerných redukčních látek nebo druhem a množstvím bakterií infikujících kvasný proces, neboť některé asimilují melibiosu [8].

Cholettová a Caldemaisous sledovali během kampaně vývoj rafinosy v záparách melasového lihovaru spojeného s řepným cukrovarem [9]. Lihovar zpracovával melasu přímo jak vycházela z výroby cukru. Roční období i klimatické poměry měly vliv na obsah nezkašitelného zbytku. Navrhují tento postup stanovení zbytkového cukru:

1. Stanovení redukčních látek metodou podle Bertranda přímo v zápaře — R_1 . V této hodnotě mohou být zahrnuty glukosa, fruktosa, melibiosa a necukerné redukční látky.

2. Po přidání preparátu kvasničné invertázy získaného autolysou pekařských kvasnic stanoví se podle Bertranda redukční mohutnost R_2 . Je-li $R_2 = R_1$, nenachází se v prostředí ani sacharosa ani rafinosa. Je-li $R_2 > R_1$, rozdíl hodnot představuje množství cukrů, jež byly hydrolysovány invertázou.

3. Po účinku invertázy přidá se autolysát ze spodních pivovarských kvasnic obsahující alfa-galaktosidázu. Tato štěpí melibiosu v obě její redukující komponenty a stanoví se znovu redukční mohutnost R'_2 .

Z rozdílu $R'_2 - R_2$ se podle autorů vypočte množství rafinosy odpovídající této melibiose. Cholettová dále uvádí: „Využívajíce enzymových hydrolyz ke stanovení

skutečného zbytku, odpovídajícího polysacharidům existujícím v záparách, jsme jisti, že jsme určovali výhradně cukry skutečné a zkvasitelné. Kdyby kromě polysacharidů bylo přítomno něco nezkašených hexos, tyto by unikly našemu hodnocení. Avšak přítomnost těchto přímo zkvasitelných cukrů v takovém prostředí je málo pravděpodobná."

V citované práci nejsou uvedena množství přidávaných enzymatických preparátů ani doba potřebná k jejich působení. Enzymatické štěpení není reakcí okamžitou [10]. Též může nastat odkvašení zplodin hydrolysy.

V následující práci je řešena otázka, které cukry mohou tvořit zkvasitelný zbytek v nedostatečně prokvašené melasové zápaře při výrobě lihu a uveden jiný způsob stanovení zbytkového cukru.

Metodika

Cukry se stanovily známými způsoby podle Bertranda, Obergarda-Ljubina-Šuljatikové, Somogyiho a metodou kapičkovou.

Čeření vzorků. K 50 ml zápaře ve 100 ml odměrce se přidá 10 ml nasyceného roztoku octanu olovnatého a po rozmíchání 10 ml roztoku $3g K_2C_2O_4 + 7g Na_2HPO_4/1000 ml$. Po doplnění vodou po značku se filtruje suchým filtrem.

Stanovení fruktosy podle Jackson a Mathewse [11].

Měďnaté činidlo: 250 g bezvodého K_2CO_3 se rozpustí asi v 700 ml horké vody, přidá se 100 g $KHCO_3$ a míchá do úplného rozpuštění. Ochladí se a za velmi intenzivního míchání se přidá roztok $25,3 g CuSO_4 \cdot 5H_2O$ rozpuštěného ve 100 až 150 ml vody. Doplní se na 1000 ml a filtruje.

Stanovení: Do Erlenmeyerovy baňky obsahu 150 ml se odměří 50 ml měďnatého činidla a přidá se takové množství analyzovaného roztoku, aby neobsahoval více než 92 mg fruktosy. Přidá se vody do celkového objemu 70 ml. Baňka se ponoří na 75 minut do vodní lázně teplé $55 \pm 0,1^\circ C$. V intervalech 10 až 15 minut se obsahem baněk krouživě zamíchá.

Vyredukovaný Cu_2O se dekantuje přes Goochův kelímeček a další postup je shodný s metodou Bertrandovou.

Množství fruktosy odpovídající vyredukované mědi:

Cu	Fruktosa	Cu	Fruktosa	Cu	Fruktosa
5	2,5	70	22,5	200	57,9
10	4,5	80	25,4	210	60,6
15	6,2	90	28,1	220	63,3
20	7,9	100	30,9	230	66,4
25	9,5	110	33,7	240	69,4
30	11,0	120	36,5	250	72,5
35	12,5	130	39,3	260	75,7
40	13,9	140	42,0	270	79,0
45	15,4	150	44,7	280	82,4
50	16,8	160	47,4	290	85,9
55	18,3	170	50,0	300	89,5
60	19,7	180	52,6	310	93,2
65	21,2	190	55,2		

Vyjádřeno v miligramech. Linární interpolací se získávají správné výsledky.

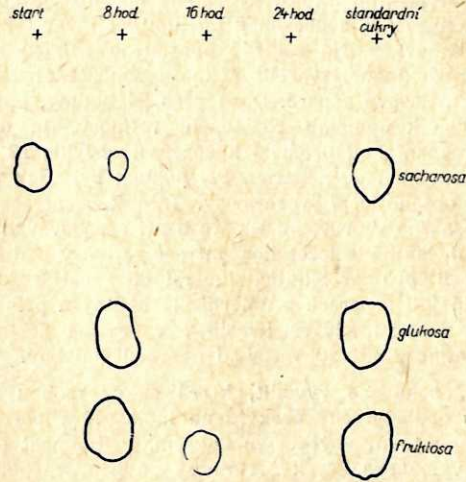
Tabulka 1.

Rychlost inverze a odkvašování jednotlivých cukrů bylo sledováno běžnou metodou sestupné rozdělovací chromatografie na papíře.

Pokusná část

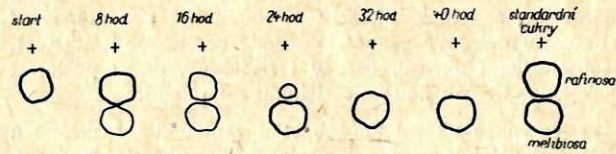
Pro stanovení rychlosti inverze sacharosy a rafinosy byl připraven substrát s výluhem sladových klíčků, do jehož jedné části bylo dáno 1 % sacharosy a do druhé 1 % ra-

finosy. Lihovarská kvasinka LK 4 se předkultivovala na melasovém mediu, odstředila a promyla fyziologickým roztokem. Suspensí ve vodě byly zakvašeny oba substráty a průběh inverze i kvašení se sledoval chromatograficky ve vzorcích odebíraných v intervalech osmi hodin.



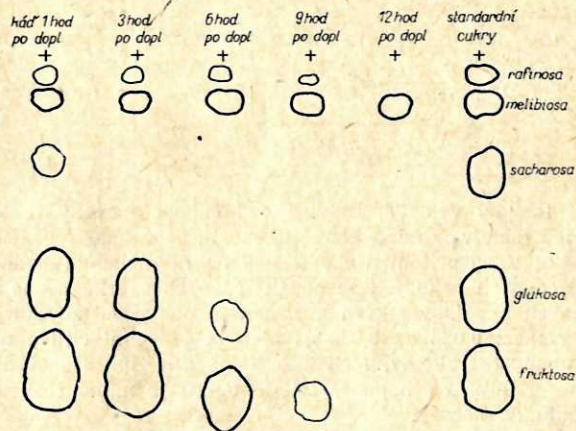
Obr. 1

Chromatogram (obr. 1) zachycuje průběh inverze sacharosy, chromatogram (obr. 2) rafinosy. Štěpení sacharosy je velmi rychlé, 8 hodin po zakvašení je vidět na chromatogramu jen nepatrné množství tohoto cukru, zatím co produkty inverze, glukosa a fruktosa jsou přítomny ve značných množstvích. Po dalších 8 hodinách sacharosa ze



Obr. 2

substrátu vymizela, glukosa byla již zkašena, a tedy 16 hodin po zakvašení byla přítomna pouze fruktosa, která kvasí hůře než druhá část invertu, glukosa. Absolutní rychlost inverze sacharosy bude záviset na množství kvasinek v zápaře, ale bude rychlejší než odkvašování produktů tohoto štěpení. Z uvedeného je zřejmé, že sacharosa nemůže tvořit součást zbytkového cukru ke konci kvašení melasové zápaře. To je potvrzeno i chromatogramem (obr. 3), ve kterém je zaznamenán průběh kvašení provozní kádě po jejím doplnění sladkou záparou.



Obr. 3

Postup hydrolysy zaznamenaný v chromatogramu (obr. 2) ukazuje pomalejší průběh enzymové reakce. Ještě 24 hodiny po zakvašení je patrné malé množství rafinosy vedle silné skvrny melibiosy. Po dalších osmi hodinách nebyla již rafinosa v substrátu přítomna. Zkvasitelný produkt štěpení, fruktosa, nebyla na chromatogramu zachycena, neboť je současně s postupující inverzí kvasinkami asimilována. Na základě popsaného pokusu je ne snadno rozhodnout, tvoří-li rafinosa součást zbytkového cukru v melasové zápaře. Doba přes 24 hodiny, potřebná při pokusu k úplnému rozštěpení rafinosy, je dlouhá, neboť provozní kád' přichází k separaci obvykle 12 hodin po doplnění sladkou záparou. Při pokusu byl však použit substrát obsahující 1 % rafinosy. Těto koncentrace bude těžko dosaženo v provozní zápaře a při zpracovávání normálních melas bude ležet koncentrace rafinosy pod 0,5 %. Počítáme-li pro probíhající inverzi od začátku kvašení v kád' do její separace průměrně 24 hodiny a přihlídneme-li k silnému zásevu kvasinek v kvasící zápaře, je výskyt rafinosy při dokvašování nepravděpodobný.

Z uvedeného lze vyvodit, které cukry mohou tvořit zbytek v nedostatečně prokvašené melasové zápaře. Melibiosa je nutným zbytkovým cukrem. Přítomnost sacharosy je vyloučena. Výskyt rafinosy je nepravděpodobný. Ze štěpných produktů sacharosy glukosa ze substrátu vymizí dříve než druhá komponenta fruktosa, která při dokvašování bude přítomna.

Stanovením obsahu fruktosy v prokvašené melasové zápaře by byla získána hodnota odpovídající zbytku průměrně měnitelnému v alkohol. Rychlá kolorimetrická metoda podle Graye [12] i metoda podle Englise a Milese [13], které dávaly velmi dobré výsledky v čistých cukerných roztocích, se však ukázaly nepoužitelné pro stanovení fruktosy v melasové zápaře. Dokonale prokvašený substrát, neobsahující fruktosu, čerňený i nečerňený, dával pozitivní reakci uvedenými kolorimetrickými metodami.

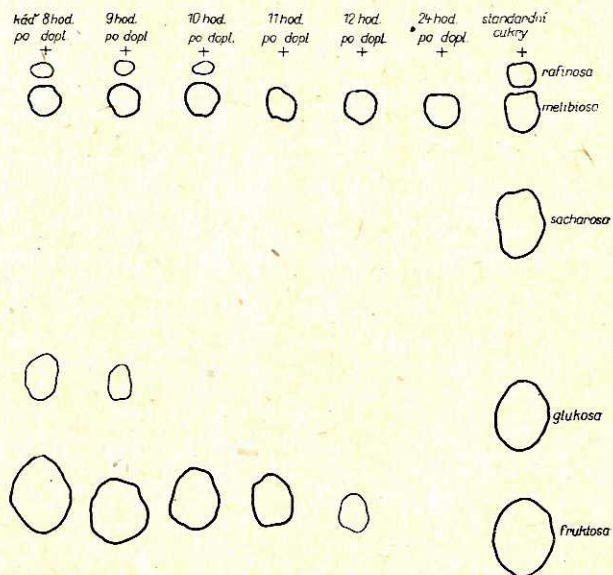
Vhodným se ukázal způsob stanovení podle Jacksona a Mathewse. V kvasném pokuse byla kvasinkami LK 4 zakvašena melasová zápara hustoty 18° Bg a pH 5,5. Po čtyřech dnech kultivace při 30° C, kdy v substrátu byla chromatograficky dokázána pouze melibiosa, byl zbytkový cukr stanoven uvedenými metodami. Výsledky jsou v tab. II.

Metoda	Cukr v %
Bertrandova	0,27
OLŠ	0,32
kapičková	0,25
Somogyiho	0,25
Jackson-Mathewse	0,05

Tabulka II.

Z tabulky vyplývá, že zbytkový cukr stanovený touto metodou nejvíce odpovídá skutečnosti, že v analysovaném vzorku nebyl přítomen zkvasitelný cukr. V několika shodně provedených pokusech za použití různých vzorků melas a různých ras lihovarských kvasinek se pohyboval zbytkový cukr mezi 0,025 až 0,035 %. Metoda je velmi citlivá na přítomnost fruktosy. Melibiosa nemá vliv na stanovení, neboť redukční schopnost tohoto cukru je mimo reakční podmínky metody.

V jednom z našich průmyslových lihovarů byly sledovány provozní kád' při dokvašování. Poslední čtyři



Obr. 4

hodiny před separací byl v hodinových intervalech stanovován cukr metodou podle Bertranda a podle Jackson-Mathewse za současného kvalitativního chromatografického rozboru. V tab. III. jsou uvedeny zjištěné hodnoty.

Vzorek	Cukr v %		Rozdíl obou stanov.
	Bertrand	Jackson-Math.	
8 hod. po doplnění kádě	1,12	0,88	0,24
9 hod. po doplnění kádě	0,78	0,58	0,20
10 hod. po doplnění kádě	0,66	0,41	0,25
11 hod. po doplnění kádě	0,54	0,29	0,25
12 hod. po doplnění kádě separace	0,42	0,18	0,24
Po dalším stání 12 hod. při laboratorní teplotě	0,35	0,10	0,25

Tabulka III.

Z tabulky vyplývá, že rozdíl obou stanovení se udržuje téměř konstantní a hodnotou odpovídá rozdílům zjišťovaným při laboratorních pokusech. Zbytkový cukr stanovený metodou Jacksonovou a Mathewsovou při počátku separace 0,18 % je vyšší než byl zjišťován v laboratorně prokvašených záparách. Jak je zřejmé z chromatogramu (obr. 4), kde byly naneseny vzorky, jejichž analýzy jsou uvedeny v tab. III, obsahovala zápara při separaci fruktosu. Vzorek odebraný z kádě při začátku odstředování kvasnic byl ponechán dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Chromatograficky nebyl zjištěn žádný zkvasitelný cukr. Stanovením podle Jacksona a Mathewse byl zjištěn zbytkový cukr 0,10 %. Kvasné pokusy, které vykazovaly téměř nulové zbytkové cukry, byly ponechány čtyři dny v termostatu při 30° C, kdy kvasinky byly již usazeny na dně baněk. Přesto vzorek z jiného našeho průmyslového lihovaru odebraný před separací, který byl ponechán ještě dva dny při 30° C vykázal zbytkový cukr 0,095 %.

Rozdíl zjištěný mezi kvasnými pokusy a provozními prokvašenými záparami lze vysvětlit rozdílnými podmínkami kvašení. (Hustota zápar, zásev kvasinek a jejich vrácení se zbytky prokvašené zápary, kyselá lázeň apod.)

Hodnota 0,10 % se zdá stálá pro dokonale prokvašenou provozní záparu. Bylo by nutno prověřit, nestoupá-li opakovaným znovupoužitím kvasinek. Tak hlubokého prokvasu nelze však v provozu dosáhnout, neboť je nutno získat separací dostatečné množství kvasnic pro další kvašení, tj. oddělit je pokud jsou ještě v emulsi, před jejich usazováním. Zjištění potvrzuje vhodnost úpravy způsobu výroby lihu s vrácením kvasnic zařazením druhé sběrné kádě [14].

Závěr

Při dokvašování melasových zápar posledním dokvašujícím cukrem je fruktosa. Druhá komponenta sacharosy, glukosa, by mohla být přítomna v záparách, jejichž zbytkové cukry stanovené některou obvyklou redukční metodou by byly vyšší než 0,7 %. Sacharosa tvoří součást zbytkového cukru, neboť její inverze je rychlejší než kvašení produktů hydrolysy. Výskyt rafinosy ve zkvasitelném zbytku je nepravděpodobný.

Zbytkový cukr stanovený metodami podle Bertranda, OLŠ, Somogyiho i metodou kapičkovou neodpovídá skutečnosti. Melibiosa tvoří pouze podíl v takto stanoveném zbytku. Podle našich pokusů připadá na melibiosu při zbytkovém cukru cca 0,30 % asi polovina redukční moci prokvašené zápary.

Přepočtením normálního zbytkového cukru (0,3 až 0,4 % glukosy) na rafinosu, vychází její obsah v zápare asi 0,9 až 1,2 %. Při čtyřnásobném ředění melasy pro kvašení by

Выводы

При дображивании меласовых заторов последним дображиваемым сахаром является фруктоза. Вторая составная часть сахарозы, глюкоза, могла бы присутствовать в заторах, у которых бы остающееся количество сахара определенное одним из общеприменяемых редуцирующих методов превышало 0,7 %. Сахароза не является составной частью остающихся сахаров, так как ее инверзия протекает быстрее чем брожение продуктов гидролиза. Присутствие рафинозы в сбраживаемом остатке неправдоподобно.

Остающийся сахар определенный методом Бертрама, ОЛШ, Самоли и капельным методом не отвечает действительности. Мелибиоза составляет лишь часть таким образом найденного остатка. Наши исследования показали, что при содержании остающихся сахаров около 0,30 % мелибиозе принадлежит около половины редуцирующей силы сброженного затора.

Пересчетом обычного остающегося сахара (0,3 до 0,4 % глюкозы) на рафинозу получается ее содержание в заторе около 0,9 до 1,2 %. При четырехкратном разрежении меласы для брожения обычным остающимся сахаром отвечало бы аномально большое количество рафинозы в меласе 3,6 — 4,8 %.

Если количество остающегося сахара, найденное одним из применяемых методов, считается числом показывающим состояние затора при сепарации, то колеблющееся количество мелибиозы делает это число ненадежным. Этой погрешности нет у метода по Джексону и Матьюсу.

Методом предлагаемым Холевтовой можно определить первоначальную и остающуюся рафинозу. Присутствие моносахаридов этим затруднительным методом не определяется.

Если проба отобраная из бродильного чана содержащая сбраживаемые сахара не подвергается немедленно аналитической обработке, их сбраживание продолжается действием дрожжей и энзимов. Определение произведенное по истечении нескольких часового периода стояния пробы не показывает состояние затора при сепарации. Задача уксуснокислого свинца для предварительного осветления (10 мл насыщенного раствора на 50 мл пробы) брожение не останавливает.

Zusammenfassung

Bei der Nachgärung der Melasemaischen ist die Fruktose der letzte nachgärende Zucker. Die zweite Saccharose-Komponente, die Glukose, könnte in Maischen

normálním zbytkovým cukrům odpovídalo abnormální množství rafinosy v melase 3,6 až 4,8 %.

Je-li hodnota zbytkového cukru stanovená některou užívanou metodou považována za číslo udávající stav zápary při separaci, pak kolísající množství melibiosy činí toto číslo nespolehlivým. Touto chybou není zatížena metoda podle Jacksona a Mathewse.

Způsobem navrhovaným Cholettovou lze stanovit rafinosu původní i po př. zbytkovou. Přítomnost monosacharidů se touto pracovní metodou nestanoví.

Obsahuje-li vzorek odebraný z kvasné kádě zkvasitelné cukry a není-li ihned analyticky zpracován, pokračuje jejich zkvašování činností kvasinek a enzymů. Stanovení po několikahodinovém stání vzorku nevyjadřuje stav zápary při separaci. Přídavek octanu olovnatého k předčření (10 ml nasyceného roztoku na 50 ml vzorku) kvašení nezastaví.

Literatura

- [1] BERTRAND G.: Bull. a soc. chim. 35 (1906) 1285.
- [2] Jednotná lihovarská metodika 1945.
- [3] SYHOROVÁ V., ŠTROS F., KARASOVÁ V.: Kvasný prům. 3 (1957) 15.
- [4] SOMOGYI M.: J. Biol. Chem. 117 (1937) 15.
- [5] JÖRGENSEN H.: Franc. pat. č. 971.130 (12. 6. 1951).
- [6] CHOLETT M., RUTTEN J.: Ind. Agr. Alim. 1 (1952) 2.
- [7] DYR J., KRUMPHANZL V.: Kvasný prům. 1 (1955) 181.
- [8] ZVÁČEK O., BARTA J., VINTIKA J.: Cs. mikrobiol. 2 (1957).
- [9] CHOLETT M., CALDEMAISOUS TH.: Ind. Agr. Alim., 68 (1951) 9/10.
- [10] ROSA M., BARTA J.: Ind. Agr. Alim. 74 (1957) 12.
- [11] Official and Tentative Methods of Analysis, AOAC 1945.
- [12] GRAY D. J. S.: Analyst 75 (1950) 314.
- [13] ENGLIS D. T., MILES J. W.: Analyt. Chem. 21 (1949) 538.
- [14] BARTA J., ROSA M.: Kvasný prům. 3, (1957) 58.

anwesend sein, derer mittels einer der üblichen Reduktionsmethoden bestimmte Restzucker höher als 0,7 % wäre. Die Saccharose ist in dem Restzucker nicht enthalten, denn ihre Inversion erfolgt schneller als die Gärung der Hydrolyse-Produkte. Das Vorkommen von Raffinose in dem vergärbaren Rest ist unwahrscheinlich.

Der Restzucker, bestimmt mittels der Methoden nach Bertrand, nach Obergard Ljubina Schuljatik, nach Somogyi und der Tröpfchenmethode, entspricht nicht der Wirklichkeit. Die Melibiose bildet nur einen Anteil des so bestimmten Restes. Gemäß unserer Versuche entfällt auf die Melibiose bei dem Restzucker cca 0,30 % ungefähr die Hälfte des Reduktionsvermögens der vergärten Maische.

Durch Umrechnung des normalen Restzuckers (0,3 bis 0,4 % Glukose) auf Raffinose erhalten wir den Raffinosegehalt der Maische cca 0,9 bis 1,2 %. Bei vierfacher Verdünnung der Melasse für die Gärung würde dem normalen Restzucker ein abnormales Quantum Raffinose in der Melasse von 3,6 bis 4,8 % entsprechen.

Wenn wir den mittels einer der üblichen Methoden bestimmten Restzuckerwert für die Zahl halten, welche den Zustand der Maische während der Separation angibt, der Restzucker. Zur Bestimmung der Anwesenheit von daß diese Zahl unverlässlich ist. Die Methode nach Jackson und Mathews ist mit diesem Fehler nicht behaftet.

Das von Cholette vorgeschlagene Verfahren ermöglicht die Bestimmung der ursprünglichen Raffinose und auch dann verursacht das schwankende Melibiose-Quantum, Monosacchariden wird diese langwierige Methode nicht benützt.

Wenn die aus dem Gärgefäß genommene Probe vergärbare Zucker enthält und wenn sie nicht gleich nach der Probenahme analytisch verarbeitet wird, setzt ihre Vergärung durch Hefen und Enzyme fort. Die Bestimmung nach mehrstündigem Stehenlassen der Probe bringt den Zustand der Maische während der Separation nicht zum Ausdruck. Die Zugabe von Bleiacetat zum Vorklären (10 ml gesättigter Lösung auf 50 ml Probe) hält die Gärung nicht auf.