

Pivovarství a sladařství

Metodika stanovení bílkovin v ječmenu

Dr. ALICE DOLEŽALOVÁ - PhMr. HANA VRTĚLOVÁ, VÚPS pracoviště Brno

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Metodika stanovení bílkovin je velmi rozličná a postupy stanovení lze seřadit od náročných po jednoduché. Podobně lze používanou přístrojovou techniku rozdělit na cenově únosnou a přístroje vhodné pro speciální ústavy, protože jejich finanční náklady jsou vysoké. Spojení čtyř základních požadavků, tj. přesnosti, rychlosti, jednoduchosti a nízkých finančních nákladů je prakticky nemožné. Vzhledem k tomu, že metodika musí sloužit pro příjem ječmene ve sladovnách, popř. výkupcech a že stanovená hodnota má být ukazatelem ceny a především ukazatelem kvality, zaměřili jsme se na přesnost. Naším požadavkem byla chyba $\pm 0,3\%$ bílkovin. Od tohoto požadavku nebylo možno ustoupit vzhledem k tomu, že $0,5\%$ bílkovin již značně ovlivní kvalitu ječmene. Dále to byla otázka ceny přístroje nebo zařízení. Přesto, že jsme zkoušeli i zahraniční aparát, vycházel jsme z požadavku tuzemské výroby. Přístroje z dovozu předpokládají vysoké náklady na vybavení všech laboratoří. Rychlosť a jednoduchost jsme byli nutni přizpůsobit jmenovaným požadavkům.

Na základě rešerše jsme vybrali ty metody, které odpovídaly těmto požadavkům:

- a — přesnost $\pm 0,3\%$,
- b — cena asi 10 000 Kčs,
- c — doba stanovení asi 1 hodina,
- d — obsluha přístroje včetně přípravy roztoků — laborantka.

Metody jsme rozdělili takto:

1. metody vycházející z mineralizace,
2. metoda Kunitake-Kobayashi,
3. kolorimetrické stanovení bílkovin.

Pro všechny zkoušky jsme otestovali 12 vzorků ječmennu, u kterých jsme stanovili bílkoviny Kjeldahlovou metodou a ty jsme potom používali, kromě jiných vzorků, jako standard.

1. Metody vycházející z mineralizace

Jde prakticky o mineralizaci, vytěsnění amoniaku a jeho titraci. Vzhledem k tomu, že tato metodika je stále nejpoužívanější a je metodou základní, zakotvenou v analytických normách pro stanovení dusíku, vrací se k ní stále noví pracovníci a upravují především rychlosť stanovení. Za nejdůležitější pokládají rychlosť spalování, která časově podstatně ovlivňuje celkovou dobu stanovení. Vyzkoušeli jsme tyto přístroje:

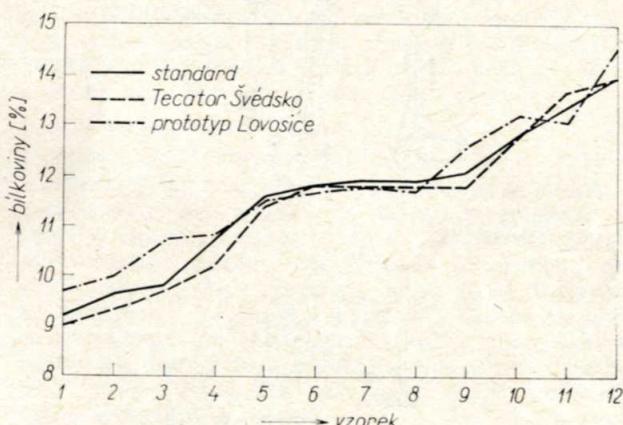
- a — Tecator — Švédsko,
- b — prototyp ZNZP-Lovosice.

a) Tecator AB

Abychom mohli porovnat přesnost nového přístroje navrhovaného ZNZP-Lovosice, provedli jsme orientační měření na přístroji Tecator AB švédské výroby, který je

založen na též principu a běžně používán v krmivářských laboratořích.

Spalovalo se ve spalovacím bloku ve speciálních skleněných patronách při teplotě 380°C . Doba spalování v předešlém vyhřátém bloku trvala 20 minut. Vyhřívání lze nastavit automatem na určitou dobu, takže před nástupem směny je přístroj vyhřátý. Po částečném ochlazení (15 až 20 min) se roztok přepláchné do destilačního přístroje typu Parnas-Wagner. Destilace trvá 5 min a amoniak se stanoví titračně. Spalovací blok potřebuje digestoř nebo odtah pro unikající spalinu. Doba stanovení asi 1 hodina. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu 1.



Obr. 1. Porovnání TECATORU a prototypu LOVOSICE

Výhody: dobrá shoda s Kjeldahlovou metodou, rychlé spalování, nepatrná rozbitnost spalovacích patron, rychlá a přesná destilace.

Nevýhody: dovoz Švédsko, vysoká cena, nutnost digestoře, nutnost přeplachování — zvyšuje chybu stanovení.

b) Prototyp ZNZP-Lovosice

Na též principu sestavili pracovníci ZNZP Lovosice Vávra a Remeš přístroj na stanovení bílkovin. Spalovací blok pro mineralizaci má 12 míst. Vyhřívání zajišťuje elektrický vařič, který může být při poruše snadno vyměněn. Teplota se reguluje Zepafotem — Nová Paka.

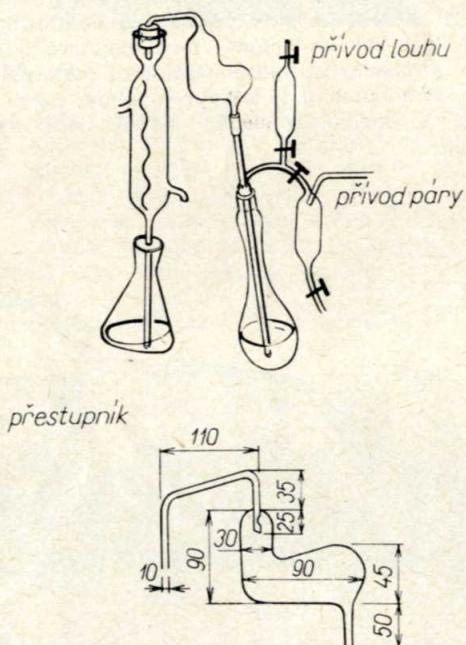
Na uvedeném přístroji jsme stanovili bílkoviny v 10 vzorcích. Doba spalování 20 až 25 min, doba destilace 5 min, celková doba stanovení asi 1 hodina. Výsledky a rozdíly od bílkoviny stanovené Kjeldahlem jsou v gra-

fu 1. Mineralizace probíhá velmi dobře a oba přístroje jsou co do pracovní kvality shodné.

Výhody: velmi dobrá shoda s Kjeldahlem,
rychlé spalování,
rychlá a přesná destilace,
výroba ČSSR,
cena — 1 spalovací blok, 1 destilační přístroj
asi 8000 Kčs.

Nevýhody: nutnost digestoře nebo jiného odtahu,
nutnost přeplachování,
není dosud v prodeji.

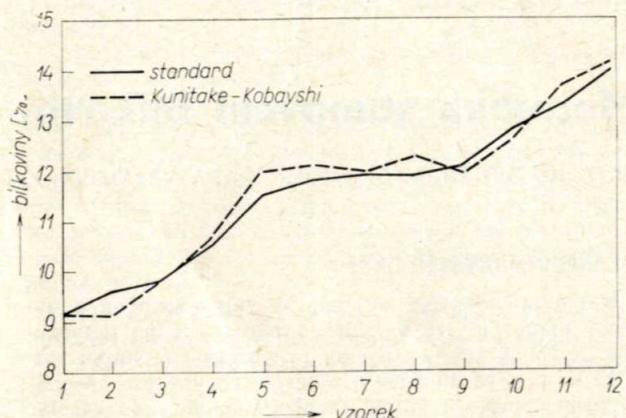
2. Metoda Kunitake-Kobayashi



Obr. 2. Destilační aparatura pro metodu Kunitake - Kobaishi

Pro destilaci je nutno použít nový typ přestupníku (obr. 2). Důležitá je destilace, její doba a vydestilovaný objem. Je třeba dodržet všechny podmínky, aby byly získány přesné a reprodukovatelné výsledky. Výsledky měření jsou uvedeny v obr. 3.

Nevýhody: nevhodné pro sériová stanovení.



Obr. 3. Porovnání s Kunitake - Kobayashi

3. Kolorimetrické stanovení bílkovin

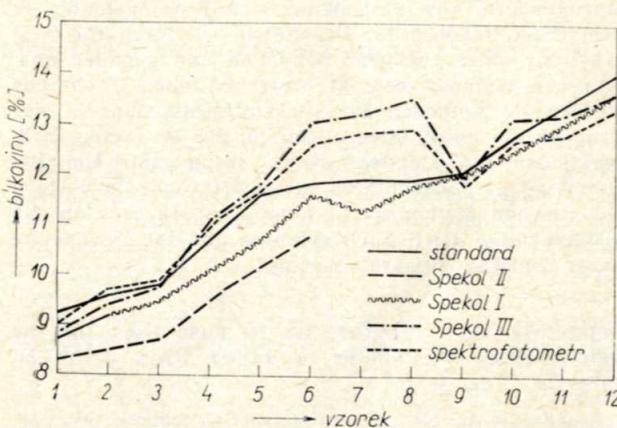
Vyzkoušeli jsme:

- a) metodu s oranží - G upravenou Kastnerem,
 b) stanovení Pro-metrem.

a) Metoda s oranží - G — Kastner

Chyba stanovení byla velmi rozdílná, někdy i větší než 1 %. Chybu ovlivňovala především jemnost mletí, která byla závislá na trvání mletí a typu kávomýlku. Pro jednotlivá stanovení se chyba zvyšovala mixací.

nost chyby daleko větší. Výsledky našich měření jsou uvedeny na obr. 4. Domníváme se, že pro podmínky výkupu je tato metoda zatížena příliš mnoha faktory, které je nutno dodržet, a proto ji pro tyto účely nepovažujeme za využitelnou. Rovněž po stránce finanční (mlýnek, mixér, fotokolorimetru) by vybavení laboratoře nebylo právě nejlevnější a vyžaduje odbornou pracovnici.



Obr. 4. Porovnání s G - oranží

b) Stanovení Pro-metrem

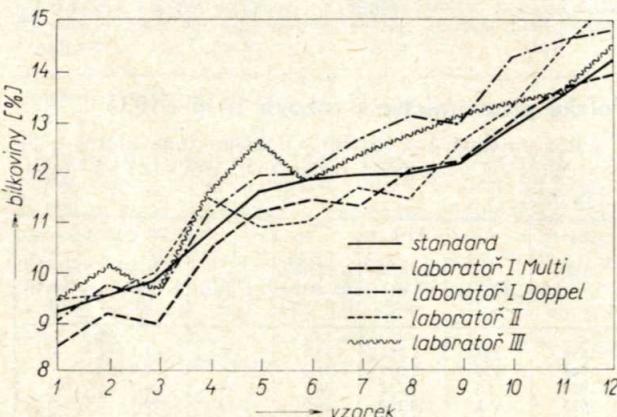
Pro-metry vyráběné dánskou firmou Foss-Elektric jsou u nás v provozu v některých sladařských a ječmenářských laboratořích. Provedli jsme proto porovnávací zkoušky na několika přístrojích. V poslední době byl dodán nově upravený přístroj s třepačkou na 60 vzorků, čímž byla odstraněna nevhodnost přístroje pro sériové analýzy. Jsou tedy dány dvě možnosti:

— 1 g vzorku reaguje se 40 ml oranže - G 6 min v reaktoru — Doppel Reaktor,

— 0,5 g vzorku reaguje se 20 ml oranže - G 60 min během třepání — Multi-Reaktor.

Při práci s Doppel-Reaktorem provede 1 pracovní síla 5 až 6 analýz za hodinu.

Negativní stránkou tohoto přístroje je otázka roztoku. Doba trvanlivosti je 6 měsíců, takže nelze objednat větší množství. Rovněž standardnost roztoku nebyla zajistěna; bylo nutno testovat každý roztok. Podle posledních informací firma nahradila roztoky krystalickou formou chemikálií.



Obr. 5. Porovnání s Pro-metrem

Pro naše zkoušky jsme vybrali tři laboratoře, kde se Pro-metr běžně používá.

Laboratoř I — pracovala se starým i novým typem Pro-metru, a to systému Multi i Doppel,

Laboratoř II — pracovala se starým typem,

Laboratoř III — pracovala se starým typem.

Všechny laboratoře pracovaly s roztokem oranže - G dodaným dánskou firmou, ale jeho záruční lhůta byla prošlá. K novému přístroji byl rovněž dodán roztok s prošlou lhůtou.

Na obr. 5 jsou zcela jasné výkyvy nejen od metody Kjeldahlové, ale především výkyvy ve stanovení na stejném přístroji mezi různými laboratořemi. I když roztoky byly prošlé, přesto rozdíl mezi laboratořemi v hodnotě 1 % je značně vysoký. Za velký přínos pokládáme systém Multi, který sice poskytuje poněkud nízké hodnoty, avšak v relaci s Kjeldahlovou metodou. Je docela možné, že prodloužená doba třepání by chybu snížila. Je třeba podotknout, že nový přístroj je tu krátkou dobu a po přezkoušení může být chyba upravena.

Výhody: rychlé stanovení Doppel 10 až 15 min, snadná obsluha, dobrá shoda výsledků Multi.

Nevýhody: Doppel — značná odchylka, Multi — délka stanovení, dovoz a cena 17 000 K dánských, zajištění roztoků.

Závěr

Obsah bílkovin v ječmenu je pro sladaře důležitý nejen z hlediska kvalitativního, ale i ekonomického. Vyšší obsah bílkovin zvyšuje náklady na výrobu bez kvalitativního efektu. Sladař tedy vyrábí s vyšší pracností zboží horší kvality.

Na základě rešerše, v níž byla sledována u jednotlivých metod doba stanovení, dostupnost přístroje, cena přístroje a přesnost metody, vybrali jsme metody, které vyuvovaly alespoň některým z uvedených požadavků. Ze všech našich zkoušek vyplývá, že pro účely okamžité kontroly ječmenů využívají dvě metody, a to

1. metoda Kunitake - Kobayashi,
2. přístroj ZNZP - Lovosice.

Metoda Kunitake - Kobayashi je jednoduchá, přesná a nenáročná na cenu aparatury i obsluhy. Po dohodě s jakoukoliv sklářskou dílnou bylo možno zajistit dostatečné množství aparatury pro vybavení provozních laboratoří. Bílkoviny jsou stanoveny za 30 minut. Odchylky od Kjeldahlové metody jsou nepatrné a metodu lze okamžitě realizovat pro stanovení bílkovin ve vykupovaných ječmenech. Metoda byla pokusně zavedena během letošního výkupu v několika provozech. Získané výsledky budou uveřejněny později.

Přístroj ZNZP - Lovosice je založen na zrychlení klasické Kjeldahlové metody, kde chyby stanovení jsou nepatrné. Nedostatkem je, že přístroje nejsou dosud ve výrobě a vyžadují by ještě částečnou úpravu, speciálně u odtahu spalin. Jsou dobré i pro sériová stanovení a pokládáme za velmi vhodné vybavit jimi laboratoře.

Zavedení stanovení bílkovin v ječmenu ve všech laboratořích usnadní sladařským pracovníkům nákup ječmenů, takže již předem budou vědět, s jakou surovinou budou pracovat. Kontrola obsahu bílkovin v nakupovaném zboží by měla přinutit pěstitele, aby se více věnovali agrotechnice a zároveň se zabránilo zvyšování obsahu bílkovin ve sladovnickém ječmenu.

Literatura

- [1] Prospektová literatura fy Foss-Electric, Dánsko
- [2] Prospektová literatura fy Tecator, Helsingborg, Švédsko
- [3] Prospektová literatura fy Technicon Controls, USA
- [4] Prospektová literatura fy Metrimex, Maďarsko
- [5] KUNITAKE, N. - KOBAYASHI, M., separát VÚ, Sapporo, Japonsko
- [6] STOWEL, K. C., EBC Proc., 1961, s. 450
- [7] SCHROGL, J., Kvas, prům. 19, 1973, č. 2, s. 48
- [8] PRUGAR, J., Studijní informace, 1967, č. 3
- [9] UDY, D. C., Anal. Chem., 28, 1956, s. 1380
- [10] UDY, D. C., Cer. Chem., 33, 1957, č. 2, s. 389
- [11] UDY, D. C., Cer. Chem., 31, 1954, č. 2, s. 369
- [12] KASTNER, J., Rostl. výroba, 11, 1965, č. 8, s. 889
- [13] SCHMIEDER, W., Rostl. výroba, 12, 1965, č. 5, s. 547
- [14] SCHMIEDER, W., Jenaer Rundschau, 1970/2, Zeiss, Jena

- [15] KIRSTEN, W. J., Anal. Chem., **29**, 1957, č. 7, s. 1084
- [16] Brauweitl, **110**, 1970, č. 31/32, s. 590
- [17] MACEK, H., Kvazný průmysl, **19**, 1973, č. 12, s. 276
- [18] Prospekt literatura fy CARLO ERBA, Milano, Itálie
- [19] ENARI, T. M. - NUMMI, M., Brauwiss., **13**, 1980, s. 91
- [20] UPATOVÁ, G. F. - ŽAŠKO, K. T., Ferment. i Spir. Prom., 1973, č. 2, s. 15
- [21] Food Engng., **39**, 1967, č. 7, s. 164
- [22] Food in Canada, **32**, 1972, č. 6
- [23] Food Engng. **44**, 1972, č. 5, s. 180

Doležalová, A. - Vrtělová, H.: Metodika stanovení bílkovin v ječmenu. Kvas. prům. **21**, 1975, č. 2, s. 31—34.

Vzhledem k tomu, že zvyšující se obsah bílkovin ve sladovnickém ječmenu je celosvětový problém, objevuje se snaha zařadit toto kritérium do normy. Zakotvení bílkoviny do ČSN je podmíněno vypracováním metody dostatečně rychlé a přesné. Na základě rešerše byly rozdeleny metody stanovení dusíku na čtyři skupiny: mineralizace materiálu, barevné reakce ječného výluhu, stanovení elementárního dusíku volumometricky a ostatní analytické metody. Ve všech skupinách byly sledovány postupy ke zrychlení spolu s použitím nových moderních přístrojů.

Долежалова, А. — Вртѣлова, Г.: Методика определения белков в ячмене. Квас. прум. **21**, 1975, № 2, стр. 31—34.

Ввиду того, что постепенное повышение содержания белков в пивоваренном ячмене имеет общемировой характер, наблюдается стремление включить соответствующий критерий в стандарты, применяемые для оценки качества ячменя. Предпосылкой включения такого показателя в чехословацкий государственный стандарт является разработка достаточно точного и требующего мало времени метода определения белков. Существующие методы определения азота подразделяются на четыре группы: в первую входят методы разработанные на принципе минерализации материала, во вторую методы, применяющие в качестве критерия вызываемый реакциями цвет экстракта ячменя, в третью волюметрические методы определения элементарного азота, а в четвертую все остальные аналитические методы. Показана возможность ускорения анализа посредством применения современных приборов.

Doležalová, A. - Vrtělová, H.: Die Methodik der Bestimmung der Eiweißstoffe in der Gerste. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 2, S. 31—34.

Aufgrund der Tatsache, dass der sich erhöhende Eiweißgehalt in der Braugerste im Weltausmass zu einem bedeutenden Problem geworden ist, werden Vorschläge geäussert, dieses Kriterium in den Standard einzugliedern. Die Festsetzung des Eiweißgehaltes in dem ČSSR-Standard für Braugerste ist durch die Ausarbeitung einer genügend schnellen und genauen analytischen Methode bedingt. Aufgrund einer Recherche wurden die Methoden der Stickstoffbestimmung in vier Gruppen eingeteilt: Mineralisierung des Materials, Faroreaktionen des Gerstenauszugs, volumometrische Bestimmung des elementaren Stickstoffs und die übrigen analytischen Methoden. In allen Gruppen wurden die Möglichkeiten der Schnellverfahren und der Anwendung neuer moderner Apparate verfolgt.

Doležalová, A. - Vrtělová, H.: Methods Used for the Determination of Proteins in Barley. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 2, pp. 31—34.

Practically in all countries growing barley the percentage of proteins present in malting barley is steadily rising and there is consequently a general tendency to include the protein content into criteria specified in binding standards applied to evaluate the quality of barley. Prior to incorporating the protein content criterion into an appropriate Czechoslovak National standard it is necessary to develop a reliable and time saving determination method. Methods used at present can be divided into 4 groups. In the first group are methods based on the mineralization of samples, in the second are methods relying on color reactions of barley extract, to the third group belong methods based on volumetric determination of elementary nitrogen and in the fourth group are all other analytic methods. The authors suggest a number of improvements which should be introduced into the existing technique, especially by using modern instruments.