

Příspěvek k rychlému stanovení bílkovin v ječmenu

Ing. JIŘÍ ŠROGL - Ing. VĚRA KLASOVÁ, Západočeské pivovary, n. p., Plzeň

V několika posledních letech se naše zemědělství pozoruhodně rozvíjí. Týká se to jak živočišné, tak i rostlinné výroby a tedy i pěstování sladovnického ječmene. Vysokých hektarových výnosů se dosahuje jednak odrůdovou skladbou, ale též silným hnojením ječmenů dusíkatými hnojivy. Tento jev je z pivovarského hlediska nesporně nepříznivý a má za následek snížení kvality sladů, vyráběných z některých partií ječmenů [1, 2].

Stanovení dusíkatých látek v ječmenu nepatří většinou v našich pivovarských laboratořích k běžným analýzám. Je to způsobeno tím, že laboratoře nebývají vybaveny dostatečně dimenzovaným zařízením na stanovení dusíku a též personální obsazení neumožňuje pravidelnou kontrolu obsahu dusíku v surovinách. Přitom má toto stanovení pro pivovarskou technologii základní význam.

Zvyšování nároků na kontrolu výroby je v poslední době všeobecným jevem. Je proto přirozené, že to má odraz ve vývoji analytických metod na stanovení dusíku a s tím souvisejících zařízení. Zajímavý přehled podává v tomto směru Doležalová a Vrtělová [3].

Ve své práci jsme se snažili vybrat takovou metodu stanovení bílkovin, která by dávala výsledky sloužící alespoň k orientačním posouzením partií ječmene. Přitom jsme vycházeli z předpokladu, že metoda musí být jednoduchá a časově nenáročná. Těmto požadavkům vyhovuje kolorimetrická extrakční metoda na stanovení bílkovin, kterou na základě biuretové reakce vyvinuli Johnson a Craney [4].

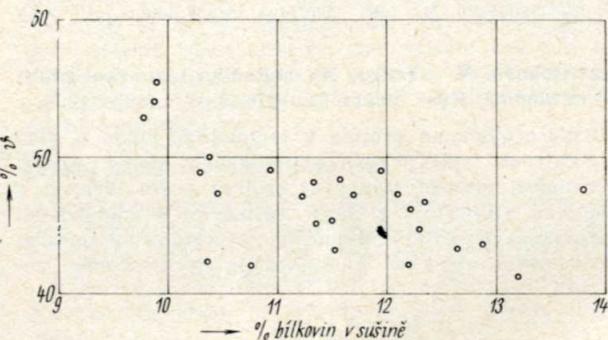
Popis původní metody

1. odebrat průměrný vzorek asi 50 g a rozemlít,
2. $1 \pm 0,01$ g průměrného vzorku navážit do 250 Erlenmayerovy baňky,
3. přidat 2 ml izopropylalkoholu do baňky a uzavřít,
4. přidat $1,0 \pm 0,1$ g práškového CuCO_3 ,
5. napipetovat 50 ml alkalického izopropylalkoholu do baňky a uzavřít,
6. intenzívě třepat na třepačce 15 minut,
7. nechat stát 15 minut (vznikne zbarvení biuretové reakce),
8. připravit filtrační zařízení,
9. reakční směs protřepat rukou a filtrovat čirý filtrát s použitím vakua (není-li filtrát čirý, filtruje se dva krátky), je zapotřebí 20 ml filtrátu (vakuum zrušit co nejdříve, aby se barevný roztok nekoncentroval odpařováním),
10. absorbanci filtrátu měřit při 550 nm a srovnat s kalibrační křivkou.

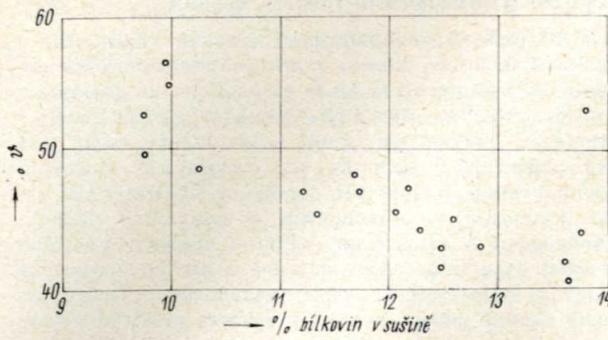
Při naší práci bylo nutno metodu poněkud modifikovat. Místo doporučovaného CuCO_3 jsme použili zásaditého uhličitanu měďnatého $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$ v ekvivalentním množství. Reakční směs jsme filtrovali přes skleněný filtrační kelímek G4 s přídavkem křemeliny.

Pro mletí vzorku ječmene jsme nejprve použili běžný kávomlýnek. Výsledek nebyl uspokojivý, rozptyl získaných hodnot byl velmi značný, takže nebylo možno získanými body proložit kalibrační křivku (graf 1).

Pro další sérii pokusů jsme vzorky mleli na laboratorním mlýnku KM4A, jehož efekt mletí je podstatně lepší a složení šrotu reprodukovatelnější než u kávomlýnku. Výsledky byly o něco příznivější, jak je patrné z grafu 2, stále však ne zcela uspokojivé.



Obr. 1



Obr. 2

Zdrojem chyb metody je mj. též použití vakuové filtrace. Nestejným odparem rozpuštěla se koncentruje barevný roztok a tím se zkreslují výsledky. K odstranění uvedeného nedostatku jsme filtrovali reakční směs tlakem CO_2 nebo N_2 přes nitrocelulózový membránový filtr SYNPOK 6.

Abychom vyloučili chyby, které mohou vzniknout subjektivními faktory při stanovení dusíku Kjeldahlovoou metodou, opatřili jsme vzorky ječmenů s obsahem dusíku ověřeným na několika pracovištích (dodalo nám pracoviště v Brně). Těchto vzorků jsme použili k sestavení kalibrační křivky.

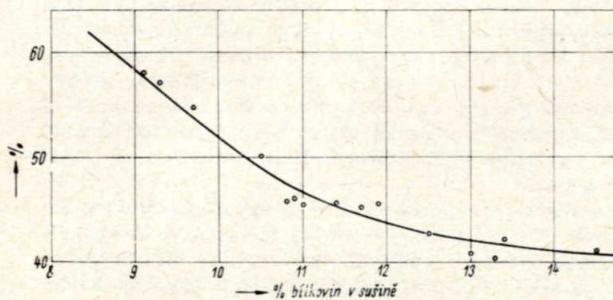
Přitom jsme použili pracovní postup, který se nám osvědčil nejlépe.

Přístroje

1. mlýnek,
2. analytické váhy,
3. třepačka,
4. kolorimetr,
5. Erlenmayerova baňka 250 ml se zábrusovou zátkou,
6. pipeta 50 ml,
7. tlakové zařízení na membránovou filtrace (provizorně lze použít i upraveného zařízení pro vakuovou membránovou filtrace).

Navrhovaný pracovní postup

1. odebrat průměrný vzorek a rozemlít,
2. usušit vzorek uzančním způsobem,
3. navážit $1 \pm 0,1$ g sušiny do 250 ml Erlenmayerovy baňky,
4. přidat 2 ml izopropylalkoholu do baňky,
5. přidat $0,9 \pm 0,1$ g práškového zásaditého uhličitanu měďnatého,
6. napipetovat 50 ml alkalického izopropylalkoholu do baňky a uzavřít,
7. intenzívne třepat na třepačce 15 minut,
8. nechat stát 15 minut,
9. připravit filtrační zařízení,
10. reakční směs protřepat a filtrovat tlakem CO_2 do zkumavky (je zapotřebí 10 ml filtrátu),
11. absorbanci filtrátu měřit při 550 nm a srovnávat s kalibrační křivkou.



Obr. 3

Výsledky jsou uvedeny v grafu 3.

Diskuse výsledků

Uvedená metoda je v navrhovaném provedení velmi jednoduchá a málo pracná. Její přesnost nedosahuje podle našich zkušeností přesnosti Kjeldahlové metody, může však sloužit pro orientační stanovení bílkovin v ječmeni. Výsledek je možno získat přibližně za 60 minut. Přesnost závisí silně na standardnosti a jemnosti mletí vzorku. Naše výsledky se neliší od výsledků Kjeldahlové metody více než 0,5 %. Při obsahu bílkovin v zrnu nad 13 % je metoda méně přesná.

Při naší práci jsme neměli k dispozici mlýnky, který by mlel ječmen ideálně pro extrakci, tj. na prášek. Podobné mlýnky jsou však na trhu dosti běžné a dodávají je např. firmy Tecator (jako příslušenství přístroje na stanovení dusíku), Retsch aj. Vzorek ječmeni se na těchto mlýncích rozemle velmi dokonale. Je nepochybně, že při použití takového mlýnku by byla extrakce bílkovin dokonalejší a výsledky přesnější.

Navrhovaný způsob používáme v laboratoři našeho národního podniku k běžné kontrole. V kampani 1974 jsme jím zkontovalo cca 150 partí ječmeni. Při tom jsme několikrát kontrolovalo tuto metodu klasickou Kjeldahlovou metodou a zjistili jsme poměrně dobrou shodu, výsledky se nikdy neliší více než o 0,5 %. Uvedený rozdíl byl zjištěn pouze jednou, jinak byla shoda s Kjeldahlovou metodou vždy příznivější.

Autoři děkují Dr. Pilátovi ze Šlechtitelské stanice v Hrubčicích na Hané za spolupráci, která jim velmi pomohla zvláště při výběru vhodné metody.

Literatura

- [1] DOLEŽALOVÁ A. - VRTĚLOVÁ H.: Kvasný průmysl, **20**, 1974, s. 244
- [2] DOLEŽALOVÁ A. - VRTĚLOVÁ H. - TRKAN M.: Kvasný průmysl, **19**, 1973, s. 3
- [3] DOLEŽALOVÁ A. - VRTĚLOVÁ H.: Kvasný průmysl, **21**, 1975, s. 6
- [4] JOHNSON R. M. - CRANEY C. E.: Cereal Chemistry **48**, 1971, s. 278

Šroglová, J. - Klasová, V.: Příspěvek k rychlému stanovení bílkovin v ječmeni. Kvas. prům. **21**, 1975, č. 6, s. 124 až 126.

Pro rychlé orientační stanovení obsahu bílkovin ječmeni se osvědčila extrakční kolorimetrická metoda na základě biuretové reakce. Přesnost metody závisí na standardnosti a jemnosti mletí vzorku.

Původní metoda podle Johnsona a Craneye se přizpůsobila našim podmínkám. Jako extrakční činidlo se osvědčil izopropylalkohol, místo uhličitanu měďnatého se použila zásaditá sůl. Vakuová filtrace byla nahrazena tlakovou membránovou filtrace. Metoda se osvědčila při provozním orientačním stanovení obsahu bílkovin v ječmeni.

Шрогл, Ю. — Класова, В.: Скоростный метод определения белков в ячмене. Квас. прум. **21**, 1975 № 6, стр. 124—126.

Для скоростного, ориентировочного определения содержания белков в ячмене можно воспользоваться экстракционным колориметрическим методом, основанным на биуретовой реакции. Точность результатов зависит от стандартности образца и тонкости размола. Метод Джонсона и Крэни подвергся модификации, чтобы лучше отвечал условиям в Чехословакии. В качестве экстрагирующего вещества оправдал себя изопропиловый спирт, основная соль заменила углекислую медь, а вместо вакуумной фильтрации применяется фильтрация через мембрану под давлением. При ориентировочном определении белков в ячмене метод дает достаточно достоверные результаты.

Šroglová, J. - Klasová, V.: Quick Determination of Protein in Barley. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 6, pp. 124—126.

Extraction colorimetric method based on the biuret reaction can be used to advantage for rough determination of protein content in barley, since its gives reasonably reliable results. Its accuracy depends on the standardization of samples and fineness of grinding. The original method developed by Johnson and Crane has been adapted to meet concrete, specific conditions. Isopropyl alcohol is now used as an extracting agent, basic salt is used instead of cupric carbonate, and vacuum filtration has been replaced with forced pressure membrane filtration. The method is suitable for routine analyses carried out to determine protein in barley.

Šroglová, J. - Klasová, V.: Beitrag zur Schnellbestimmung der Eiweißstoffe in der Gerste. Kvas. prům. **21**, 1975, No. 6, S. 124—126.

Für die schnelle Orientationsbestimmung des Eiweißgehaltes in der Gerste bewährte sich die kolorimetrische

Extraktionsmethode auf der Basis der Biuretreaktion. Die Genauigkeit der Methoden hängt von der Standardisierung und Feinvermahlung der Probe ab. Die ursprüngliche Methode nach Johnson und Craney wurde den hiesigen Bedingungen angepasst. Als Extraktionsmittel

bewährte sich Isopropylalkohol, Kupferkarbonat wurde durch basisches Salz ersetzt. Anstatt der Vakuumfiltration wurde Membranfiltration unter Druck appliziert. Die Methode bewährte sich bei der Betriebs-Orientationsbestimmung des Eiweißgehaltes in der Gerste.