

Stanovení a obsah anthokyanogenů v pivovarských materiálech

Dr. ALEXANDER BARTKO, STANISLAVA HONSOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, pravoviště Brno

663.421
663.439

Klíčová slova: anthokyanogeny, obsah, stanovení, ječmen, slad, sladina, pivo, extrakce

Anthokyanogeny (proanthokyanidiny) jsou kondenzované polyhydroxyflavany. Nacházejí se v řadě rostlinných druhů; z obilovin je však obsahují pouze čirok a ječmen. Vykazují antivirální a antimikrobiální vlastnosti [1] a zdá se, že se podflejí na ochraně rostlin před napadením škůdci a chorobami [2,3]. Z hlediska nutričního nemají význam [4].

Klíčovým kamenem biosyntézy anthokyanogenů je dihydrokvercetin. Z něj se tvoří 2,3-trans-3,4-cis-leukokyanidin. Podle posledních výsledků probíhá syntéza dále přes chinonmetid a flav-3-en-3-ol ke katechinům a anthokyanogenům [5,6].

Díky pracím [7–11] byla objasněna struktura anthokyanogenů. Byly popsány dva typy dimerů A a B o sumárních vzorcích $C_{30}H_{24}O_{12}$ a $C_{30}H_{26}O_{12}$ a od nich odvozených trimerů C, D. Ve všech případech jde o polohové izomery tvořené katechinem, galokatechinem a epigalokatechinem. V ječmenu byly doposud s jistotou identifikovány katechin, dimerní prokyanidin B-3 a prodelfinidin B-3, trimerní prokyanidin C-2 a další tři trimery, složené z galokatechinových a katechinových jednotek [12,13].

Anthokyanogeny jsou lokalizovány v testě a perikarpu a jejich celkové množství se v závislosti na odrůdě pohybuje od 60 do 200 mg ve 100 g ječmene [14–16].

Renesance zájmu pivovarského průmyslu o anthokyanogeny vychází z potřeby hledat další cesty zvýšení koloidní stability piva. I když existují odlišné názory na mechanismus vzniku nebiologických zákalů piva, bylo prokázáno, že anthokyanogeny k jejich tvorbě přispívají [17, 18].

Zákalotvorná schopnost jednotlivých anthokyanogenů není stejná. Nejvyšší srážecí potenciál byl prokázán u prokyanidinu C-2 a vyšších oligomerů [19–22]. Do stáčeného piva přecházejí díky své nízké afinitě k proteinům zejména katechin a prokyanidin B-3 [23].

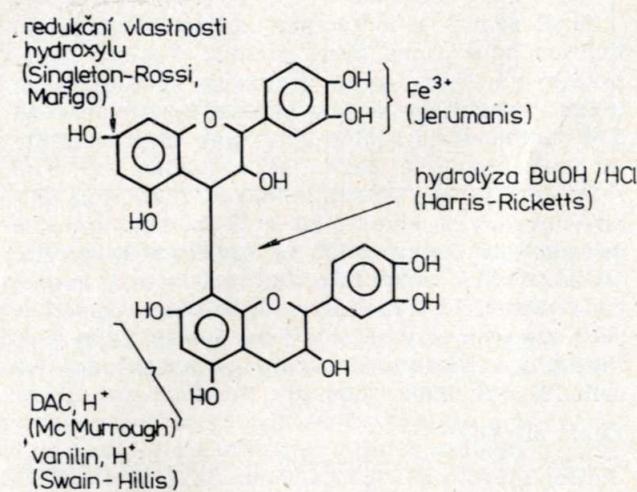
V zásadě existují dva možné způsoby zvýšení koloidní stability piva. Prvým je odstranění potenciálních reaktantů s využitím jejich specifické sorpce během filtrace. Přehled používaných metod podává např. Sarx a Wischmann [24]. Druhou možností je snížení či dokonce eliminace obsahu některých zákalotvorných látek v pivovarských surovinách. V dánské Carlsberg Research Laboratory byly vypěstovány mutanty ječmenů, u kterých je geneticky blokována přeměna dihydrokvercetinu v leukokyanidin. Tyto tzv. ječmeny bez anthokyanogenů jsou předmětem intenzívного studia jako perspektivní pivovarské materiály [25, 26]. V každém případě jsou výzkumy v této oblasti podmíněny existencí vhodných analytických metod stanovení anthokyanogenů.

METODY STANOVENÍ ANTHOKYANOGENŮ

Pomineme-li papírovou chromatografii, je nejstarší dosud používanou metodou stanovení jednotlivých anthokyanogenů tenkovrstvá chromatografie (TLC). Pro problémy, spojené s kvantifikací dělených látek, slouží však tato metoda spíše ke screeneringu výskytu jednotlivých sloučenin. Podrobný přehled systémů, používaných pro tuto nenáročnou techniku separace anthokyanogenů, je uveden v referátu [27].

Významnou roli sehrála při stanovení anthokyanogenů plynová chromatografie (zejména ve spojení s hmotnostní spektrometrií při určování jejich struktury). Anthokyanogeny se však vyznačují chemickou i tepelnou labilitou a nízkou těkavostí, a proto vyžadují před stanovením pomocí plynové chromatografie derivatizaci. Jako ideální se pro kvantitativní stanovení jednotlivých anthokyanogenů osvědčila vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), zejména na tzv. reverzních fázích [23, 28–30]. Značnou výhodu zde představuje možnost detekce flavanoidů za využití vysoce specifického činiela p-dimethylaminoskořicového aldehydu (DAC) — viz např. [31–33].

Není-li k dispozici příslušné instrumentální vybavení, musíme se spokojit se stanovením celkových anthokyanogenů. Jejich molekula nabízí několik reakčních míst, využitelných pro fotometrické stanovení. Důsledkem je, že dnes existují čtyři principiálně odlišné metody stanovení celkových anthokyanogenů (obr. 1) a každá z nich má řadu modifikací. Klasická Harris-Rickettsova metoda [34] využívá faktu, že za podmínek kyselé hydrolyzy tvoří



Obr. 1. Hlavní metody používané při fotometrickém stanovení anthokyanogenů

anthokyanogeny červeně zbarvené flavyliové ionty s maximem absorbance při 540 až 550 nm. Z reakce kondenzovaných meta-dihydroxyfenolů s DAC, resp. s vanilinem v kyselém prostředí vycházejí další metody [31—35]. Metoda Jerumanisova je založena na tvorbě komplexů fenolické orto-dihydroxyskupiny s Fe^{3+} v alkalickém prostředí [36]. Nejméně specifické jsou metody, využívající redukčních vlastností fenolického hydroxylu [37, 38].

Naším cílem bylo vypracovat metodu, která by umožňovala sledovat změny obsahu celkových anthokyanogenů od ječmene přes slad, sladinu a mladinu až do hotového piva.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Na základě předběžných pokusů byly pro stanovení vybrány metody:

a) kyselá hydrolýza směsi butanol — HCl podle Harrise a Rickettse [34],

b) stanovení s p-dimethylaminoskořicovým aldehydem podle Truelsena [16].

Byly vyzkoušeny různé postupy extrakce a zpracování vzorku před analýzou. U pevných vzorků se nejlépe osvědčila extrakce 75 % okyseleným acetonom s následným odpařením organické fáze a sorpcí anthokyanogenů na jednorázové extrakční kolonky Presep-1 (výrobce Laboratorní přístroje, Praha). Kapalné vzorky (sladina, pivo) lze na kolonky aplikovat přímo.

POSTUP STANOVENÍ ANTHOKYANOGENŮ

Extrakce anthokyanogenů z ječmene a sladu

1 g jemně mletého vzorku se extrahuje 5×20 ml 15 % acetolu, obsahujícího 10 mmol HCl (100 ml 75 % acetolu + 1 ml konc. HCl), ochlazeného na 0 °C. Extrakce se provádí v polyethylenových centrifugačních zkumavkách na ultrazvukové lázně (5 min). Extrakty se odstředí (5 min \times 6 000 g), spojí a doplní extrakčním roztokem do 100 ml.

Stanovení anthokyanogenů hydrolýzou se směsí butanol : HCl (95 : 5)

Stanovení v ječmenu a sladu

25 ml acetonového extraktu se na rotačním va-kuovém odpařováku zbaví acetolu. Teplota nesmí přesáhnout 35 °C. Vodný zbytek se nanese na kolonku Presep-1, která byla předem kondicionována 5 ml methanolu a 5 ml H₂O. Vzorek se prosaje kolonkou a odporná baňka se vypláchné 2×5 ml H₂O, které se také prosají kolonkou. Sorbované anthokyanogeny se eluují 5 ml 80 % methanolu do 25 ml odměrné baňky, přidá se 15 ml směsi butanol : HCl (95 : 5) a baňka se umístí na 30 min do vroucí vodní lázně. Po ochlazení a doplnění objemu se měří absorbance vzorku v 1 cm kyvetách při $\lambda = 550$ nm. K výpočtu koncentrace lze použít např. tabulku 24 z publikace [39].

V tom případě

koncentrace anthokyanogenů = odečtená hodnota

$$\frac{2}{x} \frac{\text{sušina}}{\text{sušina}} (\text{mg v } 100 \text{ g sušiny}).$$

Stanovení ve sladině a pivu

5 ml vzorku (v případě potřeby odplněného) se prosaje kondicionovanou kolonkou Presep-1 a promyje 2×5 ml H₂O. Dále se postupuje jako při stanovení v ječmenu a sladu. Použijí-li se k výpočtu tabelované hodnoty, udává odečtená hodnota přímo koncentraci anthokyanogenů v mg.l⁻¹.

Stanovení anthokyanogenů s p-dimethylaminoskořicovým aldehydem (DAC)

Příprava činidla

200 mg DAC se rozpustí ve směsi 140 ml methanolu a 50 ml koncentrované HCl. Doplní se methanolem do 200 ml a uchovává v temnu a chladnu. Trvanlivost činidla je 1 týden.

Stanovení v ječmenu a sladu

200 μl acetonového extraktu se smíchá se 3 ml činidla. Zaznamená se maximální hodnota absorbance při $\lambda = 640$ nm v 1 cm kyvetě (hodnota absorbance prochází maximem za 1,5 až 3 min po začátku reakce). Měří se proti slepému vzorku (200 μl acetolu + 3 ml činidla). Koncentrace anthokyanogenů (vztaženo na \pm katechin) se vypočte:

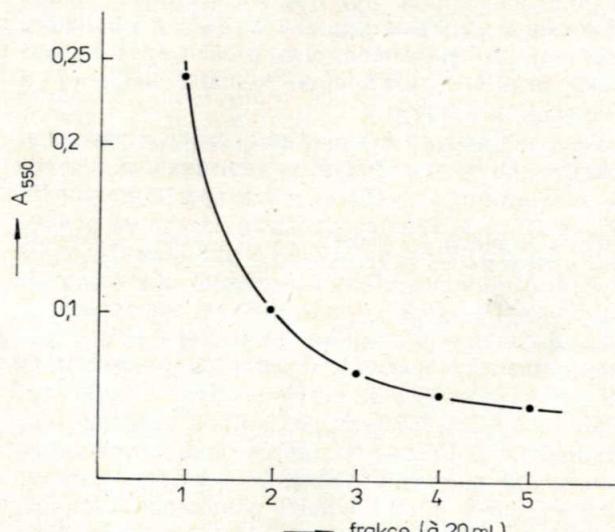
$$c = \frac{A_{640} \cdot 685}{\text{sušina}} (\text{mg v } 100 \text{ g sušiny}), \text{ kde } A_{640} \text{ je absorbance vzorku při } 640 \text{ nm}.$$

Stanovení ve sladině a pivu

5 ml odplněného vzorku se prosaje kondicionovanou kolonkou Presep-1, promyje 2×5 ml H₂O a eluuje 5 ml 80 % methanolu. Dále se postupuje jako při stanovení v ječmenu. Koncentrace anthokyanogenů se vypočte: $c = A_{640} \cdot 68,5$ (mg.l⁻¹).

VÝSLEDKY A DISKUSE

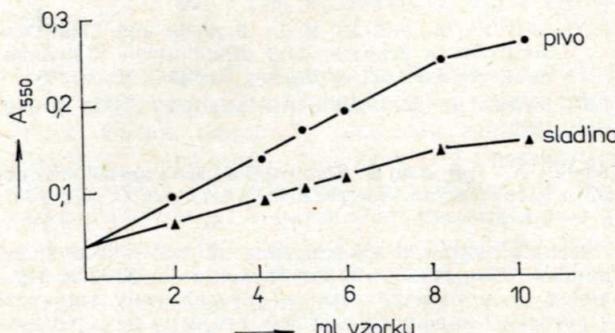
Při testování obou zvolených metod byly sledovány průběhy extrakce anthokyanogenů z pevných vzorků, sorpční kapacita kolonek Presep-1 a možnost jejich opakování použití, stálost extraktů a reprodukovatelnost metod.



Obr. 2. Průběh extrakce anthokyanogenů

Jak vyplývá z obr. 2, je převážná část anthokyanogenů extrahována již v prvních třech 20 ml podílech extrakčního roztoku.

Na vzorcích piva a sladiny bylo prokázáno, že anthokyanogeny jsou na kolonky Presep-I kvantitativně sorbovány až do 8 ml vsádeček (obr. 3). Neprítomností anthokyanogenů ve vzorku prošlem kolonkou bylo potvrzeno, že je sorpce skutečně



Obr. 3. Sorpční kapacita kolonky Presep pro pivo a sladinu

kvantitativní. Opakovánou elucí bylo zjištěno, že 5 ml 80 % methanolu zcela postačuje k vymytí sorbovaných anthokyanogenů z kolonek.

Pomocí analýzy rozptylu s dvojným tříděním [40] bylo na šesti náhodně vybraných kolonkách ověřeno, že výsledky jsou nezávislé na použité kolonce a že kolonky lze použít vícekrát. Do stanovení reprodukovatelnosti obou metod bylo zahrnuto i sledování stálosti extraktů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Každé stanovení bylo prováděno zvlášť (včetně extrakce).

Z technických důvodů byla naměřena kalibrační křivka pouze pro stanovení s DAC. Jako standard byl zvolen \pm katechin, jehož absorptivita představuje při reakci s DAC přibližný průměr absorptivit látek, jejichž stanovení nás zajímá [31]. Kalibrační křivka je lineární s korelačním koeficientem $r_{xy} = 0,9998$. Její rovnice je $A_{640} = 0,0146 \cdot c$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Oběma uvedenými metodami byl sledován obsah anthokyanogenů v celém sortimentu čs. jarních ječmenů včetně zkoušených novošlechtění, ve sladech, vyrobených z těchto ječmenů při mikrosladovacích zkouškách a v kongresní sladině.

Tabulka 1. Reprodukovatelnost stanovení anthokyanogenů v ječmenu

Stanovení	BuOH/HCl [A ₅₅₀]		DAC [A ₆₄₀]	
	ihned	za 24 h	ihned	za 24 h
N	6	6	6	6
\bar{x}	0,287	0,288	0,162	0,165
s_x	0,0054	0,0065	0,0025	0,0029
$c_x \%$	1,9	2,3	1,6	1,8

N — počet stanovení

\bar{x} — průměrná hodnota

s_x — standardní odchylka

$c_x \%$ — variační koeficient v procentech

BuOH — butanol

Tabulka 2. Koncentrace anthokyanogenů v ječmenu, sladu a kongresní sladině. Výsledky jsou vyjádřeny v mg na 100 g sušiny, resp. v mg $\cdot l^{-1}$

Odrůda	Sedlec		
	Ječmen	Slad	Sladina
Korál	DAC BuOH/HCl	DAC BuOH/HCl	DAC BuOH/HCl
Zefír	112,3	95,8	87,3
Krystal	121,0	105,5	97,7
Rubín	137,1	109,3	97,7
Mars	118,6	99,5	99,7
Jaspis	133,8	107	8,6
KM-184	118,3	97,3	108,2
Orbit	126,9	111,3	126,9
HE-2591	126,9	107	9,5
CE-334	114,4	103,9	17,8
SK-2209	119,8	105,1	123,4
CE-396	137,3	119,1	9,3
TR-1148	126,1	105,5	110,3
KM-BR-A-10	123,5	102,5	115,6
KM-UH-R-1890	116,7	98,3	9,2
KM-143	132,8	121,9	10,1
Kredit	110,9	95,1	122,7
Bonus	114,8	97,6	103,5
Zenit	122	100,9	8,6
Karát	120,3	99,4	119
HE-2803	137,5	108,1	9,9
	129	104,1	110,9

Tabulka 3. Koncentrace anthokyanogenů v ječmenu, sladu a kongresní sladině. Výsledky jsou vyjádřeny v mg na 100 g sušiny, resp. v mg $\cdot l^{-1}$

Odrůda	Věrovany		
	Ječmen	Slad	Sladina
Korál	DAC BuOH/HCl	DAC BuOH/HCl	DAC BuOH/HCl
Zefír	122,5	102,1	116,6
Krystal	124,6	101	124,4
Rubín	117,9	95,2	83,7
Mars	113,6	94,6	95,9
Jaspis	126,9	100	106,2
KM-184	126,8	105,3	111,4
Orbit	119,4	100,2	121,9
HE-2591	115,3	94,6	104,4
KM-246	105,2	85	118,2
CE-334	120,9	100,3	93,3
SK-2209	129,7	107,2	100,6
CE-396	140,6	107,5	104,6
TR-1148	126,3	103,5	112,8
KM-BR-A-10	112,2	97,3	102,1
KM-UH-R-1890	116,1	92,3	117,3
KM-143	129,7	104,8	111,6
Kredit	120,1	95,2	102,6
Bonus	112,9	89,5	107,5
Zenit	123,9	106,7	128,9
Karát	118,3	97,8	127,9
HE-2803	131,4	102,2	113,8
	124,7	100,3	119,5

Výsledky stanovení na materiálu ze dvou pěstebních míst s podobnými půdními a klimatickými podmínkami jsou shrnutý v tab. 2 a 3. Výsledky zároveň dokumentují rozdílnou citlivost metod k jednotlivým flavanům. Zatímco hydrolýza směsi butanol-HCl nereaguje na přítomnost katechinů, při stanovení s DAC se naopak změny v jejich koncentraci projeví. Nalezené hodnoty jsou v souladu se zjištěním Molla [23], že v průběhu sladování mírně vzrůstá obsah dimerních anthokyanogenů, kdežto koncentrace katechinů klesá.

ZÁVĚR

Obě vypracované metody umožňují reprodukovatelně stanovit obsah anthokyanogenů v ječmenu, sladu, sladině i pivu. Metodika umožňuje současné použití obou postupů. Ze stanovení obsahu anthokyanogenů v československých ječmenech a sladech vyplývá, že jednotlivé odrůdy se jen málo liší. Slady z nich vyrobené jsou při průměrném obsahu anhokyanogenů 110 mg ve 100 g (stanovení se směsí butanol-HCl) srovnatelné se špičkovými zahraničními materiály.

Literatura

- [1] VANDEN BERGHE, D. A., VLIETINCK, A. J., VAN HOOF, L.: Present status and prospects of plant products as antiviral agents, In: Advances in Medicinal Plant Research, WVG Stuttgart, 1985.
 - [2] HUTH, G.: Disertace, Justus-Liebig-Universität Giesen, 1980.
 - [3] HARMS, H., TERBEA, M.: Phytopath. Z., **111**, 1984, s. 283.
 - [4] NEWMAN, R. K., NEWMAN, C. W., EL-NEGOUMY, A. M., AASTRUP, S.: Nutr. Reports International, **30** (4), 1984, s. 809.
 - [5] BARZ, W., WIERMANN, R.: Proc. Internat. Bioflavonoid Symposium, Munich, 1981, s. 185.
 - [6] HEMINGWAY, R. W., LAKS, P. E.: J. Chem. Commun., 1985, s. 746.
 - [7] THOMPSON, R. S., HASLAM, D. J., TANNER, R. J. N.: J. Chem. Soc., Perkin (I) Transaction, 1972, s. 1387.
 - [8] WEINGES, K.: In: Topics in flavonoid chemistry and biochemistry, Akadémiai Kiadó, Budapest 1975, s. 5.
 - [9] HASLAM, E.: ibid., s. 77.
 - [10] BATE-SMITH, E. C.: Phytochemistry, **14**, 1975, s. 1107.
 - [11] DELCOUR, I. A., TUYTENS, G. M.: J. Inst. Brew., **90**, 1984, s. 153.
 - [12] OUTTRUP, H.: Proc. EBC, 1981, s. 323.
 - [13] JENDE-STRID, B., MOLLER, B. L.: Carlsberg Res. Commun., **46**, 1981, s. 53.
 - [14] AASTRUP, S.: ibid., **50**, 1985, s. 37.
 - [15] JENDE-STRID, B.: ibid., s. 1.
 - [16] TRUELSEN, E.: Tidsskr. Planteavl., **88**, 1984, s. 387.
 - [17] McMURROUGH, I., HENNIGAN, G. P., LOUGHREY, M. J.: J. Inst. Brew., **89**, 1983, s. 15.
 - [18] WACKERBAUER K., ANGER, H. M.: Mschr. Brau., **37**, 1984, s. 153.
 - [19] BATE-SMITH, E. C.: Phytochemistry, **12**, 1973, s. 907.
 - [20] PORTER, L. J., WOODRUFFE, J.: ibid., **23**, 1984, s. 1255.
 - [21] ASAMO, K., OHTSU, K., SHINAGAWA, K., HASHIMOTO, N.: Agric. Biol. Chem., **48** 1984, s. 1139.
 - [22] McMURROUGH, I., HENNIGAN, G. P., CLEARY, K.: J. Inst. Brew., **91**, 1985, s. 93.
 - [23] MOLL M., FONKNECHTEN, G., CARNIELLO, M., FLAY-EUX, R.: MBAA Technical Quarterly, **21**, 1984, s. 79,
 - [24] SARX, H.-G., WISCHMANN, H.: Forum der Brauerei, **6**, 1985, s. 152.
 - [25] VON WETTSTEIN, D. et al.: MBAA Technical Quarterly, **22**, 1985, s. 41.
 - [26] DELCOUR, I. A. et al.: J. Inst. Brew., **91**, 1985, s. 88.
 - [27] ZLOCH, Z.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 58.
 - [28] JERUMANIS, J.: Cerevisia, **8**, 1983, s. 179.
 - [29] LA NOTTE, E., ANTONNACI, D.: Riv. Vitic. Enol., **38**, 1985, s. 367.
 - [30] MASSCHELEIN, C. A., BATUM, M. S.: Proc. EBC, 1981, s. 359.
 - [31] McMURROUGH, I., McDOWELL, J.: Anal. Chem., **91**, 1978, s. 92.
 - [32] McMURROUGH, I.: Proc. EBC, 1979, s. 321.
 - [33] OHTSU, K., HASHIMOTO, N.: Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co., **25**, 1982, s. 47.
 - [34] HARRIS, G., RICKETTS, R. W.: J. Inst. Brew., **65**, 1959, s. 331.
 - [35] SWAIN, T., HILLIS, W. E.: J. Sci. Food Agric., **10**, 1959, s. 63.
 - [36] JERUMANIS, J.: Brauwissenschaft, **25**, 1972, s. 313.
 - [37] SINGLETON, W. R., ROSSI, J. A.: Am. J. Vitic. Enol., **16**, 1965, s. 144.
 - [38] MARIGO, G.: Analysis, **2**, 1973, s. 106.
 - [39] KRÜGER, E., BIELIG, H. J.: Betriebs-und Qualitätskontrolle in Brauerei und Alkoholfreie Getränkeindustrie, Paul Parey Verlag, Berlin 1976, s. 256.
 - [40] ANDĚL, J.: Matematická statistika, SNTL, Praha, 1978.
- Bartko, A. - Honsová, S.: Stanovení a obsah anthokyanogenů v pivovarských materiálech.** Kvas. prům., **33**, 1987, č. 8—9, s. 279—282.
- Metody stanovení anthokyanogenů hydrolyzou směsi butanol-HCl a reakcí s p-dimethylaminoskóřicovým aldehydem byly upraveny tak, aby umožňovaly stanovení v pevných i kapalných vzorcích. Pro extrakci z ječmene a sladu je použit 75% aceton s 10 mmol HCl \cdot l⁻¹. Z extraktů a vodních vzorků jsou anthokyanogeny sorbovány a přečištěny na jednorázových extrakčních kolonkách Presep-1 (náplň SiC₁₈). Odrůdy českých jarních ječmenů se liší obsahem anthokyanogenů jen málo, průměrná hodnota se pohybuje kolem 110 mg ve 100 g sladu.
- Бартко, А. - Гонсова, С.: Определение и содержание антицианогенов в пивоваренных материалах.** Квас. прум., **33**, 1987, № 8—9, стр. 279—282.
- Методы определения антицианогенов путем гидролиза смесью бутанол-НСl и реакцией с р-диметиламиноциннамальдегидом были видоизменены таким образом, чтобы они предоставили возможность определения в твердых и жидких образцах. Для экстрагирования из ячменя и солода применен 75 %-ный ацетон с 10 ммол. НСl \cdot л⁻¹. Из экстрактов и водных проб антицианогены сорбируются и очищаются на однократных экстракционных колонках Пресеп-1 (наполнитель SiC₁₈). Сорты чешословакских яровых ячменей отличаются по содержанию антицианогенов только мало, обычная средняя величина для солодов колеблется около 110 мг в 100 г.
- Bartko, A. - Honsová, S.: Determination and Content of Anthocyanogens in Brewing Materials.** Kvas. prům. **33**, 1987, No. 8—9, pp. 279—282.
- The methods for the anthocyanogens determination by a hydrolysis with a mixture of butanol — HCl followed by a reaction with p-dimethylaminocinnamaldehyde were modified to permit the determination in solid and liquid samples. The extraction of barley and malt is performed with 75 % acetone and 10 mmol HCl \cdot l⁻¹. Anthocyanogens are sorbed from extracts and water solutions and then are purified in batch extract columns Presep-1 (packing SiC₁₈). Varieties of Czech early barleys differ in the content of anthocyanogens only a little. Their average values in malts are in a range of about 110 mg in 100 g.
- Bartko, A. - Honsová, S.: Bestimmung und Gehalt der Anthocyanogene in Brauerei-Materialien.** Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 8—9, S. 279—282.
- Die Methoden der Bestimmung der Anthocyanogene durch Hydrolyse der Gemische Butanol-HCl und Reaktion mit p-Dimethylaminocinnamaldehyd wurden so modifiziert, um die Bestimmung in flüssigen und festen Proben zu ermöglichen. Für die Extraktion aus Gerste und Malz wird 75% Azeton mit 10 mmol HCl \cdot l⁻¹ angewendet. Aus Extraktten und wässrigen Proben werden die Anthocyanogene auf einstufigen Extraktionskolonnen Presep-1 (Füllung SiC₁₈) sorbiert und nachgereinigt. Die tschechoslowakischen Sommergerstesorten weisen im Anthocyanogengehalt nur unwesentliche Unterschiede auf; der Durchschnittswert bei Malzen beträgt ca 110 mg in 100 g.