

DOI: 10.18832/kp201812

Determination of Sugars and Saccharides in Beer

Stanovení cukrů a celkových sacharidů v pivu

Marie JURKOVÁ, Jana OLŠOVSKÁ, Pavel ČEJKA

Research Institute of Brewing and Malting, Plc, Lípová 15, 120 44 Praha 2, Czech Republic

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2

e-mail: jurkova@beerresearch.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Jurková, M., Olšovská, J., Čejka, P., 2018: Determination of sugars and saccharides in beer. Kvasny Prum. 64(2): 58–64

The concentration of total saccharides including polyols and sugars belongs to one of the main values of basic nutrition labelling information of food as well as beer. The article informs about the method of these compounds, describes its chemical and analytical principles, validation parameters and clearly explains how the method is applied in the beer analysis.

Jurková, M., Olšovská, J., Čejka, P., 2018: Stanovení cukrů a sacharidů v pivu. Kvasny Prum. 64(2): 58–64

Koncentrace celkových sacharidů včetně polyolů, a z toho cukrů, patří mezi jeden ze základních údajů nutričního značení potravin a také piva. Článek informuje o metodice stanovení těchto látek, její chemické a analytické podstatě, validačních parametrech a zejména přehledně vysvětluje způsob její aplikace v analýze piva.

Keywords: *sugars, saccharides, beer, liquid chromatography***Klíčová slova:** *cukry, sacharidy, pivo, kapalinná chromatografie*

1 INTRODUCTION

The current legislation, the European Parliament Regulation and Council Regulation No 1169/2011 (EU, 2011), require food commodity producers to inform the consumers about the energy content of foods and beverages. Another obligation resulting from this regulation is nutrition labelling of food and many drinks, such as non-alcoholic beer. One of the important nutritional parameters is the information about the concentration of total carbohydrates and especially sugars. According to the definition in the Regulation:

- *Saccharides are every saccharide metabolized by a human including polyols*
- *Sugars are mono- and disaccharides excluding polyols*

The metabolism of saccharides by human cells means degradation of glucose (also fructose) polymers bonded by α -glycosidic bond. A human enzyme apparatus is designed to cleave the α -glycosidic bond to produce simple glucose molecules that are the source of energy. Low-molecular carbohydrates called sugars are immediately used by the organism. Therefore, they are sometimes marked as burdening carbohydrates and are self-defined in nutrition labelling. Oligosaccharides and polysaccharides are an energy potential for the organism but in order to use it by the organism as an energy source the glycosidic bonds in the digestive tract must be enzymatically cleaved to sugars. Based on this fact, the Commission Regulation (EU) No 117/2010 (EU, 2010) about determination of carbohydrates content determination and Commission Regulation No 900/2008 (EU, 2008) about the analytical methods and other technical establishment necessary for the implementation of the goods export procedure were issued, which among others contain the obligation of enzymatic cleavage of carbohydrates followed by determination of glucose by liquid chromatography.

The saccharides contained in beer originate from malt and they are formed during the mashing step by enzymatic cleavage. Beer contains so-called fermentable sugars such as fructose, glucose, maltose and saccharide maltotriose, which are possible to analyze according to EBC 8.7, EBC 9.2.7 and MEBAK 2.7.2. (EBC, 2009a; b; MEBAK, 2013a) methods. Further, so-called oligosaccharides (dextrins), which are chains formed by the combination of 4 to 10 glucose molecules (DP4-DP10, DP means "degree of polymerization"), can be detected in beer at relatively significant concentrations. About one third of the total carbohydrate content in beer is formed of polysaccharides containing more than 10 units of glucose. The sum of all saccharides mentioned above can be determined by the MEBAK 2.7.3 (MEBAK, 2013b) method, which is based on dehydration with sulfuric acid to form 5-hydroxymethylfurfural, which gives together with anthrone a colored product determined by colorimetry at 625 nm. However, this assay is not in compliance with the procedure described in Commission Regulation (EU) No 117/2010. The dehy-

1 ÚVOD

Současná legislativa, Nařízení Evropského parlamentu a požadavky Rady No. 1169/2011 (EU, 2011), ukládá výrobcům potravinářských komodit povinnost informovat spotřebitele o energetickém obsahu jednotlivých druhů potravin a nápojů. Další povinností vyplývající z tohoto nařízení je označovat tzv. nutriční složení potraviny a řady nápojů, jako např. nealkoholického piva. Jedním z významných nutričních parametrů je informace o koncentraci celkových sacharidů a z toho cukrů. Podle definice uvedené v nařízení je:

- *Sacharidy – každý sacharid metabolizovaný člověkem, včetně polyolů*
- *Cukry – mono- a disacharidy bez polyolů*

To, že je sacharid metabolizován člověkem, znamená, že se jedná o molekulu složenou z molekul glukosy, popřípadě fruktosy vázané α -glykosidickou vazbou. Enzymatický aparát člověka je uzpůsoben právě na štěpení α -glykosidické vazby, za vzniku jednoduchých molekul glukosy, která je zdrojem energie. Nízkomolekulární sacharidy jsou označovány jako cukry a jsou organismem ihned využívány. Proto se někdy označují jako sacharidy a jsou v nutričním označení samostatně vymezeny. Oligosacharidy a polysacharidy jsou energetickým potenciálem pro organismus, ale aby je organismus mohl využít jako energetického zdroje, musí být v trávicím traktu příslušné glykosidické vazby enzymaticky rozštěpeny právě na cukry. Na základě tohoto faktu bylo vydáno Nařízením Komise (EU) č. 117/2010 o stanovení obsahu dextrinů (EU, 2010) a Nařízením Komise (EU) č. 900/2008 o analytických metodách a jiných technických ustanoveních nezbytných k provádění režimu vývozu zboží (EU, 2008), které mimo jiné obsahuje povinnost enzymatického štěpení sacharidů s následným stanovením uvolněné glukosy metodou kapalinné chromatografie.

Sacharidy obsažené v pivu pocházejí ze sladu, kde vznikají ve fázi rmutování enzymatickým štěpením. V pivu jsou obsaženy tzv. zkvasitelné cukry jako fruktosa, glukosa a maltosa a sacharid maltotriosa. Ty lze stanovit metodami EBC 8.7, EBC 9.2.7 a MEBAK 2.7.2. (EBC, 2009a; b; MEBAK, 2013a). V poměrně významných koncentracích lze v pivu detekovat také tzv. oligosacharidy (dextriny), což jsou řetězce vzniklé spojením molekul 4 až 10 jednotek glukosy (DP4 – DP10, DP značí zkratku z anglického „degree of polymerization“). Asi jednu třetinu celkové koncentrace sacharidů v pivu tvoří polysacharidy obsahující více jak deset jednotek glukosy. Sumu všech vyjmenovaných sacharidů lze stanovit metodou MEBAK 2.7.3. (MEBAK, 2013b), která je založená na dehydrataci kyselinou sírovou za vzniku 5-hydroxymethylfurfuralu. Ten poskytuje s anthronem barevný produkt stanovovaný kolorimetricky při 625 nm. Tato metoda však nevyhovuje Nařízením Komise (EU) č. 117/2010. Podle tohoto nařízení musí být metoda stanovení sacharidů v nápojích a potravinách založena na enzymatické konverzi oligomerů a polymerů sa-

dration with sulphuric acid may increase the concentration of polysaccharides because also carbohydrates with β -glycosidic bond are measured. According to the Regulation No 117/2010, the method for determination of saccharides in beverages and food must be based on the enzymatic cleavage of saccharide oligomers and polymers to glucose units using amylase or amyloglucosidase; determination of glucose must be then performed by HPLC method. During the development of the method in our laboratory (Jurková et al., 2014), it turned out that efficacy of the enzymes is negatively influenced by the presence of alcohol. Therefore, the method had to be optimized to the maximum possible degree of conversion. The residual un-cleaved polymers, about 5% of the original carbohydrates, were then determined simultaneously together with glucose by the HPLC with the RI (Refractive Index) detector.

The same instrumentation and the HPLC method is used for determination of an original profile of oligosaccharides to DP10 and glycerol (polyol) in sweet wort, bitter wort and beer. This method does not require the enzymatic cleavage and the sample is only diluted and filtrated prior HPLC determination.

2 THE METHODOLOGY

2.1 Sample preparation – enzymatic cleavage of saccharides

An amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, (70 units/mg, Sigma Aldrich, Czech Republic) is used for enzymatic cleavage of oligo- and polysaccharides in beer. The cleavage is carried out in 100 mL volumetric flasks placed in the thermostat at 60 °C for 120 minutes. The solution of the amyloglucosidase cleaving enzyme is added to the analyzed beer sample after the temperature reaches 60 °C. Subsequently, the conversion is performed for 120 minutes, which is the optimal time for maximal recovery of this enzymatic reaction. Then, the cleavage is terminated by inactivation of the enzyme by the temperature of 80 °C. Finally, the sample is centrifugated, cooled to the room temperature and diluted 10 times by ultra-pure water.

2.2 Determination by HPLC

The analysis of saccharides was performed on a Rezex RSO - Oligosaccharide ion exchange column in Ag⁺ mode (200×10 mm; Phenomenex, USA). This column works primarily as a molecular sieve and it is made of styrene-divinylbenzene sulfonated with 4% cross-linking. Carbohydrates and glycerol are eluted according to their molecular size; it means that the smallest molecules of glycerol, fructose and glucose are eluted as the last ones, while the oligosaccharides elute earlier in dependence on their decreasing molecule size (Phenomenex, 2014). The individual elution zones of saccharides are then quantified by a highly sensitive refractometric detector (Shodex RI-101).

The mobile phase consists only of ultrapure water (Millipore, USA). Its purity (in particular, the low content of ion reducing Ag⁺ cation to neutral Ag) is important for the long life of the column because the reduced Ag irreversibly clogs the pores in the column. Reducing carbohydrates themselves are also involved in the reduction of Ag ions because in the aqueous phase there is a balance between their linear and cyclic forms, of which the linear form with the aldehyde group is able to reduce the Ag ions. To prevent this mechanism, the amount of matrix must be minimal; therefore, the samples are diluted prior the analysis. The temperature of the column is 85 °C, the flow rate of the mobile phase is 0.3 mL·min⁻¹, the injection volume is 10 μ L. The analytes used are glycerol, fructose, glucose, maltose, DP3 - DP10 oligosaccharides.

If the analyzed sample contains sucrose, it is completely degraded to glucose and fructose in the aqueous mobile phase with the Ag ions at 85 °C. Therefore, the separation of sucrose is performed on NH₂ columns where this phenomenon does not occur.

In order to determine saccharides in the wort, the original sample must be diluted 50 times, the beer sample must be degassed and diluted 10 times. The sample must be diluted exclusively using ultrapure water with a high degree of deionization. Concentrations of the samples should be ranged in linear part of calibration curve, otherwise the samples need to be further diluted.

Calibration solutions are prepared from the sugar standards as of D-(+)-glucose anhydrous, D-(-)-fructose, maltose monohydrate (Merck, Czech Republic) and polyols as glycerol (99% Sigma-Aldrich, Czech Republic). Five hundred milligrams of each sugar (to the nearest 0.1 mg) is diluted in the solution of 0.5 g/100 mL glycerol to the accurate volume of 100 mL. This stock solution is further diluted with deionized water in order to obtain calibration solutions in

charidů na glukosu pomocí amylasy nebo amyloglucosidasy, stanovení glukosy musí být provedeno metou HPLC. Jak se ukázalo při vývoji metody (Jurková et al., 2014), účinnost enzymů je negativně ovlivněna přítomností alkoholu. Proto bylo potřeba metodu optimalizovat na maximální možný stupeň konverze. Nerozštěpené oligomery a polymery, zhruba asi 5% původních sacharidů, jsou pak stanoveny společně s glukosou metodou HPLC s RI (Refractive Index) detekcí.

Stejná instrumentace a HPLC metoda je používána také pro zjištění původního profilu oligosacharidů do DP10 a glycerolu (polyolu) ve sladině, mladině a pivu, metoda nevyžaduje enzymatické štěpení a vzorek je pouze vhodně naředěn a zfiltrován.

2 METODIKA

2.1 Příprava vzorku - enzymatické štěpení sacharidů

K enzymatickému štěpení oligo- a polysacharidů v pivu se používá amyloglucosidáza z *Aspergillus niger* (70 units/mg, Sigma Aldrich, Česká republika). Štěpení probíhá ve 100 ml odměrných baňkách vložených do termostatu při teplotě 60 °C po dobu 120 minut. Roztok štěpícího enzymu amyloglucosidasy se přidá k analyzovanému vzorku piva až po vytemperování na požadovanou teplotu 60 °C, od té doby se počítá doba 120 min potřebná k optimálnímu stupni konverze. Po jejím uplynutí je štěpení ukončeno inaktivací enzymu při teplotě 80 °C. Vzorek se odstředí, ochladí na laboratorní teplotu a 10 x zředí ultračistou vodou.

2.2 HPLC stanovení

Pro komplexní analýzu sacharidů piva a sladiny byla použita Rezex RSO - Oligosaccharide kolona s iontovou výměnou v Ag⁺ cyklu (200×10 mm; Phenomenex, USA). Tato kolona, vyrobená ze sulfonovaného styren-divinylbenzenu se 4% zesíťněním, funguje především jako molekulární síto. Sacharidy a glycerol jsou eluovány v pořadí podle rozměrů molekul, to znamená, že jako poslední jsou eluovány malé molekuly glycerol, fruktosa a glukosa, zatímco oligosacharidy eluují dříve, a to v pořadí sestupném vzhledem ke stupni polymerace (Phenomenex, 2014). Jednotlivé elující zóny sacharidů jsou pak kvantifikovány vysoce citlivým refraktometrickým detektorem (Shodex RI – 101).

Mobilní fáze je tvořena pouze ultračistou vodou (Millipore, USA). Její čistota (zejména nízký obsah iontů redukujících kationt Ag⁺ na neutrální Ag) je důležitá pro dlouhou životnost kolony, neboť vyredukované Ag nenávratně ucpává póry v koloně. Na redukci Ag iontů se podílejí i samotné redukující sacharidy, neboť ve vodné mobilní fázi nastává rovnováha mezi lineární a cyklickou formou, z nichž lineární forma s aldehydickou skupinou je schopna redukovat Ag ionty. Nástřik matrice na kolonu musí být proto omezen na minimum a vzorky jsou před vlastní analýzou většinou ředěny. Kolona je temperována na 85 °C, průtok mobilní fáze je 0,3 ml/min, objem nástřiku je 10 μ l. Stanovované analyty jsou glycerol, fruktosa, glukosa, maltosa, oligosacharidy DP3 – DP10.

Pokud analyzovaný vzorek obsahuje sacharózu, v prostředí vodné mobilní fáze a stříbrných iontů kolony při teplotě 85 °C dochází k její úplné degradaci na glukosu a fruktosu. Pro stanovení sacharosy se proto volí separace na NH₂ kolonách, kde k tomuto jevu nedochází.

Při stanovení sacharidů ve sladině a mladině se původní vzorek musí naředit 50krát, pivo se po odpěnění a odstranění oxidu uhličitěho ředí 10krát. K ředění se používá výhradně ultračistá voda s vysokým stupněm deionizace. Zjištěné hodnoty koncentrací zředěných vzorků by se měly nacházet v lineární části kalibrační křivky, jinak je potřeba vzorky více ředit.

Pro přípravu kalibračních roztoků se používají standardy základních cukrů, a to: D-(+)-glukosa bezvodá, D-(-)-fruktosa a maltosa monohydrát (Merck, Česká republika), a pro stanovení polyolů glycerol (99%, Sigma-Aldrich, Česká republika). Do 100 ml odměrky se naváží 0,5 g (s přesností 0,1 mg) každého standardu cukru a doplní se po rysku roztokem glycerolu o koncentraci 0,5 g/100 ml. Tento zásobní roztok je dále postupně ředěn deionizovanou vodou tak, aby byly získány kalibrační roztoky v rozsahu koncentrací 0,001 až 0,1 g/100 ml. Maltosa a vyšší oligosacharidy jsou vyhodnocovány podle bezvodé maltosy. Koncentrace pro maltosu jsou proto v kalibraci násobeny koeficientem 0,950002.

Na obr. 1 a 2 je uveden příklad analýzy sacharidů v reálném vzorku nealkoholického piva před a po enzymatickém štěpení. Z jejich porovnání je zřejmý nárůst koncentrace glukosy způsobený více jak 95% konverzí sacharidů. Jelikož je enzymatické štěpení proces dy-

the concentration ranging from 0.001 to 0.1 g/100 mL. Maltose and higher oligosaccharides are evaluated according to anhydrous maltose, therefore, concentrations for maltose are corrected in the calibration by the coefficient of 0.950002.

Fig. 1 and 2 show an example of a saccharides analysis in a real sample of non-alcoholic beer before and after enzymatic cleavage. As seen from their comparison, the increase of glucose concentration caused by saccharides conversion is higher than 95%. Since the enzymatic cleavage process is dynamic, residual DP oligomers remain in the solution at the time of its interruption. Even though they represent the minor part, they must be included into the calculation of the total saccharides content. Further, the correction is of the changed volume caused by addition of enzyme solution to the beer sample as well as correction of enzymatic activity depending on the alcohol content (see Table 1) must be considered when total saccharides are determined.

The efficacy of the amyloglucosidase enzyme is regularly verified by adding a known concentration of maltodextrin (4 g/100 mL), to a non-alcoholic beer sample. Both, the original non-alcoholic beer and non-alcoholic beer with the addition of maltodextrin are analyzed, and the difference between these two results is used to express the efficacy of the enzyme.

2.3 Quantification of glucose from DP3 to DP10

Due to the poor availability and high cost of oligomer standards, DP3-DP10 oligomers concentrations are evaluated by maltose standard. Resulting DP concentrations are then multiplied by relative response factors obtained from the comparison of the response of maltose during the method development. The factors 1.1 and 1.3 were obtained for DP3 and DP4, respectively. The concentrations of DP5–DP10 are very low and their response factor ranges from 1.4 to 1.6. Therefore, the factor value of these analytes was approximated to 1.5.

2.4 Calculations

For the calculation of the concentrations of the individual saccharides in sweet original wort, wort and beer, i.e. without enzymatic cleavage, the following equation is used:

$$c_{(p, s, m)} = c_x \cdot d$$

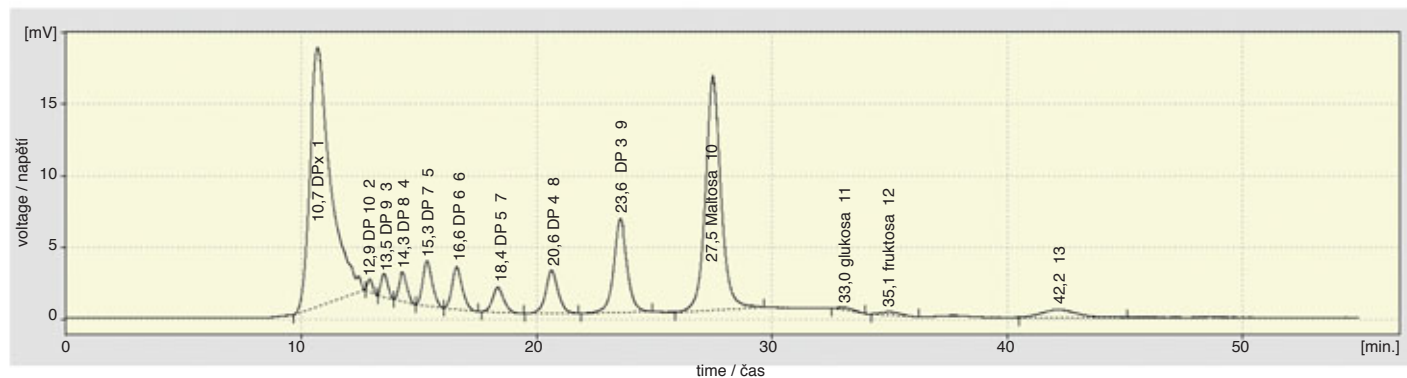


Fig. 1 Chromatogram of the real beer sample (non-alcoholic beer) before enzymatic cleavage
Obr. 1 Chromatogram reálného vzorku nealkoholického piva před enzymatickým štěpením

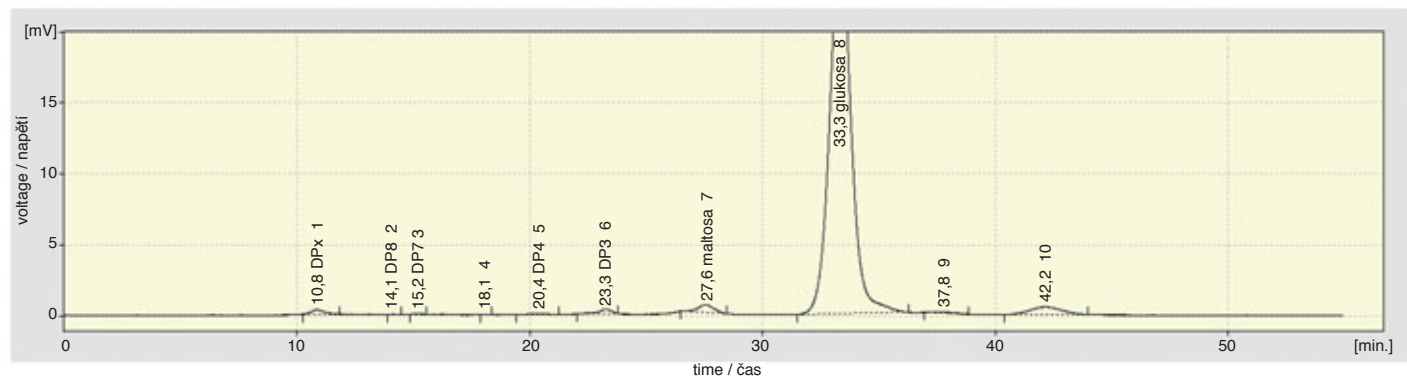


Fig. 2 Chromatogram of the real beer sample (non-alcoholic beer) after enzymatic cleavage
Obr. 2 Chromatogram reálného vzorku nealkoholického piva po enzymatickém štěpení

namický, v okamžiku jeho přerušení v roztoku zůstávají zbytkové DP oligomery, a i když představují minoritní část, musí být zahrnuty do výpočtu celkového obsahu sacharidů. Při výpočtu celkové koncentrace sacharidů je dále provedena korekce na změnu objemu vzorku přidáním roztoku enzymu (dle použitých objemů) a korekce na účinnost enzymu v závislosti na obsahu alkoholu (tab. 1).

Účinnost enzymu amyloglucosidasy je pravidelně ověřována pomocí přidavku známé koncentrace maltodextrinu (4 g/100 ml) do nealkoholického piva. Enzymaticky jsou štěpeny původní nealkoholické pivo a nealkoholické pivo s přidavkem maltodextrinu a u obou je změřen celkový obsah sacharidů po štěpení. Rozdíl obou hodnot vyjádřený v procentech vzhledem k hodnotě přidavku maltodextrinu (100%) vyjadřuje účinnost štěpení.

2.3 Kvantifikace oligomerů DP3 až DP10

Vzhledem ke špatné dostupnosti a vysoké ceně standardů oligomerů, jsou koncentrace oligomerů DP3-DP10 vyhodnoceny pomocí standardu maltosy a získané hodnoty koncentrací jsou pak násobeny relativními odezovovými faktory vzhledem k maltose pro jednotlivé oligomery, získané samostatným měřením pro všechny oligomery včetně maltosy metodou standardního přidavku. Pro DP3 byl získán faktor 1,1; pro DP4 1,3. Vzhledem k nízké koncentraci oligomerů DP5 – DP10 a jejich rozpětí odezovových faktorů v úzkém rozmezí 1,4–1,6 byla hodnota faktoru pro tyto analyty aproximována na hodnotu 1,5.

2.4 Výpočty

Pro výpočet koncentrací jednotlivých sacharidů v pivu, sladině nebo mladíně, tj. bez enzymatického štěpení, použijeme následující rovnici

$$c_{(p, s, m)} = c_x \cdot d$$

kde $c_{(p, s, m)}$ je koncentrace jednotlivého sacharidu v pivu, sladině nebo mladíně, c_x je změřená koncentrace jednotlivého sacharidu a d je příslušné ředění.

Celkový obsah monosacharidů a oligosacharidů DP2 až DP10 v pivu, sladině nebo mladíně bez štěpení, je potom součtem zjištěných koncentrací

where $c_{(p, s, m)}$ is the resulted concentration of individual saccharide in beer (p), sweet wort (s) and wort (m), c_x is the measured concentration of individual saccharides in sample, and d is dilution.

The total amount of monosaccharides (sugars) and oligosaccharides till DP10 in beer (p), sweet wort (s) and wort (m) without enzymatic cleavage is the sum of individual concentrations

$$c_{(p, s, m)} = \sum c_{xi} \cdot d$$

where $c_{(p, s, m)}$ is the total concentration of saccharides till DP10 in beer (p), sweet wort (s) and wort (m), c_{xi} is measured concentration of individual saccharides in the sample and d is dilution.

The assay of enzymatic cleavage of saccharides in beer for determination of total concentration of all cleavable saccharides contains step which are taken into account in the following equation with related correction factors:

$$c_p = \sum c_{xi} \cdot d \cdot e / f$$

where c_p is the total concentrations of saccharides in beer including glycerol, c_{xi} is the measured concentration of individual saccharides in the sample, d is dilution, e is correction factor of volume after the addition of enzyme to the sample, f is the correction factor (recovery coefficient) of the enzyme efficacy which depends on the alcohol content in beer (see Table 1).

2.5 Validation parameters

Validation parameters such as repeatability, (r_{95}), instrumentation limit of quantification (ILOQ), method limit quantification (MLOQ), and a coefficient of variation at MLOQ concentration in 10 times replication (CV) are given in Table 2.

3 VERIFICATION OF THE METHOD

In order to verify the accuracy of the method, a comparison of the total saccharide concentration with the real beer extract was performed. Usually, the real extract of beer is formed by saccharides, proteins, organic acids, minerals and other minor compounds. Detailed information on the nutritional composition of beer will be published in the following article: Olšovská et al: *The value of beer energy* published in August 2018.

An overview of tested samples, 10 non-alcoholic (samples 1–10) and alcoholic (samples 11–20) beers is given in Table 3.

The total saccharides content in tested non-alcoholic beers ranged from 3.07 to 7.53 g/100 mL with a corresponding extract from 3.17 to 7.94%. This corresponds to 90.5 to 97.9% of the actual extract. An average value of percentage of saccharides in the real extract is 94.3%. The total saccharide content in tested alcoholic beers ranged from 3.19 to 4.35 g/100 mL with a corresponding extract from 3.44 to 5.02%. Also, saccharides in alcohol beers represent 88.44% of the extract in average. A higher percentage of saccharides in the real extract in non-alcoholic beers is caused by a lower degree of fermentation, while the percentage content of other compounds is then lower than with conventional alcoholic beer. Based on these results, it can be stated that the method provides the accurate results (Jurková et al., 2014).

4 MONITORING OF SUGARS AND SACCHARIDES IN CZECH BEERS

Research Institute of Brewing and Malting has been providing the method of "Determination of sugars and total saccharides" since

$$c_{(p, s, m)} = \sum c_{xi} \cdot d$$

kde $c_{(p, s, m)}$ je koncentrace všech sacharidů v pivo, sladně nebo mladě, c_x je změřená koncentrace každého sacharidu a d je příslušné ředění.

Laboratorní postup enzymatického štěpení sacharidů v pivo pro zjištění celkové koncentrace sacharidů, tj. i těch v pivo přítomných ve formě polysacharidů a glycerolu, v sobě zahrnuje kroky, které jsou zohledněny ve výpočtu odpovídajícími korekčními faktory:

$$c_p = \sum c_{xi} \cdot d \cdot e / f$$

kde c_p je celkový obsah sacharidů v pivo včetně glycerolu, c_{xi} je změřená koncentrace jednotlivých sacharidů a glycerolu, d je příslušné ředění, e je korekční faktor změny objemu po přidavku roztoku enzymu a f je korekční faktor účinnosti enzymu, jehož hodnota závisí na obsahu alkoholu v objemových procentech (viz tab. 1).

Table 1 Recovery coefficient in dependence on alcohol content (% vol.)
Tab. 1 Koeficient výtěžnosti v závislosti na obsahu alkoholu (% obj.)

Alcohol (% vol.) Alkohol (% obj.)	Recovery coefficient Koeficient výtěžnosti
0–0.5 %	1
0.5–1 %	0.98
1–2 %	0.97
2–4 %	0.95
4–6 %	0.92
6–10 %	0.9

2.5 Validační parametry

Validační parametry metody, opakovatelnost (r_{95}), limit kvantifikace přístroje (ILOQ), limit kvantifikace metody (MLOQ) a variační koeficient při koncentraci MLOQ a deseti opakováních (CV) je pro jednotlivé sacharidy uveden v tab. 2.

3 OVĚŘENÍ METODY

Pro ověření správnosti metody bylo použito srovnání celkové koncentrace sacharidů s reálným extraktem piva, který je tvořen právě sacharidy, dále bílkovinami, organickými kyselinami, minerálními látkami a dalšími minoritními sloučeninami (podrobné informace o nutričním složení piva budou zveřejněny v následném článku Olšovská et al: *Energetická hodnota piva*, který vyjde srpnu 2018).

V tab. 3 je uveden přehled srovnávaných vzorků, 10 nealkoholických (vzorky 1–10) a 10 alkoholických (vzorky 11–20) piv.

V nealkoholických pivech byl nalezen obsah celkových sacharidů od 3,07 do 7,53 g/100 ml s odpovídajícím rozpětím extraktu od 3,17 do 7,94 %. To odpovídá 90,5 až 97,9 % skutečného extraktu s průměrnou hodnotou 94,3 %. Obsah celkových sacharidů v alkoholických pivech se pohyboval v rozmezí 3,19 až 4,35 g/100 ml s odpovídajícím extraktem 3,44 až 5,02 %. Sacharidy v těchto alkoholických pivech tedy představují 86,5 až 92,7 %. Vyšší procento sacharidů v extraktu v nealkoholických pivech je způsobeno nižším stupněm prokvašení, procentní obsah ostatních sloučenin je pak nižší než u běžného alkoholického piva. Vzhledem k těmto výsledkům lze konstatovat, že metoda poskytuje správné výsledky (Jurková et al., 2014).

Table 2 Validation parameters of the method
Tab. 2 Validační parametry metody

Parameter/ Parametr (g/100 ml)	glucose glukosa	fructose fruktosa	maltose maltosa	DP4 – DP10	glycerol	total saccharides celkové sacharidy
ILOQ	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	–
CV (%)	7.04	9.09	10.3	–	9.61	–
MLOQ	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	–
r_{95}	0.02	0.02	0.02	0.02	0,15	0.2

Table 3 Comparison of results of total saccharides and real beer extracts
Tabulka 3 Srovnání výsledků celkových sacharidů a skutečného extraktu

Sample Vzorek	Real extract Skutečný extrakt (% w/w)	Total saccharides Sacharidy celkové (g/100 mL)	Saccharide percentage Podíl sacharidů (%)
Nonalcoholic/Nealkoholické			
1	3.17	3.07	96.8
2	3.31	3.24	97.9
3	4.58	4.39	95.8
4	4.46	4.31	96.6
5	5.01	4.70	93.7
6	3.70	3.43	92.7
7	4.80	4.48	93.2
8	3.33	3.05	91.7
9	7.94	7.53	94.8
10	3.49	3.16	90.5
Mean/Průměr	4.27	3.70	94.3
Alcoholic/Alkoholické			
11	4.28	3.94	92.1
12	3.44	3.19	92.7
13	4.55	4.03	88.6
14	4.17	3.70	88.7
15	4.09	3.55	86.8
16	4.26	3.74	87.8
17	5.02	4.35	86.7
18	4.59	3.97	86.5
19	4.31	3.74	86.8
20	4.13	3.62	87.7
Mean/Průměr	4.58	4.21	88.44

2012. This method was accredited in 2013 by the Czech Accreditation Institute according to ISO EN 17025, in 2014 it was published in a foreign impacted journal Food Analytical Methods (Jurková et al., 2014) and certified by the Office for food of Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

Many Czech breweries routinely use the analysis of saccharides and sugars for food labelling. The obtained data from 2016 and 2017 were statistically processed and evaluated.

4.1 Determination of oligosaccharides in sweet wort

The profile of oligosaccharides till DP10, which is possible to be performed using the method described above without enzymatic cleavage, is depicted in the Fig. 3. This method is used if we want to know a composition of sweet wort or wort, namely, for the information about the concentration of fermentable sugars. After the integration of chromatographic peaks at the given example in the Fig. 3, we obtain concentrations of particular oligosaccharides. These data are shown in the Table 4; the resulting concentration 8,58 g/100 mL informs about the sum of sugars and oligosaccharides from DP3 to DP10.

4 APLIKACE METODY, MONITORING CUKRŮ A SACHARIDŮ V ČESKÝCH PIVECH

VÚPS metodiku stanovení cukrů a sacharidů pro nutriční značení piva provádí již od roku 2012, v roce 2013 byla akreditována Českým institutem pro akreditaci podle normy ISO EN 17025, v roce 2014 byla metodika publikována v zahraničním recenzovaném časopise Food Analytical Methods (Jurková et al., 2014) a certifikována Úřadem pro potraviny na Ministerstvu zemědělství ČR. Řada českých pivovarů již rutinně využívá metodu stanovení sacharidů a cukrů pro značení těchto hodnot na etiketách. Získaná data za období 2016 a 2017 byla statisticky zpracována a vyhodnocena.

4.1 Stanovení profilu oligosacharidů ve sladně

Na obr. 3 je profil sacharidů do DP10, kterou lze provést popsanou HPLC metodou bez předchozího enzymatického štěpení. Tato metoda je vhodná pro určení sacharidického složení sladiny nebo mladiny, zejména z důvodu obsahu zkvasitelných cukrů. Po integraci

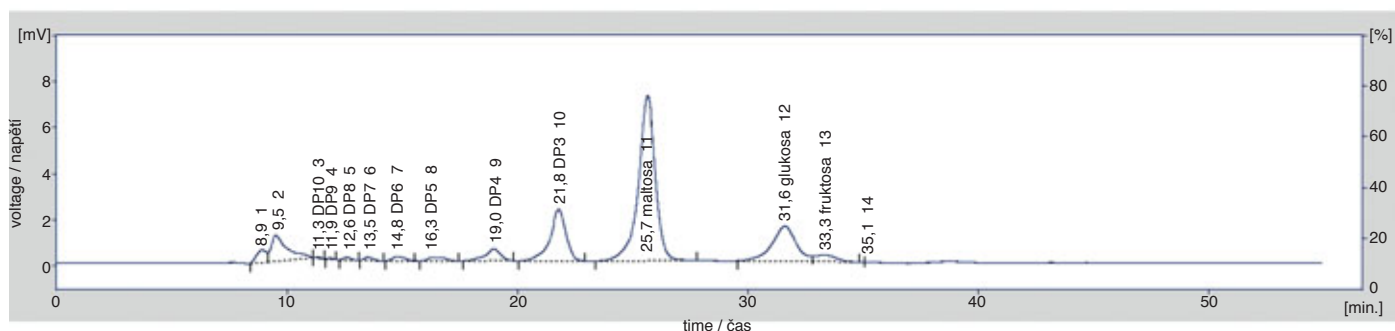


Fig. 3 Separation of dextrins DP10 in sweet wort (without enzymatic cleavage)
Obr. 3 Separace dextrinů DP10 ve sladně (bez enzymatického štěpení)

Table 4 The values of saccharides in model samples
Tab. 4 Hodnoty sacharidů v modelových vzorcích

Saccharide Sacharid	Sweet wort (Fig. 3) Sladina (obr. 3) (g/100 mL)	Beer before cleavage (Fig. 1) Pivo před štěpením (obr. 1) (g/100 mL)	Beer after cleavage (Fig. 2) Pivo po štěpení (obr. 2) (g/100 mL)
Fructose	0.31	0.02	0.07
Glucose	1.48	0.03	4.05
Maltose	4.45	2.18	0.08
DP3	1.44	0.66	0.05
DP4	0.40	0.20	0.00
DP5	0.17	0.06	0.00
DP6	0.14	0.07	0.00
DP7	0.08	0.05	0.00
DP8	0.06	0.05	0.08
DP9	0.03	0.04	0.00
DP10	0.02	0.00	0.00
Sum/Celkem	8.58	3.35	
SUGARS/ČUKRY		2.23	
SACCHARIDES/SACHARIDY			4.55*

* the value corrected using recovery coefficient

* hodnota upravená korekcí na výtěžnost

4.2 Determination of total saccharides and sugars in beer

For the purpose of determining total saccharides and sugars, namely, for beer nutrition labelling, the following procedure is used. Firstly, the sugar content of the beer is measured without enzymatic cleavage. The original beer sample is only diluted, then the glucose, fructose and maltose are determined and counted together with the determination of glycerol. Then, the concentration of sugars is determined. The example of the analysis of sugars is shown in Fig 1 and the respective values are given in Table 4. In the second step, beer is enzymatically cleaved and about 95% of all saccharides are converted to glucose. The content of the resulting glucose and the residual non-cleaved saccharides are determined by the HPLC. The example of the HPLC analysis of total saccharides is shown in Fig. 2 and the respective values are shown in Table 4.

The Table 4 shows a contribution of saccharides above DP10 to the total concentration of saccharides in beer. If we count the separated saccharides in the beer which was not enzymatically cleaved, we will get the concentration of 3.35 g/100 mL (in our specific example). If enzymatic cleavage is performed, the total saccharide concentration is 4.55 g/100 mL. The difference between these two values is 1.20 g/100 mL and corresponds to the concentrations of saccharides above DP10. It is not possible to ignore this amount from the nutritional point of view because it contributes to the total saccharides compounds with 26%. This difference applies to all beers, based on our monitoring, we can say, about 30% of beer saccharides in beer have a higher degree of polymerization than DP10.

5 CONCLUSIONS

The method of saccharides determination by the HPLC with the RI detection on an ion exchange chromatographic column in the Ag⁺ cycle can be used for sugars as well as saccharides determination in beer, sweet wort and wort with the following uses. The first application, which provides information on a mashing efficiency, is the determination of fermentable sugars and oligosaccharide profiles in sweet wort and wort. In this case, the sample is only diluted and immediately chromatographically analyzed. If we want to know the concentration of sugars and glycerol in beer for nutritional labelling of beer, we will use the method in the same way. Finally, to determine the total saccharides concentration in the beer for nutritional labelling, enzymatic cleavage of saccharides to glucose is performed and, subsequently, the glucose is determined by HPLC-RI. The method is well repeatable, it has a good recovery and provides excellent results in interlaboratory tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was developed with the support of the Czech Ministry of Education, Youth and Sport; LO1312 project "Sensory Research Centre in Prague and Brewhouse for research and development – sustainability and development (2014-2019, MSM/LO)".

chromatografických piků uvedeného příkladu získáme hodnoty cukrů a oligosacharidů uvedených v tab. 4. Výsledná koncentrace sacharidů 8,58 g/100 ml udává koncentraci do DP 10.

4.2 Stanovení celkových sacharidů a z toho cukrů v pivu

Pro potřeby stanovení celkových sacharidů a z toho cukrů, zejména pro nutriční značení piva, se používá následující postup. Nejdříve se změří obsah cukrů v pivu bez štěpení, originální pivo se pouze naředí a stanoví se obsah glukosy, fruktosy a maltosy a tyto tři hodnoty se sečtou. Zároveň je stanoven glycerol. Takto získáme hodnotu cukrů. Příklad analýzy je uveden na obr. 1 a příslušné hodnoty jsou uvedeny v tab. 4. V druhém kroku je pivo enzymaticky štěpeno a zhruba 95% všech sacharidů je převedeno na glukosu. Pomocí HPLC stanovení je zjištěn obsah vzniklé glukosy a přičten obsah zbytkových nerozštěpených sacharidů, čímž získáme hodnotu celkových sacharidů. Příklad HPLC analýzy celkových sacharidů je uveden na obr. 2 a příslušné hodnoty jsou uvedeny v tab. 4.

Z tab. 4 je zřejmé, jak velká část sacharidů s vyšším polymeračním stupněm nad DP10 je v pivu obsažena. Pokud sečteme separované sacharidy v pivu, které nebylo štěpeno, získáme v našem konkrétním příkladu hodnotu 3,35 g/100 ml. Pokud provedeme enzymatické štěpení, celková hodnota sacharidů je 4,55. Rozdíl mezi těmito hodnotami, tedy 1,20 g/100 ml, je koncentrace sacharidů nad DP10, které, jak je vidět, nelze z nutričního hlediska zanedbat, neboť tvoří 26% celkové koncentrace sacharidů. Tento rozdíl je platný pro všechna piva, lze konstatovat, že zhruba 30% tvoří v pivu sacharidy s vyšším stupněm polymerace než DP10.

5 ZÁVĚR

Metodu stanovení sacharidů pomocí HPLC s RI detekcí na chromatografické koloně s iontovou výměnou v Ag⁺ cyklu lze využít pro stanovení cukrů i sacharidů v pivu, sladinech i mladinech s následujícími možnostmi využití. První aplikace, která poskytuje informaci o účinnosti rmutování, je stanovení profilu zkvasitelných cukrů a oligosacharidů ve sladinech a mladinech. V tomto případě je vzorek pouze vhodně naředěn a ihned chromatograficky analyzován. Pokud chceme znát koncentraci cukrů a glycerolu v pivu pro nutriční značení piva, použijeme metodu stejným způsobem. Konečně pro zjištění celkové koncentrace sacharidů v pivu pro nutriční značení provedeme enzymatické štěpení na glukosu a tu pak stanovíme metodou HPLC-RI. Metoda je dobře opakovatelná, má dobrou výtěžnost a v rámci mezilaboratorních testů poskytuje výborné výsledky.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována za podpory projektu LO1312 „Výzkumné sensorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj“, MŠMT, Česká Republika.

REFERENCES / LITERATURA

- EBC, 2009a: Metoda EBC 8.7. Fermentable Carbohydrates in Wort by HPLC. EBC Analysis Committee: Analytica-EBC, Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 2009.
- EBC, 2009b: Metoda EBC 9.27. Fermentable Carbohydrates in Beer by HPLC. EBC Analysis Committee: Analytica-EBC, Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 2009.
- EU, 2008: Nařízení Komise (EU) č. 900/2008, kterým se stanoví metody analýzy a jiná technická ustanovení nezbytná k provádění dovozního režimu pro určité zboží vzniklé zpracováním zemědělských produktů.
- EU, 2010: Nařízení komise EU č. 117/210, odst. 3, Stanovení obsahu škrobů (dextrinů) podle Nařízení Komise (ES) č. 904/2008 ve znění nařízení komise (EU) č. 118/210.
- EU, 2011: Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 „O poskytování informací spotřebitelům“.
- Jurková, M., Čejka, P., Štěrbá, K., Olšovská, J., 2014: Determination of total carbohydrate content in beer using its pre-column enzymatic cleavage and HPLC-RI. *Food Analytical Methods*, 7(8), 1677-1686.
- MEBAK, 2013a: Metoda MEBAK 2.7.2 Fermentable carbohydrates. Fritz Jacob (ed.), MEBAK – Wort, Beer, Beer-based Beverages, Freising-Weihenstephan, 2013.
- MEBAK, 2013b: Metoda MEBAK 2.7.3 Total Carbohydrates. Fritz Jacob (ed.), MEBAK – Wort, Beer, Beer-based Beverages, Freising-Weihenstephan, 2013.
- Phenomenex, 2014: Application Detail (App ID: 5507) <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/5507>

Manuscript received / Do redakce došlo: 10/01/2018
Accepted for publication / Přijato k publikování: 21/02/2018