

刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β -葡聚糖

李永仙 尹象胜 顾国贤 陆 健

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

摘要 研究了以刚果红分光光度法测定麦汁及啤酒中的 β -葡聚糖, 探讨了实验条件, 在 pH8.0 的条件下, 刚果红和水溶性的 β -葡聚糖(分子量 $10^3 \sim 10^4$) 形成有色物质, 摩尔吸光系数为 $9.64 \times (10^3 \sim 10^4) \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 当参加反应的 2.0ml β -葡聚糖溶液中 β -葡聚糖的含量为 0 ~ 100 μg 时, 反应液吸光度的变化符合比耳定律, 变异系数 1.1% ~ 5.1%, 标样的回收率在 90.2% ~ 98.6% 之间, 测定麦汁或啤酒中的 β -葡聚糖时, 变异系数为 3.7% 左右。

关键词 刚果红; β -葡聚糖; 分光光度法

中图分类号 TS262.5

0 前 言

β -葡聚糖是大麦胚乳细胞壁的主要成分, 含量因大麦品种、产地、种植年份、自然条件而异, 一般占 5.0% ~ 9.5% (大麦的绝干量), 细胞壁中 β -葡聚糖大多是分子量为 $10^7 \sim 10^8$ 的高分子化合物, 在制麦汁过程中受到麦芽 β -葡聚糖酶不同程度水解, 其中间产物分子量 $10^3 \sim 10^4$, 为热水可溶性物质, 能进入麦汁, 再进入啤酒中。含量过高(如 $> 200 \text{ mg/L}$) 会造成麦汁或啤酒粘度高, 过滤困难, 形成啤酒早期混浊^[3]。含量过低($< 80 \text{ mg/L}$) 造成啤酒口味淡薄, 因此控制麦芽和啤酒中的 β -葡聚糖含量是当今啤酒界关心的问题。

文献[8]报道了 β -葡聚糖的测定方法。传统的 Phenol Sulphuric^[4], 包括麦汁同硫酸铵在 0 ~ 4 下长达 20h 的平衡过程, 现该法已逐渐被更新的方法取代。酶法^[6]包括酶反应的三个步骤, 但测定的是 β -葡聚糖的总含量。近年来, 许多研究人员开始采用流动注射分析仪的荧光法测定 β -葡聚糖^[1,5,7], 然而 Flurochrome Calcofluor 与 β -葡聚糖的结合能力会受到 Calcofluor 的发光及实验条件如 pH 值、缓冲液的离子强度和试剂浓度的影响^[1]。

据报道, 刚果红与 β -葡聚糖的结合具有高度的专一性^[9]。虽然反应呈现出随 β -葡聚糖的分子量变化而变化的特征, 但对变化的 β -葡聚糖的分子量而言, 刚果红和 Calcofluor 的敏感性显示, 两种试剂与 β -葡聚糖的反应具有相似的结构模式^[2], 而实验表明, 刚果红法更简便、快捷、实用。

1 实验仪器及试剂

1.1 仪器

721 型分光光度计 pH.87-3 型酸度计

1.2 试剂

大麦 β -葡聚糖 Sigma 公司产品; 刚果红(Congo Red) Fluka 产品;
 β -葡聚糖标准溶液 准确称取 0.0010g 大麦 β -葡聚糖, 加少量蒸馏水, 70℃ 水浴助溶, 冷却至室温后定容至 10ml, 冰箱贮存备用, 使用前配制成 0.1mg/ml 的溶液;
刚果红溶液 0.1000 克刚果红溶于 0.1mol/L pH8.0 的磷酸缓冲液中, 定容至 1L;
酒样 市售 12 P Lager 型啤酒

表 1 标准 β -葡聚糖溶液的稀释

试管组号	标准 β -葡聚糖溶液 (100 μ g/ml)	蒸馏水	稀释 β -葡聚糖溶液 浓度 (μ g/2.0ml)
0	0	2.0	0
1	0.25	1.75	25
2	0.50	1.50	50
3	0.75	1.25	75
4	1.00	1.00	100
5	1.25	0.75	125

2 试验方法

2.1 标准曲线绘制

取 6 组试管, 除 0 号为 1 只外, 其余均为 3 只平行管, 按表 1 将标准 β -葡聚糖溶液进行稀释。以上各试管中, 分别加 4.0ml 刚果红溶液摇匀, 20℃ 下准确作用 10min, 用 1.0cm 的比色杯, 于 550nm 波长下测定吸光度, 以 0 号管中反应液作空白调零。

2.2 样品分析

吸取 0.1ml 麦汁或啤酒, 依次加 1.9ml 蒸馏水, 4.0ml 刚果红, 20℃ 下准确反应 10min, 以 2.0ml 蒸馏水代替样品作空白, 测定吸光度, 根据标准曲线即可得知样品中的 β -葡聚糖含量。

3 条件确定

3.1 最大吸收波长

按试验方法测试试剂及反应液的吸收光谱及差谱, 最大吸收分别为 480nm, 500nm, 且在 550nm 处有最大差谱, 所以选择测定波长为 550nm, 吸收光谱和差谱分别见图 1 和图 2。

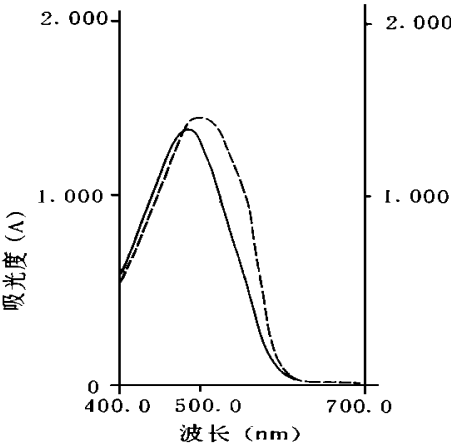


图 1 吸收曲线

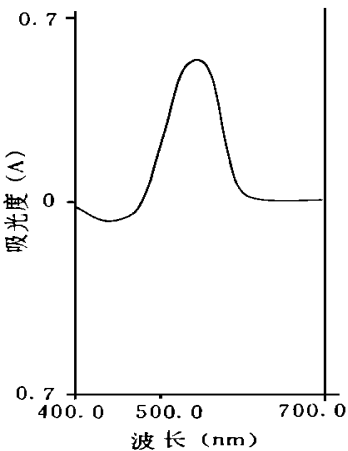


图 2 差谱

3.2 pH 对测定的影响

1) 配制不同酸度的刚果红溶液: 用不同 pH 值浓度为 0.2mol/L 的磷酸缓冲液与等体积的浓度为 200mg/L 蒸馏水的刚果红溶液混匀备用。

2) β 葡聚糖标准溶液 2.0ml, 分别加入以上不同酸度的刚果红溶液 4.0ml; 2.0ml 蒸馏水加入相对应的刚果红溶液作空白测定吸光度, 结果见图 3。

由图 3 可知, pH 在 7.8~8.4 之间, 吸光值较大, 选择反应时的 pH 为 8.0。

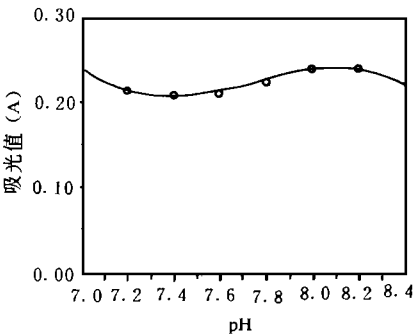


图 3 吸光度- pH 曲线

3.3 反应时间的选择

按试验方法, 测定了反应液在 5~12min 内吸光度的变化, 结果见图 4。

由上结果, 实验中选择刚果红与 β -葡聚糖的反应时间为 10min。

3.4 作用温度的选择

按试验方法, 测定了在不同温度下反应液的吸光度变化, 结果见图 5。

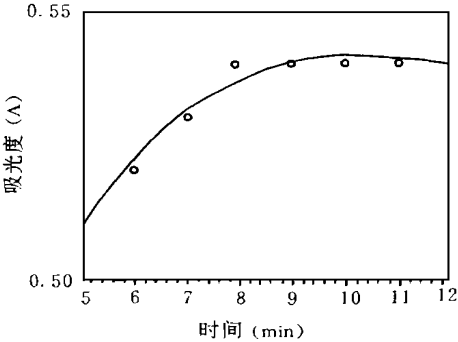


图 4 吸光度- 时间变化曲线

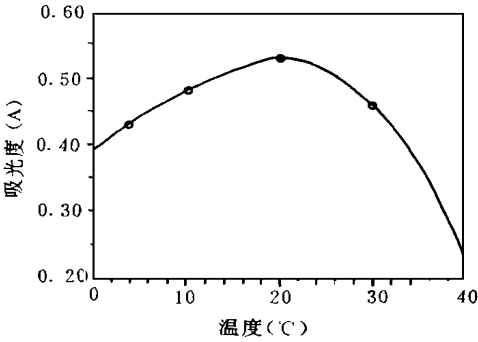


图 5 吸光度- 温度变化曲线

由图 5 可知, 温度对反应液吸光度的变化有较明显的影响, 温度为 20 时, 吸光度最大, 因此选 20 的反应温度。

3.5 被测样品的添加量对测定结果的影响

将麦汁稀释 10 倍、吸取 0.25~1.25ml 加蒸馏水定体积为 2.0ml, 按试验方法测定吸光度, 结果见图 6。同样方法, 啤酒的测定结果见图 7。

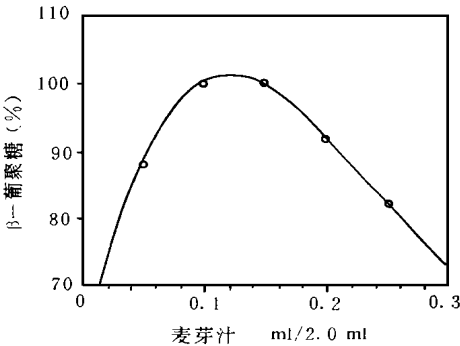


图 6 麦汁取样量对 β -葡聚糖回收率的影响

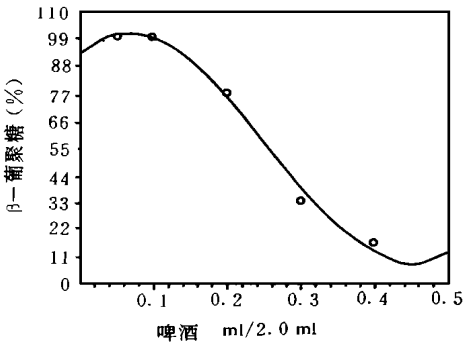


图 7 啤酒取样量对 β -葡聚糖回收率的影响

根据图 6, 图 7 结果, 取 0. 1ml 待测样品, 依次加入标样及蒸馏水, 按试验方法, 测定标样的回收率, 结果见表 2.

表 2 标样的回收率

	麦 汁					啤 酒				
样品体积 (ml)	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10	0. 10
0. 1mg/ ml 的标样体积 (ml)	0. 10	0. 20	0. 30	0. 40	0. 50	0. 10	0. 20	0. 30	0. 40	0. 50
蒸馏水 (ml)	1. 80	1. 70	1. 60	1. 50	1. 40	1. 80	1. 70	1. 60	1. 50	1. 40
β -葡聚糖 ($\mu\text{g}/2.0\text{ml}$ 混合样)	24. 67	34. 24	45. 14	55. 72	64. 19	20. 43	30. 37	39. 26	47. 94	56. 41
测得 β -葡聚糖 (混合样- 样品含量)	10. 46	20. 03	30. 93	41. 51	49. 98	9. 10	19. 04	27. 93	36. 61	45. 08
实际加入标样 ($\mu\text{g}/2.0\text{ml}$)	10. 61	21. 83	32. 20	44. 26	53. 01	10. 00	20. 00	30. 00	40. 00	50. 00
标样回收率 (%)	98. 40	91. 75	96. 05	93. 78	94. 28	91. 00	95. 20	93. 10	91. 53	90. 16

0. 1ml 样品含 β -葡聚糖: 麦汁中含 14. 12 μg , 啤酒中含 11. 33 μg

由以上结果可知, 当被测样品取量为 0. 1ml 时, 能较准确地测得样品中的 β -葡聚糖含量.

3. 6 氧化、还原物质对测定结果的影响

按试验方法, 测得结果见表 3 和表 4.

表 3 添加物对标样测定的影响

	标样 β -葡聚糖	标样+ VC	标样+ H_2O_2
含量 ($\mu\text{g}/2.0\text{ml}$)	100	100+ 3	100+ 300
吸光度 A	0. 270	0. 275	0. 265
	0. 275	0. 283	0. 265
$\bar{A}$	0. 273	0. 274	0. 265

表 4 添加物对啤酒中的 β -葡聚糖测定的影响

酒 样*	啤 酒 (T)			啤 酒 (Q)		
	酒+ 水	酒+ VC 液	酒+ H_2O_2	酒+ 水	酒+ VC 液	酒+ H_2O_2
所加体积 (ml)	1. 0+ 1. 0	1. 0+ 1. 0	1. 0+ 1. 0	1. 0+ 1. 0	1. 0+ 1. 0	1. 0+ 1. 0
吸光度 A	0. 035	0. 038	0. 036	0. 172	0. 177	0. 179
	0. 033	0. 035	0. 035	0. 174	0. 177	0. 176
$\bar{A}$	0. 034	0. 038	0. 036	0. 173	0. 177	0. 178
β -葡聚糖 (mg/ L)	63. 12	66. 39	64. 23	361. 60	363. 21	364. 20

* 酒样除气后稀释 10 倍; VC 及 H_2O_2 的浓度分别为 300mg/ L, 101mg/ L.

从表 3 和表 4 中的结果可以看出, 氧化还原物质对 β -葡聚糖的测定结果无明显影响.

4 试验结果

4. 1 β -葡聚糖的标准曲线

按试验方法绘制 β -葡聚糖的标准曲线, 见图 8.

由曲线可得, 当 β -葡聚糖浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对应的吸光度为 0. 241, 由此可得摩尔系数 $9. 64 \times (10^3 \sim 10^4) \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 桑德尔灵敏度为 $1. 04 \times$

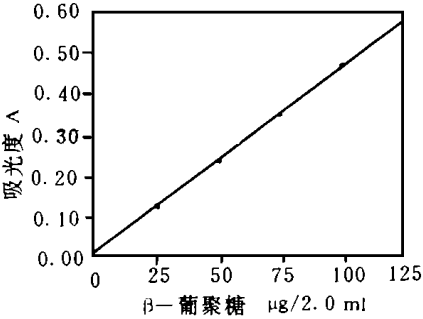


图 8 β -葡聚糖的标准曲线

($10^{-1} \sim 10^{-2}$) μgcm^{-2} , 变异系数在 1.1% ~ 5.1% 之间, 取曲线中的前 5 个点进行线性回归, 得相关系数 0.996. 近似得到麦汁(或啤酒)中的 β -葡聚糖含量:

$$\beta\text{-葡聚糖含量}(\text{mg/L}) = [(A - b) / a] \times \frac{1}{V} \times 2.0$$

式中 V 麦汁或啤酒的吸取体积(本试验中为 0.10ml)

a, b 常数(曲线回归方程所得)

2.0 参加反应的样品体积(0.10ml 样品加 1.9ml 蒸馏水)

A 在 550nm 处样品的吸收值

进而得到麦芽中的水溶性 β -葡聚糖的含量:

$$\beta\text{-葡聚糖}(\text{mg}/100\text{g 绝干麦芽}) = \frac{\text{麦汁中的 } \beta\text{-葡聚糖的含量}(\text{mg}/100\text{ml})}{D \times (100 - G)} \times \frac{(800 + w) \times 100}{100 - w}$$

式中 w 麦芽水份的百分含量

D 协定麦汁容重

G 麦芽汁浸出物的质量分数

4.2 样品分析结果

按样品分析方法, 测定几种麦芽协定糖化过滤麦汁及几种市售啤酒中的 β -葡聚糖含量, 结果见表 5 和表 6.

表 5 麦芽糖化过滤麦汁中的 β -葡聚糖

麦芽品种 (麦芽来源)	江苏冈二 (实验室自制)	加麦麦芽 (进口)	新疆莫特 44 (实验室自制)	甘肃匈 84 (实验室自制)	江苏冈二 (南京麦芽厂)
过滤麦汁浸出物	8.048	8.756	8.244	8.634	8.317
β -葡聚糖 mg/L 麦汁	334.7	156.9	173.9	156.6	199.3
β -葡聚糖 mg/L 8.6 P 麦汁	357.7	154.1	181.4	150.0	206.1
β -葡聚糖 mg/100g 绝干麦芽	304.4	140.8	156.5	136.3	179.6

表 6 几种市售 12 P Lager 型啤酒中的 β -葡聚糖

酒 样 (出品厂)	青岛啤酒 (青岛二啤)	青岛啤酒 (青岛一啤)	中德啤酒 (武汉中德长啤)	太湖水啤酒 (无锡啤酒厂)
β -葡聚糖 mg/L 啤酒	427.2	361.6	114.9	60.1

注: 表中所列酒样为 1993 年市售啤酒

麦汁经过 6 次平行测定, 变异系数为 3.7%.

5 结论

- 1) 利用刚果红分光光度法能够较准确、方便、快速地测定出麦汁或啤酒中的 β -葡聚糖含量。
- 2) 从实验结果可以看出, 当参加反应的麦汁或啤酒实际用量为 0.10ml 时, 测定结果有较高的准确性. 随着用量的增加, 测定数值准确性下降, 出现这种现象的原因, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on betaglucan in Congress Wort by Fluorescence Method. J. ASBC, 1991, 49: 187 ~ 189
- 2 Anderson I W. The effect of beta-glucan molecular weight on the sensitivity of dye binding assay procedures for beta-glucan estimation. J. Inst. Brew, 1990, 96: 323 ~ 326
- 3 Bamforth C W. Barley beta-glucans, their role in malting and brewing. Brew. Dig. 1982, 57: 22 ~ 27
- 4 Erdal K, Gjirsen P. Beta-glucans in malting and brewing part 2, the fate of beta-glucans during malting. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 11th. Madrid. 1967. 295
- 5 Jorgensen K G, Jensen S A, Harley P, et al. The analysis of beta-glucan in wort and beer using calcofluor. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 20th Helsinki. 1985. 403 ~ 410
- 6 Mcleary B V, Nurthen E. Measurement of 1, 3; 1, 4-beta-D-glucan in malt, wort and beer. J. Inst. Brew, 1986, 92: 168 ~ 173
- 7 Switala K J, Schick K G, Griffith A, et al. Rapid determination of beta-glucan in wort by flow injection analysis. J. ASBC, 1989, 47: 54 ~ 56
- 8 Ullrich S E, Clancy J A, Cuti J G, et al. Analysis of beta-glucans in barley and malt: a comparison of four methods. J. ASBC, 1991, 49: 110 ~ 115
- 9 Wood P J, Kulcher R G. Cereal Chem, 1978, 55: 952

Measurement of B-Glucans in Wort and Beer by Congo Red

Li Yongxian Yin Xiangsheng Gu Guoxian Lu Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract A spectrophotometric method for analysis of soluble B-glucan in wort and beer and methods of experiment have been studied in this paper. 2.0ml of B-glucan ($0 \sim 59\text{mg/L}$, molecular weight is $10^3 \sim 10^4$) mixed with 4.0ml congo red solution (100mg/L in 0.1M pH 8.0 phoshpato buffer) forms a coloured complex. The apparent molar absorptivity of $9.64 \times 10^3 \sim 9.64 \times 10^4 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ goes in agreement with Beer's law. The variation and recovery rate by using this method are within 1.1% ~ 5.1% and 90.2% ~ 98.6% respectively. The variation is 3.7% in detecting the soluble B-glucan in wort or beer.

Key-words congo red; β -glucan; spectrophotometry