

Bílkoviny v pivovarství. I. Dusíkaté složky ječmene a sladu

MILENA KOTRLÁ-HAPALOVÁ, Ústřední laboratoř Pražských pivovarů, n. p., Praha-Smíchov

653.4 + 547.9

Tvorba nebiologických zákalů je dnes nejaktuálnější otázkou pivovarské výroby. Souvisí úzce se zvýšeným výstavem lahví, s nutností zavádět nové materiály ve výrobě i transportu a hlavně se stoupající náročností odběratele na vzhled a jakost výrobků. Dusíkaté složky ječmene a sladu jsou podstatnou částí všech nebiologických zákalů. Referát obsahuje přehled poznatků o biochemických přeměnách a chemických reakcích těchto složek v jednotlivých výrobních fázích.

Přestože bílkoviny tvoří v celkovém extraktu mladiny pouze malý podíl [podle Lüerse (1) 3,1—5,6 %], má jejich vztah k ostatním extraktivním látkám ječmene a sladu mimořádný technologický význam. Vzhledem k charakteru výroby sladu a piva lze je právem zařadit k nejdůležitějším složkám, neboť relativně nejvíc ovlivňují průběh výroby a konečné vlastnosti výrobku.

Problém bílkovin se v pivovarství, stejně jako ve všech ostatních oblastech, sleduje na podkladě dílčích analytických poznatků, jejichž vzájemná souvislost se doplňuje empirickými zkušenostmi. Ale přesto je dnes tento problém zvládnut v pivo-

varství natolik, že dovoluje podat z hlediska současných znalostí ucelený obraz o hlavních funkcích bílkovin a tím umožňuje do značné míry usměrňovat a řídit výrobní postup podle požadavků optimální racionalizace výroby.

Bílkoviny, které se uplatňují při výrobě piva, jsou několikerého původu a různých vlastností. V extraktu sladiny jsou bílkoviny z ječmene, popř. ze sladu. Při chmelovaru přechází do extraktu mladiny malý podíl dusíkatých složek ze chmele. Při kvašení a dokvašování se dostávají do piva bílkoviny z kvasnic.

Dusíkaté složky sladu

Podstatná část bílkovin sladiny a piva pochází z ječmene, použitého k výrobě sladu. V normálním dozrálém ječmenu je téměř všechen dusík ve formě vysokomolekulárních bílkovin, pouze malá část je ve formě dusíku amoniakálního. Obsah bílkovin v ječmenu kolísá mezi 7–18 %, u dobrých ječmenů se udává rozmezí 9–12 %. Množství bílkovin v ječmenu závisí na mnoha faktorech vnějších i vnitřních (odrůda, klima, agrotechnika). Je to významný ukazatel jakosti ječmene, který ovlivňuje celou další sladařskou i pivovarskou výrobu. Podle požadavků průmyslu se hodnotí obsah bílkovin v ječmenu (2):

pod	7,5 %	jako nepříznivý,
	7,5–9,0 %	jako příznivý,
	9,0–10,5 %	jako optimální,
	10,5–11,0 %	jako příznivý,
nad	11,0 %	jako nepříznivý.

Nízký obsah bílkovin se projevuje závadami v plnosti chuti a pěnlivosti piva, popř. ve výživě a činnosti kvasnic. Vysoký obsah bílkovin způsobuje sklovitost zrna, piva vyrobená z takových ječmenů vytvářejí snadno bílkovinné zákaly (3).

Dělení bílkovin ječmene, zpravidla v souvislosti s dělením bílkovin sladu, byla věnována řada prací a studií, z nichž lze uvést např. práce (4, 5, 6). Závěry z těchto prací jsou však již většinou překonány. Všeobecně se dodnes akceptuje dělení Osbornovo (7), podle něhož jsou v ječmenu:

albumin (leukosin), rozpustný ve vodě a ve zředěných roztocích solí, kyselin a zásad,

globulin (edestin), nerozpustný ve vodě, rozpustný v roztocích solí,

prolamin (hordein), s vysokým obsahem glutaminu, rozpustný v 70 % alkoholu, v kyselinách a v alkáliích,

glutelin, nerozpustný ve vodě, alkoholu a roztocích solí, rozpustný ve zředěných alkáliích a v roztocích redukadel, např. kyseliny askorbové.

Osbornovo třídění se potvrdilo pozdějšími významnými pracemi Bishopovými (8).

Kromě pravých bílkovin je v ječmenu ještě malé množství [asi 7 % z celkového obsahu bílkovin (9)] štěpných produktů bílkovin — proteóz, které v průběhu zrání a uskladnění ječmene přecházejí postupně ve vysokomolekulární bílkoviny. Ve vodném výluhu ječmene bylo nalezeno malé množství cholinu a malá část celkového obsahu dusíkatých látek připadá na kyseliny nukleínové.

Podrobné třídění bílkovin ječmene provedl Quenel (10). Zjistil, že albuminová frakce je homogenní protein, globulinová frakce se skládá ze čtyř různých složek, které nazval α , β , γ , a δ -globulin. Hordein považoval rovněž za homogenní bílkovinu. Ultracentrifugou stanovil molekulové hmoty jednotlivých frakcí, a to pro albumin 35 000, α -globulin 26 000, β -globulin 100 000, γ -globulin 166 000, δ -globulin 300 000, hordein 27 000. Jeho zjištění doplnili později Biserte a Scriban (11), kteří ukázali, že hordein je složen z pěti frakcí, nazvaných a , b , c , d , e , které všechny mají velmi blízké molekulové hmoty. Tito autoři provedli velmi podrobný výzkum v bílkovinách ječmene, jehož závěry jsou uvedeny dále.

Studiem vztahu mezi celkovým obsahem dusíkatých složek a procentovým poměrem jednotlivých

bílkovin ječmene se zjistilo, že složení bílkovin je závislé na množství celkového dusíku (12, 13, 14). S jeho stoupajícím obsahem přibývá podíl bílkovin rozpustných v solích (leukosin a edestin) pomaleji, podíl hordeinu rychleji. Glutelinová frakce stoupá úměrně s obsahem celkového dusíku (15). Trkan aj. (16) nazývají konstantní procentový podíl glutelinu z celkového množství dusíkatých látek ječmene „glutelinovou konstantou“, jejíž hodnota je charakteristická pro každou odrůdu. Stanovení jednotlivých bílkovinných frakcí ječmene lze tedy používat při rozlišování a posuzování odrůd.

Pro praxi je důležitá závislost mezi množstvím dusíkatých látek v ječmenu a extraktem vyrobeného sladu. Nejlépe se osvědčila formulace Bishopova (17), přizpůsobovaná dalšími autory (18, 19; krajovým a odrůdovým odchylkám ječmene. Pravděpodobný extrakt ve sladu se vypočte z množství bílkovin a váhy 1000 zrn ječmene; ve vzorci Schusterova a Grünwalda (20) je rovněž uveden váhový podíl pluch.

Při výrobě piva se ječné bílkoviny neuplatňují v původní formě, nýbrž rozštěpené z valné části na nižší a rozpustné štěpné produkty. Štěpení probíhá při máčení a klíčení ječmene, částečně i při hvozdění zeleného sladu, ve varně pokračuje při rmutování a scezování. Enzymy potřebné k přeměně dusíkatých látek jsou přítomny v ječném zrně. Jejich činnost je nejvyšší v době výstavby zrna, po sklizni přecházejí do téměř latentního stavu a za vhodných podmínek nastává při klíčení opět bouřlivá činnost enzymů. Klíčení ječmene charakterizují dva základní protichůdné procesy: spotřeba zásobních látek zrna a stavba nových tkání. Při vývinu nové rostliny klíčením zrna v zemi se spotřebuje celá hmota rezervních látek. Naproti tomu při klíčení zrna ve sladovně musí být proces veden tak, aby maximální podíl štěpitelné hmoty a enzymů byl zachován pro další využití ve výrobě.

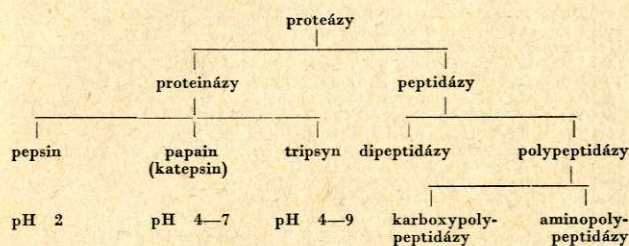
Při výrobě sladu mají enzymy ječmene důležitou úlohu v procesu rozrušování strukturních látek, tj. tkání buněčných stěn, při přeměně škrobu a při štěpení bílkovin. Intenzita enzymových procesů, jimiž se při sladování ječmene vytvoří požadované rozpustné součásti, určuje stupeň rozluštění zrna. Rozluštění zrna souvisí úzce s velmi důležitým, ale dosud málo prozkoumaným pochodem, nazývaným cytolyza. Brown a Morris (21) první zaznamenali činnost enzymu cytázy, která napadá hlavně buněčné stěny endospermu. Cytolyza je však výsledkem působení celého komplexu enzymů. Lüers a Volkammer (22) dokázali jako dílčí enzym tohoto komplexu xylanázu. Preece (23) rozlišuje enzymy cytoklastické, které převádějí nerozpustné gumovité látky do rozpustné formy a enzymy cytolytické, které katalyzují hlubší hydrolýzu. Preece a Hoggan (24) uvádějí, že rozrušování struktury buněčných stěn ječného zrna se účastní čtyři enzymové systémy: endo- β -glukosanáza, exo- β -glukosanáza, celobiáza a blíže nespecifikovaný transglukolyzační systém. Zdá se, že rozpouštění buněčných stěn endospermu, které otvírá pole působnosti pro ostatní enzymy, je společným výsledkem mechanického pronikání a enzymových účinků.

Dusíkaté složky ječmene

Kvalitativní změny bílkovin při sladování byly systematicky prostudovány teprve v nedávné době,

kdy byly překonány metodické potíže, s nimiž je spojena kontrola rozkladných reakcí bílkovin a kvantitativní stanovení proteáz.

Při klíčení nastává účinkem proteolytických enzymů hluboké rozštěpení vysokomolekulárních bílkovin na jednodušší složky. Proteolytické enzymy se podle Lüerse (1) dělí:



Proteinázy štěpí vazby $-CO-NH-$, které jsou vzdálené od dissociujících skupin, např. $-NH_2$, $-COOH$. Peptidázy napadají složky peptidů, které jsou v blízkosti dissociujících skupin.

Bylo zjištěno, že enzymové změny bílkovin ječmene nastávají převážně při klíčení (25), při hvozdní probíhají u světlých sladů už jen nepatrné (26), u tmavých sladů o něco podstatnější změny (27, 28). Z proteolytických enzymů se v klíčícím ječmenu uplatňuje jedna proteináza typu papainu (katepsinu), s optimálním účinkem při pH kolem 5,0, a dvě peptidázy — leucylglycin s optimálním pH kolem 8,6 a alanylglycin s optimálním pH při 7,8.

Albumin a globulin se při klíčení celkem nemění. Reseršní bílkoviny (hordein a glutelin) jsou v ječném zrně soustředěny v buňkách aleuronové vrstvy, kde je podle Engela a Heinse (29) rovněž hlavní podíl proteinázy (typu katepsinu) a dipeptidázy. Nerozpustné bílkovinné složky (hordein a glutelin) jsou postupně přeměňovány v bílkoviny rozpustné v solích tak, že z počátku se silně štěpí hlavně hordein, s postupujícím klíčením jeho štěpení slábne, až klesne pod stupeň štěpení glutelinu. Štěpení glutelinu naopak začíná mírně až po vzniku klíčku, z počátku probíhá jen v omezené míře, s vývinem kořínku se zesiluje, ke konci klíčení opět pomalu slábne. Rose a Anderson (30) dokázali, že v klíčku nenastává resyntéza hordeinu, ze štěpných produktů obou bílkovin si klíček bude pouze glutelin.

Proteolýza nastupuje při klíčení dříve než jiná enzymová činnost (amylolýza) a dosahuje při normálním způsobu sladování maxima již pátý den, kdy se zpravidla ustavuje rovnováha mezi štěpením bílkovin v zrně a tvorbou nových bílkovin v klíčku. Bylo dále zjištěno, že přítomnost proteolytických enzymů podstatně podporuje sacharogenní schopnost ječmene (31, 32).

Kvantitativní poměry dusíkatých složek, měnící se v průběhu sladování ječmene, byly sledovány ve starších pracích např. stanovením množství hordeinu a glutelinu (33), veškerého a rozpustného dusíku (34, 35) nebo titrací aminokyselin (36). Autoři shodně rozdělili klíčení do tří hlavních časových úseků, vymezených povahou probíhajících změn. V I. fázi (asi 100 hodin včetně máčení) nenastávají kvantitativní změny dusíkatých složek, ve II. fázi (dalších 100 hodin, tj. zhruba 3.—6. den klíčení) nastává silný rozpad hordeinu a glutelinu a vzestup aminokyselin, ve III. fázi (od 7. dne klíčení) nastupuje rovnovážný stav mezi proteolýzou a proteosyntézou.

Původní názor Osbornův (37), že bílkoviny sladu jsou odlišné od bílkovin ječmene, byl vyvrácen pozdějšími pracemi Kraftovými (35) a Lüersovými (38), které prokázaly, že Osbornův sladový bynin je totožný s hordeinem a bynedestin s edestinem.

Při sledování globulinové frakce ječmene a sladu pomocí ultracentrifugy zjistil Sandegren (39), že α - a β -globulinová frakce jsou v ječmeni i ve sladu a že jsou sladovacím procesem jen mírně napadány, γ -frakce se při sladování odbourávají částečně a δ -frakce úplně.

V podrobné práci sledovali Biserte a Scriban (loc. cit. 11) aminokyseliny, bílkoviny rozpustné v solích a bílkoviny rozpustné v alkoholu v jednotlivých fázích výroby sladu.

V ječmenu stanovili dialýzou a papírovou chromatografií tyto aminokyseliny: kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, serin, glycin, alanin, valin, leucin, kyselinu γ -aminomáselnou, asparagin, histidin, lysin, stopy methioninu a prolinu.

Albumin-globulinovou frakci rozdělili elektroforézou na dvě složky. Při elektroforéze hordeinu našli pět různých frakcí, v jejichž hydrolyzátu byly stanoveny aminokyseliny: kyselina asparagová, kyselina glutamová, cystin, glycin, threonin, alanin, tyrosin, valin, leucin, fenylalanin, histidin, lysin, arginin a prolin.

V hydrolyzátu glutelinové frakce ječmene našli kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, serin, glycin, threonin, alanin, tyrosin, valin, leucin, fenylalanin, prolin, histidin, arginin a lysin.

Při klíčení ječmene zjistili v I. fázi tyto aminokyseliny: kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, serin, glycin, alanin, valin, leucin, kyselinu γ -aminomáselnou, histidin, lysin, arginin, stopy prolinu, ethioninu a β -alaninu. Ve II. fázi klíčení nastává silná proteolýza a další uvolnění aminokyselin. Nově se objevuje threonin, tyrosin, fenylalanin, asparagin, tryptofan a glutamin a nastává další vzestup alaninu, valinu, leucinu, později také asparaginu, histidinu, kyseliny γ -aminomáselné a leucinu. Ve III. fázi se již neobjevují nové aminokyseliny a dochází k postupnému poklesu kyseliny asparagové.

V albumin-globulinové frakci byly v různých stádiích klíčení nalezeny elektroforézou vždy dvě složky, odpovídající původním složkám ječmene. Při klíčení ječmene nenastává tedy v této frakci žádná podstatná změna. Rovněž v hordeinové frakci byly nalezeny stejné složky jako v původním ječmeni (a, b, c, d, e), ale vlivem proteolýzy značně kvantitativně změněné. Metabolicky důležité aminokyseliny vznikají hlavně při štěpení hordeinu.

V hotovém sladu stanovili aminokyseliny: kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, serin, glycin, threonin, alanin, tyrosin, kyselinu γ -aminomáselnou, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, prolin, histidin, lysin, arginin, asparagin, glutamin, cystin a tryptofan. Při hvozdní sladu se tedy složení aminokyselin podstatně nemění.

Složení albumin-globulinové frakce zůstává stejné jako v původním ječmeni a zeleném sladu. Významnější změny byly zaznamenány pouze u frakce hordeinové, kde ještě při hvozdní nastává vlivem proteolýzy další kvantitativní úbytek některých složek.

Značné pokroky ve výzkumu dusíkového metabolismu zrna přineslo použití radioaktivních izotopů, hlavně N^{15} . Zjistilo se např., že klíček, kultivovaný na roztocích fosforečnanu amonného s N^{15} ,

uskutečňuje ihned rychlou syntézu glutaminu a potom pomalejší syntézu asparaginu. Všechny vytvořené aminokyseliny a bílkoviny obsahovaly všechny svůj dusík jako N¹⁵.

Rozluštění bílkovin se určuje buď přímo stupněm proteolýzy (40, 41) nebo nepřímým sledováním změn některých dusíkatých složek ječmene zrna, např. stanovením dusíku rozpustného a koagulovatelného (42), rozpustného a celkového (43, 44), formolového (45), hordeinového (46) nebo edestinového (47). Tyto způsoby mohou sloužit jen jako srovnávací metody, neboť rozluštění bílkovin je ovlivňováno ještě řadou faktorů, zejména odrůdou ječmene (48), velikostí zrna (49), teplotou a délkou vedení sladu (50), zralostí zrna (loc. cit. 14), stupněm domočení, větráním a hlavně celkovým obsahem bílkovin ječmene. Stupeň rozluštění bílkovin není v souladu s celkovým rozluštěním zrna, vyskytují se slady s vysokou diastatickou mohutností a relativně nízkou proteolytickou aktivitou a naopak (51).

Došlo do redakce 8. 10. 1959.

Literatura

- [1] Lüers H.: Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei Nürnberg 1950
- [2] Lhotský A.: Technická kontrola sladářské a pivovarské výroby. Praha 1957
- [3] Krauss G.: Brauwelt 99, 666 (1959)
- [4] Schjerring H., Carlsberg C. R.: Wo. Br. 32, 41 (1915)
- [5] Windisch W., Dietrich, Mehlitz: Wo. Br. 40, 1 (1923)
- [6] Myrbäck K., Myrbäck S.: Wo. Br. 48, 43 (1931)

- [7] Osborne T. B.: J. Am. Chem. Soc. 17, 539 (1895)
- [8] Bishop L. R.: J. Inst. Brew. 34, 101 (1928)
- [9] Dieckseit R.: Leitfaden für den Brauer und Mälzer. Leipzig 1953
- [10] Guenzel O.: Inaugural Dissertation. Uppsala 1942
- [11] Biserte G., Scriban R.: Pet. J. Brass. 59, 6 (1951)
- [12] Bishop L. R.: Wo. Br. 45, 325 (1928)
- [13] Hofmann-Bang J.: J. Inst. Brew. 37, 72 (1931)
- [14] Fink H., Kunisch G.: Wo. Br. 54, 193 (1937)
- [15] Piratzki W., Wiecha G.: Wo. Br. 56² 63, (1939)
- [16] Trkan M. aj.: Závěrečná zpráva výzkumného úkolu VÚPS ev. č. 05.03/1958. Dosud neuveřejněno
- [17] Bishop L. R.: J. Inst. Brew. 7, 545 (1933)
- [18] Kolbach P.: Wo. Br. 49, 243 (1932)
- [19] Novotný Z.: Kvasný průmysl 3, 125 (1957)
- [20] Schuster K., Grünewald J.: Brauwelt 97, 731 (1957)
- [21] Brown T. H., Morris H.: J. Chem. Soc. 57, 458 (1890)
- [22] Lüers H., Volkammer W.: Wo. Br. 40, 83 (1923)
- [23] Preece J. A.: Proc. Cong. EBC. Brighton 1951
- [24] Preece J. A., Hoggan J.: J. Inst. Brew. 62, 486 (1956)
- [25] Waldschmidt-Leitz E., Purr A.: Z. physiol. Chem. 203, 117 (1931)
- [26] Bishop L. R.: Wo. Br. 46, 361 (1929)
- [27] Lüers H., Nishimura S.: Wo. Br. 42, 7 (1925)
- [28] Lüers H., Malsch L.: Wo. Br. 46, 265 (1929)
- [29] Engel Ch., Heins J.: Biochem. at Biophys. Acta 1, 190 (1947)
- [30] Rose R. C., Anderson J. A.: Can. J. Research 14c, 109 (1936)
- [31] Lüers H., Lechner R.: Wo. Br. 50, 33 (1933)
- [32] Myrbäck K., Myrbäck S.: Bioch. Z. 285, 282 (1936)
- [33] Bishop L. R.: Wo. Br. 46, 361 (1929)
- [34] Loibl H.: Z. ges. Brauw. 46, 36 (1923)
- [35] Kraft W.: Z. ges. Brauw. 33, 193 (1910)
- [36] Moritz M. R. B., Puller D. H. F.: J. Inst. Brew. 32, 269 (1926)
- [37] Osborne T., Campbell G. F.: J. Am. Chem. Soc. 18, 542 (1896)
- [38] Lüers H.: Bioch. Z. 933, 303 (1922)
- [39] Sandegren E.: Proc. Cong. EBC. Copenhagen 1947
- [40] Massart L.: Fermentatio 23 (1946)
- [41] Wildner H.: Brauwissenschaft 7, 96 (1954)
- [42] Dinklage K.: Brauwelt 44, 249 (1904)
- [43] Bishop L. R.: Ref. Wo. Br. 48, 361 (1931)
- [44] Kolbach P.: Ref. Wo. Br. 52, 17 (1935)
- [45] Schneller M. A.: Proc. A. M. Am. Soc. Brew. Chem. 74 (1949)
- [46] Lüers H., Geiger O.: Wo. Br. 52, 193 (1935)
- [47] Hardy A.: Wo. Br. 55, 208 (1938)
- [48] Wunster G.: J. Inst. Brew. 61, 521 (1955)
- [49] Piratzki W., Wiecha G.: Wo. Br. 54, 225 (1937)
- [50] Kolbach P., Schild E.: Wo. Br. 56, 349 (1939)
- [51] Laufer S., Schwarz R.: Wo. Br. 54, 410 (1937)

БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА В ПИВОВАРЕННОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

1. АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА В ЯЧМЕНЕ И СОЛОДЕ

Образование мутности не биологического характера в пиве является одним из наиболее актуальных вопросов пивоваренного производства. Значение изучения этой проблемы повышают непрерывно увеличивающаяся доля пива разливаемого в бутылки, применение при производстве пива новых материалов, внедрение новых транспортных средств, новых видов тары а в первую очередь высокая требовательность потребителей к качеству и цвету пива.

Азотистые вещества входящие в состав ячменя и солода представляют основную составляющую мутности не биологического рода. Серия статей будет посвящена новейшим достижениям исследования и науки в области биохимических превращений и химических реакций приведенных веществ имеющих место в различных фазах производственного процесса.

EIWEISSSTOFFE IM BRAUPROZESS.

I. DIE STICKSTOFFHALTIGEN BESTANDTEILE DER GERSTE UND DES MALZES

Die Bildung nicht biologischer Trübungen gehört heute zu den hochaktuellen Problemen der Bierherstellung. Das Problem ist eng verbunden mit dem erhöhten Flaschenbierausschuss und der Notwendigkeit, neue Materiale in der Produktion und im Transport einzuführen; hauptsächlich jedoch mit den steigenden Ansprüchen des Konsumenten auf das Aussehen und die Qualität der Erzeugnisse.

Die stickstoffhaltigen Bestandteile der Gerste und des Malzes bilden die bedeutendste Komponente aller nicht biologischer Trübungen. Das Referat wird eine Übersicht der Erkenntnisse auf dem Gebiet der biochemischen Verwandlungen und der chemischen Reaktionen dieser Bestandteile in den einzelnen Produktionsphasen enthalten.

ALBUMINS IN BREWING INDUSTRY.

I. NITROGENOUS COMPONENTS OF BARLEY AND MALT

Turbidity of beer caused by non-biological components is one of the most important problems to be solved by brewing industry. Its importance is enhanced by a steadily increasing proportion of bottled beer, by new materials introduced into the technology schemes, new transport means and in the first line by more rigorous requirements of the consumers insisting on high quality and clear colour of beer. Nitrogenous components of barley and malt represent the major part of all non-biological turbidities. The series of articles will discuss the latest achievements of the research works in the field of biochemical transformations and chemical processes involving the said components in the various phases of brewing process.

Výstava

ODBORNÁ KNIHA V NĚMECKÉ DEMOKRATICKÉ REPUBLICE

bude uspořádána v době od 6. 2. do 25. 2. 1960

v Kulturním a informačním středisku NDR Praha 2, Národní třída 10

Výstava je denně otevřena od 11,00 do 19,00 hodin