

## Přímé kvantitativní hodnocení polypeptidů v pivě

JAROSLAV HUMMEL, VÚPS Praha

547.964.683.4

V pivovarské praxi je často kladen požadavek, aby byla prohlubována analytika, zejména pokud jde o hodnocení bílkovin ve vystavených pivech a aby byla také dána k úvaze otázka, do jaké míry novodobé filtrační metody se zvýšeným adsorpčním působením změní obsah bílkovin a zda je správné těchto metod používat ve výrobě [1]. Uzančným metodám zvyšování koloidní trvanlivosti pív, určených k pasteraci, se totiž často vytýká, že zasahují až do konečných fází výroby (filtrace, stabilizace enzymovými preparáty nebo taninem). Tyto metody, hlavně ostré filtrace, jsou omezeny hlediskem jakosti a plnosti chuti piva, poněvadž zvyšováním ostrosti filtrace se pivo ochuzuje nejen o látky tvořící zákaly, nýbrž i o složky, dodávající výrobku plnou chuť.

V řešení tohoto značně širokého úkolu bylo třeba nejdříve vhodnou metodikou studovat malé změny v kvantitě polypeptidů, jež mají souvislost s rozdíly ve fyzikálně chemických vlastnostech pív. Tyto difference zjišťované uzančnými analytickými metodami nejsou obvykle, s ohledem na nutnost užívání chemických srážecích metod a také s ohledem na různou kvalitu pracovníků, spolehlivě stanoveny. Pro zrychlení práce a pro možnost přímého hodnocení polypeptidů se pro uvedený cíl užilo v pivovarské praxi dosud nezavedené polarografické metody.

V úseku zkoušek polarografické reprodukce kvantity polypeptidů, zkoumaných Brdičkovou reakcí, a to při jejich dělení vysolováním síranem amonným, bylo třeba dokumentovat stupeň koloidní stabilizace pív z pokusných várek; dosud se v předpovědi stability pracovalo pouze se sulfátovým testem za užití fotometru [2] nebo jen vizuálně [3].

Potom byla přímou Brdičkovou reakcí hodnocena lahvová piva, u nichž bylo sledováno snížení výšky bílkovinné vlny účinkem koloidní stabilizace a hodnocena pěnivost. Srážecích a sorpčních prostředků se v provozních zkouškách užilo z důvodů metodických, a to jednak pro stanovení procenta polypeptidů po stabilizaci provedené pouze sorpčním prostředkem, jednak pro stanovení procenta úbytku polypeptidů účinkem taninu a proteolytického přípravku (dále jen proteolytu) s dosažením ekvi-

valentního zvýšení koloidní stability v obou případech.

Cílem druhé části práce bylo charakterizovat sorpci polypeptidů na několika druzích důležitějších filtračních křemelin a sledovat též sorpční účinek filtrace piva podle tohoto kritéria.

## Brdičkova reakce v dosavadní diagnostické praxi

Polarografické reakční proudy způsobené katalytickým vylučováním vodíku objasnil R. Brdička [4] na podkladě teorie J. Heyrovského [5 až 7], podle níž je vodíkové elektrodové přepětí způsobeno pomalou tvorbou molekulárního vodíku. Podle Brdičky jsou sulfhydrylové skupiny bílkovin v polarografii příčinou katalytické vlny.

Největší měrou se využívá této reakce v klinické praxi, jako tzv. Brdičkovy filtračtové reakce [8]. Výše katalytické vlny normálních sér se zjišťuje pokusně, protože závisí na použitém polarografickém zařízení. Pražské kliniky zavedly hodnocení výsledků reakce v jednotkách, které se vypočtou tak, že se výška vlny v jednotlivém případě dělí normální výškou, zjištěnou změřením většího počtu sér zdravých lidí, za použití téhož polarografického zařízení. Průměrná výška vlny u zdravých lidí je pokládána za 1 jednotku. Brdičkova reakce byla mnohými autory modifikována, zejména ve snaze, aby se stala specifičtější v diagnostice rakoviny [9, 10, 11].

O výsledcích polarografického hodnocení polypeptidů v pivovarství je však dodnes jen málo zpráv. Sandegren, Suominen a Ekström [12] zkoumali bílkoviny ječmene, sladu i během vlastní pivovarské výroby hodnocením jejich polarografické aktivity po izolaci a po nezbytné úpravě na stejný obsah dusíku, kontrolovaný chemickým stanovením podle Kjeldahla. Aktivita albuminové frakce vzrůstala během sladování a snižovala se během rmutování, chmelovaru a kvašení. Sandegren, Ekström a Nielsen [13] studovali také poměr mezi SH- a -SS- skupinami bílkovin v *Rhodotorula gracilis*. O významu Brdičkovy reakce, zejména pro kvantitativní hodnocení polypeptidů se zřetelem na koloidní stabilitu pasterovaných pív, není však dosud literárních zpráv.



## Metodika

Složení Brdičkovy kobaltité soluce:  $10^{-3}$  M  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , 1 M  $\text{NH}_3$  a 0,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Chlorid hexamokobaltitý byl p. a. *Riedel de Haen*. Smole-  
rova kapilára při výšce  $h = 65$  cm měla průto-  
kovou rychlost  $m = 4,81$  mg/s a dobu kapky  
 $t = 1,66$  s při 0,8 V. Polarografováno za přístupu  
vzduchu, Hg dno. Veškeré polarogramy byly pro-  
vedeny při citlivosti 13, 200 mV/absc.

Pokud jinak není v textu k příslušným polaro-  
grafům uvedeno, byly veškeré výsledky získány  
polarografickou analýzou  $12^\circ$  piv původních nebo

upravených v množství  $\frac{20}{9}$  % výsledného objemu.

Pro vyhodnocení byly výsledky porovnány s výš-  
kami polarografických vln cystinu (p. a. *Toscat-  
Brandt*). Kobaltnatá soluce, specifická pro hodno-  
cení cystinu, měla složení:  $10^{-3}$  M  $\text{CoCl}_2$ , 1 M  $\text{NH}_3$ ,  
0,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Kalibrační polarogramy (obr. 1 a 2) a graf (obr.  
3) byly získány z roztoků obsahujících:

0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
9	9	9	9	9	9
0,7	0,8				
9	9				

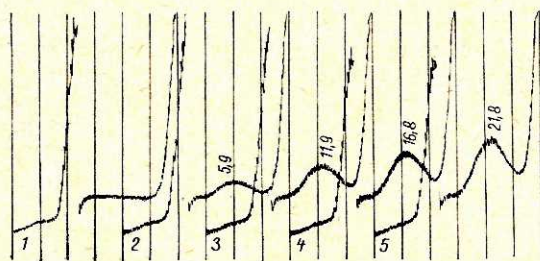
a 0,1 %  $5 \cdot 10^{-5}$  M roztoku

cystinu ve výsledném objemu. V přípravě těchto  
roztoků byl cystin rozpuštěn v 1 M  $\text{NH}_3$ .

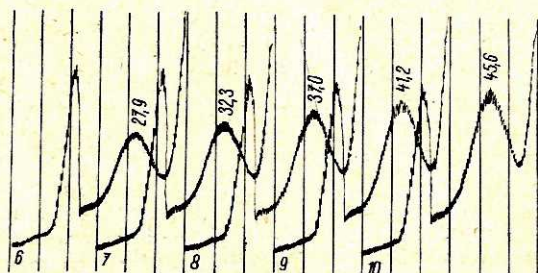
Hlavní druhy zkoumaných piv z pokusných vá-  
rek byly z několika úprav:

- $12^\circ$  A — nestabilizované pivo, vyrobené pouze ze  
sladu;
- $12^\circ$  B — nestabilizované pivo, surogace 8,5 %, z  
toho 4,5 % bezdusíkaté suroviny;
- $12^\circ$  C — surogace 15 %, z toho 9 % bezdusíkaté  
suroviny; stabilizace tanin + proteolyt  
celkem 15 g/hl;
- $12^\circ$  D — surogace 8,5 %, z toho 4,5 % bezdusíkaté  
suroviny; stabilizace Deglutanem 100 g/hl.

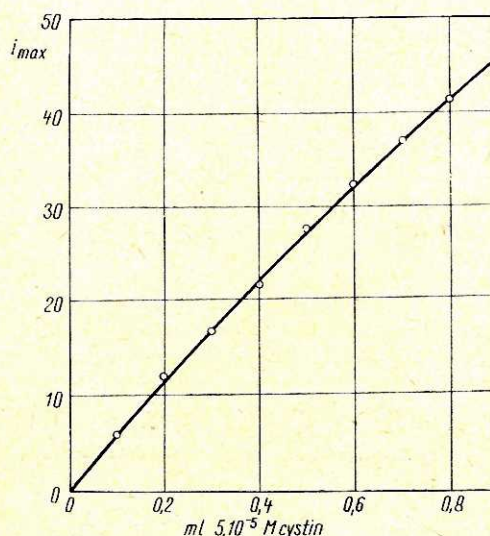
Dělení polypeptidů síranem amonným, sledované  
v hlavních rysech polarograficky, bylo provedeno



Obr. 1. Kalibrační polarogram



Obr. 2. Kalibrační polarogram



Obr. 3. Kalibrační graf

u výše uvedených  $12^\circ$  piv A, B, C, D a u dvou za-  
hraničních  $12^\circ$  piv. Vysolováno bylo přímo tuhým  
síranem amonným v koncentracích 15 g, 30 g a  
při plné saturaci ve 100 ml výsledného objemu.  
Po promíchání byly upravené i původní vzorky  
ponechány 72 hodin při  $20^\circ\text{C}$  a zfiltrány skláda-  
ným filtrem Schleicher-Schüll č. 580,  $\varnothing$  15 cm.

Aby byly zjištěny procentuální úbytky polypep-  
tidů, vzniklé stabilizací, bylo nutno přímou Brdič-  
kovou reakcí hodnotit výpadové vzorky piv ze sta-  
bilizačních zkoušek, zhodnotit úbytky čisté bílko-  
viny také chemicky a užít nestabilizovaného piva,  
vyrobeného pouze ze sladu, jako srovnávacího  
u obou způsobů stanovení. Chemicky byly bílkoviny  
stanoveny metodou Barnsteinovou srážením hydro-  
xydem měďnatým [14]. Pěnivost zkoušených piv  
byla hodnocena metodou carlsbergskou [15], kys-  
ličník uhličitý byl po výběru vzorků z vhodných  
partii stanoven manometricky [16].

Průběh sorpcí lyofilních bílkovinných částic na  
několik druhů filtračních křemelin byl sledován  
při laboratorní teplotě, k čemuž bylo nutno užít  
vyšších koncentrací křemelin (2000 až 8000 g/hl).  
Filtrováno bylo skládaným filtrem Schleicher-  
Schüll č. 588 při  $20^\circ\text{C}$ . Pro uvedenou teplotu platí  
proto i vyšetřené průběhy izoterm zkoušených ad-  
sorbentů. Při podstatně nižší koncentraci (132 g/hl)  
a rovněž při  $20^\circ\text{C}$ , bylo hodnoceno pro získání dal-  
šího přehledu o sorpčních účincích na polypeptidy  
piva také několik druhů adsorpčních umělých hli-  
nek typu bentonitu. Sorpční účinky křemelin a  
hlinek byly sledovány v dvanáctistupňovém pívě.  
Úbytky polypeptidů vzniklé provozní filtrací byly  
zjišťovány polarograficky ve světlém osmistupňo-  
vém pívě.

Reprodukovatelnost výsledků Brdičkovy reakce  
v pívě byla prověřována nejen opakovanými ana-  
lýzami, ale také opakováním předchozích úprav  
piva síranem amonným.

## Část pokusná

1. Dělení polypeptidů  $12^\circ$  piv vysolováním  
( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$ , sledované polarograficky

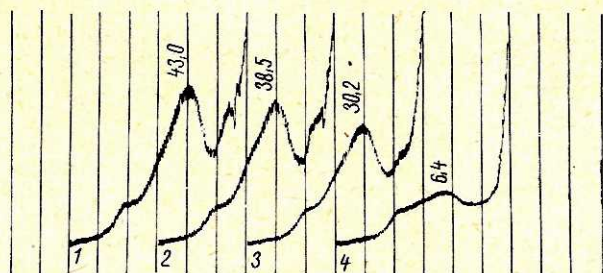
V předpovědi koloidní stability pasterovaných  
piv se měří fotometricky zákaly, vyvolané síranem  
amonným. Ze zákalových křivek se pak sledují  
dva znaky:



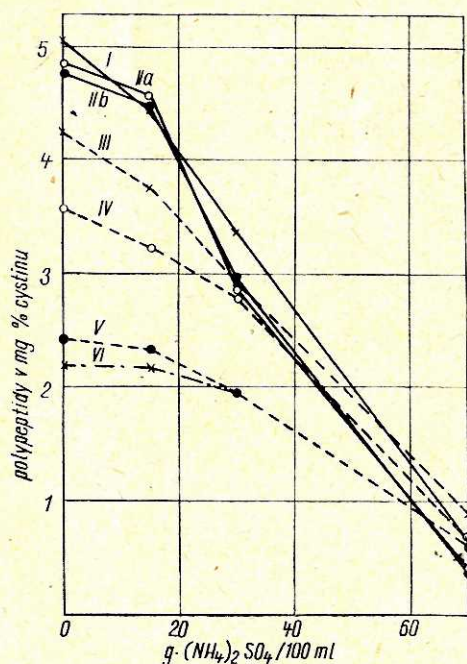
1. Počet ml nasyceného roztoku síranu amonného, potřebných k dosažení 1% světelné absorpce na Langeho fotometru.

2. Vzestup zákalové křivky jako  $\lg \alpha$  mezi 5 a 15 % světelnou absorpcí. První hodnota souvisí s fyzikálně chemickou trvanlivostí, druhá s intenzitou zákalu vzniklého u skladovaného piva.

V analytické praxi je však často třeba sledovat přímo kvantitativní změny polypeptidů, hlavně ve vztahu k jejich původní hladině. Kromě toho u pív vyrobených z mladin různého složení nejsou výsledky turbidimetrického měření v relaci s výsledky Brdičkovy reakce. Dosud byla zjištěna přímá závislost těchto vztahů pouze u jednotlivých druhů pív. Avšak z výsledků polarografické registrace dělení polypeptidů několika druhů 12° pív bylo patrné, že s postupným snižováním obsahu polypeptidů, hodnocených Brdičkovou reakcí v původních pivech, se vždy více nebo méně snižovaly i podíly polypeptidů po srážení síranem amonným. Účinky stabilizace, sledované vysolováním pomocí Brdičkovy reakce (např. pro 12° pivo A byly získány křivky uvedené na obr. 4), byly vyhodnoceny v tabulce 1 a vyjádřeny graficky na obr. 5. Vzhledem k tomu, že kvantitativní změny polypeptidů, zejména ve vztahu k jejich původní hladině, nemohou být postiženy turbidimetrickými



Obr. 4. Vysolování polypeptidů síranem amonným



Obr. 5. Dělení bílkovin 12° pív vysolováním  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sledované polarograficky

Tabulka 1  
Vysolování polypeptidů pív 12° A (obr. 4), 12° B, 12° C, 12° D a zahraničních pív 12° C. P. a B. B.

Druh piva	Saturace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$i_{\text{max}}$	Polypeptidy v mg % cystinu
12° A	—	43,0	5,04
	15/100	38,5	4,41
	30/100	30,2	3,35
	70/100	6,4	0,65
12° B a)	—	42,1	4,91
	15/100	39,4	4,53
	30/100	25,9	2,83
	70/100	5,4	0,54
12° B b)	—	41,0	4,76
	15/100	38,7	4,43
	30/100	28,9	2,95
	70/100	5,0	0,51
12° C	—	37,2	4,22
	15/100	33,2	3,72
	30/100	30,8	3,43
	70/100	8,5	0,87
12° D	—	31,8	3,55
	15/100	29,0	3,21
	30/100	25,3	2,76
	70/100	6,2	0,63
12° C. P. zahraniční	—	22,6	2,43
	15/100	21,6	2,32
	30/100	18,2	1,94
	70/100	6,0	0,61
12° B. B. zahraniční	—	20,4	2,19
	15/100	20,2	2,16
	30/100	18,2	1,94
	70/100	5,9	0,60

mi analýzami, nýbrž jen za užití metod umožňujících tyto změny objektivně hodnotit ve vztazích k původnímu stavu, je polarografický průkaz dělení polypeptidů podle autorových zjištění objektivní interpretací kvantitativních výsledků. Z obr. 5 je patrné, že snižováním kvantity polypeptidů se sklon vysolovacích křivek do saturace 30/100 zmírňoval. 12° piva: A (označ. I, vyrobené pouze ze sladu) a B (označ. IIa, IIb vyrobené za použití mírné surogace) se průběhem vysolovací křivky poněkud od sebe lišila. Stabilizovaná piva 12° C (označ. III) a 12° D (označ. IV) měla již podstatně snížené hodnoty Brdičkovy reakce a s tím souvisící zmírněný průběh křivek do saturace 30/100. Zahraniční exportní piva (označ. V a VI) obsahovala dokonce ještě o 42,5 % a 48,2 % méně hodnoty Brdičkovy reakce, než 12° stabilizované pivo ze zkoušek C. Tím je možno doplnit i dřívější rozbor zahraničních exportních pív, vyznačujících se vysokým stupněm prokvašení, nízkou barvou a nízkým obsahem dusíkatých látek účinkem intenzivní surogace a stabilizace [17].

K polarografickému hodnocení polypeptidů dělením síranem amonným podle nové metodiky, mohla by být vznesena námitka, že s rostoucí koncentrací  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nastává pokles maxima dvojmocného kobaltu (tabulka 2). Po příslušném vyhodnocení těchto polarografických maxim se však ukázalo, že toto snížení je konstantního charakteru a má nízké směřodáté odchylky také u různých druhů 12° pív. Proto nebylo nutné korigovat hodnoty  $i_{\text{max}}$  podle snížení výšek  $i_d \text{ Co}^{2+}$ .

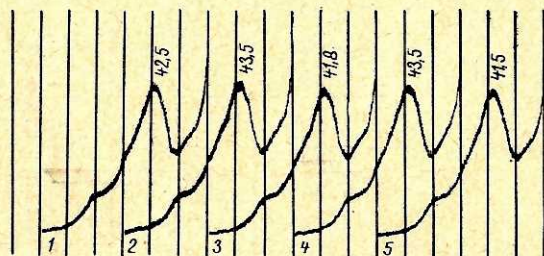
Tabulka 2  
Pokles maxima  $\text{Co}^{2+}$  s rostoucí koncentrací  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Vyhodnoceno z polarogramů platných pro tab. 1

Saturace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	15/100	30/100	70/100
		arit. průměr $i_d \pm \text{s.o.}$		
		13,66 $\pm 0,46$	12,65 $\pm 0,60$	12,01 $\pm 0,47$
				11,81 $\pm 0,61$

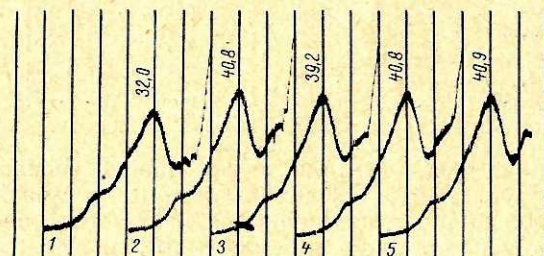


## 2. Přímá Brdičková reakce výpadových vzorků 12° pív ze stabilizačních zkoušek

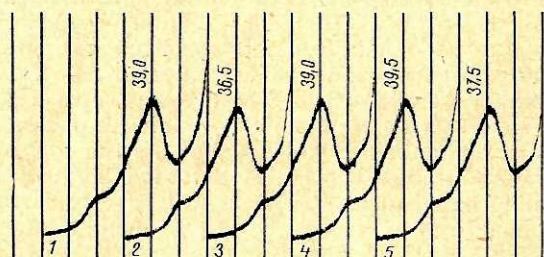
Pro zjištění výkyvů v hodnotách této reakce byl polarograficky hodnocen větší počet výpadových vzorků 12° pív A, B, C, D a k nim připojeny také vzorky dalšího druhu mírně stabilizovaného piva 12° E1, vyrobeného za užití 4,5% surogace bezdu-



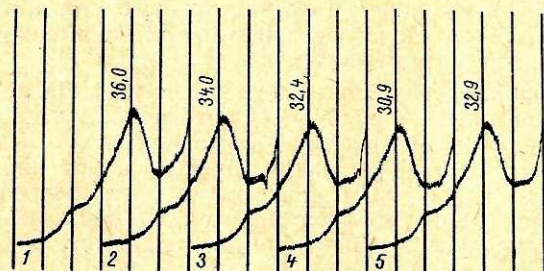
Obr. 6



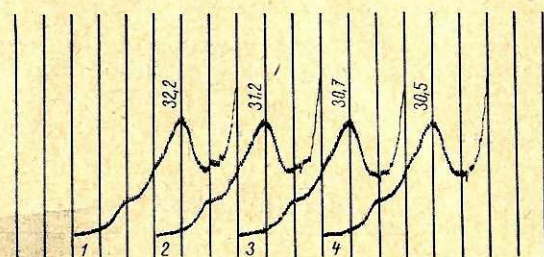
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

síkatou surovinou a stabilizovaného taninem + proteolytem celkem 12 g/hl. Hodnoty Brdičkovy reakce z polarogramů obr. 6 až 10, získaných analýzou 12° pív A, B, E1, C, D jsou shrnuty v tabulce 3. Konečné vyhodnocení a stanovení průměrného snížení polypeptidů Brdičkovou reakcí proti 12° pivu A, vyrobenému pouze ze sladu, je uvedeno v tabulce 4. Z výsledků je patrné, že účinnou stabilizací byly polypeptidy sníženy o 25,49 % v pivě C a o 28,72 % v pivě D.

Aby bylo zjištěno, jaké hodnoty dusíku představují uvedená snížení polypeptidů, byla provedena příslušná chemická stanovení. Podle srovnávacích zkoušek jsou hodnoty Brdičkovy reakce vyčerpány po chemickém srážení hydroxydem měďnatým podle Barnsteina [14]. Jestliže bylo ve 12° pivu A nalezeno 11,3 mg N/100 ml a polarograficky zjištěné snížení bílkovin Brdičkovy reakce činilo 25,49 % a 28,72 %, šlo o úbytky 2,9 mg a 3,3 mg bílkovinného dusíku ve 100 ml. Celkový dusík 87 mg/100 ml piva vyrobeného pouze ze sladu byl tudíž v „čisté bílkovině“ účinkem stabilizace snížen poměrně málo, jen o 3,3 % a 3,7 %.

Chladová stabilita 12° pív C a D byla nejvyšší (tabulka 5). 12° pivo E1 se snížením polypeptidů o 12,63 %, mělo podstatně nižší koloidní stabilitu (asi 4 1/2 měsíční) než 12° piva C a D se snížením polypeptidů blízkým 25 % a se stabilitou šestiměsíční.

Podle současných poznatků nezpůsobí ani intenzivní, avšak vhodně provedená umělá stabilizace

Tabulka 3

Přímá Brdičková reakce výpadových vzorků pív ze stabilizačních zkoušek

12° A srovnávací. Různé partie stáčení.					
$i_{\max}$	42,5	43,5	41,8	43,5	41,5
polypeptidy					
mg% cystinu	4,97	5,11	4,87	5,11	4,83
obr. 6, kř.	1	2	3	4	5
12° B Výstupní vzorky z past. stroje po 20 min.					
$i_{\max}$	32,0*)	40,8	39,2	40,8	40,9
polypeptidy					
mg% cystinu	3,57*)	4,73	4,50	4,73	4,74
obr. 7, kř.	1	2	3	4	5
12° E1. Různé partie stáčení.					
$i_{\max}$	39,0	36,5	39,0	39,5	37,5
polypeptidy					
mg% cystinu	4,48	4,14	4,48	4,55	4,27
obr. 8, kř.	1	2	3	4	5
12° C. Různé partie stáčení.					
$i_{\max}$	36,0	34,0	32,4	30,9	32,9
polypeptidy					
mg% cystinu	4,07	3,82	3,62	3,44	3,68
obr. 9, kř.	1	2	3	4	5
12° D. Různé partie stáčení.					
$i_{\max}$	32,2	31,2	30,7	30,5	
polypeptidy					
mg% cystinu	3,60	3,48	3,41	3,39	
obr. 10, kř.	1	2	3	4	

\*) do partie piva 12° B přešla na počátku stáčení část piva 12° C (zbytek z tanku).

Tabulka 4

Výsledné hodnoty % úbytku polypeptidů

Druh 12° piva	$i_{\max}$ arit. průměr $\pm$ s. o.	Polypeptidy v mg% cystinu arit. průměr $\pm$ s. o.	Průměrné snížení polypeptidů B. r. ve srovnání s pivem 12° A v %
A	42,8 $\pm$ 1,1	5,0 $\pm$ 0,15	—
B	40,6 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,12	6,22
E1	38,3 $\pm$ 1,0	4,3 $\pm$ 0,14	12,63
C	33,3 $\pm$ 1,9	3,7 $\pm$ 0,23	25,49
D	32,0 $\pm$ 1,6	3,5 $\pm$ 0,20	28,72



Tabulka 5  
Citlivost k zákalu chladem

12° pivo	ITT po past.	Chladový zákal v týdnech (38° C / 2° C - 24 hod.)						
		0	2	4	6	8	10	12
A	130	0	2	6	8+	10	>10	>10
B	185	0	2	3	7	9	9+	>10
E1	135	0	1	2	2+	4	4+	5
C	330	0	0	0	0	1+	1+	2+
D	320	0	0	0	0	1	1+	2+

piva negativní chuťové změny, avšak může se projevit snížením pěnivosti. Polypeptidy, jakožto důležité součásti pěnotvorných látek pív, jsou schopny vytvářet stabilizující filmy okolo jednotlivých částic disperzní fáze a je nutné předpokládat, že při určité intenzitě resorpce CO<sub>2</sub>, jejich kvantita ovlivní pěnivý objem. Jde o objem pěny, který vznikl z objemové jednotky kapaliny za určitých podmínek, přičemž jeho velikost není základem pro stálost pěny.

Jestliže o vlastnostech pěny rozhodují specifické vlastnosti pěnotvorného činidla, resp. pěnotvorných látek, musí se úbytky polypeptidů, tj. zejména podílů do 30/100 saturace síranem amonným, projevit ve výsledcích měření pěnivého objemu a ve stálosti pěny. Hodnoty pěnivého objemu i zbytkové pěny se určují nejčastěji carlsbergskou metodou. Helm [18], De Clerk [19] a Hopkins [20] uvedli, že pěnivý objem závisí na obsahu CO<sub>2</sub> v pívě. Pěnivý objem (Pv %), stanovený carlsbergskou metodou, byl sledován v širokém rozsahu stupně nasycení piva CO<sub>2</sub>, avšak pro stabilitu pěny má význam hodnota zbytkové pěny (Pz %); mezi množstvím CO<sub>2</sub> a hodnotou v oblasti 0,35 až 0,42 % nebyl dosud nalezen žádný vztah.

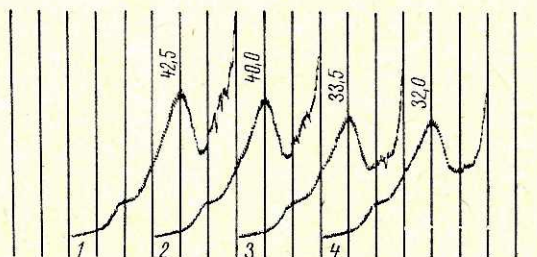
Obsah CO<sub>2</sub> ve stabilizovaných zahraničních pivech byl zjištěn ve zvýšených hodnotách [17] a jde o zřejmou snahu zvýšit pěnivost na základě zkušenosti, podle níž se zvýší hodnoty Pz % v pivech s přesycením nad 0,47 % CO<sub>2</sub> váh. Krauss [21] zjistil zvýšenou pěnivost piva způsobenou změnou hradicového tlaku již z 0,2 na 0,3 atp. Rozdíly v nestejné pěnivosti piva z jednotlivých lahví mají svou příčinu také v rozpuštěném vzduchu, zvyšujícím hodnoty Pv % i Pz % a zároveň způsobujícím podstatné zvyšování odchylek ve výsledcích měření CO<sub>2</sub> metodou manometrickou. Byly proto v našich zkouškách hodnocení pěnivosti pív s různým obsahem polypeptidů použity jen vzorky lahvových pív z přezkoušených partií a s minimálními differencemi v poměru veškerý vzduch ml : objem hrdlového prostoru ml.

Pěnivost a obsah CO<sub>2</sub> byl sledován u čtyř druhů 12° pív A, E1, C, D, z nichž pouze stabilizované pivo C dozrávalo při vyšším hradicím tlaku nad 0,5 atp/1°; analyzováno po 84 vzorcích uvedených druhů pív a stanoveny průměry hodnot Pv %, Pz % a CO<sub>2</sub> [tabulka 6]. Při zvýšeném obsahu CO<sub>2</sub> 0,47 ± 0,03 % bylo u stabilizovaného piva C s průměrným 25,5% snížením polypeptidů dosaženo zvýšení trvanlivosti pěny v hodnotách Pz % blízkých 0,2, proti pivům s obsahem CO<sub>2</sub> 0,42 ± 0,03 %.

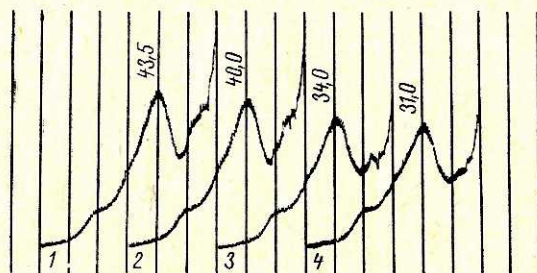
### 3. Reprodukovatelnost výsledků polarografického hodnocení polypeptidů

Reprodukovatelnost výsledků polarografického hodnocení polypeptidů byla zjišťována provedením celých analýz téhož druhu piva včetně vysolování síranem amonným 12° B [tabulka 7] a dále opakovaným stanovením polypeptidů ve 12° pivech

A, B, C, D (obr. 11 a 12, tabulka 7). V rozsahu 2,83 až 5,11 mg % cystinu odchylka jednotlivých určení nepřesahovala 4 %.



Obr. 11. Reprodukovatelnost výsledků polarografického hodnocení polypeptidů



Obr. 12. Reprodukovatelnost výsledků polarografického hodnocení polypeptidů

Tabulka 6  
Pěnivost modifikovaná metodou carlsbergskou

12° pivo	Pv %	Pz %	CO <sub>2</sub> % váh.
	arit. průměr	± s. o.	arit. průměr ± s. o.
A	5,72 ± 0,72	0,58 ± 0,11	0,42 ± 0,02
E1	4,93 ± 0,58	0,56 ± 0,10	0,40 ± 0,03
C	5,88 ± 0,69	0,79 ± 0,18	0,47 ± 0,03
D	4,43 ± 0,56	0,51 ± 0,14	0,42 ± 0,03

Tabulka 7  
Reprodukovatelnost výsledků

Druh piva	Síran amonný	i <sub>max</sub>		Polypeptidy v mg % cystinu		Odchylka b-a v mg % cystinu
		a)	b)	a)	b)	
12° B	—	42,1	41,0	4,91	4,76	-0,15
	15/100	39,4	38,7	4,53	4,44	-0,09
	30/100	25,9	26,9	2,83	2,95	+0,12
	70/100	5,4	5,0	0,55	0,51	-0,04
12° A	—	42,5	43,5	4,97	5,11	+0,13
12° B	—	40,0	40,0	4,62	4,62	0
12° C	—	33,5	34,0	3,76	3,82	+0,06
12° D	—	32,0	31,0	3,57	3,45	-0,12

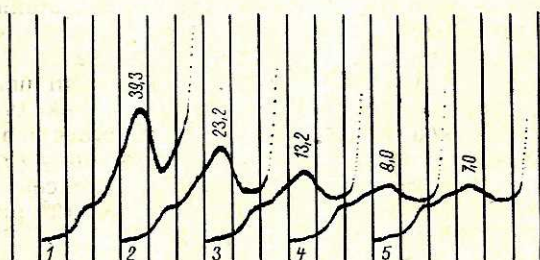
### 4. Účinky filtračních křemelin a sorpčních hlinek na polypeptidy piva

Schmid a Kleber [22] určují adsorpční účinnost filtračních křemelin chemicky: 60 ml vzorku piva se po přidání 1 g křemelinu za chlazení při 0 až 2 °C stejnoměrně promíchává 15 minut. Pak se směs odstředí při 3000 ot/min (teplota roztoku se zvýší na 5 °C) a v čiré kapalině se určí dusík podle Kjeldahla. Výsledek se vyjádří úbytkem N-látek adsorbovaných na 1 g křemelinu.

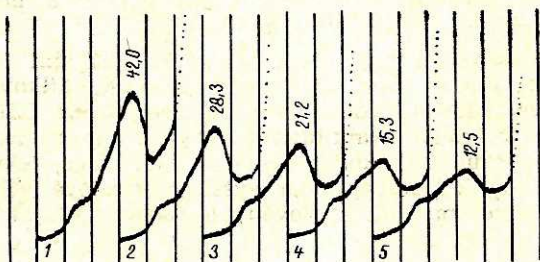


Autor této práce používá však k hodnocení sorpční účinnosti křemelin jednoduššího postupu s polarografickou registrací, umožňujícího rozlišit křemeliny podle průběhu isotermy již při 20 °C. Do kádinek na 100 ml se odváží po 1, 2, 3, 4 g zkoušené křemeliny, přidá se 50 ml piva vytřepaného při 20 °C a po krátkodobém mírném promíchání 2 až 3 min se jednotlivé směsi zfiltrují skládaným filtrem Schleicher-Schüll č. 588. Ve filtračních se polypeptidy hodnotí Brdičkovou reakcí. Nejdříve se zaznamenává bílkovinná vlna piva původního, zfiltrovaného za uvedených podmínek.

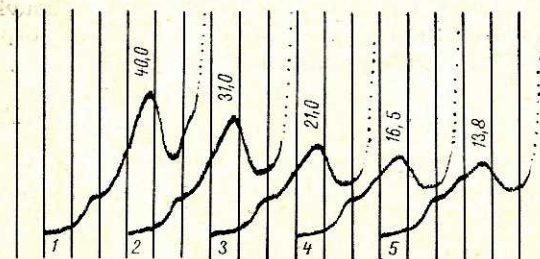
Hodnoceny byly křemeliny Filter Cel (obr. 13), Borovany LAS (obr. 14), Schenk II (obr. 15), Hyflo Super Cel (obr. 16). Adsorpční isotermy vyšetřené z hodnot Brdičkovy reakce jsou uvedeny na obr. 17. Z průběhu isoterm je patrné, že sorpční účinnost zkoušených křemelin se snižuje v tomto pořadí:



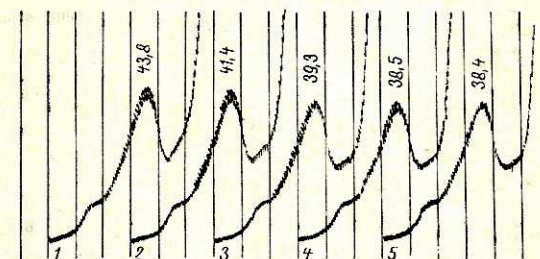
Obr. 13. Křemelina Filter Cel



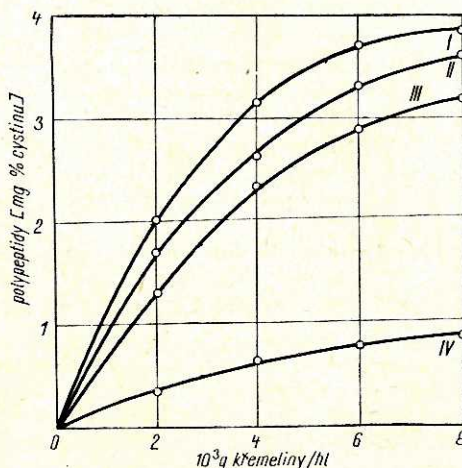
Obr. 14. Křemelina Borovany LAS



Obr. 15. Křemelina Schenk II



Obr. 16. Křemelina Hyflo Super Cel



Obr. 17. Adsorpční isotermy zkoušených druhů křemelin

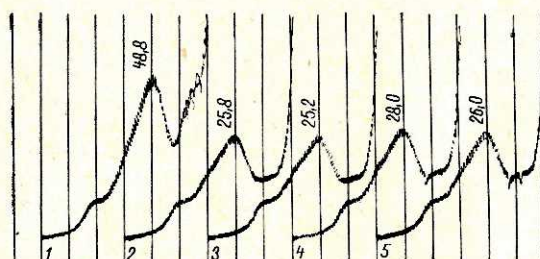
Filter Cel	(křivka I)
Borovany LAS	(křivka II)
Schenk II	(křivka III)
Hyflo Super Cel	(křivka IV)

Intenzita sorpce polypeptidů na 4 druhy provozně důležitějších filtračních křemelin je tudíž různá. Minimální sorpci jeví křemelina Hyflo Super Cel, čímž je ověřeno, že tento druh v pivovarství hojně používaný, plní funkci základního filtračního materiálu, schopného se vyznačovat nanejvýše jen slabým sorpčním účinkem, a to ještě jen při vysokých koncentracích.

Adsorpční účinek 4 druhů umělých aluminium-silikátových hlinek typu bentonitu, byl sledován pro rychlé zjištění výsledku při stejných koncentracích 132 g/hl na nefiltrovaném 12° pivu z výroby (obr. 18, křivka 1 značí Brdičkovu reakci piva neupraveného, křivky 2 až 5 byly získány po úpravě). Při uvedené koncentraci, sorpční hlinky působily na polypeptidy drasticky:

	Adsorbováno polypeptidů B. r. v mg % cystinu	Adsorbováno polypeptidů B. r. %
Disalbumin (křivka 2)	3,07	52,08
Clarsol (křivka 3)	3,14	53,26
Bentopur S (křivka 4)	2,81	47,66
Deglutan (křivka 5)	3,05	51,73

Z obr. 17 a 18 lze zjistit, že hlinky typu bentonitu v koncentraci 132 g/hl nebo jemné křemeliny (Filter Cel, B. LAS, Schenk II) v koncentracích 1850 až 2450 g/hl adsorbují ve 12° pivu při 20 °C kolem 50 % polypeptidů.



Obr. 18. Adsorpční účinky 4 druhů hlinek typu bentonitu

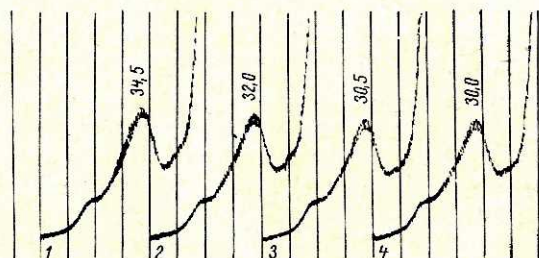


### 5. Vliv filtrace na polypeptidy piva

Schmid a Kleber [22] hodnotili sorpci při filtraci podle úbytku koagulovaného dusíku. Po 45 min provozní filtrace křemelinou zjistili snížení blízké 0,2 mg N/100 ml 14<sup>o</sup> piva.

V našich filtračních zkouškách 8<sup>o</sup> piva byl sledován Brdičkovou reakcí vliv filtrace po 100 hl. Pivo bylo polarograficky analyzováno v koncentraci  $\frac{15}{9}$  % výsledného objemu (obr. 19).

	$i_{\max}$
Pivo nefiltrované . . . . .	34,5 (křivka 1)
Po filtraci normální hmotou . . . . .	32,0 (křivka 2)
Po filtraci pouze křemelinou (60% LAS + 40% F 2) . . . . .	30,5 (křivka 3)
Po nastavbové filtraci křemelinou (60% LAS + 40% F 2) + desky (K 7) . . . . .	30,0 (křivka 4)



Obr. 19. Vliv filtrace na polypeptidy piva

Účinkem normální filtrace hmotou se adsorbovalo 8 % polypeptidů B. r. Pouhou filtrací křemelinou se snížil obsah polypeptidů o 12,7 % B. r. a zařazením dvojfiltrace křemelinou + desky bylo již adsorbováno 14,7 % B. r. v 8<sup>o</sup> pivu.

Celkový dusík 8<sup>o</sup> nefiltrovaného piva (po odstředění) činil 53 mg/100 ml a srážením Cu(OH)<sub>2</sub> nalezeno 7 mg bílkovinného N/100 ml. Polarograficky zjištěný úbytek 14,7 % bílkovin B. r. způsobený účinkem ostré filtrace (křemelinou + desky) odpovídal 1,0 mg N/100 ml, což činilo 1,9 % dusíku. Z výsledku je zřejmo, že sice ostrou filtrací může být absorbováno 10 až 15 % polypeptidů, avšak v 8<sup>o</sup> pivu jde o množství malá, zpravidla nepřevyšující 2 % celkového dusíku.

### Zhodnocení výsledků

Tato práce upozorňuje na možnost přímého kvantitativního hodnocení polypeptidů ve vystavených pivech stejné stupňovitosti proti srovnávacímu vzorku za použití polarografické metody. Byly studovány kvantitativní změny polypeptidů při vysolování síranem amonným, účinky filtračních křemelin, sorpčních hlinek, jakož i vliv filtrace na polypeptidy 8<sup>o</sup> piva.

a) Stupeň koloidní stabilizace různých druhů pív stejné stupňovitosti může být polarograficky dokumentován tím, že v průběhu vysolování síranem amonným se registrují hodnoty rozpuštěných polypeptidů. Z grafického vyjádření výsledků je zřejmý velký rozptyl možných kvantitativních změn polypeptidů do saturace 30/100.

b) K stanovení intenzity koloidní stabilizace je možno užít přímé Brdičkovy reakce. Hodnotí se snížení výšky katalytické vlny v mg % cystinu

proti srovnávacímu vzorku piva nestabilizovaného stejné stupňovitosti. Snížením hodnoty Brdičkovy reakce o 1/4 bylo dosaženo požadovaného zvýšení chladové stability 12<sup>o</sup> pív. Zvýšením obsahu CO<sub>2</sub> u pív se sníženou Brdičkovou reakcí, tj. pív stabilizovaných, zvýšila se jejich pěnivost.

c) Za užití dvou různých způsobů koloidní stabilizace, z nichž první byla provedena taninem a proteolytem, druhá pouze jen sorpčním prostředkem, bylo dosaženo prakticky stejného zvýšení chladové trvanlivosti, jestliže byly polypeptidy Brdičkovy reakce sníženy o 25,5 % v případě prvním a o 28,7 % v druhém případě.

d) Podle účinku na polypeptidy Brdičkovy reakce byla zhodnocena sorpční účinnost několika druhů provozně důležitějších filtračních křemelin. Tuzemská křemelinu Borovany LAS byla vyhodnocena jako filtrační materiál o značně vysoké filtrační aktivitě. Naproti tomu, téměř zanedbatelnou sorpční účinností na polypeptidy piva, lze charakterizovat zahraniční křemelinu Hyflo Super Cel. Dále bylo ověřeno, že rozdíly mezi sorpční účinností jemných křemelin a umělých hlinek typu bentonitu jsou veliké. Hlinky různé provenience v koncentraci 132 g/hl nebo jemné křemeliny (Filter Cel, Borovany LAS, Schenk II) v koncentracích 1850 až 2450 g/hl, adsorbovaly ve 12<sup>o</sup> pivu při 20 °C kolem 50 % polypeptidů.

e) Byly hodnoceny úbytky polypeptidů způsobené zvýšenou ostroty filtrace 8<sup>o</sup> piva. Z výsledků bylo patrné, že sice ostrou filtrací může být adsorbováno 10 až 15 % polypeptidů, avšak v 8<sup>o</sup> pivu jde o úbytky nízké absolutní hodnoty.

Předložená práce obsahuje pouze základní výsledky z užití polarografického hodnocení bílkovin v pivu hotovém nebo z konečné fáze výroby. Důležité teoretické kvantitativní vztahy, stupeň obecnosti přímé Brdičkovy reakce v pivě vůbec, jakož i vztahy k polypeptidům vyšší molekulové váhy jsou autorem nyní studovány a budou zveřejněny v separátní práci.

V kontrolní praxi bylo u nás Brdičkovy reakce použito zejména při dokumentování stupně koloidní stabilizace různých druhů pív stejné stupňovitosti, prověřováním závady v pěnivosti v souvislosti s kvantitou bílkovin anebo hodnocení sorpčních účinků filtračních materiálů.

### Literatura

- [1] Závěrečná zpráva č. 12/1959, VÚPS Praha.
- [2] Enders C., Saji T., Hartong B. D.: Woch. f. Br. 57, 329 (1939).
- [3] Hartong B. D.: Woch. f. Br. 55, 33 a 321 (1937).
- [4] Brdička R.: Collection Czech. Chem. Comm. 11, 614 (1939).
- [5] Heyrovský J.: Chem. listy 29, 295 (1935).
- [6] Heyrovský J.: Chem. listy 31, 440 (1937).
- [7] Heyrovský J.: Collection 9, 273, 345 (1937).
- [8] ČSN-Úseková norma 84-3112.
- [9] Haselbach H., Schwabe K.: Pharmazie 10, 310 (1955).
- [10] Ledvina M.: Čas. léc. Čes. 93, 606 (1954).
- [11] Ledvina M.: Českoslov. okológia 3, 22 (1956).
- [12] Sandegren E., Suominen H. S., Ekström D.: Acta chem. scand. 3, 1027 (1949).
- [13] Sandegren E., Ekström D., Nielsen N.: Acta chem. scand. 4, 1311 (1950).
- [14] Beythien A.: Laboratoriumsbuch f. d. Lebensmittelchemiker 6. Aufl., 687, 1951.
- [15] Hummel J.: Průmysl potravin 3, 323 (1952).
- [16] Wallerstein: Bottle beer quality 161, (1948).
- [17] Klazar G.: Kvasný průmysl 2, 77 (1956).
- [18] Helm E., Woch. f. Br. 50, 241 (1933).
- [19] De Clerck: Cours de Brasserie I, 559 (1948).
- [20] Hopkins R. H., Krause B.: Biochem. appl. to malt. a. Brew., London, 342 (1947).
- [21] Krauss G.: Woch. f. Br. 49, 409 (1932).
- [22] Schmid P., Kleber W.: Brauwiss. 13, 238 (1960).

Došlo do redakce 25. 4. 1961.



НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ  
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ПОЛИПЕПТИДОВ В ПИВЕ

В статье показывается возможность применения полярографического метода для непосредственного количественного определения полипептидов в пиве. Анализ базируется на сравнении эталона пива с исследуемой пробой той же крепости. Рассматриваются результаты изучения количественных изменений полипептидов при обработке пива сернокислым аммонием, содержания пептидов в пробах пива отобранных при испытаниях на устойчивость после предварительной стабилизации, влияния состава диатомитов применяемых для фильтрации, состава сорбционной земли и технологии фильтрации на полипептиды восьмиградусного пива.

Для определения интенсивности коллоидной стабилизации можно воспользоваться непосредственно реакцией Брдиčky. Критерием служит снижение высоты каталитической волны выраженное в мг % цистина при сравнении с эталоном нестабилизированного пива такой же крепости. При применении двух разных методов коллоидной стабилизации, т. е. в первом случае танином и протеолитом, в другом только лишь сорбционными средствами было получено одинаковое улучшение стойкости пива, при условии снижения полипептидов реакции Брдиčky в первом случае на 25,5 %, во втором на 28,7 %. Заслуживает внимание незначительная адсорбционная способность диатомита Хифло Супер Цел.

## DIREKTE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER POLYPEPTIDE IM BIER

Die Arbeit macht auf die Möglichkeit der direkten quantitativen Bestimmung der Polypeptide in Ausstossbieren aufmerksam, und zwar bei Benützung der polarographischen Methode. Die zu prüfenden Biere müssen von derselben Grädigkeit wie die Vergleichsbierprobe sein. Es wurden die quantitativen Veränderungen der Polypeptide bei der Aussalzung mittels Ammoniumsulfat verfolgt und studiert; im weiteren die Polypeptide in Bierproben aus Stabilisierungsversuchen, die Wirkung von Kieselguren und Sorptionserden, sowie auch der Einfluss der Filtration auf die Polypeptide des 8° Bieres.

Zur Ermittlung der Intensität der kolloidalen Stabilisierung kann die direkte Reaktion nach Brdička benützt werden. Bewertet wird die Senkung der katalytischen Welle in mg % des Cystins im Vergleich mit der nicht stabilisierten, gleichgrädigen Vergleichsprobe. Es wurden Versuche mit der Anwendung von zwei Methoden der kolloidalen Stabilisierung durchgeführt, und zwar: 1. Stabilisierung mit Tannin und Proteolyt; 2. Stabilisierung nur durch Sorptionsmittel. Es werde dieselbe Erhöhung der Kältestabilität erreicht, wenn die Polypeptide nach Brdičkas Reaktion in dem ersten Fall um 25,5 %, im zweiten um 28,7 % vermindert wurden. Interessant ist die Feststellung der niedrigen Adsorptionsfähigkeit der Kieselgur Hyflo Super Cel.

## DIRECT QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYPEPTIDES IN BEER

The article shows, that polarographic methods can be successfully applied for direct quantitative determination of polypeptides in beer to be delivered from breweries. The test is based upon the comparison of a standard sample with samples of beer of the same strength. The article deals further with the quantitative changes effecting polypeptides at processing beer with ammonium sulphate, with polypeptides in samples taken during stabilization tests, with effect of the diatomite composition, of sorption earths and filtration upon polypeptides in 8° beer. Direct Brdička reaction can be used for determining the intensity of colloidal stabilization. The reduction of the catalytic wave height, expressed in mg % of cystine, as compared with the sample of non-stabilized beer of the same strength is taken as criterion. Two different stabilization methods have been compared. One consisted in introducing tannin and proteolyte, the other was a conventional one based on sorption substances. The durability of beer has been improved there being no difference between the two methods, provided the polypeptides of Brdička reaction had been reduced by 25,5 % in the first case and by 28,7 % in the second. Low adsorption capacity of the Hyflo Super Cel diatomite is worth mentioning.