

Chromatografie vysokomolekulárních bílkovin v pivovarských roztocích

VLADIMÍR KAREL, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

66.067.85

Nutnost podrobnějších znalostí vysokomolekulárních bílkovin vyplynula z problému zabývajícího se sledováním složek zákalů piv. Při počátečních stanoveních se postupovalo podle metody uveřejněné Raiblem [1], který adsorbuje bílkoviny na silikagel nebo na bentonity, resorbuje kyselinou mravenčí nebo čpavkem a nanáší na 15 cm široký pás chromatografického papíru Sch.-Sch. 2043 b, jemuž odpovídá papír Whatman 1 [2]. Chromatogramy vyvíjí vzestupně soustavou:

- 6 obj. n-butanolu
- 3 obj. acetonu
- 8 obj. dest. vody
- 2 obj. piperidinu nebo diethylaminu nebo 25% čpavku.

Pásky s naneseným vzorkem se ponechají přes noc v atmosféře soustavy, pro vlastní vyvíjení požaduje autor konstantní teplotu 22 °C.

Chromatogramy, získané popsáním způsobem, byly sice informující, avšak ohraničení skvrn nebylo dostatečně ostré a měly malou barevnou intenzitu. Lepších výsledků se nepodařilo dosáhnout ani druhým či třetím během rozpouštědlové směsi, přídavek 0,5–2 % chloridu sodného k vyvíjecí soustavě [2] neprojevil příznivý účinek. Pracovalo se s papírem Whatman 1.

Pro detekci byla vyzkoušena ninhydrinová reakce, chlorace I, II [2], reakce s bromfenolovou modří, chloridem železitým. Mimo uvedené činidla, bylo použito i směsi ninhydrinu a octanu kademnatého [3]; toto činidlo se osvědčilo nejlépe.

Při dalších pokusech se zjistilo, že velmi dobré vlastnosti pro dělení bílkovin pivovarských roztoků má soustava:

- 6 obj. n-butanolu
- 1 obj. kyseliny octové (ledové),
- 2 obj. vody.

Tuto směs navrhuje Nordström a Swain [4] pro dělení polyfenolových látek. Vzhledem k uvedení mu zjištění se začaly propracovávat podmínky modifikace použití této soustavy pro sledovaný účel. Ostatní podmínky, navržené Raiblem, bylo zapotřebí pro tuto soustavu ověřit a upravit. Zkoušelo se nanášet různá množství eluátu, dále účinek přídavku NaCl k vyvíjecí směsi, vyvolání jedním, dvěma i třemi běhy. Vedle silikagelu, který byl označen [1] jako adsorbens vysokomolekulárních bílkovin frakce A podle Lundina se zkoušel i adsorpční účinek některých bentonitů (Clarsol, Stabifix), a to pro chromatografické stanovení vysokomolekulárních a středněmolekulárních bílkovin. Použilo se chromatografických papírů Whatman 1 až 4, nejlépe se osvědčil Whatman 3.

Z velké řady pokusů byly odvozeny podmínky, při nichž se dosahuje zřetelných chromatogramů, a to stejného počtu skvrn, jak uvádí Raible [1]:

150 ml sladiny (mladiny) nebo 300 ml piva se třepe s 1,5 g jemně rozetřeného silikagelu 60 min. Silikagel se oddělí v odstředivce a v kyvetách se pětkrát promyje vodou. Po posledním promytí se bílkoviny adsorbované na silikagelu eluují asi 66% kyselinou mravenčí: množstvím 9,75 ml obchodní 85% kyseliny mravenčí se za podmínek metody dosahuje potřebné koncentrace se zřetelem na zbytky vody, obsažené ve vrstvě silikagelu. Po půlhodinové eluci v kyvetách za občasného míchání se silikagel znovu oddělí odstředěním a 4 až 5 ml získaného čirého eluátu se nanese na 12 cm široký pás papíru Whatman 3, za použití sušicí lampy. Pro nanášení je vhodná 1 ml pipeta.

Po nanešení vzorku se z pásu odstříhne po obou stranách ½ cm proužek, načež se chromatogram vloží na 12 hodin do atmosféry soustavy. Po uplynutí této doby se pás vyvíjí až rozpouštědlo vystoupí 30 až 35 cm; usuší se na vzduchu, znovu se vloží do atmosféry a vyvíjí se druhým během soustavy. Pro detekci se použije 0,25% roztoku ninhydrinu v bezvodém acetonu nebo směsi octanu kademnatého a ninhydrinu [10]. Výhoda Cd-ninhydrinové detekce je dále v tom, že umožňuje přímou fotometrii skvrn. Transparence papíru se dosahuje roztokem bromnaftalenu v parafinovém oleji [10].

Cd-ninhydrinové činidlo se připraví takto: ke 100 mg octanu kademnatého se přidá 10 ml vody, 5 ml kyseliny octové (ledové), 100 ml acetonu, 1 g ninhydrinu. Je nutno zachovat uvedené pořadí chemikálií. Roztok se uchovává v chladničce, nemá být starší než týden.

Chromatogramy se roztokem protáhnou, nechají se ½ hodiny schnout na vzduchu, načež se vkládají do bezdusíkové atmosféry nad 96% kyselinou sírovou. Skvrny jsou zřetelné za 24 hodin.

Chromatogramy získané upraveným postupem u kongresních sladin ze dvou různých sladů, jsou na obr. 1.

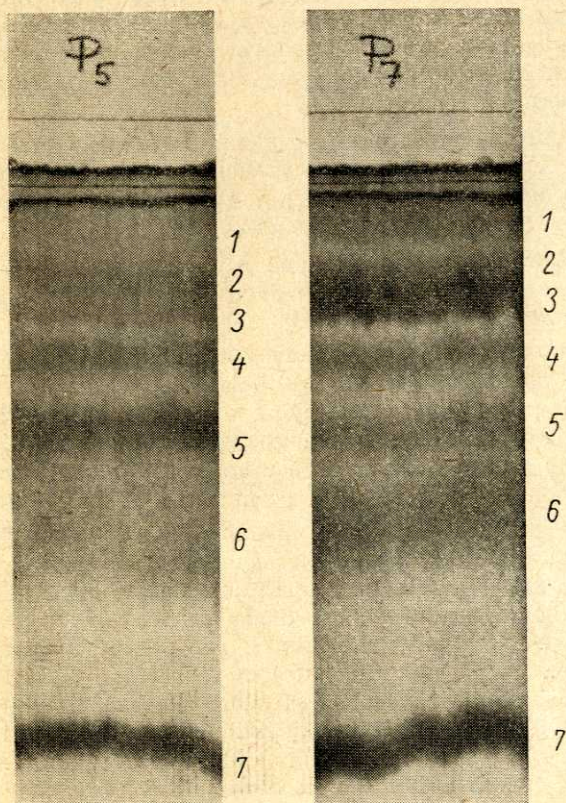
Je zajímavé, že mladiny z těchto sladů skýtaly na chromatogramech prakticky stejný obraz jako kongresní sladiny; stejný počet skvrn o snížené intenzitě. To svědčí o tom, že typy vysokomolekulárních bílkovin, zastoupené v kongresních sladinách, přecházejí při dekokčním rmutování až do mladin.

V souvislosti s tímto zjištěním byl sledován vliv samotné dekokce na bílkoviny sladin: chromatogramy kongresních, tedy infuzních sladin, odpovídají počtem skvrn sladinám, získaným za stejných podmínek a povařeným 5 hodin pod zpětným chladičem. Rozdíl se projevil toliko ve snížené intenzitě skvrn, a to markantně u skvrn 1 až 6, intenzita skvrny č. 7 byla prakticky nezměněna. Toto zjištění poukazuje na to, že varem sladiny, popř. mladiny se nevyklučuje určitý typ nebo vymezené typy koagulovatelných bílkovin, ale že jednotlivé typy vysokomolekulárních bílkovin jsou prakticky zastoupeny

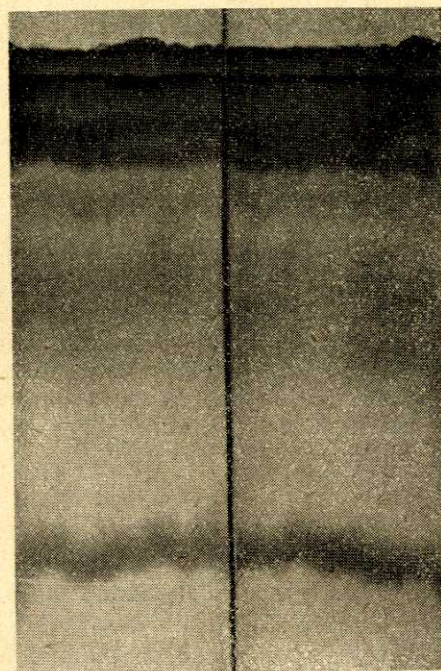
ve dvou formách, a to za podmínek pivovarské dekokce ve formě koagulovatelné i nekoagulovatelné. V tomto směru se pravděpodobně uplatňuje např. i hvozdění a odležení sladu svým vlivem na solvaci bílkovin. Rovněž lze dedukovat, že kvantitativně stanovovaný podíl koagulovatelného dusíku je vytvářen nikoli jedním typem vysokomolekulárních bílkovin, nýbrž prakticky všemi jejich zastoupenými typy.

Změna v jakosti vysokomolekulárních bílkovin v pivovarském procesu se projevila až na chromatogramech piv, kde místo sedmi skvrn se objevovalo 4 až 5 skvrn. Zde je však nutno hledat příčiny již v samotných podmínkách hlavního kvašení a dokvašování, především v dusíkovém metabolismu kvasnic. *De Clerck* [5] přičítá asi čtvrtině dusíkatých látek v pivu původ z kvasnic.

K tomu, co bylo řečeno, je snad vhodné poukázat na práci *F. Knorra* [6], v níž autor vyslovuje předpoklad, že různé frakce ječných a sladových bílkovin přetrvávají chmelovar a podílejí se alespoň zčásti na tvorbě zákalu piv. K tomuto předpokladu lze na základě uvedených výsledků dodat, že prakticky všechny typy vysokomolekulárních bílkovin přecházejí do mladiny a dále, že v infuzních i dekokčních pivech je možno počítat s výskytem i uplatněním se všech typů vysokomolekulárních bílkovin, zastoupených v infuzních sladinách. Na zřeteli je ovšem nutno mít individuální vlivy při kvašení a dokvašování na výsledný obraz bílkovin v pivech. V těchto fázích se rozhodne, které bílkoviny a v jaké míře budou zastoupeny v tom kterém pivu.



Obr. 1. Cd-ninhydrinová detekce



Obr. 2. Ninhydrinová detekce

Autor původní metody stanovení bílkovin [1] nepopisuje ve své práci identifikaci skvrn. Modifikované metody bylo použito pro sledování jakostních změn bílkovin frakce A podle *Lundina* při výrobním procesu piva, kde postačující informace byla získána už z pouhého porovnání chromatogramů z jednotlivých výrobních fází. S pracemi na identifikaci skvrn však bylo započato a z předběžného hodnocení chromatogramů sladových výluhů podle *Bishopa* [5], lze první skvrnu pod startem hodnotit jako albuminy, následují globuliny (skvrny 2, 3), hordein (skvrna 6), glutelin (skvrna 7). Skvrny 4, 5 nebyly zatím identifikovány. V tomto směru se bude ještě pracovat dále.

Při použití bentonitů Clarsol a Stabifix pro adsorpci a stanovení A a B frakce bílkovin podle *Lundina* se osvědčil lépe Stabifix, avšak metoda potřebuje ještě některé úpravy. Počet skvrn při použití Stabifixe je větší, než při použití silikagelu. Jde o skvrny, které vesměs mají vyšší hodnotu r_f , než skvrny, získané z eluátů silikagelu. To svědčí o tom, že jde o bílkoviny menších molekul než u silikagelu a tedy o bílkoviny frakce B. Clarsol adsorbuje proti stabifixu zřejmě ještě některé balastní látky, takže vyvíjecí soustava stěží prostupuje startem a zanechává jednolitý „závoj“, táhnoucí se až k první skvrně.

Závěr

Závěrem lze shrnout v práci dosažené výsledky takto: Byla modifikována původní Raiblova metoda chromatografického stanovení vysokomolekulárních bílkovin. Zjistilo se, že všechny typy bílkovin frakce A podle *Lundina*, které jsou zastoupeny v kongresních sladinách, přetrvávají chmelovar a vyskytují se v dekokčních mladínách. Změny v jakosti vysokomolekulárních bílkovin nastávají až při kvašení a dokvašování piv. Jednotlivé typy vysokomolekulárních bílkovin jsou pravděpodobně zastoupeny

ve dvou formách, a to ve formě koagulovatelné a nekoagulovatelné pětihodinovým varem resp. za podmínek dekokčního varního způsobu.

Literatura

- [1] Raible K.: Monatschrift f. Brauerei 14, 49 (1961).
[2] Hais M., Macek K.: Papírová chromatografie, Praha, 1959.

- [3] Heilmann J., Barollier J., Watzke E.: Hoppe-Hoppe Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie — 309, 219 (1957).
[4] Nordström, Swain loc. cit.: Union E.: Brauwissenschaft 14, 227 (1961).
[5] De Clerck J.: Lehrbuch der Mälzerei u. Bierbrauerei I., II., Berlin 1950.
[6] Knorr F.: Brauwelt 102, 358 (1962).

Došlo do redakce 21. 2. 1963.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ В СУСЛАХ

В статье описывается модификация хроматографического метода, предложенного Райблем для определения высокомолекулярных белковых веществ. При помощи этого метода изучались влияние варки на высокомолекулярные белковые вещества в инфузионных суслах и изменения качества этих веществ в ходе технологического процесса пивоварения.

CHROMATOGRAPHIE DER HOCH-MOLEKULAREN EIWEIßSTOFFE IN DEN BRAUEREIFLÜSSIGKEITEN

In der Arbeit wird eine Modifikation der chromatographischen Bestimmung hochmolekularer Eiweißstoffe nach Raible beschrieben. Der Autor verfolgte den Einfluß des Kochens auf die hochmolekularen Eiweißstoffe in Infusionswürzen und weiter auch die Qualitätsänderungen dieser Eiweißstoffe im Verlauf der Biererzeugung.

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF HIGH MOLECULAR ALBUMINS IN BREWING WORTS

The article deals with a new modification of chromatographic methods developed by Raible for determining high molecular albumins in brewing worts. The method was applied in the research works studying the effect of boiling upon the high molecular albumins present in worts in the infusion stage as also to changes taking place in the high molecular albumins during the brewing process.