

Vlastnosti některých enzymových preparátů z *Aspergillů*, jejich vliv na bílkoviny a prokvašení piva

JAROSLAV HUMMEL, Výzkumný ústav pивovarský a sladařský, Praha

577.15
083.1

Je známo, že bakteriálních nebo plísňových proteolytických a amylolytických preparátů lze využívat v úpravnictví obilovin. Děje se to v zahraničí zejména při výrobě obchodních pivovarských surogátů upravených na vyšší rozpustnost a snazší zpracovatelnost ve varně. Nejčastěji jde o výrobky z kukuřice, rýže i pšenice ve formě vloček.

Wallerstein [1] uvádí pro využití bakteriálních a plísňových amyláz a proteáz přípravu rozpustného koncentráту z pšenice. Za přítomnosti amylolytického enzymu se rmutuje při 75 až 80 °C, po ztekutění škrobu se rmut ochladí na 55 až 60 °C s přísadou proteolytického bakteriálního preparátu, a tím se upraví rozpustnost dusíkatých látek.

Týž autor však podotýká, že k výrobě chladově stabilních pív využívá enzymů jiného než mikrobiálního původu. Bakteriální nebo plísňové proteázy pokládá však za pomocný přísadový materiál, prospívající dozrávání piva ve sklepě a upravující jeho koloidní stabilitu.

Podklady pro přípravu proteolytických enzymů hloubkovou fermentací *Asp. flavus* podle Kučery [2]

Po zjištění vlivu složek půdy na produkci proteáz se pracovalo s upravenou půdou, která obsahovala 3 % kukuřičné mouky, 1 % škrobu (nebo 1 % sacharózy) a 0,5 % uhlíčitánu vápenatého. Maximum produkce se při 3% vegetativním inokulu při třepačkových pokusech i při pokusech v malých laboratorních fermentačních tančích za míchání a vzdušnění pohybovalo mezi 40. až 60. hodinou.

Zahuštění na 25 % původního objemu proběhlo ve vakuové odparce při 15 až 20 °C a pH 7,0 za 8 h. V zahuštěném filtrátu po hloubkové fermentaci byla zjištěna přítomnost amyláz.

Na aktivitě enzymu po dialýze kultivační tekutiny nastávaly jen nepatrné ztráty. Pokles sušiny po dialýze ukázal na značný obsah dialyzovatelných látek jako sacharidů a solí.

Srážením kultivační tekutiny organickými rozpouštědly se enzymové bílkoviny v četných případech částečně denaturovaly. Pravděpodobně spolu s enzymy se izolovaly i balastní látky, které strhávaly sebou i enzymaticky aktivní bílkoviny.

Rozpustnost preparátů se zkoušela postupnou extrakcí v citrát-fosfátovém pufru při pH 7,2 s regulací iontové síly pomocí KCl. Vliv iontové síly na extrakci proteáz nebyl rozhodující. Při frakcionovaném srážení v mezích 40 až 66 % etylalkoholu zbytek nerozpuštěného preparátu se pohyboval kolem 15 %.

Specifická aktivita a rozpustnost se šetrně zvýšila použitím dialýzy a mrazové sublimace extraktu preparátu. Výtěžnost byla vyšší než při opakovaném srážení etylalkoholem. Vzniklé ztráty byly převážně manipulační, rozpustnost preparátu byla dokonalá.

Jinou sledovanou metodou, nahrazující srážení bílkovin organickými rozpouštědly, byla frakcionace síranem amonným při 5 °C a pH 5,0. Největší podíl enzymu přecházel do rozmezí nasycení 0,4 až 0,7. Specifická aktivita se zvýšila.

Přibližné srovnání optimálního pH hydrolýzy použitím proteolytických enzymů různého původu podle Wallersteina [1]

Enzymy hydrolýzující proteiny	Substrát	Přibližně optimální pH hydrolýzy
pepsin	bílkoviny	1,5— 2,5
trypsin	bílkoviny	8 —10
erepsin	polypeptidy	—
papain	bílkoviny a polypeptidy	4,5— 8
bromelin	bílkoviny a polypeptidy	4,5— 8
bakteriální proteáza	bílkoviny a polypeptidy	6— 8,5
plísňová proteáza	bílkoviny a polypeptidy	5— 8

Ovšem uvedené enzymy obsahují více druhů proteolytických enzymů, zejména tehdy, jestliže optimum pH hydrolýzy je značně široké. U preparátů z *Aspergillů* zjistil Kučera [2] podle průběhu křivek hydrolýzy azokaseinu a hemoglobinu, že jde o 2 složky, jednu s pH optimem mezi 6 až 6,5 (na hemoglobinu mezi pH 5 až 6), druhou mezi pH 9 až 10 (na hemoglobinu mezi pH 7,5 až 8,5). Pozoruhodné bylo, že při optimálním pH 6 a teplotě 55 °C se proteáza z *Aspergillů* v závislosti na čase inaktivovala mírně, při 60 °C již velmi rychle.

Část pokusná

Cílem práce bylo sledovat po úpravě piva některým technickým preparátem z *Aspergillů* celkové vysokomolekulární bílkoviny, bílkoviny srazitelné etylalkoholem, povrchovou aktivitu glycidického podílu srazitelného etylalkoholem, vnitřní tlak v lahvích po stočení, stabilitní testy a trvanlivost při změnách teploty.

Použité proteolytické preparáty, metodika a výsledky

Zkoušené proteolytické preparáty dodané Ústředním výzkumným ústavem potravinářského průmyslu v Praze:

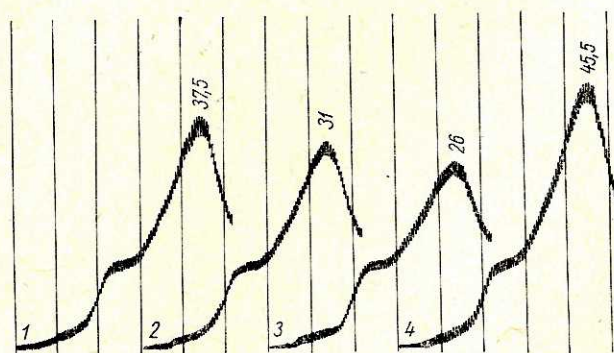
1. Preparát připravený fermentací *A. oryzae* povrchovým způsobem na pšeničných otrubách a srážený etylalkoholem, s aktivitou 42 000 azokaseinových jednotek [3] na 1 g.

2. Preparát z *A. flavus* vyrobený hloubkovým způsobem a srážený etylalkoholem, aktivity 51 000 Akj/g.

3. Preparát připravený fermentací *A. flavus* hloubkovým způsobem a přesrážený alkoholem, aktivity 53 000 Akj/g.

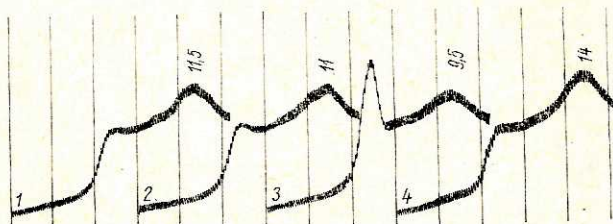
Použitím těchto preparátů se sledoval ve 12° pivu po pasteraci téhož druhu jejich účinek polarografickou registrací bílkovin, a to reakcí přímou a v izolovaném glycidickém podílu, který byl v prostředí 80% etylalkoholu [4] separován, promyt a znovu rozpuštěn. Výsledky se uváděly v hodnotách:

$$\frac{100 \cdot G}{A + B}, \text{ popř. } \frac{[(A + B) - G] \cdot 100}{A + B} \text{ podle [5]}$$



Obr. 1. Bílkoviny pokusných piv upravených proteolytickými preparáty

Křivka: 1 — preparát Ao/25 000 Akj; 2 — Ao/50 000 Akj; 3 — Ao/100 000 Akj; 4 — Af/25 000 Akj. V kobaltité soluci analyzováno 15/9 % vzorku, od 0,8 V, 200 mV/abs., citl. 1:70.



Obr. 2. Bílkoviny glycidického podílu pokusných piv upravených proteolytickými preparáty

Křivka: 1 — preparát Ao/25 000 Akj; 2 — Ao/50 000 Akj; 3 — Ao/100 000 Akj; 4 — Af/25 000 Akj. V kobaltité soluci analyzováno 15/9 % vzorku, od 0,8 V, 200 mV/abs., citl. 1:70.

Tyto hodnoty značily relativní procentuální zastoupení sírných bílkovin glycidického podílu G, sraženého etylalkoholem anebo bílkovin neglycidického podílu, vztažených na celkovou bílkovinu, reprodukovanou přímou bílkovinnou reakcí (tzv. A + B frakcí).

Výše uvedené proteolytické preparáty byly hodnoceny ve třech koncentracích tak, aby v partiích po 1 hl 12° piva byly dávky 25 000 Akj/g, 50 000 Akj/g a 100 000 Akj/g.

Z výsledků bylo patrné, že v bílkovinném podílu A + B se lišil více účinek přípravku získaného fermentací *A. oryzae*, protože se snižoval zvyšujícími se koncentracemi obsah vysokomolekulárních bílkovin nejintenzivněji; bílkovinný podíl A + B u vzorků upravených preparáty z *A. flavus* byl vyšší.

V podílu srazitelném etylalkoholem bylo při použití preparátu z *A. oryzae* zaregistrováno špičaté maximum kobaltu (obr. 2), křivky 2 a 3. Tento jev byl u některých druhů piv pozorován již dříve a nastával u piv se sníženým obsahem dextrinů. Obsahoval tudíž zkoušený preparát získaný fermentací *A. oryzae* pravděpodobně současně i amylázy. Bylo proto v dalších pokusech použito jako přísady i amylolytického preparátu.

Maloprovozní pokusy s úpravami 12° piva byly provedeny v PVS Braník. Sledoval se vliv kombinací enzymů proteolytických i s amylázou na vlastnosti hotových piv. Z proteolytických preparátů, připravených fermentací *Aspergillů*, byl na základě

Tabulka 1

Kvantitativní hodnocení bílkovin pokusných piv upravených proteolytickými preparáty

Vzorky 1 až 3 <i>A. oryzae</i> Vzorky 4 až 6 a 7 až 9 <i>A. flavus</i>				
Vzorek	A + B i_{\max} (mm)	G i_{\max} (mm)	$\frac{100 \cdot G}{A + B}$	$\frac{[(A + B) - G] \cdot 100}{A + B}$
1	37,5	11,5	30,7	69,3
2	31	11	35,5	64,5 obr. 1 a 2
3	26	9,5	36,5	63,5
4	45,5	14,5	30,8	69,2
5	37,5	11,5	30,6	69,4
6	33,5	10	29,8	70,2
7	39	10,5	26,9	73,1
8	36,5	10,2	27,9	72,1
9	31	10	32,2	67,8

výsledků dříve popsaných předběžných pokusů pro další zkoušky zvolen preparát Af-3. Použitý amylolytický preparát připravený hloubkovou fermentací *A. oryzae*, byl plíšíňovou α -amylázou s pH optimumm asi 5,5 při 30 °C. Byl připraven v ÚVÚPP a měl aktivitu 3400 malt. jednotek/g/Bernfeld. Veškeré použité preparáty z *Aspergillů* obsahovaly nerozpustný zbytek 9 až 15 %.

K těmto pokusům byl dále přiřazen vzorek pepsinu s aktivitou 10 000 j/g (SPOFA) a zahraničního obchodního preparátu na bázi papainu s aktivitou asi 14 000 Akj/g.

Vycházelo se ze standardní mladiny asi 12 % hmot., vyrobené z čistě sladového sypání. Po hlavním kvašení bylo mladé pivo upraveno taninem a za dalších 14 dní převedeno za současné filtrace do 5 ležáckých sudů po 1 hl. Před zahražením sudů, upravených přidáním 250 g hustých kvasnic se dávala zvolená množství enzymových preparátů jednotlivě i v kombinacích.

Tabulka 2

Použité enzymové preparáty

Vzorek	Proteolytické preparáty			Amylolitický preparát
	Af-6 Akj/hl	Obchodní na bázi papainu Akj/hl	Pepsin Aj/hl	
1	70 000 (6 g)	—	—	—
2	70 000	—	3 000 (0,3 g)	—
3	70 000	—	3 000 (0,3 g)	3 400 (1,0 g)
4	70 000	—	3 000 (0,3 g)	5 100 (1,5 g)
5	—	70 000 (5 g)	—	—

Dokvašování pokusných pív probíhalo tudíž za přísady kvasnic v konstantním množství, druhu a za stejných vnějších podmínek při teplotě 3 °C. Za 58 dní se piva ze sudů stáčela přímo přes Seit-zův filtr do lahví a pasterovala.

Tabulka 3

Vnitřní tlaky v sudech, lahvích a relat. % CO₂

Pivo	Sud	Láhve 0,5 l			
	kp/cm ² /3 °C	Ø kp/cm ² /25 °C	Ø vzduch ml	Ø objem hrdl. p. ml	Ø CO ₂ %
1	0,65	2,2	3,9	19,5	0,41
2	0,70	2,25	3,6	16,5	0,42
3	1,02	2,4	3,0	18,0	0,45
4	1,20	2,5	3,0	20,4	0,465
5	0,48	1,85	3,8	18,8	0,36

Vnitřní tlaky v sudech se poměrně značně lišily; nejvyšší vnitřní tlak měla pokusná piva č. 3 a 4, upravená směsí enzymů Af-6+pepsin+amyláza. Nejnižší vnitřní tlak v sudě mělo pivo č. 5, upravené obchodním proteolotickým preparátem na bázi papainu. Tyto poměry se odrážely i ve vnitřních tlacích po stočení pív do lahví.

Povrchová aktivita glycidického podílu jednotlivých pokusných pív, sledovaná polarografickou me-

todou [6] se lišila jen u vzorků č. 3 a 4, tj. u vzorků vyznačujících se vyššími vnitřními tlaky. Tím bylo v podstatě prokázáno, že tyto jevy nepatří enzymu Af-6 ani pepsinu nýbrž jen amyláze. Vzorky č. 3 a 4 s nižší povrchovou aktivitou (se zvýšeným maximem kobaltu) měly snížený obsah dextrinů. Zvýšený objem pěny u vzorků č. 3 a 4 lze vysvětlit vyšším sycením a dobrou vazbou CO₂; naopak nedostačující pěnivost měl vzorek č. 5 (úprava obchodním preparátem na bázi papainu), který měl nejnižší vnitřní tlak v sudu i v lahvích.

Tabulka 4

Povrchová aktivita glycidického podílu, dextriny a pěnivost

Vzorek	Povrchová aktivita glycid. podílu piva podle stupně potlačení polarograf. maxima kobaltu h'(mm)	Dextriny (Schild a Weyh) g/100 g	Pěnivost (Helm)	
			Pv%	Pz%
1	25	2,24	5,1	0,50
2	25	2,15	5,1	0,54
3	28,5	1,76	5,5	0,65
4	29,5	1,61	5,6	0,70
5	24,5	2,35	4,8	0,45

Pokusná piva měla výhodné sulfátové testy vzájemně velmi málo odlišné; o málo nižší byl tento test jen u vzorku č. 1. Také koloidní trvanlivost při změnách teploty byla u jednotlivých druhů upravených pív značně vyrovnaná. Optimální trvanlivost měly však vzorky z úpravy č. 2 (Af-6+pepsin) bez přísady amylázy; vyznačovaly se výhodným testem sulfátovým i testem podle Esbacha.

Tabulka 5

Stabilitní testy a trvanlivost při změnách teploty

Vzorek	Sulfátový test ml	Esbachův test ml	Trvanlivost při 2 °C (40 °/2 °C, 4 + 3 dny) týdnů
1	3,0	2,1	5
2	3,25	2,4	6
3	3,25	1,7	5
4	3,2	1,4	5
5	3,2	1,2	5

Ze sledování stupně prokvašení jednotlivých pokusných pív bylo možno dobře vyčíst vliv enzymů z fermentace *Aspergillů*. Vzorky č. 3 a 4, upravené přísadou amylázy, prokvasily hlouběji než vzorek č. 2 bez přísady amylázy. Přísada pepsinu působila na zvýšení prokvašení velmi nepatrně a ve srovnání vzorků, upravených enzymovými preparáty z *Aspergillů*, prokvasil vzorek č. 5, upravený obchodním preparátem na bázi papainu, nejméně.

Pokusné preparáty vyrobené fermentací *Aspergillů* obsahovaly 9 až 15 % nerozpustného zbytku, obsahujícího denaturované dusíkaté a jiné balastní látky. I když jde o látky enzymaticky inaktivní je jejich přítomnost pokládána za nežádoucí, protože tyto látky znesnadňují určit, kdy je preparát rozpuštěn, pracuje-li se s ním ve větších kvantech.

Tabulka 6
Rozbory pokusných piv

Druh stanovení	V z o r k y				
	1	2	3	4	5
Zdánlivý extrakt %	2,75	2,73	2,46	2,28	2,85
Skutečný extrakt %	4,55	4,55	4,34	4,19	4,65
Alkohol %	3,88	3,92	4,04	4,10	3,89
Koncentrace % (př. stup.)	12,07	12,14	12,15	13,13	12,18
Zdánlivé prokvašení %	77,2	77,5	79,7	81,2	76,6
Skutečné prokvašení %	62,3	62,5	64,3	65,4	61,8
Barva ml N J ₂ na 100 ml	0,35— 0,40	0,35— 0,40	0,35— 0,40	0,35— 0,40	0,35— 0,40

Použité preparáty ve zkoušených dávkách chuťové vlastnosti piv nijak nepříznivě neovlivnily. Při skladování byly prosté jakéhokoli zápachu a v suchém stavu po velmi dlouhou dobu si zachovávaly konstantní aktivitu.

Stručný přehled výsledků

Účinek pokusných technických proteolytických preparátů získaných fermentací *Aspergillů* v ÚVÚP, Praha, se jevil v pivě hlavně snižováním polarografické bílkovinné vlny a zvyšováním testu podle *Esbacha*.

Při změnách teploty piva v závislosti na čase byl jeho reverzibilní zákal za chladu oddálen nejlépe použitím směsi preparátu získaného fermentací *A. flavus* a nízké dávky pepsinu. Takto upravené pivo mělo výhodný test sulfátový i test *Esbachův*.

Piva upravená komplexem proteolytických enzymů a současně α -amylázou z *A. oryzae* jevila jiné vlastnosti v podílu srazitelném etylalkoholem. Tento podíl se projevoval polarograficky zvýšením ma-

xima kobaltu. Lze to vysvětlit tím, že působením amylázy na dextriny a polysacharidy se snížil obsah povrchově aktivních koloidů cukerné povahy. To bylo v soulase se sledovaným snížením obsahu dextrinů a se zvýšením prokvašení piva.

Šetrné použití amylolytického preparátu umožnilo získat v ležáckých sudech již v poměrně krátké době vyšší tlaky a po stočení získat piva o hlubším prokvašení, s vyšším nasycením CO₂, podporujícím i zvýšení objemu pěny při jeho vylití do sklenice.

Cílem pokusů nebylo však zvyšovat prokvašení piva. Za správnou je možno pokládat námitku, že způsob úpravy touto cestou je v pivovarství neobvyklý, protože lze prokvašení a stupeň nasycení piva CO₂ regulovat volbou sypání a technologického postupu. Avšak tato práce upozorňuje právě ještě na jiný možný způsob, na regulaci umělým zásahem, což nevylučuje aplikaci pro speciální účely. Tím má autor na mysli využití relace rychlosti dokvašování s dosaženým prokvašením ve sklepě, tj. možnost zkrácení doby dokvašování a dosažení obvyklého prokvašení.

Souhrn

Práce upozorňuje na vliv některých technických enzymových preparátů z *Aspergillů* na součásti piva. Při stejné době dokvašování amylolytický preparát způsobil hlubší prokvašení a nasycení piva CO₂. Způsob použití amyláz nevylučuje možnost do jisté míry zrychlovat proces dokvašování piva.

Literatura

- [1] Wallerstein Lab. Comm., 7, 1939: 5—20.
- [2] Kučera, M.: Podklady pro využití *Aspergillů* k produkci proteolytických enzymů. Praha 1963, dosud nepublikováno.
- [3] Slavík, K. — Smetana, R.: „Chem. listy“, 46, 1952: 49.
- [4] Ljungdahl, L. — Sandegren, E.: Congress EBC, Nice, 1953.
- [5] Hummel, J.: Závěrečná zpráva VÚPS, č. 10/1963.
- [6] Hummel, J.: Závěrečná zpráva VÚPS, č. 5 (1964—65).

Došlo do redakce 25. 3. 1966.

СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИЗГОТОВЛЕННЫХ ИЗ АСПЕРГИЛЛУСА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПРОТЕИНЫ В ПИВЕ И НА ЕГО БРОЖЕНИЕ

Статья посвящена влиянию некоторых технических энзиматических препаратов изготовленных из аспергиллуса на составляющие пива. При сходной длительности дображивания присутствие в пиве амилолитического препарата вызвало более глубокое дображивание и повышенное насыщение пива углекислотой. Применение амилазы дает возможность ускорить до известной степени процесс дображивания пива.

EIGENSCHAFTEN EINIGER ENZYMPRÄPARATE AUS ASPERGILLEN UND IHR EINFLUSS AUF DIE EIWEISS-STOFFE UND VERGÄRUNG DES BIERES

Der Artikel macht auf die Einflüsse einiger technischen Enzympräparate aus Aspergillen auf die Bierbestandteile aufmerksam. Bei gleicher Nachgärungsdauer verursachte das amylolytische Präparat eine höhere Endvergärung und CO₂-Sättigung. Die Applikation der Amylasenpräparate könnte also den Prozess der Nachgärung des Bieres in einem gewissen Mass beschleunigen.

PROPERTIES OF SOME ENZYMATIC PREPARATIONS MADE FROM ASPERGILLUS AND THEIR EFFECT UPON PROTEINS IN BEER AND ITS FERMENTATION

The article describes the effect of some technical enzymatic preparations made from Aspergillus upon the beer components. The presence of amylolytic preparations in beer results after the same after-fermentation period in deeper fermentation and higher saturation with carbon dioxide. Application of amylase permits to speed-up the after-fermentation process, though within certain limits only.