

# Metody stanovení volných aminokyselin a aminodusíku v pivovarství (II. část)

663.41:543  
547.466 546.171

Ing. Gabriela Basařová, CSc., — Ing. Ivana Černá, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

## Metody stanovení aminodusíku v pivovarské laboratoři

Hodnoty získané analýzou aminokyselin na analyzátoru jsou poměrně exaktní. Pro značné nároky na vybavení laboratoří, kvalifikovanou obsluhu i vzhledem k poměrně vysoké ceně analýz nemá však tato metoda v našich podnikových a závodových laboratořích širší uplatnění. Je proto zapotřebí najít metodu stanovení aminodusíku, která by byla jednoduchá, rychlá a která by dávala pracovníkům laboratoří orientační hodnotu k rozlišení vysoké, nízké či střední hladiny aminodusíku v mladínách a pivech.

Vyzkoušeli jsme proto v našem oddělení několik metod, přicházejících v úvahu:

### 1. stanovení aminodusíku metodou s TNBS [1. c. 9].

Princip: kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová reaguje s aminodusíkem za vzniku barvy, která v kyselém roztoku má absorpční maxima při 340 nm a 403 nm,

### 2. stanovení aminodusíku reakcí s ninhydrinovým činidlem [1. c. 11].

Princip: ninhydrin reaguje s aminodusíkem za vzniku modré sloučeniny s jednoduchým absorpčním maximem při 570 nm, které tvoří základ stanovení,

### 3. stanovení aminodusíku titrační metodou [1. c. 12].

Princip: metoda je založena na schopnosti aminokyselin a různých peptidů tvořit komplexní rozpustné sloučeniny s mědí, stanovitelné jodometricky,

### 4. stanovení aminodusíku s měďnatým činidlem podle Brennera a spol. [1. c. 8].

Princip: metoda je založena na kvantitativním převodu Cu z nerozpustného fosforečnanu měďnatého do alkalické suspenze na rozpustné komplexy Cu a aminokyselin.

Poměrně rychlé kolorimetrické postupy používané pro stanovení aminodusíku jsou reakce s ninhydrinem a TNBS kyselinou. Při obou těchto metodách jsou kromě aminoskupin aminokyselin měřeny i koncové aminoskupiny postranního řetězce, přítomné v peptidech a proteinech. Zatímco většina volných aminokyselin při reakci s TNBS nebo ninhydrinem jsou si kvantitativně podobné, peptidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík se co do míry jejich reakcí značně liší.

Tabulka 2. Popis reakce aminokyselin s TNBS-kyselinou a ninhydrinovým činidlem

Sloučenina	TNBS-reakce měřeno při 340 nm	Ninhydrinová reakce měřeno při 570 nm
ala, arg, asp, glu, his, ile, leu, met, phe, ser, thr, trp, tyr, val	všechny reagují barevná intenzita kolísá od 80–103 %	všechny reagují barevná intenzita kolísá od 91–104 %
lysin	barevná intenzita 176 % ( $\alpha$ , $\Sigma$ -NH <sub>2</sub> )	barevná intenzita 108 % (převládají $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )
ammonium	nereaguje	barevná intenzita 98 %
prolin	nereaguje	barevná intenzita 4 % (asi 30 % při 440 nm)
$\epsilon$ -aminodusík lysinu v peptidech a proteinech	reakce je podobná reakci $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> ve volném lysinu	barevná intenzita 65–75 %, ale 7–10 % v koncovém N lysinu
koncová skupina $\alpha$ -aminodusíku v peptidech a proteinech	táž reakce jako $\alpha$ -aminodusíku ve volných aminokyselinách	barevná intenzita kolísá a je nižší než 100 %; některé peptidy se při reakci s ninhydrinem hydrolyzují a uvolněné aminokyseliny zvyšují barevnou intenzitu na více než 100 %



Tabulka 3. Porovnání hodnot aminodusíku stanoveného různými metodami

Označení vzorku	Původní stupňovitost [% E]	Dosažitelné prokvašení [%]	Výpočet analyzátor [mg/1000 ml]	TNBS [mg/1000 ml]	Ninhydrinová [mg/1000 ml]	Titrační [mg/1000 ml]	Brenner [mg/1000 ml]
Mladina 1	9,68	81,61	114,37	152,50	176,25	208,84	270,00
Mladina 2	9,67	78,90	109,00	146,25	150,00	198,75	215,00
Mladina 3	9,76	81,15	121,25	163,12	165,00	218,55	250,00
Mladina 4	10,02	82,73	144,45	191,25	196,15	246,74	270,00
Pivo A	9,28	—	67,00	82,50	103,13	120,43	110,00
Pivo B	10,00	—	90,00	112,50	128,75	116,02	113,00
Pivo C	9,65	—	54,48	65,60	68,11	70,50	93,00

Reakce některých složek mladiny a piva, obsahující dusík, s TNBS-kyselinou a ninhydrinem, popisuje *tabulka 2* [l. c. 10]. Barevná intenzita byla vyjádřena na základě leucinu = 100 %.

Ze získaných výsledků vyplývá, že hodnoty získané analýzou piva s TNBS-kyselinou a ninhydrinem se shodují, zatímco u mladiny dává ninhydrinová reakce hodnotu asi o 17 % vyšší. Příčina je patrně v reakci  $\text{NH}_3$  a prolinu mladiny s ninhydrinem, zatímco v pivě je toto zvýšení neutralizováno větší reaktivitou aminoskupin peptidů s TNBS. Ze srovnání obou metod vyplývá, že ninhydrinová metoda je výhodnější rychlostí provedení a kratší reakční dobou. Naproti tomu se musí ninhydrinové činidlo připravovat a skladovat mnohem pečlivěji, než TNBS-činidlo.

Velmi jednoduché stanovení aminodusíku poskytuje titrační metoda. Výhodou této metody je, že není zapotřebí speciální zařízení, jako např. kolorimetr, nebo spektrální fotometr, potřebný pro dříve diskutovaná stanovení. Z vlastního principu stanovení a zvláště způsobu vyhodnocení výsledku je nutno předpokládat značné nepřesnosti, a proto se musí tato metoda považovat pouze za orientační. Značný vliv na výsledky této metody má skutečnost, že všechny aminokyseliny neposkytují dobře rozpustné komplexní sloučeniny s mědí. Například cystin, methionin, tryptofan a leucin tvoří špatně rozpustné sloučeniny, které ve směsi s ostatními aminokyselinami se dostatečně rozpouštějí. Vždy je však možné, že stupeň jejich rozpustnosti bude záviset na celkovém složení analyzovaných vzorků.

Metoda stanovení aminodusíku podle Brennera a spol. je založena na obdobném principu jako titrační a v porovnání s ostatními metodami dříve diskutovanými je časově podstatně náročnější. Na výsledky stanovení má vliv stáří fosfátové suspenze i její příprava. Protože tyto faktory mohou měnit výsledky až o 10 %, doporučuje se při každém stanovení současně analyzovat standardní roztok. Také u této metody ne všechny aminokyseliny dávají dobře rozpustné komplexní sloučeniny s mědí, a proto se musí předpokládat, že výsledky stanovení budou závislé na celkovém složení analyzovaných vzorků.

V *tabulce 3* je porovnání hodnot aminodusíku, které jsme získali analýzou vzorků mladiny a piva z různých pivovarů metodami diskutovanými v této práci. Hodnoty aminodusíku zjištěné výpočtem z analýzy jednotlivých aminokyselin na analyzátoru jsou nejnižší. Není započítán aminodusík kyseliny aminomáselné, která se vyskytuje v pivovarských roztocích. Rozdíl mezi množstvím aminodusíku zjištěného výpočtem a metodami TNBS a ninhydrinovou je mj. ovlivněn obsahem peptidů a polypeptidů v analyzovaném vzorku, jejichž koncové aminoskupiny reagují s uvedenými činidly.

Z přehledu výsledků vyplývá, že relativní hodnoty aminodusíku jsou u různých metod srovnatelné, ale absolutní hodnoty se značně liší. Nejnižší hodnoty dává metoda s kyselinou TNBS, dále ninhydrinová metoda a nejvyšší metody založené na tvorbě rozpustných sloučenin s mědí. Protože hodnoty celkového aminodusíku, které se zís-

kají při výpočtech aminokyselin na analyzátoru, jsou podstatně nižší, než hodnoty získané analýzou s kyselinou TNBS, zdá se, že hodnoty získané metodou s kyselinou TNBS odpovídají nejlépe skutečným hodnotám aminodusíku. Naopak metody, založené na tvorbě komplexních sloučenin s mědí, dávají vyšší výsledky, na které mají značný vliv látky mladiny a piva, jako jsou peptidy, které při tomto stanovení reagují obdobně jako aminokyseliny.

Obsah aminodusíku v mladině informuje předběžně sládky, jaký může očekávat průběh hlavního kvašení a stupeň prokvašení vyráběného piva. Předpokládá se, že má-li kvašení probíhat normálně, musí mladina obsahovat 14 mg aminodusíku na 1 % extraktu.

Z *tabulky 3* vyplývá, že absolutní hodnoty aminodusíku při různých stanoveních jsou odlišné, ale že existuje relace mezi dosažitelným prokvašením mladiny a hodnotou aminodusíku stanovenou jednotlivými metodami.

#### Souhrn

V práci se diskutují různé metody pro stanovení aminokyselin a aminodusíku v pivovarských laboratořích. Autorky se zabývaly úpravou vzorků pro analýzu aminokyselin na automatickém analyzátoru a vyhodnotily výši ztrát, které vznikají při úpravě vzorků sladiny, mladiny a piva lyofilizací, izolací aminokyselin na sloupcích Dowexu 50-X4 a pro oddělení vysokomolekulárních dusíkatých látek vysrážením kyselinou trichloroctovou. Zjistily, že nejmenší ztráty aminokyselin v porovnání k původnímu vzorku bez úpravy jsou při pouhém zahuštění vzorku lyofilizací. Pro vlastní funkci a chod analyzátoru zvláště při zpracování vzorku s bohatým obsahem vysokomolekulárních látek jako jsou sladiny a mladiny je vhodná izolace aminokyselin na Dowexu 50-X4 za předpokladu, že vznikají ztráty bazických aminokyselin.

Dále se hodnotily různé metody jednoduchého stanovení aminodusíku, které se mohou uplatnit v běžných provozních laboratořích pivovarů.

Skutečné hodnotě aminodusíku nejvíce odpovídají výsledky získané metodou s TNBS, které se přibližují nízkým hodnotám aminodusíku vypočteným z aminogramů při analýze na automatickém analyzátoru.

Vždy se zjistila relace mezi hodnotou aminodusíku a stupněm prokvašení mladiny. Mají-li se však porovnávat hodnoty u vzorků různého složení a původu, musí se použít jednotná metoda.

#### Literatura

- [1] BASAROVÁ, G. - ČERNÁ, I.: Kvasný průmysl **18**, (1972): 4
- [2] HENRIQUES, SORONSON, Z.: Physiol. Chem. **64**, (1909): 120
- [3] SPACKMAN, D. M., - STEIN, W. H., - MOORE, S.: Anal. Chem. **30**, (1958): 1190
- [4] JONES, M., - RAINBOW, C.: Proc. ASBC (1966): 66
- [5] YEMM, E. W., - COCKING, E. C.: Analyst, **80**, (1955): 209
- [6] WREN, J. J., - WIGGALL, P. H.: Biochem. J. **94**, (1965): 216
- [7] GUENTHER, K. R., - STUTLER, J. S.: Proc. ASBC, (1966): 59
- [8] BRENNER, M. W., - OWADES, J. K., - JAKOVAC, J.: Proc. ASBC (1931): 69



- [9] SATAKE, K., - OKUYANA, T., - OHASHI, M., - SHINODA, T.: Journal of Biochemistry (Tokyo): 47, (1960): :654
- [10] BATESON, J. B.: J. Inst. of Brew., 76, (1970): :150
- [11] MOORE, S., - STEIN, W. H.: J. Biol. Chem., 176, (1948): 367
- [12] BELOZERSKY, A. N., - PROSKURJAKOV, N. J.: Praktická rukověť biochemie rostlin, Vydavatel Sovjetskaja nauka 1951.
- [13] BORCHERS, R.: Analytical Chemistry, 31, (1959): 1179—1180
- [14] TIGANE, E., - WADE, E. H., - WONG, J. T. F., - HANES, C. S.: Canad. J Biochem. Physiol. 39, (1961): 427
- [15] GRUJIĆ - IGNJAC, B., VUŠETIĆ, J., - LAJŠIĆ, S., - LIČANIN, Z., - MEDJED, M.: II. symposium pivovarníků — sborník přednášek, Split (1969), vydal Poslovno udrženje industrije piva, Beograd 1970.
- [16] HEILMANN, J., - BARALLIER, J., - WATZKE, E.: Physiol. Chem. 309, (1957): 219
- [17] MILCH, H.: J. Chromat. 1, (1958): 93
- [18] ROWE, K., - FERBER, E., - FISCHER, H.: J. Physiol Chem. 313, (1958): 174
- [19] ATFIELD, G. N., - MORRIS, C. J. O. R.: Biochem. J., 74, (1960): 37
- [20] WINTER, R.: Anal Chemie, 223, (1966): 172
- [21] JUFIŠZ, M.: J. Chrom. 13, (1964): 560
- [22] HARTEL, J., - PLEUMEEKERS, A. J. G.: Analyt. Chem. 36, (1964): 1021
- [23] ZOMZELY, C., - MARCO, G., - EMERY, E.: Analyt. Chem. 34, (1962): 1414
- [24] HERZ, W. J., - SCHALLENGERGER, R. S.: Food Research, 235, (1980): 491
- [25] CRUIKSHANK, P. A., - SHEEHAN, J. C.: Analyt. Chem. 36, (1964): 1191
- [26] LAMPKIN, N. M., - GEHRKE, C. W.: Analyt. Chem. 37, (1965): 383
- [27] GEHRKE, C. W., - STALLING, D. L.: Separation Science, 2, (1967): 101
- [28] MARINELLI, L.: Brewers Digest, 42, (1967): 93
- [29] KURASKY, A., - BARS, A.: J. Inst. of Brew., 74, (1968): 200
- [30] BOULTON, A. A., - BOUSH, I. E.: Biochem. J., 92, (1964): 11 P
- [31] MOORE, S., - SPACKMAN, W. H., - STEIN, S.: Analyt. Chem., 30, (1958): 1185
- [32] MOORE, S., - SPACKMAN, W. H., - STEIN, S.: Analyt. Chem., 30, (1958): 7
- [33] HUDSON, J. R., - ASHURST, P. R.: Proc. EBC, Brussels, (1963): 500 vydal Elsevier Publishing Co., 1964
- [34] YOSHIDA, T., - HATTAN, H., - MORIMOTO, K.: Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., č. 11, (1968): 63—75
- [35] YOSHIDA, T.: Rept. Res. Lab. Kirin Brewery CO., Ltd., č. 11, (1968): 78—86
- [36] MÄNDL, F., WULLINGER, D., WAGNER, D., PIENDL, A.: Brauwissenschaft, 23, (1970), 142—149
- [37] BASAROVÁ, G., - ČERNÁ, I.: Výběr a aplikace fyzikálně chemických a biochemických metod pro hodnocení meziproduktů piva. Závěrečná zpráva VÚPS, ev. č. 9/15, 1971
- [38] THOMPSON, J. F., - MORRIS, C. J., GERING, R. K.: Analyt. Chem. 31, (1959): 1028—1031
- [39] MOŠTEK, J., - ŠOLÍNOVÁ, H., - ČEPIČKA, J.: Kvasný průmysl, 17, (1971): 121—128