

## Pivovazství a sladažství

### Metodika stanovení prolinu ve sladíně

Ing. MARIE NENTVICOVÁ - Ing. MIROSLAV TRKAN, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, pracoviště Brno

S rychlým rozvojem sladařské technologie, používáním surogátů při výrobě piva a s ním spojeným používáním enzymů pro rmutování z jiných zdrojů než ze sladu, ukazuje se nutné získat další informace o skladbě aminokyselin, poněvadž obsah jednotlivých aminokyselin se poněkud mění s použitým procesem sladování.

Studiem aminokyselin ve sladařství a pivovarství se zabývalo mnoho autorů. Jones a Pierce [1, 2] studovali změny koncentrace aminokyselin, zejména prolinu při výrobě sladu. Z jejich práce vyplývá, že prolin má unikátní pozici mezi nízkomolekulárními dusíkatými sloučeninami. Zdá se, že v procesu sladování obsah prolinu stále vzrůstá, a to stejnou rychlostí jako vývin embrya, na rozdíl od volného  $\alpha$ -aminodusíku, který stoupá do maxima asi ve 4. dnu klíčení a potom klesá, když je normální sladovací cyklus ukončen.

Podle výsledků zkoušek seřadili nízkomolekulární dusíkaté látky do tří skupin, jejichž představiteli jsou amidy, glycin a prolin. Amidy dosahují maximální koncentrace zhruba po čtyřech dnech sladování, potom následuje pokles. Glycin dosáhne maxima rovněž po čtyřech dnech klíčení a potom se udržuje na konstantní výši. Prolin narůstá během celého cyklu sladování. Autoři vyslovili domněnku, že koncentrace prolinu ve vyrobeném sladu může být ukazatelem délky sladování, za předpokladu, že nebylo použito chemických prostředků, které koncentraci aminokyselin snižují.

O důležitosti prolinu při klíčení pojednává i další práce Jonese a Pierce [3].

Protože prolin zaujímá centrální pozici v metabolismu klíčícího zrna, domnívají se Lie a Rasch [4], že stanovení této aminokyseliny může přinést účinné informace k analytice volného  $\alpha$ -aminodusíku ve sladu.

Prolin je také jedna z velmi mála dusíkatých složek sladu, která prochází relativně nezměněna normálním kvašením až do piva, kde jej lze dokázat. V této práci studovali norští autoři obchodní slady i slady z čistých odrůd z hlediska množství prolinu a volného  $\alpha$ -aminodusíku a tato kritéria srovnávali s hodnotami konvenčních analytických metod u sladů, např. s extraktivou diferencí moučka — šrot, Kolbachovým číslem, relativním extraktem při 45 °C apod.

Autoři došli k názoru, že koncentrace prolinu se mění s odrůdou ječmene a s podmínkami při sladování. Stanovením prolinu v mladíně nebo pivu lze získat zajímavé informace o použitém sladu.

Nalézt vhodnou metodiku pro stanovení prolinu je poměrně obtížné. Protože aminokyseliny jsou si chemicky velmi podobné — všechny obsahují stejné funkční skupiny, aminové a karboxylové, je jejich dělení, popřípadě individuální stanovení, velmi obtížné. Kolem roku 1940 vznikly dvě metody, které se velmi dobře osvědčily pro tyto účely, a to papírová chromatografie a chromatografie na měničích iontů [5].

Papírová chromatografie slouží především k identifikaci aminokyselin, je velmi citlivá, lze jí dokázat i nepatrná množství (5  $\mu$ g i méně). Také její provedení je vcelku jednoduché, má však význam zejména pro kvalitativní stanovení.

Ke kvantitativnímu stanovení, o němž v tomto případě jde, používá se dnes nejčastěji chromatografie na měničích iontů. Měníče iontů jsou umělé pryskyřice, které mají bázecké nebo kyselé skupiny; kyselé skupiny ( $-\text{SO}_3\text{H}$  nebo  $\text{COOH}$ ) mohou odštěpit proton, který však zůstává vázán, aby byla zachována elektroneutralita. Může se oddělit jen tehdy, vstoupí-li jiný pozitivní ion na



jeho místo. To se děje právě při výměně iontů. Zcela analogicky se vyměňují i negativní ionty, např.  $\text{—NH}_3^+$ ,  $\text{OH}^-$  z pryskyřice vymění svůj  $\text{OH}^-$  za  $\text{Cl}^-$  nebo  $\text{RCOO}^-$ .

Principu výměny iontů bylo využito v řadě prací, zabývajících se stanovováním prolinu ve směsi aminokyselin. Autoři Troll a Lindsley [6] vypracovali fotometrickou metodu na stanovení prolinu za použití ninhydrinové reakce. Při aplikaci na biologický materiál interferují i jiné aminokyseliny, a proto se musí odstranit. Autoři odstraňují interferující základní aminokyseliny — lysin, hydroxylysin a ornithin protřepáním roztoku s permutitem. Za těchto podmínek je metoda specifická pro prolin při určení v hydrolyzátech, moči a plazmě.

**Postup:** Roztoky (koncentrace  $1\text{--}5 \cdot 10^{-5}$  M prolinu) b,ly třepány 5 minut s 1/10 váhového množství permutitu. 5 ml roztoku po filtraci, 5 ml ledové kyseliny octové a 5 ml ninhydrinového reagens se zahřívá ve vodní lázni po jednu hodinu ve zkumavkách s plastickými zátkami. Roztoky se ochladí na pokojovou teplotu a extrahují 5 ml benzenem 5 minut třepáním. Benzenová fáze se oddělí a změří se optická hustota při 515 nm.

**Ninhydrinové činidlo:** 125 mg ninhydrinu na 3 ml ledové kyseliny octové + 2 ml 6 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , rozpustí se zahřátím na 70 °C.

Tato práce je vlastně modifikací Chinardovy metody [7] fotometrického stanovení prolinu a ornithinu.

Při pH kolem 1 reaguje ninhydrin s prolinem, ornithinem, lysinem, hydroxylysinem a cystinem. Ostatní aminokyseliny však nereagují. Autor využil této vlastnosti k fotometrickému určení prolinu a ornithinu.

Studoval absorpční křivky aminokyselin pro reakci s ninhydrinem a zjistil, že při vlnové délce 515 nm mají maxima křivky ornithinu a prolinu, přičemž prolin dává pouze 89,8 % zbarvení ornithinu. Při stejné vlnové délce dávají směrodatné hodnoty extinkce citrulin, cystein, lysin, hydroxylysin, pouze však v 10násobnému molárním přebytku. V oblasti 0,02 až 0,1  $\mu\text{M}$  na ml pro prolin a ornithin a v oblasti 0,1 až 0,5  $\mu\text{M}$  pro lysin a hydroxylysin je vztah mezi optickou hustotou a koncentrací aminokyselin lineární.

Schweet [8] stanovoval kvantitativně prolin a kyselinu piperidinovou ninhydrinovou metodou. Interferující aminokyseliny odstraňoval iontoměničem Amberlitem IR-4B.

Principiálně obdobná je metoda autorů Wrena a Wiggalla [9]. Zahnuje čtyři stupně, z nichž první dva se týkají rozkladu složitějších dusíkatých sloučenin na jednoduché aminokyseliny (oxidace, hydrolýza), třetí stupeň se zabývá odstraněním základních aminokyselin a čtvrtý je reakce s ninhydrinem. Je to metoda na stanovení prolinu v přítomnosti jiných ninhydrinopozitivních sloučenin.

K odstranění interferujících aminokyselin používají autoři permutit, s nímž protřepávají zkoumaný vzorek. Po odstředění se čirý supernatant používá k reakci s ninhydrinovým činidlem.

K 1 ml supernatantu se přidá 2,5 ml glycinové soluce a 2,5 ml roztoku ninhydrinu. Zazátkovaná zkumavka se udržuje ve vodní lázni 40 minut při 95 °C. Po ochlazení vodou se roztok extrahuje 5 ml benzenem a centrifuguje se, až je benzenová vrstva čirá. Extinkce benzenové vrstvy se měří v 1 cm kyvetách při 515 nm proti blanku, připravenému z 1 ml vody místo vzorku. Extrakci benzenem autoři doporučují zachovat, poněvadž zvyšuje specifickou barvu produkovanou tyrosinem a hodně barvy vzniklé z histidinu zůstane ve vodní vrstvě. Metodu těchto autorů převzali pro své práce norští výzkumní pracovníci Lie a Rasch [4]. Zabývali se přizpůsobením jednoduchých analytických postupů, vhodných pro rutinní kontrolu, které by zachycovaly koncentrace složek sladu, důležitých při výrobě piva. Volný prolin ve

sladině byl stanovován metodou Wrena a Wiggalla. Stupně 1 a 2 v originální proceduře byly vynechány, rovněž i konečná extrakce benzenem, která odstraňuje barvu vytvořenou tyrosinem a histidinem. V přípravných testech autoři našli, že interference tyrosinu i histidinu byla zanedbatelná a že reprodukovatelnost vzroste, vypustí-li se extrakce.

**Macholán** [10] zpracoval metodiku fotometrického stanovení kyseliny  $\alpha$ -keto- $\delta$ -amino-valerové a prolinu. Metoda se zakládá na katalytické oxidaci prolinu a ornithinu  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  v alkalickém prostředí. Z těchto látek vzniká zjistitelné množství kyseliny  $\alpha$ -keto- $\delta$ -amino-valerové. Autor tak stanovuje prolin. Prolin odděluje od ornithinu a lysinu na sloupci katexu Zerolit 226 (X-4, kuličková forma, velikost zrn 0,15 až 0,36 mm, firma United Water Softeners Ltd., England), propláchnutém několikrát 4 % NaOH a převedeném na  $\text{H}^+$  formu 4 % HCl a dobře promytém vodou.

Z řady uvedených metod jsme vybrali úpravu podle Wrena a Wiggalla [9], kterou používali pro zpracování sladařského materiálu Lie a Rasch. Na rozdíl od uvedených autorů jsme použili pro odstranění základních aminokyselin místo permutitu slabě kyselý katex Zerolit 226, kterého použil Macholán [10] pro oddělení prolinu od ornithinu a lysinu. Na sloupci Zerolitu 226 je možno získat 98 až 99 % původního množství prolinu. Z časových důvodů jsme nahradili zachycování rušivých aminokyselin sloupcem katexu použitím vsádkového způsobu Zerolitu. Množství iontoměniče i dobu působení jsme zjistili empiricky.

#### Použitý materiál a postup metody

1. Glycinová soluce: 4  $\mu\text{mol/ml}$  glycinu ve směsi kyseliny octové a 6 M kyseliny ortofosforečné (3:2 obj.). Roztok je stálý při teplotě místnosti několik měsíců.

2. Roztok ninhydrinu: 40 mg/ml v kyselině octové, připraven zahříváním do 70 °C. Je stálý pouze několik hodin!

3. Zerolit 226: X-4, kulovitá forma, velikost zrn 0,15 až 0,36 mm, firma United Water Softeners Ltd., England. Před použitím se propláchl několikrát 4 % NaOH, potom 4 % HCl převedl na  $\text{H}^+$ -formu a vodou dobře promyl.

**Přístroje:** třepačka Labor, Budapest, typ LE 203; spektrofotometr MOM 201.

**Postup:** 2 ml vzorku sladiny se třepe na třepačce s 0,2 g Zerolitu 226 po dobu 5 min. Filtruje se přes navlhčený filtr Sch X Sch bílá páska, průměru 7 cm. Zkumavka se propláchne třikrát 4 ml destilované vody a filtr ještě dvakrát 4 ml vody. Spojené roztoky se doplní v odměrné baňce na 25 ml. Pro vybarvování se bere 1 ml protřepaného vzorku, přidá se 2,5 ml glycinové soluce a 2,5 ml ninhydrinu. Protřepe se. Zazátkovaná zkumavka se vloží na 40 min do vodní lázně, vyhřáté na  $95 \pm 0,5$  °C. Potom se ochladí na 20 °C, protřepe a nechá 2 h stát. Před měřením se ještě jednou protřepe a měří se extinkce při 515 nm proti blanku, připravenému z 1 ml vody místo vzorku. Kalibrace se provádí tak, že se k 0,5 ml použitého vzorku přidá známé množství (asi 0,5; 1,0; 1,5 atd.  $\mu\text{M}$ ) prolinu v 0,5 ml vody, analyzuje se stejným postupem. Diference extinkce proti roztoku bez prolinu se použije k sestrojení kalibrační křivky.

**Výpočet**

$$\text{prolinový N } \mu\text{g/l} = \frac{a \cdot 14 \cdot 12\,500}{115} = a \cdot 1522,$$

$$\text{prolinový N mg/l} = a \cdot 1,522,$$

kde  $a$  je hodnota pro zjištěnou extinkci odečtená z kalibračního grafu,

115 — molekulová hmota prolinu,

14 — atomová hmota dusíku,

12 500 — přepočet na zředění.



Poněvadž metoda se skládá prakticky ze dvou částí, a to izolace prolinu a jeho kolorimetrického stanovení, zjistili jsme jednak chybu kolorimetrie a jednak také chybu celého stanovení. Chyba kolorimetrického stanovení je  $\pm 2,65 \%$ , míra přesnosti celé metody je  $\pm 3,5 \%$ , což je pro tento typ analýzy velmi dobré. Výpočet míry přesnosti byl proveden podle *Likaře* [11].

V dalším sdělení uvedeme praktické využití stanovení prolinového dusíku pro hodnocení kvality sladu a korelace jeho hodnot s hodnotami ostatních analytických kritérií.

#### Literatura

- [1] JONES, M. - PIERCE, J. S.: Proc. EBC, Congr. 1963, s. 101
- [2] JONES, M. - PIERCE, J. S.: J. Inst. Brew., **70**, 1964, s. 307
- [3] JONES, M. - PIERCE, J. S.: J. Inst. Brew., **73**, 1967, s. 577
- [4] LIE, S. - RASCH, S.: Proc. EBC, Cong. 1969, s. 193—203
- [5] KARLSON, P.: Základy biochemie. Nakladatelství ČSAV Akademie, Praha 1965
- [6] TROLL, W. - LINDSLEY, J.: J. Biol. Chem., **215**, 1955, s. 655
- [7] CHINARD, F. P.: J. Biol. Chem., **199**, 1952, s. 91
- [8] SCHWEET, R. S.: J. Biol. Chem., **208**, 1954, s. 603
- [9] WREN, J. J. - WIGGALL, P. H.: Biochem. J., **94**, 1965, s. 216
- [10] MACHALÁN, L.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie, **328**, 1962, s. 111—119
- [11] LÍKAŘ, O.: Statistické metody v laboratorní práci. SNTL, Praha, 1967
- [12] NENTWICHOVÁ, M.: Dílčí závěrečná zpráva úkolu 2b/15 Brno 1973
- [13] NENTWICHOVÁ, M.: Dílčí závěrečná zpráva úkolu 2c/15 Brno 1974

**Nentwichová, M. - Trkan, M.: Metodika stanovení prolinu ve sladidě.** Kvas. prům. **21**, 1975, č. 6, s. 121—123.

Diskuse významu prolinu v technologii sladu a piva s přehledem specifických analytických metod. Autoři přezkoušeli metodu stanovení prolinu podle *Wrenna* a *Wiggalla*, kterou *Lie* a *Rasch* aplikovali k analyzování sladařského materiálu. Metoda modifikovaná ve způsobu odstraňování rušivých aminokyselin je podrobně popsána.

**Нентвихова, М. — Тркан, М.: Метод определения пролина в сладком сусле.** Квас. прум. **21**, 1975, № 6, стр. 121—123.

Авторы разъясняют роль, какую играет пролин в технологии соложения и пивоварения и перечисляют специальные аналитические методы, применяемые для его определения. Авторы проверили метод Врена и Виггалла модифицированный Льем и Рашом. Усовершенствование метода — в статье подробно описанного — заключается в устранении нежелательного влияния аминокислот. Модифицированный метод отвечает требованиям пивоваренной промышленности.

**Nentwichová, M. - Trkan, M.: Determination of Proline in Sweet Wort.** Kvas. prům. **21**, 1975, No. 6, pp. 121—123.

The article deals with the role of proline in malting and brewing technology and with the specific analytic methods applied for its determination. The authors have carried out analyses of sweet wort using the Wrenn and Wiggall method modified by Lie and Rasch. In the modified method the distorting effects of amino acids are completely eliminated. The modified method is described in detail.

**Nentwichová, M. - Trkan, M. Methodik der Bestimmung des Prolins in der ungehopften Würze.** Kvas. prům. **21**, 1975, No. 6, S. 121—123.

Die Diskussion der Bedeutung des Prolins in der Technologie des Malzes und des Bieres wird durch eine Übersicht der spezifischen analytischen Methoden ergänzt. Die Autoren überprüften die Methode der Prolin-Bestimmung nach Wrenn und Wiggall, die von Lie und Rasch auf die Analysen in dem Mälzereibereich appliziert wurde. Diese in der Art der Beseitigung der störenden Aminosäuren modifizierte Methode wird ausführlich beschrieben.