

## Studium interakcí polyfenolových látek s bílkovinami za podmínek chmelovaru

663.444.3

Ing. JOSEF ŠKACH, CSc., Ing. ALEXANDR MIKYŠKA, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

**Klíčová slova:** pivo, chmel, slad, polyfenoly, anthokyanogeny, flavanoly, bílkoviny, sladiny, chmelovar, tříslovinné komplexy, koagulace

### ÚVOD

Zásadní role při vzniku koloidního zákalu piva je polyfenolovým látkám přisuzována již řadu let. Od principu vzájemné reakce polyfenolů s bílkovinnými složkami extraktu piva jsou odvozeny prakticky všechny dosavadní technologické postupy pro výrobu koloidně stabilních pív, využívající různých způsobů ke korekci obsahu polyfenolových a dusíkatých látek v pivu [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

I přes prokázanou vysokou účinnost stabilizace založené na základě snižování koncentrace polyfenolových látek se dosud nepodařilo stanovit závislost mezi obsahem polyfenolů v pivu a jeho koloidní trvanlivostí. To je logickým důsledkem skutečnosti, že z velmi široké škály polyfenolů surovin a z nich vyrobeného piva se na zhoršení koloidní stability podílejí pouze některé frakce polyfenolů, analyticky většinou jen obtížně identifikovatelné [8].

S využitím moderních analytických technik se podařilo identifikovat řadu oligomerních polyfenolů s prokazatelným vlivem na koloidní stabilitu a objasnit význam jejich struktury z tohoto hlediska [9, 10, 11, 12]. Pro využití při výběru surovin a volbě technologie jsou však tyto informace zatím nepostačující, a proto je z praktického hlediska stále výhodné věnovat pozornost důležitým skupinám polyfenolů, vykazujícím zákalotvornou aktivitu.

Proto se v souvislosti se současným trendem využívání surovin s nízkým obsahem polyfenolů pro výrobu koloidně stabilních pív [12, 13, 14] na našem pracovišti věnovala pozornost vzájemnému vztahu polyfenolových a dusíkatých látek během chmelovaru.

### MATERIÁL A METODY

Sladina pro experimenty se připravovala kongresní metodou užívanou pro stanovení extraktu sladu [15]. Jako výchozí materiál se použily dva slady plzeňského typu z různých sladoven označené A a B.

Extrakt polyfenolů z chmele se získal z k. p. Astrid. Jednalo se o zahuštěný podíl z extrakce chmele horkou vodou z provozní výroby dvousložkového chmelového extraktu. Tento koncentrát s obsahem sušiny 66,9 % se pro potřeby pokusů analyzoval jednak po rozpuštění v destilované vodě při teplotě 90 °C, jednak po hodinovém varu pod zpětným chladičem opět v destilované vodě.

Kongresní sladina se rozdělila na tři díly — pro analýzu původní sladiny, povářené samotné sladiny a její povářené s extraktem chmelových polyfenolů. Var se realizoval pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny, aby se neměnila výchozí koncentrace

extraktu sladiny odparem. V případě sladu A se ke sladidě přidal extrakt polyfenolů v množství odpovídajícím 3,9072 g.l<sup>-1</sup> a pro var sladiny B byla dávka polyfenolového koncentráту 3,9669 g.l<sup>-1</sup>. Po skončení varu a ochlazení se získané vzorky filtrovaly a analyzovaly. Ve všech vzorcích se sledovaly polyfenolové látky a bílkoviny před a po deproteinaci octanem uranylu.

Změny koncentrace polyfenolových látek se stanovovaly metodami celkových polyfenolů podle *Jerumanise* [16], anthokyanogenů podle *Moška* [17] a flavanolů podle *McMurrougha* a *McDowella* [18] s tím, že se pro kvantitativní vyjádření použila kalibrační křivka sestavená pomocí standardu D (+) katechinu (Serva Feinbiochemica, NSR) tak, aby bylo možno výsledky vyjádřit v mg.l<sup>-1</sup> jako u ostatních skupin polyfenolů.

Bílkoviny s relativní molekulovou hmotností větší než 5 000 se stanovovaly na principu reakce s Coomassie Brilliant Blue (Serva Feinbiochemica, NSR) [19]. Pro kalibraci se použily izoláty bílkovin z různých pív a mladín získané jak vysolením síranem amonným, tak gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G 25, ve kterých se stanovil dusík po mineralizaci kyselinou sírovou. Výsledky jsou vyjadřovány jako bílkovinný dusík v mg.l<sup>-1</sup> [20].

Deproteinace se prováděla pomocí octanu uranylu (k. p. Spolana Neratovice, ČSSR) tak, že se do příslušného vzorku přidal pevný octan uranylu v množství odpovídajícím výsledné koncentraci 0,02 mol.l<sup>-1</sup>. Po dvacetiminutovém míchání na magnetické míchačce se vzniklý precipitát odfiltruje.

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem provedených experimentů bylo studium významu sladových a chmelových polyfenolů pro vylučování bílkovin sladiny z roztoku ve formě tříslobílkovinných komplexů za podmínek chmelovaru. K tomuto účelu je nutno stanovit nejen látky vstupující do reakce, ale také zjišťovat podíl polyfenolů vázaných s bílkovinami. Specifická kvantifikace tříslobílkovinných komplexů je však velmi obtížně řešitelná. Proto se jako metoda umožňující alespoň částečnou orientaci zvolila deproteinace vzorků na základě předpokladu, že při totálním vysrážení bílkovin zůstanou v roztoku pouze volné polyfenoly. Octan uranylu splňuje velmi dobře podmínku úplného vysrážení bílkovin. Jelikož se však octany těžkých kovů (octan olovnatý) doporučují k izolaci polyfenolů z roztoku, ověřovala se nejprve případná precipitace standardních roztoků katechinu a epikatechinu. Výsledky v *tabulce 1* ukazují, že se koncentrace zmíněných jednoduchých flavanolů snižuje působením octanu uranylu jen velmi málo — prakticky na hranici analytické chyby. Ověřit pů-

Tabulka 1. Vliv octanu uranylu na koncentraci flavanolů v roztocích standardů

	Původní roztok (mg.l <sup>-1</sup> )	Po srážení (mg.l <sup>-1</sup> )	Srazitelné (%)
D (+) katechin	191,0	182,0	4,7
L (-) epikatechin	82,5	75,0	9,0

sobení octanu uranylu na anthokyanogeny z přírodního materiálu se nepodařilo vzhledem k obtížím s jejich izolací bez příměsí proteinů. Jednoduché flavanoly, které zůstávají při zvoleném způsobu deproteinace nedotčeny, se považují za látky s nejmenší tzv. „tříslovinnou silou“. Lze tedy s určitým zjednodušením považovat polyfenoly srážené při deproteinaci octanem uranylu buď za vázané v komplexech s bílkovinami, nebo alespoň za látky schopné tyto komplexy tvořit, případně za neflavanolové polyfenoly.

Z analýzy použitého „tříslovinného“ podílu chmelového extraktu (tab. 2) vyplývá, že obsahuje značné množství bílkovin, a že prakticky 90 % všech jeho polyfenolových složek je srazitelných octanem uranylu, tedy že jsou buď vázány v komplexech s proteiny, nebo alespoň ve složitější struktuře, neboť jednoduché katechiny se octanem uranylu nesrážejí. Varem samotného „tříslovinného“ extraktu chmele se projevila koagulace tříslobílkovinných komplexů poklesem hodnot anthokyanogenů o 20 % a bílkovin o 3 %. Zastoupení polyfenolových látek srazitelných octanem uranylu se však prakticky neměnilo a lze tedy říci, že výsledkem procesu extrakce při výrobě produktu jsou již značně stabilní látky, ať už polyfenoly, či jejich komplexy s bílkovinami.

Za velmi důležitou je nutno považovat skutečnost, že tříslovinný koncentrát obsahuje z hlediska cel-

Tabulka 2. Obsah polyfenolových látek a bílkovin ve vodné složce chmelového extraktu

Postup rozpouštění	Sledované látky	Před srážením mg v 10 g extraktu	Po srážení mg v 10 g extraktu	Srazitelné (%)
Destilovaná voda 90 °C 1 hodina	Anthokyanogeny	182	16	91,2
	Flavanoly	10,1	1,8	82,2
	Bílkovinný dusík	283	5	98,2
Destilovaná voda 100 °C 1 hodina	Anthokyanogeny	144	16	88,9
	Flavanoly	10,2	2,5	75,5
	Bílkovinný dusík	275	5	98,2

kového množství bílkovin ve sladině již významné množství bílkovinného dusíku, které je nutno uvažovat při hodnocení výsledků.

Proti extraktu polyfenolů z chmele je obsah polyfenolových látek srazitelných octanem uranylu v kongresní sladině podstatně menší, jak dokumentují tabulky 3 a 4. Velmi zajímavé jsou přitom hod-

Tabulka 3. Vybrané analytické parametry sladiny, povážené sladiny a sladiny povážené s chmelovým extraktem (slad A)

Sledované látky	Sladiny	Před srážením (mg.l <sup>-1</sup> )	Po srážení (mg.l <sup>-1</sup> )	Srazitelné (%)
Anthokyanogeny	SP	17,0	5,5	67,6
	SV	12,5	5,0	60,0
	SVE	47,5	17,8	62,5
Flavanoly	SP	8,1	4,4	45,7
	SV	7,5	5,0	33,3
	SVE	9,6	6,3	34,4
Bílkovinný dusík	SP	532	0	100,0
	SV	464	5	98,9
	SVE	399	1	99,7

SP — původní sladina, koncentrace extraktu 7,99 %  
SV — sladina povážená, koncentrace extraktu 7,94 %  
SVE — sladina povážená s tříslovinným extraktem chmele, koncentrace extraktu 8,17 %

Tabulka 4. Vybrané analytické parametry sladiny, povážené sladiny a sladiny povážené s tříslovinným extraktem chmele (slad B)

Sledované látky	Sladiny	Před srážením (mg.l <sup>-1</sup> )	Po srážení (mg.l <sup>-1</sup> )	Srazitelné (%)
Anthokyanogeny	SP	17,0	6,0	64,7
	SV	10,5	5,0	52,4
	SVE	51,0	18,5	63,7
Flavanoly	SP	9,0	4,9	45,6
	SV	6,6	4,0	39,4
	SVE	10,4	6,3	39,4
Bílkovinný dusík	SP	545	0	100,0
	SV	387	1	99,7
	SVE	380	0	100,0

SP — sladina původní, koncentrace extraktu 8,23 %  
SV — sladina povážená, koncentrace extraktu 8,14 %  
SVE — sladina povážená s tříslovinným extraktem chmele, koncentrace extraktu 8,42 %

noty anthokyanogenů a flavanolů před a po povážení, které ukazují, že se prakticky zachovává během varu koncentrace jednoduchých, octanem uranylu nesrazitelných sloučenin. Zaznamenal se pouze pokles celkových anthokyanogenů a flavanolů, zřejmě obsažených v komplexech s bílkovinami, které se během varu vyloučily z roztoku. Znamená to tedy, že během varu kongresní sladiny jednoduché flavanoly nepodléhají změnám vedoucím k tvorbě větších struktur s menší stabilitou v roztoku, ať už jde o polymeraci nebo reakci s bílkovinami.

Hodnocení změn celkových polyfenolů v tomto směru není možné, neboť octan uranylu ruší jejich stanovení běžně užívanou metodou.

Diskutované tendence se projeví ve sladinách z obou zkoušených sladů, ovšem v různé míře, což je pravděpodobně důsledkem toho, že množství a skladba polyfenolů jsou závislé na použité výchozí surovině — ječmenu.

Podstatně složitější systém představuje kombinace sladových a chmelových polyfenolů při chmelovarů. Po zhodnocení změn v této fázi se jako výchozí koncentrace použily hodnoty vypočtené na základě stanovení jednotlivých složek na konci varu samostatně povařeného kongresní sladiny a roztočce vodné fáze z dvousložkového chmelového extraktu. Tím se sledovalo postižení změn, způsobených vzájemnou interakcí složek pocházejících ze sladů s látkami pocházejícími z chmele, při současné eliminaci změn majících původ v prostém povaření výchozích extraktů. Výsledky získané za daného zjednodušujícího předpokladu, tj., že při kombinovaném povaření obou složek se uplatní ve stejné míře změny zaznamenané během povařování výchozích systémů, uvádí pro dva různé slady *tabulka 5 a 6*.

Nejvýraznějším poznatkem je, že v obou případech se během chmelovaru vyloučilo značné množství bílkovin, které je nutno přičíst vzájemnému působení tříslobílkovinných komplexů sladů a chmele. Kromě toho se zjistil zřetelný pokles celkových polyfenolů a anthokyanogenů pravděpodobně vyloučených ve formě zmíněných komplexů. Naproti tomu je změna flavanolů podstatně menší a vzhledem k relativně nízké hladině koncentrací jsou uvedené hodnoty zatíženy poměrně velkou relativní chybou a je tedy možno hovořit spíše o tendenci k nižším hodnotám. Ze stejného důvodu (velká relativní chyba nízkých hodnot) je vyhodnocení vztahů pro jednoduché polyfenoly nesrazitelné oc-

*Tabulka 5. Změny koncentrace polyfenolových látek a bílkovin při varu kongresní sladiny*

	Sledované látky	Před varem (mg.l <sup>-1</sup> )	Po varu (mg.l <sup>-1</sup> )	Úbytek (%)
Sladina ze sladů A	Celkové polyfenoly	59	51	13,6
	Anthokyanogeny	17,0	12,5	26,5
	Flavanoly	8,1	7,5	7,4
	Bílkoviny	532	464	12,8
Sladina ze sladů B	Celkové polyfenoly	65	62	4,6
	Anthokyanogeny	17,0	10,5	38,2
	Flavanoly	9,0	6,6	26,7
	Bílkoviny	545	387	29,0

*Tabulka 6. Změny koncentrace polyfenolových látek a bílkovin při varu kongresní sladiny s polyfenolovými látkami chmele*

	Sledované látky	Teoretický* obsah (mg.l <sup>-1</sup> )	Skutečný obsah (mg.l <sup>-1</sup> )	Úbytek (%)
Sladina ze sladů A	Celkové polyfenoly	322	205	36,3
	Anthokyanogeny	68,6	47,5	30,8
	Flavanoly	11,5	9,6	16,5
	Bílkoviny	572	399	30,1
Sladina ze sladů B	Celkové polyfenoly	337	203	39,8
	Anthokyanogeny	67,5	51,0	24,4
	Flavanoly	10,6	10,4	1,9
	Bílkoviny	496	380	23,4

\* Teoretický obsah byl uvažován jako součet množství polyfenolových látek v původní sladině a dávce chmelového extraktu, zmenšený o podíl daný vysrážením při varu samotných složek

tanem uranylu během chmelovaru problematické. Zdá se však, že zastoupení těchto polyfenolových složek se během chmelovaru mění jen málo a jejich obsah je v mladině po hodině varu srovnatelný se sladinou povařenou stejnou dobu.

Literatura

[1] DROENNE, M.: Brau. Rdsch., **90**, 1979, s. 23.  
[2] NARZISS, L., GROMUS, J.: Brauwiss., **35**, 1982, s. 198.  
[3] SMITH, C. S.: The Brewer, **82**, 1982, s. 60.  
[4] JAGER, P.: Mitt. Versuchsstat. Gärungsgewerbe in Wien, **34**, 1980, č. 9/10, s. 83.  
[5] REIBLE, K. et al.: Mschr. f. Brau. **36**, 1983, s. 76.  
[6] HARTMEIER, W.: Brau. Rdsch., **90**, 1979, s. 31.  
[7] SCHAFT, H.: Brau. Rdsch., **90**, 1979, s. 16.  
[8] ŠKACH, J.: Koloidní stabilizace piva moderními průmyslovými preparáty (Kandidátská disertační práce.) Praha, VŠCHT, 1984.  
[9] DELCOUR, J. A. et al.: J. Inst. Brew., **87**, 1981, s. 319.  
[10] MULKAY, P., TOUILLAX, R., JERUMANIS, J.: Cerevisia, **6**, 1981, s. 29.  
[11] DELCOUR, J. A. et al.: J. Inst. Brew., **90**, 1984, s. 381.  
[12] SARX, H. G., WISCHMANN, H.: Forum der Brauerei, **38**, 1985, s. 152.  
[13] ERDAL, K.: J. Inst. Brew., **92**, 1986, s. 220.  
[14] WETTSTEIN, D. et al.: Techn. Quart. MBAA, **22**, 1985, s. 41.  
[15] VANČURA, M. et al.: Pivovarsko-sladařská analytika, 1. vyd., Praha 1966.  
[16] JERUMANIS, J.: Brauwiss., **25**, 1972, s. 313.  
[17] MOŠTEK, J.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie, I. část, 1. vyd., Praha 1973, s. 182.  
[18] McMURROUGH, I., McDOWELL, J.: Anal. Biochem., **91**, 1978, s. 92.  
[19] BRADFORD, M. M.: Anal. Biochem., **72**, 1976, s. 248.  
[20] ŠKACH, J., ZIMOVA, I., MIKYŠKA, A.: Modernizace analytické kontroly v pivovarském průmyslu. (Výzkumná zpráva.) Praha, VÚPS, 1985.

**Skach, J. - Mikyška, A.: Studium interakcí polyfenolových látek s bílkovinami za podmínek chmelovaru.** Kvas. prům. **33**, 1987, č. 8—9, s. 251—254.

Vliv polyfenolových látek sladu a chmele na srážení bílkovin během chmelovaru se ověřoval v laboratorních podmínkách. Zastoupení jednoduchých a v komplexech vázaných polyfenolů v kongresní sladinně, polyfenolovém extraktu z chmele, v povařených výchozích složkách a mladinně se testovalo srážením bílkovin octanem uranilu. Polyfenolový extrakt chmele je tvořen převážně složitějšími, termicky odolnými polyfenoly a bílkovinami. Sladina obsahuje značné množství jednoduchých polyfenolů, které během varu nepodléhají polymeračním změnám ani nereagují s bílkovinami za tvorby látek nestabilních v roztoku. Při chmelovaru dochází vzájemným působením sladových a chmelových polyfenolů vázaných v komplexech s bílkovinami k podstatnému úbytku bílkovin vysrážených ve formě tríslobílkovinných komplexů.

**Шах, И. - Микышка, А.: Изучение взаимодействий полифенольных веществ с белками в условиях хмелеварки.** Квас. прум. **33**, 1987, № 8—9, стр. 251—254.

Влияние полифенольных веществ солода и хмеля на коагуляцию белков в течение хмелеварки исследовалось в лабораторных условиях. Представление простых и в комплексах связанных полифенолов в сусле, полифенольном экстракте из хмеля, в исходных компонентах исследовалось при помощи коагуляции белков уранилом. Полифенольный экстракт хмеля образуется прежде всего более сложными, термостойчивыми полифенолами и белковыми веществами. Сусло содержит значительное количество простых полифенолов, которые в течение варки не подвергаются полимерационным изменениям и не реагируют с белками с образованием веществ нестабильных в растворах. При хмелеварке под взаимодействием полифенолов солода и хмеля, связанных в комплексах с белками происходит существенный убыток белковых веществ, коагулирующихся в форме дубильнобелковых комплексов.

**Skach, J. - Mikyška, A.: Interactions of Polyphenols with Proteins During Hop Boiling.** Kvas. prům. **33**, 1987, No. 8—9, pp. 251—254.

The effect of polyphenol compounds of malt and hops on the protein precipitation during hop boiling was tested on a laboratory scale. The quantity of the individual and in the complexbound polyphenols in congress wort, polyphenol extract of hops and boiled raw materials and hopped wort was tested by the protein precipitation with uranyl acetate. Polyphenol extract of hops consists of more complex polyphenols and proteins that are thermally resistant. Wort consists of a large quantity of single polyphenols which are resistant to the polymerization changes during the boiling as well as do not react with proteins to compounds being unstable in the solution. Due to simultaneous effect of malt and hop polyphenols that are bounded in complexes with proteins a significant quantity of proteins is precipitated in the form of tannin-protein complexes during the hop boiling.

**Škach, J. - Mikyška, A.: Studium der Interaktionen der Polyphenol-Stoffe mit den Eiweißstoffen beim Hopfenkochen.** Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 8—9, S. 251—254.

Der Einfluß der Polyphenole des Malzes und des Hopfens auf die Ausfällung der Eiweißstoffe während des Hopfenkochens wurde in Laborversuchen verfolgt. Die Vertretung der einfachen und der in Komplexen gebundenen Polyphenole in der Kongreßwürze, im Polyphenol-extrakt aus Hopfen, in den gekochten Ausgangbestandteilen und in der Würze wurde durch Eiweißfällung mittels Uranylazetat getestet. Der Polyphenol-extrakt des Hopfens besteht überwiegend aus komplizierteren, thermisch beständigen Polyphenolen und Eiweißstoffen. Die Süßwürze enthält beträchtliche Mengen einfacher Polyphenole, die während des Sudprozesses keinen Polymerisationsänderungen unterliegen und nicht mit den Eiweißstoffen reagieren. Beim Würzekochen findet aufgrund der wechselseitigen Einwirkung der Malz- und Hopfenpolyphenole eine wesentliche Abnahme der in der Form von Gerbstoff-Eiweißstoffkomplexen ausgefällten Eiweißstoffe statt.