

Ing. ILIAN ILIEV, Ing. BOŽIDAR ČORBANOV, Institut organické chemie, Centrum fytochemie Bulharské akademie věd, Sofie

Ing. VIOLETA TODOROVA, Institut pivovarského průmyslu a chmelářství, Sofie

Klíčová slova: bílkovinný hydrolyzát, slad, odpad, sladový květ, alkalická proteasa, hydrolyza, kvasinky

1. ÚVOD

Sladový květ je odpadem při výrobě sladu (3 až 5 %). Jeho složení je dávno známo [1, 2] a vysoký obsah bílkovin vždy vzbuzoval zájem k využití jako zdroje bílkovin. Přes svou vysokou hygroskopičnost se sladový květ snadno skladuje a je výborným substrátem pro přípravu enzymového bílkovinného hydrolyzátu.

Cílem této práce je studium hydrolyzy bílkovin ve sladovém květu pomocí alkalické proteasy, analýza složení získaného produktu a posouzení možností využití enzymového bílkovinného hydrolyzátu.

2. VYUŽITÍ SLADOVÉHO KVĚTU — LITERÁRNÍ PŘEHLED

Jediná rešerše věnovaná sladovému květu byla publikována v roce 1971 [3]. Proto budou v tomto přehledu krátce uvedeny nové poznatky o využití sladového květu. Všechny práce jsou pro přehlednost uvedeny podle oblastí použití.

2.1 Sladový květ pro krmivářské účely

Jako přísada ke krmivu se sladový květ používá již dlouho. Efektivnost tohoto využití je určena nízkou cenou. Sladový květ má ekvivalent škrobu 46 %, obsah bílkovin je 21 až 22 % [4]. Sladový květ se používá jen jako přísada ke krmivu, protože ve větším množství může způsobit intoxikaci zvířat, související s rozmnožováním plísní v odpadu. Proto byl navržen test toxicity sladového květu [5].

2.2 Sladový květ pro přípravu mikrobiálních médií

Široké uplatnění našel sladový květ jako složka mikrobiálních médií. Speciálně k tomuto účelu

bylo zkoumáno jeho složení v práci Fertmana a Girse [6]. Bylo zjištěno, že přídavek sladového květu úspěšně stimuluje producenty antibiotik [7], pektinasy [8], amylasy [9], L-lyzinu [10] a kyseliny citrónové [11]. Sladový květ se využívá i při kultivaci kvasinek a plísní [12]. V řadě prací [6, 13] se poukazuje na zvýšení stimulačního účinku sladového květu při přidávku bílkovinného hydrolyzátu a autolyzátu kvasinek. Ve většině případů se používaly extrakty sladového květu [6, 7, 9, 10].

2.3 Sladový květ v potravinářském průmyslu

Sladový květ byl zkoumán jako potravinářská surovina, přičemž bylo dokázáno, že potravinářská hodnota tohoto odpadu je nižší než kaseinu [14]. Při výrobě chleba byl použit extrakt sladového květu v organickém rozpouštědle jako zdroj glutathionu [15]. Do současné doby je povolena oficiálně pouze jediná potravinářská přísada s použitím sladového květu. Sladový květ je využit jako zdroj enzymů a jako substrát byly použity kvasnice. Získaný produkt je povolen jako chuťový intenzifikátor, obsahující max. 6 % 5-nukleotidů [16]. Extrakt sladového květu obsahující 0,7 % aminodusíku (vztaheno na sušinu extraktu) byl vyzkoušen jako složka (přísada) pivovarského sladu a jako nositel aminodusíku [17]. Týž extrakt byl zkoušen i jako zdroj proteolytických enzymů [18].

2.4 Další využití sladového květu

Alkalicky hydrolyzovaný sladový květ byl použit i při geologických vrtech jako součást kalu [14] a tukový extrakt sladového květu byl navržen jako složka kosmetického krému speciálního určení [20].

Pouze v jedné krátké zprávě [21] se uvádí, že bílkoviny sladového květu mohou být podrobeny enzymové hydrolyze.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Sladový květ

Při práci byl použit sladový květ získaný při výrobě světlého sladu, obsahující 21,5 až 22,8 % surové bílkoviny.

Alkalická proteasa

Pro hydrolýzu byla použita alkalická proteasa pro technické účely ($100\,000\text{ j. g}^{-1}$) a předčištěná alkalická proteasa pro potravinářské účely ($450\,000\text{ j. g}^{-1}$). Výrobce jsou závody na výrobu enzymových preparátů Botevgrad, Bulharsko. Jedna proteolytická jednotka byla rovna množství enzymu, které katalyzuje uvolnění $1\text{ }\mu\text{g}$ tyrosinu z 1,2% roztoku kaseinu při $\text{pH} = 7,4$ a teplotě 37°C za minutu.

Enzymová hydrolýza

Enzymová hydrolýza byla prováděna při 50°C a stálém míchání při $\text{pH} = 8,5$, které bylo během první hodiny udržováno konstantními přísadkami roztoku NaOH ($c = 4\text{ mol. l}^{-1}$).

Analytické metody

Obsah bílkovin byl stanovován podle Kjeldahla a obsah dextrinů podle [22]. Obsah aminokyselin rozpustného bílkovinného hydrolyzátu sladového květu byl určován po 24hodinové kyselé hydrolýze HCl ($c = 5,7\text{ mol. l}^{-1}$) při 110°C přístrojem Biotronic LC-601 (SRN). Stanovení obsahu tryptofanu bylo prováděno kolorimetricky podle [23]. Hydrofóbnost zbylých aminokyselin (Q-hodnota) se stanovovala podle metody [24].

Obsah aminodusíku byl určován pomocí 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny v přítomnosti dodecylsulfátu sodného [25]. Stupeň hydrolýzy byl stanoven jako procento hydrolyzovaných peptidických vazeb.

Modelové pokusy

Vliv bílkovinného hydrolyzátu ze sladového květu na fermentaci kvasinek byl vyzkoušen na třech kmenech podle metody [26]. Kvasinky *Kluyveromyces fragilis* 20°C byly kultivovány na mléčné syrovátce (50 g. l^{-1} laktosy), k níž bylo přidáno 4 g. l^{-1} bílkovinného hydrolyzátu, což odpovídalo 80 mg aminodusíku. Kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, var. Eperne a var. Varna-1 byly použity při druhotné fermentaci suchého jablečno-vinného substrátu, obsahujícího 16 mg. l^{-1} aminodusíku. K živné půdě bylo přidáváno 12 g. l^{-1} zkvasitelných cukrů a bílkovinný hydrolyzát ze sladového květu, který zabezpečil 30 až 40 mg aminodusíku na 1 l .

Rychlost fermentace byla určována jako specifická ethanolová produktivita kvasinek (g alkoholu na g kvasinek za hodinu metodou zbytkového objemu). Kvasničné buňky byly imobilizovány v 1,5 % agaru (obsahujícím 1 mg buněk) do injek-

ních stříkaček objemu 2 ml a gel ve formě kapky zatvrdl na dně stříkačky.

Tři paralelní vzorky se plnily fermentační půdou a inkubovaly při nepřetržitém třepání při odpovídající teplotě. Oxid uhličitý, vznikající v průběhu fermentace, vytěsňoval část fermentačního roztoku a zbytkový objem byl během 24 hodin registrován.

Specifická ethanolová produktivita q byla vyčíslena jako funkce zbytkového objemu V_1 :

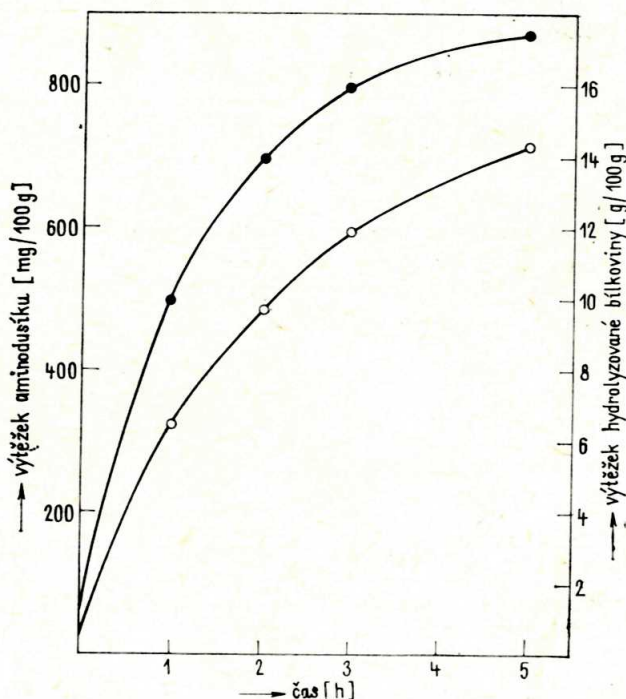
$$q = -1,675 \frac{dV_1}{dt} \quad (1)$$

kde t je čas. Získané výsledky jsou průměrem ze tří paralelních zkoušek.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Enzymová hydrolýza

Enzymová hydrolýza sladového květu probíhá ve velmi příznivých podmínkách, což podmiňuje zachování všech aminokyselin a biologicky aktivních látek. Na obrázku 1 je typický průběh enzy-

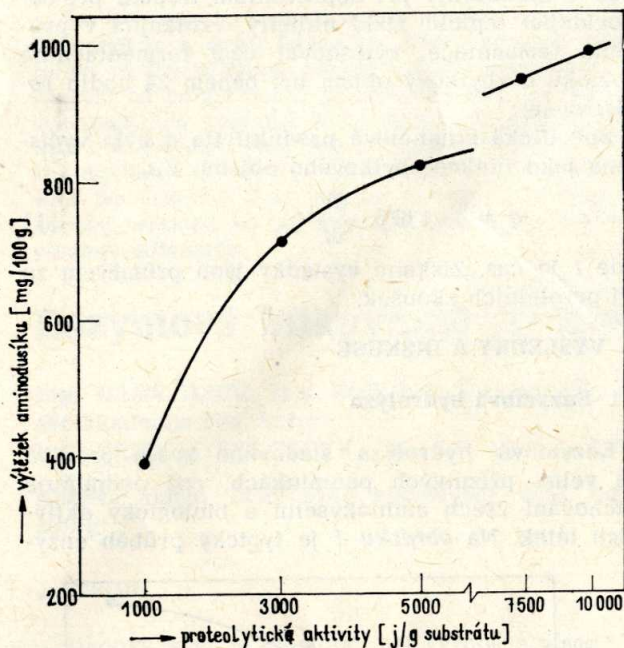


Obr. 1. Změny výtěžku aminodusíku ● a hydrolyzované bílkoviny ○ v průběhu hydrolýzy (suspenze 10 %, enzym — 5000 jednotek. g^{-1})

mové hydrolýzy. Je vidět, že zvětšení koncentrace aminodusíku odpovídá zvýšení obsahu hydrolyzované bílkoviny. Při použití proteasy se uskutečňuje nejen hydrolýza, ale i extrakce bílkoviny ze substrátu. Bez přísadky proteolytického enzymu se získává extrakt obsahující pouze 8 % sušiny sladového květu.

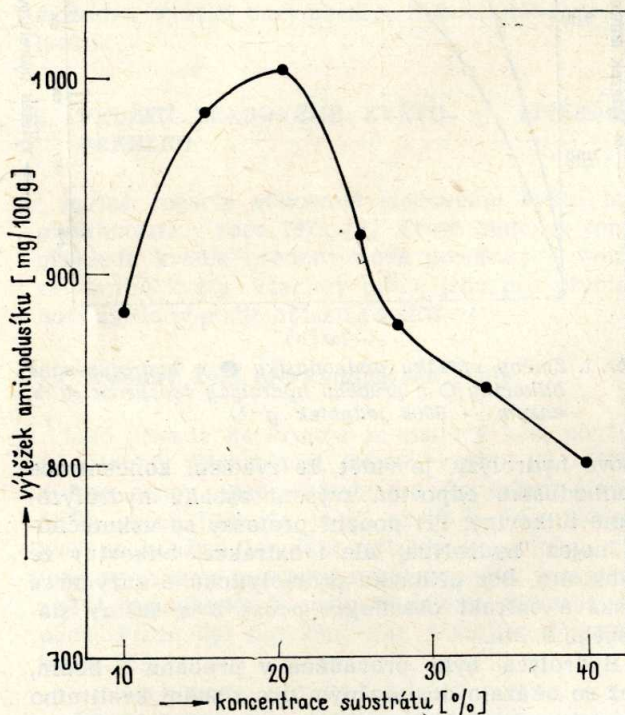
Hydrolýza byla prováděna v průběhu 5 hodin, což se ukázalo dostatečným pro získání kvalitního produktu. Je třeba poznamenat, že při delší hydrolýze se množství bílkovinného hydrolyzátu zvyšuje nepodstatně, ale silně se zvyšuje nebezpečí mikrobiálního znečištění.

Pro určení optimálního vztahu mezi množstvím enzymu a substrátu byly provedeny zkoušky, jejichž výsledky jsou zobrazeny na obr. 2. Je vidět,



Obr. 2. Závislost výnosu aminodusíku na množství enzymu při hydrolýze (suspenze 10 %, 5 hodin)

že při přidavku enzymu 5000 j.l⁻¹ a době hydrolýzy 5 hodin se získávají nejspokojivější výsledky. Použití většího množství enzymu vede k vyššímu výnosu aminodusíku. Avšak pro další nevelké zvýšení výnosu aminodusíku je nutno podstatně



Obr. 3. Závislost výťažku aminodusíku na koncentraci substrátu (enzym 5000 jedn. g⁻¹, doba hydrolýzy 5 hodin)

zvýšení množství enzymu, což vede k velkému zdražení procesu, a tím ke snížení efektivity.

Během zkoušek bylo zjištěno, že koncentrace substrátu má velký vliv na výtěžek aminodusíku (obr. 3). Je vidět, že pro získávání bílkovinného hydrolyzátu ze sladového květu je optimální koncentrace substrátu 15 až 25 %, i když míchání reakční směsi při koncentraci větší než 10 % je značně ztíženo. Jako výsledek zkoušek je možno určit optimální podmínky hydrolýzy sladového květu pomocí alkalické proteasy: substrát 15 až 20 %, pH 8 až 9, teplota 50 až 55 °C a množství enzymu 2000 až 5000 jednotek na g substrátu.

Alkalické proteasy — subtiliziny jsou nejdostupnějšími enzymy, které se často využívají při výrobě bílkovinných hydrolyzátů. Mají širokou substrátovou specifitu, což umožňuje získat bílkovinné hydrolyzáty s vysokým stupněm hydrolýzy. Při získávání bílkovinných hydrolyzátů ze sladového květu dosahuje stupeň hydrolýzy 38 až 43 %.

V závislosti na určení produktu jsme používali technickou nebo čistěnou proteasu. Alkalická proteasa je plně inhibována při snížení pH na 5 až 6 a inkubaci při 70 až 80 °C po dobu několika minut.

Tento proces má i druhou výhodu, tj. že roztok bílkovinného hydrolyzátu je možno pasterovat, což je velmi důležité po skončení 5hodinové hydrolýzy.

4.2 Produkty hydrolýzy

Enzymová hydrolýza sladového květu proteasou poskytuje několik konečných produktů.

Je důležité poznamenat, že hydrolyzovaný sladový květ lze lehce vysušit a rozemlít na mouku, která může být využita v kvasném průmyslu. Tímto způsobem získaný produkt obsahuje všechny bílkoviny sladového květu, přičemž kolem 65 % je díky hydrolýze rozpustných. Obsah aminodusíku je průměrně 0,6 až 0,8 %, což odpovídá stupni hydrolýzy 40 % ve vztahu na hydrolyzovanou bílkovinu. V závislosti na určení je možno pH produktu přivést k libovolné hodnotě.

Rožtok obsahující bílkovinný hydrolyzát je možno oddělit, zkoncentrovat a vysušit. Získané produkty jsou bílkovinné hydrolyzáty s obsahem 40 až 45 % hydrolyzované bílkoviny, 40 % dextrinů

Tabulka 1. Složení aminokyselin bílkovinného hydrolyzátu sladového květu

Aminokyselina	Obsah v hydrolyzované bílkovině (%)	Požadavek FAO (%)	Obsah v produktu (g/100 g)
Lysin	5,5	5,5	2,2
Histidin	4,6		1,84
Arginin	3,5		1,4
Kyselina asparagová	15,1		6,04
Threonin	4,2	4,0	1,68
Serin	4,0		1,6
Kyselina glutamová	18,2		7,28
Prolin	6,6		2,64
Glycin	5,4		2,16
Alanin	6,4		2,56
1/2 Cystin	1,3		0,52
Methionin	1,6	3,5	0,64
Valin	6,0	5,0	2,4
Izoleucin	4,1	4,0	1,64
Leucin	6,7	7,0	2,68
Tyrosin	2,6		1,04
Fenylalanin	4,0	6,0	1,6
Tryptofan	0,9	1,0	0,36
Q—hodnota	4 560 J . mol ⁻¹		

a solí. Vysoká koncentrace dextrinů způsobuje technické potíže při sušení těchto proteinů.

Bílkovinný hydrolyzát ze sladového květu prakticky vyhovuje požadavkům FAO na nenahraditelné aminokyseliny (tabulka 1). Má nahořklou chuť. Podle [24] jsou enzymové bílkovinné hydrolyzáty velmi hořké, jestliže hydrofóbnost (Q-hodnota) aminokyselin je vyšší než 5860 J. mol⁻¹. Je-li hydrofóbnost menší než 5440 J. mol⁻¹, je hořkost velmi slabá. Jak je vidět z tabulky 1, Q-hodnota bílkovinného hydrolyzáta ze sladového květu je velmi nízká. To ukazuje na nepřítomnost hořkosti produktu a otevírá možnosti jeho využití v potravinářském průmyslu.

4.3 Stimulační účinky hydrolyzátů na fermentaci

Již dříve publikovanou metodou [26, 27] je možno využít stimulačního účinku bílkovinných hydrolyzátů při fermentaci kvasinek. Zjistili jsme, že bílkovinný hydrolyzát ze sladového květu má v nízkých koncentracích stimulační vliv na fermentaci (tab. 2). Ačkoliv použití sladového květu pro stimu-

Tabulka 2. Vliv bílkovinného hydrolyzáta ze sladového květu na fermentaci kvasinek — modelové zkoušky

Kmeny	Specifická ethanolová produktivita g ethanolu . g ⁻¹ kvasinek . h ⁻¹		
	Kluyveromyces fragilis	Saccharomyces cerevisiae	
		Eperne	Varna 1
Teplota (°C)	40	18	18
Zkoušky: kontrolní — bez pří- dávku bílkovinného hydrolyzáta ze sladového květu	1,1	0,08	0,16
Pokus s přidáním bílkovinného hydrolyzáta ze sladového květu	2,9	0,21	0,26

laci fermentace mikroorganismů je známo [7—13], umožňuje využití proteas a enzymová hydrolýza sladového květu podstatně zvýšit účinnost stimulačního působení sladového květu.

Literatura

- [1] DE CLERK, J.: Textbook of brewing, vol. 1, Chapman and Hall Ltd, London. 1957, s. 216.
- [2] NARZISS, L.: Die Technologie der Malzbereitung, 1976, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- [3] POMERANZ, I., ROBBINS, G. S.: Brew. Dig., **46**, 1971, s. 58, 60, 62, 64.
- [4] DAMMERS, I., HAMM, G.: Landbouwk. Tydschr., **72**, 1960, s. 127.
- [5] SCHULTZ, I., MOTZ, R.: Veterinaarmed., **23**, 1973, s. 790.
- [6] FERTMAN, G. I., GIRS, V. T.: Izv. Vysch. Ucheb. Pishch. Tekhnol., (1), 1972, s. 92.
- [7] FERTMAN, G. I., GIRS, V. T.: Ferm. Spirt. Prom., **35** (5), 1969, s. 23.
- [8] ILCZUK, Z.: Ann. Univ. Maria Curie-Skłodowska, Sect. C, **31**, 1976, s. 159.

- [9] EL-ZALAKI, M., ESMAT, HAMZA, M. A.: Food Chem., **5**, 1980, s. 131.
- [10] MURGOV, I., et al.: Nauchni Tr. Visch. Inst. Khranit. Vkusova Prom-st, Plovdiv, **24** (1), 1977, s. 243.
- [11] USSR Patent 1 409 658.
- [12] CS Patent 170 685.
- [13] BLOK, G. I.: Tr. Vologod. Moloch. Inst. **55**, 1967, s. 157.
- [14] ABDEL-KADER, M. M., et al.: J. Drug. Res. **4**, 1972, s. 1.
- [15] US Patent 2 420 567.
- [16] Anonymous (Food Drug Adm., Wash., DC): Fed. Regirt. 11 May 1973, **38** (91), s. 12397.
- [17] TODOROVA, V., KABAKCHIEVA, G., GINOVA-STOYANOVA, T.: Khran. Prom-st (Sofia), **37** (4), 1988, s. 17.
- [18] NIKOLOVA, A. K., DENCHEVA, A. V., TODOROVA, V.: Plant Physiol. (Sofia), XIV, (3), 1988, s. 60.
- [19] USSR Patent 1 273 371.
- [20] USSR Patent 1 243 728.
- [21] MALKKI Y., SALMINEN, M., PIHLAJANIEMI, M.-L.: Proc. Nat. Meet. Biophys. Biotechnol. Finl., 1-st, 1973, s. 157.
- [22] BULGAKOV, N.: Proizvodstvennyi i laboratornyi kontrol' solodorashcheniya i pivovareniya, Pishch. promizdat Moscow., 1959, s. 260.
- [23] MILLER, E. L.: J. Sci. Food Agric., **18**, 1967, s. 381.
- [24] NEY, K. H.: Z. Lebensmittel-Untersuch. Forsch., **123**, 1972, s. 321.
- [25] ADLER-NISSEN, J.: J. Agric. Food Chem., **27**, 1979, s. 1256.
- [26] LAZAROVA, G., KOSTOV, V., SOKOLOV, T.: Biotechnol. Techniques, **1**, 1987, s. 123.
- [27] TCHORBANOV, B., LAZAROVA, G.: Biotechnol. Appl. Biochem., **10**, 1988, s. 301.

Lektoroval Ing. Jan Voborský

Илиев, И. - Чорбанов, Б. - Тодорова, В.: Энзимовые белковые гидролизаты ze sladového květu. Kvas. prům., **37**, 1991, č. 3, s. 70—74.

Je uveden přehled literatury o využití sladového květu, který je odpadem při výrobě sladu. Byla zkoumána hydrolýza sladového květu alkalickou proteasou a stanoveny optimální podmínky procesu. Bylo prokázáno, že se v průběhu hydrolýzy kolem 65 % surové bílkoviny hydrolyzuje do vysokého stupně. Bylo zjištěno, že hydrolyzovaný sladový květ je možno usušit a rozemlít na moučku, obsahující 0,7 až 0,8 % aminodusíku a 35 % extrahovaných látek. Extrakt je možno zkoncentrovat a výsledný produkt pak obsahuje 40 až 45 % bílkovinného hydrolyzáta (stupeň hydrolýzy 38 až 42 %), 40 % dextrinů a solí vztaženo na sušinu extraktu. Složení aminokyselin hydrolyzáta prakticky odpovídá požadavkům na obsah a vzájemný poměr nenahraditelných aminokyselin. Důležité je zdůraznit, že produkt není hořký, což otevírá možnosti jeho použití v potravinářském průmyslu. Pomocí modelových pokusů byl ukázán stimulační účinek bílkovinného hydrolyzáta ze sladového květu při fermentaci kvasinek.

Илиев, И. - Чорбанов, Б. - Тодорова, В.: Энзимные белковые гидролизаты из солодовых ростков. Квас. прум., **37**, 1991, № 3, стр. 70—74.

Приводится обзор по литературе об использовании солодовых ростков, являющихся отходами при производстве солода. Исследовался гидролиз солодовых ростков алкалической протеазой и были устновлены оптимальные условия процесса. Было доказано, что в течение гидролиза около 65 % сырого белкового вещества подвергается гидролизу до высокой степени. Было найдено, что гидролизированные солодовые ростки можно высушивать и молоть в муку, содержащую 0,7 до 0,8 аминокислоты и 35 % экстрагированных веществ. Экстракт

можно сконцентрировать и конечный продукт будет содержать 40—45 % белкового гидролизата (степень гидролиза 38—42 %), 40 % декстринов и соли (в отношении к сухому веществу экстракта). Состав аминокислот гидролизата практически содержит требованиям к содержанию и взаимоотношению незаменимых аминокислот. Важно подчеркнуть, что продукт не горек, что открывает возможности его применения в пищевой промышленности. При помощи модельных экспериментов было доказано стимулирующее действие белкового гидролизата из солодовых ростков при ферментации дрожжей.

Iliev, I. - Ćorbanov, B. - Todorova, V.: Enzyme Protein Hydrolysates from Malting Germs. Kvas. prům., 37, 1991, No. 3, pp 70—74.

The literature review on the application of malting germs is described. Malting germs are wastes from the malt production. The malting germs hydrolysis by alkaline protease was tested and the optimum conditions of the process were determined. It was proved that during hydrolysis about 65 % of raw protein is hydrolyzed very deeply. The hydrolyzed malting germs can be dried and powdered. The powder contains from 0.7 to 0.8 % of amino nitrogen and 35 % of extract. After the concentration the extract contains from 40 to 45 % of protein hydrolyzate [the degree of hydrolysis 38 to 42 %], 40 % of dextrins and salts [to the extract dry weight]. The amino acids composition is qualitatively and quantitatively very suitable with respect to the ratio of essential amino acids. This product is not bitter and

therefore it can be applied in a food industry. The protein hydrolysate of malting germs had an stimulating effect on a yeast fermentation.

Iliev, I. - Ćorbanov, B. - Todorova, V.: Enzym-Eiweißhydrolysate aus Malzkeimen. Kvas. prům., 37, 1991, Nr. 3, S. 70—74.

Es wird eine Literaturübersicht über die Ausnützung von Malzkeimen angeführt, die bei der Malzherstellung abfallen. Die Autoren studierten die Hydrolyse der Malzkeime mittels alkalischer Protease und ermittelten die optimalen Bedingungen dieses Prozesses. Es wurde bewiesen, daß im Verlauf der Hydrolyse etwa 65 % des Roheiweißes in einem hohen Grad hydrolysiert werden. Es wurde weiter festgestellt, daß die hydrolysierten Malzkeime getrocknet und zu einem Mehl gemahlen werden können, das 0,7 bis 0,8 % Aminostickstoff und 35 % extrahierte Stoffe enthält. Das Extrakt kann konzentriert werden, wobei das Endprodukt 40 bis 45 % Eiweißhydrolysat [Grad der Hydrolyse 38 bis 42 %], 40 % Dextrine und Salze [im Verhältnis zu der Trocken-substanz des Extrakts] enthält. Die Zusammensetzung der Aminosäuren des Hydrolysats entspricht praktisch den Anforderungen an den Gehalt und die gegenseitige Verhältnisse der unersetzbarer Aminosäuren. Es sollte die Bedeutung der Tatsache unterstrichen werden, daß das Produkt nicht bitter ist, was seiner Anwendung in der Lebensmittelindustrie gute Chancen bietet. In Modellversuchen wurde die Stimulationswirkung des Eiweißhydrolysats aus Malzkeimen bei der Fermentation von Hefen aufgezeigt.