

VÝZNAM AMINOKYSELIN V PIVOVARSTVÍ A NOVÉ POSTUPY JEJICH STANOVENÍ

THE IMPORTANCE OF AMINO ACIDS IN BREWING INDUSTRY AND NEW METHODS OF THEIR DETERMINATION

HANA ČÍŽKOVÁ, PAVEL HOFTA, IRENA KOLOUCHOVÁ, PAVEL DOSTÁLEK, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6-Dejvice, e-mail: hana.cizkova@vscht.cz

Čížková, H. – Hofta, P. – Kolouchová, I. – Dostálek, P.: Význam aminokyselin v pивovarství a nové postupy jejich stanovení. Kvasny Prum. 51, 2005, č. 2, s. 47–51.

V článku je shrnut význam aminokyselin v pивovarství z hlediska vhodné skladby dusíkatých složek extraktu mladiny a zajištění optimálního průběhu kvašení. Zdůrazněn je aspekt podílu volných aminokyselin na tvorbě jak senzorycky významných metabolitů, tak látek negativně ovlivňujících organoleptický profil piva v procesu jeho skladování. Je podána stručná charakteristika aminokyselin jako chemických sloučenin. Přehled metod stanovení aminokyselin obsahuje metody klasické, založené na spektrofotometrickém měření, a moderní, využívající HPLC, GC, GPC a HIC. Hlavní pozornost je zaměřena na metodu stanovení volných aminokyselin pomocí Waters AccQ•Tag derivatizace a následného stanovení těchto derivátů po jejich separaci na reverzní fázi pomocí fluorescenční detekce. Metoda byla aplikována na stanovení volných aminokyselin v pivech. Jsou uvedeny podmínky separace aminokyselin a jejich kvantifikace je dokumentována na analýzách reálných vzorků piva typu světlý ležák.

Čížková, H. – Hofta, P. – Kolouchová, I. – Dostálek, P.: The importance of amino acids in brewing industry and new methods of their determination. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 2, p. 47–51.

In the article, the importance of the amino acids in the brewing industry from the view of a suitable composition of nitrogenous compounds of hopped wort extract and the ensurance of an optimal course of fermentation is resumed. The aspect of the participation of free amino acids in the production of both metabolites important from the view of organoleptic properties and the compounds adversely affecting the organoleptic profile of beer during storage is underlined. In the article, a brief characteristic of amino acids as chemical compounds is given. The overview of amino acids determination includes conventional methods based on spectrophotometric measurements as well as the latest methods, employing HPLC, GC, GPC and HIC. Prime attention is paid to the method of free amino acids determination by means of Waters AccQ•Tag derivatization and subsequent determination of these derivatives after their isolation on reverse phase by means of fluorescence detection. The method was applied for the determination of free amino acids in beer. In the article, the conditions of amino acid isolation are given and their quantification is documented on the analysis of real samples of pale lager beer.

Čížková, H. – Hofta, P. – Kolouchová, I. – Dostálek, P.: Die Bedeutung der Aminosäuren in der Brauindustrie und die neuen Methoden ihrer Bestimmung. Kvasny Prum. 51, 2005, Nr.2, S. 47–51.

Klíčová slova: aminokyseliny, stanovení, HPLC, pivo
Keywords: amino acids, determination, HPLC, beer

1 ÚVOD

1.1 Význam aminokyselin

Základem pro výrobu dobrého piva jsou kvalitní suroviny, a to především sladovnický ječmen s vhodným obsahem dusíkatých látek a aminokyselin. Aminokyseliny mají nezastupitelný význam při kvašení pro pomnožení kvasinek a pro metabolismus nejen dusíkatých látek, ale i sacharidů, lipidů, sirných sloučenin apod. [1]. Až do rozšíření poznatků o mechanismech tvorby komponent staré chuti piva byly aminokyseliny považovány za bezproblémové látky sladařského a pivovarského procesu a jejich vysoké množství v mladině za příznivý ukazatel. Nyní jsou vzhledem k účasti v reakcích vedoucích

k tvorbě senzorycky nežádoucích sloučenin ze skupiny těkavých aldehydů řazeny do skupiny tzv. kompromisních složek [2].

1.2 Klasifikace a charakteristika aminokyselin

Aminokyseliny jsou sloučeniny, v jejichž molekule je přítomna alespoň jedna primární aminoskupina $-NH_2$ a současně jedna karboxylová skupina $-COOH$. Podle vzdálenosti aminoskupiny od karboxylové skupiny se aminokyseliny rozdělují na α - až ϵ - (2–6 aminokyseliny). K aminokyselinám se řadí také karboxylové kyseliny obsahující v molekule sekundární aminoskupinu $-NH-$, která je součástí tří- až šestičlenného cyklu [3].

K označování aminokyselin se užívá trivi-

álně v tomto článku je uvedena význam aminokyselin v pivovarství z hlediska vhodné skladby dusíkatých složek extraktu mladiny a zajištění optimálního průběhu kvašení. Zdůrazněn je aspekt podílu volných aminokyselin na tvorbě jak senzorycky významných metabolitů, tak látek negativně ovlivňujících organoleptický profil piva v procesu jeho skladování. Je podána stručná charakteristika aminokyselin jako chemických sloučenin. Přehled metod stanovení aminokyselin obsahuje metody klasické, založené na spektrofotometrickém měření, a moderní, využívající HPLC, GC, GPC a HIC. Hlavní pozornost je zaměřena na metodu stanovení volných aminokyselin pomocí Waters AccQ•Tag derivatizace a následného stanovení těchto derivátů po jejich separaci na reverzní fázi pomocí fluorescenční detekce. Metoda byla aplikována na stanovení volných aminokyselin v pivech. Jsou uvedeny podmínky separace aminokyselin a jejich kvantifikace je dokumentována na analýzách reálných vzorků piva typu světlý ležák.

Чижкова, Г. – Гофта, П. – Колоухова, И. – Досталек, П.: Значение аминокислот в пивоварении и новые методы их определения. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 2, стр. 47–51.

Рассматриваются значение аминокислот в пивоварении с точки зрения подходящего содержания азотистых веществ экстракта сусла и обеспечение оптимального прохождения брожения. Подчеркивается аспект доли несвязанных аминокислот на образование как сенсорически значительных метаболитов, так и веществ влияющих отрицательно на органолептический профиль пива в процессе его хранения. Дается краткая характеристика аминокислот как химических соединений. Перечень методов определения аминокислот содержит как классические методы, основанные на спектрофотометрическом измерении, так и современные методы, применяющие HPLC, GC, GPC и HIC. Основное внимание уделяется методу определения летучих веществ при помощи дериватизации Waters AccQ•Tag и последующего определения этих дериватов после их сепарирования на реверсной фазе при помощи флуоресцентного детектирования. Метод был использован для определения несвязанных аминокислот в пивах. Приводятся условия сепарирования аминокислот и их квантификация указана на анализах реальных проб пив типа светлого лагерного пива.

álních názvů, odvozených od jejich původu nebo vlastností, ke zkrácenému označování se používá třípísmenných symbolů (nebo jednopísmenných u rozsáhlejších peptidových struktur).

Podle struktury a funkčních skupin v postranním řetězci se dělí na aminokyseliny alifatické a nealifatické, aminokyseliny obsahující síru a heterocyklické aminokyseliny. První skupina zahrnuje monoamino-monokarboxylové kyseliny (glycin, alanin, isoleucin, valin, leucin), hydroxy-monoamino-monokarboxylové kyseliny (serin, threonin), monoamino-dikarboxylové kyseliny (kyselina asparagová a glutamová). K nealifatickým aminokyselinám patří aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin), monoamino-dikarboxylové amidy (asparagin, glutamin) a diamino-mono-

karboxylové kyseliny (arginin, lysin, hydroxyprolin, ornitin). Aminokyseliny obsahující síru představují cystein, cystin, methionin a heterocyklické aminokyseliny tryptofan, histidin, prolin, hydroxyprolin. Podle acidobazických vlastností lze aminokyseliny členit na kyselá a neutrálně reagující (kyselina asparagová a glutamová, glycín, alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, serin, threonin, methionon, cystein a cystin) a bazické kyseliny (lysin, arginin a histidin).

Podle polaritý postranního řetězce se dělí na nepolární (hydrofobní), polární (hydrofilní) a obojetné (amfifilní). Z hlediska významu ve výživě člověka lze aminokyseliny rozdělit na esenciální, semiesenciální a neesenciální. Z hlediska optické aktivity tvoří aminokyseliny D- a L-izomery, v bílkovinách se vyskytují jen v L-konfiguraci. Podle organoleptických vlastností se rozlišují na sladké, kyselé, hořké a indiferentní.

1.3 Výskyt aminokyselin v pivovarských surovinách

Základní pivovarskou surovinou je sladovnický ječmen. Významnou úlohu v procesu posklizňového dozrávání ječmene mají aminokyseliny a peptidy s SH-skupinou (glutathion a cystein), které zajišťují indukci dýchacího systému zrna a syntézu proteinů, enzymových komplexů a nových tkání.

V procesu sladování se působením proteolytických enzymů endopeptidas a exopeptidas zvyšuje v zrnu hladina celkového aminodusíku a volných aminokyselin. Štěpení vysokomolekulárních dusíkatých látek a zvyšování obsahu volných aminokyselin pokračuje i při hvozdění až do tzv. enzymové fáze sušení. Obsah bílkovin nelze zcela ovlivnit výběrem odrůdy, neboť více než 80 procent proměnlivosti znaku je dáno agroekologickými podmínkami ročníku [4].

Během vstírky a rmutování ve varně přecházejí volné aminokyseliny ze sladu do roztohu a v omezené míře pokrácuje jejich uvolňování z vysokomolekulárních dusíkatých sloučenin aktivními proteolytickými enzymy.

U chmele představují dusíkaté látky 15–20 procent sušiny a zahrnují proteiny, polypeptidy a aminokyseliny s převahou argininu. Bazickým aminokyselinám je přisuzován negativní účinek na pěnivost piva a stabilitu pивní pěny [5]. Mladina obsahuje asi 5 procent dusíkatých látek z celkového množství extraktu a tento podíl je složen hlavně z bílkovin, peptidů, aminů, aminokyselin a v menší míře z purinů a některých vitaminů [6].

1.3.1 Aminokyseliny v procesu kvašení a dokvašování piva

Aminokyseliny tvoří přibližně 40–45 procent dusíkatých složek spotřebovaných kvasinkami během kvašení [7]. Pivovarské kvasinky využívají aminokyseliny mladiny dvojím způsobem: jednak tvoří tyto jednoduché dusíkaté látky zdroj pro syntézu proteinů, a tím pro pomnožení buněk, jednak jsou substrátem pro tvorbu vedlejších metabolitů kvašení. Z toho vyplývá nezastupitelný význam aminokyselin spočívající nejen v zajištění růstu a pomnožení kvasinek, ale v souvislosti s metabolismem základních složek extraktu mladiny i v následné tvorbě ethanolu, esterů, vyšších alkoholů, diacetylů, mastných kyselin, oxidu siřičitého a dalších látek, důležitých pro buket piva [8]. Míra utilizace aminokyselin pi-

vovarskými kvasinkami má vliv na množství aminokyselin v hotovém pivu. Existuje celá řada klasifikačních systémů aminokyselin podle účasti na metabolismu, rychlosti a míry absorpce při kvašení [9, 10, 11].

1.3.2 Aminokyseliny a vliv na senzoryckou stabilitu piva

Aminokyseliny jsou považovány za jedny z prekurzorů těkavých aldehydů, které se mohou tvořit rovněž z nenasyčených mastných kyselin, vyšších alkoholů a hořkých kyselin. Základní reakce tvorby aldehydů jako komponent staré chuti, na kterých se přímo podílí aminokyseliny, jsou následující [12]:

1. Maillardovy reakce pentos a hexos s aminokyselinami, aminy a peptidy za vzniku melanoidinů nebo derivátů furfuralu
2. Streckerova degradace aminokyselin na aldehydy
3. Aldolová kondenzace a oxidační degradace aldehydů, kde aminokyseliny působí jako bazické katalyzátory, reagující přechodně s aldehydy za vzniku iminů
4. Oxidace alkoholů především nízkomolekulárními melanoidiny v radikálových reakcích za účasti kyslíku a kovových iontů
5. Oxidace alkoholů kovovými ionty a vzdušným kyslíkem za přítomnosti vhodného redukčního činidla (např. aminokyselina cystein)
6. Oxidace polyfenolů a kondenzace s aminokyselinami.

Při stárnutí piva se zároveň mohou vyšší alkoholy i aminokyseliny opět oxidovat na aldehydy a udílet tak pivu typickou chuť a vůni [13]. Některé aminokyseliny pravděpodobně přednostně podléhají fotochemické oxidaci (sirné aminokyseliny), další se oxidují jinou aktivní formou kyslíku [14].

Z dosavadních studií vyplynulo, že změny obsahu aminokyselin během přirozeného stárnutí piva probíhají v různém rozsahu, kdy k výraznějšímu úbytku dochází u aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu, leucinu, isoleucinu, methioninu a glutaminu a v pivech s vyšším obsahem volného kyslíku [15].

2 PŘEHLED METOD STANOVENÍ AMINOKYSELIN

K základním metodám poskytujícím údaje o obsahu aminodusíku patří metoda formolové titrace a spektrofotometrické postupy – metody využívající reakce s ninhydrinem nebo s kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou (TNBS) [16]. Orientační stanovení obsahu a spektra aminokyselin umožňovaly semikvantitativní klasické metody na principu chromatografie papírové (PC) a tenkovrstvé (TLC) [17, 18]. Chromatografické postupy využívající separace na měničích iontů (IEC) ve spojení se zavedením automatických analyzátorů aminokyselin představují relativně rychlé a přesné kvantitativní určení obsahu aminokyselin v potravinářských i pivovarských materiálech [19]. Náplň kolony – stacionární fáze – tvoří silně kyselý katex, mobilní fáze je kapalina a složky směsi – aminokyseliny – se dělí na principu různé afinity jednotlivých iontů k ionexu. Gradientem tlumivých roztoků se postupně jednotlivé aminokyseliny uvolňují a eluují v okamžiku, kdy je dosaženo hodnoty pH, při kterém přechází aminokyselina na amfoterní formu. Základem detekce je spektrofotometrická detekce po postkolonové reakci s ninhydrinem.

V 80. a 90. letech minulého století dochází k rozvoji vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [20, 21], plynové chromatografie (GC) [22] a gelové permeační chromatografie (GPC) [23], s variantami hydrofobní interakční chromatografie (HIC) [24] a chromatografie na reverzní fázi [25], a všechny tyto metody mohou být použity pro stanovení aminokyselin. Někdy se využívají i některé metody s odlišným principem [26, 27].

Mezi nejmodernější varianty patří např. kapilární zónová elektroforéza s UV detekcí [28], chromatografie na reverzní fázi s fluorometrickou detekcí derivátů aminokyselin [29], kapilární zónová elektroforéza s elektrochemickou detekcí [30] a s následnou bezkontaktní vodivostní detekcí (contactless conductivity detection) [31], iontovýmenná chromatografie a elektroforéza s FT-IR [32, 33], plynová chromatografie s chirální stacionární fází ke stanovení enantiomerů aminokyselin [34], in situ fotometrické fluorimetrické stanovení aminokyselin tyrosinu [35], isokratické stanovení nederivatizovaných aminokyselin s ampérometrickou detekcí [36]. Dále sem patří metoda ke stanovení peptidů a aminokyselin s fluorescenčním činidlem 2-(9-karbazol)-Et chloroformat (CEOC) pomocí HPLC na reverzní fázi a hmotnostní spektrometrie [37], nová HPLC metoda k simultánnímu stanovení aminokyselin a aminů jako o-ftaldialdehyd derivátů [38], stanovení biogenních aminů metodou Heavy Atom Induced Phosphorescence (HAI-RTP) [39].

2.1 Stanovení aminokyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC

Více než 75 procent v dnešní době prováděných analyz HPLC je uskutečňováno v systémech s reverzní fází (RP-HPLC), kde stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární rozpouštědlo. Jako stacionární fáze se používá upravený silikagel s kovalentně navázanými alkylovými řetězci různé délky (nejčastěji $C_{18}H_{37}$ a C_8H_{17}). Běžnou mobilní fází je při stanovení aminokyselin směs vody a s ní mísitelného méně polárního rozpouštědla jako je methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran.

Aminokyseliny je nutno převést před vlastním stanovením na vhodný derivát, dostatečně stabilní a neintegrující s nosičem. Velký počet různých způsobů derivatizace aminokyselin lze rozdělit na dva základní postupy [40]:

a) předkolonová derivatizace – derivatizace před vlastní chromatografickou separací.

Derivatizační činidla:
o-ftaldialdehyd (OPA),
9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid (FMOC),
fenylisothiokyanát (PITC),
dimethylamino-azobenzensulfonylchlorid (dabsylchlorid DABS-Cl),
1-dimethylaminonafalen-5-sulfonylchlorid (dansylchlorid DANS-Cl),
AQC činidlo a další.

b) postkolonová derivatizace – derivatizace aminokyselin až po separaci na koloně.

Derivatizační činidla:
indantrion hydrat (ninhydrin),
o-ftaldialdehyd (OPA).

Detekce probíhá UV a fluorescenčními detektory, OPA jako derivatizační činidlo neumožňuje stanovení sekundárních aminokyselin (prolin, hydroxyprolin) bez předchozí úpravy vzorku.

Na principu HPLC a předkolonové derivatizace vyvinula řada firem systémy a činidla na stanovení jednoduchých i komplexních proteinů za vzniku stálých derivátů aminokyselin, s možností jejich detekce PDA nebo UV a fluorescenčními detektory. V roce 1993 firma Waters vyvinula metodu AccQ•Tag, která představuje jednoduchý a rychlý derivatizační postup zaměřený na přesné a vysoce citlivé stanovení aminokyselin v koncentracích řádu pikomolů, s mezí detekce řádu femtomolů. Waters Alliance chromatografický systém při ní pracuje se separačním modulem 2695, fluorescenčním detektorem a AccQ•Tag fluorescenčním činidlem, převádějícím primární a sekundární aminokyseliny na stabilní fluorescenční deriváty [41, 42].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitá metodika stanovení aminokyselin

Waters Alliance HPLC systém

Podmínky stanovení aminokyselin:

Waters AccQ•Fluor Reagenční činidlo (6-aminoquinolyl-A-hydroxysuccinimidyl karbamát)

Waters Amino Acid Hydrolysate Standard

Waters AccQ•Tag Amino Acid kolona Nova-Pak C18, 4 μm , (150x3,9 mm)

Teplota kolony: 37 °C

Waters Multi 2475 fluorescenční detektor, s excitací 250 nm, emisí při 395 nm

Eluenty:

eluent A – borátový pufr (vodný roztok)

B – acetonitril (čistota HPLC grade)

C – Milli-Q voda (18 M Ω)

Gradient:

Čas [min]	Průtok [ml.min ⁻¹]	% A	% B	% C
počáteční	1,0	100	0	0
0,5	1,0	99	1	0
18	1,0	95	5	0
19	1,0	91	9	0
29,5	1,0	83	17	0
33	1,0	0	60	40
36	1,0	100	0	0
51	1,0	100	0	0

Nástřik na kolonu: 5 μl vzorku (koncentrace aminokyselin 5–200 pmol)

Vnitřní standard: kyselina α -aminomáselná (AAbA)

Doba analýzy: 36 minut

Spektrum stanovitelných aminokyselin: kyselina asparagová (Asp), serin (Ser), kyselina glutamová (Glu), glycin (Gly), histidin (His), arginin (Arg), threonin (Thr), alanin (Ala), prolin (Pro), cystein (Cys), tyrosin (Tyr), valin (Val), methionin (Met), lysin (Lys), isoleucin (Ile), leucin (Leu), fenylalanin (Phe).

AMQ – 6-Aminoquinolin – hydrolyzovaný přebytek AccQ•Fluor činidla.

3.2 Analyzovaný materiál

Vzorky lahvového, filtrovaného a pastovaného piva typu světlý ležák, vyrobeného ve vybraných pivovarech ČR za daných surovinových a technologických podmínek s českými kmeny pivovarských kvasinek.

Značení vzorků: pivo 1, 2, 3, 4 a 5

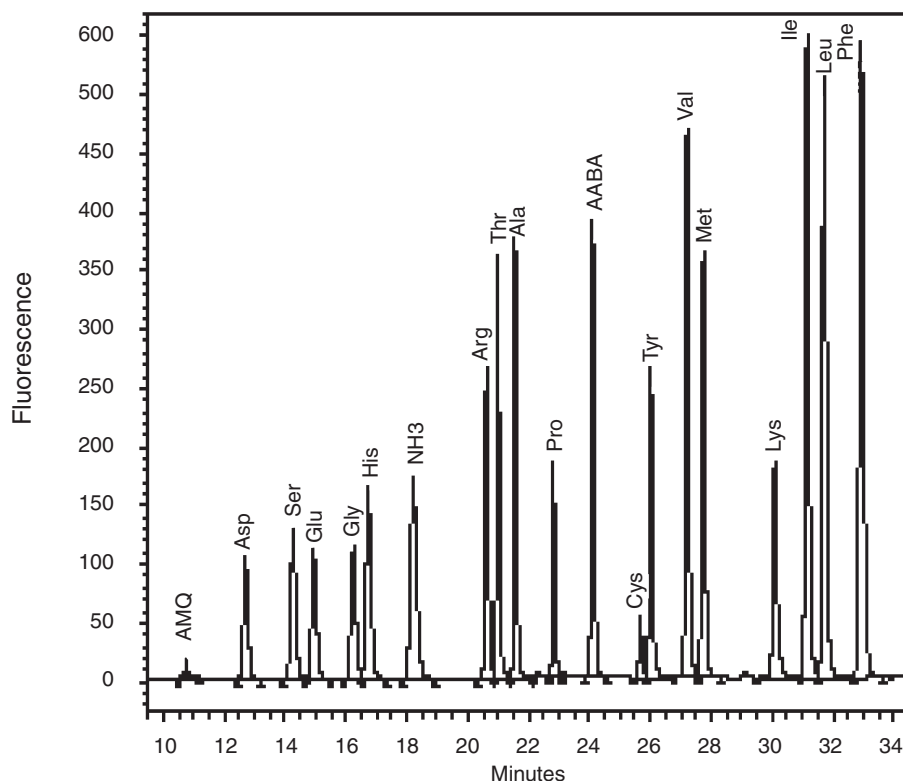
Základní údaj: obsah alkoholu 5–5,5 % obj.
Předchozí úprava vzorků: deproteinace, odpaření

Následná příprava vzorků pro HPLC: převedení odparku do roztoku 20 mM HCl, přidavek vnitřního standardu, derivatizace AccQ•Fluor činidlem

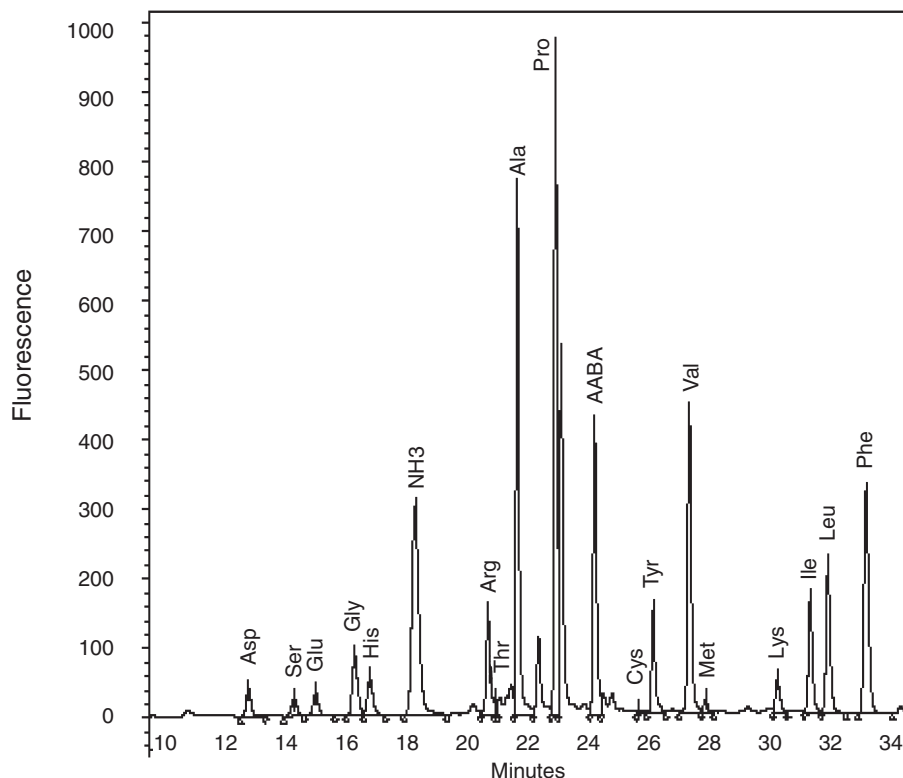
Kvantifikace výsledků: obsah volných aminokyselin vyjádřen v mg/l po přepočtu z pikomolů v 50 μl nástřiku.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Chromatogram standardní směsi aminokyselin (obr. 1) potvrdil velmi dobré rozdělení jednotlivých elučních pásů aminokyselin Arg/Thr, Cys/Tyr, Val/Met a Ile/Leu. U reálných vzorků pív (obr. 2) byly eluční pásy jednotlivých aminokyselin rovněž zřetelně rozlišené a k určitému zhoršení rozdělení došlo jen ve dvojici Arg/Thr. Obsah aminokyseliny cyste-



Obr. 1 Chromatogram směsi aminokyselin s přidavkem vnitřního standardu



Obr. 2 Chromatogram aminokyselin vzorku piva

inu byl na hranici kvantifikace; zlepšení identifikace lze dosáhnout úpravou temperace kolony a zvýšením gradientu mobilní fáze z 1 na 2 %. Počet opakovaných stanovení každého vzorku (*n*) byl čtyři.

Hodnocení analyzovaných vzorků pív 1, 2, 3, 4 a 5:

Stanovení obsahu jednotlivých a celkových aminokyselin (tab. 1) ukázalo na charakteristické rozdíly pív, vyplývající z použitých surovin, kvasničného kmene a technologického postupu.

Jednotlivá piva se lišila v celkovém obsahu volných aminokyselin, který se pohyboval v rozsahu 560 až 780 mg/l a byl nejvyšší u vzorku 5, a to jak v celkové hodnotě, tak v obsahu většiny stanovených volných aminokyselin (kromě aminokyseliny prolinu). To ukazuje na pravděpodobně jiný použitý slad a odlišné vedení procesu kvašení a dokvašování.

Rozdíly byly zjištěny i v obsahu přednostně využívaných aminokyselin – threoninu, serinu, lysinu a leucinu a v obsahu aminokyselin podílejících se na reakcích stárnutí piva – fenyلالaninu, tyrosinu, leucinu, isoleucinu a methioninu. Jejich nejnižším obsahem se vyznačovalo pivo 1. Basařová [43] uvádí, že v procesu stárnutí dochází k změnám těchto aminokyselin v různém rozsahu v závislosti na podmínkách skladování, době, teplotě, a zejména obsahu rozpuštěného kyslíku. Podle Šavla [13] směs aminokyselin obsažená v pivu může být oxidována melanoidiny za tvorby těkavých látek, zjistitelných UV spektrofotometrií a mechanismus stárnutí piva spočívá v prooxidačním působení melanoidních látek za postupné spotřeby antioxidantních sloučenin piva. Formou oxidace peroxidisíranem draselným prokázali autoři citlivost k oxidačním reakcím zejména u aminokyseliny fenyلالaninu a některých aromatických a heterocyklických vyšších alkoholů.

Z posledních prací vyplývá, že redukce aldehydů mladiny na příslušné alkoholy je významně ovlivněna kmenem kvasinek a jejich 3-methylbutanal reduktasovou aktivitou [44]. Streckerovu degradaci aminokyselin a tvorbu aldehydů a její rozsah studoval Veselý [45] na

souboru evropských a amerických pív. Zjištěný rozdíl ve stupni přeměny u aminokyselin valinu, leucinu a zejména methioninu vedl k zřetelné síranovo-kovové příchuti u amerických pív a zřetelné příchuti po staření u evropských pív.

Obsah bazických aminokyselin negativně ovlivňujících pěnivost piva – histidin, lysin, arginin – se zásadně nelišil, vyšší hodnoty zejména aminokyseliny argininu u piva 5 by mohly být předpokladem jeho snížené pěnivosti. Negativní účinek na přilnavost pěny roste od lysinu k argininu, což pravděpodobně souvisí se zvyšujícím se isoelektrickým bodem těchto aminokyselin a interakcí s iso- α -hořkými kyselinami [46].

Vzhledem k tomu, že v pivech nebyl určen obsah diacetylu, nebylo možné hodnotit rozdíly v obsahu aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu (při jejich biosyntéze v kvasničné buňce vzniká) v kontextu s intenzitou jeho tvorby a redukce v průběhu hlavního kvašení a dokvašování.

Stanovený obsah aminokyseliny prolinu (kvasinkami není využívána a je jedním ze znaků rozluštění sladu) v rozsahu 140 až 240 mg/l s vyššími hodnotami u vzorku 2 a 3 ukázal na použití odlišných odrůd sladů, velikost sypání nebo různý stupeň surogace, charakteristické pro jednotlivé pivovary a příslušné technologické výrobní postupy.

Enantioselektivní analýzy aminokyselin [47] v pivovarských surovinách a pivu prováděné v zahraničí metodou GC a HPLC v pivu, ječmeni a sladu uvádí celkový obsah volných D a L aminokyselin v pivu 500 až 5000 mg/l (piva typu lambic a silná piva). Nejvíce zastoupenou aminokyselinou byl L-prolin. Celkový obsah pouze volných D-aminokyselin činil v pivu 6,5 až 96,3 mg/l. Analyzované české světlé ležáky svým obsahem celkových volných aminokyselin L-forem 500 až 800 mg/l odpovídají tedy zahraničním „silným“ pivům.

Srovnávací studie [47] zaměřené na výživovou hodnotu piva u odlišných zahraničních druhů pív (standardní, super draft pivo, ledové pivo a super čerstvé pivo) se zabývaly vztahem hladin dusíku, aminodusíku a alkoholu ve sladině a pivu a výživovou hodnotou piva.

Autoři zjistili, že obsah celkového dusíku a aminodusíku byl nejvyšší u standardního piva, stejně tak jako jeho výživová hodnota.

5 ZÁVĚR

Aminokyseliny jsou látky přirozeně se vyskytující v pivovarských meziproduktech a produktech, s nezastupitelným významem při tvorbě kvasničné biomasy a v metabolických drahách odbourání základních extraktových složek mladiny. Zároveň jsou to látky, které ovlivňují senzorický profil piva a jeho stabilitu v procesu stárnutí piva. Prezentovaná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Waters Alliance HPLC systém) s derivatizací pomocí AccQ•Tag metody představuje jednoduchou, rychlou a přesnou metodu, s možností uplatnění a aplikace i v oblasti pivovarské výroby a kontroly. Uvedené rozborby pěti druhů pív ukázaly na rozdíly ve spektru a zastoupení aminokyselin, které mohou významným způsobem ovlivnit senzorické vlastnosti piva, jejich stabilitu, a jsou charakteristické pro použité suroviny, aplikovaný kmen kvasinek a příslušný technologický výrobní postup.

Literatura

- [1] Gorinstain, S. et al.: Food Chem. **67**, 1999, 71.
- [2] Basařová, G.: Kvasny Prum. **46**, 2000, 46.
- [3] Velíšek, J.: Chemie potravin I, OSSIS, Tábor, 1999.
- [4] Prokeš, J.: Kvasny Prum. **46**, 2000, 277
- [5] Bamforth, C.: EBC Symposium Beer Foam Quality, Amsterdam, 1998.
- [6] Palmquist, U. et al.: J. Inst. Brew. **75**, 1969, 488.
- [7] Cop, J., et al.: Proc. EBC, Zürich, 1989, 3.
- [8] Donhauser, S., Wagner, D.: Brauwelt Internat. 1990 (4), 268.
- [9] Jones, M., Pierce, J. S.: J. Inst. Brew. **74**, 1968, 78.
- [10] Äyräpää, T., Palmquist, V.: J. Inst. Brew. **76**, 1970, 144.
- [11] Basařová, G., Černá, I.: Kvasny Prum. **18**, 1972, 55.
- [12] Back, W., et al.: Brauwelt Internat. **17**, 1999, 394.
- [13] Šavel, J., Zdvihalová, D.: Kvasny Prum. **45**, 1999, 67.
- [14] Šavel, J., Zdvihalová, D., Prokopová, M.: Kvasny Prum. **43**, 1997, 233.
- [15] Janoušek, J.: Disertační práce, VŠCHT Praha, 2000.
- [16] Analytica EBC, EBC Analysis Committee, Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 1998.
- [17] Moore, S., et al.: Methods in Enzymology **6**, 1963, 819.
- [18] Charlwood, B. V., et al.: J. Chromatogr. **135**, 1977, 77.
- [19] Vodrážka, Z.: Biochemie, Academia, Praha, 1999.
- [20] Hewlett-Packard Application Note, 228–212, October 1992.
- [21] Fürst, P., et al.: J. Chromatogr. **499**, 1990, 557.
- [22] Šedová, H., et al.: Kvasny prum. **26**, 1980, 193.
- [23] Volka, K., et al.: Analytická chemie II, kap. 7, SNTL, 1983.

Tab. 1 Obsah volných aminokyselin ve vzorcích pív 1, 2, 3, 4 a 5

AK	Obsah aminokyselin [mg/l]				
	1	2	3	4	5
ASP	15,3	28,1	7,5	37,9	23,5
SER	11,5	16,6	9,7	29,2	19,6
GLU	17,3	29,2	10,4	35	26
GLY	25,3	26,2	21,8	31,2	34,7
HIS	27,3	27,4	26,1	17,7	27,7
ARG	41,9	47	42,5	46,5	65,3
THR	6,8	9	4,8	16,4	10,7
ALA	66,1	73,8	59	80,7	87,2
PRO	177,2	198,4	238,6	139,2	175,7
TYR	37,9	49,2	47,9	47,9	64,5
VAL	40,2	51,5	42,8	58,2	65,5
MET	4	7,9	4	12,6	11,5
LYS	22,4	27,2	12,9	12,6	37,7
ILE	13,7	21,5	12,7	28,4	25,8
LEU	18,1	33,9	18,9	48,1	50,7
PHE	31,8	46,2	36,5	54,4	57,2
celk. AK	556,8	693,1	596,1	696	783,3

Poznámka: výsledné hodnoty jsou průměrnou hodnotou čtyř měření

- [24] Brey, S. E., et al.: J. Inst. Brew. **108**, 2002, 424.
[25] Coghlan, D.J., et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **53**, 1995, 93.
[26] Brierly, E. R., et al.: J. Sci. Food. Agric. **70**, 1996, 531.
[27] Haukeli, A. D., et al.: Proc. Eur. Brew. Conv., Oslo, 1993, 385.
[28] Klampfl, Ch. W. et al: J. Agr. Food Chem. **47**, 1999, 987.
[29] Jin, D. et al: Anal. Biochem. **269**, 1999, 124.
[30] Dong, Q.: State Key Lab. Microbiol. Tech., China **23**, 2002, 559.
[31] Coufal, P. et al.: Electrophoresis, **24**, 2003, 671.
[32] Gorinstein, S. et al: Food Chem. **687**, 1999, 71.
[33] Gorinstein, S. et al.: Lebensm. Wissens. Technol. **35**, 2002, 265.
[34] Erbe, T. et al: J. Chromatography **881**, 2000, 81.
[35] Cai, W.: Key Lab. Anal. Sc. Minis. Educ., Xiamen University, China **28**, 2000, 1535.
[36] Casell, I.G., et al: Anal. Chimica Acta, **478**, 2003, 179.
[37] You, J., et al.: Anal. Biochem. **313**, 2003, 17.
[38] Kutlan, D., et al: J. Chrom. A **987**, 2003, 311.
[39] Canabate-Diaz, B. et al: Analyst **128**, 2003, 415.
[40] Bidlingmeyer, B.A., et al.: J. Chromatogr. **336**, 1984, 93.
[41] Iwaki, K., et al: J. Chromatogr. **407**, 1987, 273.
[42] Instruction Manual Waters AccQ•Tag Chemistry Package, Waters Corporation, USA, 1994.
[43] Basařová, G., et al.: Monatsschr. Brauwiss. **52**, 1999, 112.
[44] Basařová, G., et al.: Kvasny Prum. **48**, 2003, 3.
[45] Veselý, P.: Disertační práce, VŠCHT Praha, 2003.
[46] Furukobo, S., et al.: Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am. **30**, 1993, 155.
[47] Erbe, T., et al.: Lebensmittelchemie **53**, 1999, 118.
[48] Kang, Chuan-h., et al.: Harbin Shangye Daxue Xuebao **18**, 2002, 217.

*Zpracováno na základě přednášky na 16. konferenci Technologie a hodnocení výrobků nápojového průmyslu 16.–17. 6. 2004, Plzeň
Do redakce došlo 18. 11. 2004*

21. PIVOVARSKO-SLADAŘSKÉ DNY

6.–7. října 2005

ÚSTÍ NAD LABEM

Organizátoři:

Drinks Union, a. s.

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT Praha

Odborný program bude zaměřen zejména na problematiku výzkumu a technologie českého piva a na legislativu ve vztahu k Evropské unii.

Přípravný výbor vyzývá zájemce o prezentaci své práce, aby zasílali náměty na přednášky či postery (název a krátká anotace do 15 řádků) **do 2. května 2005** na adresu redakce časopisu Kvasný průmysl
frantik@beerresearch.cz

Firmy, které mají zájem o svou prezentaci, mohou kontaktovat

Ing. Josefa Vejlupeka na adresu **Drinks Union, a. s.,**
Drážďanská 80, 400 07 Ústí nad Labem, tel. **472 703 320**,
fax **475 503 045**, e-mail **josef.vejlupek@drinksunion.cz**

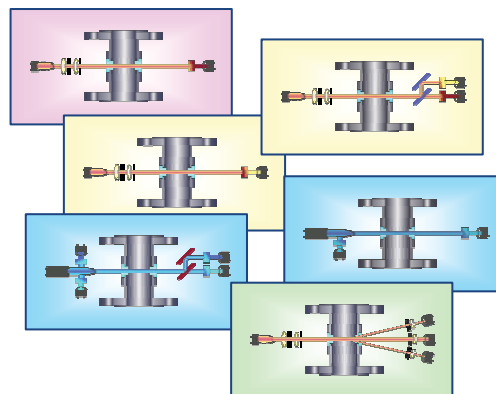
Aktuální informace budou zveřejňovány na URL **www.beerresearch.cz** a v následujících číslech Kvasného průmyslu.

Procesní přístroje



Výhradní zastoupení pro ČR a SR

- zákal
- barva
- koncentrace
- UV detektory



REGOM
INSTRUMENTS

Brabcova 2/1159, 147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206
☎ 241 400 290

✉ regom@regom.cz
🌐 www.regom.com