VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PIVOVARSKÝ A SLADAŘSKÝ V PRAZE
Pracoviště BRNO Mostecká 7

10

říjen 1965 - ročník 11

Kvasný průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÝCH PRŮMYSLECH

Vliv kyseliny giberelové na vysokomolekulární bílkoviny sladu

VLADIMÍR KAREL, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.438
547.98

Působení kyseliny giberelové na extraktivní látky i na enzymový komplex sladu se v současné době věnuje celosvětově zvýšená pozornost. To lze přičítat jednak možnosti využití této látky ve sladařství a jednak skutečnosti, že sledování účinku kyseliny giberelové na klíčení ječných zrn za různých podmínek pomohlo objasnit a lépe pochopit řadu dějů, které probíhají při klíčení.

Vliv kyseliny giberelové (GA_3) na složení frakce vysokomolekulárních bílkovin sladu byl sledován v rámci problému optimální skladby extraktivních látek sladin a mladin pro dosažení koloidně stabilních piv. K dělení N-látek vysokomolekulární Lundinovy frakce A byl vybrán chromatografický způsob [1, 2], kterým se pro vysokomolekulární bílkoviny dosahuje týž počet skvrn, jaký uvádí *Meredith* [3, 4] při frakcionaci bílkovin, vysrážených kyselinou trichloroctovou a jaký se nachází v AT-resorbátech, tj. v resorbátech z nerozpustného polyvinylpyrolidonu nebo v resorbátech z nylonu [5]. Silikagel, kterého se v této práci použilo jako adsorbense vysokomolekulárních bílkovin, byl výrobkem n. p. Spolana a adsorboval dusíkaté látky Lundinovy frakce A.

Kyselina giberelová byla aplikována jednak jako postřik na pukavku ječmene a jednak máčením ječmene ve stadiu pukavky v roztoku GA_3 po dobu jedné minuty. K pokusům se použilo GA_3 koncentrace 0,1, 0,15, 0,20, 0,30 mg% ve směsi s glukózou; přídavek glukózy byl ve všech případech 0,01 g na 100 ml roztoku kyseliny giberelové.

Pokusy se konaly s 5kg namáčkami, v humnové mikrosladovně. Objem jednotlivých roztoků, použitých pro postřiky různých koncentrací GA_3, byl takový, že dávky účinné látky odpovídaly:

v 1. sérii 10, 15, 20, 30 μg/kg ječmene,

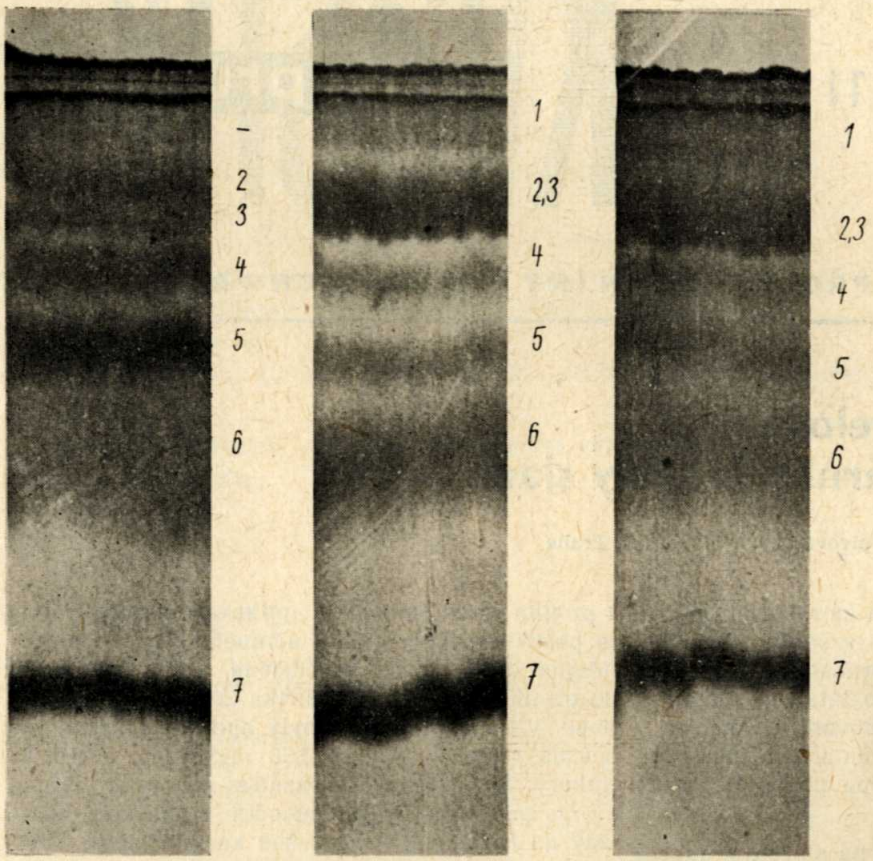
ve 2. sérii 20, 30, 40, 60 μg/kg ječmene.

V prvním sledu pokusů se aplikoval na 5 kg ječmene postřikem vždy objem účinného roztoku, odpovídající 100 l na 100 q ječmene, ve druhém sledu šlo o mikroreprodukci postřiku 200 l na 100 q ječmene. V obou případech byly aplikovány postupně směsné roztoky 0,10 až 0,30 mg% GA_3 a 0,01 % glukózy. Pro extrém a výraznější zachycení účinku GA_3 se pukavka (5 kg) namočila v gázovém sáčku vždy do roztoku GA_3 příslušné koncentrace.

Všechny GA-slady, tj. slady při jejichž výrobě se aplikovala kyselina giberelová, se zpracovaly na piva a současně se vyrobila piva kontrolní, tj. z 5-denního a 7denního sladu bez použití giberelinu. Šlo o pokus poznat a teoreticky vysvětlit nálezy vyšší koloidní stability [6, 7] sladin, resp. mladin z giberelinových sladů, zjistit jejich vliv na koloidní stabilitu piv a v kladném případě se pokusit poznaný děj usměrnit tak, aby byl využitelný ve výrobní praxi. Proto se sledovala především jakost vysokomolekulární frakce bílkovin, jejichž podíl je ve většině případů GA-sladin nižší, porovnává-li se se sladinami kontrolními. Jako druhá zákalotvorná složka se sledovaly informativně i třísloviny, rovněž z hlediska jakosti.

Bílkoviny Lundinovy frakce A se určovaly chromatograficky v kongresních sladinách GA i kontrolních sladů, v mladinách a pivech. Na *obr. 1* jsou bílkoviny kongresních, infuzních sladin z kontrolního pětidenního a sedmidenního sladu a z pětidenního GA-sladu, jehož pukavka byla namočena po dobu 1 minuty do směsného roztoku 0,1 mg% GA_3 + 0,01 % glukózy.

Celkový vzhled chromatogramů, intenzita, šířka, ostrost ohraničení skvrn svědčí o tom, že giberelinový pětidenní slad se blíží sedmidennímu porovnávacímu, zatímco na chromatogramu bílkovin sladiny z pětidenního porovnávacího sladu (bez giberelinu), chybí skvrna 1 a je rozdíl ve skvrně 2, 3.



Obr. 1

Za směrodatné je považovat zde nález ve sladině ze sladu, vedeného na humně plných sedm dní, jak je obvyklé ve sladařské praxi. Z tohoto hlediska je zřejmé, že vlivem kyseliny giberelové proběhly za pět dní ve sladu pochody, které bez její přítomnosti, tj. bez její exogenní aplikace, probíhají 7 dní. Zásadní rozdíly, viditelné změny v podílech jednotlivých vysokomolekulárních bílkovin Lundinovy frakce A, se za podmínek použité metody v GA-sladinách neprojevily. Tento poznatek se potvrdil ve všech kongresních sladinách z GA-sladů, ať se účinný roztok aplikoval postřikem, nebo přímo namáčkou pukavky ječmene. Bílkoviny, diferující skvrny 1, které se projevily ve sladině z kontrolního sedmidenního sladu, dále ve sladině z pětidenního GA-sladu a neprojevily se ve sladině ze sladu vedeného na humně 5 dní bez aplikace GA_3, lze chápat jako produkt enzymové činnosti, probíhající při normálním klíčení mezi pátým a sedmým dnem, snad jako produkt resyntézy.

Podstatné je zjištění, že účinkem kyseliny giberelové se neprojevila žádná charakteristická změna v jakosti bílkovin Lundinovy frakce A [1, 2]. Neprojevily se rozdíly, které by vysvětlovaly změny koloidní stálosti GA-sladin. Za příznivé pro vyšší stálost by bylo možno označit snížení obsahu bílkovin Lundinovy frakce A, které se zpravidla projevuje; nikoli jakostní změnu v zastoupení jejích bílkovinných složek. Není bezpodstatné, že ke stejnému nálezu i poznatku se došlo v celém rozsahu použitých koncentrací a dávek GA_3; rozdíly v jakosti se neprojevovaly. Kvantitativní rozdíly, zjištěné při stanovení frakcí Ludinovou metodikou, se na chromatogramech projevovaly rovnoměrně menší intenzitou všech skvrn; všechny bílkovinné složky zůstávaly zastoupeny.

V podobném smyslu vyznívají i chromatogramy dekokčních mladin. Složení bílkovin frakce A podle Lundina je po stránce jakosti v GA-mladinách prakticky stejné jako u mladin z pětidenního a sedmidenního kontrolního sladu *(obr. 2)*.

Skutečnost, že nevznikají rozdíly v zastoupení jednotlivých složek vysokomolekulárních bílkovin v mladinách GA a porovnávacích, tj. neprojevil se rozdílně var rmutů ani chmelovar, jenom potvrzuje, že kyselina giberelová nevyvolává pronikavé změny vlastností vysokomolekulárních bílkovin. Chromatogramy *a, b, d (obr. 2)* byly prakticky identifické, na chromatogramu *c* byl rozdíl ve vzhledu skvrny 7.

Patrná změna vysokomolekulárních bílkovin se použitou metodikou projevila až na chromatogramech piv, kde místo sedmi skvrn (pásů zjištěných na chromatogramech mladin), se projevily u piv z porovnávacích sladů pětidenního a sedmidenního intenzívně toliko čtyři skvrny, u piv z giberelinových sladů tři skvrny *(obr. 3)*.

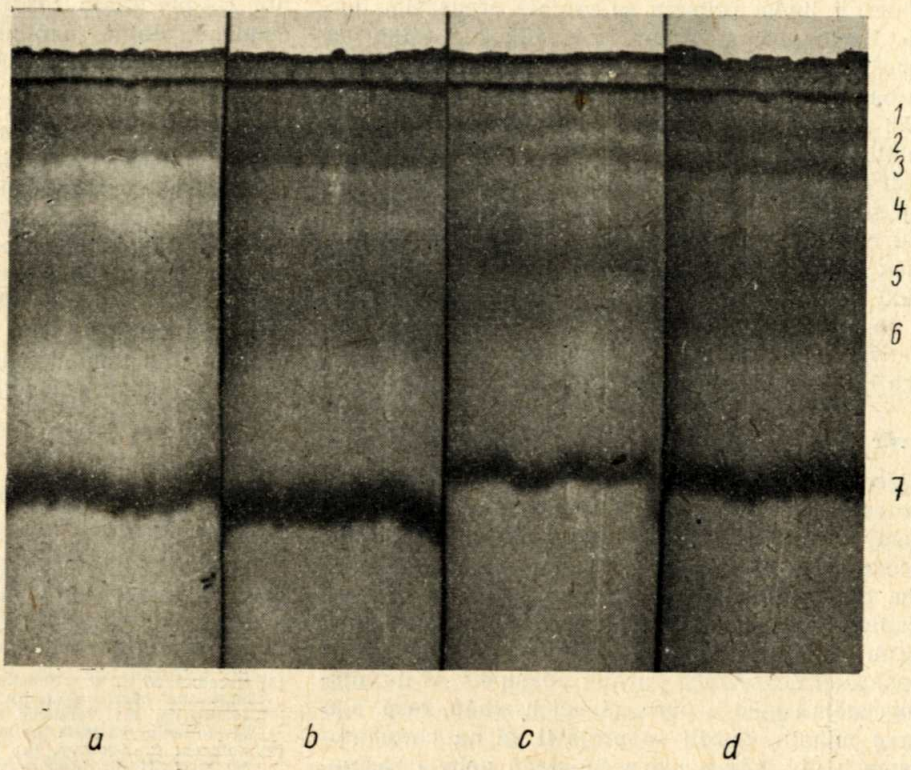
Vyšší stabilitu po pasteraci měla všechna piva z GA-sladů, piva ze sladů, máčených ve stadiu pukavky v roztocích GA_3, měla stabilitu podstatně vyšší. Všechny slady pro sérii pokusů byly připraveny z téhož ječmene. Je otázkou, do jaké míry by bylo možno počítat s reprodukovatelností tohoto zjištění za použití různých ječmenů k výrobě sladu, tj. do jaké míry by bylo možno předpokládat jednoznačnost působení GA_3 u různých ječmenů.

Z chromatografického sledování polyfenolových látek [6, 7, 8] doposud vyplynulo, že se zvyšuje vznik polyfenolů, prekursorů anthokyanogenních látek; je pravděpodobné, že se zde uplatňuje zvýšená aktivita systému polyfenoláz.

Zjištěnou vyšší koloidní stabilitu GA-piv by bylo možno vysvětlit především sníženým podílem vy-

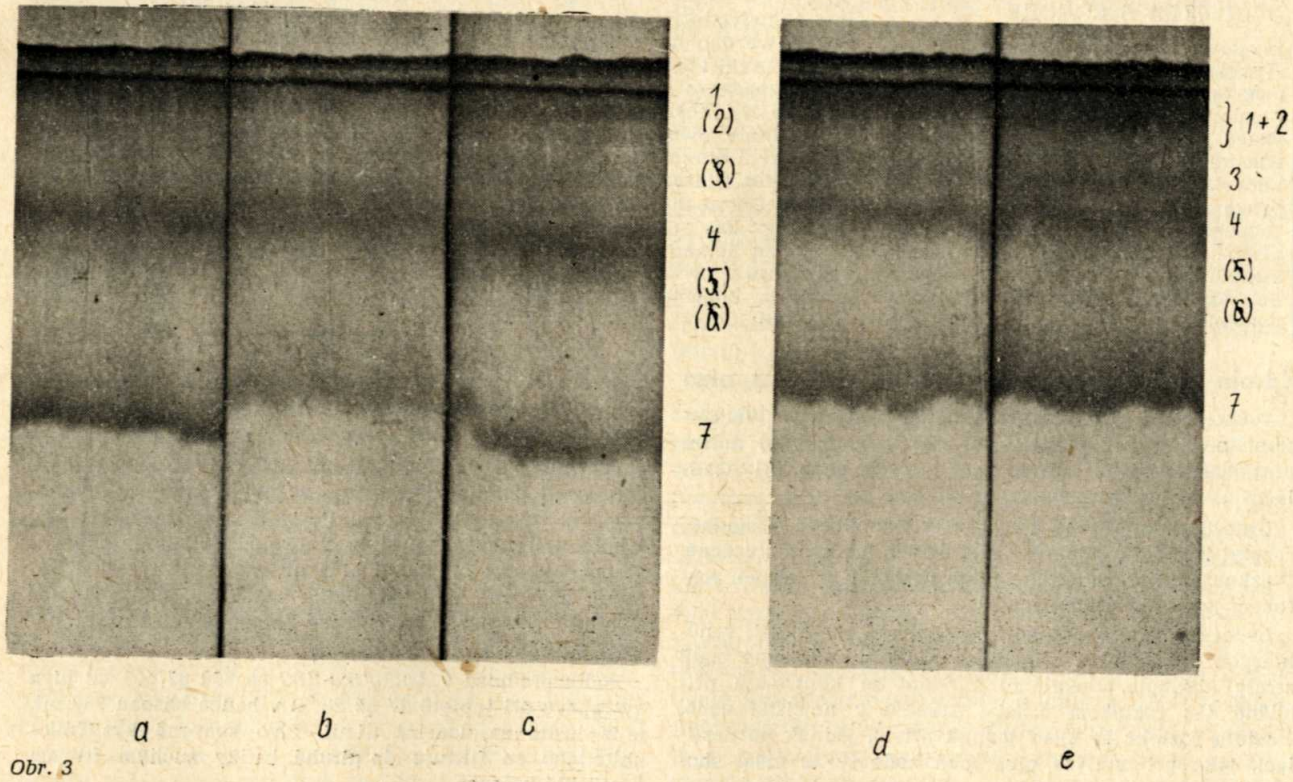
Obr. 2

a — mladina ze sladu máčeného ve stadiu pukavky v 0,2 mg% roztoku GA_3 + 0,01 g glukózy/100 ml; b — mladina ze sladu máčeného ve stadiu pukavky v 0,3 mg% roztoku Ga_3 + 0,01 g glukózy na 100 ml; c — mladiny z pětidenního sladu, vyrobeného bez aplikace GA_3; d — mladina ze sedmidenního sladu, vyrobeného bez aplikace GA_3.



sokomolekulárních bílkovin, takže vznikají v menší míře třísloblíkovinné komplexy, které vytvářejí zákal. Přítomnost samotných tříslovin v roztoku nemusí rušit koloidní stabilitu, pokud nevznikají, resp nemohou vznikat komplexy s bílkovinami, tj. za nepřítomnosti komplexotvorných bílkovin. Jde ovšem i o to, v jaké formě jsou polyfenolové látky.

Vzhledem k celkovému působení exogenně aplikované kyseliny giberelové na enzymový komplex sladu lze předpokládat, že se zvyšuje jeho aktivita v několika směrech ať následkem vyšší tvorby některého enzymu nebo umožněním uplatnění se enzymu jiného. Enzymové děje lze u GA-sladů vcelku označit za pokročilejší, avšak pokročilost se neprojevuje u různých ječmenů ve stejné míře a ve stejném smyslu. To platí pro rozsah koncentrací a dávek v práci zkoušených. U některých ječmenů se vliv GA_3 projeví v jakosti sladu např. vyšší diastatickou mohutností, přijatelně vyšším Kolbachovým



Obr. 3

(2) — velmi slabě; (3), (5), (6) — se neprojevily; a — pivo ze sladu stříkaného ve stadiu pukavky roztokem 0,1 m% GA_3 + 0,1 g glukózy/100 ml (mikroaplikace postřiku 100 l/100 q ječmene); b — pivo ze sladu stříkaného ve stadiu pukavky roztokem 0,1 mg% GA_3 + 0,01 g glukózy/100ml (mikroaplikace postřiku 200 l/100 q ječmene); pivo ze sladu máčeného ve stadiu pukavky v roztoku, kterého se použilo v případech a), b) pro postřik; d — pivo z pětidenního sladu, vyrobeného bez aplikace GA_3 e — pivo ze sedmidenního sladu, vyrobeného bez aplikace GA_3

číslem, v jiném případu se projeví především lepším Hartongovým číslem, v křehkosti, celkovém rozluštění a diastatická mohutnost se zvýší nepodstatně nebo zůstane nezměněna. Proto lze vyslovit další názor v souvislosti se zjištěnou vyšší koloidní stabilitou GA-piv, totiž, že celkově zvýšenou činností enzymového komplexu sladu vlivem GA_3, vznikají sladiny, mladiny i piva, jejichž koloidní částice jsou menší a v roztoku stálejší. Význam momentů, změn na něž bylo ve skladbě látek extraktu GA-sladů poukázáno, by ovšem bylo možno zhodnotit až po jejich podrobnějším ověření a zjištění reprodukovatelnosti příznivého vlivu složení extraktivních látek GA-sladů pro koloidní stabilitu piv.

Závěr

Předmětem tohoto úseku práce bylo zjistit, zda účinkem kyseliny giberelové nenastávají typické změny ve skladbě bílkovinných složek Lundinovy vysokomolekulární frakce A. Při chromatografickém rozdělení bílkovin této frakce na 7 složek se zjistilo, že v ječných zrnech vznikají aplikací giberelinu (GA_3) bez výjimky všechny tyto složky a že procházejí dekokčním varním postupem až do mladiny, stejně jako u porovnávacích sladů, resp. sladin a mladin. Rozdíl se projevil až na chromatogramech piv, kde u piv z GA-sladů nebyla zastoupena jedna z bílkovinných složek. Není vyloučeno, že šlo právě o N-látku, vytvářející snadno komplexy s třísloviny. Jednoznačné vysvětlení vyšší stability GA-piv tímto rozdílem se nezdá být pravděpodobné, stejně jako zaručení reprodukovatelnosti tohoto rozdílu.

Lze uzavřít, že v kongresních, infuzních sladinách z GA-sladů i v dekokčních GA-mladinách bylo zastoupeno všech sedm bílkovinných složek Lundinovy vysokomolekulární frakce A, zjišťovaných ve sladinách a mladinách z normálních sladů. V pivovarském dekokčním procesu nebyla až po zchlazenou mladinu zjištěna žádná charakteristická jakostní změna ve skladbě bílkovin Lundinovy frakce A, vyvolaná aplikací GA_3. Současně se potvrdila až překvapující komplexnost i heterogennost bílkovin sladu, v jaké procházejí (přetrvávají) varním procesem.

Literatura

[1] Raible, K.: Chromatographische Untersuchungen an den höhermolekularen Eiweisstoffen von Würze und Bier. = „Monatschrift für Brauerei", 14, 1961 : 49.
[2] Karel, V.: Chromatografie vysokomolekulárních bílkovin v pivovarských roztocích. = Kvasný průmysl", 9, 1963 : 117.
[3] Meredith, W. O. S.: Studies on wort nitrogen. IV. Starch gel elektrophoresis of TCA precipitates — ASBC-Proceedings. Jones Press, Inc., Minneapolis, Minnesota, 1963, 5 s.
[4] Meredith, W. O. S.: Observations on studies on the composition of the chill haze and its origin = „Brew. Digest", 38, 1963 : 54.
[5] Meredith, W. O. S. - Tkachuk, R.: Chill haze protein of barley, malt and beer. = „Journ. Inst. Brew.", 70, 1964 : 410.
[6] Sandegren, E.: Versuche mit Gibberelinsäure bei der Malzherstellung. = „Wiss. Beilage", 11, 1958 : 231.
[7] Kolbach, P. - Sommer, G.: Versuchssud mit Gibberelinmalz. = Monatschrift für Brauerei", 15, 1962 : 117. ref.: Journ. Inst. Brew. 69, 1963 : 55.
[8] Harris, G.: Studies on non-biological hazes of beers. Isolation of polyphenols and phenolic acids of malt husk. = „Journ. Inst. Brew.", 64, 1958 : 22.

Došlo do redakce 22. 6. 1965.

ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА В СОЛОДЕ

Белковые вещества фракции «А» по Лундину подвергались адсорбции на силикагеле и разделялись после этого хроматографически на 7 составляющих, служивших для изучения влияния на них гибберелиновой кислоты. Было установлено, что добавке гибберелина из внешних источников не вызывает никаких изменений. На соотношение отдельных высокомолекулярных составляющих не оказал гибберелин никакого влияния.

EINFLUSS DER GIBERELINSÄURE AUF DIE HOCHMOLEKULAREN EIWEISSSTOFFE DES MALZES

Die Einweisstoffe der Lundinfraktion A wurden nach der Adsorption auf Silikagel chromatographisch auf 7 Komponenten aufgeteilt und der Einfluss der Giberelinsäure auf diese Bestandteile wurde verfolgt. Es wurde kein durch die exogene Applikation des Giberelins (GA 3) verursachter Unterschied festgestellt. Die Wirkung des Giberelins (GA 3) führte zu keinen wesentlichen Veränderungen in der Vertretung der einzelnen hochmolekularen Eiweissbestandteile.

EFFECT OF GIBBERELLIC ACID UPON HIGH-MOLECULAR ALBUMINS IN MALT

Albumins of the Lundin's A-fraction — after absorbtion on silica gel — have been chromatographically separated into 7 components and the effect of gibberellic acid upon them studied. Exogenous application of gibberelline (GA_3) had no effect. No changes of any importance in the proportions of individual high-molecular albumin components could be traced.