Kvasný průmysl
roč. 12 (1966) - číslo 3

Studie o působení kyseliny giberelové při klíčení ječmene

VLADIMÍR KAREL, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.438

Tato práce má informovat o působení kyseliny giberelové při klíčení ječných zrn z pivovarského hlediska, tj. o jejím vlivu na jakost látek sladového extraktu a navazuje na dříve již uveřejněnou studii o vysokomolekulárních bílkovinách [1]. Zjistilo se, že extrakt giberelinových sladů není v podstatě ochuzen o žádný ze zjišťovaných sedmi typů vysokomolekulárních bílkovin; změny jsou převážně kvantitativní, a to nikoli na úkor jedné či dvou skupin obvykle zastoupených vysokomolekulárních bílkovin, nýbrž zřejmě rovnoměrné ve všech podílech bílkovin Lundinovy frakce A. Nyní se sledovalo zastoupení jednoduchých sacharidů přímo v eluátech GA-sladů a dále se věnovala pozornost jakosti polyfenolových látek. Přihlíželo se k dávce kyseliny giberelové, která se aplikovala jako postřik na ječmen ve stadiu pukavky a rovněž se bral zřetel na koncentraci GA_3 postřikových roztoků.

Cílem této práce tedy nebylo zjišťovat mechanismus působení kyseliny giberelové, nýbrž informovat o následcích jejího použití z hlediska zpracovatelnosti GA-sladů v pivovarství.

Dnes je známo, že exogenní aplikací GA_3 na ječná zrna se zvyšuje tvorba enzymů v aleuronové vrstvě, aniž by se jednoznačně zvyšovala tvorba všech enzymů, nýbrž mění se obsah nebo aktivita jednotlivých enzymů; lze říci, že se zvyšuje enzymová mohutnost sladu, která se projeví celkově lepším rozluštěním i zpracovatelností. V průběhu pokusů s použitím kyseliny giberelové při klíčení ječmene se ukázaly různé závislosti mezi dávkou GA_3/kg ječmene a mezi koncentrací roztoku GA_3 pro postřik. Závislosti se projevovaly ve zjišťovaných pivovarských kritériích sladu, tj. ve vlastnostech sladu, které jsou výsledkem činnosti jeho ezymového komplexu a jsou současně obrazem stavu, síly, jakosti tohoto enzymového komplexu, a tím informují o působení GA_3. Proto byl pro zjištění optimální dávky GA_3 ověřen i tento moment.

Pracovalo se s roztoky koncentrace 0,01 až 0,3 mg% GA_3 na mikrosladovně (5 kg namáčky ječmene); postřik se prováděl roztoky jednotlivých koncentrací GA_3 v objemech, které odpovídaly množství 100 a 200 l postřiku/100 q ječmene (mikroaplikace), a tím se dosáhlo dávky až 0,060 mg GA_3/kg ječmene.

Z porovnání vlastností vyrobených GA-sladů a vlastností sladů kontrolních, vyplynula skutečnost, na níž se poukázalo. Aplikací postřiku roztokem GA_3 určité koncentrace se dosahovalo zlepšení, např. zvýšení diastatické mohutnosti a Kolbachova čísla, tímtéž roztokem při použití jeho dvojnásobného objemu pro postřik pukavky z téhož ječmene se dosáhlo dalšího zvýšení diastatické mohutnosti i Kolbachova čísla, tedy dalšího zvýšení těchže kritérií. Roztok kyseliny giberelové o jiné koncentraci, tj. o další ze zkoušených koncentrací, projevil za těchže podmínek na tomtéž ječmeni účinek takový, že slad měl zvýšené Hartongovo číslo a extrakt, zatímco jeho diastatická mohutnost i Kolbachovo číslo se v porovnání s kontrolním sladem změnila jen málo nebo vůbec neměnila. Význam koncentrace postřikového roztoku se potvrzoval tím, že určitou koncentrací se dosahovalo změny těchže kritérií jakosti; rozsah změny dosažené použitou koncentrací závisel na obsahu účinného roztoku aplikovaného postřikem, čili na absolutní dávce GA_3/kg ječmene. Vliv koncentrace se potvrdil i tehdy, kdy připadlo stejné množství GA_3/kg ječmene aplikované v různých koncentracích a odpovídajících objemech postřikového roztoku.

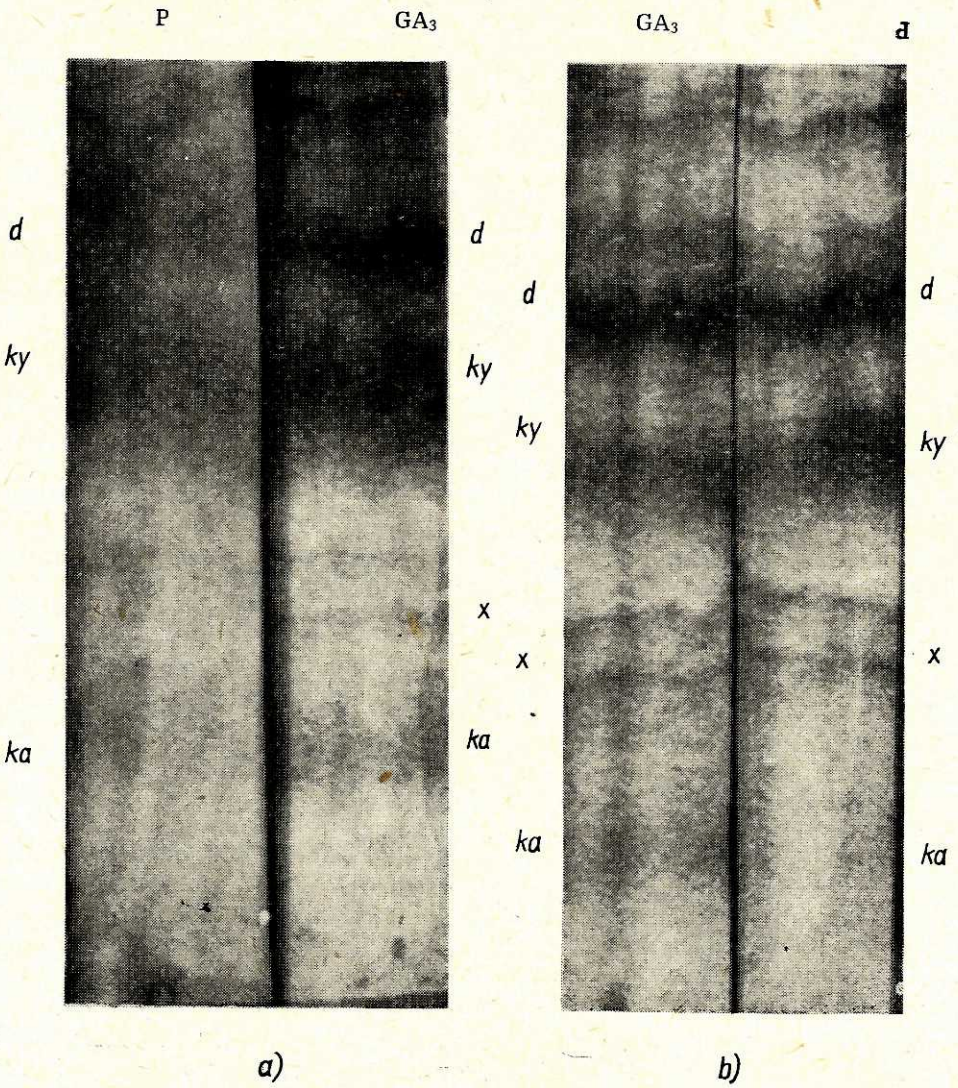
Pro pokusy, při nichž se uvedený poznatek projevil, použilo se jednotného ječmene. Bylo by asi velmi nesnadné, usilovat o zjištění obecně platné závislosti popsaného vztahu. Lze předpokládat, že význam koncentrace účinného roztoku GA_3 značně závisí na celkové dispozici zrn jednotlivých ječmenů: jako mají některé ječmeny předpoklady pro výrobu vysoce diastatických sladů nebo celkově enzymaticky bohatých, extraktivních sladů, tak mají vzhledem k účinku GA_3 i různé, nejednotné předpoklady pro zvýšení tvorby především jen určitých, ne vždy týchž enzymů. Vezmou-li se v úvahu odlišné účinky jednotlivých koncentrací GA_3, které se projevily při zachování jednotnosti ječmene, lze vyslovit názor, že změny kritérií jakosti GA-sladů lze vidět jako výsledek souhry podmínek, z nichž značnou část nelze vymezit. Není vyloučeno, že s podobnými rozdíly, jaké se projevily při použití téhož ječmene a různých dávek i koncentrací GA_3, je nutno počítat při zachování jedné, téže aplikace GA_3 při použití různých ječmenů. V sérii patnácti pokusů provedených na mikrosladovně se projevilo, že koncentrace GA_3 postřikového roztoku má vliv především na to, v kterých kritériích jakosti sladu se projeví zlepšení. Dnes lze říci, že koncentrace pravděpodobně rozhoduje nebo spolurozhoduje o tom, které enzymy začnou vznikat v aleuronové vrstvě ve zvýšeném množství, resp. které začnou ve zvýšeném množství vznikat přednostně. Extrakt GA-sladů nebo jeho zvýšení bylo ve sledu různých aplikací GA_3 variabilní snad proto, že právě hodnota extraktu sladu je výsledkem činnosti prakticky celého jeho enzymového komplexu, přitom aplikací GA_3 se zvyšuje obsah jednotlivých ne vždy týchž enzymů.

Při dalších zkouškách s různými ječmeny se uvedené předpoklady potvrdily. Jediný závěr, který má obecnější význam pro sladařskou praxi je zjištění koncentrace a dávky GA_3, při jejímž použití se klíčení ječmene urychlilo o dva dny a maximálně se zlepšila pivovarská kritéria jakosti sladu bez průvodních negativních účinků (zvýšení barvy, Kolbachova čísla sladu aj.), které podle své povahy

mohou slad i vyloučit z pivovarského použití. V průběhu pěti let se při mikrozkouškách na různých ječmenech čs. provenience neprojevil žádný z negativních znaků jakosti, byla-li kyselina giberelová aplikována v 0,3 mg% koncentraci jako postřik na pukavku ječmene, a to v množství 100 l na 100 q ječmene. Na 1 kg ječmene připadá v tomto případě 0,030 mg GA_3; již při použití dávky 0,040 mg/kg ječmene se v jednotlivých případech dosahovalo Kolbachovo číslo 47 a hodnot vyšších. Ukázalo se, že lze stěží předpokládat závislost, která by vedla k obecnému pravidlu, podle něhož by bylo možno úpravou aplikace kyseliny giberelové vhodně usměrnit její působení, např. ve prospěch tvorby určitých enzymů, a to s obecnou platností. Koncentrace GA_3 se zde zřejmě uplatňuje nejen v množství účinné látky, která přejde do zrna, nýbrž snad i v rychlosti, se kterou zrno tuto látku přijímá. Snad je na místě v této souvislosti poukázat také na způsob účinu enzymů — teorii počtu a specifitě, resp. různé specifitě záchytných míst na bílkovinném nosiči enzymů pro různé koenzymy a substráty; zde se rozhoduje, jaký substrát bude vytvořený enzym zpracovávat, čili který enzym vznikne. Lze soudit, že závislost v působení koncentrace se může projevit za vyloučení různosti dispozic ječmenů, tj. za použití jednoho a téhož ječmene. Různost v dispozicích jednotlivých ječmenů vzhledem k účinku kyseliny giberelové je však natolik značná, že jedinou možností pro obecně platné usměrnění účinku této aktivní látky bylo poznání podmínek, kdy se z pivovarského hlediska dosahuje maximálního, ještě příznivého účinku a neprojevují se negativní znaky.

Při vysokých dávkách GA_3/kg ječmene se ve vlastnostech sladů projevila již určitá jednoznačnost, především v hodnotách diastatické mohutnosti a Kolbachova čísla, avšak právě Kolbachovo číslo dosahovalo hodnot nezvyklých, u pivovarských sladů nežádoucích. V souvislosti s vysokým Kolbachovým číslem byla i zvýšená barva, nadměrná tvorba melanoidinových látek na hvozdu, změny chuťové apod.

Vliv kyseliny giberelové na jednoduché sacharidy [2] sladového extraktu a na polyfenolové látky sladu se sledoval chromatograficky [3]. Aby se zachytil stav v zrnech GA-sladů, „status quo", tj. bez působení enzymů v roztoku při rmutování, pracovalo se s přímými alkoholickými výluhy, které se chromatografovaly, polyfenolové látky se sledovaly rovněž ve sladinách. V přímých eluátech se



Obr. 1

a — první pás: eluát porovnávaného 7denního sladu
druhý pás: eluát GA_3 5denního sladu
b — první pás: eluát GA_3 5denního sladu
druhý pás: eluát porovnávacího 7denního sladu
d — delfinidin; ky — kyanidin; ka — katechiny; x — diferující skvrna (pozitivní nález)

zjistilo, že v zrnech GA-sladů vznikají tytéž a bez výjimky všechny jednduché sacharidy jako v zrnech kontrolních sladů, tj. jako v zrnech obvykle vyráběných a v pivovarství používaných sladů. Ve sledovaném směru se potvrdila plnohodnotnost pětidenních GA-sladů s porovnávacími sedmidenními slady. GA-slady s aplikací 0,030 mg GA_3 na 1 kg ječmene, vedené na humnech plných sedm dní, vykazovaly již vyšší obsah jednotlivých sacharidů než kontrolní sedmidenní slady; považují-li se vlastnosti sladu vedeného sedm dní (bez aplikace GA_3) na humně za směrodatné, lze uvedené zjištění považovat již za známku přeluštění. Souhlasné znaky se současně projevovaly i v hodnotách relativních extraktů podle Hartonga; tytéž známky přeluštění na chromatogramech cukrů se objevovaly i u pětidenních GA-sladů, při aplikaci dávky 0,060 mg GA_3/kg ječmene postřikem. O vlivu kyseliny giberelové na zastoupení jednoduchých sacharidů ve sladovém extraktu tedy platí asi totéž, co o zastoupení sedmi frakcí vysokomolekulárních bílkovin [1].

Změnou jakosti se projevila GA_3 až ve složení polyfenolových látek. Po kvantitativní stránce se projevovaly rozdíly v infuzních, laboratorních sladinách u povařovaných, dekokčních roztoků se rozdíly prakticky vyrovnávaly avšak u GA-roztoků zůstávala jejich hladina zpravidla zvýšena. Zvýšení bylo u jednotlivých sladů variabilní a u jednotlivých ječmenů se při určité dávce GA_3 dosahovalo horní meze, která se dalším zvýšením dávky účinné látky v podstatě neměnila.

Změna v zastoupení polyfenolových látek, která se projevila, byla jedinou zjištěnou typickou jakostní změnou na rozdíl od jakosti sledovaných složek jednoduchých cukrů a bílkovin.

Chromatogramy polyfenolových látek alkoholických eluátů [3] porovnávacích a GA-sladů na *obr. 1* zachycují změnu, která se projevuje u GA-sladů bez rozdílu, v jaké dávce či koncentraci byla kyselina giberelová aplikována. Pro extrém se použilo až dávky 4 mg GA_3/kg ječmene, a charakter změny se opakoval i zde. Podle provedeného zjištění jde vlastně o dvě možnosti jakostního rozdílu ve složení polyfenolů; rozdíl se projevoval v první nebo druhé alternativě u velké řady pokusných sladů z několika ročníků ječmene.

U GA_3 eluátů se na chromatogramech objevovala skvrna v místech, kde *Harris* [4] na dvojrozměrném chromatogramu uvádí blíže neidentifikovanou skvrnu sladových třísloviin č. 15 (na *obr. 1a*, skvrna x) — skvrnu o nejblíže nižším Rf označuje jako jednoduché fenoly. U eluátů porovnávacích sladů se zmíněná skvrna neprojevovala (*obr. 1aP*). Z barevné intenzity ostatních skvrn bylo patrno, že zvýšení obsahu polyfenolových látek nastává vlivem GA_3 i ve všech ostatních jejich typech, zastoupených současně na jednorozměrných chromatogramech GA i kontrolních sladů. Rozdíl v intenzitě skvrn je zřejmý na *obr. 1a*. Toto zjištění bylo poznáno jako prvá ze dvou alternativ jakostní změny.

Druhá alternativa rozdílu v zastoupení třísloviných látek GA-sladu (*obr. 1b*) se projevovala podstatným zvýšením obsahu katechinů, přitom v intenzitě skvrn ostatních zastoupených polyfenolů GA a kontrolního sladu rozdíl nebyl. Skvrna, o níž se hovořilo v předcházejícím odstavci se v takových případech vyskytovala i u porovnávacího sladu. V tomto případu tedy nejde o tvorbu nových látek vlivem GA_3, tj. látek, které se nevyskytují v porovnávacím sladu jako v případu prvním, nýbrž o usměrnění zvýšení tvorby třísloviných látek ve prospěch jedné jejich složky.

Zjištěná skutečnost poukazuje na to, že giberelin (GA_3) působí na tvorbu polyfenolových látek v ječných zrnech při klíčení, avšak jak lze podle provedených chromatogramů soudit, nevznikají za podmínek pětidenního sladování na humnech třísloviné látky v pivovarství neobvyklé, jejichž výskyt by snad bylo možno posuzovat nepříznivě.

Popsaná diferující skvrna (*obr. 1a*) se vyskytovala u GA-sladů téměř vždy, avšak vyskytovala se často i u sladů kontrolních. Poznatek lze vyjádřit tak, že prakticky „diferoval" v uvedené skvrně porovnávací slad. Pokud nebyla tato skvrna u eluátů kontrolních sladů zastoupena (*obr. 1aP*), objevila se na chromatogramech odpovídajících GA-sladů a současně se zvyšovala hladina všech typů třísloviin zjišťovaných použitou metodou.

Pokud se látky sledované skrny vyskytovaly u porovnávacích, sedmidenních sladů, zvyšoval se u GA-sladů výrazně obsah katechinů, zatímco zvýšení obsahu ostatních polyfenolových složek nebylo patrné (*obr. 1b*).

V kontrolních ani v GA-laboratorních (infuzních) sladinách se skvrna *x* zjištěná v alkoholických eluátech jako diferující již nevyskytovala; stejně tomu bylo i ve sladinách povařovaných 30 minut v laboratoři a v dekokčních sladinách.

V GA-laboratorně povařovaných i v dekokčních sladinách byla zjištěna především kvantitativní změna ve smyslu zvýšení anthokyanogenních látek, stanovených po jejich adsorpci na nylonu 66 a hydrolýze HCl [5], a to i v případech, kdy v infúzních GA- a porovnávacích sladinách byl obsah třísloviin vyrovnán nebo v některých případech GA-infúzních sladin i snížení. Není vyloučeno, že diferující skvrnu *x* v přímých eluátech sladů vytvářejí prekursory anthokyanogenů; tomu nasvědčuje další zjištění, totiž, že na chromatogramech sladin, důsledně na chromatogramech povařovaných sladin, se projevovaly rozdíly (zvýšení intenzity skvrn) až nad leukoanthokyaniny, v oblasti látek skýtajících hydrolýzou HCl kyanidinchlorid a delfinidinchlorid.

Rozdíly v hladině katechinů, zjišťované v eluátech, se ve sladinách vyrovnávaly a na chromatogramech odpovídajících sladin se projevoval týž rozdíl v oblasti nad leukokyaniny, jaký byl zjištěn ve sladinách ze sladů, jejichž eluáty vykázaly první ze dvou nacházených typů změn.

Oba jakostní rozdíly zjištěné v alkoholických eluátech sladů se projevovaly ve sladinách stejně, jednoznačně. GA-slady se zvýšeným obsahem katechinů tedy skýtaly sladiny, v nichž byl obsah těchto

látek prakticky vyrovnán s obsahem katechinů sladin z porovnávacích sladů, diference se projevila na chromatogramech v popsaných již oblastech, a to v plném souhlasu se stanovením anthokyanogenních látek Ny- metodou [5]. Toto zjištění lze chápat např. i tak, že se katechiny převádějí na anthokyanogenní látky činností snad polyfenoloxidáz nebo i jiných polyfenoláz [6—11], tj. že se vytvářejí podmínky, kterým byla i je zejména až v poslední době věnována pozornost. Zajisté však lze zjištěnou změnu vysvětlovat i z jiných hledisek.

Podstatným zůstává, že se v dekokčních sladinách zvyšuje obsah látek adsorbovatelných nylonem 66, skýtajících hydrolýzou HCl červené zabarvení (anthokyanidiny). Z hlediska koloidní stability piv však nelze tuto skutečnost považovat snad za jednoznačně nepříznivou, protože GA-piva mají zpravidla nižší podíl bílkovin vysokomolekulární frakce A, a proto je možno předpokládat menší pravděpodobnost vzniku zákalotvorných třísloviných komplexů, než jaká je u odpovídajících porovnávacích piv.

Závěr

Z práce vyplynulo, že aplikací giberelinu (GA_3) při výrobě sladu v zásadě nenastávají radikální jakostní změny ve skladbě základních složek sladového extraktu, tj. ve skladbě vysokomolekulárních bílkovin [1], jednoduchých cukrů a ani třísloviny. Problematika závislosti dávky GA_3 na 1 kg ječmene a koncentrace účinného roztoku pro event. použití v běžné sladařské praxi vyzněla v tom smyslu, že nemají-li se vyskytovat u některých pivovarských kritérií jakosti sladu nežádoucí hodnoty, tj. hodnoty, které mohou slad i vyloučit z pivovarského použití, bylo by při zpracování různých ječmenů výhodné používat postřikový roztok koncentrace 0,3 mg% GA_3 tak, že na 1 kg ječmene připadá 0,030 mg GA_3 (100 l postřiku na 100 q pukavky ječmene).

Při vyšších koncentracích GA_3 i při vyšších dávkách této látky na 1 kg ječmene měly vždy některé pětidenní slady z ječmenů různých ročníků jakostní znaky, které ačkoli svědčily o dokonalejším rozluštění GA-sladu, byly z pivarského hlediska již méně příznivé než u sedmidenních, porovnávacích sladů.

Literatura

[1] Karel, V.: Vliv kyseliny giberelové na vysokomolekulární bílkoviny sladu. = „Kvasný průmysl", 11, 1965 : 217.
[2] Harris, G.-McWilliam, J. C.: Changes in the carbohydrate composition of barley on ripening and corresponding variations in nitrogenous constituents. = „Joun. Inst. Brew.", 63, 1957 : 210.
[3] Harris, G.: Chromatographic separation of hop and malt tannins. = „Journ. Inst. Brew.", 62, 1956 : 405.
[4] Harris, G.-Rickets, B. A.: Isolation of polyphenols and phenolic acids of malt husk. = „Journ. Inst. Brew.", 64, 1958 : 22.
[5] Harris, G.-Rickets, R. W.: Rapid estimation of anthocyanogens in beer. = „Journ. Inst. Brew.", 65, 1959 : 331.
[6] Pollock, J. R. A.-Pool, A. A.-Reynolds, T.: Anthocyanogens in barley and other cereals and their fate during malting. = = „Journ. Inst. Brew.", 66, 1960 : 389.
[7] Pollock, J. R. A. a spol.: Hordein in relation to anthocyanogens (leucoanthocyanins) in ungerminated barley. = „Journ. Inst. Brew.", 65, 1959 : 483.
[8] Pollock, J. R. A.: Anthocyanogens in malting and brewing. = = ref. „Journ. Inst. Brew.", 67, 1961 : 278; „Rev. Ferm. Ind. Aliment." 15, 1960 : 171.
[9] Harris, G.-Rickets, M. A.: Effect of nylon 66 in dealing formation of haze. = „Journ. Inst. Brew." 65, 1959 : 418.
[10] Karrer, P.: Organic chemistry, Elsevier Publ. Comp., N. York — Amsterdam — London — Brussels, 1950, 545.
[11] Reynolds, T.-Pollock, J. R. A.: Polyphenols in malting and brewing — EBC — Congr. Vienna 1961 Summaries of papers, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam — London — N. York — Princeton, 1961, 46.

Došlo do redakce 1. 11. 1965.

ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАЩИВАНИЕ ЯЧМЕНЯ

В статье приводятся результаты изучения влияния применения гиббереллиновой кислоты при проращивании ячменя на содержание сахаридов и полифеноловых соединений в солодовом экстракте. При анализе не обнаружились изменения состава таннидов установленных в элюатах GA, могущие иметь влияние на качество продукта. В сусле полученном методом отварного затирания повысилось содержание полифеноловых соединений, адсорбируемых найлоном 66 и дающих при гидролизе соляной кислотой красную окраску.
Лучшие результаты дала гиббереллиновая кислота при концентрации 0,3 мг % в растворе GA_3, опрыскивании ячменя в первой фазе прорастания ростков при дозе 0,030 мг GA_3 на 1 кг ячменя.

STUDIUM DER WIRKUNG DER GIBERELINSÄURE WÄHREND DER GERSTENKORNKEIMUNG

Es wurde der Einfluss der Giberelinsäure, die im Stadium der Gerstenkeimung appliziert wurde auf die qualitative Vertretung der einfachen Saccharide und Polyphenolstoffe im Malzextrakt verfolgt. Die qualitativen Unterschiede in der Vertretung der Gerbstoffe, die in den direkten Eluaten der GA- und Vergleichsmalze nicht festgestellt wurden, kamen bei den Dekoktionswürzen zum eindeutigen Vorschein in der Erhöhung des Gehalts der Polyphenolstoffe, die durch Nylon 66 adsorbierbar sind und bei der Hydrolyse mit HCl rote Verfärbung aufweisen. Für die Giberelinsäureanwendung zeigte sich als optimal die Applikation von 0,3 mg % GA_3-Lösung zur Gerste im Stadium des Brechhaufens in der Form von Bespritzung, wobei die GA_3-Dosierung auf 1 kg Gerste 0,030 mg betrug.

EFFECT OF GIBBERELLIC ACID ON THE GERMINATION OF BARLEY

The article deals with the results of experimental research works on the effect of gibberellic acid upon the shares of simple saccharides and polyphenol substances in the malt extract. The analyses failed to show any difference in the composition of tannins present in the GA eluates, which could effect the quality of the product. The proportion of polyphenol substances in the mash obtanied through decoction mashing was higher. These polyphenols are adsorbed by nylon 66 and their presence is shown in hydrolisis with HCl by red colouring. The best results were obtained with spraying barley in the very first stage of germination with a solution of GA_3. The dosis should be 0,030 mg of CA_3 per 1 kg of barley, and the concentration of solution 0,3 mg %.