

DOI: 10.18832/kp201701

# Aktivita proteolytických enzymů v průběhu sladování a výroby piva

## Activity of Proteolytic Enzymes During Malting and Brewing

Karolína BENEŠOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ, Zdeněk SVOBODA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Malting Institute Brno, 7 Mostecká, 614 00 Brno, Czech Republic*

e-mail: benesova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper***Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2017: Aktivita proteolytických enzymů v průběhu sladování a výroby piva. Kvasny Prum. 63. č. 1, s. 2–7**

Sladování je řízené klíčení zrna ječmene za určitých podmínek do okamžiku modifikace zrna a je základním kamenem pivovarnického a lihovarnického průmyslu. Cílem sladování je vyrobit z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určitého druhu piva. Důležitou složkou tohoto procesu je aktivita proteolytických enzymů, nejenom při degradaci zásobních bílkovin, ale také při dalších aspektech procesu klíčení, například při aktivaci dalších enzymů. Rozluštění zrna je významným kritériem kvality vyráběných sladů a následně i kvality a specifických vlastností jednotlivých druhů piv.

**Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2017: Activity of proteolytic enzymes during malting and brewing. Kvasny Prum. 63, No. 1, pp. 2–7**

Malting is controlled germination of barley grain under certain conditions to the time of grain modification and it is a key process of the brewing and distilling industries. The aim of malting is to produce from barley malt containing the necessary enzymes, aroma and color substances needed for the production of a certain type of beer. An important part of this process is the activity of proteolytic enzymes, not only during the degradation of storage proteins but also in other aspects of the germination process, for example activation of other enzymes. Grain modification is an important criterion for the quality of produced malts and subsequently the quality and specific characteristics of different types of beers.

**Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2017: Die Aktivität der proteolytischen Enzymen im Laufe des Keimungs – Bierherstellungsprozesses. Kvasny Prum. 63, Nr. 1, S. 2–7**

Der Malzprozess ist unter bestimmten Bedingungen eine gesteuerte Keimung des Gerstenkerns bis zur Kernmodifikation und stellt einen Grundstein der Brau- und Spirituosenindustrie dar. Der Endpunkt des Malzens ist aus der Gerste ein Malz herzustellen, das alle zum bestimmten Bier Typs notwendige Enzyme, Aromatische- und Farbstoffe enthält. Eine wichtige Komponente dieses Prozesses ist die Aktivität der proteolytischen Enzyme nicht nur bei der Degradation von Vorratsproteinen aber auch bei den weiteren Keimungsprozessaspekten, z.B. bei der Aktivität der weiteren Enzyme. Die Kernauflösung stellt ein wichtiges Kriterium der Malzqualität nicht vom hergestellten Malz aber auch von der Bierqualität und spezifischen Eigenschaften der einzelnen Biersorten dar.

**Klíčová slova:** proteolytické enzymy, ječmen, slad**Keywords:** proteolytic enzymes, barley, malt

### 1 ÚVOD

Rezervní látky obsažené v zru ječmene jsou při skladování ve stabilní vysokomolekulární formě. Enzymy jsou přítomny v malém množství. Při máčení dojde ke zvýšení obsahu vody v zru, při následné fázi, klíčení, k aktivaci a syntéze enzymů, které štěpí zásobní makromolekulární látky na rozpustné nízkomolekulární produkty. Tento proces je nazýván rozluštění zrna a je významným kritériem v kvalitě vyráběných druhů sladů a následně i v kvalitě a specifických vlastnostech jednotlivých druhů piv (Basařová et al., 2015). Jedná se především o rozrušení buněčných stěn a následně o rozštěpení škrobových zrn a bílkovinných řetězců. Při klíčení se snižuje obsah škrobu a zvyšuje obsah cukrů, nerozpustné vysokomolekulární bílkoviny se musí přeměnit v rozpustné nízkomolekulární štěpné produkty. Tím se změní celkové množství bílkovin.

Ze sladařského hlediska jsou zvláště důležité enzymy. Sklizený sladovnický ječmen obsahuje v posklizňové zralosti v aktivní nebo latentní formě velké množství enzymů a jejich prekurzorů (Kosař et al., 2000). Působení enzymů se projevuje v jednotlivých fázích vývoje zrna a v celém sladařsko-pivovarském procesu v různé míře. Ze sladařského hlediska můžeme za nejdůležitější označit enzymy třídy hydrolas, které je možno rozdělit do čtyř skupin (cytolytické enzymy, proteolytické enzymy, fosfatasy, amylasy) a třídy oxidoreduktas, za nimi potom následují transferasy, lyasy, isomerasy a ligasy. V pivovarském procesu mají vedoucí úlohu hydrolasy, především ve varním procesu, ostatní třídy enzymů se ve větší míře uplatňují při kvašení. Zástupci jednotlivých tříd enzymů jsou uvedeni v *tab. 1*.

### 1 INTRODUCTION

During storage, reserve substances contained in barley grain are in a stable high-molecular form. Enzymes are present only in a small amount. During steeping, water content in grain increases, during the following phase, germination, enzymes which cleave macromolecular substances to soluble low-molecular products, are activated and synthesized. This process is called modification of grain, it is an important criterion of quality of produced kinds of malts and subsequently also of quality and specific features of the individual kinds of beers (Basařová et al., 2015). Cell walls are disrupted and subsequently starch granules and protein chains are split. During steeping, starch content declines and sugar content increases, insoluble high-molecular proteins must be converted in soluble low-molecular degraded products. Thus the total amount of protein is changed.

In malting terms, enzymes are of a special importance. In post-harvest maturity, harvested malting barley contains, in active or latent forms, a huge amount of enzymes and their precursors (Kosař et al., 2000). The activity of enzymes varies in the individual phases of the grain development and the entire malting and brewing process. From the malting point of view, enzymes of the hydrolase group can be classified as the most important enzymes. They can be divided into four groups (cytolytic enzymes, proteolytic enzymes, phosphatases, amylases) and the class of oxidoreductases, followed then by transferases, lyases, isomerases, and ligases. Hydrolases play a key role mainly in the brewing process, other classes of enzymes are then more active during fermentation. The representatives of the individual classes of enzymes are given in *Table 1*.

Tab. 1 Jednotlivé třídy enzymů (Kosař et al., 2000)

Představitelé jednotlivých tříd enzymů:	
EC1 – oxidoreduktasy	lipoxygenasa, superoxid dismutasa, katalasa, peroxidasa, polyfenoloxidasa
EC 2 – transferasy	transglukosidasy: D – enzym, P – enzym, Q – enzym
EC 3 – hydrolasy	esterasy: lipasy, fosfatasy karbohydrasy: $\alpha$ -amylasa, $\beta$ -amylasa, limitní dextrinasa, R-enzym, maltasa, sacharasa hemicelulasy štěpící $\beta$ -glukany a pentozany: $\beta$ -glukanasa, solubilasa, xylobiasa, arabinosidasa, xylanasy štěpící peptidové vazby: endopeptidasy a exopeptidasy
EC 4 – lyasy	aldolasa, karboxydismutasa
EC 5 – isomerasy	ribulasa-5fosfát-epimerasa
EC 6 – ligasy	Acetyl-CoA-karboxylasa

Hydrolytické enzymy jsou nejdůležitějšími enzymy při výrobě sladu a sladiny, ale i v dalším procesu výroby piva. Při procesu sladování a rmutování se uplatňují především hydrolasy, které štěpí esterové vazby. Patří sem velká skupina enzymů štěpících lipidické složky (lipasy) a fosforečné estery (fosfatasy), dále štěpící glykosidové vazby škrobu, hemicelulosu a celulosu, tzv. karbohydrasy. Sem patří amylolytické enzymy a oligosaccharidasy ( $\alpha$ -amylasa,  $\beta$ -amylasa, maltasa, limitní dextrinasa, R-enzym, sacharasa), hemicelulasy (enzymy, které štěpí glukany a pentosany) a celulasy (enzymy, které odštěpují z celulosy odpovídající dextriny) a hydrolasy štěpící peptidové vazby (endopeptidasy a exopeptidasy).

## 2 PROTEOLYTICKÉ ENZYMY

Proteolytické enzymy (proteasy) katalyzují štěpení bílkovin (obr. 1). Vedle amylas jde o nejdůležitější hydrolytické enzymy. Tyto enzymy katalyzují štěpení peptidické C-N vazby, řada z nich však vykazuje další aktivity – esterovou, koagulační, transpeptidasovou (Vodrážka, et al., 1991). Vzájemně se liší původem, lokalizací, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, specifitou, mechanismem působení, fyziologickými funkcemi i možnostmi jejich praktického využití. Uvnitř peptidového řetězce dochází ke štěpení jen na určitých místech, tj. před nebo za určitými aminokyselinovými zbytky (Havlová, 1999). Obecně lze celou podtřídu enzymů (EC 3.4) rozdělit podle místa štěpení v molekule proteinu na endopeptidasy a exopeptidasy. Endopeptidasy štěpí strukturu bílkovin zevnitř jejich struktury, jejichž sekvence aminokyselin jsou specifické pro aktivitu určitého enzymu, a exopeptidasy na koncích řetězce bílkovin.

Proteasy můžeme také podle mechanismu jejich působení a inhibice jedním nebo více specifickými inhibitory rozdělit do 4 tříd: (Bell, 2012): 1) cysteinové proteasy, jejichž aktivita nastává prostřednictvím cysteinového fragmentu přítomného v jejich aktivním místě. Tato třída je specificky inhibována trans – epoxysuccinyl – L – leucylamido – (4 – guanidino) butanem (E – 64) a stimulována redukčními činidly, jako například dithiothreolem (DTT) a  $\beta$ -merkaptoethanolem, 2) metaloproteasy, které vyžadují přítomnost kovového iontu (obvykle zinku) v aktivním místě a jsou specificky inhibovány chelátorem 1, 10 fenantrolinem, který má vysokou afinitu k zinku, 3) asparátové proteasy, které katalyzují hydrolyzu substrátu bez tvorby kovových meziproductů, tyto jsou specificky inhibovány pepstatinem A, a 4) serinové proteasy, které katalyzují hydrolyzu substrátu přes hydroxylovou skupinu serinového zbytku v aktivním místě a podobným způsobem jako cysteinové proteasy, tedy tvorbou kovalentních meziproductů. Jejich specifickým inhibítorem je fenylmetansulfonyl fluorid (PMSF).

## 3 PROTEOLYTICKÁ AKTIVITA V PRŮBĚHU SLADOVÁNÍ

Degradaci zásobních proteinů v klíčícím zrně ječmene zajišťuje velký komplex proteolytických enzymů a probíhá ve třech fázích: počáteční hydrolyza specifických bílkovin (hlavně globulinů) je *in situ* katalyzována endopeptidasami přítomnými v embryu. Tato fáze proteolýsy je základní pro tvorbu aminokyselin, které jsou následně využity pro syntézu proteinů. V další fázi odbourávání proteinů se vyskytuje rychlá proteolytická aktivita, kdy dochází k syntéze endo-

Table 1 Individual classes of enzymes (Kosař et al., 2000)

Representatives of the individual classes of enzymes:	
EC1 – oxidoreductases	lipoxygenase, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase
EC 2 – transferases	transglucosidases: D – enzyme, P – enzyme, Q – enzyme
EC 3 – hydrolases	esterases: lipases, phosphatases carbohydrases: $\alpha$ -amylase, $\beta$ -amylase, limit dextrinase, R-enzyme, maltase, saccharase hemicellulases degrading $\beta$ -glucans and pentosans: $\beta$ -glucanase, solubilase, xylobiase, arabinosidase, xylanase peptide bond: degrading endopeptidases and exopeptidases
EC 4 – lyases	aldolase, carboxydismutase
EC 5 – isomerases	ribulase-5 phosphate-epimerase
EC 6 – ligases	Acetyl-CoA-carboxylase

Hydrolytic enzymes are the most important enzymes at production of malt and sweet wort as well as in other brewing processes. Hydrolases play a role namely during the malting and mashing processes, they cleave ester linkages. They comprise a large group of enzymes cleaving lipid components (lipases) and (phosphorus esters phosphatases), further, glycosidic bonds of starch, hemicelluloses and celluloses, so-called carbohydrases. They include amylolytic enzymes and oligosaccharidases ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, maltase, limit dextrinase, R-enzyme, saccharase), hemicellulases (enzymes cleaving glucans and pentosans) and cellulases (enzymes that cleave from cellulose corresponding dextrins) and hydrolases cleaving peptidic bonds (endopeptidases and exopeptidases).

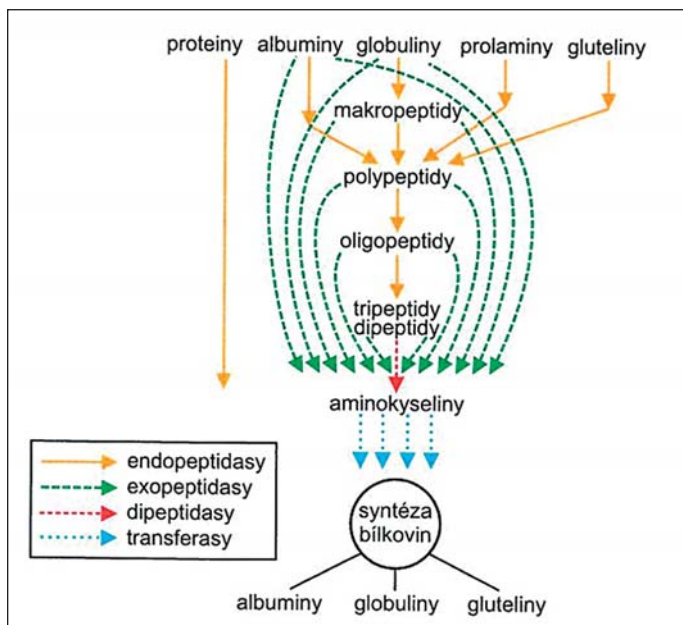
## 2 PROTEOLYTIC ENZYMES

Proteolytic enzymes (proteases) catalyze protein cleavage (Fig. 1). Besides amylases, they are the key hydrolytic enzymes. These enzymes catalyze the cleavage of the peptide C-N bonds but many of them also have other activities – ester, coagulation, transpeptidase (Fig. 1). (Vodrážka et al., 1991). They differ mutually by their origin, localization, physical and chemical properties, specificity, mechanism of operation, physiological functions and possibilities of their practical use. The cleavage inside the peptide chain occurs only at certain sites, i.e. before or behind certain amino acid residues (Havlová, 1999). Generally, the whole subclass of enzymes (EC 3.4) can be split according to the site of cleavage in protein molecule to endopeptidases and exopeptidases. Endopeptidases cleave protein structures from inside, sequences of amino acids are specific for the activity of a certain enzyme and exopeptidase at the ends of the protein chain.

Based on the mechanism of operation and inhibition by one or more specific inhibitors, proteases can be split into four classes: (Bell, 2012): 1) cysteine proteases, the activity of which is induced by a cysteine fragment present at their active site. This class is specifically inhibited by trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) and stimulated by reduction agents, such as dithiothreitol (DTT) and  $\beta$ -mercaptoethanol, 2) metalloproteases, which require the presence of a metal ion (usually zinc) at the active site and are specifically inhibited by chelator 1, 10 fenantrolin with high zinc affinity, 3) aspartic proteases, which catalyze hydrolysis of the substrate without creating metal intermediaries, they are inhibited specifically by pepstatin A, and 4) serine proteases, which catalyze hydrolysis of substrate through the hydroxyl group of a serine residuum at the active site and similarly as cysteine protease, i.e. by creation of covalent intermediaries. Their specific inhibitor is phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF).

## 3 PROTEOLYTIC ACTIVITY DURING MALTING

Degradation of storage proteins in germinating barley grains is ensured by a large complex of proteolytic enzymes in three phases: initial hydrolysis of specific proteins (mainly globulins) is *in situ* catalyzed by endopeptidases present in the embryo. This phase of proteolysis is principal for formation of amino acids which are subsequently used for protein synthesis. In the further phase of protein



Obr. 1 Schéma štěpení bílkovin během sladování (Narziss, 1985)

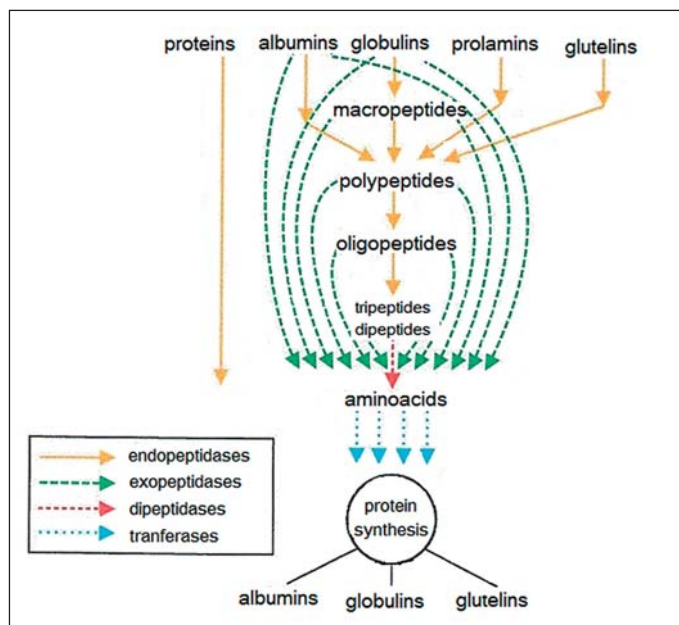


Fig. 1 Scheme of protein cleavage during malting (Narziss, 1985)

peptidas. Tyto enzymy jsou vylučovány do endospermu, kde degradují hlavní zásobní proteiny (prolaminy a gluteliny) na peptidy a aminokyseliny. Následně jsou peptidy dále degradovány na aminokyseliny exopeptidasami v průběhu třetí fáze proteolýzy (Ross Guerin, 1993). Aktivita proteas během klíčení 5–6krát stoupá (Havlová, 1999) a během hvozdění sladu a při přípravě mladiny se snižuje (Jones et al., 1993). V první fázi degradace proteinů při klíčení jsou štěpeny proteiny ve štitku a aleuronové vrstvě. Rozpustné peptidy produkované proteasami slouží jako substrát pro karboxypeptidas, které je degradují na aminokyseliny. V další fázi se proteasy podílejí na degradaci buněčných stěn škrobových zrn v endospermu a hydrolyzují rezervní proteiny (hordeiny a gluteliny) lokalizované v endospermu.

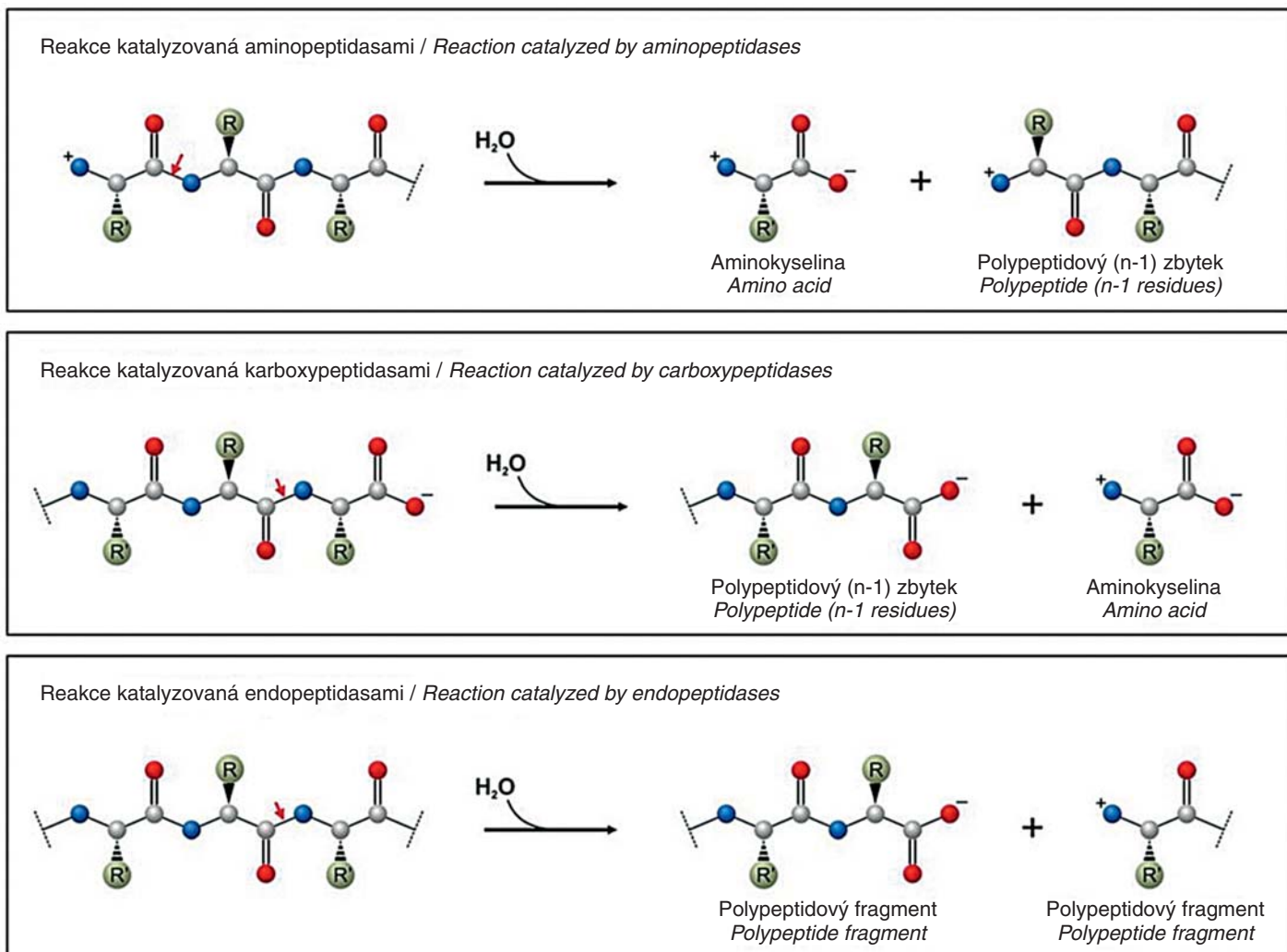
Endopeptidasová aktivita je tvořena nejméně pěti enzymy (Basařová et al., 2015). Z 90% jsou to dva sulfhydrylové enzymy, které inhibuje p-chlormercuribenzoát a mají optimální pH při 3,9–5,5. Zbylých 10% zajišťují tři enzymy s aktivitou závislou na kovových iontech (tzv. metaloenzymy) s optimálním pH 5,5–6,9 a 8,5. Tyto enzymy jsou inhibovány kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Optimální podmínky pro působení endopeptidas jsou mezi 45–50 °C. Optimální pH a teplota závisí na molekulové hmotnosti štěpených sloučenin (Havlová, 1999). Za nejdůležitější endoproteasy ve sladu byly označeny cysteinové proteasy, které uvolňují při klíčení aminokyseliny z hordeinů a glutelinů. V usušeném sladu zůstává až 90% jejich aktivity, ale při rmutování se uplatní jen 1% z jejich možné aktivity vzhledem k poměrně vysokým optimálním hodnotám pH (Basařová et al., 2015). Exopeptidas odštěpují z vnějších konců molekul proteinů jednoduché aminokyseliny. Ve sladu jsou přítomné čtyři neutrální aminopeptidas s optimálním pH 7,0–7,2 a jedna alkalická leucin-aminopeptidasa s optimálním pH 8,0–10,0, které odštěpují aminokyseliny z aminového konce peptidů, a dipeptidasa, která štěpí dipeptidy na aminokyseliny. Optimální teplota jejich působení je 40–50 °C, optimální pH jsou velmi odlišná a závislá na pH prostředí. Při nízkých teplotách a sušení sladu se tyto enzymy inaktivují a nemají základní význam pro zvýšení hladiny aminodusíku v mladině. Karboxypeptidasami je nazýváno celkem pět enzymů, které odštěpují aminokyseliny z karboxylového konce proteinů. Jsou inhibovány diisopropylfosfátem (DFP). Mají různou substrátovou aktivitu a optimální pH mezi 4,8–5,6. Jsou nejvíce teplotně rezistentní ze všech proteolytických enzymů sladu. Optimální teplota působení je 40–50 °C a jsou inaktivovány při teplotách nad 70 °C. Jejich optimální pH je nejbližší hodnotě pH rmutů, proto je 80% uvolněných aminokyselin následně během rmutování zajištěno těmito enzymy (obr. 2).

Autoři John et al. (1975) sledovali vztah mezi Kolbachovým číslem, které udává poměr rozpustného dusíku ve sladině k celkovému obsahu dusíku ve sladu, a proteolytickou aktivitou a vývoj endopeptidas během sladování. Výsledky ukázaly, že slady s nízkým Kolbachovým číslem vykazují poměrně malou aktivitu endopeptidas, je-li Kolbachovo číslo na 38%, pak proteolytická aktivita silně stoupá. Při sledování vývoje aktivity endopeptidas autoři zjistili, že se jejich akti-

degradation, endopeptidases are synthesized due to rapid proteolytic activity. These enzymes are secreted into the endosperm where they degrade main storage proteins (prolamins and glutelins) to peptides and amino acids. Subsequently, peptides are further degraded to amino acids by exopeptidases during the third phase of proteolysis (Ross Guerin, 1993). During germination and malt kilning, the activity of proteases increases 5–6 times (Havlová, 1999) and it decreases during preparation of sweet wort (Jones et al., 1993). In the first phase of protein degradation, during germination, proteins are degraded in the scutellum and aleuron layer. Soluble peptides produced by proteases serve as a substrate for carboxypeptidases, which are degraded to amino acids. In a further phase, proteases contribute to the degradation of cell walls of starch granules in the endosperm and hydrolyze reserve proteins (hordeins and glutelins) occurring in the endosperm.

Endopeptidase activity is formed by at least five enzymes (Basařová et al., 2015). Two sulfhydryl enzymes form 90%, they are inhibited by p-chlormercuribenzoate and have optimal pH at 3.9–5.5. The remaining 10% are three enzymes with the activity depending on the metal ions (so-called metaloenzymes) with optimal pH 5.5–6.9 and 8.5. These enzymes are inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The optimal conditions of the endopeptidase activity are between 45–50 °C. The optimal pH and temperature depend on molecular weight of the cleaved compounds (Havlová, 1999). Cystein proteases releasing amino acids from hordeins and glutelins during germination were identified as the most important endoproteases in malt. As much as 90% of their activity remain in dried malt but only 1% of their possible activity is utilized during mashing due to their relatively high optimal pH values. (Basařová et al., 2015). Exopeptidases cleave simple amino acids from the external ends of protein molecules. Four neutral aminopeptidases with optimal pH 7.0–7.2 and one alkali leucine-aminopeptidase with optimal pH of 8.0–10 which cleave amino acids from the amino end of peptides, and dipeptidase which cleaves dipeptides to amino acids are present in malt. The optimal temperature of their activity is 40–50 °C, optimal pH values are very different and depend on the pH environment. At low temperatures and during malt drying, these enzymes inactivate and are of no principal significance for increasing the level of amino nitrogen in sweet wort. Carboxypeptidases comprise totally five enzymes that cleave amino acids from the carboxyl-terminal end of protein. They are inhibited by diisopropyl phosphate (DFP). They have differing substrate activity and optimal pH between 4.8–5.6. Of all proteolytic malt enzymes, carboxypeptidases are thermally the most resistant. The optimal temperature of their activity is 40–50 °C and they are inactivated at temperatures over 70 °C. Their optimal pH is close to that of mashes, therefore, 80% of the released amino acids are subsequently cleaved during mashing by these enzymes (Fig. 2).

The authors John et al., 1975 followed the relationship between Kolbach index which gives the rate between soluble nitrogen in sweet wort and the total nitrogen content in malt, and proteolytic ac-



Obr. 2 Působení proteolytických enzymů (Mótyán et al., 2013) / Fig. 2 Activity of proteolytic enzymes (Mótyán et al., 2013)

vita až do 3. dne klíčení podstatně nezvyšuje. Až na počátku třetího dne aktivita prudce narůstá a po 4. dnu zase klesá, potom následuje další nárůst aktivity až do 6. dne sladování. Autoři dospěli k závěru, že po 4. dnu klíčení se syntetizuje specifický inhibitor endopeptidas. Takové inhibitory popsali také Mikola a Suolinna (1969). Jedná se o protein, který tvoří s dotýcnými endopeptidasami reversibilní reakcí komplex inhibitorů enzymů (Mikola, 1983). V tomto komplexu je pak aktivita enzymu zcela nebo částečně inhibována.

#### 4 Vliv stupně rozluštění bílkovin na technologii výroby piva

Z hlediska technologie výroby piva je rozhodující stupeň hydrolyzy proteinů dosažený při sladování. Se stoupajícím obsahem bílkovin ve sladu stoupá koncentrace rozpustných dusíkatých látek v mladině a pivu. Obsah štěpných produktů v mladině je převážně závislý na kvalitě sladu. Koncentrace rozpustných dusíkatých látek ve sladu a v mladině je v poměru 1:2 (Havlová, 1999). Vliv stupně rozluštění bílkovin na jakost piva je mnohostranný. Nejsilnější se projevuje vliv na pěnívost piva. Obsah bílkovin v ječmeni nad 11% zvyšuje pěnívost, nižší než 9,5% pěnívost snižuje. Důležitý je podíl vysokomolekulárních štěpných produktů bílkovin a glykoproteinů s vysokou viskozitou, která podporuje pěnívost (Čížková et al., 2006). Stupeň rozluštění bílkovin má vliv také na chlebnatost a plnost chuti piva, dalekosáhlé rozluštění bílkovin je příčinou prázdné chuti piva (Havlová, 1999). Známé jsou i vlivy na chemicko-fyzikální stabilitu piva, neboť proteinové frakce se z přibližně 55% podílejí na vzniku chladového zákalu piva. Nedostatečné proteolytické rozluštění sladu ovlivňuje filtrovatelnost piva. Předpoklad proteolýzy a tedy optimální složení dusíkatých látek mladiny lze v praxi odhadnout z analýzy kongresní sladin, zahrnující stanovení volného aminodusíku podle hodnoty rozdílu extraktu v moučce a šrotu a z určení aktivity proteas.

tivity and development of endopeptidases during malting. The results showed that malts with low Kolbach index exhibited a relatively low endopeptidase activity while with Kolbach index 38% proteolytic activity strongly increased. While monitoring the development of the endopeptidase activity, the authors found out that their activity did not substantially increase till the third day of germination. At the beginning of the third day, the activity steeply increased and after the fourth day it again declined, then it again increased to the sixth malting day. The authors concluded that after the fourth day of germination a specific inhibitor of endopeptidases was synthesized. Such inhibitors were also described by Mikola and Suolinna (1969). It is a protein, which with relevant endopeptidases forms a complex of inhibitors of enzymes through a reversible reaction (Mikola, 1983). The activity of the enzyme in this complex is then completely or partially inhibited.

#### 4 THE EFFECT OF THE LEVEL OF PROTEIN MODIFICATION ON THE BREWING TECHNOLOGY

In terms of the brewing technology, the degree of protein hydrolysis achieved during malting is crucial. With increasing protein content in malt, concentration of soluble nitrogenous substances in sweet wort and beer increases. Content of degraded products in sweet wort prevalingly depends on malt quality. Concentration of soluble nitrogenous substances in malt and sweet wort is in rate 1:2 (Havlová, 1999). The effect of the degree of protein modification on beer quality is multiple. Beer foam is most strongly affected. Protein content in barley above 11% improves foam power, content below 9.5% reduces it. The rate of high-molecular protein degradation products and glycoproteins with high viscosity, which promotes foaming, is also important (Čížková et al., 2006). The degree of protein modification

## 5 METODY STANOVENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY

Nejrozšířenějšími postupy ke stanovení proteolytických enzymů se staly metody založené na přírůstku absorbance reakčního roztoku v ultrafialové oblasti světla (280 nm), způsobené tvorbou peptidů, které jsou rozpustné i v přítomnosti kyseliny trichloroctové (Kunitz, 1947). Modifikaci této metody pro viditelnou oblast umožnil přidavek fenolového činidla (Anson, 1939). Uvedené dnes už klasické metody jsou komplikované z hlediska technického provedení, různorodost použitých substrátů neumožňuje unifikaci metody a nejsou tedy vhodné k rutinní analýze (Havlová, 1999). Nízkomolekulární chromogenní a vysokomolekulární substráty proteas, vyvíjené a používané v 70. letech 20. století, jsou síťované proteiny, které obsahují kovalentně navázaná reaktivní barviva. Jde např. o 4-nitroanilidy aminokyselin a peptidů (Rick, 1974; Kasafírek et al., 1989). Tyto substráty jsou specifické, což má výhodu při stanovení aktivity jedné proteasy ve směsi proteolytických enzymů, jejich nevýhodou je však špatná manipulovatelnost, složitá příprava, tvorba nestabilního prchavého produktu a interference zbarvených složek prostředí s chromoforem produktu (Havlová, 1999). Tyto nevýhody nemají substráty chromolytického typu připravené z proteinů (albumin hovězího séra, ovoalbumin, kasein, denaturovaný kolagen apod.), síťované v místech některých primárních amino-nebo thiolových skupin elektrofilními bifunkčními činidly, na které je navázáno reaktivní barvivo, např. Remazol Brilliant Blue R (Fukal et al., 1983; Káš et al., 1983).

Dalšími vhodnými substráty pro stanovení proteolytické aktivity mohou být například azocasein (Bell, 2012), gelatin a azogelatin (Jones et al., 1998), kasein, hemoglobin, hordeiny a gluteliny (Osman et al., 2002; Osman, 2003).

Ke studiu aktivity proteolytických enzymů a jejich inhibitorů během sladování je možno použít i elektroforetických metod (Wrobel and Jones, 1992 a; b; Osman et al., 2002).

## 6 ZÁVĚR

Dusíkaté látky jsou obsaženy v zrně ječmene ve formě rozdílné rozpustných frakcí albuminů, globulinů, hordeinů, glutelinů a jejich štěpů. Nebílkovinné dusíkaté složky představované dusíkatými báze, fosfatidy a amidy tvoří jen malý podíl a jsou přítomné převážně v klíčku. Z technologického hlediska dalšího zpracování jsou důležitými složkami ječmene enzymy, přítomné jak v latentní, tak v aktivní formě. Dusíkaté látky mají v zrně různý význam a během klíčení provádějí značné změny. Dochází k výraznému štěpení rezervních proteinů v endospermu vlivem působení zvyšující se aktivity proteolytických enzymů a do rozpustné formy přecházejí i neproteinové dusíkaté látky. Během hydrolyzy jsou zásobní bílkoviny přeměněny na peptidy, popřípadě až na aminokyseliny. Proteolytická aktivita je velice významným faktorem. Při výrobě sladu je tak uvolňováno do kapaliny značné množství aminokyselin, které mohou dále sloužit jako výživa pro kvasinky, pro tvorbu biomasy, nebo mohou tvořit základ pro aroma finálního výrobku. V posledních letech také vychází najevo, že to jsou právě rezidua bílkovin, která zapříčiňují tvorbu a stabilitu pěny a zákalu piva.

## PODĚKOVÁNÍ

Tato publikace vznikla ve Výzkumném ústavu pivovarském a sádkářském, a.s. v rámci projektu „TACR TE0200017 – Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

also affects bread flavor and palatibility, extensive modification of proteins is a cause of empty beer taste (Havlová, 1999). The effects on chemical and physical beer stability are also known as protein fractions contribute approximately from 55% to chill haze in beer. Insufficient proteolytic malt modification affects beer filterability. Thus, the optimal composition of nitrogenous substances in sweet wort can be in practice predicted from the analysis of congress wort including the determination of free amino nitrogen based on the value of the difference of extract in fine flour and grist and from protease activity assay.

## 5 METHODS FOR THE DETERMINATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY

The most widely methods used for the determination of proteolytic enzymes became the assays based on the increase in absorbance of the reaction solution in the ultraviolet light area (280 nm), due to the formation of peptides which are soluble in the presence of trichloroacetic acid (Kunitz, 1947). Modification of this method for the visible region was allowed by the addition of phenol reagent (Anson, 1939). These classic methods are complicated in terms of their technical performance, different substrates prevent unification of the method and thus they are not suitable for routine analyses (Havlová, 1999). Low molecular weight and high molecular chromogenic substrates of proteases which were developed and used in the 1970s, are cross-linked proteins, which contain covalently linked reactive dyes, such as for example 4-nitroanilids of amino acids and peptides (Rick, 1974; Kasafírek et al., 1989). These substrates are specific, which is advantageous for the determination of activity of one protease in the mixture of proteolytic enzymes, however, the disadvantage is difficult handleability, complex preparation, formation of an unstable volatile product and interference of colored environment components with product chromophore (Havlová, 1999). This disadvantage was not recorded in chromolytic substrates prepared from proteins (bovine serum albumin, ovoalbumin, casein, denaturated collagen etc.) cross-linked at the sites of some primary or thiol groups by electrophilic bifunctional agents with a reactive dye such as Remazol Brilliant Blue R (Fukal et al., 1983; Káš et al., 1983).

Other suitable substrates for the determination of the proteolytic activity include for example azocasein (Bell, 2012), gelatin, and azogelatin (Jones et al., 1998), casein, hemoglobin, hordeins and glutelins (Osman et al., 2002; Osman, 2003).

Electrophoretic methods can also be used for study of the activity of proteolytic enzymes and their inhibitors during malting (Wrobel and Jones, 1992 a; b; Osman et al., 2002).

## 6 CONCLUSION

Nitrogenous substances are contained in barley grain in a form of differently soluble fractions of albumins, globulins, hordeins, glutelins and their fractions. Non-protein nitrogenous components, represented by nitrogenous bases, phosphatides and amides, form only a small portion occurring mainly in the germ. From the technological point of view of further processing, enzymes which are present both in the latent and active forms, are important barley components. Nitrogenous substances in grain play various roles and undergo considerable changes during germination. Storage proteins in the endosperm are cleaved by an increased activity of proteolytic enzymes, non-protein nitrogenous substances are also dissolved. During hydrolysis, storage proteins are converted to peptides or amino acids. The proteolytic activity is a very important factor. During malt production, a considerable amount of amino acids is released to liquid serving subsequently as nutrition for yeasts or forming biomass or basis for aroma of the final product. It has been also shown recently that protein residues can cause foam formation and stability and beer haze.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the project TE02000177 – Center for the Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products.

**LITERATURA / REFERENCES**

- Anson, M. L., 1938: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79–89.
- Basařová, G., Psota, V., Šavel, J., Basař, P., Paulů, R., Kosař, K., Dostálék, P., Basařová, P., Kellner, V., Mikulíková, R., Čejka, P., 2015: Sladařství – teorie a praxe výroby sladu. Havlíček Brain Team, Praha, 626 s. ISBN 978-80-87109-47-2
- Bell, A., 2012: Analysis of the Barley Grain Protease Spectrum. Ph. D. Thesis, Heriot – Watt University, Edinburgh.
- Čížková, H., Dostálék, P., Fiala, J., Kolouchová, I., 2006: Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva. *Chem. Listy* 100: 478–485.
- Fukal, L., Rauch, P., Káš, J., 1983: Very sensitive method for assaying proteolytic activities in beer. *J. Inst. Brew.*, 89: 257–259.
- Havlová, P., 1999: Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. VÚPS, Brno.
- Jones, B. L., Fontanini, D., Jarvinen, M., Pekkarinen, A., 1998: Simplified Endoprotease Assays Using Gelatin or Azogelatin, *Analytical Biochemistry*, 263: 214–220.
- Jones, B. L., Wrobel, R., Marinac, L., Yhang, N., 1993: Electrophoretic separation and characterization of barley and green malt endoproteases, *Proc. EBC 24<sup>th</sup> Congress, Oslo 1993*. ISBN 0-19-963466-1.
- Kasářík, E., Heinová D., Bartík, M., Roubalová, A., 1989: Chromogenní substráty pro proteolytické enzymy štěpící v kyselé oblasti pH. Číslo patentu: 262120.
- Káš, J., Rauch, P., 1983: Labeled Proteins, Their Preparation and Application. In: *Preparative Organic Chemistry*, Springer, Berlin – Heidelberg, pp. 163–230. ISBN 978-3-540-12396-5
- Kosař, K., Procházka, S., 2000: Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha. ISBN 80-902658-6-3
- Kunitz, M., 1947: Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291.
- Mikola, J., Suolinna, E. M., 1969: Purification and properties of a trypsin inhibitor from barley. *Eur. J. Biochem.*, 9: 655–660.
- Mótyán, J. A., Tóth, F., Tözsér, J., 2013: Research Application of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology, *Biomolecules*, 3: 923–942.
- Narziss, L., 1985: Die Bierbrauerei, 6. Aufl., Vol. 1: Technologie der Wurzbereitung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, p. 383. ISBN: 3-432-85006-9
- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., de Jersey, J., Inkerman, P. A., 2002: Characterisation and Assessment of the role of Barley Malt Endoproteases During Malting and Mashing. *J. Inst. Brew.*, 108: 62–67.
- Osman, M. A., 2003: Barley and Malt Proteins and Proteinases: The Purification and Characterisation of Five Malt Endoproteases, Using the High Degradable Barley Protein Fraction (HDBPF) Substrate. *J. Inst. Brew.*, 109: 142–149.
- Rick, W.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 1974, Acad. Press, New York, p. 1011
- Ross Guerin, J., 1993: Endopeptidases in Barley Seed and their action during germination. Ph. D. Thesis, Adelaide, Australia.
- Vodrážka, Z., Rauch, P., Káš, J., 1991: *Enzymologie*, 2. Vydání, VŠCHT Praha. ISBN 80-7080-330-4, 80-7080-124-7
- Wrobel, R., Jones, B. L., 1992a: Appearance of Endoproteolytic Enzymes during the Germination of Barley. *Plant Physiol.*, 100: 1508–1516.
- Wrobel, R., Jones, B. L., 1992b: Electrophoretic Study of Substrate and pH Dependence of Endoproteolytic Enzymes in Green Malt. *J. Inst. Brew.* 98, 471–478.

*Do redakce došlo / Manuscript received: 30/10/2016  
Přijato k publikování / Accepted for publication: 02/12/2016*



## V4 workshop – Heritage of traditional beverages quality Prague, November, 2016

Ve dnech 9.–10. listopadu 2016 uspořádal VÚPS, a.s., jako součást grantového programu Mezinárodního Visegrádského fondu mezinárodní seminář "Heritage of traditional beverages quality".

### Program semináře

#### November 9, 2016

- 9:00 Welcome by Research Institute of Brewing and Malting
- 9:10 Influence of breweries demands on production of malting barley (Zajączkowski Tomasz, Malteurop Polska, Poland)
- 9:30 Malt production and barley types (Fogarasi Attila Levente, Boortmalt, Hungary)
- 10:10 Brewing in the Czech Republic (Dostálék Pavel, University of Chemical Technology Prague, Czech Republic)
- 10:30 Beer production and consumption in Slovakia (Šmogrovičová Daniela, Čaplová Júlia, Slovak University of Technology in Bratislava, Slovakia)
- 10:50 Beer consumption in Hungary (Kun-Farkas Gabriella, Szent István University, Hungary)
- 11:10 The Polish brewing scene (Kordialik-Bogacka Edyta, Lodz University of Technology, Poland)
- 11:30 Extraordinary innovation for Czech beer market (Košin Petr, Šavel Jan, Brož Adam, Budějovický Budvar, Czech Republic)
- 13:00 Gluten-free beers (Kiss Zsuzsanna, Szent István University, Hungary)
- 13:20 Inspirational brewing: Ideas and impulses for biotechnological application (Mikeš Jiří, Špaček Pavel, Laish Avi Ben, TERAMED, s.r.o., CHEMCOMEX Praha, a.s., ABIRT, Czech Republic, Israel)
- 13:40 Use of non-Saccharomyces yeast for beer production (Kochláňová Tatiana, Kopecká Jana, Matoulková Dagmar, Masaryk University Brno, Research Institute of Brewing and Malting, Czech Republic)
- 14:00 The influence of PET bottle composition and storage conditions on beer ageing (Šmogrovičová Daniela, Bachár Dušan, Kováčiková Dana, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Hurbanovo Brewery, Heineken Slovensko, a.s., Slovakia)

- 14:20 Practical ways how to suppress primary gushing (Poštulková Michaela, Brányik Tomáš, Růžička Marek, Fiala Jaromír, University of Chemical Technology Prague, Institute of Chemical Process Fundamentals of the Czech Academy of Sciences, Research Institute of Brewing and Malting, Czech Republic)
- 14:40 LC-HRMS. A tool for sensomic mapping of beer and its raw material (Olšovská Jana, Dušek Martin, Research Institute of Brewing and Malting, Czech Republic)
- 14:50 Viticulture and enology for maintaining and restoring cultural identity wine regions in Moravia (Sochor Jiří, Fiala Jaromír, Markel Martin, Baroň Mojmir, Matoulková Dagmar, Olšovská Jana, Kubizniaková Petra, Mikeš Jiří, Mendel university in Brno, Research Institute of Brewing and Malting, Masaryk University Brno, TERAMED, s.r.o. Czech Republic)
- 15:30 Hops production in the Czech Republic (Pokorný Jaroslav, Patzak Josef, Hop Research Institute, Co.Ltd. Zatec, Czech Republic)
- 15:50 Czech Beer in the Context of Changing Consumption Patterns in Europe Vinopal Jiří (Institute of Sociology of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic)
- 16:20 V4 project results (Fiala Jaromír, Balaščík Milan, Kordialik-Bogacka Edyta, Kun-Farkas Gabriella, Šmogrovičová Daniela, Research Institute of Brewing and Malting Czech University of Life Sciences Prague, Lodz University of Technology, Szent István University, Slovak University of Technology in Bratislava, V4 - Czech Republic, Poland, Slovakia, Hungary)

#### November 10, 2016

- 9:00 Technical visit - Research Institute of Brewing and Malting (Analytical Testing Laboratory – Olšovská Jana, Technological Department – Slabý Martin. Department of Microbiology – Matoulková Dagmar)

Více informací na: [http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=311&Itemid=214&lang=cs](http://www.beerresearch.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=311&Itemid=214&lang=cs)

Souhrny přednášek budou zveřejněny v čísle 2/2017 Kvasného průmyslu.