

DOI: 10.18832/kp201838

Determination of proteolytic enzyme activity during malting

Stanovení aktivity proteolytických enzymů během výroby sladu

Karolína BENEŠOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ, Zdeněk SVOBODA

Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute Brno, 7 Mostecká, 614 00 Brno, Czech Republic
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno
e-mail: benesova@beerresearch.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2018: Determination of proteolytic enzyme activity during malting. Kvasny Prum. 64(6): 318–322

Proteolytic enzymes (proteases) are widely represented in living organisms where they catalyze the hydrolysis of peptide bonds in proteins and peptides. In malting barley, they are found in small quantities, and their activation takes place only in the process of controlled germination – malt production. In germinating barley, proteases hydrolyze storage proteins to high molecular and low molecular weight degradation products while simultaneously synthesizing other proteins. The final grain modification affects significantly quality of the produced malts and subsequently also technology and characters of the produced beer.

Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2018: Stanovení aktivity proteolytických enzymů během výroby sladu. Kvasny Prum. 64(6): 318–322

Proteolytické enzymy (proteasy) jsou široce zastoupeny v živých organismech, kde katalyzují hydrolyzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. Ve sladovnickém ječmeni se nacházejí v malém množství, k jejich aktivaci dochází až při procesu řízeného klíčení – výrobě sladu. V klíčícím ječmeni proteasy hydrolyzují zásobní proteiny na vysokomolekulární a nízkomolekulární štěpné produkty za současné syntézy dalších proteinů. Výsledné rozluštění zrna velmi ovlivňuje kvalitu vyrobených sladů a následně i technologii a vlastnosti vyrobeného piva.

Keywords: Proteolytic enzymes, malting, modification of grain, chromogenic substrate, azocasein**Klíčová slova:** Proteolytické enzymy, sladování, rozluštění zrna, chromogenní substrát, azocasein

1 INTRODUCTION

Germination of barley is an important technological step in the production of malt. A number of chemical, biochemical, physiological and physical changes are held in barley grain. These changes are connected with the growth and structural changes which depend on the degradation of high-molecular substances leading to the modification of grain. These transformations are conditioned by the activation and synthesis of a wide range of enzymes. Grain modification, both cytolytic (release of non-starch polysaccharides from protein bonds and cleavage to low-molecular products) and proteolytic (protein cleavage) is an important criterion of the produced malt quality and consequently also quality and specific properties of individual beers (Basařová et al., 2015). The degradation of storage proteins during germination of barley and subsequently malt is ensured by a large complex of proteolytic enzymes (Basařová et al., 2015; Benešová et al., 2017) and both low molecular and high molecular fission products are produced (Prokeš, 2000).

Proteolytic enzymes (proteases) are divided into two basic groups according to the cleavage site in the protein molecule: to endopeptidases and exopeptidases (Havlová, 1999). Exopeptidases are characterized by cleaving the peptide chain from the end, always cleaving off the terminal amino acid. They act mainly on oligopeptides and polypeptides. Depending on their specificity, they can be divided into carboxypeptidases, which attack the carboxyl terminus of the peptide chain, and aminopeptidases, which act from the N-terminus of the peptides (Moštek, 1975). Exopeptidases occur in barley grains mainly at the sites of growth of new grain parts, i.e. in the germ and later in the rootlets and the acrospire where the nitrogenous substances from the endosperm are diffused. They are active mainly during germination of barley; kilning and mashing damage them (Moštek, 1975). Endopeptidases cleave the proteins at the certain sites in the middle of the chain and do not attack the ends of the chain. Therefore, they mainly act on proteins and higher polypeptides. Unlike most other enzymes, proteases are not specific to a particular substrate (protein) but they are specific to certain structural features of the peptide chain. Therefore, within the peptide chain, cleavage occurs only at some sites, i.e., before or after certain amino acid residues. For example, the digestive enzyme trypsin cleaves the peptide bond at the sites where the amino acids arginine and lysine are bound via the carboxyl group unless followed by proline. The endopeptidases present in barley malt are similar to those found in plant enzyme papai.

1 ÚVOD

Klíčení ječmene je důležitý technologický krok ve výrobě sladu. Probíhá při něm řada chemických, biochemických, fyziologických a fyzikálních změn ječného zrna. S těmito změnami souvisejí růstové projevy a strukturální změny závislé na degradaci vysokomolekulárních látek vedoucí k rozluštění zrna. Tyto přeměny jsou podmíněné aktivací a syntézou široké škály enzymů. Rozluštění zrna, a to jak cytolytické (uvolňování neškrobových polysacharidů z vazeb s proteiny a štěpení na nízkomolekulární produkty), tak proteolytické (štěpení bílkovin), je významným kritériem v kvalitě vyráběných sladů a následně i v kvalitě a specifických vlastnostech jednotlivých druhů piv (Basařová et al., 2015). Degradaci zásobních proteinů během klíčení ječmene a následně i sladu zajišťuje velký komplex proteolytických enzymů (Basařová et al., 2015; Benešová et al., 2017). Jejich působením vznikají nízkomolekulární i vysokomolekulární štěpné produkty (Prokeš, 2000).

Proteolytické enzymy (proteasy) se dělí na dvě základní skupiny podle místa štěpení v molekule proteinu na endopeptidasy a exopeptidasy (Havlová, 1999). Exopeptidasy jsou charakteristické tím, že štěpí peptidický řetězec od konce, odštěpují vždy koncovou aminokyselinu. Působí hlavně na oligopeptidy a polypeptidy. Podle specifčnosti je lze rozdělit na karboxypeptidasy, které napadají karboxylový konec peptidového řetězce, a aminopeptidasy, které působí od N-konce peptidů (Moštek, 1975). Exopeptidasy se vyskytují v ječném zrně hlavně v místech růstu nových částí zrna, tj. v klíčku a později v koříncích a střílce, kam difundují dusíkaté látky z endospermu. Působí zejména při klíčení ječmene, hvozdním a rmutováním se poškozuji (Moštek, 1975). Endopeptidasy štěpí bílkoviny na určitých místech uprostřed řetězce, konce řetězců nenapadají. Účinkují proto převážně na bílkoviny a vyšší polypeptidy. Na rozdíl od většiny ostatních enzymů nejsou proteasy specifické vůči určitému substrátu (bílkovině), ale jsou specifické vůči určitým strukturálním znakům peptidového řetězce. Uvnitř peptidového řetězce proto dochází ke štěpení jen na určitých místech, tedy před nebo za určitými aminokyselinovými zbytky. Např. trávicí enzym trypsin štěpí peptidovou vazbu v místech, kde jsou přes karboxylovou skupinu vázány aminokyseliny arginin a lysin, pokud nenásleduje prolin. Endopeptidasy přítomné v ječném sladu jsou svými vlastnostmi podobné enzymu papainu vyskytujícímu se v rostlinách.

Endopeptidasy jsou důležitými enzymy z technologického hlediska výroby sladu a piva. Při klíčení je asi 35–40% bílkovin převedeno do rozpustné formy, přitom vznikají činnosti peptidas především nízkomolekulární sloučeniny, jako jsou oligopeptidy a aminokyseliny.

Endopeptidases are important enzymes from the technological point of view of malt and beer production. At germination, about 35–40% of the proteins are converted into a soluble form, primarily low molecular compounds, such as oligopeptides and amino acids, are produced by peptidase activity. The degradation of high-molecular proteins takes place in parallel with the synthesis of new proteins. Part of the degradation protein products are used to form rootlets in germinating barley. Low-molecular products are essential for yeast nutrition. High-molecular degradation products favorably affect the foaming power and the palatibility of beer, and they adversely affect turbidity. Insufficient hydrolysis of storage proteins causes problems with beer filterability, while excessive protein degradation is the cause of the development of undesirable flavors and beer color. The degree of protein degradation also affects the color of malt and wort (Havlová, 1999; Kosář et al., 2000).

An important criterion of malt associated with the rate of proteolytic degradation is Kolbach index expressing the ratio of soluble nitrogenous substances in the wort to their total malt content. The value of this figure is typically between 35 and 45% (Basařová et al., 2015). Malts with higher Kolbach index exhibit a higher enzymatic activity (Gomez-Guerrero, 2009; Jin et al., 2013; Havlová, 1999).

During the germination process, proteins are initially digested by endoproteases and subsequently by exopeptidases. Processes associated with the formation of soluble proteins during malting and mashing are still not fully understood, cysteine proteases probably play the most important role. The influence of other classes of endoproteases (metalloproteases, aspartate proteases, serine proteases) is summarized in the review. (Jones, 2005).

The individual enzymes differ markedly from each other by their origin, localization, physical and chemical properties, specificity, mechanism of action, physiological properties and possibilities of their practical use (Havlová, 1999). The optimum temperature and pH for their activity vary between enzymes and their mixtures. The determination of the protease activity is therefore complicated. Besides azocasein, substrates such as gelatin and azo-gelatin (Jones et al., 1998), casein, hemoglobin, hordein, and glutelin can be used (Osman et al., 2002; Osman, 2003).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals used

Sodium acetate trihydrate (Sigma-Aldrich, USA), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), DTT (1,4-Dithio-DL-threitol), acetic acid (glacial) (Sigma-Aldrich, USA), trypsin protease (Sigma-Aldrich, USA), azocasein protease substrate (Sigma-Aldrich, USA), trichloroacetic acid pa, (Lach-ner), sodium hydroxide pa (Lach-ner), deionized water.

2.2 Selection of samples

Samples were obtained from a floor malting plant and were sampled in a real process of malting. The set included samples of barley, steeped barley, barley during germination, green malt, dry kilned malt, and finished malt after degermination. The usual length of barley steeping is three days: the length of steeping is 5 hours, the air break is 17 hours. The temperature of the steeping water is 12 °C and the air temperature 18 °C. At the end of steeping, the degree of steeping is 45%. Germination takes place on the malting floors for 4–5 days, usually at 18 °C. Turning malt is carried out with a maltomobile. At the end of germination, the degree of steeping is approximately 44%. The total kilning time is 36 hours. Regulation of the temperature between kilning floors is carried out by opening cold draughts. The maximal temperature between the kilning floors at the end of kilning achieves 55 °C. After dumping on the bottom floor, getting to the heating temperature takes 5 hours, getting to the kilning temperature takes another 8 hours and kilning at 85 °C lasts for 3 hours.

The samples are described in detail in *Table 1*.

2.3 Sample preparation

Enzymes were extracted from the samples by a modified method according to Osman et al., (2002) and Bell (2012). 10 g of barley, intermediaries or malt samples were weighed and added into 30 ml of subcooled extraction solution (50 mM sodium acetate, pH 5.0 containing 0.1% Triton X) and homogenized with a laboratory homogenizer (Ika, 10,000 rpm). The samples were extracted for 1 hour, then centrifuged (5000 rpm, 10 min), the extract was filtered and used for spectrophotometric assay. At the same time, the water content was gravimetrically determined in the samples (EBC, 1998; Čulík et al., 2008) and Kolbach index (EBC 2010, 4.9.3).

Odbourávání vysokomolekulárních bílkovin probíhá paralelně se syntézou nových proteinů. Část štěpných produktů bílkovin je použita k tvorbě kořinek v klíčovém ječmeni. Nízkomolekulární produkty jsou nezbytné pro výživu kvasinek. Vysokomolekulární štěpné produkty příznivě ovlivňují pěnivost a plnost piva, nepříznivě se projeví při tvorbě zákalu. Nedostatečná hydrolyza zásobních proteinů způsobí problémy s filtrovatelností piva, naopak nadměrné rozluštění bílkovin je příčinou vývoje nežádoucích příchutí a barvy piva. Stupeň rozluštění bílkovin má vliv také na barvu sladu a sladiny (Havlová, 1999; Kosář et al., 2000).

Důležitým kritériem sladu souvisejícím s mírou proteolytického rozluštění je hodnota Kolbachova čísla vyjadřujícího poměr rozpustných dusíkatých látek ve sladince k jejich celkovému obsahu ve sladu. Hodnota tohoto čísla se ve světlých sladech běžně pohybuje mezi 35 a 45% (Basařová et al., 2015). Slady s vyšším Kolbachovým číslem vykazují vyšší enzymatickou aktivitu (Gomez-Guerrero, 2009; Jin et al., 2013; Havlová, 1999).

Při klíčení ječmene jsou proteiny zpočátku štěpeny endoproteasami a následně exopeptidasami. Procesy spojené s tvorbou rozpustných proteinů během sladování a rmutování stále nejsou detailně pochopeny, avšak nejdůležitější roli hrají pravděpodobně cysteinové proteasy. Vliv dalších tříd endoproteas (metalloproteasy, aspartátové proteasy, serinové proteasy) přehledně shrnuje review (Jones, 2005).

Jednotlivé enzymy se vzájemně velmi liší původem, lokalizací, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, specifičností, mechanismem působení, fyziologickými vlastnostmi i možnostmi jejich praktického využití (Havlová, 1999). Optimální teplota a pH pro jejich činnost jsou různé jak pro jednotlivé enzymy, tak jejich směsi. Stanovení aktivity proteas je proto komplikované. Jako substráty lze použít kromě azocaseinu např. gelatinu a azogelatinu (Jones et al., 1998), kasein, hemoglobin, hordein a glutelin (Osman et al., 2002; Osman, 2003).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Použité chemikálie

Octan sodný trihydrát (Sigma-Aldrich, USA), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), DTT (1,4-Dithio-DL-threitol), kyselina octová (ledová) (Sigma-Aldrich, USA), enzym trypsin proteasa (Sigma-Aldrich, USA), substrát azocasein proteasa (Sigma-Aldrich, USA), kyselina trichloroctová p. a., (Lach-ner), hydroxid sodný p. a. (Lach-ner), deionizovaná voda.

2.2 Výběr vzorků

Vzorky pocházely z malé humnové sladovny a byly odebírány podle plánu v reálném průběhu sladování. Šlo o vzorky ječmene, namočeného ječmene, ječmene v průběhu klíčení, zeleného sladu, odvodněného sladu a hotového sladu po odklíčení. Obvyklá délka máčení ječmene je tři dny, přičemž délka namáčky je 5 hod., délka vzdušné přestávky pak 17 h. Teplota máčecí vody je 12 °C a teplota vzduchu 18 °C. Na konci namáčky se dosahuje stupně domočení 45%. Klíčení probíhá na humnech 4–5 dnů, obvykle při 18 °C. Obracení sladu se provádí maltomobilem. Na konci klíčení je stupeň domočení přibližně 44%. Celkový čas hvozdnění je 36 hodin. Regulace teploty mezi lískami se provádí oteviráním studených tahů. Maximální teplota mezi lískami v závěru hvozdnění dosahuje 55 °C. Po sklopení na spodní lísku trvá náběh na teplotu vyhřívání 5 hodin, náběh na doťahovací teplotu dalších 8 hodin a dotahování při teplotě 85 °C trvá 3 hodiny.

Vzorky jsou podrobně popsány v *tab. 1*.

2.3 Příprava vzorků

K extrakci enzymů ze vzorků byla použita modifikovaná metoda podle Osman et al. (2002) a Bell (2012). 10 g vzorku ječmene, mezi-produktů nebo sladu bylo odváženo a zalito 30 ml podchlazeného extrakčního roztoku (50 mM octan sodný, pH 5,0, který obsahoval 0,1% Triton X) a zhomogenizováno pomocí laboratorního homogenizátoru (Ika, 10 000 min⁻¹). Vzorky byly extrahovány 1 hodinu, poté byly odstředěny (5000 min⁻¹, 10 minut), extrakt byl přefiltrován a použit ke spektrofotometrickému stanovení. Současně byl ve vzorcích vázkově stanoven obsah vody gravimetricky (EBC, 1998; Čulík et al., 2008) a Kolbachovo číslo (EBC 2010, 4.9.3).

2.4 Stanovení aktivity proteolytických enzymů

Metoda je založena na principu použití chromogenního substrátu azocaseinu, což je protein kasein derivatizovaný azobarvivem sulfanilamidem. Proteolytické štěpení substrátu uvolňuje volné azobarvivo do okolního roztoku. Změna barvy reakčního roztoku je měřena

Table 1 Samples of barley, intermediaries of malt and malt production during malting

Tab. 1 Vzorky ječmene, meziproductů výroby sladu a sladu v průběhu sladování

Order of the sample Pořadí vzorku	Description Označení	Identification Identifikace
1	A	barley steeping tank <i>ječmen_náduvník</i>
2	B1	barley 1 st day of steeping <i>ječmen_I. den máčení</i>
3	B2	barley 2 nd day of steeping <i>ječmen_II. den máčení</i>
4	C1	barley 3 rd of steeping (1 st day of germination) <i>ječmen_III. den máčení (I. den klíčení)</i>
5	C2	2 nd day of germination <i>II. den klíčení</i>
6	C3	3 rd day of germination <i>III. den klíčení</i>
7	D1	4 th day of germination (green malt) – wet <i>IV. den klíčení (zelený slad) – mokrý</i>
8	D2	green malt – prekilned <i>zelený slad – předsoušený</i>
9	D3	green malt – bottom kiln floor <i>zelený slad – spodní líska</i>
11	E	Malt <i>Slad</i>
12	F	malt culms <i>sladový květ</i>

2.4 Determination of activity of proteolytic enzymes

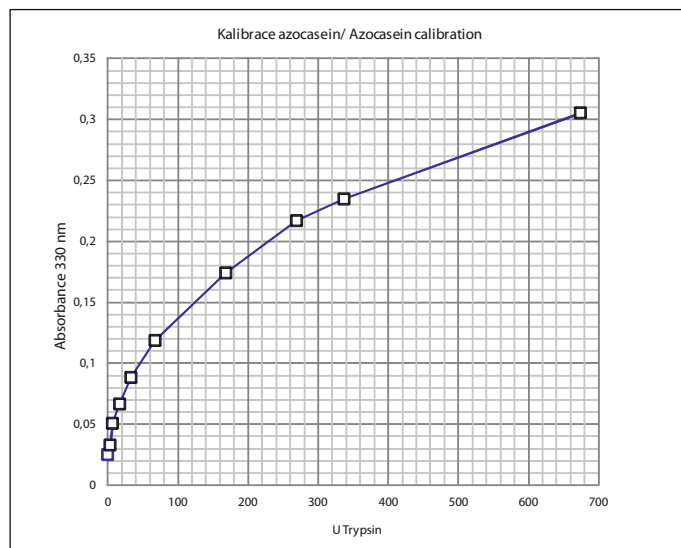
The method is based on the use of a chromogenic substrate of azocasein – casein protein derivatized with azo-dye with sulfanilamide. The proteolytic cleavage of the substrate releases the free azo dye to the surrounding solution. The color change of the reaction solution is measured photometrically and is proportional to the activity of the enzyme acting. The activity of proteolytic enzymes was determined spectrophotometrically. 100 µl of sample extract, 395 µl of reaction buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0), 5 µl of DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, 1 mM) solution and 500 µl of a azocasein solution (1% w/v) were pipetted into a 2 ml plastic tube. Control assay (blank) consisted of 495 µl of reaction buffer, 5 µl of DTT solution and 500 µl of azocasein solution. The solutions were vortexed and incubated in a water bath at 36 °C for 1 hour. The reaction was ended by addition of 700 µl of trichloroacetic acid solution (15% w/v), the solutions were remixed and frozen for 15 minutes to precipitate the unreacted azocasein completely, after that centrifuged on a microcentrifuge for 5 minutes (13,000 rpm) and 1 ml of the supernatant was collected into 1 cm thick quartz cells. The absorbance at 330 nm was measured spectrophotometrically and the activity was subtracted from the calibration curve developed according to section 2.5. The results were recalculated to the dry matter content.

2.5 Preparation of the calibration curve

The calibration dependence was constructed using trypsin protease (Bell, 2012). A trypsin solution of a defined activity (U/mg of dry matter, ca 0.5 mg/ml in reaction buffer) was prepared and a calibration dependency within 10–1000 U of trypsin in the reaction buffer was prepared by successive diluting. The activity of the enzyme was determined according to the procedure described in paragraph 2.4. The calibration curve is constructed as a dependence of absorbance on the trypsin activity (Fig. 1).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Over the period 2014–2018, totally 132 samples of barley, malt production intermediaries and finished malt were analysed. The results of the protease activity were recalculated to the dry matter content. In 2014 one trial sampling was carried out, in 2015–2017 there were always three samplings and in 2018 one sample was collected.

Fig. 1 Calibration dependence of trypsin
Obr. 1 Kalibrační závislost trypsinu

fotometricky a je úměrná aktivitě působícího enzymu. Aktivita proteolytických enzymů byla stanovena spektrofotometricky. Do 2 ml plastové zkumavky bylo napipetováno 100 µl extraktu vzorku, 395 µl reakčního pufru (100 mM octan sodný, pH 5,0), 5 µl roztoku DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, 1 mM) a 500 µl roztoku azokaseinu (1% w/v). Kontrolní stanovení (blank) – sestávalo z 495 µl reakčního pufru, 5 µl roztoku DTT a 500 µl roztoku azokaseinu. Roztoky byly řádně promíchány (vortex) a inkubovány ve vodní lázni při teplotě 36 °C 1 hodinu. Reakce byla zastavena přidáním 700 µl roztoku kyseliny trichloroaceticové (15% w/v), roztoky byly znovu promíchány a po dobu 15 minut zmrazeny, aby došlo k úplnému vysrážení nezreagovaného azokaseinu. Poté byly odstředěny na stolní mikrocentrifuze 5 minut (13 000 min⁻¹) a 1 ml supernatantu bylo odebráno do křemenných kyvet o tloušťce 1 cm. Spektrofotometricky byla měřena absorbance při 330 nm a aktivita byla odečtena z kalibrační závislosti sestavené dle bodu 2.5. Výsledky byly přepočítány na obsah sušiny.

2.5 Příprava kalibrační křivky

Kalibrační závislost byla sestavena s použitím enzymu trypsinu proteasy (Bell, 2012). Byl připraven roztok trypsinu o definované aktivitě (U/mg sušiny, cca 0,5 mg/ml v reakčním pufru) a z něj byla postupným ředěním připravena kalibrační závislost v rozmezí 10 – 1000 U trypsinu v reakčním pufru. Aktivita enzymu byla stanovena postupem uvedeným v odstavci 2.4. Kalibrační křivka je konstruována jako závislost absorbance na aktivitě trypsinu (obr. 1).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkem bylo v letech 2014–2018 analyzováno 132 vzorků ječmene, meziproductů při výrobě sladu a hotového sladu. Výsledky aktivity proteas byly přepočítány na obsah sušiny. V roce 2014 byl proveden 1 zkušební odběr, v letech 2015–2017 vždy tři odběry a v roce 2018 1 odběr. Kombinovaná standardní nejistota metody byla stanovena z 10 opakovaných měření aktivity proteolytických enzymů ve vzorku sladu a byla 18%.

Průměrné hodnoty aktivity proteolytických enzymů v ječmeni se pohybovaly od 197 mU/g sušiny do 718 mU/g sušiny, což je srovnatelné s výsledky Gomez-Guerrero, 2009 a Bell, 2012. V hotovém odhvozděném sladu se průměrné hodnoty pohybovaly v rozmezí 2501 až 3165 mU/g sušiny. Získané výsledky potvrzují závěry dalších autorů, že aktivita proteolytických enzymů v průběhu sladování prudce vzrůstá, třikrát až pětkrát (Havlová, 1999; Jones et al., 2000; Gomez-Guerrero, 2009; Bell, 2012). Během fáze máčení ječmene se aktivita výrazněji nezvyšuje a k výraznému zvýšení dochází až během klíčení (obr. 2).

Podle některých autorů dochází po počátečním nárůstu ve 4. dni klíčení k úbytku aktivity endopeptidas a potom následuje další nárůst až do šestého dne. To je způsobeno syntézou specifických inhibitorů endopeptidas. Tento protein tvoří s endopeptidasami komplex, ve kterém je jejich aktivita úplně nebo částečně inhibována (Mikola a Suolinna, 1969; Havlová 1999). Nárůst aktivity proteas se snižuje až během hvozdění (teplota 55 °C, tab. 1), a dále se již jejich aktivita

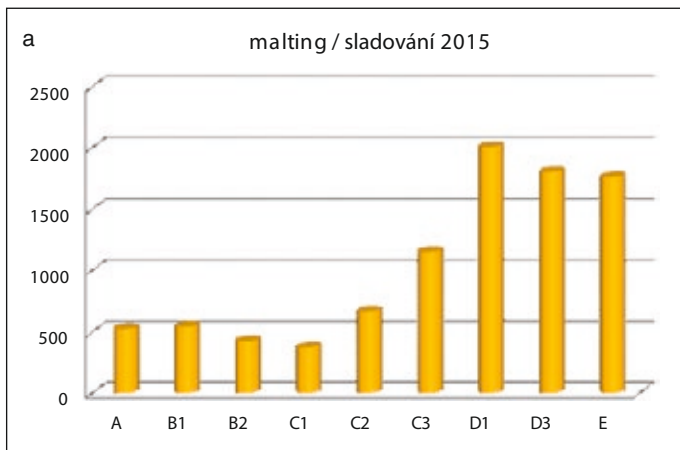


Fig. 2a, 2b Activity of proteolytic enzymes during malting
Obr. 2a, 2b Aktivita proteolytických enzymů během sladování

The combined standard uncertainty of the method was determined from 10 repeated measurements of proteolytic enzyme activity in a malt sample, and it was 18%.

The average values of the activity of proteolytic enzymes in barley moved from 197 mU/g of dry matter to 718 mU/g of dry matter, which is comparable with the results of Gomez-Guerrero (2009) and Bell (2012). The average values in the finished kilned dried malt ranged from 2501 to 3165 mU/g of dry matter. The results obtained confirm the conclusions of other authors that the activity of proteolytic enzymes increases sharply during malting, three to five times (Havlová, 1999; Jones et al., 2000; Gomez-Guerrero, 2009; Bell, 2012). During the phase of barley steeping, the activity does not increase significantly and the increase does not take place until germination (Fig. 2).

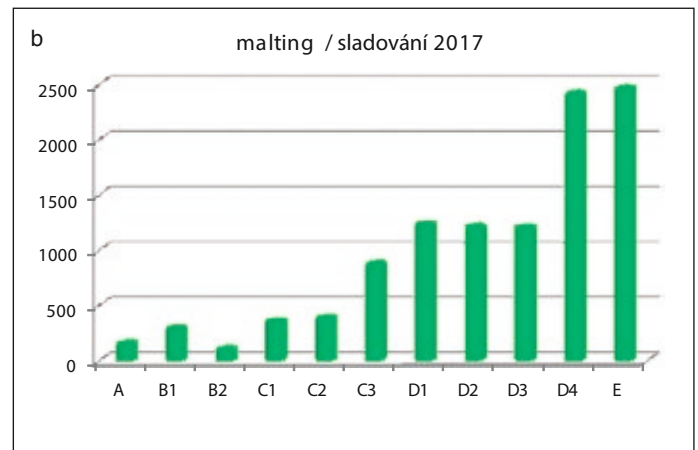
Some authors reported that on the 4th day of germination after an initial increase, the endopeptidase activity declines, a further increase follows until the sixth day. This is caused by the synthesis of specific endopeptidase inhibitors. This protein forms a complex with endopeptidases in which their activity is totally or partially inhibited. (Mikola and Suolinna, 1969; Havlová, 1999). The increase in the activity of proteases only declines during kilning (temperature 55 °C, Table 1) and further their activity does not change markedly (Jones et al., 2000; Gomez-Guerrero, 2009). Proteases are thus thermostable. Enzymes are inactivated at the temperature of 70–80 °C (Havlová, 1999), this corresponds to the kilning temperature (85 °C, 3 hours, see section 2.2). In some cases, the highest activity of proteases was recorded in the produced malts. Some research also suggests that the activity of some proteases may increase in the final phase of the malting process (Jones et al., 2000). Further, the relationship between Kolbach index and endoprotease activity in the produced malts was studied. The highest proteolytic activity was recorded in malts with Kolbach index between 36.6 and 37.4% and in addition, in malt with Kolbach index 44.4% (Fig. 3), which approximately corresponds to the data reported by Jin et al. (2014).

4 CONCLUSIONS

Over the period of 2014–2018, activity of proteolytic enzymes during the malting process was mapped in the samples collected from a small floor malthouse. Proteases catalyze hydrolysis of peptide bonds in proteins and peptides. During germination, they cleave storage proteins (hordeins and glutelins) to amino acids and low molecular weight peptides of varying sizes which can be further used for rooting in germinating barley and later for nutrition of yeast during the brewing process. They are of great importance because some aspects of beer production are affected by the amount of proteins, peptides and amino acids present in the wort. It was confirmed that the protease activity increases during the malting process. Endoproteases are formed in green malt, and due to high temperatures during kilning, the proteolytic activity of malt is not reduced.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the project “TAČR TE0200017 - Center for the Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products.



výrazně nemění (Jones et al., 2000; Gomez-Guerrero, 2009). Proteasy jsou tedy termostabilní. K inaktivaci enzymů dochází při teplotě 70–80 °C (Havlová, 1999), což odpovídá dotahovací teplotě hvozdní (85 °C, 3 hodiny, viz odst. 2.2). V některých případech byla aktivita proteas nejvyšší ve vyrobených sladech. Některé výzkumy rovněž uvádějí, že může dojít ke zvýšení aktivity některých proteas v konečné fázi sladovacího procesu (Jones et al., 2000). Dále byl sledován vztah mezi Kolbachovým číslem a aktivitou endoproteas ve vyrobených sladech. Nejvyšší proteolytickou aktivitu vykazovaly slady s Kolbachovým číslem mezi 36,6 a 37,4% a dále slad s Kolbachovým číslem 44,4% (obr. 3), což přibližně odpovídá údajům autorů Jin et al. (2014).

4 ZÁVĚR

V letech 2014–2018 byla zmapována aktivita proteolytických enzymů během sladovacího procesu ve vzorcích odebraných z malé hmuňové sladovny. Proteasy katalyzují hydrolyzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech. Při klíčení ječmene štěpí jeho zásobní proteiny (hordeiny a gluteliny) na aminokyseliny a nízkomolekulární peptidy různé velikosti, které mohou být dále využívány pro tvorbu kořínků v klíčovém ječmeni a později pro výživu kvasinek během vaření piva. Mají velký význam, protože některé aspekty výroby piva jsou ovlivněny množstvím bílkovin, peptidů a aminokyselin přítomných v mladině. Bylo potvrzeno, že aktivita proteas v průběhu sladovacího procesu vzrůstá. Endoproteasy se tvoří v zeleném sladu a vlivem vysokých teplot při hvozdní nedochází ke snížení proteolytické aktivity sladu.

PODĚKOVÁNÍ

Předložená studie vznikla v rámci řešení projektu TE0200017 „Centrum pro inovativní využití posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“. Technologické agentury České republiky.

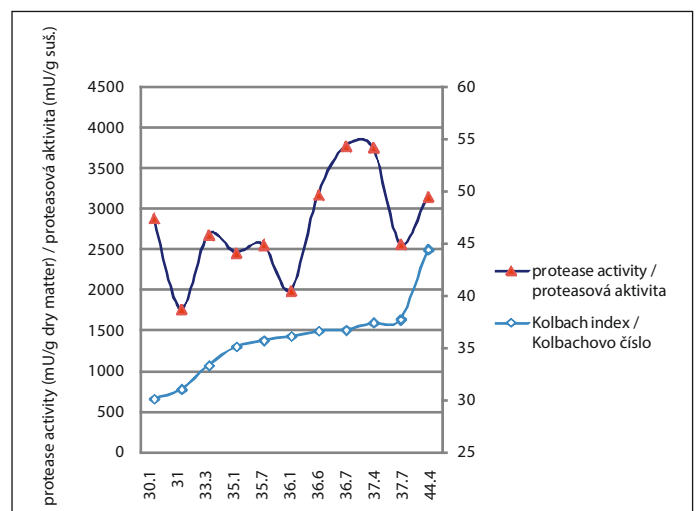


Fig. 3 Relationship between the activity of proteolytic enzymes and Kolbach index

Obr. 3 Vztah mezi aktivitou proteolytických enzymů a Kolbachovým číslem

REFERENCES/ LITERATURA

- Basařová, G., Psota, V., Šavel, J., Basař, P., Paulů, R., Kosař, K., Dostálek, 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.
- Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z., 2017: Activity of Proteolytic Enzymes During Malting and Brewing, Kvasny Prum., 63: 2–7.
- Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., 2008: Thermo-gravimetric Determination of moisture in brewing Raw Materials. Kvasny Prum., 54: 174–180.
- EBC, 1998: EBC Analysis Committee. Analytica EBC, 5. Vyd., Fachverlag, Hans Carl, Nürnberg.
- EBC, 2010: EBC Analysis Committee. Analytica EBC; 4. 9. 3: Soluble Nitrogen of Malt: Dumas Combustion Method. Fachverlag, Hans Carl, Nürnberg.
- Gomez-Guerrero, B., 2013. Effects of Amino Acid Profile, Endoprotease Activities and Wort Quality on Fermentability under Different Malting and Brewing Conditions. Master Theses, University of Manitoba, Winnipeg.
- Havlová, P., 1999: Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. VÚPS, Brno.
- Jin, Y., Du, J., Zhang, K., Guo, M., 2014: Relationships between the index of protein modification (Kolbach index) and hydrolytic enzyme production in a wheat malt. J. Inst. Brew., 120: 201–206.
- Jones, B.L., 2005. Endoproteases of barley and malt. J Cereal Sci, 42:139–56.
- Jones, B.L., Fontanini, D., Jarvinen, M., Pekkarinen, A., 1998: Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin. Analytical Biochemistry, 263: 214–220.
- Jones, B.L., Marinac, L. A., Fontanini, D., 2000: Quantitative study of the formation of endoproteolytic activities during malting and their stabilities to kilning. J. Agric. Food Chem., 48:3898-905.
- Kosař, K., Procházka, P. a kol., 2000: Technologie výroby sladu a piva. VÚPS, Praha. ISBN 80-902658-6-3
- Mikola, J., Suolinna, E. M., 1969: Purification and properties of a trypsin inhibitor from barley. Eur. J. Biochem. 9: 655–560.
- Moštek, J., 1975: Sladařství. 1. Vyd., SNTL, Praha.
- 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.
- Osman, A. M., Coverdale, S. M., Cole, N., Hamilton, S. E., de Jersey, J., Inkerman, P. A., 2002: Characterization and Assessment of the Role of Barley Malt Endoproteases During Malting and Mashing. J. Inst. Brew., 108: 62–67.
- Prokeš, J., 2000: Technologický význam dusíkatých látek v ječmeni a ve sladu. Kvasny Prum., 46: 277–279.

Translated by Vladimíra Nováková

Manuscript received / Do redakce došlo: 22/09/2018
Accepted for publication / Přijato k publikování: 26/10/2018