

Určování ztekucující mohutnosti sladových amyláz

VLADIMÍR MAREČEK,

Výzkumný ústav pro oleje a tuky, Praha

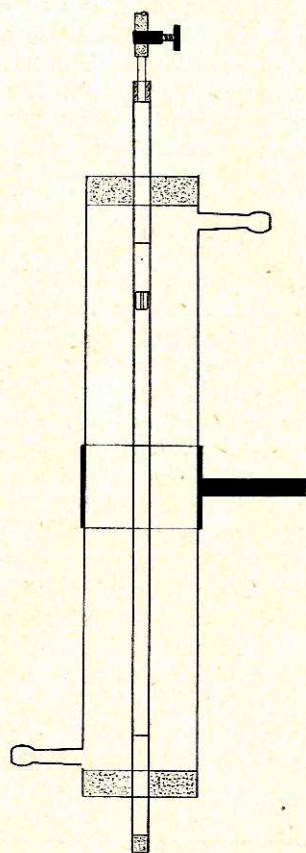
663.43:577.154.31

Určovat ztekucující mohutnost sladové amylázy (t. zv. α -amylázy) podle koloidního stavu substrátu postupujícím ztekucováním škrobového mazu je stále nepřesné [1—6]. Reprodukovatelné hodnoty poskytl viskosimetr, jednoduché konstrukce s měřením času klesajícího tělíska (obr.). Nejvhodnějším škrobem je rýžový škrob, jehož maz vykazuje po několik hodin téměř konstantní viskozitu. Pokusné podmínky dovolily přesně zachytit vliv pH na ztekucování a zcukřování škrobového mazu, stanovit reakční řád obou pochodů a podchytil zajímavé rozdíly v chování a působnosti obou amyláz.

Příprava škrobových mazů a enzymatických roztoků

Odvážilo se 3 % škrobu na 1 litr (počítáno na sušinu) a rozmíchalo se v třecí misce s trochou vody. Tato směs se vlila do baňky se 750 ml vroucí destilované vody (50 ml se použilo na rozmíchání škrobu a spláchnutí). Baňka byla opatřena zpětným chladičem a michadlem. Po 10 minutách varu se obsah baňky zchladil na pokusnou teplotu, zfiltraval jemným tkanivem a 400 ml filtrátu vpravilo do odměrného válce se zábrusem. Po přilítí 90 ml roztoku regulátoru, 5 ml enzymatického roztoku a 5 ml destilované vody se obsah válce promíchával přesně 1 minutu (doba měřena stopkami). Pracuje-li se bez regulátoru, přilévá se k 400 ml mazu 100 ml destilované vody. Po přezkoušení teploty se reakční směs vpravila do měřicího přístroje (viskosimetru), překontrolovala se teplota lázně a započalo se s měřením. Zbytek reakční směsi se vлил do baňky. Baňka se vložila do termostatu a sledovalo se zcukřování. V časových intervalech se bral vzorek (50 ml) roztoku, zcukřování se zastavilo 2 ml 20 % louhu sodného, destilovanou vodou se doplnilo v odměrné baňce na 100 ml a titrace se provedla podle Pollaka-Egloffsteina [7—8].

Enzymatickým roztokem byl pro všechny pokusy 1 % roztok t. zv. studeného výluhu sladového zahuštěného na 78 °Bg s diastatickou mohutností 17 tisíc 600 d. j. a chovaného ve větší zásobě. V práci se uplatnily Soerensenovy regulátory vhodného pH.



Přístroj k měření viskosity
škrobového mazu

Přístroj se skládá ze skleněné trubice 65 cm dlouhé s vnitřní světlostí 14 mm. Trubice má asi 10 cm od konců rysky protažené kolem celého obvodu. V trubici se pohybuje skleněné tělísko z tlustostěnné trubky s vnitřní světlostí 1 mm a vnějším průměrem 12,7 mm, dlouhé 3 cm (tělísko u popsaného viskosimetru vážilo 9,4764 g). Trubice s ryskami se vsune do široké skleněné roury opatřené na koncích dvěma trubicemi pro přítok a odtok vody a zajistí kaučukovými zátkami; na jedné straně prochází kaučukovou zátkou citlivý teploměr dělený na desetiny stupně. Celý přístroj je upevněn v otočných svorkách na podstavci spolu s olovnicí. Vnitřní trubice se po vytemperování lázně naplní na pokusnou teplotu reakční směsí, vsune se tělísko a trubice se uzavře (bez vzduchových bublinek). Jakmile tělísko klesne k jednomu konci, otočí se celý přístroj a stopkami se zjistí doba klesání tělíska mezi oběma ryskami. Reakční doba se počítá od slítí všech komponent reakční směsi dohromady. Výhodou přístroje je, že klesající tělísko stále promíchává reakční směs.

Výsledky pokusů

Vhodnost rýžového škrobu pro přesná měření ukazují tyto výsledky:

(Reakční teplota: 20 °C)

3 % bramborový škrob		3 % pšeničný škrob		3 % rýžový škrob	
Čas v min	rychlost klesání tělíska	Čas v min	rychlost klesání tělíska	Čas v min	rychlost klesání tělíska
10	3 min 58,9 vt	10	26,4 vt	10	27,6 vt
60	3 min 17,9 vt	60	27,2 vt	60	27,2 vt
180	3 min 08,8 vt	120	27,2 vt	120	27,2 vt
		180	27,8 vt	180	27,0 vt
		240	27,9 vt	240	27,0 vt
		1320	29,25 vt	1320	27,0 vt

Dále se zjistilo, že s prodlužovanou dobou varu mazu klesá jeho viskositá.

3 % bramborový škrob vařený se zpětným chladičem			
Čas v min 20 °C	1 min	10 min	1 hod
	rychlost klesání tělíska		
10	25 min 14,9 vt	3 min 32,4 vt	58,6 vt
120	15 min 06,9 vt	3 min 17,4 vt	43,3 vt

Právě tak pH má vliv na viskositu mazu:

3 % rýžový škrob		
Čas v min 20 °C	rychlost klesání tělíska	
	pH = 5,7	pH = 13
10	26,0 vt	12 min 43,05 vt
120	25,4 vt	12 min 03,10 vt

Z uvedených výsledků vyplývá, že zejména bramborový škrob je zcela nevhodný jako substrát k měření ztekucující mohutnosti; kromě nestálosti je to i různá viskositá dvou vedle sebe za stejných podmínek připravených mazů, čímž se stává jakékoli srovnání dvou výsledků nespolehlivým. Právě z tohoto důvodu nutno brát všechny výsledky uváděné ve starších pracích (na př. v Eulerových) s rezervou. Jak patrně, vykazuje sice pšeničný škrob stálejší hodnoty viskosity, ale během reakční doby projevuje náklonnost k tvorbě vrstev, kterými — zvláště na počátku — tělísko špatně proniká a tím pravou délku doby klesání skresluje. Kromě toho je pšeničný maz zakalený, takže vlastní měření trpí nepřesnostmi.

Vliv různého pH na ztekucující mohutnost sladové amylázy:

3 % rýžový škrob při 20 °C (1 % enzymatický roztok v množství 1 %)														
pH = 3,3			pH = 5,5			pH = 6,5			pH = 6,8			pH = 13		
Čas v min	rychlost klesání tělíska		Čas v min	rychlost klesání tělíska		Čas v min	rychlost klesání tělíska		Čas v min	rychlost klesání tělíska		Čas v min	rychlost klesání tělíska	
	min	vt		min	vt		min	vt		min	vt		min	vt
9	5	14,1	8	3	10,6	9	2	26,25	5	1	23,10	4	10	16,2
19	3	54,5	15	1	10,5	17	1	22,7	10	1	05,9	31	11	06,8
31	3	38,0	24		28,2	25		51,4	15		48,05	60	11	09,25
40	3	13,2	30		23,2	55		13,75	30		19,6	160	11	47,75
90	2	25,8	40		14,8	95		5,7	50		10,6			
110	2	23,0	50		10,0	120		4,2	66		7,5			
370	1	05,5	77		5,5	157		3,8	95		4,25			
705		37,4	97		4,6									
1310		24,2	165		3,7									

Vliv různého pH na ztekucující mohutnost sladové amylázy:

3 % rýžový škrob při 20 °C (1 % roztok enzymatický v množství 1 %)									
pH = 3		pH = 5,5		pH = 6,5		pH = 6,8		pH = 13	
Čas v min	g maltosy	Čas v min	g maltosy	Čas v min	g maltosy	Čas v min	g maltosy	Čas v min	g maltosy
15	0,114	15	0,322	17	0,176	20	0,2206	15	—
120	0,227	150	1,390	120	1,130	120	1,188	180	—
240	0,286	270	2,410	240	2,145	240	2,130		
360	0,286	390	3,510	360	2,970	360	2,880		
		510	7,720	480	4,001	480	4,001		

Reakční rychlost ztekucování škrobového mazu

Vypočtená konstanta reakční rychlosti podle I. řádu je sice uspokojivá, ale byla by správnou jedině tehdy, kdyby zjištěná rychlost klesání tělíska přímo odpovídala ubývání množství neztekuceného škrobu. Při správném postupu nutno přihlížet k přesně zjištěnému poměru ztekuceného a neztekuceného škrobu a odpovídající rychlosti klesání

tělíska. Proto se nejprve připravil ztekucený rýžový 3 % škrob tím způsobem, že připravený maz se při 37,6 °C zcela ztekutil sladovým výluhem, pak se obě složky amylázy varem inaktivovaly a viskositá tohoto roztoku v přístroji se zjistila při zachování výše uvedeného postupu. Potom se ztekucený škrob smíchal s 3 % rýžovým mazem v určitých poměrech a stanovila se viskositá jednotlivých směsí.

20 °C — bez regulátoru			30 °C — bez regulátoru			20 °C s regulátorem pH = 5,5			
rychlost klesání těliska vt	poměr obou škrobů v ml		rychlost klesání těliska vt	poměr obou škrobů v ml		rychlost klesání těliska		poměr obou škrobů v ml	
	nezt. škrobu	ztek. škrobu		nezt. škrobu	ztek. škrobu	min	vt	nezt. škrobu	ztek. škrobu
31,0	100	—	23,75	100	—	14	30,45	100	—
21,0	90	10	16,15	90	10	1	05,50	90	10
14,0	80	20	10,50	80	20		41,80	80	20
9,5	70	30	7,30	70	30		9,75	50	50
6,5	60	40					4,75	20	80
5,6	50	50	4,40	50	50		4,05	10	90
4,45	40	60					3,00	—	100
3,8	30	70							
3,4	20	80	3,20	20	80				
3,15	10	90							
3,00	—	100							

Pomocí těchto výsledků a extrapolace se vypočítala rychlost ztekucování ve dvou případech:

3 % rýžový škrob, bez regulátoru, při 20 °C, 1 % enzymatický roztok:		
Čas v min	množství neztekuceného škrobu ve směsi	$\frac{k}{2,303}$
4	92 %	0,0090
7	87 %	0,0087
20	83,5 %	0,0039
30	74,0 %	0,0044
40	64,0 %	0,0043
50	57,0 %	0,0038
60	47,0 %	0,0040
90	67,5 %	0,0037
100	38,0 %	0,0038
		průměr 0,00399

3 % rýžový škrob, s regulátorem pH = 5,5, při 20 °C, 1 % enzymatický roztok:		
Čas v min	množství neztekuceného škrobu ve směsi	$\frac{k}{2,303}$
15	91 %	0,0030
20	78 %	0,0050
25	72 %	0,0060
30	67 %	0,0060
40	57,5 %	0,0059
50	47,5 %	0,0060
60	41 %	0,0066
80	28 %	0,0066
		průměr 0,00604

Reakční rychlost zcukřování rýžového škrobu:

3 % rýžový škrob, s regulátorem při 20 °C

pH = 4,4			pH = 5,5		
Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$	Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$
15	0,193	—	30	0,322	0,00045
120	1,103	0,00040	150	1,390	0,00041
240	2,103	0,00029	270	2,410	0,00042
360	2,940	0,00039	390	3,510	0,00045
480	3,860	0,00041	510	4,880	0,00044

pH = 6,5			pH = 6,8		
Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$	Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$
17	0,176	0,00044	20	0,2206	0,00046
120	1,130	0,00039	120	1,188	0,00044
240	2,145	0,00039	240	2,230	0,00043
360	2,970	0,00040	360	2,900	0,00039
480	4,001	0,00044	480	4,001	0,00044

Vliv teploty na rychlost zcukřování a stanovení
teplotního koeficientu:

3 % rýžový škrob, pH = 5,5 a 10 °C			3 % rýžový škrob, pH = 5,5 a 30 °C		
Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$	Čas v min	g maltosy	$\frac{k}{2,303}$
15	0,0804	0,00024	17	0,351	0,00087
180	0,904	0,00022	77	1,610	0,00094
420	1,608	0,00018	137	2,570	0,00089
1200	4,825	0,00022	257	4,290	0,00088
			437	6,430	0,00092

Vliv zvýšené koncentrace enzymatického roztoku
na rychlost ztekucování a zcukřování:

3 % rýžový škrob, pH = 5,5 20 °C, 2 % enzymatický roztok (o 100 % více):						
Čas v min	rychlost klesání těliska		g mal- tosy	$\frac{k}{2,303}$ zcukř.	množství neztek. v %	$\frac{k}{2,303}$ ztekuc.
	min	vt				
3	2	16,0	0,386	0,0011	88	0,0079
7		55,55				
10		38,0				
15		19,85				
25		10,1				
30		7,-45	0,486	0,0011	66	0,012
35	5,75					
40	4,95					
45	4,5					
120			2,576	0,0011	19	0,019
240			4,290	0,0010		
360			5,730	0,00999		
				průměr 0,00101		průměr 0,0146

Výpočtem podle vzorce $\frac{k_t + 10}{k_t}$ byl zjištěn

koeficient teploty mezi 10 °C a 20 °C = 2,05, a
v rozmezí teplot 20 °C a 30 °C = 2,1, za jinak týchž
podmínek.

Vliv teploty na rychlost ztekucování sladovou α -amylázou:

3 % rýžový škrob, bez regulátoru (pH = 5,7), 30 °C					
Čas v min	rychlost klesání těliska vt	g maltosy	k 2,303 zcukř.	množství neztekuc. škrobu	k 2,303 ztekuc.
2	16,9	—	—	92 %	0,018
4	12,5	—	—	83 %	0,020
10	9,9	—	—	75,5 %	0,020
12	5,2	—	—	54 %	0,021
15	4,4	0,310	0,0008	50 %	0,020
25	3,9	—	0,00037	41,5 %	0,018
120	—	1,096	0,00037	—	průměr 0,0195
240	—	1,930	0,00035	—	
360	—	2,620	0,00040	—	
—	—	3,840	průměr 0,00037	—	

Souhrn

Ztekucující mohutnost se měřila na viskosimetru vlastní konstrukce založeném na principu měření rychlosti klesání těliska substrátem. Konstrukce a funkce přístroje je podrobně popsána. V řadě pokusů bylo dokázáno, že bramborový škrob se nehodí pro stanovení rychlosti ztekucování, ježto jeho viskositeta není ani po hodinovém varu konstantní; jeho maz podléhá samovolnému ztekucování, takže všechny výsledky získané pomocí tohoto škrobu (Euler) nutno brát s rezervou. Spolehlivější výsled-

ky dává pšeničný škrob, ale téměř konstantní viskozitu vykazuje rýžový škrob. S různým pH substrátu je také viskositeta mazu různá. Optimální pH ztekucování rýžového škrobu sladovou amylázou (α -amylázou) se pohybuje v rozmezí 5,5 až 6; vyplývá to z pokusných výsledků, neboť při různé počáteční viskozitě mazu je ztekucující mohutnost α -amylázy při pH 5,5 spíše větší, než při pH 6,8. Také zcukřování probíhá nejrychleji při pH 5,5 až 6. Je zajímavé, že konečné hodnoty dosaženého ztekucení při různém pH odpovídají různému stupni dosaženého zcukření. Ztekucování a zcukřování probíhají jako reakce monomolekulární. Zvýšením množství sladových enzymů o 100 % dosahuje se zrychlení zcukřující mohutnosti 2,3krát, zatím co ztekucující mohutnost se zrychlí 2,4krát. Zvýšením teploty z 20 °C na 30 °C zrychlí se ztekucování 4,8krát, zatím co zcukřování v tomto rozmezí teplot se zrychlí pouze 2,1krát.

Literatura:

- [1] OHLSSON U.: Z. physiol. Chem. **29** (1923) 126.
- [2] PELSHENKE P.: Untersuchungsmethoden für Brotgetreide, Mehl und Brot (1938).
- [3] MEYER K. H.: Experimentia **8** (1952) 405.
- [4] BADENHUIZEN F.: Cereal chemistry **32** (1955) 286 a práce předcházející.
- [5] PRONIN S. J.: Amylolitické fermenty, Moskva (1953).
- [6] CEREVITINOV F. V.: Chemické složení a fyzikální vlastnosti ovoce a zeleniny (1952) 83.
- [7] WEICHERZ J.: Die Malzextrakte, Berlin (1928).
- [8] Potravní kodex československý, Praha (1937) 361.