

Rozdelovanie α a β — amylázy pri sladovaní papierovou chromatografiou

ELENA ŠTEFANCOVÁ-BOLFOVÁ

Katedra technickej mikrobiológie a biochemie chemickej fakulty Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave
(Diplomovú prácu viedla dr. Anna Kocková-Kratochvílová)

663.44:577.154.31:545.84

V kvasnej chemii získal veľký význam enzým katalyzujúci štiepenie škrobu, tzv. amyláza alebo diastáza. Tento enzým bol objavený ruským vedcom *Kirchhofom* [1, 14] už r. 1814. Objavenie tohto enzýmu bolo ozajstným triumfom ruskej vedy, pretože tak bol po prvý raz získaný enzým a enzymatické pochody sa už mohli podrobiť vedeckému výskumu. *Kirchhof* vymýval lepok z pšeničnej múky a zistil jeho svojrázne pôsobenie na škrobový maz. Viskozita mazu mizla a tvoril sa cukor. Získanie cukru záviselo na teplote a bolo najväčšie v intervale medzi 50 až 75 °C. Získal sa sladký, snadno skvasiteľný sirup. Podobné vlastnosti javil aj škrob jačmenný. Zvláštnosti enzymatickej hydrolyzy objavené *Kirchhofom* boli bližšie overené neskôr, keď pokročili znalosti o enzýmoch ako o biologických katalyzátoroch. Účinkom tohto enzýmu sa rozpušťajú glykozidické väzby škrobu za prírastia vody.

Pretože sa účinkom surového enzýmu stekucuje škrobový maz a tiež sa nerovnako scukorňuje, pokladá sa amyláza za enzým nejednotný, skladajúci sa z enzýmu stekucujúceho a z dvoch druhov amyláz. *Ohlson* [2], *Freeman* a *Hopkins* [3] vo svojich prácach dokazujú, že slad obsahuje dve amylázy, jednu, ktorá uvoľňuje redukujúce látky s mutarotáciou v α — zmysle, a druhú, ktorá dáva látky s mutarotáciou v β — zmysle. Podľa *Kuhna* [4] sa sacharogenná amyláza nazýva β —amylázou.

Za jej katalytickej účasti sa z škrobu vytvorí najmä maltóza, ktorú možno identifikovať podľa špecifickej otáčivosti, redukčnej schopnosti, ako aj podľa rýchlosti kvasenia. Druhý enzým bol *Ohlsonom* [2] nazvaný dextrinogenná amyláza, pretože medzi reakčnými produktmi odbúravaného škrobu zo začiatku prevládajú dextríny a iba po ďalšom pôsobení sa tvorí tiež vo väčšom množstve maltóza. Táto dextrinogenná amyláza bola *Kuhnom* [4] nazvaná α —amylázou. α —amyláza sa vyznačuje vysokou stekucujúcou a dextrinogennou aktivitou s pomerne malým scukorňujúcim účinkom, kdežto β —amyláza pôsobí opáčne, je silne scukorňujúca a má takmer bezvýznamný dextrinotvorný účinok.

Corvaisier [5] však pripisuje stekucujúci účinok zvláštnemu enzýmu fosfatázového charakteru. *Corvaisier* popiera nejednotnosť sladovej amylázy.

Pokladá α —amylázu za totožnú s β —amylázou s tým rozdielom, že k α —amyláze je navyše prídružený stekucujúci enzým. Jednotnosť a nejednotnosť amylolytických enzýmov bola často predmetom diskusie.

V jačmeni sa nachádza len amyláza sacharogenná, kdežto dextrinogenná amyláza je typickou zložkou sladu a vzniká až pri kličení jačmeňa. Vznik α —amylázy pri kličení zrna súvisí do istej miery s činnosťou niektorých iných enzýmov, predovšetkým kyselinotvorných a štiepiacich bielkoviny. Aby mohli amylolytické enzýmy štiepiť škrob, musí byť tento uvoľnený z škrobonosných buniek. K tomu prispieva rozluštenie zrna, pri ktorom cytáza katalyzuje štiepenie hemicelulózy a celulózy bunkovej blany. Rozluštenie sladu postupuje od štitku k vnútrajšku endospermu. Škrobové zrná sú najprv napadané amylofosfatázou, ktorá z amylopektínového obalu škrobu odštiepuje kyselinu fosforečnú a tým umožňuje prístup amyláz k vlastnej škrobovej hmote, ktorú tieto scukorňujú.

R. 1951 uverejnili indickí pracovníci *Giri, Prasad, Gowri Devi* a *Sri Ram* [6] zpravu o možnosti dokázať rôzne druhy amyláz a fosforyláz rozdelením na papieri. V tejto práci sme sa pokúsili túto metódu aplikovať na sledovanie tvorby amyláz počas procesu sladovania.

Experimentálna časť

Použitý materiál

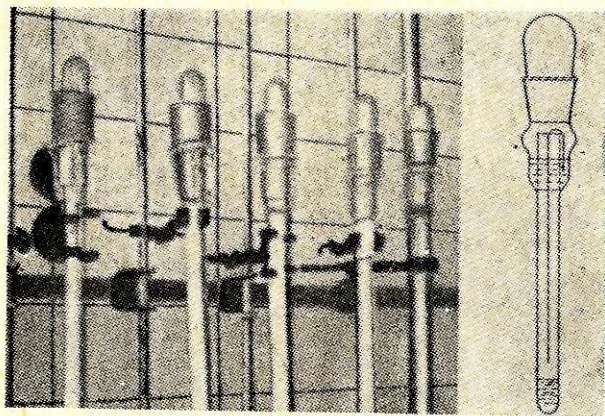
Proces sladovania na humne bol sledovaný v sladovni v Bratislave, sladovanie v bubnoch v pivovare v Brne a v skriňach vo Výskumnom ústave pivovarského a sladárskeho priemyslu v Brne. Vzorok boli odoberané denne od jačmeňa, až po hvozdenie.

Chromatografické delenie amyláz

Odobratá vzorka sa rozotierala v porcelánovej trecej miske, lebo pri mletí na mlynku sa enzýmy inaktivovali. 20 g jemne rozotreného sladu sa vylúhovalo 100 ml destilovanej vody po dobu 20 minút. Po prefiltrovaní sa výluh použil k chromatografickej separácii.

Na chromatografické delenie amyláz sa používal prúžok filtračného papiera *Whatman* č. 1 asi 50 cm dlhý a 2,5 cm široký. Na tento pruh filtračného pa-

piera sa nanášalo mikropipetou 0,02 ml enzymatického výluhu v 0,004 ml dávkách. Priemer kvapiek na papieri nebol väčší ako 1 cm. Súčasne sa zakladali dve vzorky: jedna s prefiltrovaným výluhom ako zmes amyláz a druhá po 15 minútovom zahriatí na 70 °C ako α -amyláza, za predpokladu, že β -amyláza sa inaktivovala. Po vysušení sa papierové pruhy ukladali do sklenených chromatografických trubíc (obr. 1).



Obr. 1 — Sklené chromatografické trubice

Ako vyvíjajúci roztok bolo vyskúšané 0,33 M roztok NaCl a acetón v koncentrácii od 20 do 50 %. Najlepšie oddelenie amyláz sa dosiahlo pri použití 30 % roztoku acetónu. Tiež na dno trubice sa naliato rozpúšťadlo, aby bola dostatočná vlhkosť. Trubice boli uložené do chladničky o 0°–5 °C. Chromatografia prebiehala 6,5 až 7 hodín, kým rozpúšťadlo neprebehlo 20 cm od štartu. Potom sa pružky vysušili pri teplote miestnosti.

K identifikácii enzýmov sa používal tlmenný škrobový agar: 4 g agaru v 200 ml destilovanej vody, 2 g škrobu, 60 ml 0,2 M roztoku octanu sodného o pH 4,6. Roztopený agar sa vylial do veľkej Petriho misky a nechal utuhnúť. Potom sa priložili vysušené chromatogramy na jeho povrch. Inkubovali sa pri optimálnej teplote v termostate po dobu 14 hodín. Potom sa papier opatrne odstránil a povrch agaru sa polial 0,01 N roztokom jodu. Poloha jednotlivých enzýmov na agarovej platničke sa dokazuje podľa bielych, po prípade fialových, škvŕn na tmavomodrom podklade. Poloha škvŕn sa môže dokázať aj na papieri, a to tak, že sa pásy postriekajú 2 % roztokom rozpustného škrobu a po 30 minútovom pôsobení sa vyvolajú 0,02 N roztokom jódu. Na mieste, kde nastalo enzymatické odbúranie, nevzniká jód–škrobová reakcia.

Priprava kryštalickej amylázy

Kryštalická amyláza bola pripravená s prihliadnutím k prácam Shwimmera a Ballsa [7], Mayera Fulda a Bernfelda [8], Fischera a de Montmaliina [9], Wildnera a Wildnerovej [10] a Pronina [14]. 200 g zeleného sladu, jemne rozotretého v trecej miske, sa extrahovalo v 800 ml 20 % alkoholu počas 24 hodín. Roztok sa odfiltraval, zmiešal s 2,5-násobným

objemom absolútneho alkoholu (benzín a alkohol po predestilovaní a vysušení). Za intenzívneho miešania sa vytvorila žltobiela chytro sa usadzujúca zrazenina, skladajúca sa hlavne z bielkovín. Roztok nad zrazeninou sa zliat, zrazenina sa preniesla na filter a alkohol sa rýchle odsál. Potom sa zrazenina preniesla do trecej misky, kde sa trela s absolútnym alkoholom, odsála a ešte raz premyla alkoholom. Ďalej sa rozotierala s éterom, odsála a vysušila v exsikátore. Výsledkom bol prášok žltobielej farby, ktorý sa použil ako štandard k chromatografii. Bol zmesou amyláz a α -amyláza sa z neho pripravila zahriatím na 70 °C, ako už bolo spomenuté.

Stanovenie dusíka aminokyselín

K 5 ml sladového výluhu sa pridajú 4 kvápkymolftaleinu (0,25 g sa rozpustí v 100 ml 50 % roztoku alkoholu) a N roztok NaOH do slabomodrého zafarbenia. Potom sa pridá 30 ml suspenzie $\text{Cu}_3\text{PO}_4/2$ (pripraví sa tak, že sa zmiešajú 2 objemy Na_3PO_4 , 1 objem CuCl_2 a 2 objemy borátového pufru: 57,21 g borátu sodného $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sa rozpustí v 1500 ml vody a pridá sa 100 ml N HCl a zriedi sa na dva litre. Suspenzia fosforečnanu meďnatého sa pripravuje vždy čerstvá) a všetko sa zamieša. Roztok sa zriedi destilovanou vodou na 50 ml a odfiltruje. K 10 ml filtrátu sa pridá 0,5 ml kyseliny octovej a 2 g KJ p. a. Titruje sa jód s 0,01 N sírnatom (4,96 g sírnatu sodného sa rozpustí v 200 ml vody bez CO_2 a pridá sa 0,1 % borátového pufru a zriedí na 2000 ml), ako indikátor sa použije škrobový maz. 1 ml 0,01 N sírnatu odpovedá 0,28 mg aminodusíka. Od výsledkov sa odpočíta slepý pokus (bez vzorky).

Stanovenie diastatickej mohutnosti

Diastatická mohutnosť sa stanovila podľa Windische a Kolbacha [11].

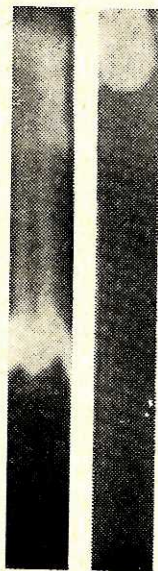
Chromatografické stanovenie cukrov, vzniklých pri enzymatickom rozklade škrobu

Toto stanovenie sa previedlo metódou použitou Winklerom [12] a Vlčkom [13].

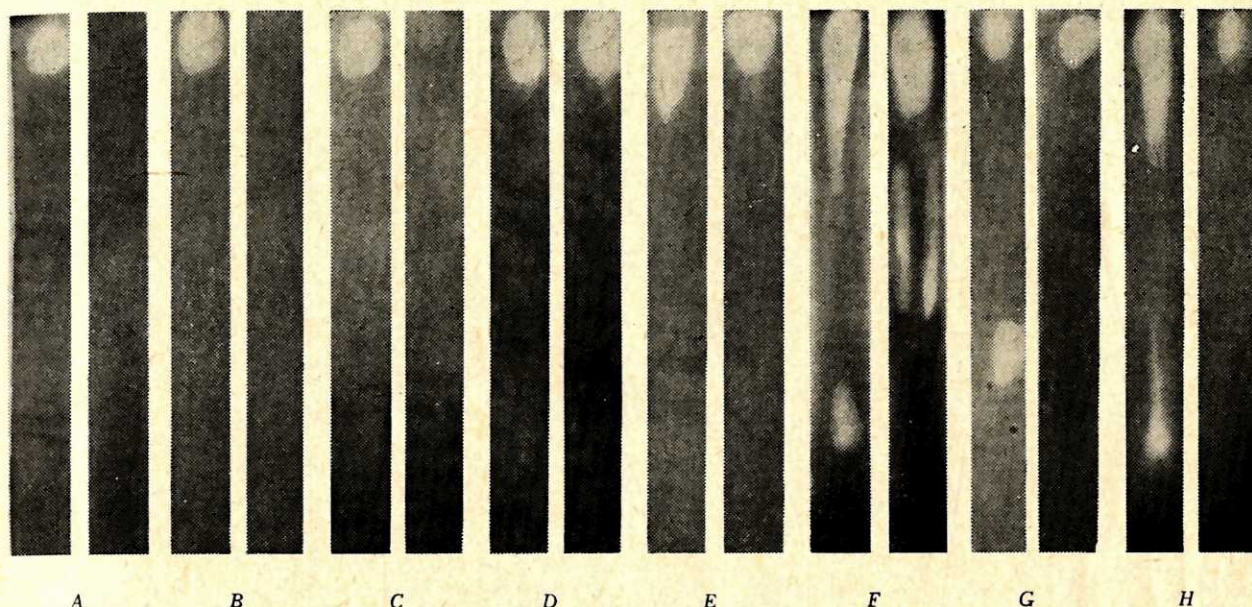
Výsledky pokusov

Chromatografia amyláz

Obr. 2 ukazuje, že sa u jačmeňa a v prvých čtyroch dňoch sladovania dostáva len jedna škvŕna na štarte, ktorá po zrušení β -amylázy sa už neobjavuje alebo ostáva na štarte ďalej. To potvrdzuje názor, že v jačmennom zrne sa nachádza len β -amyláza. Amylázy sú spočiatku asociované s vysokomolekulárnymi bielkovinami, ktoré rozpúšťadlo nestačí vytlačiť zo štartu, a preto nedochádza k pohybu týchto enzýmov po chromatografickom papieri. Až v priebehu slakovania, asi piaty až



Obr. 2a — Chromatogram čistej amylázy
(A = zmes α - a β -amylázy, B = α -amyláza)



Obr. 2b — Chromatogramy sladových výluhov pri výrobe pľeňského sladu
A = pôvodný jačmeň (vľavo je škvrna amyláz na štarte, vpravo škvrna zmizla po zahriatí β -amyláza sa inaktivovala)
B = prvý deň na humne (vľavo škvrna β -amylázy, vpravo po zahriatí)
C = druhý deň na humne (vľavo škvrna β -amylázy, vpravo po zahriatí)
D = tretí deň na humne (vľavo zmes amyláz, vpravo po zahriatí ostáva škvrna, čo svedčí o tom, že sa už objavuje α -amyláza)
E = štvrtý deň na humne (vľavo zmes amyláz, vpravo po zahriatí)
F = piaty deň na humne (vľavo zmes amyláz, β -amyláza začína putovať, vpravo po zahriatí)
G = šiesty deň na humne (vľavo zmes amyláz, β -amyláza sa oddelila a tvorí dole škvrnu, ktorá po zahriatí mizí — vpravo)
H = hotový slad (ľavý chromatogram ukazuje zreteľné dve škvrny, β -amylázy dole a α -amylázy pri štarte, vpravo po zahriatí)

šiesty deň sa amyláza účinkom proteolytických enzýmov zo zväzku s bielkovinami uvoľňuje a β -amyláza putuje po papieri smerom nadol. Že ide o β -amylázu sa konštatovalo z toho, že sa na druhom pruhu, kde bola táto amyláza teplom inaktivovaná, sa objavuje len škvrna na štarte dokazujúca prítomnosť α -amylázy. U všetkých druhov sladov podľa technologického postupu, t. j. u sladu humnového, bubnového aj skriňového sa tieto výsledky zhodovali. U hotového karamelového a farebného sladu nevznikli na chromatograme žiadne škvrny, lebo vysoká teplota pri hvozdení ničí obidve amylázy.

Posúdenie proteolytickej aktivity sladu

Proteolytická aktivita sladu bola hodnotená podľa pribúdania aminokyselinového dusíka v sladkom výluhu.

Závislosť aminodúsika na dobe sladovania:

Dni	mg aminodúsika v 100 g sušiny sladu		
	slad skriňový	slad bubnový	slad humnový
0	47,0	52,4	71,4
1	48,0	54,0	85,5
2	58,3	61,9	117,0
3	68,0	92,7	122,5
4	111,6	107,6	149,8
5	132,0	114,8	179,0
6	154,8	135,7	198,0
7	186,8	178,7	194,0
8	164,0	204,0	—
Prírastok po 7. dňoch	139, —	126,3	122,6

Sledovanie diastatickej mohutnosti

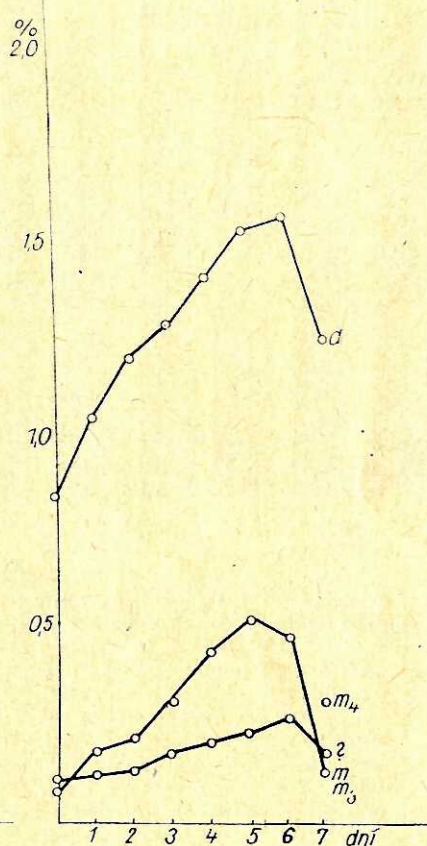
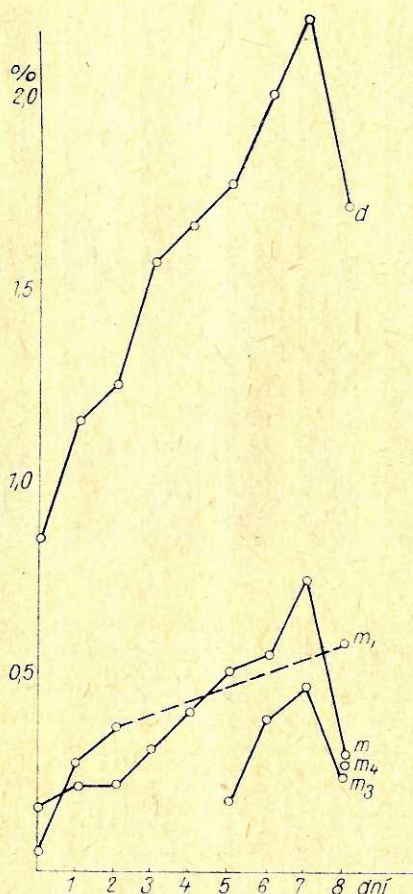
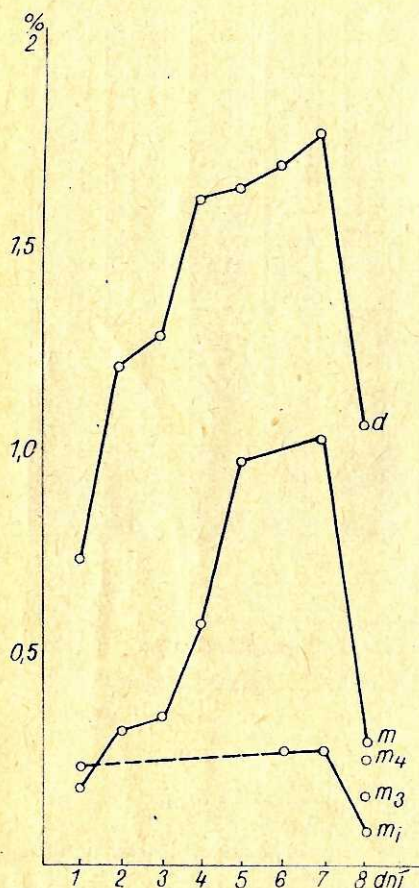
Diastatická mohutnosť bola stanovená u sladového výluhu bez úpravy, teda so zmesou oboch amyláz a potom po inaktivácii β -amylázy ako diastatická mohutnosť α -amylázy. Ukázalo sa, že najväčšie hodnoty diastatickej mohutnosti dosiahol slad

Závislosť diastatickej mohutnosti na dobe sladovania ($\alpha + \beta$ — amyláza):

Dni	Jednotky diastatickej mohutnosti		
	slad skriňový	slad bubnový	slad humnový
0	70,57	93,0	88,8
1	77,5	106,0	103,0
2	96,9	142,0	180,7
3	139,57	210,5	295,7
4	223,0	300,0	360,0
5	287,3	320,0	389,9
6	331,1	318,4	393,0
7	348,51	310,9	289,8
8	256,4	205,8	—

(α — amyláza):

Dni	Jednotky diastatickej mohutnosti		
	slad skriňový	slad bubnový	slad humnový
0	5,7	10,6	7,7
1	11,9	16,78	13,87
2	17,26	23,4	33,11
3	23,1	30,58	53,09
4	36,30	36,46	57,86
5	57,53	42,27	51,71
6	71,73	46,85	44,70
7	55,0	47,72	41,88
8	41,7	37,64	—



Obr. 3 — Vznik cukrov a dextrinů účinkom výluhu zo skřiňového sladu na škrob počas sladovania. Posledný deň značí hotový slad

Obr. 4 — Vznik cukrov a dextrinů účinkom výluhu z bubnového sladu na škrob počas sladovania. Posledný deň značí hotový slad

Obr. 5 — Vznik cukrov a dextrinů účinkom výluhu z humnového sladu na škrob počas sladovania. Počiatočná hodnota značí jačmeň, kon. hot. slad

humnový (289,8 jednotiek) a najnižšie slad bubnový (205 jednotiek), hoci siedmeho dňa mal skřiňový slad najvyšší prírastok.

Rozklad škrobu na cukry pôsobením amyláz

Kvalita cukrov vznikajúcich amylolytickou činnosťou bola zisťovaná chromatografickým delením na papieri. Kvantitatívne boli tieto cukry stanovené kolorimetrickou metódou antronovou [12, 13]. Účinkom α - a β -amylázy vznikla predovšetkým maltóza (m) a dextriny (d), v menšom množstve maltotrióza (m_3), maltotetraóza (m_4) a izomaltóza (m_1). U humnového sladu sa objavil neznámy cukor pod maltózou (?), po detegovaní fialovej farby, o ktorom sa už zmienil tiež Vlček a Winkler. Obr. 3, 4, 5.

Súhrn výsledkov

V tejto práci sa ukázalo, že amylolytický sladový enzým môže vytvoriť za daných okolností na papieri dve škvrny, ktoré javia diastatickú aktivitu. Jednu možno popísať ako α -amylázu a druhú ako β -amylázu.

Pre chromatografické rozdelenie amyláz je potrebné použiť nie príliš koncentrované vyvíjajúce roztoky, napr. 0,33 M NaCl alebo 30 % ocetón. Pri vyvíjaní s koncentrovanejšími roztokmi dochádza k vysolo-

vaniu týchto enzýmov už na štarte. Vodné roztoky rozpúšťadiel sú schopné vyvolať pohyb β -amylázy zo štartu a tak ju oddeliť od α -amylázy. Zdá sa, že bielkoviny alebo aj iné neenzymatické látky sa asociujú s enzýmami a menia pohyb enzýmu alebo ho dokonca celkom potláčajú. Preto u jačmeňa a na začiatku sladovania nedochádza k deleniu amyláz. Až zväčšením proteolytickej aktivity, keď sa v sladovom výluhu objaví 115 až 150 mg aminodúsika na 100 g sušiny sladu, dajú sa enzýmy chromatograficky oddeliť.

Keď sme sledovali diastatickú mohutnosť v priebehu sladovania, ukázalo sa, že najlepšie podmienky pre túto činnosť poskytoval humnový slad.

Prvé proteolytické maximum bolo po dvoch dňoch, optimálna aktivita α -amylázy sa javila po tri a pol dňa a chromatografické rozdelenie oboch amyláz po štvrtom dni. Najmenšiu diastatickú mohutnosť javil bubnový slad. Prvé proteolytické maximum bolo po tri a trištvrte dňoch, optimálna aktivita α -amylázy po šiestich dňoch a rozdelenie oboch amyláz na papieri 5. až 6. deň. Keď sa sleduje priebeh proteolytickej aktivity, ukazujú sa dve maximá; jedno, ktoré súhlasí s rozdelením amyláz na papieri a druhé, ktoré odpovedá už zníženej amylolytickej aktivite pri hvozdení.

ВЫВОДЫ

Автор приходит к заключению, что при условиях заданных опытом амилолитический фермент дает на бумаге два пятна, которые отвечают α и β амилазе. Было доказано, что в начале соложения амилазы связаны присутствующими белковыми веществами; движение амилаз этим изменяется или даже подавляется. Только повышенным протеолитической активности — присутствием от 115 до 150 мг азотистого азота на 100 г сухого вещества солода — можно ферменты хроматографически разделить.

При соложении на току имеются самые благоприятные условия для действия ферментов. Первый протеолитический максимум проявил себя после 2 дней, оптимальная активность α амилазы после 3½ дней. Наименьшую диастатическую силу имел барабанный солод. Первый протеолитический максимум был установлен после 3½ дней, оптимальное действие амилазы после 6 дней, разделение после 5–6 дней.

SUMMARY

The author comes to conclusion, that under the given experimental conditions the amylolytic enzyme forms two blots, representing alpha and beta-amylase respectively. It was ascertained, that at the beginning of malting the amylases are blocked by the proteins and their motion is changed or even oppressed. First the growth of proteolytic activity, which is characterized by the presence of 115 to 150 mg of amine nitrogen in 100 g of dry matter of malt makes the chromatographic separation of enzymes possible.

The malting on the malt-floor brings the best conditions for

activation of enzymes. The first point of maximal proteolytic activity of enzymes appeared after two days, the optimal activity of alpha amylase after 3½ days and the chromatographic separation of both amylases after four days. The drum malt showed the least diastatic ability. The first maximum of proteolytic activity appeared after 3½ days, the optimal activity of alpha-amylase after 6 days. The separation on the paper took place after five or six days.

LITERATURA

- [1] V. L. KRETOVIČ: Základy biochemie rostlin, Praha 1954
- [2] E. OHLSON: Ztschr. physiol. Chemie 189 (1930), 20
- [3] FREEMAN, HOPKINS: Biochem. Jour. 30 (1936), 444
- [4] JACOB BLOM, A. BAK, B. BRAAE: Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 250 (1957), 252, ref.
- [5] CORVAISIER: Biochem. Jour. 43 (1949), 237
- [6] K. V. GIRI, A. L. N. PRASAD, S. GOWRI DEVI, I. SRI RAM: Biochem. Jour. 51 (1951), 122
- [7] SCHWIMMER, BALLS: Jour. biol. chem. 176 (1948), 465
- [8] MAYER, FULD, BERNFELD: Experimentia 3 (1947), 411
- [9] FISCHER, DE MONTMALLIN: Ztsch. angew. chemie 63 (1951), 153
- [10] H. WILDNER, G. WILDNER: Brauwissenschaft 9 (1956), 222
- [11] PAWLOWSKI-SCHILD: Die Brautechnischen Untersuchungsverfahren, Norimberk 1953
- [12] R. WINKLER: Kvasný průmysl 2 (1956) 196
- [13] J. VLČEK: Kvasný průmysl 3 (1957) 169
- [14] S. L. PRONIN: Amylolytičeskije fermenty i ich roľ v piščevoj promyšlenosti, Moskva 1953