

Enzymové preparáty v pivovarství pro zpracování vyšších podílů škrobnatých surogátů

Dr. O. BENDOVÁ, CSc, Ing. B. PARDONOVÁ, Výzkumny ústav pivovarský a sladařský, Praha

663.422
663.43 : 577.15

Aplikace enzymových preparátů přichází v úvahu při zpracování vyšších podílů nesladovaných obilných materiálů, zejména ječmene, jako náhražek sladu.

Pro rmutovací proces jsou důležité dva hlavní typy enzymů, amylolytické a proteolytické. Sladová α -amyláza ztekucuje škrob, štěpí jej na nižší a vyšší dextriny a účastní se tvorby hlavního podílu zkvasitelných cukrů, zejména maltózy. Proteolytické enzymy sladu štěpí vysokomolekulární bílkoviny na středně- a nízkomolekulární produkty, peptidy a aminokyseliny, významné pro stabilitu piva, jeho pěnivost a výživu kvasinek.

Nesladovaný ječmen obsahuje pouze β -amylázu a ve srovnání se sladem nedostatečné množství proteolytických enzymů. Ty spolu s α -amylázou vznikají až během sladovacího procesu. Z toho plyne, že při náhradě většího podílu sladu ječmenem projevuje se více či méně potřeba tyto enzymy nahradit. K tomuto účelu se používají různé preparáty amylolytických a proteolytických enzymů.

α -amyláza je produkována jak plísněmi, tak i baktériemi. Různé druhy *Aspergillus niger* a *Aspergillus oryzae* tvoří při povrchové či submerzní kultivaci amylolytické enzymy. Vzhledem k jejich nízké termostabilitě, nízké optimální teplotě (50 °C) a relativně nízkému pH (5), není možno plísňové preparáty k našemu účelu doporučit. Poměrně větší vyhlídky k praktickému využití má plísňová α -amyloglukozidáza, která tvoří jako jediný konečný produkt své činnosti glukózu terminálně odštěpovanou z neredukujícího konce glukozidického řetězce.

Tím zvyšuje koncentraci zkvasitelných cukrů v mladině na úkor dextrinů a působí tím i vyšší prokvašení mladiny.

Z uvedeného je zřejmé, že při zpracování škrobnatých náhražek sladu je vhodnější aplikovat amylázu bakteriálního původu, jejíž vlastnosti, co se týče účinku optima teploty a pH, jakož i termostability, předčí amylázy plísňové.

Bakteriální amyláza je produkována do prostředí jak za stacionárních, tak za submerzních kultivačních podmínek. Stacionární podmínky převládaly v počátečních fázích výzkumu a vývoje, kdy se uplatňovala jak forma tekutého, tak i pevného živného média, na jehož povrchu rostla kultura produkčního kmene. V současné době převládá submerzní typ kultivace. K produkci bakteriální amylázy slouží zejména různé kmeny druhu *Bacillus subtilis*. V odborné literatuře existují údaje i o kmelech jiných druhů, schopných produkovat ve zvýšeném množství extracelulární amylázu. Jsou to např.: *Bacillus polymyxa*, různé druhy rodu *Clostridium*, a to *Cl. pasteurianum*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. butyricum*, dále *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus macerans*. Tvorba amylázy v živné půdě vhodného složení byla zaznamenána nejen u sporulátů, nýbrž i u bakterií druhu *Pseudomonas saccharophila* [1].

Bakteriální amylolytické enzymy jsou zpravidla zařazovány mezi α -amylázy. Enzymy tohoto druhu působí rychlé štěpení α -1,4 glukozidických vazeb amylózy převážně na dextriny o nízké molekulové hmotě. V souvislosti s tím dochází i k rychlým ba-

revným změnám při reakci s jódem. Tato první rychlá fáze štěpení probíhá až k achroickému bodu jodoškrobové reakce, kdy je rozštěpeno asi 20 až 45 % vazeb amylózy. Směs obsahuje přitom fragmenty s krátkými řetězci převážně o 6 až 8 glukozidických jednotkách, maltotriózu a maltózu, přičemž maltotriózy vzniká více nežli maltózy. Tetrasacharidy a pentasacharidy a glukóza jsou přítomny pouze v malém množství. Poté nastupuje druhá fáze s podstatně nižší reakční rychlostí, kdy α -amyláza štěpí nízkomolekulární dextriny a v reakční směsi se zvyšuje obsah maltotriózy, maltózy a glukózy. Degradace amylózy je ovlivněna jednak koncentrací enzymu a jednak stupněm disperze polysacharidu.

Při štěpení α -1,4 glukozidických vazeb amylopektinu působením α -amylázy vznikají nejdříve většinou dextriny střední molekulové hmoty, barvící se jodem červenoohnědě a pouze malé množství maltózy. Později se tvoří dextriny s nižší molekulovou hmotou, nebarvící se jódem, zvyšuje se obsah maltózy a vzniká glukóza. Mezi hydrolytickými produkty lze tedy zjistit směs větvených i nevětvených hraničních dextrinů o 4–7 glukozidických jednotkách, maltotriózy, maltózy, izomaltózy a malého množství glukózy. α -amyláza hydrolyzuje maltotriózu, avšak neštěpí maltózu. Glukóza nevzniká pouze z maltotriózy, nýbrž i z fragmentů obsahujících více než 3 glukozidické jednotky.

Aktivita bakteriální amylázy se uvádí nejen v souvislosti s určitým pořadím aminokyselin v peptidickém řetězci enzymové bílkoviny, nýbrž se spojuje i s přítomností vápenatých iontů v molekule enzymu. Jeho odstraněním dialýzou nebo činnidly, které se vážou s vápníkem, ztrácí enzym svou aktivitu. Vápenaté ionty chrání enzym před inaktivací a denaturací a tím i před degradací jejích molekul proteolytickými enzymy.

S obsahem vápenatých iontů souvisí i odolnost amylázy vůči vyšším teplotám, která je podporována také přítomností iontů chloridových. V tomto směru se projevuje závislost na produkčním mikroorganismu, a to, zda jde o producenta mezofilního nebo termofilního.

Pro zpracování nesladovaných škrobnatých surovin ve varně jeví se tedy potřeba aplikovat nejen vhodné amylolytické, nýbrž i proteolytické enzymy. Preparáty obsahují převážně enzymy bakteriálního nebo plísňového původu.

Plísňové proteolytické enzymy jsou rozděleny do dvou skupin podle druhu produkčního mikroorganismu z rodu *Aspergillus*. Plísňe typu *Aspergillus niger* produkují proteázy s optimem aktivity v kyselé oblasti, plísňe typu *Aspergillus oryzae* proteázy především s optimem v neutrální a alkalické oblasti pH. K prvnímu typu patří též *A. saito*, k druhému *A. flavus*, *A. sojae*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* [2].

Bakteriální proteázy alkalická a neutrální jsou produkovány kmeny *Bacillus subtilis*. Alkalická proteáza, která je poměrně stálá, bývá podle produkčního kmene uváděna v Dánsku pod názvem subtilisin A, či subtilopeptidáza A, Novo, v Japonsku Nagarse, BPN apod. O neutrální proteáze je zatím málo údajů pro její malou stálost [2]. Proteolytické enzymy se zpravidla tvoří současně s amylolytickými, a to u různých kmenů ve větší či menší míře v závislosti na kultivačních podmínkách, nikoliv však v korelaci s tvorbou amylázy.

Velký význam pro sladování a varný proces mají i hemicelulázy, které působí odbourávání buněčných stěn endospermu a gumovitých látek. Podle Preece se dělí na dvě skupiny:

1. Enzymy cytotlastické, jejichž zástupcem je endo- β -glukanáza, která působí odbourávání velkých molekul a snižuje tím viskozitu roztoku. Je přítomna již v ječmeni.

2. Enzymy cytolytické, zastoupené exo- β -glukanázou, která dokončuje štěpení molekul až na pentózy a tvoří se během sladování [3].

Bylo zjištěno, že vysokou viskozitu rmutu způsobuje β -glukan. Je obsažen v ječmeni v množství 1–2 % a při sladování se jeho obsah působením β -glukanázy snižuje. U krátce vedených sladů není β -glukan dostatečně odbourán, a protože je β -glukanáza citlivá na teplotu a částečně se ničí při hvozdění, lze v tomto případě očekávat, že nejsou odbourány i gumovité látky přecházející během rmutování do roztoku. Tím vznikají potíže při scezování ve varně a rovněž i při filtraci piva [3].

Studiem cytolytických enzymů se zabývali v NDR. V současné době ke zpracování vyšších podílů surogátů se zde zavádí kombinovaný preparát α -amylázy a β -glukanázy, produkovaných kmenem *Bacillus subtilis*.

V SSSR byl vyvinut preparát s obdobným účinkem připravovaný povrchovou kultivací produkčního kmene *Trichothecium roseum* (ze třídy *Fungi imperfecti*) na pevné půdě vhodného složení. Podle dostupných informací aplikuje se tento preparát jak při várkách s vysokým procentem surogace, tak i při práci se slady vyrobenými z ječmenů s vysokým obsahem bílkovin.

Pro posouzení vhodnosti enzymových preparátů k danému účelu měli jsme doposud k dispozici pouze přípravky amylolytické a proteolytické bakteriálního původu. Z amylolytických preparátů to byla především československá Bolamyláza, výrobek n. p. Slovenské škrobárny, Nervanase, vyráběná angl. firmou Winthrop Products Co., francouzská Superclastase, výrobek firmy Societ e Rapidase, Seclin a holandský preparát Brew-n-zyne firmy Chemische Fabriek, Naarden, což je kombinovaný preparát amylolytický a proteolytický.

Z proteolytických preparátů jsme měli možnost posoudit účinnost anglické Proteinase (vyráběná stejnou firmou jako Nervanase) a proteolytický preparát, vyrobený ČAZ-VÚPP v Praze, který jako jediný zkoušený přípravek je plísňového původu. Produkčním kmenem je v tomto případě *Aspergillus flavus*.

Československá Bolamyláza se vyznačuje teplotním optimem pro svou aktivitu 70 °C, je vysoce aktivní v rozmezí pH 5,5–7 s optimem pH 6,0, při 30 ° i 70 °C. Při 30 °C je stabilní po dobu 1 hodiny při hodnotách pH 5 až 9, při teplotě 70 °C v rozmezí pH 6 až 9. Preparát obsahuje 2430 dextrinálních jednotek v gramu, měřeno modifikovanou SKB metodou [1].

Nervanase je účinná v rozmezí pH 5 až 8 s optimem pH 6,0 a optimální teplotou 60 až 65 °C. Jak jsme zjistili, není tento preparát ve srovnání s ostatními zkoušenými preparáty dostatečně stabilizován vůči působení vysoké teploty. Vykazuje v průměru 1400 j/g.

Rozmezí hodnot pH a jejich optimum u francouzské Superclastase, jakož i teplotní optimum pro činnost preparátu jsou obdobné jako u Nervanase. V průměru bylo u uvedeného přípravku stanoveno 9720 j/g.

Amylolytická složka Brew-n-zymu je značně rezistentní vůči teplu, optimální pH je 6,0, optimální teplota 70 °C. Preparát je vysoce aktivní, neboť bylo zjištěno v průměru 35 930 j/g, čímž zdaleka předčí ostatní zkoušené přípravky.

Co se týče termostability, jsou uvedené preparáty zhruba rovnocenné, s výjimkou Nervanase, která má podstatně nižší odolnost vůči vysokým teplotám.

Proteolytická aktivita preparátů byla měřena mo-

difikovanou metodou podle Slavíka a Smetany, s použitím kaseinu jako substrátu [1].

Nejvyšší aktivitu vykazoval Brew-n-zyme s optimální teplotou 50 °C. Preparát byl vysoce aktivní i při ostatních sledovaných teplotách v rozmezí 45 až 60 °C. Vykazoval 2 632 j/g. Anglický preparát Proteinase měl zhruba 3krát nižší aktivitu, 877 j/g, optimální teplotu 50 °C. Nižší aktivitu měl proteolytický preparát z ČAZ-VÚPP 625 j/g a minimální proteolytická účinnost byla zjištěna u preparátu Superclastase. Bolamyláza nemá proteolytickou účinnost.

Na základě výsledků našeho šetření použili jsme pro zkoušky praktické aplikace preparátů ve varně čs. Bolamylázu, neboť jsme byli vedeni snahou vyzkoušet především domácí výrobek. Pro srovnání byl vybrán Brew-n-zyme, vysoce aktivní preparát vzhledem ke své účinnosti amylolytické a proteolytické. Napříště bude vhodné ověřit účinnost a efekt praktické aplikace cytolytických preparátů. Výsledky těchto zkoušek budou obsahem dalšího sdělení.

Literatura

- [1] Bendová, O.: „Produkce bakteriální amylázy“
kand. disert. práce, VŠCHT, r. 1962
- [2] TURKOVÁ, J., MIKEŠ, O., ŠORM, F.: „Extracelulární proteázy z *Aspergillus flavus*“
Sborník „Enzymy v potravinářském průmyslu“, 1966, s. 39
ČSVTS — ÚV pro potrav. průmysl
- [3] DICKSCHEIDT, R.: „Bedeutung und Perspektiven der Enzymforschung für die Lebensmittelindustrie“, II. Internac.
Symposium der Gärungsindustrie, Leipzig - DDR, r. 1968 —
Symposiumsberichte Bd. 11, s. 5.