Stanovenie sladovej β -glukanázovej aktivity za použitia chromolytického (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-glukanu v tabletovej forme

663.439

ING. VIERA MONCOLOVÁ, Pivovary a sladovne GRT, Výskumné pracovisko pre pivo a nealkoholické nápoje, 815 79 Bratislava
Ing. JIRÍ ZEMEK, CSc. a Ing. LUDOVÍT KUNIAK, CSc., Ústav biotechnológie, Slovenská vysoká škola technická, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: β -glukany, aktivita, mikroorganizmus, *Cetraria islandica*, celulóza

ÚVOD

Minoritnou zložkou bunečnej steny endospermu jačmenného zrna je polysacharidický prirodný analóg celulózy, obsahujúci poväčšine celotriózové jednotky viazané navzájom β -1,3 väzbami [1].

Vplyv tohto β -glukanu sa prejavuje predovšetkým počas priemyselného spracovania jačmeňa v pivovárníctve. Tento glukan zapríčiňuje zvýšenú viskozitu mladiny a piva a znižuje účinnosť extrakcie [2]. β -glukan sa čiastočne hydrolyzuje v priebehu sladovacieho procesu endogénnou sladovou β -glukanázou, enzýmom laminarinázového typu (endo-1,3- β -D-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.39) a čiastočne aj celulózou (endo-1,4- β -D-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.4). Rozhodujúci význam v tomto procese však má β -glukanáza lichenázového typu (endo-1,3; 1,4- β -D-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.73), v ďalšom len β -glukanáza [1, 3, 4]. β -glukanáza má zanedbateľnú aktivitu v jačmennom zrne, ale vzrastá v priebehu klíčenia zrna a v procese sladovania. Aktivita β -glukanázy v rôznych sladoch sa líši. Stanovenie aktivity sladovej β -glukanázy je dôležitým analytickým ukazovateľom kvality sladu, nakoľko v prípade nízkych hodnôt je nutné znižovať viskozitu mladiny pridávaním, poväčšine bakteriálnej β -glukanázy. Z tohoto dôvodu vyvinutie jednoduchšej a spoľahlivejšej metódy k stanoveniu β -glukanázovej aktivity v sladoch, resp. bakteriálnych enzýmových prípravkoch má význam pre ďalšie technologické spracovanie mladiny. Viskozimetrické metódy [1, 5, 6], alebo metódy založené na stanovení prírastku redukujúcich sacharidov [7] sú zdĺhavé, nepresné, s ohľadom na variabilitu použitých substrátov neštandardné, a preto nevhodné pre rutinnú analýzu. Za účelom rozpracovania štandardnej, jednoduchšej a dobre reprodukovateľnej metódy stanovenia β -glukanázovej aktivity bol vyvinutý tabletový test. Tableta použitá

k stanoveniu β -glukanázovej aktivity obsahuje chromolytický (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukan, mikrokryštalickú celulózu a všetky zložky potrebné k stanoveniu aktivity β -glukanázy. Použitý substrát je modifikovaný lichenan izolovaný z *Cetraria islandica* [8].

MATERIÁL A METÓDY

Enzymy. Sladová β -glukanáza bola extrahovaná z komerčných sladov postupom podľa [9]. Preparáty bakteriálnej β -glukanázy poskytla firma Prowiko VEB, Schönebeck/Elbe z NDR (*Bacillus licheniformis*), enzýmový preparát GPG-L firma Naarden Int. z Holandska a enzýmové preparáty Filtrase B a Filtrase AM firma Chemofarma z Rakúska. Tablety S-test Lichenáza boli pripravené v Ústave biotechnológie Slovenskej vysokej školy technickej, Bratislava (výrobu a distribúciu zabezpečuje spolu s kontrolným enzýmovým preparátom o deklarovanej aktivite JRD Priateľstva ČSSR-NDR, 930 37 Lehnice a JZD Agrokombinát (Agrogen), 763 15 Slušovice.

Referenčnou metódou bol postup využívajúci kyselinu 3,5-dinitrosalicylóvu (3,5-DNS) na stanovenie koncentrácie uvoľnených redukujúcich sacharidov [10]. Substrátom pri stanovení aktivity referenčnou metódou bol nativný lichenan (*Cetraria islandica*). Aktivita sa stanovovala pri 30 °C v prostredí fosfátového tlmivého roztoku (pH 7, 0,05 mol.l⁻¹) pre bakteriálnu β -glukanázu a vo fosfátovom tlmivom roztoku s HCl (pH 4,5; 0,05 mol.l⁻¹) pre sladový enzým. Enzýmová reakcia sa zastavila prídavkom zastavovacieho roztoku o zložení Na₂CO₃ (10 g) v 900 ml H₂O a 100 ml acetónu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri stanovení aktivity β -glukanázy S-testom Lichenáza v sladových extraktoch a bakteriálnych enzýmových pre-

Tabuľka 1. Postup stanovenia enzýmovej aktivity za použitia S-testu Lichenáza

	Pokusná vzorka (ml)	Slepý pokus (ml)
Tlmový roztok [0,05 mol.l ⁻¹]: fosfátový, pH 7 (bakteriálne enzymové preparáty), fosfátový, HCl, pH 4,5 (slad)	0,5	0,5
Extrakt sladu alebo mikrobiálny enzým	0,5	—
Predinkubácia 5 min pri 30 °C		
Prídavok jednej tablety so substrátom — inkubácia 60 min		
Prídavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Extrakt sladu alebo mikrobiálny enzým	—	0,5
Centrifugácia (3000 g, 5 min) alebo filtrácia, Whatman No 1 lebo Filtrak, Niederschlag, VEB (NDR)		
Zmeranie absorbancie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity enzýmu v slade pomocou kalibračnej krivky (μkat.kg ⁻¹)		

parátoch navrhujeme postup podľa schémy v tabuľke 1.

Z hľadiska štandardizácie, normalizácie a ujednotenia metodík stanovenia aktivity enzýmov je totiž výhodné, aby postup pri stanovení S-testom Lichenáza bol rovnaký, ako postup pri stanovení aktivít ďalších biotechnologicky významných hydrolytických enzýmov S-testami. Simultánne stanovenie aktivity β-glukanázy [B. licheni-

Obr. 1. Stanovenie β-glukanázovej aktivity S-testom Lichenáza (●) a štandardnou metódou s 3,5-DNS kyselinou (○).

Obr. 2. Kalibračná krivka pre metódu s 3,5-DNS kyselinou na D-glukózu.

Obr. 3. Kalibračná krivka $a = f(A_{620})$ k stanoveniu aktivity β-glukanázy z *B. licheniformis* S-testom Lichenáza.

formis] S-testom Lichenáza a štandardnou metódou za využitia 3,5-DNS kyseliny je znázornené na obr. 1. Kalibračná krivka pre metódu s 3,5-DNS kyselinou na D-glukózu je znázornená na obr. 2. Z uvedených grafických závislostí bola zostrojená kalibračná krivka pre prepočet absorbancie na aktivitu (obr. 3). V logaritmickom usporiadaní kalibračnú krivku možno vyjadriť vzťahom

$$\log a = k_1 \log A + k_2$$

kde a je aktivita enzýmu (μkat.kg⁻¹) a A absorbancia pri 620 nm a konštanty k_1 a k_2 sú závislé od spôsobu modifikácie lichenanu. Pre substrát použitý v pokuse (obr. 3) $k_1 = 0,919$ a $k_2 = 1,919$.

V tabuľke 2a sú zhrnuté výsledky stanovenia enzýmovej aktivity S-testom Lichenáza v sérii 10 opakovaných stanovení z toho istého zásobného sladového extraktu. Hodnota variačného koeficientu vyjadrujúceho presnosť stanovenia je 1,8 %.

V tabuľke 2b sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity enzýmu v 10 paralelných vzorkách extraktov, pripravených z jednej vzorky sladu. Variačný koeficient

Tabuľka 2a. Presnosť stanovenia β -glukanázovej aktivity v sérii. Opakované stanovenie (10) z toho istého zásobného sladového extraktu (slad F, viskozita 1,54 mPa.s, diastatická mohutnosť 245 j. W. K.)

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita (μ kat . kg ⁻¹)	Priemerná hodnota ($\bar{x}$)	Odchýlka od priemeru ($x_i - \bar{x}$)	Smerodajná odchýlka (s)	Variačný koeficient (%)
1	0,664	57,0	56,5	0,5	$\pm 1,0$	1,8
2	0,659	56,5		0		
3	0,631	55,0		-1,5		
4	0,663	57,0		0,5		
5	0,648	56,0		-0,5		
6	0,672	57,5		1,0		
7	0,664	57,0		0,5		
8	0,634	55,0		-1,5		
9	0,651	56,0		-0,5		
10	0,677	58,0		1,5		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 3)

Tabuľka 2b. Presnosť stanovenia β -glukanázovej aktivity v sérii. Opakované extrakcie (10) enzýmu z toho istého sladu a následné stanovenie aktivity enzýmu (slad J, viskozita 1,58 MPa.s, diastatická mohutnosť 245 j. W. K.)

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita (μ kat . kg ⁻¹)	Priemerná hodnota ($\bar{x}$)	Odchýlka od priemeru ($x_i - \bar{x}$)	Smerodajná odchýlka (s)	Variačný koeficient (%)
1	0,276	25,0	24,2	0,8	$\pm 0,9$	3,7
2	0,250	23,0		-1,2		
3	0,277	25,0		0,8		
4	0,264	24,5		0,3		
5	0,284	26,0		1,8		
6	0,253	23,5		-0,7		
7	0,261	24,0		-0,2		
8	0,257	24,0		-0,2		
9	0,253	23,5		-0,7		
10	0,257	24,0		-0,2		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 3)

zohľadňujúci presnosť stanovenia aktivity enzýmu S-testom, ako aj presnosť prevedenia extrakcie sladu je 3,7 %.

V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky stanovenia aktivity β -glukanázového komplexu sladu v 10 rôznych vzorkách sladov (pH 4,5) a 4 vzorkách mikrobiálnych enzýmov (pH 7), pričom jeden preparát (*Bacillus licheniformis*) bol pripravený v stabilizovanej forme ako vnútorný štandard metodiky s deklarovanou aktivitou enzýmu. Pre

Tabuľka 3. Štiepenie (1-3)/(1-4)- β -D-glukanu enzýmovým komplexom sladu a mikrobiálnymi enzýmovými preparátmi

Vzorka	Viskozita* (mPa . s)	Diastatická mohutnosť* (j. W. K.)	Aktivita (μ kat . kg ⁻¹)
slad A	1,57	255	28,0
slad B	1,70	215	36,5
slad C	—	255	44,0
slad D	1,55	250	27,5
slad E	1,58	245	26,5
slad F	1,54	245	38,5
slad G	1,58	240	45,0
slad H	1,54	235	21,5
slad I	1,54	220	46,0
slad J	1,56	245	22,5
Brew-N-zyne GPG-L	—	—	6280,0
Naarden Int., Holandsko	—	—	4330,0
Filtrase B, Chemopharma Rakúsko	—	—	4720,0
Filtrase AM, Chemopharma Rakúsko	—	—	11220,0
Brauerienzym, Prowiko VEB, NDR	—	—	—

* Hodnoty viskozity a diastatickej mohutnosti podľa atestu vydaného Výskumným ústavom pivovarským a sladárskym, pracovisko Brno

kompletnú štandardizáciu pracovného postupu a medzi-laboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test farebný štandard s deklarovanými hodnotami absorbancií (620 nm) pri 3 úrovniach.

ZÁVER

Z predložených postupov a výsledkov vyplýva, že stanovenie aktivity enzýmu β -glukanázy tabletovým S-testom Lichenáza predstavuje štandardný, jednoduchý a pritom presný postup, použiteľný aj v priemyselných laboratóriách, vybavených spektrofotometrami staršej generácie.

Literatúra

- [1] BAMFORTH, C. W.: *Brewers Digest*, **57**, 1982, s. 22
- [2] MCCLEARY, B. V., GLENNIE-HOLMES, M.: *J. Inst. Brew.*, **91**, 1985, s. 285—295
- [3] BATHGATE, G. N.: *J. Inst. Brew.*, **85**, 1979, s. 92
- [4] FICHER, G. B.: *J. Inst. Brew.*, **81**, 1975, s. 116
- [5] BOURNE, D. T., PIERCE, J. S.: *J. Inst. Brew.*, **76**, 1970, s. 328
- [6] WOODWARD, J. R., FINCHER, G. B.: *European J. Biochemistry*, **121**, 1981, s. 663
- [7] DENAULT, L., ALLEN, W. G., BOYER, E. W., COLLINS, D., KRAMMED, D., SPRADLIN, J. E.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **36**, 1978, s. 18
- [8] Pat. ČSSR PV 1977-87
- [9] McCleary, B. V., SHAMEER, I.: *J. Inst. Brew.*, **93**, 1987, s. 87
- [10] HLAVÁČEK, I., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: *Kvas. prům.*, **27**, 1979, s. 11

Lektoroval Ing. Jan Masák

Moncoľová, V. - Zemek, J. - Kuniak, E.: Stanovenie sladovej β -glukanázovej aktivity za použitia chromolytického (1-3)(1-4)- β -D-glukanu v tabletovej forme. *Kvas. prům.*, **34**, 1988, č. 6, s. 161—164.

Overovalo sa stanovenie β -glukanázovej aktivity tabletovým S-testom Lichenáza, ktorý obsahuje chromolytický (1-3)(1-4)- β -D-glukan (modifikovaný lichenan izolovaný z *Cetraria islandica*), mikrokryštalickú celulózu a ďalšie zložky. Navrhnutý postup sa porovnával so štandardnou metódou využívajúcou 3,5-dinitrosalicilovej kyseliny.

Hodnota variačného koeficientu vyjadrujúceho presnosť stanovenia β -glukanázovej aktivity v sérii 10 opakovaných stanovení z toho istého sladového extraktu je 1,8 %, variačný koeficient zohľadňujúci presnosť stanovenia aktivity enzýmu S-testom, ako aj presnosť prevedenia extrakcie sladu je 3,7 %.

Монцо́лова, В. - Земек, И. - Куняк, Л.: Определение солодовой β -глюканазовой активности с применением хромолитического (1-3) (1-4)- β -D-глюкана в таблетной форме. *Квас. прум.*, **34**, 1988, № 6, стр. 161—164.

Исследовалось определение β -глюканазовой активности при помощи таблетного S-теста Лихеназа, который содержит хромолитический (1-3) (1-4)- β -D-глюкан, модифицированный лихенат, изолированный из *Cetraria islandica*, микрокристаллическую целлюлозу и другие компоненты. Предложенный способ сопоставлялся с стандартным методом, использующим 3,5-динитросалициловую кислоту.

Величина коэффициента вариации выражающего точность определения β -глюканазовой активности в серии 10 повторяющихся определений из одного солодового экстракта составляет 1,8 %, коэффициент вариации, представляющий точность определения активности энзима S-тестом, также как и точность проведения экстракции солода 3,7 %.

Moncoľová, V. - Zemek, J. - Kuniak, E.: Determination of β -Glucanase Activity from Malt Using Chromolytic (1-3)(1-4)- β -D-Glucan in the Form of Tablets. *Kvas. prům.*, **34**, 1988, No. 6, pp. 161—164.

The determination of β -glucanase activity using tablet S-test Lichenase that contains the chromolytic (1-3) (1-4)- β -D-glucan (the modified lichenan isolated from *Cetraria islandica*), microcrystalline cellulose and further compounds was verified. The developed procedure was compared with the standard method based on 3,5-dinitrosalicylic acid. The accuracy of the determination of β -glucanase activity from 10 repeated determinations using the same malt extract was 1.8 %.

The accuracy of the enzyme activity determination using S-test as well as the accuracy of malt extraction were 3.7 %.

Moncořová, V. - Zemek, J. - Kuniak, L.: Bestimmung der β -Glukanase-Aktivität des Malzes bei Applikation des chromolytischen (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glukans in Tablettenform. Kvas. prům., 34, 1988, Nr. 6, S. 161—164.

Es wurde die Bestimmung der β -Glukanase-Aktivität mittels des Tabletten-S-Tests Lichenase überprüft, der chromolytisches (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glukan (modifiziertes aus

Cetraria islandica isoliertes Lichenat), mikrokristallische Zellulose und weitere Bestandteile enthält. Das vorgeschlagene Verfahren wurde mit der Standardmethode verglichen, bei der 3,5-Dinitrosalizylsäure benützt wird.

Der Wert des Koeffizienten, der die Genauigkeit der Bestimmung der β -Glukanase-Aktivität in einer Serie von 10 wiederholten Bestimmungen aus identischem Malzextrakt ausdrückt, betrug 1,8 %. Der Variationskoeffizient, der die Genauigkeit der Bestimmung der Enzymaktivität mittels S-Test sowie auch die Präzision der Durchführung der Extraktion des Malzes charakterisiert, war 3,7 %.