

Stanovenie aktivít α -amylázy a β -amylázy v sladoch tabletovým S-testom Sladová amyláza

663 431

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

Kľúčové slová: slad, amyláza, spektrofotometr, farebný štandard, tabletový S-test

ÚVOD

Z hľadiska sladovníctva kľúčovými enzýmami sú amylolytické enzýmy, a to predovšetkým α -amyláza (α -1,4-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.1) a β -amyláza (α -1,4-glukan maltohydroláza E.C.3.2.1.2). Dalším významným enzýmom je glukoamyláza (α -1,4-glukoamyláza E.C.3.2.1.3), schopná svojím účinkom narušovať α -1,6-väzby. Amyláza sladu (staršie označenie diastáza) je zmesou stekucujúcej α -amylázy a scukorňujúcej β -amylázy. Tieto enzýmy majú v technológii výroby piva základný význam v procese rmutovania, kedy sa podieľajú na tvorbe skvasiteľných sacharidov v extrakte získanej mladiny.

Zatiaľ čo scukorňujúca β -amyláza je aktívna už v jačmennom zrne, α -amyláza sa aktivuje v procese sladovania [1]. Dôkladná amylolýza škrobu je zabezpečená súčasným pôsobením obidvoch amylolytických aktivít, t.j. α -amylázy i β -amylázy. Zatiaľ čo α -amyláza je enzým pôsobiaci endo-mechanizmom, refazce α -1,4-glukanu škrobu atakuje v ktoromkoľvek mieste, β -amyláza ako exo-enzým pôsobí s neredukujúcich koncov refazcov a jej účinok končí 2–3 anhydroglukozylové jednotky od miesta vetvenia, podľa toho, či refazec obsahuje páry alebo nepáry počet jednotiek.

Nakoľko amylázy majú v pivovarníckej technológii rozhodujúci význam, je potrebné zabezpečiť jednoduchú, spoľahlivú a správnu metodiku k stanoveniu ich aktivít.

Základné, doteraz používané metódy stanovenia aktivít amyláz sa zakladajú na meraní prírastku reakčného produktu, napr. sacharogénne metódy [2] alebo rádiometrické metódy [3], úbytku substrátu, alebo na základe zmien fyzikálnochemických vlastností škrobového substrátu (zmeny viskozity [4], nefelometrické metódy a pod.). Vzhľadom na neštandardnosť substrátu, zložitosti vykonania analýzy, rôznu citlivosť a špecifitu neumožňujú tieto metódy unifikáciu a nie sú preto vhodné k rutínnej analýze.

Chromolytické substráty boli zavedené v roku 1967. Vtedy Rinderknecht použil reaktívne farbivo, ktoré naviazal na škrob a tak dal základ novému smeru v analýze aktivít enzýmov [5]. Dnes sú na tomto princípe známe viaceré firemné súpravy na stanovenie amylolytických aktivít — ako napr. Amylochrome (Hoffmann — La Roche), Dy-Amyl (General Diagnostics — Gödecke), Phadebas (Pharmacia, Uppsala), Spofa Test (Slovakofarma, Hlohovec) a ďalšie, ktoré umožňujú pomerne jednoduché stanovenie α -amylázovej aktivity. Nevýhodou uvedených súprav je ich technické riešenie, ktoré zodpovedá vlastnostiam amyláz telových tekutín — sú

vhodné pre klinicko-biochemickú diagnostiku, ale nie pre stanovenie aktivít amyláz iného pôvodu.

K stanoveniu aktivity α -amyláz a β -amyláz v slade bol vyvinutý špeciálny chromolytický substrát, ktorý rešpektuje vlastnosti uvedených enzýmov [6,7]. Tento substrát je súčasťou tablety, ktorá obsahuje mikrokryštalickú celulózu a ďalšie zložky, potrebné k stanoveniu α - a β -amyláz. V predloženej práci sa prezentujú skúsenosti s rutínnym využívaním tohto tabletového testu.

MATERIÁL A METÓDY

Príprava extraktu sladových amyláz. Predsušený slad sa rozomliel na sladovom mlynčeku Retsch (1800 min^{-1}). Rozomletý slad (3 g) sa extrahoval 15 ml 20% etanolu, za miešania na magnetickej miešačke (3000 min^{-1}) po dobu 15 minút. Extrakt sa centrifugoval (3000 g , 5 min). Uvedený zmesný sladový extrakt, pripravený z 50 sladov rôzneho pôvodu, sa použil k stanoveniu amylolytických aktivít [8]. Tabletový S-test Sladová amyláza bol pripravený v Ústave biotechnológie Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave (výrobu a distribúciu zabezpečuje spolu s kontrolným enzýmovým preparátom o deklarovanej aktivite CHZJD, Pavilón diagnostík a biochemikálií, Bratislava a JZD Agrokombinát (Agrogén), 763 15 Slušovice.

Referenčnou metódou bol postup využívajúci kyselinu 3,5-dinitrosalicylovú (3,5-DNS) na stanovenie voľných redukujúcich sacharidov [8]. Substrátom pri stanovení aktivity s 3,5-DNS bol škrob „Stärke löslich“ p.a. od fy Merck (NSR). Aktivita sa stanovovala pri 30°C v prostredí fosfátového tlmivého roztoku (pH 5,0; $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) rovnako pre α -amylázu a β -amylázu. Ako inhibítor α -amylázy pri stanovení β -amylázy sa použila EDTA v tabletovej forme, ako súčasť súpravy. Aktivita β -amylázy pri stanovení α -amylázy bola eliminovaná krátkym reakčným časom.

Enzymová reakcia s S-testom Sladová amyláza sa zastavila prídavkom zastavovacieho roztoku o zložení Na_2CO_3 (10 g) v 900 ml H_2O a 100 ml acetónu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri stanovení aktivít α -amyláz a β -amyláz S-testom Sladová amyláza v sladových extraktoch navrhujeme postup podľa schémy v tabuľke 1. Postup pri stanovení aktivít amylolytických enzýmov je rovnaký ako postup pri stanovení β -glukanáz S-testom Lichenmetáza, čo je výhodou pri štandardizácii a normalizácii metód.

Paralelné stanovenie aktivity enzýmu α -amylázy S-testom

Tabuľka 1. Postup stanovenia α - a β -amylázovej aktivity použitím S-testu Sladová amyláza

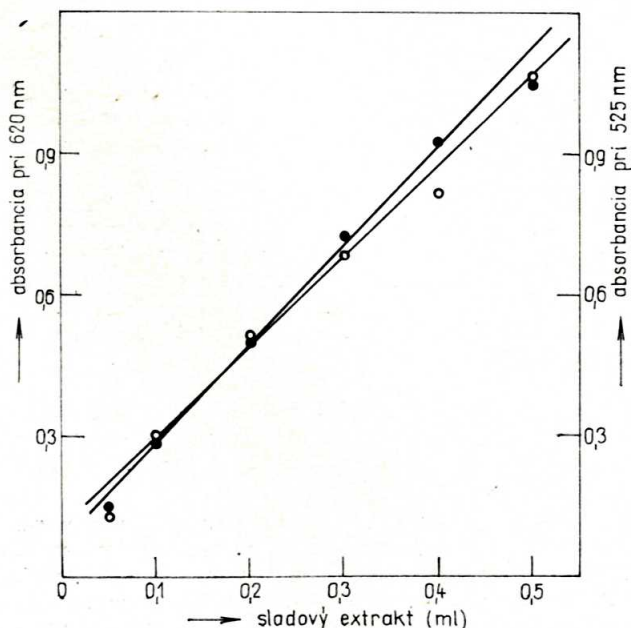
	Stanovenie		Slepý pokus
	α -amylázy	β -amylázy	
Fosfátový tlmičový roztok (0,05 mol.l ⁻¹ , pH=5)	1 ml	1 ml	1 ml
Extrakt sladu	0,1 ml	0,1 ml	—
Prídavok 1 tbl. EDTA	—	+	—
Teplota 5 min pri 50 °C	—	+	—
Teplota 5 min pri 30 °C	+	+	+
Prídavok 1 tbl. substrátu	+	+	+
Inkubácia pri 30 °C	15 min.	4 h	—
Prídavok zastavovacieho roztoku	4 ml	4 ml	4 ml
Extrakt sladu	—	—	0,1 ml
Centrifugácia (3000 g, 5 min) alebo filtrácia, Whatman No 1 alebo Filtrak filtračný papier, Niederschlag VEB, NDR			
Zmeranie absorbancie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm			
Prepočet aktivity enzýmu v slade pomocou kalibračnej krivky ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)			

tom Sladová amyláza a štandardnou metódou za využitia 3,5-DNS kyseliny je znázornené na obr. 1. Kalibračná krivka pre metódu s 3,5-DNS na glukózu je znázornená na obr. 2. Z uvedených grafických závislostí bola zostrojená kalibračná krivka pre prepočet absorbancie na aktivitu (obr. 3).

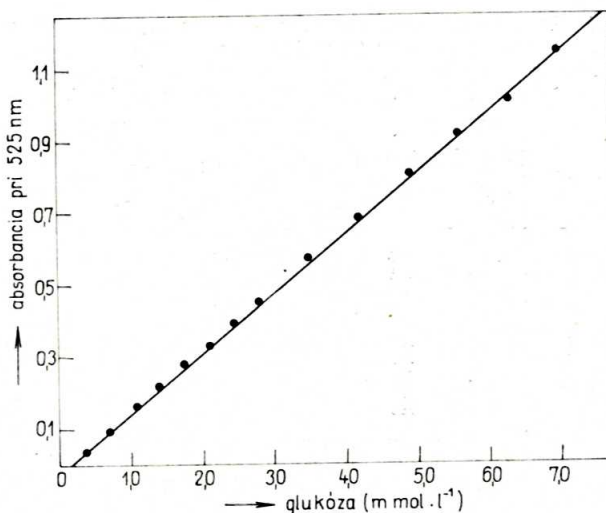
Kalibračná krivka pre amylolýzu chromolytického škrobového substrátu v tablete S-test Sladová amyláza je daná vzťahom:

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

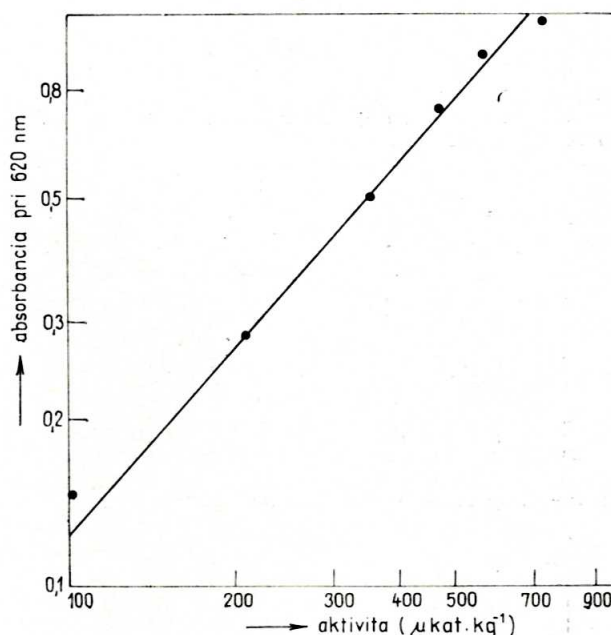
kde a je aktivita enzýmu ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$) a A je absorbancia pri 620 nm a konštanty k_1 a k_2 sú závislé od spôsobu modifikácie škrobového substrátu. Pre použitý substrát v pokuse (obr. 3) $k_1 = 0,892$; $k_2 = 2,799$.



Obr. 1. Stanovenie aktivity enzýmu α -amylázy S-testom Sladová amyláza (●) a štandardnou metódou za využitia 3,5-DNS kyseliny (○)



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



Obr. 3. Kalibračná krivka $a = f(A)$ stanovenia aktivity sladovej α -amylázy pre S-test Sladová amyláza

V tabuľke 2a sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia α -amylázovej aktivity S-testom Sladová amyláza v sérii 10 opakovaných stanovení z toho istého zásobného sladového extraktu. Pre aktivitu enzýmu α -amylázy 278 $\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$ hodnota variačného koeficientu $v_k = 2,1\%$. V tabuľke 2b sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity α -amylázy v 10 paralelných extraktoch, pripravených z jednej vzorky sladu. Variačný koeficient zohľadňujúci presnosť stanovenia aktivity enzýmu S-testom, ako aj presnosť prevedenia extrakcie sladu $v_k = 4,1\%$.

Účinkom β -amylázy vzniká jednotný produkt maltóza. Pri výpočte aktivity β -amylázy vychádzame z hodnoty A_t tablety, t.j., z hodnoty absorbancie, zistenej po úplnej hydrolýze chromolytického škrobu ako substrátu v tablete a zo známeho množstva substrátu v tablete. Aktivita β -amylázy v neznámej vzorke sladu sa vypočítava podľa vzorca:

$$a = \frac{A}{A_t} \cdot k \quad (\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1})$$

kde A je absorbancia zmeraná vo vzorke sladového extraktu,

Tabuľka 2a. Presnosť stanovenia α -amylázovej aktivity v sérii S-testom Sladová amyláza. Opakované stanovenie [10] z toho istého sladového extraktu (slad A, diastatická mohutnosť 255 j.W.K., bielkoviny v sušine 11,4 %).

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Priemer. hodnota	Odchýlka od priemeru	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient (%)
1	0,395	275	278	-3	$\pm 5,8$	2,1
2	0,395	275		-3		
3	0,401	280		2		
4	0,407	285		7		
5	0,381	265		-13		
6	0,410	285		7		
7	0,402	280		2		
8	0,400	280		2		
9	0,397	280		2		
10	0,400	280		2		

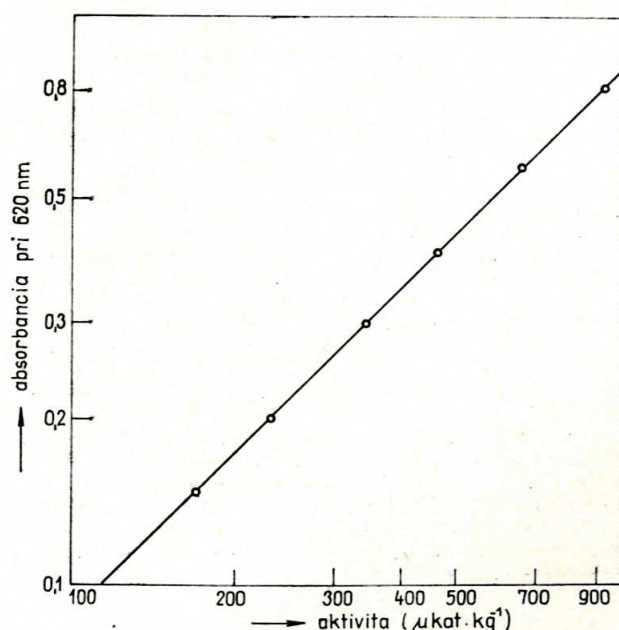
Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 3)

A_t — absorbancia nameraná po totálnej amylolýze chromolytického škrobu v tablete (udaná výrobcom),
 k — ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$) je konštanta zohľadňujúca reakčnú dobu a zriedňovacie pomery; číselne sa rovná takej

Tabuľka 2b. Presnosť stanovenia α -amylázovej aktivity S-testom Sladová amyláza v sérii. Opakované extrakcie [10] enzýmu z toho istého sladového extraktu a následné stanovenie aktivity enzýmu (slad B, diastatická mohutnosť 245 j.W.K., bielkoviny v sušine 10,8 %)

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Priemer. hodnota	Odchýlka od priemeru	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient (%)
1	0,347	245	241	4	$\pm 9,9$	4,1
2	0,330	235		-6		
3	0,331	235		-6		
4	0,342	240		-1		
5	0,322	230		-11		
6	0,377	265		24		
7	0,349	245		4		
8	0,349	245		4		
9	0,326	235		-6		
10	0,332	235		-6		

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



Obr. 4. Kalibračná krivka $a = f(A)$ stanovenia aktivity sladovej β -amylázy pre S-test Sladová amyláza

aktivite enzýmu, ktorá spôsobuje totálnu amylolýzu chromolytického škrobu v tablete (udaná je výrobcom).

Aktivitu β -amylázy potom možno vyjadriť pre danú výrobnú šaržu kalibračnou krivkou (obr. 4). Pre uvedenú grafickú závislosť, hodnota $A_t = 7$ a hodnota $k = 8125$.

Tabuľka 3. Hodnoty α -amylázovej a β -amylázovej aktivity vo vzorkách sladov rôzneho pôvodu

Vzorka	Diastatická mohutnosť* (j. W. K.)	Bielkoviny v sušine* (%)	Aktivita	
			α -amylázy ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)	β -amylázy ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)
A	260	11,1	230	308
B	240	10,8	375	933
C	245	11,7	330	254
D	255	11,4	255	540
E	220	11,5	470	952
F	215	10,8	500	807
G	255	11,0	450	746
H	255	10,8	315	933
CH	255	11,1	375	886
I	240	10,6	410	446

* Hodnoty diastatickej mohutnosti a bielkovín v sušine podľa atestu vydaného Výskumným ústavom pivovarským a sladárskym, pracovisko Brno

V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky stanovenia aktivity α -amylázy a β -amylázy v 10 vzorkách sladov rôzneho pôvodu. Pre kompletnú standardizáciu pracovného postupu a medzilaboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test Farebný štandard s deklarovanými hodnotami Sladová amyláza.

Literatúra

- [1] MOŠTEK, J.: Sladařství, SNTL Praha, 1975
- [2] SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem., **12**, 1952, s. 125
- [3] Pat. ČSSR 204 179
- [4] BLOM, J., BAK, A. Z.: Z. phys. Chem., **256**, 1938, s. 197
- [5] RINDERKNECHT, H.: Experientia, **23**, 1976, s. 805
- [6] Pat. ČSSR 192 210
- [7] ZEMEK, J., KUNIAK, E., MATUSOVÁ, A.: Makromol. Chem. Suppl., **9**, 1985, s. 219
- [8] HLAVÁČEK, I., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 241

Lektoroval Ing. Jan Masák, CSc.

Moncoľová, V. — Zemek, J. — Kuniak, E.: Stanovenie aktivít α -amylázy a β -amylázy v sladových tabletových S-testom Sladová amyláza. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 10, s. 290—293.

Stanovenie aktivity α - a β -amylázy tabletovým S-testom Sladová amyláza predstavuje štandardný, jednoduchý a pritom presný postup, použiteľný aj v laboratóriách vybavených spektrofotometrami staršej generácie. Výsledky však možno semikvantitatívne odčítať aj pomocou spomenutej série farebných štandardov, bez použitia spektrofotometrov.

Монцолова, В., Земек, И., Куньяк, Л.: Определение активностей α -амилазы и β -амилазы в солодах при помощи таблестного С-теста Солодовая амилаза. Квас. прум., **34**, 1988, № 10, стр. 290—293.

Определение активности α - и β -амилаз при помощи таблестного С-теста Солодовая амилаза представляет собой стандартный, простой и притом точный способ, применимый и в лабораториях, оснащенных спектрофотометрами старшей генерации. Результаты однако можно полуколичественно вычитать также при помощи приведенной серии цветных стандартов без применения спектрофотометров.

Moncořová, V. — Zemek, J. — Kuniak, E.: Determination of Activities of α -Amylase and β -Amylase in Malts Using Tablets S-Test Malt Amylase. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 10, pp. 290—293.

The method of the determination of activities of α - and β -amylases using tablets S-test malt amylase is standard, simple and correct. This method can be applied in laboratories equipped with spectrophotometers. There is also another possibility how to obtain approximate results without the use of any spectrophotometer — using colour standards.

Moncořová, V. — Zemek, J. — Kuniak, E.: Die Bestimmung der Aktivitäten der α -Amylase und β -Amylase in Malz mittels Tabletten-S-Test Malzamyase. Kvas. prům. **34**, 1988, Nr. 10, S. 290—293.

Die Bestimmung der Aktivität der α - und β -Amylase mittels Tabletten-S-Test Malzamyase stellt ein einfaches und zugleich präzises Standardverfahren dar, das auch in den Laboratorien anwendbar ist, die mit Spektrophotometern älterer Generation ausgestattet sind. Die Ergebnisse können jedoch auch ohne Spektrophotometer mittels der erwähnten Serie der Farbstandarde ermittelt werden.