

Stanovenie α -amylázovej aktivity v obilninách pomocou eS-testu Amyláza

Ing. JIŘÍ ZEMEK, CSc, Ing. VIERA HOMOLOVÁ, Bioeffect, Bratislava

Kľúčové slová: α -amyláza, aktivita, tabletový eS-test, spektrofotometer

579 663

ÚVOD

Stanovenie aktivity α -amylázy (1,4 - α -D-glukan-glukanohydroláza; EC 3.2.1.1) v obilninách je dôležité z viacerých hľadísk. Tak vhodnosť múky pre pekárske účely určuje obsah gluténu dobrej kvality [1, 2], a primeraná α -amylolytická aktivita [3]. Amylolytické preparáty fungálneho alebo bakteriálneho pôvodu pridávané do pekárenských výrobkov zapríčiňujú horšie senzorické hodnotenie týchto výrobkov v porovnaní s výrobkami pripravenými s dostatočnou len cereálnou α -amylázovou aktivitou [4, 5].

Stanovenie aktivity α -amylázy v obilninách je dôležité pre zisťovanie stupňa naklíčenia zrna (degree of sprouting), prípadne pri testovaní na odolnosť voči klíčeniu pre šľachtiteľskú prax. Hoci stupeň naklíčenia zrna stanovený vizuálne všeobecne koreluje s produkciou amylázy, občas sa vyskytnú prípady, že zrná s pomerne dlhým klíčením majú nízku amylázovú aktivitu a naopak zrná vizuálne hodnotené bez známok klíčenia majú vysokú amylázovú aktivitu [6]. Priamym stanovením aktivity α -amylázy možno na rozdiel od vizuálnych metód detekovať už tzv. "skrytú" klíčivosť [7] a diferencovať vzorky s rôznym stupňom naklíčenia zrna.

Aktivitu α -amylázy je možné stanoviť niekoľkými spôsobmi, ktoré sú založené na schopnosti amylázy hydrolyzovať škrob [8]. Prvú skupinu tvoria metódy viskozimetrické, ktorými sa meria zníženie viskozity škrobovej suspenzie. Do tejto skupiny patrí i známa metóda čísla viskozity (falling number) [9, 10], ktorá využíva pre meranie aktivity aj substrátu vlastnej vzorky. Druhú skupinu tvoria metódy, ktorými sa meria zvýšenie redukčnej mohutnosti škrobového roztoku [11, 12] a tretiu skupinu metódy, ktorými sa meria úbytok zafarbenia komplexu škrob - J_2 . Uvedené metódy sú však obecné buď komplikované, časovo náročné alebo nedostatočne presné a citlivé (jódo-škrobová metóda).

V roku 1967 sa objavila metóda na stanovenie aktivity α -amylázy v práci Rinderknecht a kol. [13], ktorý použil ako substrát škrob s kovalentne naviazaným farbivom. Účinkom enzýmu na takýto substrát vzniká farebný roztok, absorbanciu ktorého možno merať kolorimetricky a je lineárne závislá od koncentrácie α -amylázy. V roku 1974 Barnes a Blakeney [14] publikovali úspešné použitie komerčného preparátu obsahujúceho Cibachron-blue amylázový substrát na stanovenie α -amylázy v cereáliách. V náväznosti na túto prácu Mathewson a Pomeranz v roku 1977 a 1979 publikovali využitie tejto kolorimetrickej metódy pre vyhodnotenie stupňa naklíčenia obilnín [15, 16] a u nás Hubík [7]. Aj keď uvedená metóda sa ukázala ako vhodná, dostatočne rýchla a výsledky ňou získané na sérii vzoriek pšeníc obsahujúcich od 0 do 5 % naklíčených zŕn boli v lineárnej závislosti k výsledkom získaných metódou čísla viskozity a amylografu, presnosť výsledkov medzi rôznymi laboratóriami bola nízka [17]. Požiadavkou praxe bolo štandardizovať túto metódu, čo si vyžiadalo zavedenie uniformného automatického prístroja na stanovenie α -amylázy, s použitím ktorého sa presnosť výsledkov medzi rôznymi laboratóriami značne vylepšila. Mathewson a Pomeranz vo svojich ďalších prácach [8, 18] prezentujú výsledky získané použitím nového komerčne dostupného analyzátoru na stanovenie α -amylázy vyrobeného D & S Instrument, Ltd., Pullman, WA 99163, s použitím ktorého sa metóda zjednodušila. Extrakcia α -amylázy a jej reakcia so substrátom prebieha simultánne, čím sa zvýšila aj rýchlosť stanovenia a pritom presnosť metódy ostala vyhovujúca, nakoľko vzorky pšeníc s obsahom naklíčených zŕn od 0 do 8 % boli spoľahlivo rozlíšené.

Na stanovenie aktivity α -amylázy v cereáliách je možné použiť novovyvinutú súpravu eS-test Amyláza, výrobok firmy Bioeffect, Bratislava [19, 20]. Tablety tohto testu obsahujú chromolytický škrobový substrát rešpektujúci vlastnosti uvedených enzýmov, mikrokryštalickú celulózu a ďalšie zložky potrebné na stanovenie aktivity α -amylázy.

V predloženej práci sú prezentované výsledky s použitím tohto tabletového testu pri priamom stanovení aktivity α -amylázy v obilninách.

MATERIÁL A METÓDY

Príprava extraktu pšeničnej amylázy

Pšenica sa pomelie na mlynčeku Retsch (1 800.min⁻¹). Pomletá pšenica (3g) sa extrahuje 15 ml 20% etanolu na laboratórnej trepačke po dobu 30 min. Extrakt sa odstredí

(3 000 x g, 10 min) a supernatant sa použije na stanovenie aktivity α -amylázy [21]. Rovnakým postupom možno pripraviť aj extrakty z iných obilnín, napr. jačmeňa, raže atď.

Zmesný pšeničný extrakt pripravený z 20 pšeníc rôzneho pôvodu sa použil na konštrukciu kalibračných kriviek uvedených v kapitole Výsledky a diskusia.

Tabletový eS-test Amyláza bol pripravený podľa [22]. Jeho výrobu a distribúciu zabezpečuje spolu s kontrolným enzýmovým preparátom o deklarovanej aktivite firma Bioeffect, Bratislava.

Enzýmová reakcia s eS-testom Amyláza sa zastavila prídavkom zastavovacieho roztoku o zložení 10 g uhličitanu sodného v 900 ml destilovanej vody a 100 ml acetónu.

Na prepočet absorbancie nameranej pri 620 nm metódou eS-test Amyláza na aktivitu v $\mu\text{kat.kg}^{-1}$ je potrebná kalibračná krivka. Preto k metóde eS-test bola použitá referenčná metóda využívajúca kyselinu 3,5-dinitrosalicylovú (3,5-DNS, ktorou je možné uvoľnené redukujúce sacharidy ako produkty enzýmovej reakcie stanoviť [21]. Substrátom pri tejto metóde bol škrob "Stärke löslich" p.a. od fy Merck (10 mg.ml⁻¹). Aktivita sa stanovovala pri 30 °C v prostredí fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol.l⁻¹; pH=6,0), pričom reakčný čas bol 15 minút.

Extrakt pšeničnej amylázy bol pre túto metódu ešte zriedený 20% etanolom v pomere 1 : 19, čím bolo aj množstvo redukujúcich látok pôvodne prítomných v pšeničnom extrakte znížené na hodnotu, ktorá nerušila stanovenie redukujúcich sacharidov uvoľnených enzýmovou hydrolýzou škrobu.

Na určenie pH optima aktivity α -amylázy metódou eS-test boli pripravené fosfátové tlmivé roztoky (0,05 mol.l⁻¹) v rozsahu pH 4,0 až 7,0. Tieto boli pripravené zmiešavaním dvoch základných fosfátových tlmivých roztokov - dihydrogénfosforečnanu sodného (0,05 mol.l⁻¹) a hydrogénfosforečnanu sodného (0,05 mol.l⁻¹) a nastavením na digitálnom pH-metri fy Radelkis.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na stanovenie aktivity α -amylázy v pšenici eS-testom Amyláza sme vypracovali postup uvedený v tabuľke 1. Uvedený postup možno s malými modifikáciami (vhodné pH reakčného roztoku a inkubačná doba) použiť aj na stanovenie α -amylázovej aktivity v iných obilninách, napr. jačmeni, raži, atď.

Pretože aktivita α -amylázy je závislá na pH, bolo v prípade troch obilnín - pšenice, jačmeňa a raže určené pH optimum α -amylázovej aktivity z nich extrahovanej. Ako vyplýva z grafických závislostí na obr. 1, vo všetkých troch prípadoch leží pH optimum v oblasti pH 6,0. Na osi y je síce uvedená hodnota absorbancie pri 620 nm určená metódou eS-test, avšak táto je úmerná aktivite enzýmu. Substrátové tablety eS-test Amyláza nie sú pufrované, takže poskytujú správne výsledky závislosti aktivity od pH reakčného roztoku, čo nie je možné tvrdiť s použitím pufrovaných tabliet Spofa-test α -amyláza (pH 7,2), ktoré použil vo svojej práci [7] Hubík a získal odlišné výsledky.

Za účelom konštrukcie kalibračnej krivky $a = f(A_{620})$, kde a je aktivita α -amylázy v $\mu\text{kat.kg}^{-1}$ a A je absorbancia

pri 620 nm určená metódou eS-test, boli vykonané následovné pokusy. Pre sedem rôznych alikvotných prídavkov zmesného pšeničného extraktu bola paralelne stanovená absorbancia ich reakčných roztokov metódou eS-test Amyláza a referenčnou metódou zostrojená kalibračná krivka na D-glukózu - znázornená na obr. 3. Využitím tejto kalibračnej krivky boli hodnoty absorbancie namerané referenčnou metódou premenené na hodnoty uvoľnených redukujúcich sacharidov a tieto boli ďalej prepočítané (zahrnutím zriedovacích pomerov a reakčného času) na hodnoty enzýmových aktivít v $\mu\text{kat.kg}^{-1}$.

Tab. 1. Postup stanovenia α -amylázovej aktivity použitím eS-testu Amyláza

	Pokusná vzorka (ml)	Slepý pokus (ml)
Fosfátový tlmivý roztok (0,05 mol.l ⁻¹ , pH 6,0)	0,9	0,9
Extrakt pšenice	0,1	-
Predinkubácia 5 min pri 30 °C		
Prídavok jednej substrátovej tablety eS-test Amyláza - inkubácia 30 min pri 30 °C		
Prídavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Extrakt pšenice	-	0,1
Odstredenie (3 000 g, 5 min) alebo filtrácia, Whatman No. 1 alebo Filtrak No. 595		
Zmeranie absorbancie číreho supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity α -amylázy v pšenici pomocou kalibračnej krivky ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)		

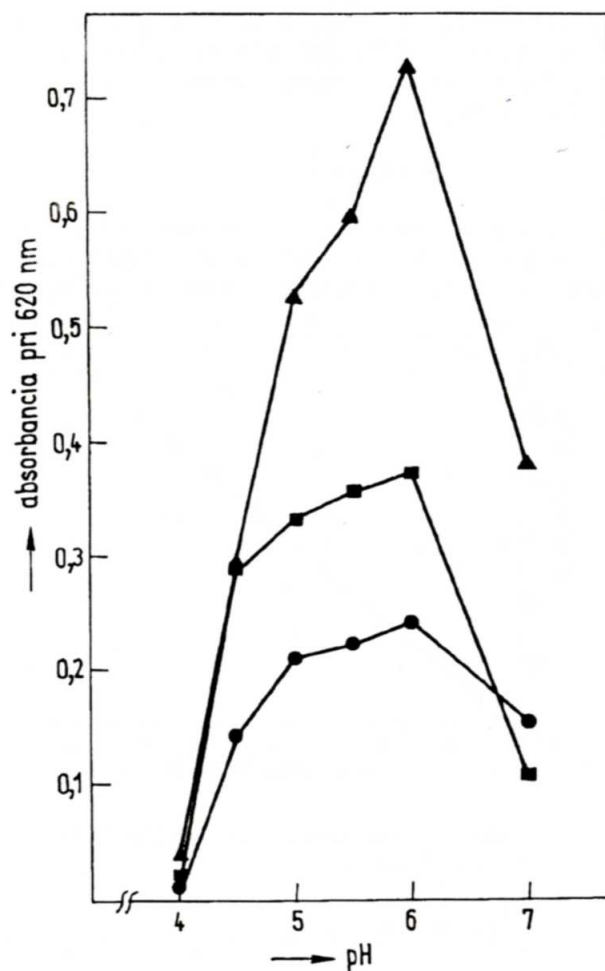
Aktivita β -amylázy pri stanovení je eliminovaná použitím škrobu v tablete eS-testu, sieťovaného tak, aby sa neuplatnili účinky amylolytických enzýmov pôsobiacich exo-mechanizmom (20).

Tab. 2. Presnosť stanovenia α -amylázovej aktivity v sérii eS-testom Amyláza. Opakované stanovenie (10) z toho istého pšeničného extraktu.

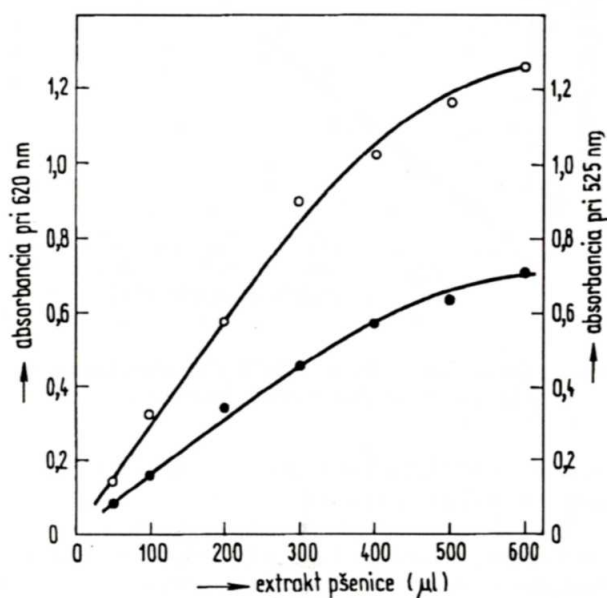
Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Priemer. hodnota	Odhýlka od priemeru	Smerodajná odchyľka	Variačný koeficient (%)
1	0,396	490	496	-6	$\pm 9,7$	1,9
2	0,395	490		-6		
3	0,401	500		4		
4	0,407	505		9		
5	0,381	475		-21		
6	0,410	510		14		
7	0,402	500		4		
8	0,400	500		4		
9	0,397	495		-1		
10	0,400	500		4		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 4)

Vynesením vypočítaných hodnôt enzýmových aktivít k prislúchajúcim hodnotám absorbancie nameranej pri 620



Obr. 1. Závislosť aktivity α -amylázy (vyjadrenie v jednotkách absorbancie) extrahovanej z pšenice (●), jačmeňa (■) a raže (▲) od pH reakčného roztoku.

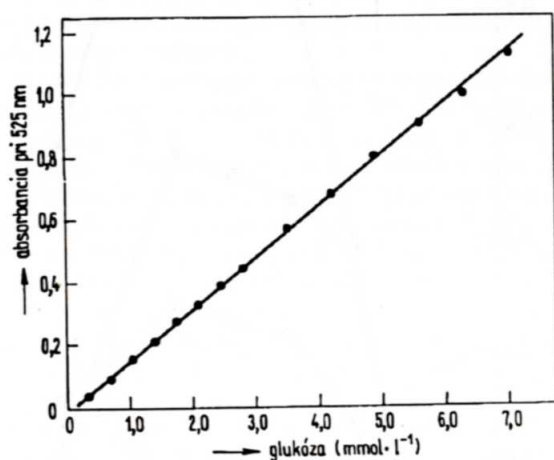


Obr. 2. Vzťah medzi hodnotou absorbancie a objemom pridaného pšeničného extraktu pri metóde eS-test Amyláza (●) a pri referenčnej metóde (○).

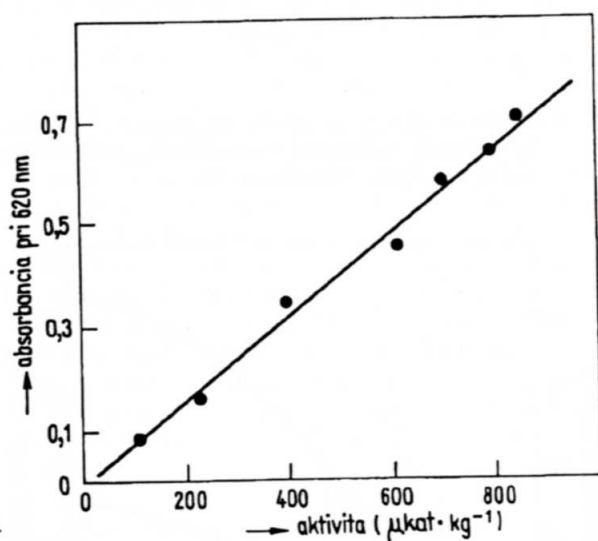
nm bola zostrojená kalibračná krivka pre metódu eS-test Amyláza (obr. 4). Kalibračná krivka pre aktivitu α -amylázy (v 1 kg obilnín) pomocou tabletového eS-testu Amyláza je daná vzťahom

$$a = k_1 A + k_2,$$

kde a je aktivita α -amylázy ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$) a A je absorbancia pri 620 nm, k_1 a k_2 sú konštanty závislé od stupňa sieťovania použitého škrobového substrátu [20]. Pre



Obr. 3. Kalibračná krivka pre referenčnú metódu s 3,5-DNS kyselínou na D-glukózu.



Obr. 4. Kalibračná krivka $a = f(A_{620})$ na stanovenie aktivity pšeničnej α -amylázy eS-testom Amyláza.

substrát v tabletách eS-test Amyláza použitých v našom pokuse $k_1 = 1228,6$ a $k_2 = 6,4$.

V tabuľke 2 sú zhrnuté výsledky stanovenia α -amylázovej aktivity eS-testom Amyláza v sérii 10 opakovaných stanovení z toho istého pšeničného extraktu. Pre aktivitu α -amylázy $496 \mu\text{kat.kg}^{-1}$ bola hodnota variačného koeficientu $v_k = 1,9 \%$. V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity α -amylázy v 10 paralelných

extraktoch, pripravených z jednej vzorky pšenice. Variačný koeficient zohľadňujúci presnosť stanovenia aktivity enzýmu eS-testom, ako aj presnosť vykonania extrakcie pšenice $v_k = 4,9 \%$. Hodnoty obidvoch variačných koeficientov vyhovujú požiadavkám presnosti metódy eS-test.

Tab. 3. Presnosť stanovenia α -amylázovej aktivity eS-testom Amyláza v sérii. Opakované extrakcie (10) enzýmu z tej istej pšenice a následné stanovenie aktivity enzýmu.

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Priemer. hodnota	Odhýlka od priemeru	Smerodajná odchyľka	Variačný koeficient (%)
1	0,347	430	423	7	$\pm 20,8$	4,9
2	0,330	410		-13		
3	0,331	410		-13		
4	0,342	425		2		
5	0,322	400		-23		
6	0,377	470		47		
7	0,349	435		12		
8	0,349	435		12		
9	0,326	405		-18		
10	0,332	410		-13		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 4)

Tab. 4. Hodnoty α -amylázovej aktivity vo vzorkách pšenice stanovené metódou eS-test Amyláza

Vzorka	Kypré pečivo	Crackery	Aktivita α -amylázy ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)
1	-	-	90
2	+	-	125
3	+	-	175
4	+	-	350
5	+	-	460
6	-	-	675
7	-	+	975
8	-	+	1 040
9	-	+	1 225
10	-	+	2 093

V tabuľke 4 uvádzame hodnoty α -amylázy stanovené metódou eS-test Amyláza v 10 náhodne vybraných vzorkách pšenice a ich vhodnosť pre prípravu múky pre pekárské účely. Ako z tabuľky vyplýva, pre pečenie kyprého pečiva vyhovuje múka z pšenice o aktivite α -amylázy v rozsahu $125 - 460 \mu\text{kat.kg}^{-1}$ a pre crackery, bisquity, kekсы a pod. múky z pšeníc s aktivitou vyššou ako $975 \mu\text{kat.kg}^{-1}$.

Výsledky v tabuľke ilustrujú značnú rozdielnosť v nameraných hodnotách α -amylázy v pšeničiach a sú predpokladom pre presné určenie stupňa naklíčenia zrna na rozdiel od vizuálnych metód posudzovania.

LITERATÚRA

- [1] BOTH M.R., MELVIN M.A.: J.Sci. Food Agric., **30**, 1979, s. 1057
- [2] MAC RITCHIE F.: J. Food Technol., **13**, 1978, s. 187
- [3] WARCHALEWSKI J.R.: Roczniki AR-Poznań, **82** 1978, s. 5
- [4] WARCHALEWSKI J.R., KLOCKIEWICZ-KAMINSKA E.: The influence of α -amylase supplementation as well as long time of storage of wheat grain on dough rheological properties and bread bading performance, In: Developments in Food Science, Progress in Cereal Chemistry and Technology (HOLAS J., KRATOCHVIL J., eds), **5**, Elsevier, Amsterdam 1983, s. 361
- [5] POMERANZ Y., FINNEY K.F.: The Bakers Digest., **42**(5), 1975, s. 64
- [6] MEREDITH P.: Aspects of field - sprouting of wheat, In: Developments in Food Science, Progress in Cereal Chemistry and Technology (HOLAS J., KRATOCHVIL J., eds), **5**, Elsevier, Amsterdam 1984, s. 127
- [7] HUBÍK K.: Mlýnsko-pekárenský průmysl, č. 12, 1987, s. 355
- [8] MATHEWSON P.R., FAHRENHOLZ C.H., BOOTH G.D., POMERANZ Y., MILLER B.S.: Results of collaborative testing using a simplified, rapid colorimetric α -amylase assay for evaluation of sprout damage in wheat, Cereal Chem., **59**, 1982, s. 108
- [9] HAGBERG S.: Cereal Chem., **38**, 1961, s. 202
- [10] PERTEN H.: Cereal Chem., **41**, 1964, s. 127
- [11] BERNFELD P.: Methods in Enzymology, I. Academic Press, New York, 1955, s. 149
- [12] ROBYT J.F., WHELAN W.J.: Starch and derivatives LTD, London, 1968, s. 430
- [13] RINDERKNECHT H., WILDING P., HAVERBACK B.J.: Experientia **23**, 1967, s. 805
- [14] BARNES W.C., BLAKENEY A.B.: Die Stärke **26**, 1974, s. 193
- [15] MATHEWSON P.R., POMERANZ Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **60**, 1977, s. 16
- [16] MATHEWSON P.R., POMERANZ Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **62**, 1979, s. 198
- [17] MATHEWSON P.R., et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64**, 1981, s. 1243
- [18] MATHEWSON P.R., FAHRENHOLZ C.H., POMERANZ Y.: Cereal chem., **59**, 1982, s. 156
- [19] AO 192 210, CS
- [20] ZEMEK J., KUNIAK L., MATUSOVÁ A.: Makromol. Chem. Suppl., **9**, 1985, s. 219
- [21] HLAVÁČEK I., KRÁLOVÁ B., MOŠTEK J.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 241
- [22] AL 287 515, CS
- [23] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 161
- [24] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 290
- [25] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 136
- [26] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 229
- [27] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **36**, 1990, s. 289
- [28] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **27**, 1991, s. 37
- [29] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **38**, 1992, s. 262

Lektoroval Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Do redakce došlo 23. dubna 1992

Zemek, J. - Homolová, V.: Stanovenie α -amylázovej aktivity v obilninách pomocou eS-testu Amyláza. Kvas. prům., **39**, 1993, č. 3, s. 69 - 73

Z výsledkov vyplýva, že stanovenie aktivity α -amylázy eS-testom Amyláza predstavuje štandardný, jednoduchý a pritom

presný postup použiteľný aj v prevádzkových laboratóriách vybavených spektrofotometrami s detekciou vo viditeľnej oblasti spektra.

Postup pri stanovení aktivity α -amylázy v pšenici je rovnaký ako postup pri stanovení aktivít iných biotechnologicky významných hydrolytických enzýmov publikovaných v prácach (23 - 29), čo je z hľadiska štandardizácie a normalizácie metodík stanovenia aktivity enzýmov veľmi výhodné.

Земек, И. - Гомолова, В.: Определение α -амилазной активности в хлебных злаках при помощи eS-теста Амилаза. Квас. прум., **39**, № 3, стр. 69 - 73

Из результатов вытекает, что определение активности α -амилазы eS-тестом Амилаза представляет собой стандартный, простой и одновременно точный способ, применимый и в производственных лабораториях, оснащенных спектрофотометрами с детектированием в видимой части спектра. Ход определения активности α -амилазы в пшенице тот же самый как ход определения активностей других биотехнологически значительных гидролитических энзимов, опубликованных в работах (23 - 29), что с точки зрения стандартизации методик определения активности энзимов является весьма выгодным.

Zemek, J. - Homolová, V.: Determination of α -Amylase Activity in Cereals Using eS-Test Amylase. Kvas. prům., **39**, 1993, No. 3, pp. 69 - 73

The results proved that the determination of α -amylase activity using eS-Test Amylase permits a standard, simple and correct procedure applicable in plant laboratories equipped with spectrophotometers with the detection above UV spectrum. The procedure for the determination of α -amylase activity in wheat is the same as in any other biotechnologically significant hydrolytic enzymes published in articles (23-29). This fact shows the advantage of the described method from the standpoint of a standardization of methods used for the determination of enzyme activities.

Zemek, J. - Homolová, V.: Bestimmung der α -Amylase-Aktivität im Getreide mittels des eS-Tests Amylase. Kvas. prům., **39**, 1993, Nr. 3, S. 69 - 73

Aus den Ergebnissen ergibt sich, daß die Bestimmung der Aktivität der α -Amylase mittels des eS-Tests Amylase ein einfaches und dabei genaues Standardverfahren vorstellt, das auch in den Betriebslaboratorien anwendbar ist, die mit Spektrophotometern mit der Detektion in dem sichtbaren Spektrumbereich ausgestattet sind.

Die Methode bei der Bestimmung der Aktivität der α -Amylase beim Weizen ist die gleiche wie das Verfahren bei der Bestimmung der Aktivitäten anderer biotechnologisch wichtiger hydrolytischer Enzyme, die in 7 zitierten Arbeiten veröffentlicht wurden, was vom Standpunkt der Standardisierung und Normalisierung der Methoden der Bestimmung von Enzymaktivitäten sehr vorteilhaft erscheint.