

# Enzymové aktivity sladu - stanovení přímými metodami

Ing. Jiří ZEMEK, CSc., Ing. Viera HOMOLOVÁ, Bioeffect, 930 37 Lehnice

**Klíčová slova:**  $\alpha$ -amylasa,  $\beta$ -amylasa,  $\beta$ -glukanasa, tabletový eS-Test, aktivita

663.439

## Ú V O D

I když rozbor sladu podle dohody EBC spočívá asi na 7 znacích mechanických a dalších cca 30 znacích rozboru chemického, klíčová úloha se připisuje znakům, souvisejícím s enzymovými aktivitami sladu. K těmto znakům tradičně patří diastatická mohutnost (dle Windisch-Kolbacha), vystihující údajně  $\beta$ -amylasovou aktivitu sladu, dále doba zcukření, podle předpokladu související s  $\alpha$ -amylasovou aktivitou a dále viskozita, která, pokud souvisí s mírou rozluštění sladu, by měla korelovat s aktivitou enzymů tzv. "cytasového komplexu" [1].

K přímé analýze enzymových aktivit hydrolas biopolymerů jsme rozpracovali systém standardních a unifikovaných metod, založených na použití chromolytických tabletových substrátů s označením eS-Test, doplněný o standardy intenzity absorbance k mezilaboratorní kontrole spektrofotometrů a dále o stabilizované tabletové enzymové standardy s deklarovanou aktivitou příslušných enzymů, k funkční kontrole eS-Testu [2]. Pro rutinní analýzu sladu byl proto sestaven eS-Test Sladová amylasa, umožňující oddě-

lené stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy (EC 3.2.1.1) a  $\beta$ -amylasy (EC 3.2.1.2), viz. [3], eS-Test Lichenasa (EC 3.2.1.73),  $\beta$ -glukanasa, viz [4], eS-Test Laminarinasa (EC 3.2.1.39, viz [5]), případně eS-Test Celulasa  $C_x$  a eS-Test Proteinasa universal [6-8], spolu s barevným standardem absorbance [9] a tabletovým enzymovým standardem s deklarovanou aktivitou [10].

V předložené práci se věnujeme stanovení  $\alpha$ -amylasové aktivity sladu v korelaci s dobou zcukření, stanovení  $\beta$ -amylasové aktivity v souvislosti s diastatickou mohutností a  $\beta$ -glukanasové aktivitě (lichenasa) v souvislosti s viskozitou sladiny u souboru 85 náhodně vybraných českých a slovenských sladů charakterizovaných dle metodiky EBC.

## M A T E R I Á L A M E T O D Y

**Slad.** K srovnávací analýze byl použit soubor 85 vzorků různých sladů od ročníku 1987. Rozbor dle metodik zakotvených v Analytice EBC byl zabezpečen ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském (Sladařský

ústav, Brno) a opakován na našem pracovišti, bez zjištění rozdílů ve výsledcích. Použité vzorky sladů pocházely ze sladoven Hurbanovo (18), Trnava (8), Topolčany (5), Michalovce (2), Levjice (2), Rimavská Sobota (6), Prostějov (10), Nová Úlice (3), Kromčříž (15), Rajhrad (5), Brodek u Přerova (2), Olomouc-Bělidla (2), Olomouc-Holice (5) a Ivanovice na Hané (2). V závorce je uveden počet analyzovaných sladů z příslušné sladovny.

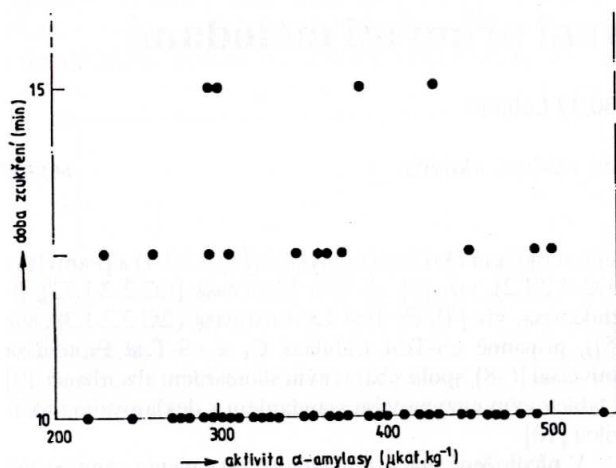
**Enzymy.** Sladové enzymy byly z atestovaných sladů extrahovány postupy, uvedenými v našich předcházejících studiích [3,4]. Stanovení enzymových aktivit bylo provedeno do měsíce po rozboru sladů dle metodik EBC.

Aktivita enzymů byla stanovena příslušnými eS-Testy v  $\mu\text{kat.kg}^{-1}$  podle [3,4] a porovnávala se s deklarovanými hodnotami doby zcukření ( $\alpha$ -amylasy), diastatické mohutnosti ( $\beta$ -amylasy) a viskozity (lichenasy).

**Tabletové testy,** eS-Test Sladová amylasa a eS-Test Lichenasa jsou výrobky firmy Bioeffect Lehnice.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Porovnání doby zcukření s  $\alpha$ -amylasovou aktivitou je znázorněno na obr. 1. U 70 vzorků sladů (z celkového souboru 85) byla deklarována doba zcukření 10 min, u 11 sladů 10 až 15 min a pouze u 4 sladů byla deklarována doba zcukření 15 min. Po formální stránce, na základě těchto 3 úrovní doby zcukření, by všechny slady souboru odpovídaly normálním hodnotám pro světlé slady plzeňského

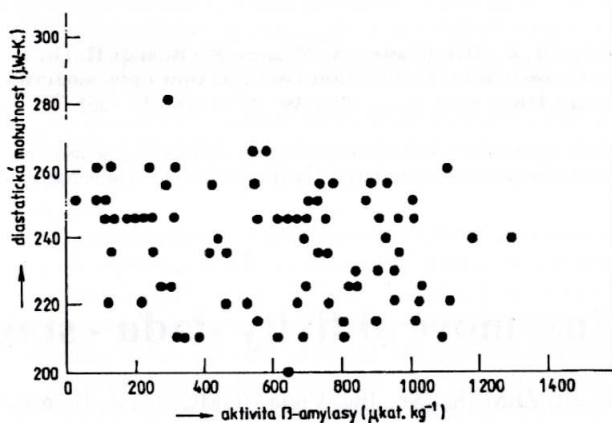


Obr.1 - Porovnání doby zcukření s přímým stanovením aktivity  $\alpha$ -amylasy sladů

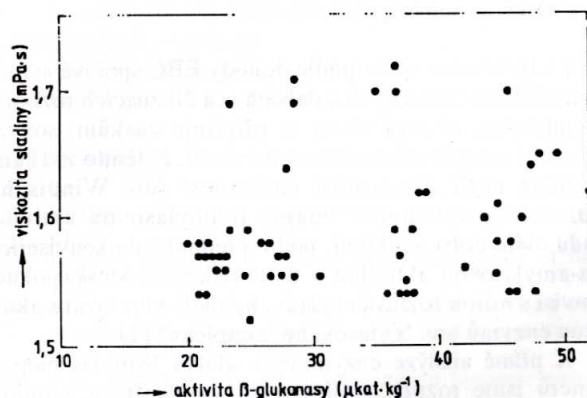
typu, avšak 70 vzorků sladů splňuje tento požadavek na dolní hraniční hodnotě [1]. Naměřené rozpětí hodnot pro  $\alpha$ -amylasovou aktivitu je od 220 do 530  $\mu\text{kat.kg}^{-1}$  pro slady o vyhovující kvalitě. Doba zcukření je charakterizována pouze 3 hodnotami (10 min, 10-15 min a 15 min). Stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy eS-Testem při sériovém stanovení je zatíženo hodnotou variačního koeficientu ( $v_k$ )=4,1 % (viz.3). Přímé stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy je proto metodicky přesnější než pouhá hodnota doby zcukření a výpo-

vědní hodnota tohoto stanovení pro charakterizaci sladů je podstatně vyšší. Charakterizace kvality sladů pomocí přímého stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy je proto jedním z klíčových a nezastupitelných parametrů analýzy sladů.

Normální hodnoty diastatické mohutnosti světlých sladů plzeňského typu se pohybují v rozmezí 220 - 280 j.W.-K. Většina sladů analyzovaného souboru (72) tuto podmínku splňuje. Zatímco variační rozpětí diastatické mohutnosti se pohybuje u analyzovaného souboru od 190 do 280 j.W.-K., aktivita  $\beta$ -amylasy u uvedeného souboru sladů o vyhovující kvalitě se pohybuje od 95 do 1280  $\mu\text{kat.kg}^{-1}$ . Je zřejmé, že ani mezi diastatickou mohutností a  $\beta$ -amylasovou aktivitou není zjevná korelace (obr.2). Pod parametrem diastatická mohutnost je nutno zřejmě rozumět kumulativní účinek více amylolytických enzymů, vedle  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy i efekt pululanasy, resp. tzv. "debranching enzymu" a glukosidas. V případě diastatické mohutnosti jde spíše jen o odhad účinnosti celého enzymového komplexu. Přímé stanovení  $\beta$ -amylasy a dalších enzymových aktivit je možno proto považovat v budoucnosti za perspektivnější.



Obr.2 - Porovnání diastatické mohutnosti s přímým stanovením aktivity  $\beta$ -amylasy sladů



Obr.3 - Porovnání viskozity kongresní sladiny s přímým stanovením aktivity  $\beta$ -glukanasy (lichenasy) sladů

Viskozita sladiny, jak uvádí odborná literatura, souvisí se stupněm rozluštění sladů a s účinkem "cytasového" komplexu enzymů. Zde se připisuje důležitost především

$\beta$ -glukanase lichenasového typu (EC 3.2.1.73, viz. cit. 1). Přírodní analog celulosy, 1,3-1,4- $\beta$ -D-glukan, strukturně příbuzný lichenanu z *Cetraria islandica* je minoritní složkou endospermu ječného zrna [11]. Uvedený  $\beta$ -glukan zvyšuje viskozitu sladiny i piva [12], což má za následek výrazné snížení účinnosti extrakce. Zatímco viskozita sladiny z uvedeného souboru sladů se pohybuje v rozmezí 1,52 - 1,72 mPa.s, aktivita enzymu lichenasy je v rozmezí od 20-52  $\mu$ kat.kg<sup>-1</sup> (obr.3). Mezi oběma veličinami není přímý funkční vztah. Stanovení viskozity je zatíženo větší metodickou chybou než stanovení lichenasové aktivity eS-Testem. Viskozita sladiny jako kumulativní parametr odráží nejen podíl ječného  $\beta$ -glukanu lichenasového typu, ale i příspěvek dalších hemicelulos a proteinů. Viskozita kongresní sladiny je parametrem, odvozeným od sladu za podmínek jiných, než je stanovení aktivity endogenní  $\beta$ -glukanasy, kdy extrakce sladových polysacharidů je silně potlačena. Na druhé straně je zřejmé, že mikrobiální průmyslové enzymové preparáty obsahují vedle lichenasové aktivity i další enzymy hemicelulasového a proteinasového typu, jejichž kumulativní účinek má za následek účinné snížení viskozity sladiny.

Aktivita endogenní lichenasy sladu je bezesporu důležitým kvalitativním znakem sladu. K objasnění problému viskozity sladiny bude nutno charakterizovat další enzymy "cytasového" komplexu ale i koncentraci dalších hemicelulos, podílejících se na viskozitě sladiny.

## Z Á V Ě R

Přímé stanovení aktivity enzymů sladu je důležitou a nezastupitelnou charakteristikou kvality sladu. Pro normální světlé slady plzeňského typu je aktivita  $\alpha$ -amylasy v rozmezí 220 až 530  $\mu$ kat.kg<sup>-1</sup> vyhovující, stejně tak jako aktivita  $\beta$ -amylasy v rozmezí 100 až 1300  $\mu$ kat.kg<sup>-1</sup>. Endogenní aktivita lichenasy není v přímé závislosti na hodnotě viskozity kongresní sladiny. K objektivnímu podchycení tohoto parametru bude nutno sledovat zastoupení jednotlivých hemicelulosových frakcí ve sladu a aktivity dalších hemicelulas, schopných tyto polysacharidy hydrolyticky rozštěpit.

## LITERATURA

- [1] MOŠTEK, J.: Sladařství, SNTL Praha, 1975
- [2] ZEMEK, J., KUNIAK, L., MONCOLOVÁ, V., BLAŽEJ, A.: Biotechnology and Food Chemistry (Holló, J. ed.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988, s.345
- [3] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, L.: Kvas.prům. 34, 1988, s. 290
- [4] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, L.: Kvas.prům. 34, 1988, s.161
- [5] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas. prům., 35, 1989, s.136
- [6] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas. prům. 37, 1991, s.37
- [7] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: kvas. prům. 35, 1989, s.229
- [8] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas. prům. 36, 1990, s.289
- [9] JANIŠ, J., ZEMEK, J., JURČOVÁ, Z., KUNIAK, L.: Biochem. Clin. Bohemoslov. 11, 1982, s.357
- [10] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas.prům. 38, 1992, s.262

- [11] BAMFORTH, C.W.: Brewers Digest, 57, 1982, s.22
- [12] McCLEAR, B.V., GLENNIE-HOLMES, M.: J.Inst.Brew., 91, 1985, s.285

Lektoroval Ing.P.Dostálek,CSc.  
Do redakce došlo 13.4.1993

**ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Enzymové aktivity sladu - stanovení přímými metodami.** Kvas. prům., 39, 1993, č.9, s. 261 - 263

Práce se zabývá korelací mezi stanovením enzymových aktivit sladu pomocí tabletových eS-testů Sladová amylasa a Lichenasa s tradičními analytickými metodami jako je doba zcukření, diastatická mohutnost a viskozita sladiny.

Z výsledků získaných na souboru 85 vzorků vyplývá, že pro světlé slady plzeňského typu je vyhovující aktivita  $\alpha$ -amylasy 220 až 530  $\mu$ kat/kg a pro  $\beta$ -amylasu jsou vyhovující hodnoty 100 až 1300  $\mu$ kat/kg. Endogenní aktivita lichenasy není v přímé závislosti na hodnotě viskozity kongresní sladiny.

**Земек, И. - Гомолова, В.: Энзимные активности солода - определение прямыми методами.** Квас. прум., 39, 1993, № 9, стр.261 - 263

Работа занимается корреляцией между определением энзимных активностей солода при помощи таблетных eS-тестов - Амиласа солода и Лихенаса и традиционными аналитическими методами, как время осахаривания, диастатическая способность и вязкость сусла. Из результатов, полученных в комплексе 85 образцов, вытекает, что для светлых солодов пильзенского типа подходящая активность  $\alpha$ -амилазы представляет 220 по 530  $\mu$ кат/кг и для  $\beta$ -амилазы подходящие величины составляют 100 по 1300  $\mu$ кат/кг. Эндогенная активность лихенасы не находится в прямой зависимости от величины вязкости конгрессного сусла.

**ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Enzyme Activity of Malt - Determination by Direct Methods.** Kvas. prům. 39, 1993, No. 9, pp261 - 263

The correlation resulting from comparison of enzyme activity determinations using tablets eS-Tests-Malt Amylase and Lichenase and the classical analytical methods such as the saccharification time, diastatic power and wort viscosity are described. The results obtained from 85 samples proved that for light malts of the pilsener type the suitable activity of  $\alpha$ -amylase is from 220 to 530  $\mu$ kat.kg<sup>-1</sup> and of  $\beta$ -amylase from 100 to 1300  $\mu$ kat.kg<sup>-1</sup>. There was found no linear plot between the endogenous activity of lichenase and the viscosity of congress wort.

**ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Enzymaktivitäten des Malzes - Bestimmung mittels direkter Methoden.** Kvas. prům., 39, 1993, Nr. 9, S. 261 - 263

Die Arbeit befaßt sich mit der Korrelation zwischen der Bestimmung der Enzymaktivitäten des Malzes mittels der Tabletten-eS-Teste Malzamyase und Lichenase und den traditionellen analytischen Methoden, wie z. B. Verzuckerungszeit, diastatische Kraft und Viskosität der Würze.

Aus den Ergebnissen, die an 85 Proben erzielt wurden, geht hervor, daß für helle Malze des Pilsner Typs die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase 220 - 530  $\mu$ kat/kg entsprechend ist und für die  $\beta$ -Amylase die Werte 100 bis 1300  $\mu$ kat/kg entsprechen. Die endogene Lichenaseaktivität hängt nicht direkt von dem Wert der Viskosität der Kongreßwürze ab.