

Stanovení extraktu v zrně ječmene enzymatickou cestou

Determination of Extract in Barley Grain by the Enzymatic Way

TOMÁŠ GREGOR¹, RADIM CERKAL², LUDEK HRIVNA¹, VIERA ŠOTTNÍKOVÁ¹

¹Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně / Dpt. of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně / Dpt. of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

e-mail: tomas.gregor@mendelu.cz.

Gregor, T. – Cerkal, R. – Hřivna, L. – Šottníková, V.: Stanovení extraktu v zrně ječmene enzymatickou cestou. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 236–241.

K získání rychlé informace o extraktu zrna ječmene je používán vztah podle Bishopa, který byl získán experimentálně a pro potřeby moderního sladovníctví byl několikrát modifikován. Stanovení přesného obsahu extraktivních látek zrna je časově náročné a provádí se po sladování zrna v kongresní sladince dle metodiky EBC 4.5.1. Cílem této práce bylo stanovit extrakt přímo v zrně ječmene jarního pomocí enzymatických preparátů na bázi proteas, celulas, xylanas, β -glukanas a amylas. Tyto enzymy rozkládají jednotlivé složky zrna podobným způsobem jako přirozené enzymy ve sladu, proto není nutné zrna sladovat. Zrna ječmene neobsahuje potřebné enzymy pro rozklad obsahových látek zrna. Příprava ječného sladu s aktivním enzymatickým aparátem trvá v mikroskladovně přibližně 10 dní. Firma GENENCOR International® vyrábí kompletní sadu enzymů pro rozklad extraktivních látek obilného zrna. Jako nejvýhodnější bylo experimentálně ověřeno pořadí enzymů celulasa – xylanasa – β -glukanasa – α -amylasa – β -amylasa společně s proteasou. Aplikací těchto enzymů do roztoku s obsahem rozemletého zrna (tzv. hrubé mletí) a jeho filtrací vznikne sladina, která je svým složením podobná konvenční sladině získané ze sladu. Použitím faktoru 1,13 je dosaženo korekce na hodnoty blízké se hodnotám extraktu v moučce dle EBC.

Gregor, T. – Cerkal, R. – Hřivna, L. – Šottníková, V.: Determination of extract in barley grain by the enzymatic way. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 236–241.

The Bishop correlation is used in order to obtain fast information regarding the extract of barley grain. The Bishop correlation was developed experimentally and has been modified several times to adjust to the requirements of the modern malting practice. Establishment of the exact content of the extractive grain substances is time-consuming, and it is carried out after malting the grain in the congress wort according to the EBC method 4.5.1. The aim of this study was to establish the extract directly from the spring barley grain by the means of enzymatic preparations based on proteases, cellulases, xylanases, β -glucanases, and amylases. These enzymes decompose individual components of the grain in a similar way the natural enzymes in malt do, therefore, there is no need to malt the grain. The barley grain does not contain the necessary enzymes that are able to break down the extractive grain substances. The preparation of barley malt containing active enzymatic apparatus takes approximately 10 days in the micro malt house. The company GENENCOR International® has developed a complete set of enzymes for extractive cereal grain substances decomposition. It was experimentally verified that the following sequencing of the enzymes was the most favorable cellulase – xylanase – β -glucanase – α -amylase – β -amylase together with protease. Application of these enzymes into a solution containing crushed grain (so-called preliminary crushing) and by filtration of this solution, wort is created. Its composition is similar to that of the conventional wort obtained from malt. By using the 1.13 factor, correction to values nearing the values of the extract in malt according to EBC is achieved.

Gregor, T. – Cerkal, R. – Hřivna, L. – Šottníková, V.: Die enzymatische Bestimmung des Extrakts im Gerstenkorn. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 236–241.

Zur schnellen Extraktbestimmung im Gerstenkorn wurde eine Bishop's Beziehung angewandt, die experimentell gewonnen wurde und mehrmals modifiziert worden war. Die genaue Bestimmung des Korngehalts an Extraktstoffe ist zeitraubend und wird laut Methodik EBC 4.5.1 nach Kornmalzen in der Kongresswürze durchgeführt. Der Artikel befasst sich mit der direkten Bestimmung des Extrakts im Sommergerstenkorn mittels enzymatischen Präparaten auf Basis von Proteasen, Zellulasen, Xylanasen, β -Glukanasen und Amylasen. Diese Enzyme splittieren einzelne Komponente des Kornes auf ähnlicher Weise wie die natürlichen Enzyme im Malz, dadurch ist es nicht notwendig das Gerstenkorn zu malzen. Das Gerstenkorn enthält keine notwendigen Enzyme zur Spaltung der Extraktstoffe. Die Vorbereitung des Gerstenmalzes mit Zugabe eines aktiven enzymatischen Präparates in einer Mikromälzerei dauert etwa zehn Tage. Zur Spaltung der Extraktstoffen des Kornes liefert die Firma GENENCOR International® komplette Enzymensets. Als die beste Folge der Enzyme wurde experimentell festgestellt: Zellulase – Xylanase – β -Glukanase – α -Amylase – β -Amylase zusammen mit Protease. Durch Zugabe von Enzymen in die Lösung mit grobgemahlten Malz (grobe Mahlung) entsteht die Würze mit einer Zusammensetzung, die wie die aus dem Malz hergestellte Konventwürze ähnlich ist. Durch die Anwendung des Faktors 1,13 wird die Korrektur zu den Extraktwerten nähernden sich zu den Werten laut Methodik EBC im Mehl erreicht.

Klíčová slova: ječmen, slad, Bishop, enzymy, sladina, EBC

Keywords: barley, malt, extract, Bishop, enzymes, wort, EBC

1 ÚVOD

Extrakt je jedním z nejdůležitějších kritérií jakosti sladu. Je to souhrn všech látek sladu, které jsou přímo rozpustné ve vodě nebo po enzymatickém rozkladu přecházejí v průběhu rmutování do sladin [2]. Extrakt představuje rozpustné látky bílkovinné povahy, tvořené aminokyselinami, oligopeptidy a polypeptidy, dále látky sacharidické povahy, kam patří především monosacharidy a oligosacharidy, z nichž kromě lineárních oligosacharidů jsou přítomné i rozvětvené dextriny. Další látky, které se v extraktu nacházejí, jsou minerální a polyfenolické látky, malé množství lipidů a vitaminů. Obsah extraktu a přesnost jeho stanovení ovlivňuje řadu technologických procesů i samotný vý-

1 INTRODUCTION

Extract is the key quality parameter of malt. It is the sum of all substances contained in malt that are directly water-soluble or transfer into wort during mashing after enzymatic decomposition [2]. Extract represents soluble substances of protein nature formed by amino acids, oligopeptides and polypeptides. Moreover, it includes substances of saccharide nature, among which mainly monosaccharides and oligosaccharides belong. Besides linear oligosaccharides, branched dextrins are also present. Other substances contained in extract are mineral and polyphenolic substances, a small amount of lipids and vitamins. The extract content and the accuracy of its determination

sledek – výtěžnost finálního produktu, tedy piva. Z tohoto důvodu se pivovarská analytika již dříve snažila nalézt souvislost mezi chemickým složením zrna ječmene a extraktem ve sladu. Kritérii pro rychlé zhodnocení kvality ječmene byly zejména procentický obsah bílkovin, obsah škrobu a extrakt v ječmeni [3]. Také dnes jsou v praxi obecně požadovány rychlé, ale přesné metody predikce kvality vstupní suroviny, vč. obsahu extraktu.

Stanovení obsahu extraktu v nesladovaném zrně ječmene se přímou metodou přípravy kongresní sladiny v praxi neprovádí. Obilka ječmene nemá potřebné množství hydrolytických enzymů pro odbourání v ní obsažených polymerů. K získání informace o předběžném obsahu extraktivních látek v zrně ječmene je používán původní vztah podle Bishopa z roku 1930 [4], ve kterém je do výpočtu zahrnut obsah bílkovin a hmotnost tisíce zrn:

$$E = K - (0.85 \cdot B) + (0.15 \cdot G)$$

kde E – extrakt sladu v sušině [%]
 K – Bishopem udávaná konstanta 83,0
 B – obsah bílkovin v sušině zrna [%]
 G – hmotnost tisíce zrn v sušině [g]

Vztah byl získán experimentálně a byl pro potřeby moderního sladovnictví několikrát modifikován [3, 5]. Na základě praktických pokusů a analytických prací upravili vzorec pro výpočet extraktu sladu pro tehdejší československé ječmeny např. Novotný, Karabec [3] (koeficient K měl hodnotu 83,6). Všechny tyto vztahy používají k výpočtu údaje o složení obilky ječmene, která obsahuje 80–88 % sušiny a 12–14 % vody. Sušinu tvoří organické (dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny) a anorganické látky [6]. Vlhkost je potom z výše uvedených vztahů eliminována uvedením hodnot bílkovin a hmotnosti tisíce zrn vztažených na sušinu ječmene.

Jako alternativa k těmto matematickým metodám výpočtu extraktu v ječmeni se používá stanovení na principu rozkladu zrna ječmene pomocí enzymů, buď průmyslových nebo izolovaných ze sladu. K metodám, které používají enzymy izolované ze sladu, patří metoda podle Grafa [7]. Při použití této metody je nutné získat enzymatický preparát ze sladu, u něhož je známý obsah extraktu, ten je potom přidán za podmínek metody ke vzorku ječmene. Obsah extraktu je následně určen na základě hustoty odečtem z příslušných tabulek. Na obdobném principu pracují i metody Dinklageho, nebo Lüerse a Millera [8], které místo enzymů ze sladu používají průmyslové enzymy. Základ těchto metod byl položen v padesátých letech minulého století, kdy nebylo možné použít tak široké spektrum enzymů jako dnes. Z tohoto důvodu byla u těchto metod nutná složitější a časově náročná příprava vzorků ječmene, která spočívala ve vaření ječného šrotu v definovaném objemu vody, teprve potom následovala aplikace enzymů.

Pokud použijeme enzymy jiné, než původní sladové enzymy, potýkáme se s problémem, zdali tyto enzymy budou mít dostatečný potenciál k rozkladu všech složek zrna ječmene a jejich převedení do roztoku. Vhodná volba enzymů přímo souvisí se složením zrna ječmene, jak je znázorněno v tab. 1.

Ve vztahu k uvedenému složení zrna jsou důležité následující skupiny enzymů:

termostabilní α -amylasy (EC 3.2.1.1),
 β -amylasy (EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.10),
 proteasy (EC 3.4.11.1–EC 3.4.11.24),
 celulasy (EC 3.2.1.4),
 xylanasy (EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.37),
 β -glukanasy (EC 3.2.1.6).

S výhodou lze dnes využít nabídky firem produkujících tyto enzymy. Jednou z nich je i firma GENENCOR International®, která vyrábí kompletní sadu enzymů pro rozklad obilného zrna. V praxi je tento soubor enzymů využíván především pro přípravu sladkých zápar při výrobě bioethanolu. Jako nejvhodnější se pro účely získání extraktu ze zrna jeví aplikace enzymů v pořadí: enzymy štěpící pentozany a celulosu (celulasa, xylanasa, β -glukanasa), dále termostabilní α -amylasa pro zmačkování a ztekucení škrobu a v posledním kroku zcukřující β -amylasa společně s proteasou pro rozklad bílkovin [9, 10, 11, 12].

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Enzymatické přípravy

Enzymatické preparáty byly dodány firmou GENENCOR International®, USA. Enzymy je nutné uchovávat v lednici při 5 °C, plná účinn

impact a range of technological processes as well as the result as such – the yield of the final product, beer. This is the reason why the brewery analytics has always tried to find correlation between the chemical composition of the barley grain and the extract in malt. The criteria for a fast barley quality evaluation were mainly the percentages of the protein content, the starch content, and the extract in barley [3]. Nowadays, fast as well as accurate methods of quality prediction of the input material, including the extract content, are required.

In practice, establishment of the extract content in unmalted barley grain is not conducted by the direct method of congress wort preparation. Barley caryopsis does not have the required amount of hydrolytic enzymes to break down the polymers contained in the caryopsis. To obtain information on the preliminary content of extractive substances in the barley grain, the original correlation according to Bishop from 1930 is used [4]. According to this correlation, the protein content and thousand grain weight is included in the calculation:

$$E = K - (0.85 \cdot B) + (0.15 \cdot G)$$

E – extract of malt in dry matter [%]
 K – constant of 83.0 according to Bishop
 B – protein content in dry matter of grain [%]
 G – thousand grain weight in dry matter [g]

The correlation was developed experimentally and was modified several times in order to match the requirements of modern malting practice [3, 5]. Based on practical experiments and analytical studies, the formula for malt extract calculation for Czechoslovak barley varieties was adjusted by, for example, NOVOTNÝ, KARABEC [3] in the past (the K coefficient had the value of 83.6). For the calculation, all these correlations use data known for the barley caryopsis that has the content of 80–88% of dry matter and 12–14% of water. The dry matter is composed of organic (nitrogenous and non-nitrogenous compounds) and anorganic substances [6]. The humidity is then excluded from the above presented correlations by stating the protein and thousand grain weight values related to the barley dry matter.

As an alternative to these mathematical methods of barley extract calculation, the extract establishment based on the principle of barley grain decomposition by either industrial enzymes or enzymes isolated from malt is used. The method according to Graf is one of the methods that use enzymes isolated from malt [7]. When using this method, it is necessary to obtain an enzymatic preparation from malt in which the extract content is known. It is then added to the barley sample under the conditions of the method. After that, the extract content is established on the basis of the density by subtraction from the applicable tables. Methods according to Dinklage, or Lüers and Miller [8] are based on similar principles; however, they use industrial enzymes instead of enzymes from malt. The groundwork of these methods was founded in the 50s of the last century when it was not possible to employ such a wide spectrum of enzymes as it is today. These methods required a more complicated and time-consuming barley samples preparation consisting of cooking barley grist in a predefined water volume. Only after that, enzymes application could have followed.

If we use enzymes other than the original malting ones, the problem might be that these enzymes will not have sufficient potential to decompose all the components of the barley grain and will not be able to transform these components into a solution. A suitable choice of enzymes directly relates to the barley grain composition, as displayed in Tab. 1.

In relation to the presented grain composition, the following groups of enzymes are important:

Thermostable α -amylases (EC 3.2.1.1),
 β -amylases (EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.10),
 proteases (EC 3.4.11.1–EC 3.4.11.24),
 cellulases (EC 3.2.1.4),
 xylanases (EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.37),
 β -glucanases (EC 3.2.1.6).

Presently, one is able to take advantage of good deals offered by companies that produce these enzymes. One of the companies is GENENCOR International® who manufacture a complex set of enzymes for cereal grain decomposition. In practice, this set of enzymes is used mostly for preparation of fresh mash in bioethanol production. The following sequencing of enzymes seems to be most suitable for the purpose of obtaining extract from the grain: enzymes decomposing pentosanes and cellulose (cellulase, xylanase, β -glucanase), followed by thermostable α -amylase for gelatinization and liquification of starch, and during the last step, β -amylase (for its saccharification effect) together with protease to aid protein decomposition [9, 10, 11, 12].

Tab. 1 Chemické složení obilky ječmene [6] / Chemical composition of barley caryopsis [6]

Látka / Substance	Obsah Contents [%]
Sacharidy / Saccharides	
Škrob / Starch	60–65
– amylasa / amylase	17–24
– amylopektin / amylopectin	škrobu / of starch 76–83
	škrobu / of starch
Nízkomolekulární sacharidy / Low molecular saccharides	
Sacharosa / Saccharose	1–2
Ostatní cukry / Other sugars	1
Rafinosa / Raffinose	0.3–0.5
Neškrobnaté polysacharidy / Non-amylose polysaccharides	
Hemicelulosa / Hemicelluloses	
– β -glukany / β -glucans	3.3–4.9
– pentosany / pentosans	9
– celulóza / cellulose	4–7

nost při takovémto uskladnění je garantována jeden rok, s každým dalším rokem uskladnění klesá účinnost enzymů asi o 15 %.

2.1.1 OPTIMASH™ TBG

Tento enzym redukuje viskozitu ječmenných a pšeničných zápar. Enzym OPTIMASH™ TBG obsahuje kombinaci enzymů typu β -glukanasy (EC 3.2.1.2), které efektivně modifikují a štěpí neškrobnaté polysacharidy, stavební materiály rostlinných buněk. Výhodou použití OPTIMASH™ TBG je hydrolyza neškrobových sacharidů, které jinak zvyšují viskozitu zápar. Nejvyšší aktivitu má enzym při 60–70 °C v rozmezí hodnot pH 4–4,6. Při udané teplotě je doba působení minimálně 30 minut.

2.1.2 OPTIMASH™ VR

Tento enzym je schopný redukovat viskozitu a intenzivně štěpit látky na bázi pentosanů v zrně pšenice, žita a ječmene. OPTIMASH™ VR obsahuje kombinaci celulas (EC 3.2.1.4) a xylanasy (EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.37), které efektivně přeměňují a štěpí neškrobnaté sacharidy. Vykazuje i aktivitu β -glukanasy (EC 3.2.1.6). Štěpí tedy hlavně celulózu, arabinoxylany, v menší míře také β -glukany, které jsou ve vazbě společně s ligninem, pektiny, proteiny, škrobem a lipidy. Nejvyšší aktivitu má enzym při 60–70 °C v rozmezí hodnot pH 4,5–5. Při udané teplotě je doba působení minimálně 30 minut.

2.1.3 SPEZYME® ALFA

Tento enzym obsahuje termostabilní α -amylasu (EC 3.2.1.1) s vynikající stabilitou při nízkém pH. Endoamylasa v enzymu SPEZYME® ALFA náhodně hydrolyzuje α -1,4-glykosidické vazby s rychlou redukcí viskozity želatiny a škrobu v obilných záparách, produkuje rozpustné větvené dextriny a lineární oligosacharidy. Nejvyšší aktivitu má enzym při 83–95 °C v rozmezí hodnot pH 5,4–5,8. Při udané teplotě je doba působení minimálně 90 min.

2.1.4 DISTILLASE® CS

Tento enzym se využívá k úplnému zcukření naštěpěného škrobu až na maltosu a glukosu. Je to exoamylasa (EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.10), která katalyzuje uvolnění po sobě následujících glukosových jednotek z neredukujících konců rozpustných větvených dextrinů a lineárních oligosacharidových řetězců hydrolyzovaných jak lineárními (1,4- α -D) tak rozvětvenými (1,6- α -D) glykosidovými vazbami. Enzym se používá pro zcukření ztekuceného škrobu z různých zdrojů, zahrnujících

Látka / Substance	Obsah Contents [%]
Tuky / Fats	3.5
Fosfáty / Phosphates	
Fytin / phytin	0.9
Polyfenoly / Polyphenols	0.1–0.6
Dusíkaté látky / Nitrogenous substances	7–18
Rozp. dusíkaté látky / Soluble nitrogenous substances	1.9
Albuminy a globuliny / Albumins and globulins	3.5
Hordeiny (prolaminy) / Hordeins (prolamins)	3–4
Gluteliny / Glutelins	3–4
Minerální látky / Mineral substances	2

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Enzymatic preparations

Enzymatic preparations were supplied by the company GENENCOR Internacional®, USA. It is necessary to store the enzymes in a fridge at the temperature of 5 °C. If stored this way, a full effectivity is guaranteed for the duration of one year, with each subsequent year of storage, the effectiveness of the enzymes drops by approximately 15%.

2.1.1 OPTIMASH™ TBG

This enzyme reduces the viscosity of barley and wheat mashes. The OPTIMASH™ TBG enzyme contains a combination of the β -glucanase type of enzymes (EC 3.2.1.2) that effectively modify and break down non-amylose polysaccharides, which are the building materials of plant cells. The advantage of using OPTIMASH™ TBG is the hydrolysis of non-amylose saccharides because they otherwise increase the viscosity of the mash. The highest enzyme activity is achieved at 60–70 °C and pH values ranging between 4–4.6. At the given temperature, the treatment must take at least 30 minutes.

2.1.2 OPTIMASH™ VR

This enzyme has the capacity to reduce viscosity and intensely break down substances based on pentosanes in the wheat, rye, and barley grain. OPTIMASH™ VR contains the combination of cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanases (EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.37) that effectively transform and break down non-amylose saccharides. Additionally, β -glucanase activity is also present (EC 3.2.1.6). Therefore, it breaks down mainly cellulose, arabinoxylanes, in a smaller extend also β -glucans that are in bond together with lignine, pectins, proteins, starch, and lipids. The highest activity of this enzyme is found at 60–70 °C and pH values ranging between 4.5–5. At the given temperature, the minimum duration of the treatment is 30 minutes.

2.1.3 SPEZYME® ALFA

This enzyme contains thermostable α -amylase (EC 3.2.1.1) that has an outstanding stability at a low pH. The endoamylase contained in the SPEZYME® ALFA enzyme randomly hydrolyzes the α -1,4-glycosidic bonds with fast viscosity reduction of starch in the process of gelatinization in cereal mashes. It produces soluble branched dextrins and linear oligosaccharides. The enzyme has the highest activity at 83–95 °C and pH values ranging between 5.4–5.8. At the given temperature, the minimum duration of the treatment is 90 minutes.

2.1.4 DISTILLASE® CS

This enzyme is used to induce complete saccharification of partially broken down starch into maltose and glucose. It is an exoamylase

Tab. 2 Enzymatické preparáty, dávkování a optimální reakční podmínky / Enzymatic preparations, dosing, and optimum reaction conditions

Enzym / Enzyme	Druh enzymu / Type of enzyme	Teplota Temperature [°C]	Čas Duration [min]	Dávkování [μl/100g šrotu] Duration [μl/100g of grit]	pH
1 Optimash™ VR	celulasa, Xylanasa / cellulase, xylanase	60–70	30	25	4.5–5.5
Optimash™ TBG	β -glukanasa / β -glucanase	60–70	30	25	4.5–5.5
2 Spezyme® Alfa	α -amylasa / α -amylase	83–95	90	100	5.4–5.8
3 Distillase® CS	β -amylasa / β -amylase	60–65	30	60	3.8–4.5
Fermgen™	Proteasa / Protease	60–65	30	60	3.0–4.5

kukuřici, čirok, ječmen, pšenici, rýži a brambory. Při udané teplotě je doba působení minimálně 30 minut. Teplota nad 65 °C má za následek ztrátu aktivity enzymu.

2.1.5 FERMGENTM

Proteasa (EC 3.4.11.1–EC 3.4.11.24) obsažená v preparátu náhodně štěpí bílkoviny z krajních řetězců i uvnitř molekuly. Nejvyšší aktivitu má enzym při 60–65 °C v rozmezí hodnot pH 3,8–4,5. Při udané teplotě je doba působení minimálně 30 minut. Teplota nad 65 °C má za následek ztrátu aktivity.

2.2 Vzorky ječmene

Pro analýzy byly použity vzorky zrna ječmene sedmi sladovnických odrůd (Bojos, Jersey, Kompakt, Malz, Sebastian, Tolar a Radegast). Zrno pocházelo z maloparcelních pokusů realizovaných na lokalitě Žabčice v roce 2009. K přípravě meliva byl použit laboratorní mlýnek (Laboratorní přístroje Praha, Česká Republika) a prosévadlo (např. pfungstadtské) s příslušnými síty. Velikostní profil meliva odpovídal tzv. hrubému mletí (65 % částic meliva jsou frakce větší jak 0,56 mm). Vlhkost zrna byla stanovena laboratorní metodou vysušením 5 g vzorku při 105 °C do konstantní hmotnosti [1].

2.3 Průběh enzymatického rozkladu

Dávkování a optimální reakční podmínky jednotlivých enzymatických preparátů jsou uvedeny v tabulce 2. Rmutovací kádinky s obsahem destilované vody (300 ml) a meliva (50 g) se po přidavku enzymů Optimash™ VR, Optimash™ TBG umístí do rmutovací lázně (1-Cube, Česká Republika). V této fázi je upraveno pH roztokem kyseliny sírové o koncentraci 1 mol.l⁻¹ (Lachema, Česká Republika, čistota p.a.) na hodnotu 5,0. Při teplotě 60 °C nastává štěpení celulosových látek, vlákniny a β-glukanů. V další fázi po přidavku enzymu Spezyme® Alfa a při teplotě 80 °C mazovatí škrob, suspenze se plně ztekucuje, amylosa a amylopektin ze škrobu je přeměňován na dextriny a oligosacharidy, zkouška jodem po proběhnutí této fáze je negativní, pH v této fázi je obvykle v optimálních hodnotách kolem 5,5. Po ochlazení na 60 °C a přidavku Distillase® CS a Fermgen™ dochází k finálnímu rozštěpení dextrinů a oligosacharidů až na maltosu a glukosu, dochází také ke štěpení bílkovin [12], hodnota pH je upravena před počátkem této fáze roztokem kyseliny sírové na 4,0.

Roztok je po skončení poslední fáze dovážen studenou destilovanou vodou (na 450 g), zfiltrován přes papírový filtr (KA2-M, 20 cm, Papírna Pernštejn, ČR), prvních 100 ml filtrátu se vrací zpátky na filtr. Hustota je změřena pomocí pykometru temperovaného na 20 °C. Hustota sladiny je podíl hmotnosti sladiny a hmotnosti (objemu při 20 °C) vody.

$$\rho = \frac{\text{hmotnost sladiny v g}}{\text{vodní hodnota pykometru v g}}$$

V tabulkách [7] se vyhledá podle hustoty sladiny příslušná koncentrace a dosadí do vztahu pro výpočet extraktu v zrna ječmene:

$$E = \frac{(800 + a) \cdot b}{100 - b} \cdot 1,13$$

kde **E** je extrakt ve vzorku, **a** je vlhkost zrna ječmene v %, **b** je koncentrace sladiny ze sladařských tabulek v %, **1,13** je faktor stanovený experimentálně pro danou kombinaci enzymů.

Extrakt v ječmeni se přepočítá na sušinu podle vztahu:

$$E_{\text{suš}} = \frac{E \cdot 100}{100 - a}$$

kde **E** je extrakt zrna ječmene v %, **a** je vlhkost zrna ječmene v %.

Celý proces je znázorněn na obr. 1.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

U 56 vzorků ječmene odrůd Bojos, Jersey, Kompakt, Malz, Sebastian, Tolar a Radegast byl ve třech opakováních stanoven extrakt výpočtem podle Bishopa a dále bylo provedeno stanovení extraktu pomocí výše popsané enzymatické metody. Stejně vzorky ječmene byly také sladovány ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a. s., Sladařském ústavu v Brně. U sladu byl stanoven obsah extraktu

(EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.10) that catalyzes the release of sequencing glucose units from non-reducing ends of soluble branched dextrans and linear oligosaccharide chains that are hydrolyzed by linear (1,4-α-D) as well as branched (1,6-α-D) glycosidic bonds. The enzyme is used for saccharification of liquid starch from various sources, including maize, millet, barley, wheat, rice, and potatoes. At the given temperature, the minimum duration of the treatment is 30 minutes. Temperatures above 65 °C lead to a loss in activity of the enzyme.

2.1.5 FERMGENTM

By acting at random locations, the protease (EC 3.4.11.1–EC 3.4.11.24) contained in this preparation breaks down the end-chain proteins as well as those inside the molecules. The highest quality of the enzyme is achieved at 60–65 °C and pH ranging between 3.8–4.5. At the given temperature, the minimum treatment duration is 30 minutes. Temperatures above 65 °C result in activity loss.

2.2 Barley Samples

Barley samples of seven malting varieties (Bojos, Jersey, Kompakt, Malz, Sebastian, Tolar, and Radegast) were used for the analyses. The grain was obtained from the small-plot trials realized at the Žabčice locality in 2009. To prepare the grist, a laboratory mill (Laboratory Devices Prague, Czech Republic) and a sieving machine (e.g. Pfungstadt) with the applicable sieves were employed. The size profile of the grist corresponded to the so-called preliminary crushing (65% of the grist particles are fractions larger than 0.56mm). The humidity of the grain was established by the laboratory method of drying a 5 g sample at 105 °C to the constant weight [1].

2.3 The course of the enzymatic decomposition

Dosing and optimum reaction conditions of individual enzymatic preparations are presented in Tab. 2. Mashing is conducted in the beaker containing distilled water (300 ml) and grist (50 g), these components are supplied with the Optimash™ VR and Optimash™ TBG enzymes and placed into a mashing bath (1-Cube, Czech Republic). At this stage, the pH is adjusted to 5.0 by adding a sulphur acid solution of a 1 mol.l⁻¹ concentration (Lachema, Czech Republic, p.a.). At the temperature of 60 °C, breaking down of cellulose substances, fiber, and β-glucans occurs. In the next stage, after adding the Spezyme® Alfa enzyme at the temperature of 80 °C, the starch gelatinizes, the suspension becomes fully liquid, the amylase and amylopectin from the starch is transformed into dextrans and oligosaccharides. After this stage, the test by using iodine is negative. The pH at this stage is usually around the optimum value of 5.5. After cooling down to 60 °C and addition of Distillase® CS and Fermgen™, the final breaking down of dextrans and oligosaccharides to maltose and glucose occurs, moreover, protein decomposition [12] takes place, too, pH is adjusted to 4.0 prior to this stage by adding a solution of sulphur acid.

Upon completion of the final stage, the solution is supplied by distilled water to reach the weight of 450 g, it is then filtered through a paper filter (KA2-M, 20 cm, Papírna Pernštejn, CR), the first 100 ml of the filtrate returns on the filter. The density is measured by the means of the pycnometer tempered to the temperature of 20 °C. The density of the wort is the ratio of the weight of wort and the weight (volume at 20 °C) of water.

$$\rho = \frac{\text{weight of wort in grams}}{\text{water value of pycnometer}}$$

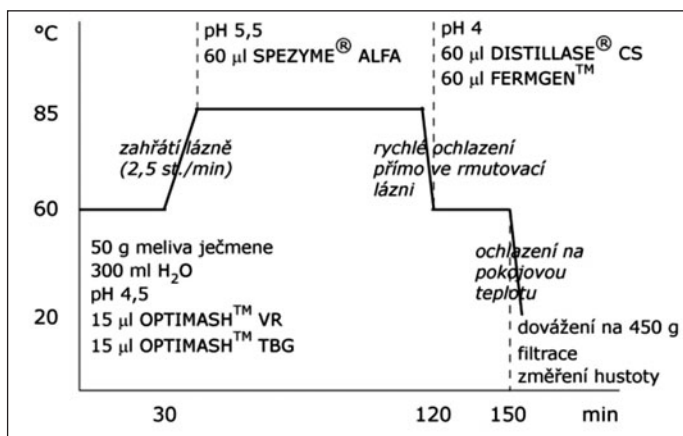
One must find the applicable concentration in tables [7] according to the density of the wort and include it into the correlation for calculation of the barley grain extract:

$$E = \frac{(800 + a) \cdot b}{100 - b} \cdot 1,13$$

where **E** is the extract of the sample, **a** is the humidity of the barley grain in %, **b** is the wort concentration according to malting charts in %, **1.13** is the factor established experimentally for the given combination of enzymes.

Extract in barley is converted to dry matter according to the following correlation:

$$E_{\text{dm}} = \frac{E \cdot 100}{100 - a}$$



Obr. 1. Průběh reakčních kroků při enzymatickém rozkladu

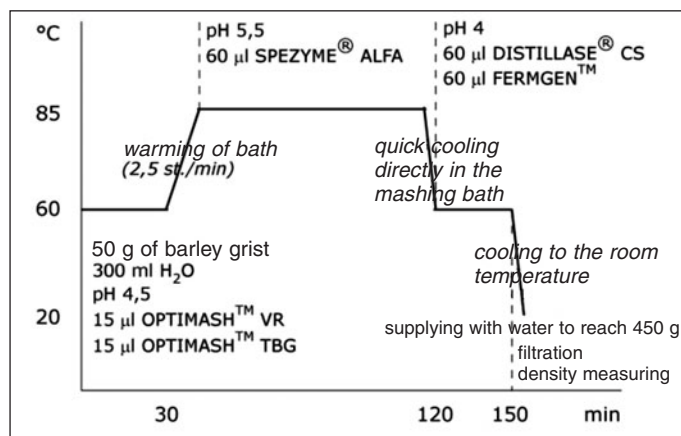


Fig.1 The course of the reaction steps during the enzymatic decomposition

konvenční metodou pomocí kongresní sladiny. Tímto způsobem byla získána data o obsahu extraktu v zrně ječmene a z něj vyrobeného sladu.

Z tab. 3 je patrný nižší obsah extraktu v ječmeni získaný pomocí rozkladu průmyslovými enzymy. V průměru je tento obsah extraktu asi o 9 % nižší než extrakt dle Bishopova vztahu, resp. než skutečný extrakt ve sladu. V průběhu sladování probíhají v zrně ječmene podstatné biochemické změny – dojde k rozluštění složitých látek endospermu na látky menší molekulové hmotnosti, stejně tak i ke vzniku nativních enzymů odlišných od poměrně ostře ohraničených tříd průmyslových amylas, proteas, celulas, xylanas a β -glukanas. Je tedy logické, že enzymy vzniklé v zrně ječmene přirozenou cestou při klíčení nemohou být zcela nahrazeny souborem průmyslových enzymů [13].

Pro přiblížení se k hodnotám extraktu stanoveného dle metodiky EBC je třeba provést korekci hodnot příslušným faktorem. Ten lze získat jako průměr prostého dělení průměrných hodnot extraktu kongresní sladiny a hodnot extraktu zrna získaných enzymatickým rozkladem. V tomto experimentu na použitém souboru odrůd odpovídá hodnotě 1,13. Obdobně je tento problém řešen i na jiných pracovištích [14], kde jsou ke stanovení extraktu zrna používány jak enzymy z průmyslových kmenů plísní, mající poměrně široký potenciál rozkladu látek ječného zrna, tak i sladinové koncentráty, které jsou bohaté na enzymy a byly získány při nízkých teplotách rmutování. Zde je potom nutné odečíst od finálního extraktu i extrakt sladiny vnesený s enzymatickým koncentrátem.

V případě odrůd Malz, Tolar nebo Kompakt je přepočtený enzymatický extrakt vyšší než hodnoty vypočtené dle Bishopova vztahu i než skutečné hodnoty extraktu ve sladu stanovené dle metodiky EBC. Naopak u odrůd Jersey, Sebastian, Bojos a Radegast se hodnoty přepočteného extraktu nacházejí mezi hodnotami vypočtenými dle Bishopa a hodnotami skutečného extraktu ve sladu. Je tedy zřejmé, že přesnou hodnotu přepočítacího faktoru je vhodné stanovit pro každou šarži použitých enzymů (od konkrétního výrobce) a pro konkrétní odrůdu. Pro laboratoře zpracovávající velké množství vzorků by popsaná metoda mohla přinést poměrně přesné hodnoty extraktu bez nutnosti sladovat zrně ječmene, což je proces časově, energeticky a tedy i finančně velmi náročný.

where E is the barley grain extract in %, a is the barley grain humidity in %.

The whole process is displayed in Fig. 1.

3 RESULTS AND DISCUSSION

For 56 barley samples of the Bojos, Jersey, Kompakt, Malz, Sebastian, Tolar, and Radegast varieties, the extract was established in three replications by the Bishop correlation and by means of the above described enzymatic method. Additionally, the same barley samples were malted in the Research Institute for Brewing and Malting, PLC, Malting Institute in Brno. In malt, the extract content was determined by the conventional method using congress wort. This way, data regarding the extract content in the barley grain and malt were obtained.

Tab. 4 shows the lower extract content in barley when decomposition is attained by industrial enzymes. On average, this extract content is by approximately 9% lower than the extract according to the Bishop correlation and than the real extract in malt. During malting, substantial biochemical changes take place in the barley grain – enucleating of complex endosperm substances into substances of a lower molecular weight occurs, likewise, native enzymes develop, however, they differ from the rather sharply defined classes of industrial amylases, proteases, cellulases, xylanase, and β -glucanases. Therefore, it is logical that enzymes that develop naturally in the barley grain during germination cannot be fully replaced by a set of industrial enzymes [13].

To achieve extract values according to the EBC method, correction of values by the corresponding factor must be carried out. The factor can be obtained as the average of a simple dividing of the average extract values of the congress wort and the extract values of grain obtained by enzymatic decomposition. In this experiment (using the set of varieties included), it equals the value of 1.13. Similarly, this problem is also being solved at other sites [14] where the grain extract is established by using enzymes from industrial mold strains that have a relatively wide potential to break down barley grain substances as well as wort concentrates that are rich in enzymes and were obtained by mashing at low temperatures. It is necessary to subtract the wort

Tab. 3 Obsah extraktu získaný metodou enzymatického rozkladu, metodou dle Bishopa, metodou vynásobením faktorem 1,13 a extrakt kongresní sladiny / The extract content obtained by the enzymatic decomposition method, method according to Bishop, method of multiplying by the 1.13 factor and extract of congress wort.

Odrůda / Variety	Extrakt / Extract			Extrakt kongresní sladiny Extract of congress wort
	Dle Bishopa / According to Bishop	Enzymaticky / Enzymatic	Enzymaticky x 1,13 / Enzymatic x 1.13	
Malz	82.13±0.33	73.18±0.29	82.70±0.33	82.05±0.39
Jersey	82.31±0.29	72.76±0.58	82.22±0.66	81.90±0.37
Tolar	82.65±0.15	73.24±0.45	82.77±0.51	81.99±0.48
Kompakt	82.59±0.22	73.22±0.46	82.74±0.53	81.86±0.31
Sebastian	82.63±0.21	72.77±0.56	82.22±0.63	81.77±0.41
Bojos	82.60±0.16	72.83±0.58	82.30±0.66	82.02±0.32
Radegast	82.33±0.23	72.72±0.46	82.17±0.53	82.08±0.38

4 ZÁVĚR

Cílem práce bylo navrhnout a ověřit metodu pro rychlé stanovení extraktu v zrně ječmene pomocí enzymatických preparátů na bázi proteas, celulas, β -glukanas a amylas. Metoda je založena na použití běžně dostupných enzymatických preparátů používaných při výrobě ethanolu na rozklad látek obsažených v zrně a její výsledky jsou verifikovány s konvenčně používanou metodou stanovení extraktu v kongresní sladině. Metoda byla odzkoušena na vzorcích zrna sedmi odrůd ječmene jarního, ze kterých byl nezávisle vyroben slad a stanoven extrakt ve sladu. Získané výsledky byly také porovnány s hodnotami extraktu podle Bishopa. Pro korekci hodnot získaných enzymatickou metodou na hodnoty blíží se skutečnému extraktu byl použit experimentální faktor 1,13. Přínosem metody je vyšší přesnost stanovení hodnot extraktu (oproti výpočtu extraktu podle Bishopa [5]) a zároveň menší materiálová a časová náročnost (oproti konvenční metodě stanovení extraktu ve sladu dle EBC).

Poděkování

Výzkum byl realizován za podpory „Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele“ č. 1M0570.

extract brought in together with the enzymatic concentrate from the final extract.

In the case of the Malz, Tolar, or Kompakt varieties, the converted enzymatic extract is higher than the values calculated according to the Bishop correlation as well as than the real values of extract in malt established by the EBC method. Conversely, the values of the converted extract for the Jersey, Sebastian, Bojos, and Radegast varieties range between the values calculated according to Bishop and those of the real extract in malt. Therefore, it is obvious that the exact value of the conversion factor needs to be determined for each charge of the used enzymes (from a concrete producer) as well as for each concrete variety. For laboratories that process a large number of samples, this method might bring in relatively accurate extract values without the need to malt the barley grain which is a very time-consuming and energy-demanding, and therefore also financially demanding process.

4 CONCLUSION

The aim of this study was to design and verify a method for a fast establishment of the extract in the barley grain by means of enzymatic preparations based on proteases, cellulases, β -glucanases, and amylases. The method is based on using commonly available enzymatic preparations used during ethanol production for grain substances decomposition, and its results are verified with the conventionally employed method of extract establishment in the congress wort. The method was tested on grain samples of seven spring barley varieties out of which malt was manufactured independently and extract in malt was determined. The acquired results were also compared to the extract values according to Bishop. For correction of values obtained by the enzymatic method to the values nearing the real extract, the experimental factor of 1.13 was used. The benefit of this method is the accuracy of the established extract values (in contrast to calculating the extract according to Bishop [5]) and at the same time, it is less material-demanding and time-consuming (in contrast to the conventional method of extract establishment in malt by EBC).

Acknowledgements

The research was realized with the support of the “Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop” no. 1M0570.

LITERATURA / REFERENCES

1. EBC. Analytica–EBC. Barley: 4.5.1 Extract of Malt. Congress Mash. Getränke-Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 1998.
2. Kunze, W.: Raw materials, Technology Brewing and Malting, International Edition, VLB, Berlin, 2009, 26–50.
3. Novotný, Z.: Předpověď extraktu sladu. Kvasný Prum. **3**, 1957, 125–132.
4. Bishop, L. R.: Institute of brewing research scheme. 1. The prediction of extract. J. Inst. Brew. **36**, 1930, 421–434.
5. Bishop, L. R.: The prediction of extract. IV. The adjustment of prediction to give true extract in malt. J. Inst. Brew. **54**, 1948, 330–333.
6. Kosař, K., Procházka, S. a kol.: Technologie výroby sladu a piva, 1. vydání, Praha, VÚPS, 2000.
7. Basařová, G. a kol.: Pivovarsko-sladařská analytika 1. Merkanta s. r. o., Praha, 1992.
8. Vančura, M., Bednář, J., Kahler, M., Karel, V., Lhotský, A., Šauer, Z., Šteker, K.: Pivovarsko-sladařská analytika. 1. vyd., SNTL, 1966.
9. Dunovský, D.: Význam škrobu v ječmeni a vztah k extraktivnosti sladu. Diplomová práce, MZLU v Brně, 2007.
10. Kolínková, H.: Možnosti kombinace enzymových preparátů a jejich vliv na výtěžnost bioethanolu z kukuřičných zápar. Diplomová práce, MZLU v Brně, 2008.
11. Králík, P.: Možnosti využití mikroorganismu *Zymomonas mobilis* při výrobě bioethanolu z obilných zápar. Diplomová práce, MZLU v Brně, 2006.
12. Pavlíková, L.: Vliv použitých enzymů na výtěžnost ethanolu z pšenice. Diplomová práce, MZLU v Brně, 2008.
13. Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T.: Pivovarství, VŠCHT Praha, 2010.
14. Li, Y., Schwarz, P. B., Barr, J. M., Horsley, R. D.: Factors predicting malt extract within a single barley cultivar. Journal of Cereal Science **48**(2), 2008, 531–538.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 12. 5. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 23. 6. 2011