

10-11

říjen - listopad 1990  
ročník 36

# KVÍZENÝ průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO VÝROBU NÁPOJŮ A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE  
VYDÁVAJÍ PIVOVARY A SLADOVNY, státní podnik vědeckotechnických a obchodních služeb, Praha  
a KOOSPOL, akciová společnost

## Z výzkumu a praxe

### Stanovenie aktivity glukoamylázy tabletovým S-testom Glukoamyláza

664.23 579

Ing. VIERA MONCOLOVÁ, Pivovary a sladovne, š. p., Výskumno-vývojová základňa, Bratislava  
Ing. JIŘÍ ZEMEK, CSc., Tessek, Združenie, Praha, laboratórium Bioen, Bratislava

**Kľúčové slová:** pivo, glukoamyláza, spektrofotometer, aktivita, tabletový S-test

#### ÚVOD

Amyloytické enzýmy predstavujú v súčasnosti najrozšírenejšiu skupinu technických enzýmov. Po pri  $\alpha$ -amylázach bakteriálneho a fungálneho pôvodu, v zásadnej miere sa na celkovom objeme výroby amyláz podieľajú aj glukoamylázy. Enzýmy glukoamylázového typu (amyloglukozidáza, glukoamyláza,  $\gamma$ -amyláza, systematicky 1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukohydroláza, EC 3.2.1.3) hydrolyzujú škrob (amylozu, amylopektín), ale aj glykogén, fotoglykogen, dextríny a oligosacharidy maltózového typu takmer kvantitatívne až na D-glukózu. Obdobne ako aj iné enzýmy hydrolázového typu, aj glukoamylázy za vhodných podmienok totiž katalyzujú procesy tzv. back-polymerization, t. j. tvorbu reverzných produktov z D-glukózy, ktorými môžu byť nielen oligosacharidy maltózového a izomaltózového typu, ale aj glukózové oligoméry spojené 1,2- $\alpha$ -, alebo 1,3- $\alpha$ -väzbami [1].

Ako technický enzým glukoamyláza nachádza široké uplatnenie v škrobárenstve, pivovarníctve, liehovarníctve, výrobe biochemikálií a chemických špecialít, čiastočne sa využíva aj v analytike, pri konštrukcii diagnostík pre humánnu a veterinárnu medicínu a v kozmetike [2-11].

Široké uplatnenie glukoamylázy v technickej praxi si vyžiadalo racionálnu aplikáciu týchto enzýmov v technologických procesoch, čo predpokladá zabezpečenie jednoduchej, spoľahlivej a pritom správnej metodiky na stanovenie aktivity tohto enzýmu. Doteraz využívané metódy sú založené na stanovení koncentrácie D-glukózy uvoľnenej zo

štandardného preparátu škrobu, za použitia kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej, alebo aktivity enzýmov glukózaoxidázy a peroxidázy v návaznej enzýmovej reakcii [10]. V zmesných preparátoch, kde glukoamyláza je sprevádzaná  $\alpha$ -amylázovou aktivitou, pred stanovením glukoamylázovej aktivity je nutné  $\alpha$ -amylázu inhibovať. K tomu sa využíva chelátón III (EDTA) za súčasnej krátkodobej tepelnej expozície zmesi enzýmov [1, 10]. Klasické postupy používané na stanovenie aktivity glukoamylázy sú neštandardné s ohľadom na neštandardnosť škrobových substrátov a komplikované v technickom prevedení. Z hľadiska unifikácie analytickej metódy a štandardnosti jej prevedenia, podstatným prínosom sú chromolytické metódy založené na vysokomolekulárnych substrátoch, 1,4(6)- $\alpha$ -glukanoch, sietovaných vhodnými elektrofilnými bifunkčnými činidlami (2-chlórometylloxirán, 2,2'-bis/oxiran-ylmetyl/éter) a zafarbenými reaktívnymi farbívami (napr. Remazol Brilliant Blue R) [12].

V predloženej práci sa prezentujú skúsenosti s rutinným využívaním chromolytického tabletového S-testu Glukoamyláza v pivovarníctve.

#### MATERIÁL A METÓDY

Preparát s glukoamylázovou aktivitou pod označením Brew-N-Zyme L-300 (BNZ L-300) sa dováža od firmy Quest (Holandsko) na zlepšenie konečného stupňa prekvasenia a na výrobu špeciálnych druhov piv. Keďže sa jedná o prevádzkový preparát, možno predpokladať, že ide o zmesný preparát s doprovodnou  $\alpha$ -amylázovou aktivitou. Preto pri

stanovení glukoamylázovej aktivity je nutné  $\alpha$ -amylázu inhibovať. Inhibiciu  $\alpha$ -amylázy v preparáte BNZ L-300 sme urobili nasledovným postupom: K 20 ml zriedeného enzýmového preparátu (0,1 % roztok) vo fosfátovom tlmivom roztoku (0,05 mol · l<sup>-1</sup>, pH 4,5) sme pridali 11 tablet EDTA (výroba JZD Agrokombinát Slušovice, jedna tableta obsahuje 2 mg EDTA) a suspenziu sme nechali inkubovať 10 minút pri 52 °C. Za týchto podmienok sa kvantitatívne inhibuje  $\alpha$ -amylázová aktivity, nakoľko  $\alpha$ -amylázy sú metaloproteíny a v supernatante ostane neovplyvnená aktívna hladina glukoamylázy [1]. Po ochladení sme suspenziu scentrifugovali (3 000 g, 5 min) a supernatant sme použili k stanoveniu glukoamylázovej aktivity.

K určeniu glukoamylázovej aktivity tabletovým S-testom Glukoamyláza (výrobok JZD Agrokombinát, Agrogén, Slušovice) je potrebná kalibračná krvka na prepočet absorbancie nameranej pri 620 nm na aktívnu v mkat. l<sup>-1</sup>. K zostrojeniu kalibračnej krvky sme použili referenčnú metódu, ktorou je možné glukózu ako produkt enzýmovej reakcie stanoviť.

Ako referenčnú metódu I sme zvolili metódu, pri ktorej glukóza vznikajúca účinkom BNZ L-300 na rozpustný škrob sa stanoví enzymaticky systémom glukózaoxidáza-peroxidáza použitím komerčne dostupnej súpravy Bio-La-test „Oxochrom Glukóza“ (Lachema, Brno). Použitý bol postup bez deproteinácie, pri teplote inkubácie 30 °C, pričom k 5 ml glukózového činidla sa pridávalo 0,05 ml hydrolyzátu [17].

Referenčnou metódou II sme vytvorenú glukózu stanovili postupom využívajúcim kyselinu 3,5-dinitrosalicylovú (3,5-DNS) [18].

Pri obidvoch referenčných metódach sme použili ten istý postup hydrolyzy škrobu. Hydrolyza škrobu (1% roztok) prebiehalo pri 30 °C v prostredí fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol · l<sup>-1</sup>, pH 4,5) za katalytického účinku enzýmového preparátu BNZ L-300 (0,1% roztok s inhibovanou  $\alpha$ -amylázovou aktívou) po dobu 15 minút.

Substrátom pri obidvoch referenčných metódach bol škrob „Stärke löslich“ p. a. od firmy Merck (SRN).

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

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

K stanoveniu aktivity glukoamylázy v preparáte BNZ L-300 S-testom Glukoamyláza navrhujeme postup podľa schémy v tabuľke 1. Ako je z tabuľky 1 zrejmé, postup pri stanovení glukoamylázovej aktivity je rovnaký ako postup uvádzaný pri stanovení aktívít amylolytických enzýmov S-testom Sladová amyláza [13],  $\beta$ -glukanáz S-testom Lichenáza [12] a S-testom Laminarináza [14] ako aj postup pri stanovení aktívít proteináz S-testom Celková proteináza [15], čo je z hľadiska štandardizácie a normalizácie metodík stanovenia aktivity enzýmov veľmi výhodné.

Tabuľka 1. Postup stanovenia aktivity glukoamylázy v preparáte BNZ L-300 S-testom Glukoamyláza

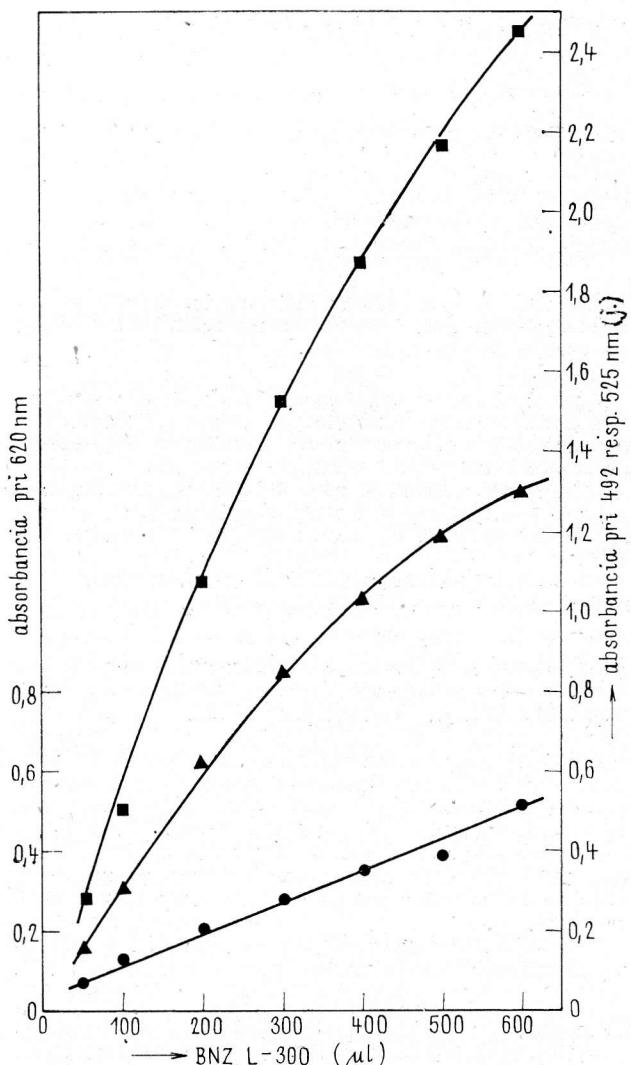
	Pokusná vzorka (ml)	Slepý pokus (ml)
Fosfátový tlmivý roztok (0,05 mol · l <sup>-1</sup> , pH 4,5)	0,9	0,9
Roztok enzýmu (0,1 % obj.)	0,1	—
Predinkubácia 5 min. pri 30 °C		
Príďavok jednej substrátovej tablety — inkubácia 15 min.		
Príďavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Roztok enzýmu (0,1 % obj.)	—	0,1
Centrifugácia (3 000 g, 5 min) alebo filtračia, Whatman No. 1 alebo Filtrak No. 595		
Zmeranie absorbancie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity enzýmového preparátu pomocou kalibračnej krvky (mkat. l <sup>-1</sup> )		

Paralelné stanovenie absorbancie reakčných roztokov pri metóde S-test Glukoamyláza a pri referenčnej metóde I a referenčnej metóde II je znázornené na obr. 1. Kalibračné krvky pre referenčnú metódu I a referenčnú metódu II na glukózu sú znázornené na obr. 2. Z uvedených kalibračných krviek bola vyjadrená koncentrácia glukózy v jednotlivých reakčných roztokoch. V tabuľke 2 sú uve-

Tabuľka 2. Množstvo glukózy vytvorené v enzýmovej reakcií s BNZ L-300 stanovené dvoma metodami

Reakčný roztok	Objem prida- ného enzým. preparátu (μl)	Glukóza stanovená refer. metódou I (mmol · l <sup>-1</sup> )	Glukóza stanovená refer. metódou II (mmol · l <sup>-1</sup> )
1	50	1,85	2,05
2	100	3,55	3,50
3	200	7,25	7,30
4	300	9,75	10,20
5	400	11,90	12,55
6	500	13,90	14,50
7	600	15,45	16,35

dené hodnoty glukózy namerané referenčnou metódou I (Bio-La-testom) a referenčnou metódou II (s kyselinou 3,5-DNS). Výsledky v tabuľke ukazujú, že referenčnou metódou II boli stanovené o niečo vyššie hodnoty glukózy, pričom rozdiely v stanovenej hodnote sa zväčšujú s množstvom pridaného enzýmového preparátu. V priebehu hydrolyzy vznikajúce redukujúce zbytky sacharidov zvyšujú hodnoty glukózy stanovené danou metódou. Úplne zanedbateľné rozdiely v stanovenej hodnote glukózy boli namerané v reakčnom roztoku 2 a 3. Z toho vyplýva, že za určitých zvolených podmienok a za predpokladu dostatočne prečisteného enzýmového preparátu je možné špecifické stanovenie aktivity glukoamylázy aj pomocou nešpecifického stanove-



Obr. 1. Vzťah medzi hodnotou absorbancie a objemom pridaného enzymového preparátu BNZ L-300 (0,1 % obj.) pri metóde S-test Glukoamyláza (●) a pri referenčnej metóde I (▲) a referenčnej metóde II (■).

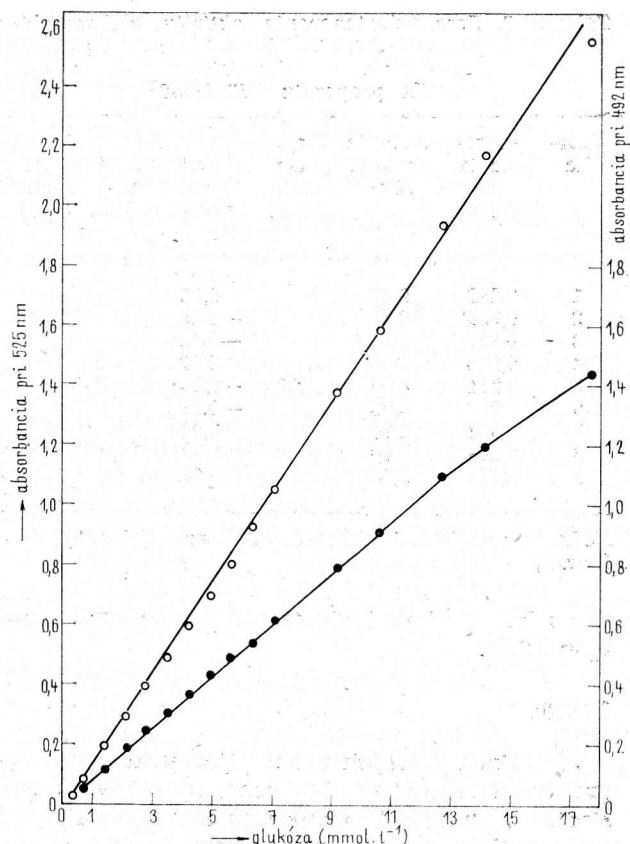
nia redukujúcich sacharidov metódou s kyselinou 3,5-DNS.

Kalibračná krivka pre prepočet absorbancie na meranej metódou S-test Glukoamyláza na aktivitu glukoamylázy (obr. 3) bola zostrojená z grafických závislostí na obr. 1 a obr. 2, vychádzajúc z poznatku, že množstvo vytvorennej glukózy ( $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v časovom intervale umožňuje štandardné vyjadrenie glukoamylázovej aktivity v  $\text{mkat} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Na obr. 3 sú zakreslené dve rôzne série bodov zodpovedajúce dvom metódam stanovenia koncentrácie glukózy. Keďže rozptyl týchto bodov je malý, je vedená nimi jedna kalibračná krivka. Pre hydrolyzu chromolytického substrátu v tablete S-test Glukoamyláza enzymovým preparátom BNZ L-300 kalibračnú krivku na obr. 3 možno vyjadriť vzťahom

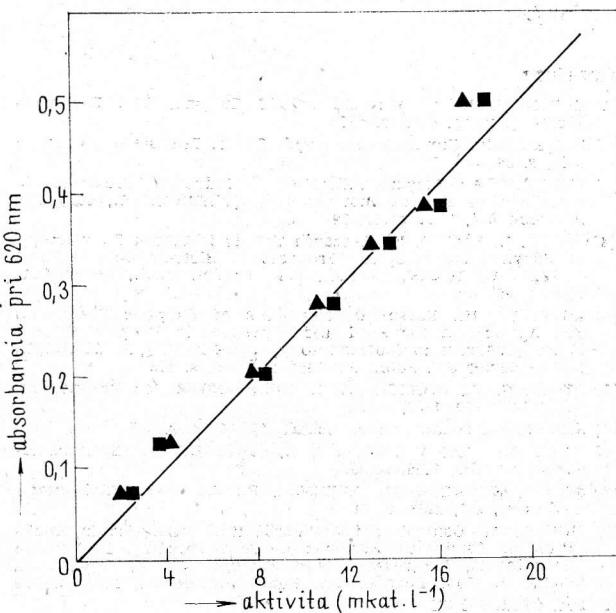
$$a = k A,$$

kde  $a$  je aktivita glukoamylázy ( $\text{mkat} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a  $A$  je absorbancia pri 620 nm a  $k$  je konštantá závislá od spôsobu modifikácie substrátu. Pre substrát použitý v našom pokuse  $k = 39,37$ .



Obr. 2. Kalibračná krivka pre referenčnú metódu I (●) a referenčnú metódu II (○) na D-glukózu.

V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity glukoamylázy v preparáte BNZ L-300 S-testom Glukoamyláza. Pre aktivitu glukoamylázy



Obr. 3. Kalibračná krivka  $a = f(A_{620})$  pre stanovenie aktivity glukoamylázy (BNZ L-300) S-testom Glukoamyláza. Body označené (▲) boli vypočítané z hodôt glukózy nameranej Bio-la-testom, body označené (■) boli vypočítané z hodôt glukózy nameranej metódou s kyselinou 3,5-DNS.

**Tabuľka 3. Presnosť stanovenia aktivity glukoamylázy v sérii S-testom Glukoamyláza. Opakovane stanovenie z toho istého roztoku enzymového preparátu BNZ L-300**

Vzor-ka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita (mkat. l <sup>-1</sup> )	Prie-mer. hod-nota	Od-chýlka od prie-meru	Smero-dajná od-chýlka	Variačný koeficient [%]
1	0,240	9,40		0,32		
2	0,224	8,80		-0,28		
3	0,221	8,65		-0,43		
4	0,235	9,20		0,12		
5	0,221	8,65	9,08	-0,43	±0,33	3,6
6	0,229	9,00		-0,08		
7	0,233	9,10		0,02		
8	0,243	9,50		0,42		
9	0,239	9,40		0,32		

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

9,08 mkat. l<sup>-1</sup> bola hodnota variačného koeficiente  $v_k = 3,6\%$ .

## ZÁVER

Výsledkom všetkých vykonaných pokusov je vypracovaná relatívne jednoduchá, spoľahlivá a prístrojovo nenáročná metóda stanovenia aktivity glukoamylázy tabletovým S-testom Glukoamyláza, slúžiaca pre analytickú kontrolu dovážaných enzymových preparátov s glukoamylázovou aktivitou.

Pre kompletnejšiu standardizáciu pracovného postupu a medzilaboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test Farebný štandard a Enzymový štandard glukoamyláza v tabletovej forme s deklarovanou aktivitou glukoamylázy.

## Literatura

- [1] RUTTLUFF, H. et al.: Industrielle Enzyme, VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1978, s. 255
- [2] Encyklopédia Biotechnológie, vyd. Obzor, Bratislava, Pyramída 1990, s. 58
- [3] WISEMAN, A.: Enzyme Utilization in Industrial Processes, in Handbook of Enzyme Biotechnology (WISEMAN, A., ed.) Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1975, s. 116
- [4] HOLLÓ, J., LÁSZLÓ, E.: Research Trends in Starch Enzymology, in Enzyme Technologies (Progress in Biotechnology Vol. 4) BLAŽEJ, A., ZEMEK, J., eds., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1988, s. 363
- [5] RUTTLUFF, H.: Recent Developments of Enzymes Production and Application for Food and Nutrition, in Enzyme Technologies (Progress in Biotechnology) Vol. 4 BLAŽEJ, A., ZEMEK, J., eds., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1988, s. 335
- [6] OFFER, G. V., GOSLICH, V., HALDENWANGER, M.: Branntweinwirtschaft, **110**, 1970, s. 151
- [7] KREIPE, H.: Branntweinwirtschaft, **112**, 1972, s. 315
- [8] FREY, A., VON WALLMODEN, J., GELHAUS, J.: Branntweinwirtschaft, **108**, 1968, s. 397
- [9] SCHILD, E., WEYH, H., BRENNER, F.: Z. Lebensmittel-Unters. u.-Vorsch., **123**, 1983, s. 24
- [10] TÄUFEL, A.: Control and Standardization Analytics in Application of Amylolytic Enzymes in Food Industry, in Enzyme Technologies, Progress in Biotechnology, Vol. 4, BLAŽEJ, A., ZEMEK, J., eds. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1988, s. 379
- [11] Pat. ČSSR: 189 471

- [12] ZEMEK, J., et al.: Standardization and Unification in the Determination of Activities of Biotechnologically Important Enzymes, Biotechnology and Food Industry, Proc. Int. Sym., Budapest, 1988
- [13] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, E.: Kvas. prům. **34**, 1988, s. 161
- [14] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, E.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 290
- [15] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 136
- [16] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 229
- [17] Lachema Brno Oxochrom Glukosa, 1988
- [18] HLAVÁČEK, I., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 241

**Moncolová, V. - Zemek, J.: Stanovenie aktivity glukoamylázy tabletovým S-testom Glukoamyláza.** Kvas. prům., **35**, 1990, č. 10–11, s. 289–292.

V práci sú prezentované výsledky s rutinným využívaním chromolytického tabletového S-testu Glukoamyláza pri stanovení glukoamylázovej aktivity v enzymovom preparáte Brew-N-Zyme L-300.

Referenčnou metódou bolo stanovenie glukózy ako produktu enzymovej hydrolýzy rozpustného škrobu súpravou Bio-la-test a metódou s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou.

Pre aktivitu glukoamylázy 9,08 mkat. l<sup>-1</sup> bola hodnota variačného koeficiente  $v_k = 3,6\%$ .

**Монцолова, В. - Земек, И.: Определение активности глюкоамилазы таблетным С-тестом Глюкоамилаза.** Квас. прум., **36**, 1990, № 10–11, стр. 289–292.

В работе представлены результаты работы с рутинным использованием хромолитического таблетного С-теста Глюкоамилаза при определении глюкоамилазной активности в энзимном препарате Brew-N-Zyme L-300.

Референтным методом было определение глюкозы как продукта энзимного гидролиза растворимого крахмала набором Bio-la-test и методом с 3,5-дinitrosалициловой кислотой.

Для активности глюкоамилазы 9,08 мккат. л<sup>-1</sup> величина вариантового коэффициента составляла  $v_k = 3,6\%$ .

**Moncolová, V. - Zemek, J.: Determination of Glucoamylase Activity Using the Tablet S-Test Glucoamylase.** Kvas. prům., **36**, 1990, No. 10–11, pp. 289–292.

The tablet S-test Glucoamylase was routinely used for the determination of glucoamylase activity in the enzyme preparation Brew-N-Zyme L-300. As the comparative methods the glucose determination after enzyme hydrolysis of soluble starch using Bio-la-test and the methods with 3,5-dinitrosalicylic acid were used. For the glucoamylase activity of 9,08 mkat. l<sup>-1</sup> the value of a variation coefficient was  $v_k = 3,6\%$ .

**Moncolová, V. - Zemek, J.: Bestimmung der Glukoamylase-Aktivität mittels Tabletten-S-Test Glukoamylase.** Kvas. prům., **36**, 1990, Nr. 10–11, S. 289–292.

In der Arbeit werden die Ergebnisse mit der Routine-Application des chromolytischen Tabletten S-Tests Glukoamylase bei der Bestimmung der Glukoamylase-Aktivität in dem Enzympräparat Brew-N-Zyme L-300 präsentiert.

Als Referenzmethoden wurden zwei angewandt: Bestimmung der Glukose als Produkt der Enzymhydrolyse der löslichen Stärke mittels Bio-la-Test-Garnitur, und Methode mit 3,5-Dinitrosalizylsäure.

Für die Aktivität der Glukoamylase 9,08 mkat. l<sup>-1</sup> betrug der Wert des Variationskoeffizienten  $v_k = 3,6\%$ .