

Stanovenie aktivity β -glukanázy v enzymových preparátoch pre potravinárstvo

EDITA DUDÍKOVÁ

Súhrn. Pre potreby špecifikácie enzymových preparátov používaných v potravinárskom priemysle a zjednotenie analytického postupu pre technickú prax sa urobil prieskum a výber metód na stanovenie aktivity β -glukanázy. Experimentálne sa overila metóda rozpracovaná vo VÚPP Praha a S-test lichenáza. Z výsledkov overovania na sérii vzoriek vyplynulo, že metóda podľa VÚPP Praha je vhodná pre účely špecifikácie. Je však potrebné doplniť postup uvedením konkrétneho druhu substrátu. Odporúča sa akceptovať štandardný jačmenný β -glukan firmy Biocon.

Klasickým zdrojom enzymov pri výrobe piva je slad, avšak vysoké náklady jeho sladovania viedli k vývoju enzymov, ktoré sa pridávajú k jačmeňu a ďalším surovinám v priebehu technologického procesu. Jedným z dôležitých enzymov, ktoré sa uplatňujú v pivovarníctve je β -glukanáza. Aplikácia β -glukanázy sa prejaví znížením viskozity mladiny a urýchlením konverzie substrátu v prípade menej kvalitného sladu alebo vysokého obsahu jačmeňa, ďalej na zvýšení rýchlosťi filtrace piva a filtračnej kapacity [1].

Viskozita mladiny a filtrovateľnosť piva závisí od obsahu β -glukanu, ktorý je najdôležitejším neškrobovým polysacharidom v jačmeni. Rozpuštný β -glukan je prítomný v jačmennom zrne v množstve 1 - 2 %. β -glukány sa do istej miery hydrolyzujú počas sladovania endogénnou sladovou β -glukanázou laminarinázového typu (endo-1,3- β -D-glukan glukanohydroláza, EC 3.2.1.39) a čiastočne aj celulázou (endo-1,4- β -D-glukan glukanohydroláza, EC 3.2.1.4). Rozhodujúci význam v tomto procese však

Ing. Edita Dudíková, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

má β -glukanáza lichenázového typu (endo-1,4(1,3)- β -D-glukan glukano-hydroláza EC 3.2.1.73), bežne nazývaná β -glukanáza. V jačmennom zrne má β -glukanáza nízku aktivitu, jej aktivita výrazne vzrástá v priebehu klíčenia zrna, t.j. v procese sladovania. Aktivita β -glukanázy sa v rôznych druchoch sladu líši. Stanovenie aktivity sladovej β -glukanázy je dôležitým analytickým ukazovateľom kvality sladu, nakoľko v prípade nízkych hodnôt je nutné znižovať viskozitu mladiny prídavkom mikrobiálnej β -glukanázy [2].

Mikrobiálne enzymy obsahujú relatívne termostabilné β -glukanázy (optimum 50 - 70 %) a ich producenti sú tak niektoré baktérie ako aj plesne (*Aspergillus niger*, *Penicillium emersonii*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*). Enzymové preparáty β -glukanázy obsahujú často vedľajšie enzymové aktivity (amylázy, glukozidázy, proteinázy), alebo sú zložkami enzymových systémov s deklarovanými aktivitami α -amylázy, β -glukanázy a proteinázy [3].

Výber metódy stanovenia aktivity β -glukanázy

Metódy stanovenia aktivity β -glukanázy z aspektu použitia v potravinárstve sa zakladajú na reduktometrickom stanovení uvoľnených redukujúcich sacharidov alebo na viskozimetrickom meraní. Do prvého typu metód patrí postup odporúčaný Výborom expertov FAO/WHO pre potravinárske aditíva. Postup je určený na stanovenie aktivity β -glukanázy u enzymových preparátov pochádzajúcich z *Aspergillus niger* a *Bacillus subtilis*. Analýza sa zakladá na hydrolýze licheninu ako substrátu pri 40°C a pH 6,5 počas 15 minút. Uvoľnené redukujúce látky sa stanovia neokuproinovou metódou. Postup neuvádzza konkrétny druh licheninu ako substrátu. Jednotka aktivity β -glukanázy (BGU) sa definuje ako množstvo enzymu, ktoré uvoľní 1 μ mol redukujúcich sacharidov (ako ekvivalenty glukózy) za minútu za podmienok stanovenia [4].

Na rovnakom princípe sa zakladá postup stanovenia 1,4(1,3)- β -glukanázovej aktivity, rozpracovaný na VÚPP v Prahe a uplatňovaný pri vývoji β -glukanázového preparátu [5]. V zmysle tohto postupu sa β -glukanový substrát (lichenin alebo iný β -glukán v koncentrácií 5 g.l⁻¹) podrobí pôsobeniu enzymu 30 minút pri 40°C a pH 5,5 a uvoľnené redukujúce látky sa stanovia spektrofotometricky s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou.

Firma Novo-Industri stanovuje aktivitu β -glukanázy svojich výrobkov Glucanex a Ceremix za použitia reduktometrickej metódy so Somogyi-Nelsonovým činidlom. Jednotka aktivity sa definuje rovnako ako u oboch vyššie uvedených postupov, substrátom je jačmenný β -glukán, štandardné podmienky sa líšia v teplote hydrolízy 30°C. Uplatňuje sa optimálne pH pre enzym, čas reakcie 30 minút [6].

Druhým typom metód stanovenia aktivity β -glukanázy sú viskozimetrické metódy. Zaraďuje sa medzi ne postup stanovenia endo-1,3- β -glukanázy, ktorý používa firma Jan Dekker pre svoje výrobky Brew-N-zyme [1,7]. Postup je založený na pôsobení β -glukanázy na roztok jačmenného β -glukanu pri 50°C, pričom sa znižuje viskozita v dôsledku rozštiepenia molekuly substrátu.

Zmena viskozity sa meria Oswaldovým viskozimetrom. Jednotkou aktivity β -glukanázy je zmena recipročnej špecifickej viskozity za minútu. Aktivita sa vyhodnotí pomocou počítača s programom pre výpočet regresných koeficientov. Aj ďalšia holandská firma Gist-Brocades udáva aktivitu svojej bakteriálnej a fungálnej β -glukanázy vo viskozimetrických jednotkách [8].

Okrem uvedených dvoch typov metód bola vyvinutá aj rutinná metóda, ktorú predstavuje S-test lichenáza. Chromolytický tabletový test lichenáza vtedajšieho Biotechnologického ústavu SVŠT obsahuje ako substrát modifikovaný lichenan izolovaný z *Centraria islandica* a mikrokryštálickú celulózu. Hydrolízou chromolytického substrátu sa uvoľnia sfarbené degradačné produkty, ktorých intenzita sa meria spektrofotometricky. Aktivita β -glukanázy sa vyjadruje v relatívnych jednotkách [2,9].

Materiál a metódy

Použili sa vzorky enzymových preparátov: β -glukanáza VÚPP Praha 13 000 IU.g⁻¹ (*Trichoderma reesei* CCII); Ceremix Novo, zmes α -amylázy, β -glukanázy 300 BGU.g⁻¹ a proteinázy (*Bacillus subtilis*); Brew-N-zyme BG-5 Jan Dekker, fungálny pôvod; Brew-N-zyme CGP-13 a Brew-N-zyme GPG-L Jan Dekker, zmesi α -amylázy, β -glukanázy a proteinázy (pôvod neuvedený). Ďalej sa použil jačmenný β -glukan Biocon, lichenan a S-test lichenáza z vtedajšieho Biotechnologického ústavu SVŠT. Ostatné chemikálie pochádzali z firmy Lachema.

Stanovenie aktivity 1,4(1,3)- β -glukanázy [5,10]

Metóda sa zakladá na enzymovej hydrolýze β -glukanového substrátu a stanovení uvoľnených redukujúcich látok kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (DNS) spektrofotometricky. V niektorých prípadoch je potrebná korekcia na endo-1,4- β -glukanázu (EC 3.2.1.4) so substrátom Na-karboxymetylcelulózou. U väčšiny enzýmov sa však za podmienok optimálnych pre konverziu 1,4(1,3)- β -glukanu neuplatňuje enzymová zložka celulázového komplexu degradujúca karboxymetylcelulózu a korekciu možno zanedbať.

Definícia:

Jednotka β -glukanázovej aktivity 1 U je množstvo enzýmu, ktoré uvoľní z β -glukanového substrátu 1 mol glukózy za minútu za podmienok metódy.

Roztoky:

- a/ citrátový tlmivý roztok ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) pH 5,5 alebo pH optimálne pre daný enzým,
- b/ substrát: jačmenný β -glukan Biocon (5 g.l^{-1} citrátového tlmivého roztoku) sa rozpustí pri 85°C ,
- c/ DNS činidlo: 30 g vínanu Na-K sa rozpustí za horúca v 50 ml destilovannej vody. 1g kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej sa rozpustí za horúca v 20 ml roztoku NaOH (2 mol.l^{-1}). Oba roztoky sa spoja, ďalej zahrievajú a po ochladení sa objem doplní na 100 ml destilovanou vodou.

Postup:

V kalibrovaných skúmavkách o objeme 20 ml sa k 1 ml substrátu po vytemperovaní vo vodnom kúpeli pri 40°C prídá 1 ml vhodne riedenej vzorky enzýmu. Enzým musí byť riedený tak, aby v oblasti alikvótou 1 ml bola závislosť absorbancie na koncentráции enzymového roztoku lineárna. Po 30 minútovej inkubácii pri 40°C sa reakcia zastaví pridaním 2 ml DNS-činidla a reakčná zmes sa varí 5 minút vo vodnom kúpeli. Po ochladení sa obsah doplní na 20 ml destilovanou vodou a premieša. Na spektrofotometri sa meria absorbancia červenohnedého roztoku pri 530 nm v 1 cm kyvetách oproti slepému pokusu, pri ktorom sa vzorka enzýmu prídá do reakčnej zmesi až po inkubácii a po prípadku DNS činidla.

Kalibračná čiara:

K 1 ml roztokov glukózy v koncentračnom rade 0,1 až 1 mg.ml⁻¹ sa pridá 1 ml destilovanej H₂O a 2 ml DNS činidla. Reakčné zmesi sa varia 5 minút vo vodnom kúpeli, po ochladení a doplnení na objem 20 ml sa meria absorbancia roztokov rovnako ako pri vlastnom stanovení.

Výpočet aktivity:

Kvapalné enzýmy

$$\text{Aktivita} = G \cdot R \cdot \frac{1000}{30 \cdot 180} = G \cdot R \cdot 0,185 \quad [\text{U.ml}^{-1}]$$

Tuhé enzýmy

$$\text{Aktivita} = G \cdot \frac{1000}{N} \cdot \frac{1000}{30 \cdot 180} = G \cdot \frac{1000}{N} \cdot 0,185 \quad [\text{U.g}^{-1}]$$

kde G je glukóza z kalibračnej čiary [mg], R-riedenie enzýmu, 1000 - prepočet mg glukózy na g, 30 - prepočet na 1 minútu, 180 - prepočet na mol glukózy, N - množstvo enzýmu v 1 ml roztoku [mg], 1000 - prepočet na 1 g enzýmu u tuhých preparátov.

Chromolytický S-test lichenáza [9]

Postup sa zakladá na meraní intenzity sfarbenia degradačných produktov, ktoré sa vytvoria počas enzýmovej hydrolýzy tablety obsahujúcej ako substrát lichenin s kovalentne viazaným farbivom.

Definícia:

Jednotka aktivity 1 U je relatívna aktivita, ktorá odpovedá 1 mg chromolytického substrátu, zhydrolyzovanému za 1 hodinu.

Roztoky:

- citrátový tlmivý roztok (0,05 mol.l⁻¹) o pH 5,5 pre fungálne enzýmy
a o pH 7 pre bakteriálne enzýmy,
- zastavovací roztok: 10 g Na₂CO₃ sa rozpustí v 900 ml destilovanej vody
a pridá sa 100 ml acetónu.

Postup:

Do kónickej centrifugačnej kyticety, ktorá obsahuje 0,3 ml tlmiaceho roztoku a 0,2 ml vhodne riedenej vzorky enzymu sa po vytemperovaní pridá substrátová tableta a zmes sa inkubuje pri 37°C 60 minút. Reakcia sa zastaví prídavkom 3 ml zastavovacieho roztoku a zmes sa po 5 minútach odcentrifuguje. Meria sa absorbancia supernatantu pri 620 nm oproti slepému pokusu, u ktorého sa roztok enzymu pridá až po pridaní zastavovacieho roztoku.

Výpočet aktivity:

Kvapalné enzymy

$$\text{Relatívna aktivita} = \left[\frac{A_t}{50} \right]^{-1} \cdot A \cdot 5 \cdot R = \frac{A}{A_t} \cdot 2,5 \cdot 10^2 \cdot R \quad [\mu\text{ml}^{-1}]$$

Tuhé enzymy

$$\text{Relatívna aktivita} = \frac{A}{A_t \cdot N} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \quad [\mu\text{g}^{-1}]$$

kde A je absorbancia vzorky, A_t - absorbancia zodpovedajúca celkom z hydrolyzovanému chromolytickému substrátu v tablete; je deklarovaná pre každú výrobnú šaržu testu, N - množstvo enzymu v 1 ml roztoku [mg], R - riedenie enzymu, 50 - množstvo modifikovaného substrátu v 1 tablete [mg], 5 - prepočet na objem vzorky 1 ml.

Výsledky a diskusia

Pre stanovenie aktivity β -glukanázy sa overovala metóda stanovenia 1,4(1,3)- β -glukanázovej aktivity postupom rozpracovaným na VÚPP Praha [5]. Tento postup je porovnateľný s metódou odporúčanou Komisiou expertov FAO/WHO pre enzymy. Rozdiel medzi metódami je vo vlastnom stanovení uvoľnených redukujúcich látok, ktoré sa u postupu FAO/WHO stanovia neokuproinovou metódou [4]. Ako substrát sa použil jačmenný β -glukan firmy Biocon, ktorý bol vyvinutý špeciálne pre sladovníctvo a pivovarníctvo ako štandardný čistý β -glukanový substrát [11]. Pre porovnanie vplyvu substrátu na aktivitu sa u vzorky enzymu Brew-N-zyme GPG-L,

ktorého jedna enzýmová zložka je β -glukanáza, overoval aj natívny lichenan domáceho pôvodu. Rozdiel v nameranej aktivite po hydrolýze oboch substrátov nie je zanedbateľný, preto výsledky získané s použitím týchto dvoch substrátov nemožno stotožňovať. Metóda stanovenia aktivity β -glukanázy sa overovala pri analýze 5 vzoriek enzýmov, obsahujúcich β -glukanázovú zložku (tab. 1). U vzoriek fungálneho pôvodu a vzoriek s pH optimom blízko 5 sa enzýmová konverzia substrátu uskutočnila v tlmivom roztoku o pH 5,5 a u vzorky bakteriálneho pôvodu Ceremix pri pH 7.

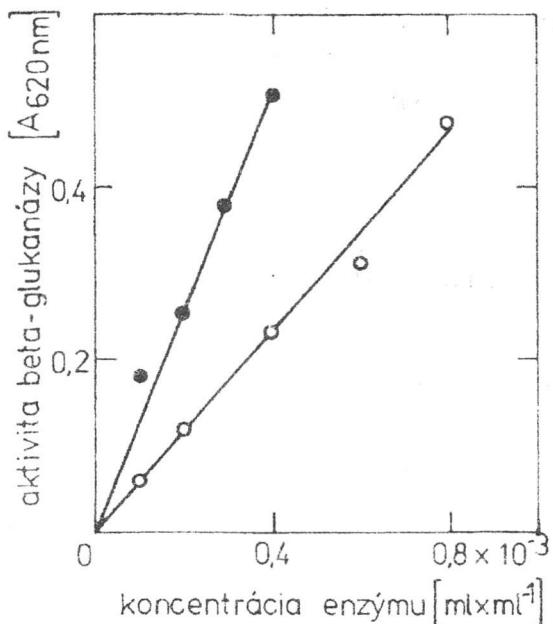
Tabuľka 1. Aktivita β -glukanázy, stanovená metódou podľa VÚPP a S-testom lichenáza v komerčných enzýmových preparátoch.

Table 1. β -glucanase activity, determined by method according FIRI and S-test lichenase in commercial enzyme preparations.

ENZÝM ¹	VÚPP ²			S-test ⁵	
	Aktivita ³		Variač. koef. ⁴	Relatívna aktivita ⁶	
	[U.g ⁻¹]	[U.ml ⁻¹]		[u.g ⁻¹]	[u.ml ⁻¹]
1 β -glukanáza VÚPP	12 050	-	± 4	8 200	-
2 Brew-N-zyme CGP-13	6 000	-	-	39 000	-
3 Brew-N-zyme BG-5	530	-	-	140	-
4 Brew-N-zyme GPG-L	-	2 750	-	-	14 800
5 Ceremix	-	4 000	-	-	51 100

1 - enzyme, 2 - Food Industry Research Institute, 3 - S-test, 4 - activity, 5 - variation coefficient, 6 - relative activity.

Význam optimálneho pH pre hodnotu aktivity demonštrujú ďalej uvedené výsledky získané pri overovaní S-testu lichenáza (obr. I). Stanovili sa oblasti linearity merania absorbancie v závislosti od koncentrácie enzýmu pre jednotlivé vzorky. Doplnili sa vzorce pre výpočet aktivity a spresnil sa význam jednotlivých symbolov vo vzorcoch v snahe, aby v praxi nevznikali chyby v dôsledku nesprávneho výpočtu, čo je častou príčinou nezrovnalostí. Reprodukovateľnosť metódy stanovenia aktivity 1,4(1,3)- β -glukanázy sa vyhodnotila u vzorky β -glukanázy z VÚPP Praha. Z výsledkov 6 sérií stanovení sa vypočítal variačný koeficient $\pm 4\%$, ktorý svedčí o dobrej reprodukovateľnosti overovaného postupu. Hodnota aktivity nameraná v našom laboratóriu sa ďalej porovnala s aktivitou deklarovanou pre vzorku



Obr. 1. Závislosť aktivity β -glukanázy vyjadrené časovou zmenou absorbancie od pH reakčnej zmesi pri stanovení S-testom lichenáza u enzymového roztoku Ceremix.

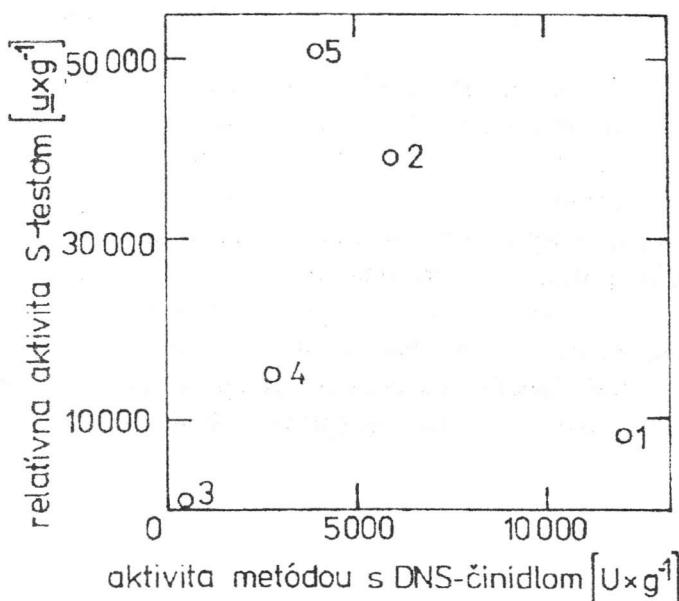
● - optimálne pH 7, ○ - pH 5,5.

Fig. 1. β -glucanase activity dependence expressed with time change of absorbtion from pH of reactive mixture in S-test lechenase determination in enzyme solution Ceremix.

● - optimum pH 7, ○ - pH 5,5.

β -glukanázy z VÚPP (13 000 U.g⁻¹). Na oboch pracoviskách sa použil ako substrát jačmenný β -glukan firmy Biocon. Rozdiel medzi laboratóriami je približne 7 %, čo je primeraný rozdiel vzhľadom na to, že postup sa vzájomne detailne nezjednocoval.

Na stanovenie aktivity β -glukanázy lichenázového typu sa overoval ďalej S-test lichenáza z vtedajšieho Biotechnologického ústavu SVŠT pre 5 vzoriek enzymov obsahujúcich β -glukanázy (tab.1), pričom sa akceptovalo optimálne pH pre príslušné enzymy tak, ako je uvedené vyššie. Vplyv rozdielnej hodnoty pH inkubačnej zmesi na aktivitu oproti optimálnemu pH sá sledoval u vzorky kvapalného enzymu Ceremix a je znázornený na obr. 1. Pri optimálnom pH 7 je aktivita dvojnásobne vyššia ako pri porovnávanom pH 5,5. Z výsledkov overovania vyplynulo, že S-test lichenáza umožňuje stanovenie aktivity u všetkých 5 enzymov, koncentračná závislosť absorbanie je lineárna v rozsahu 0,1 až 0,6 a dosiahla sa vyhovujúca reprodukova-



Obr.2. Relácia hodnôt aktivity β -glukanázy u rôznych enzymových preparátov, stanovených metódou s DNSčinidlom a S-testom lichenáza.
1 - β -glukanáza VÚPP, 2 - Brew-N-zyme CGP-13,
3 - Brew-N-zyme BG-5, 4 - Brew-GPG-L, 5 - Ceremix.

Fig.2. β -glucanase values relation in different enzyme prepartes, determined by the method with DNS agent and S-test lichenase.
1 - β -glucanase FIRI, 2 - Brew-N-zyme CGP-13,
3 - Brew-N-zyme BG-5, 4 - Brew-GPG-L, 5 - Ceremix.

teľnosť výsledkov v opakovaných stanoveniach s výnimkou vzorky Brew-N-zyme CGP 13, pravdepodobne pre jeho zníženú rozpustnosť. S-test lichenáza sa prejavil ako jednoduchý a pritom presný postup, použiteľný najmä pri sledovaní zmien aktivity v technickej praxi.

Ďalej sa porovnali hodnoty aktivity namerané reduktometrickou metódou stanovenia 1,4(1,3)- β -glukanázovej aktivity a S-testom lichenáza. Z výsledkov porovnania však nie je možné určiť žiadny funkčný vzťah medzi hodnotami získanými oboma metódami pre uvedených 5 vzoriek enzymových preparátov (obr.2). Jednou z príčin pre tak veľký rozptyl hodnôt aktivít nameraných porovnávanými postupmi je zrejme rozdiel v použitom substráte, pretože tableta S-testu lichenáza obsahuje vedľa modifikovaného lichenanu aj mikrokryštallickú celulózu [2]. Ďalšiu príčinu možno pripisať rozdielnemu spôsobu účinku jednotlivých enzymov na substráty, nakoľko

obsahujú aj vedľajšie aktivity alebo sú zmesi enzýmov (napr. Brew-N-zyme CGP 13 a GPG-L).

Z hľadiska návrhu na štandardizáciu v našich podmienkach možno odporúčať metódu stanovenia β -glukanázy rozpracovanú na VÚPP Praha s tým, že sa v nej doplní údaj o konkrétnom druhu substrátu potrebnom pre analýzu. Vzhľadom na výsledky pri overovaní čistého štandardného substrátu jačmenný β -glukan firmy Biocon, možno akceptovať tento substrát pre analytický postup. Odporúčaná metóda je aj v súlade s postupom FAO/WHO pre stanovenie aktivity β -glukanázy. Detailne upresnený a doplnený postup vzhľadom na jeho použitie vo výrobnej praxi sa uviedol v príručke "Metódy špecifikácie enzymových prípravkov pre potravinársky priemysel" [10], ako aj v záverečnej správe riešenia výskumnej etapy [12].

Literatúra

1. Firemná literatúra: Brew-N-zyme β -glucanase, Jan Dekker, Holandsko, 1986.
2. MONCOLOVÁ, V. - ZEMEK, J. - KUNIAK, E.: Kvasný průmysl, 34, 1988, s.161.
3. GODFREY, T. - REICHELT, J.: Industrial Enzymology, The Nature Press, New York, 1983.
4. Specifications for Identity and Purity, FAO and Nutrition Paper, No.38, Rome 1988.
5. FOJT, B.: Vývoj preparátov degradujúcich rostlinné polysacharydy. Dôlží zpráva P11-529-810/03-01, VÚPP Praha, 1986.
6. Firemná literatúra: Ceremix, Novo-Industri, Dánsko, 1988.
7. Firemná literatúra: Bestimmung der Endo-1,3- β -Glucanase aktivität, Quest International, Holandsko, 1989.
8. Firemná literatúra: Filtrase NL and Filtrase L, Gist-brocades, Holandsko, 1989.
9. Informačný materiál: S-test lichenáza, Biotechnologický ústav SVŠT, 1989.
10. DUDÍKOVÁ, E. - JURÍKOVÁ, K. - LEŠKOVÁ, Z. - ŠUBÍK, J.: Metódy špecifikácie enzymových prípravkov pre potravinársky priemysel, VÚP Bratislava, 1990, s.59.
11. Firemná literatúra: Barley β -Glucan, Gamma Chemie, SRN 1989.
12. ŠUBÍK, J. - DUDÍKOVÁ, E. - JURÍKOVÁ, K. - LEŠKOVÁ, Z.: Komplexná analytická špecifikácia enzymových preparátov, Záverečná správa P11-529-810/04.01, VÚP Bratislava, 1990, s.115.

Do redakcie došlo 15.11.1992.

Determination of β -glucanase activity in enzyme preparations for food industry

Summary

For the needs of specification of enzyme preparations used in food industry and for unifying analytical method for technical practice research and choice of methods for β -glucanase activity determination were carried out. The FIRI method and S-test lichenase were verified experimentally. From the verification on a serie of samples it followed that the FIRI method is suitable for specification purposes. But it is necessary to complete the method with the concrete type of substrate. It is recommended to accept standard barley β -glucan from firm Biocon.