

THE DETERMINATION OF EXTRACT IN BARLEY BY THE ENZYMATIC WAY

Karásková I., Gregor T.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkarask7@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was determine extract in barley by the enzymes on base proteases, cellulases, xylanases, β -glukanases and amylases. These enzymes were disintegrated components of grain of barley analogous to natural enzymes in malt; fall off so need grain of barley malted. The grain of barley hasn't needed enzymes for disintegration compounds in the barley. The determination of extract in barley by conventional method by prepared sweet, are not practice. For information of extract in barley is used formula by the Bishop. The formula was won experimentally and was for needs modern malting several times forced. Direct method by the help of prepared congress sweet we are making in the final malt. Preparation of the malt lasts usually 10 days; this suit in laboratory conditions does in micro-malt house. Like optimal, shows application enzymes in this succession: cellulase, xylanase, β -glukanase, α -amylase, β -amylase along with protease. In comparison with assessment by enzymatic way in the barley and way by the prepare congress sweet, are record same, with error perhaps 1%.

Key words: extract, barley, malt, enzymatic way

Acknowledgments: Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop, 1M0570.

ÚVOD

Cílem práce je stanovení extraktu u ječmene pomocí enzymatických preparátů (Genencor, Holansko) na bázi proteáz, celulózy, xylanázy, β -glukanázy a amylázy. Tyto enzymy rozštěpí složky zrna podobně jako přirozené enzymy u sladu, odpadá tak potřeba zrna ječmene sladovat, stanovení lze provést přímo u ječmene, rmutovací proces je podobný jako při stanovení extraktu u sladu.

Stanovení extraktu u ječmene se přímou metodou přípravy kongresní sladiny neprovádí. Zrno ječmene nemá potřebné enzymy pro rozklad obsahových látek zrna a vznik rozpustných sacharidů, bílkovin a dalších součástí zrna ječmene. K získání informace o předběžném extraktu ječmene je používán vztah podle Bishopa, ve kterém je zahrnut obsah bílkovin a hmotnost tisíce zrn:

$$E = 83,6 - (0,85 \cdot B) + (0,15 \cdot G),$$

kde E - extraktu sladu v sušině v %, B – obsah bílkovin v sušině v %, G - HTZ v sušině v g

Vztah byl získán experimentálně a byl pro potřeby moderního sladovnictví několikrát modifikován. Přímou metodou pomocí přípravy kongresní sladiny se stanovení extraktu provádí až u hotového sladu. Ječmen tak musí projít sladařským procesem, který celý trvá obvykle 10 dnů, tento proces se v laboratorních podmínkách provádí v mikrosladovně. (Dunovský, 2007) Firma GENENCOR vyrábí kompletní sadu enzymů pro rozklad obilného zrna, v praxi je tento systém enzymů využíván především pro přípravu sladkých zápar při výrobě bioethanolu. Jako nejvhodnější se jeví aplikace enzymů v tomto sledu (Kolínková, 2008) celulóza + xylanáza + β -glukanáza, úplné ztekucení a zmazovatění škrobu α -amylázou, ztukření β -amylázou společně s proteázou.

MATERIÁL A METODIKA

Pro stanovení byly použity následující enzymy:

OPTIMASH™ BG

Tento enzym redukuje viskozitu ječmenných a pšeničných zápar. Enzym OPTIMASH™ BG obsahuje kombinaci enzymů typu β -glukanázy, které efektivně modifikují a štěpí neškrobnaté sacharidy, stavební materiály rostlinných buněk. Výhodou použití OPTIMASH™ BG je hydrolyzáza neškrobových sacharidů, které jinak zvyšují viskozitu zápar. Nejvyšší aktivitu má enzym při 60 – 70 °C v rozmezí hodnot pH 4 – 4,6. Při dané teplotě je doba působení minimálně 30 minut. (Genencor, 2007)

OPTIMASH™ XL

Tento enzym je schopný redukovat viskozitu a oddělovat zlomky obilných frakcí pšenice, žita a ječmene. OPTIMASH™ XL obsahuje kombinaci celulózy a xylanázy, které efektivně přeměňují a štěpí neškrobnaté sacharidy. Štěpí tedy hlavně celulózu, arabinoxylany, v menší míře také β -glukany, které jsou sesíťované navzájem také s ligninem, pektiny, proteiny, škrobem a lipidy. Nejvyšší aktivitu má enzym při 60 – 70 °C v rozmezí hodnot pH 4,5 – 5. Při dané teplotě je doba působení minimálně 30 minut. (Genencor, 2007)

SPEZYME® ETHYL

Tento enzym obsahuje termostabilní škrob hydrolyzující α -amylázu s vynikající stabilitou při nízkém pH. Endoamyláza v enzymu SPEZYME® ETHYL náhodně hydrolyzuje α -1,4-glykosidické vazby s rychlou redukcí viskozity želatinujícího škrobu v obilných záparech, produkuje rozpustné dextriny a 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. (Genecor, 2007)

FERMENZYME® L-400

Tento enzym se využívá k úplnému zcukření naštěpěného škrobu až na maltózu a glukózu. Je to exoamyláza, která katalyzuje uvolnění po sobě následujících glukózových jednotek z neredukujících konců rozpustných dextrinů a 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, zahrnující kukuřici, čirok, ječmen, pšenici, rýži a brambory. Proteáza 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 enzymu. Preparát rapidně zvyšuje obsah proteinů ve rmutu. (Genecor, 2007)

Dávkování a optimální reakční podmínky jednotlivých enzymatických preparátů jsou v tabulce 1. Po přidavku enzymů Optimash XL, Optimash BG k navážce ječného šrotu v destilované vodě nastává v první fázi při teplotě 60 °C štěpení celulóзовých látek, vlákniny a β -glukanů. V další fázi při teplotě 80 °C po přidavku enzymu Spezyme Ethyl mazovatí škrob, suspenze se plně ztekucuje, amylóza a amylopektin ze škrobu je přeměňován na dextriny a oligosacharidy, zkouška jodem po proběhnutí této fáze je negativní. Po ochlazení na 60 °C a přidavku Fermentzyme L-400 dochází k finálnímu rozštěpení dextrinů a oligosacharidů až na maltózu a glukózu, dochází také ke štěpení bílkovin (Pavlíková, 2008).

Tab. 1 Enzymatické preparáty, dávkování a optimální reakční podmínky

	použitý enzym	druh enzymu	teplota [°C]	Čas [min]	dávkování [μl/100g šrotu]	pH
1	Optimash XL	celuláza, xylanáza	60-70	30	25	4,5 - 5,5
	Optimash BG	β -glukanáza	60-70	30	25	4,5 - 5,5
2	Spezyme Ethyl	α -amyláza	83-95	90	100	5,4 - 5,8
3	Fermentzyme L-400	β -amyláza, proteáza	60-65	30	100	3,8 - 4,5

Roztok je po skončení poslední fáze zfiltrován přes papírový filtr (červená barva, č. 560) a pomocí pyknometru změřena hustota. Hustota přímo koreluje s obsahem extraktivních látek ve sladině, pomocí tabulek je možno vyhledat odpovídající koncentraci sladinu.

Vzorky zrna ječmene byly pomlety na laboratorním mlýnku (Laboratorní mlýn, Laboratorní přístroje Praha, Česká Republika). Rmutování bylo provedeno v osmimístné rmutovací lázni (1-Cube, Česká Republika). Rmutovací lázeň je opatřena mikropočítačem, pomocí něhož je možné celý

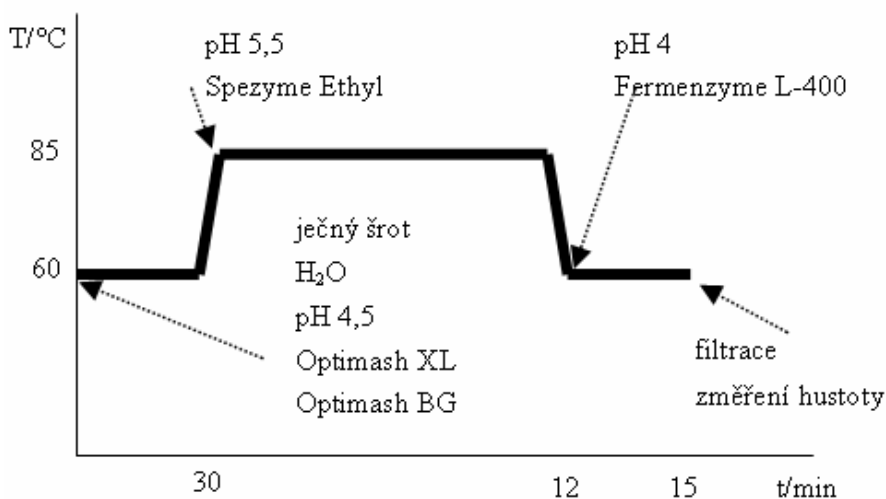
rmutovací proces naprogramovat do přesných časových celků. Celý proces lze provádět i při manuálním nastavení teplot. Enzymatické preparáty byly dodány firmou Genencor (Holansko), je nutné je uchovávat v lednici, plná účinnost při takovémto uskladnění je garantována 1 rok, s každým dalším rokem uskladnění klesá účinnost enzymů asi o 15 %. Pro přesné dávkování enzymů byla použita pipeta (10-100 μ l, Finnpiquette, Thermo Scientific, USA) s výměnnými špičkami, na každý enzymatický preparát byla použita nová špička. Při úpravě pH byl použit pH metr inoLAB (Německo).

Ke snížení pH rmutu byla použita kyselina sírová (Lachema, Česká Republika, čistota p.a.), z níž byl připraven roztok o koncentraci 1 mol/l.

Pro zvýšení pH rmutu byl použit 1M roztok hydroxidu sodného (Lachema, Česká Republika, čistota p.a.).

Proces enzymatického rozkladu zrna ječmene a získání extraktu probíhal ve rmutovací kádince umístěné do rmutovacího přístroje. Směs ječného šrotu a vody byla promíchána míchadlem, které je součástí přístroje. Bylo upraveno pH směsi na 4,5 pomocí 1M roztoku kyseliny sírové. Rmutovací kádinka byla umístěna do rmutovací lázně, v níž byla nastavena teplota 60 °C. Byly přidány enzymy Optimash XL a Optimash BG. Při této teplotě je směs rmutována 30 minut. Po uplynutí této doby byla teplota zvýšena na 85 °C, pH směsi bylo upraveno na 5,5 roztokem NaOH a byl přidán preparát Spezyme Ethyl. Směs je při této teplotě rmutována 90 minut. V poslední fázi byla teplota rmutovací lázně snížena na 60 °C, pH směsi upraveno roztokem kyseliny sírové na 4 a byl přidán preparát Fermentzyme L-400. Tato fáze trvá 30 minut. V grafu 1 je znázorněn průběh všech kroků.

Graf 1 Průběh všech reakčních kroků.



Po skončení poslední fáze je kádinka vyjmuta ze rmutovací lázně a ochlazena studenou vodou na pokojovou teplotu. Po promíchání byl obsah kádinky zfiltrován přes skládaný filtr (červený, č. 560), prvních 100 ml bylo vráceno zpět na filtr. Stanovení hustoty sladiny bylo provedeno

pyknometricky pomocí Reischauerova pyknometru. U pyknometru byla zjištěna jeho vodní hodnota. Stejný postup byl opakován i s připravenou sladinou. Hustota sladinou je podíl hmotnosti sladinou a hmotnosti (objemu) vody. (Králík, 2006)

$$\rho = \frac{\text{hmotnost sladinou v g}}{\text{vodní hodnota pyknometru v g}}$$

V tabulkách (viz příloha 1) byla vyhledána podle hustoty sladinou příslušná koncentrace a dosazena do vztahu pro výpočet extraktu u ječmene:

$$E = \frac{(800 + a) \cdot b}{100 - b}, \text{ kde } a \text{ je vlhkost ječmene v } \%, b \text{ je koncentrace sladinou z tabulek v } \%.$$

Extrakt v ječmeni byl přepočítán na sušinu podle vztahu:

$$E_{\text{suš}} = \frac{E \cdot 100}{100 - a}, \text{ kde } E \text{ je extrakt v ječmeni v } \%, a \text{ je vlhkost ječmene v } \%.$$

VÝSLEDKY A DISKUZE

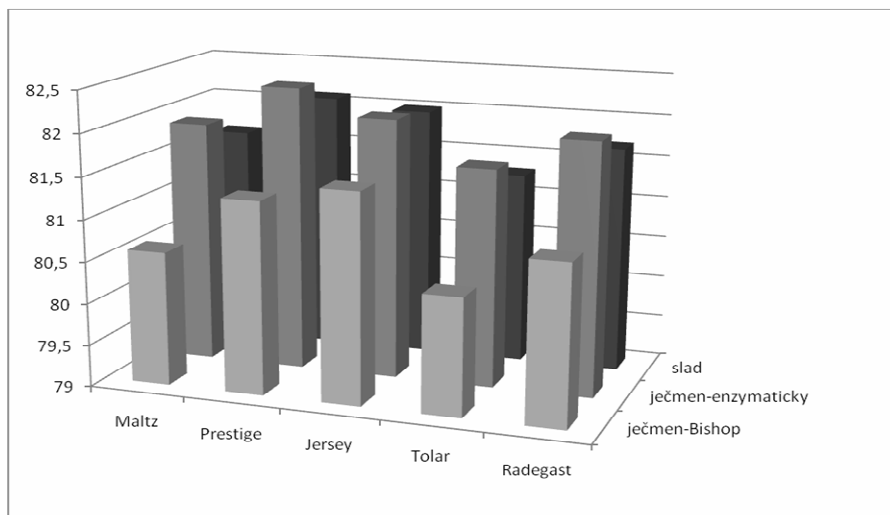
Pomocí uváděné metodiky bylo měřeno pět odrůd ječmene ze sklizně 2008. Byly to odrůdy Maltz, Prestige, Jersey, Tolar a Radegast. U stejných ječmenů bylo provedeno zesladování na Výzkumném ústavu sladu a piva, a byl proměřen extrakt u sladů vyrobených z jednotlivých odrůd. Stanovení u každého vzorku bylo provedeno třikrát. V tabulce 2 jsou výsledky naměřených hodnot.

Tab. 2 Stanovení extraktu v ječmeni pomocí vztahu podle Bishopa, enzymaticky a extrakt ve sladu

odrůda ječmene	ječmen-Bishop	ječmen-enzymaticky	slad
Maltz	80,6	81,9	81,6
Prestige	81,3	82,4	82,1
Jersey	81,5	82,1	82,0
Tolar	80,4	81,6	81,3
Radegast	80,9	82,0	81,7

Extrakt získaný výpočtem podle Bishopa vykazuje ve všech případech nižší hodnoty, než stanovení pomocí enzymatických preparátů, to vykazuje naopak ve všech případech vyšší hodnoty. Hodnoty získané enzymaticky jsou vyšší i ve srovnání s extraktem ve sladu. Ve všech případech je chyba stanovení menší než 1 %. V grafu 2 je obsah extraktu v jednotlivých variantách znázorněn graficky.

Graf 2 Obsah extraktu v ječmeni pomocí vztahu podle Bishopa, enzymaticky a extrakt ve sladu



ZÁVĚR

Stanovení extraktu u ječmene je konvenčně prováděno pouze výpočtem pomocí vztahu podle Bishopa. Zde uváděná práce zavádí stanovení extraktu u ječmene přímou metodou s použitím průmyslových enzymatických preparátů. Získané hodnoty by z hlediska praxe mohly mít vyšší důležitost a přínos, ve srovnání s výpočtem podle Bishopa, jenž je často nutno modifikovat na konkrétní reálné vzorky ječmene. Naopak při stanovení extraktu u sladu, odpadá při použití této metodiky sladování ječmene, lze použít přímo zrna ječmene. V porovnání se stanovením extraktu enzymatickou cestou u ječmene a konvenčním stanovením extraktu u sladu, jsou výsledky rozdílné s chybou do 1 %.

LITERATURA

David Dunovský (2007): Význam škrobu v ječmeni a vztah k extraktivnosti sladu, diplomová práce

Petr Králík (2006): Možnosti využití mikroorganismu *Zymomonas mobilis* při výrobě bioethanolu z obilných zápar, diplomová práce

Hana Kolínková (2008): Možnosti kombinace enzymových preparátů a jejich vliv na výtěžnost bioethanolu z kukuřičných zápar, diplomová práce

Lucie Pavlíková (2008): Vliv použitých enzymů na výtěžnost ethanolu z pšenice, diplomová práce

Genencor, Aplikační listy pro enzymy, Holansko (2007)