

Prinzip

Bei der Einwirkung der Endo- β -Glucanase auf eine β -Glucanlösung nimmt deren Viskosität durch die Spaltung der Substratmoleküle kontinuierlich ab, was mit einem Rotationsviskosimeter verfolgt wird. Die Änderung der reziproken spezifischen Viskosität ist ein Maß für die Aktivität der Endo- β -Glucanase.

Geräte

Vgl. α -Amylase (siehe MEBAK-Methode R-200.24.283 [2016-03]), zusätzlich Blaubandfilter

Reagenzien

β -Glucan aus Gerste

Phosphatpuffer, 0,1 mol/L, pH 5,7 (Herstellung: 0,426 g Na_2HPO_4 und 11,64 g NaH_2PO_4 in 1 L H_2O lösen; pH-Wert ggf. mit 1 mol/L NaOH oder HCl nachjustieren)

Natriumchlorid, 0,5 GV-%

Calciumchlorid, 0,1 mol/L

Ausführung

Enzymauszug

- 20 g Malzfeinschrot in 100 mL 0,1 mol/L Calciumchloridlösung suspendieren und während 1 h bei 20 °C rühren oder industrielles Enzympräparat in 0,5 GV-%iger Natriumchloridlösung suspendieren und während 5 min bei 20 °C rühren
- Suspension durch Blaubandfilter filtrieren
- Lösung evtl. verdünnen, bis Enzymreaktion linear verläuft

Substrat

- 2 g β -Glucan in 100-mL-Becherglas geben und in ca. 40 mL Phosphatpufferlösung suspendieren
- Suspension quantitativ in 100-mL-Messkolben transferieren
- Phosphatpufferlösung zugeben bis zu einem Totalvolumen von ungefähr 90 mL
- Messkolben 20 min im Wasserbad von 98 °C stehen lassen
- Lösung auf 20 °C abkühlen und mit Phosphatpufferlösung bis zur Marke auffüllen

Inkubation und viskosimetrische Messung

- 20 mL Substratlösung auf 50 °C temperieren und in 150-mL-Erlenmeyerkolben pipettieren, 2 mL Enzymlösung bzw. Malzauszug zugeben, gut mischen und sofort in Messzylinder des Rotationsviskosimeters einfüllen
- Viskosität kontinuierlich oder in Abständen von 2 min während 20 min messen (1. Messung frühestens 6 min, besser 10 min nach Zugabe der Enzymlösung ausführen)

Berechnung

$$\eta_s = \frac{\eta_{RL}}{\eta_{LM}} - 1$$

η_s = spezifische Viskosität

η_{RL} = Viskosität der Reaktionslösung

η_{LM} = Viskosität des Lösungsmittels (20 mL 0,1 mol/L Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 5,7 und 2 mL Natriumchloridlösung mit 0,5 GV-%)

$$A = \frac{\Delta 1/\eta_s}{GP} \quad \text{für Enzympräparate}$$

(bezogen auf 1 g Präparat und 1 min)

$$A = \frac{\Delta 1/\eta_s}{GP} \times 1000 \quad \text{für Malz (bezogen auf 1000 g Malz und 1 min)}$$

- A = Aktivität der β -Glucanase in 1 g der Probe
 $\Delta 1/\eta_s$ = Änderung der reziproken spezifischen Viskosität der Reaktionslösung in 1 min
 GP = Gewicht der eingesetzten Probe im Reaktionsansatz in g

Beispiel:

Messwerte [$\text{Dyn} \times \text{cm}^{-2}$] am Rotationsviskosimeter in Abständen von 2 min ablesen oder Messwerte aufzeichnen (vgl. Kurve in Abb. 1)

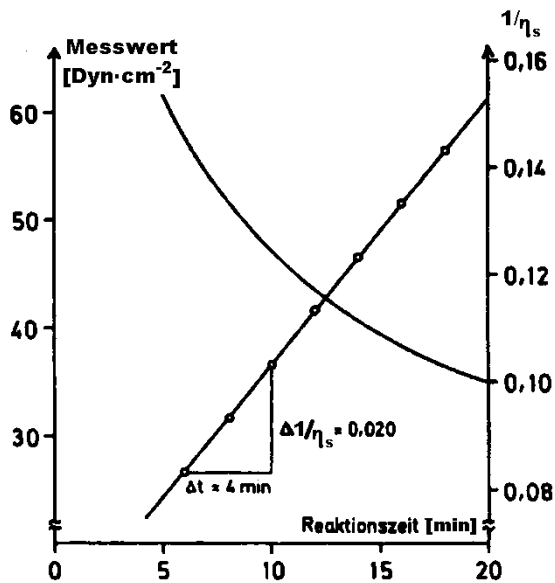
Aus den Messwerten durch Multiplikation mit dem gerätespezifischen und von der eingestellten Geschwindigkeitsstufe abhängigen Faktor die entsprechenden Viskositätswerte η_{RL} berechnen, daraus gemäß $(\eta_{RL}/\eta_{LM}) - 1$ die einzelnen Werte für die spezifische Viskosität η_s berechnen und deren Reziprokwerte gegen die Zeit auftragen (ansteigende Gerade, Abb. 1); die Steigung der Geraden, ermittelt aus $\Delta (1/\eta_s)/\Delta t$ entspricht der Endo- β -Glucanaseaktivität, in diesem Beispiel mit Malzfeinschrot

$$\frac{0,020 \times 1000}{4 \times 0,5} = 10$$

(0,5 g Feinschrot im Reaktionsansatz)

Abbildung 1 – R-200.25.283 [2016-03]:

Messwerte und Reziprokwerte der spezifischen Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit



Angabe der Ergebnisse

Bei Zerealien: in Einheiten [$1/\eta_s \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$] mit einer Dezimale

Bei Enzympräparaten: in Einheiten [$1/\eta_s \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$] mit einer Dezimale

Genauigkeit

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| Enzympräparate | $V_{kr} = \pm 2,5 \%$ |
| Malz | $V_{kr} = \pm 2,9 \%$ |
| Nachweisgrenze für Malz: | 0,15 Einheiten |

Normwerte

Helles Malz 6–14 Einheiten

Bemerkungen

Aufbewahren von Enzymlösungen:

Malzauszug maximal 6–8 h,

Lösungen mikrobieller Enzyme maximal 2 h.

Die Substratlösung sollte täglich frisch bereitet werden. Die Enzymkonzentration ist so zu wählen, dass die Änderung der reziproken spezifischen Viskosität während 20 min linear verläuft.

Literatur

1. P. Anderegg, F. Schur, H. Pfenninger, SchwBR 89, 37, 1978