

Použitie kvasinkovej glukoamylázy Glm v pekárskej technológii

VIERA HORVÁTHOVÁ - KATARÍNA VALACHOVÁ

SÚHRN. Glukoamyláza Glm produkovaná *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 je ako jediná kvasinková glukoamyláza schopná katalyzovať štiepenie natívneho škrobu. V predloženej práci sa na dvoch druhoch múk (pšeničnej a ražnej) skúmalo pôsobenie glukoamylázy v podmienkach simulácie fázy miesenia a zrenia cesta. Jej účinok sa porovnával s účinkom komerčného glukoamylázového prípravku. Pôsobenie obidvoch glukoamyláz sa analyzovalo stanovením obsahu vznikajúcich skvasiteľných sacharidov (glukózy a maltózy). Zistilo sa, že za zvolených podmienok hydrolýzy a koncentrácie testovaných enzýmov dochádza pôsobením obidvoch prípravkov k zvýšeniu množstva skvasiteľných sacharidov. Najvyšší obsah skvasiteľných sacharidov (7,3 %) sa zaznamenal pri použití glukoamylázy Glm počas hydrolýzy ražnej múky v podmienkach simulácie fázy miesenia a zrenia cesta (28 °C, 55 min).

KLÚČOVÉ SLOVÁ: múka; skvasiteľné sacharidy; kvasinková glukoamyláza

Obilniny predstavujú kľúčovú skupinu plodín rastlinnej výroby, ich postavenie je na celom svete dominantné. Tvoria jednu z hlavných energetických zložiek ľudskej výživy. U nás sa pre ľudskú výživu pestuje hlavne pšenica a raž. Sú to chlebové obilniny a pokrývajú asi 40 % energetickej a proteínovej potreby výživy obyvateľstva [1].

Pre pekársku technológiu majú veľký význam enzýmy. Vzhľadom na to, že existuje veľa nekontrolovateľných okolností (počasie, lokalizácia a vlastnosti poľa) ovplyvňujúcich množstvo a aktivitu enzýmov v zrne, je potrebné pri spracovávaní surovín na cesto používať zlepšujúce prípravky. Je to skupina aditívnych látok (viazacie látky, povrchovo aktívne látky, oxidačno-redukčné látky, enzýmové prípravky), ktoré prispievajú k racionalizácii výrobného procesu pri súčasnom zabezpečení požadovanej kvality výrobkov.

Ing. Viera HORVÁTHOVÁ, Mgr. Katarína VALACHOVÁ, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 1, 917 00 Trnava.
Korešpondujúci autor: Ing. Viera HORVÁTHOVÁ, e-mail: viera.horvathova@ucm.sk

Enzymové prípravky (amylázy, hemicelulázy a xylanázy, proteázy a lipázy) umožňujú kompenzáciu meniacej sa kvality vstupných surovín (najmä múky), zefektívňujú technológiu a niektoré z nich prispievajú k predĺženiu trvanlivosti výrobkov [2–4]. Sú účinné v malých množstvách, čo je aj z ekonomického hľadiska v mnohých prípadoch veľmi výhodné.

Amylázy sa v pekárstve používajú jednak na zvýšenie obsahu kvasiteľných sacharidov, ktoré sú potrebné pre kvasinky vo fáze zrenia cesta a jednak sa ich účinok využíva aj v procese pečenia, kedy prítomné α -amylázy štiepia škrob na dextríny. Vznikajúce dextríny prispievajú k sfarbeniu kôrky výrobku a k udržaniu jeho dlhšej čerstvosti. Ovpływujú aj textúru a chuť výrobkov, avšak ich nadbytočný obsah spôsobuje lepivosť a gumovitost' striedky. Amylázová aktivita počas pečenia závisí od druhu prítomných amyláz a ich inaktivačných teplôt. Preferujú sa fungálne amylázy, ale používajú sa aj amylázy bakteriálne [5]. Účinkom fungálnej a cereálnej amylázy majú vznikajúce dextríny v procese pečenia stupeň polymerácie (DP) okolo 10, účinkom bakteriálnych amyláz dochádza k tvorbe dextrínov s DP 25–35. V priebehu skladovania hotového výrobku môže ďalej dochádzať k štiepeniu týchto dextrínov, pretože niektoré amylázy (najmä bakteriálneho pôvodu) sa pečením celkom neinaktivujú [6]. Aplikácia enzýmov však nikdy nebude zdrojom ekonomických úspor v pekárskom priemysle, ale len jedným z kľúčov štandardizácie výroby vhodnou úpravou pekárskych surovín, prostriedkom inovácie výrobkov a optimalizácie technologických postupov [7, 8].

Zvýšiť obsah kvasiteľných sacharidov pri príprave cesta možno aj prídavkom glukoamyláz [9].

Glukoamylázy (1,4- α -D-glukán glukanohydrolázy, E.C.3.2.1.3) sú exohydrolázy, ktoré hydrolyzujú α -1,4 a α -1,6 glukozidové väzby amylózy a amylopektínu a reťazcov iných oligo- a polysacharidov za vzniku β -D-glukózy [10]. Konečnými produktami pôsobenia glukoamyláz je glukóza, maltóza a limitné dextríny. Glukoamylázy sa môžu získať zo živočíšnych alebo mikrobiálnych zdrojov. Hlavným zdrojom mikrobiálnych glukoamyláz sú vláknité huby rodu *Aspergillus* (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*), ďalšími mikroorganizmami sú napr. *Bacillus lentis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Fusidium* sp., *Lactobacillus brevis*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium italicum* [11, 12]. Glukoamyláza nerozkladá škrob na glukózu úplne. V praxi je jej účinnosť limitovaná z hľadiska nedostatočného rozkladu α -1,6-glukozidických väzieb a pri koncentráciách glukózy nad 90 % glukoamyláza vykazuje reverznú reakčnú aktivitu [13].

Rozklad natívneho škrobu je medzi kvasinkovými amylázami zriedkavý, a je viazaný na prítomnosť domén viažucich škrob (SBD - Starch Binding Domain) v štruktúre enzýmu. Sú to polypeptidové reťazce (peptidové

sekvencie), ktoré majú afinitu k škrobu [11]. Ich základnou funkciou je viazanie a spracovanie natívneho škrobu [14, 15]. U niektorých α -amyláz výrazne ovplyvňujú termostabilitu [16], ale u glukoamyláz nemajú s termostabilitou nič spoločné [17]. Môžu deštruktívne pôsobiť na povrch škrobu, čo má za následok zvýšenie rýchlosti amylolytickej reakcie [18, 19]. Doména viažuca škrob si zachováva svoju nezávislú funkciu (nezavislá od katalytickej domény α -amyláz, β -amyláz a glukoamyláz) [20] i v prípade, ak je zlúčená s iným proteínom ako amylázou [21].

Glukoamyláza Glm zo *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 je doposiaľ jediná popísaná glukoamyláza kvasinkového pôvodu schopná štiepiť aj natívny nezmazovateľný škrob [22, 23] a zároveň je to prvý amylolytický enzým, u ktorého sa zistilo, že namiesto externej škrob viažucej domény má miesto viažuce škrob integrované priamo do katalytickej domény. Glukoamyláza Glm po zahriati nad 70 °C ireverzibilne stráca schopnosť renaturovať, v dôsledku čoho sa zatiaľ nepodarilo pripraviť kryštály vhodné pre RTG-štruktúrnu analýzu. Avšak vďaka vysokej homológii s glukoamylázou Glu (producent *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212) bolo možné vypočítať pravdepodobný model jej 3D štruktúry [22, 24].

Amylázy produkované *S. fibuligera* majú vlastnosti, pre ktoré sú potenciálne využiteľné v priemysle, avšak nemôžu sa porovnávať s amylázami produkovanými baktériami a vláknitými hubami [22].

V tab. 1 [22] sa porovnávajú niektoré vlastnosti glukoamyláz zo *Saccharomycopsis fibuligera* KZ a *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111. Na rozdiel od *S. fibuligera* IFO 0111, ktorý produkuje len glukoamylázu (Glm), *S. fibuligera* KZ predstavuje kmeň, ktorý syntetizuje amylolytický komplex zložený z α -amylázy, glukoamylázy (Gla) a α -glukozidázy. Glukoamyláza

TAB. 1. Enzymové vlastnosti glukoamyláz
Saccharomycopsis fibuligera KZ a *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 [22].

TAB. 1. Enzymatic properties of glucoamylases from strains
Saccharomycopsis fibuligera KZ and *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 [22].

Enzým ¹	Molekulová hmotnosť ² [kDa]	Optimálne pH ³	Optimálna teplota ⁴ [°C]	Zvyšková aktivita ⁵ [%]	Degradácia natívneho škrobu ⁶
Glukoamyláza ⁷ KZ	62	5–6	40–50	55	–
Glukoamyláza IFO 0111	55	5,5	40	0	+

1 - enzyme, 7 - glucoamylase KZ, 8 - glucoamylase IFO 0111, 2 - molecular weight, 3 - pH optimum, 4 - temperature optimum, 5 - residual activity, 6 - raw starch digestion.

Gla, ktorá v porovnaní s glukoamylázou Glm nemá schopnosť štiepiť natívny škrob, si však aj po 10 minútovom vare zachová časť svojej enzýmovej aktivity (konkrétne 55 %).

Cieľom predkladanej práce bolo skúmať glukoamylázu Glm počas hydrolyzy dvoch múk (pšeničnej a ražnej) v podmienkach simulujúcich pekársku technológiu vo fáze miesenia a zrenia cesta a porovnať jej účinok s komerčným prípravkom.

Materiál a metódy

Substráty a enzýmy

- Pšeničná múka hladká T650 (Adivit, Nitra, Slovensko).
- Ražná múka chlebová (Adivit, Nitra, Slovensko).
- Glukoamyláza Glm zo *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 (Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava, Slovensko). Supernatant po oddelení biomasy sa ultrafiltráciou skoncentroval cez membránu Amicon PM-30 (Millipore, Midland, Kanada) a koncentrát sa prečistil kvapalinovou chromatografiou na molekulovom site Superose 12 P (US Pharmacia, Rockville, USA) v hydrouhličitanom amónnom. Získaný koncentrát sa lyofilizoval, špecifická aktivita lyofilizátu bola 70 U.mg⁻¹ proteínu.
- Komerčný kvapalný glukoamylázový prípravok (Novozymes, Bagsvaerd, Dánsko) [25].

Príprava vzoriek múk bez prídavku enzýmov

Navážilo sa 10 g múky, ktorá sa nasypala do odmernej banky a vytemperovala na teplotu 28 °C. Pridalo sa 100 ml vody zohriatej na 28 °C. Banka sa uzavrela a substrát s vodou sa rozmiešal na suspenziu bez zhlukov. Banka sa prikryla a nechala temperovať v termostate 15 min pri 28 °C (fáza miesenia cesta) resp. 55 min pri 28 °C (fáza miesenia a zrenia cesta). Po uplynutí inkubačného času sa činnosť enzýmov zastavila pridaním 8 kvapiek koncentrovanej H₂SO₄. Roztok sa vyčíril 10 ml Carrezovho roztoku I a po ďalšom premiešaní 10 ml Carrezovho roztoku II. Obsah sa premiešal, pridalo sa 100 ml vody a 8 kvapiek koncentrovanej H₂SO₄. Po opätovnom premiešaní sa obsah ochladil na 20 °C, prefiltroval do suchej banky (prvý podiel sa vylial) a filtrát sa použil na analytické stanovenie glukózy a maltózy.

Príprava vzoriek múk s prídavkom enzýmov

Navážilo sa 10 g múky, ktorá sa nasypala do odmernej banky a vytemperovala na teplotu 28 °C. Do banky sa k múke pridala glukoamyláza Glm

(75 U.g⁻¹ škrobu), resp. komerčná glukoamyláza (30 g/100 kg múky). Potom sa banka doplnila vodou rovnakej teploty do 100 ml. Banka sa uzavrela a substrát s vodou sa rozmiešal na suspenziu bez zhlukov. Banka sa prikryla a nechala temperovať v termostate 15 min pri 28 °C (fáza miesenia cesta), resp. 55 min pri 28 °C (fáza miesenia a zrenia cesta). Po uplynutí inkubačného času sa činnosť enzýmov zastavila pridaním 8 kvapiek koncentrovanej H₂SO₄. Roztok sa vyčíril 10 ml Carrezovho roztoku I a po ďalšom premiešaní 10 ml Carrezovho roztoku II. Obsah sa premiešal, pridalo sa 100 ml vody a 8 kvapiek koncentrovanej H₂SO₄. Po opätovnom premiešaní sa obsah ochladil na 20 °C, prefiltroval do suchej banky (prvý podiel sa vylial) a filtrát sa použil na analytické stanovenie glukózy a maltózy.

Analytické metódy

Glukoamylázová aktivita sa stanovila modifikovanou mikrometódou podľa Somogyi-Nelsona [26]. Jednotka enzýmovej aktivity je také množstvo enzýmu, ktoré za predpísaných experimentálnych podmienok uvoľní zo škrobu 1 μmol glukózy za minútu.

Na stanovenie obsahu škrobu v múkach sa použila metóda podľa Ewersa [27]. Obsah glukózy sa stanovil komerčnou súpravou Glukosa GOD 1500 (Lachema, Brno, Česká republika) a obsah maltózy Schoorlovou metódou [28].

Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo skúmanie účinnosti glukoamylázy Glm v hydrolyzátach pšeničnej a ražnej múky v podmienkach simulujúcich fázu miesenia a zrenia cesta. Glukoamyláza Glm zo *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 je schopná degradovať aj natívny škrob. Táto schopnosť je u kvasinkovitých glukoamyláz zriedkavosťou. Glm je štrukturálne novým typom glukoamylázy, pretože nemá osobitnú doménu viažucu škrob porovnateľnú s doménami nájdenými u iných glukoamyláz, resp. u iných amylolytických enzýmov. Predpokladá sa však, že aminokyselinové zvyšky tejto glukoamylázy (Glm), umiestnené na jej povrchu môžu zohrať úlohu afinitného miesta pre natívny škrob kooperujúceho s katalytickým miestom.

Účinok testovanej glukoamylázy sa sledoval stanovením skvasiteľných sacharidov (glukózy a maltózy) po 15 min (fáza miesenia cesta) resp. po 55 min hydrolyzy (fáza miesenia a zrenia cesta), ktorá prebiehala pri teplote 28 °C za občasného premiešania múčnej suspenzie. Koncentrácia testo-

vanej glukoamylázy bola 75 U.g^{-1} škrobu, čo po stanovení glukoamylázovej aktivity predstavuje koncentráciu lyofilizovaného prípravku $1,07 \text{ mg}$ na 1 g škrobu. Táto koncentrácia sa zvolila na základe experimentov uskutočnených v minulosti [23]. Účinok testovanej glukoamylázy sa porovnával s účinkom komerčného glukoamylázového prípravku od firmy Novozymes, ktorý sa používa ako aditívny enzýmový prípravok v pekárskej technológii na zvýšenie skvasiteľných sacharidov v ceste. Tento prípravok sa použil v koncentrácii odporúčanej výrobcom, čo predstavovalo $30 \text{ g}/100\text{kg}$ múky a čo pri obsahu škrobu v múkach 65% a po stanovení aktivity predstavuje $7,2 \text{ U.g}^{-1}$ škrobu, resp. $0,46 \text{ mg}$ prípravku na 1 g škrobu. Pre dôkladnejšie stanovenie účinnosti testovanej glukoamylázy sa uskutočnili všetky hydrolýzy aj bez prídavku enzýmov.

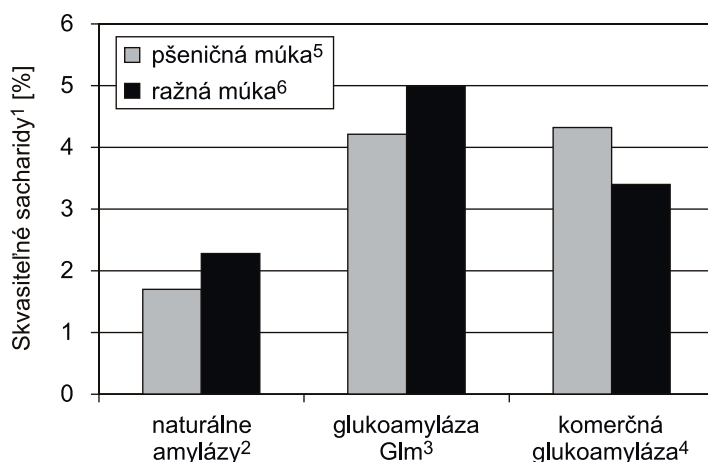
Z výsledkov prezentovaných v tab. 2 vyplýva, že skúmané múky patria k štandardným, vzhľadom na obsah skvasiteľných sacharidov pôvodne v múkach obsiahnutých. Aplikáciou obidvoch enzýmových prípravkov sa v pokusných podmienkach dosiahlo zvýšenie skvasiteľných sacharidov. Ak obsah skvasiteľných sacharidov zistený bez aplikácie enzýmov predstavuje 100% , potom u pšeničnej múky došlo 15-minútovým pôsobením aplikovaných enzýmov k ich nárastu o cca 150% (konkrétne s Glm o $147,64 \%$ a s komerčnou glukoamylázou o $154,12 \%$). Po 55-minútovom pôsobení

TAB. 2. Tvorba skvasiteľných sacharidov v pšeničnej a ražnej múke v podmienkach simulácie miesenia a zrenia cesta.

TAB. 2. Creation of fermentable saccharides in wheat flour and rye flour in simulation conditions of dough kneading and ripening.

Enzým ¹	Podmienky hydrolýzy ²		Pšeničná múka ⁵		Ražná múka ⁸	
	čas ³ [min]	teplota ⁴ [°C]	glukóza ⁶ [%]	maltóza ⁷ [%]	glukóza [%]	maltóza [%]
Bez enzýmu ⁹	0	28	0,07	1,25	0,01	1,94
	15	28	0,10	1,60	0,13	2,15
	55	28	0,50	2,86	0,16	2,64
Glukoamyláza Glm ¹⁰	15	28	1,21	3,00	0,59	4,40
	55	28	2,41	7,20	0,67	9,44
Komerčná glukoamyláza ¹¹	15	28	0,51	3,81	0,30	3,10
	55	28	0,69	4,98	0,81	6,60

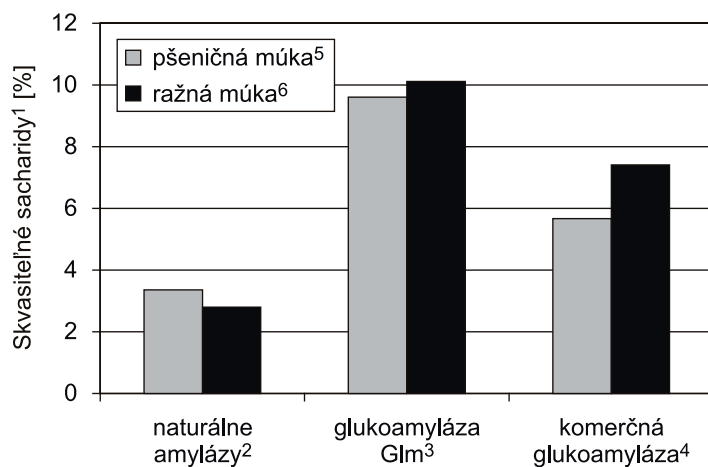
1 - enzyme, 2 - conditions of hydrolysis, 3 - time, 4 - temperature, 5 - wheat flour, 6 - glucose, 7 - maltose, 8 - rye flour, 9 - without enzyme, 10 - glucoamylase Glm, 11 - commercial glucoamylase.



OBR. 1. Obsah skvasiteľných sacharidov po 15 minútach hydrolyzy múčnych suspenzií pri teplote 28 °C.

FIG. 1. Contents of fermentable saccharides after a 15 minutes hydrolysis of flour suspensions at a temperature of 28 °C.

1 - fermentable saccharides, 2 - natural amylases, 3 - glucoamylase Glm, 4 - commercial glucoamylase, 5 - wheat flour, 6 - rye flour.



OBR. 2. Obsah skvasiteľných sacharidov po 55 minútach hydrolyzy múčnych suspenzií pri teplote 28 °C.

FIG. 2. Contents of fermentable saccharides after a 55 minutes hydrolysis of flour suspensions at a temperature of 28 °C.

1 - fermentable saccharides, 2 - natural amylases, 3 - glucoamylase Glm, 4 - commercial glucoamylase, 5 - wheat flour, 6 - rye flour.

aditívnych enzýmov sa zaznamenal rozdielny nárast v obsahu skvasiteľných sacharidov. Účinkom Glm tento nárast predstavoval 186 %, pôsobením komerčného prípravku to bolo 69 %. U ražnej múky bola situácia podobná, pri obidvoch prípravkoch sa zaznamenalo zvýšenie obsahu skvasiteľných sacharidov. Po 15-minútovej hydrolýze predstavoval prírastok skvasiteľných sacharidov pôsobením Glm 182 %, účinkom komerčného prípravku 49,12 %. Po 55-minútovom pôsobení obidvoch prípravkov došlo k nárastu skvasiteľných sacharidov priemerne o 260 %. V súvislosti s dosiahnutými výsledkami je možné konštatovať, že prírastok skvasiteľných sacharidov účinkom glukoamylázy Glm v porovnaní s účinkom komerčného prípravku (dávkovaným v koncentrácii odporúčanej výrobcom) bol podobný alebo vyšší. Ak dávkovanie komerčného prípravku odporúčané výrobcom považujeme za optimálne, potom koncentrácia glukoamylázy Glm, ktorá sa použila v experimentoch, je pre tieto potreby postačujúca, resp. je možné ju aj znížiť. Pre lepšiu prehľadnosť sa na obr. 1 a 2 uvádza obsah skvasiteľných sacharidov dosiahnutý po 15 minútach, resp. po 55 minútach hydrolýzy suspenzií pšeničnej, resp. ražnej múky aplikovaním obidvoch skúmaných aditívnych glukoamyláz, resp. bez ich.

Záver

Múka je základná pekárska surovina. Aby ju bolo možné spracovať na pekársky výrobok, musí mať požadované fyzikálno-chemické vlastnosti. Existuje niekoľko nepredvídateľných faktorov (klimatické, pestovateľské), ktoré významnou mierou ovplyvňujú kvalitu múky. Preto moderná technológia využíva zlepšujúce prípravky, ktoré do určitej miery zabezpečia jej štandardnú kvalitu. Súčasťou zlepšujúcich prípravkov sú tiež enzýmové preparáty. V pekárstve sa najviac používajú amylázy vzhľadom na dominantné postavenie škrobu v daných výrobkoch. V práci sa skúmal účinok dvoch amylázových prípravkov (glukoamylázy Glm zo *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 a komerčnej glukoamylázy ako referenčného prípravku) na suspenziu pšeničnej a ražnej múky za podmienok, ktoré simulovali fázu miesenia a zrenia cesta. Zistilo sa, že pôsobením obidvoch skúmaných enzýmov po 15 minútach (fáza miesenia) aj po 55 minútach (fáza miesenia a zrenia cesta) hydrolýzy pri teplote 28 °C sa zvýšil obsah skvasiteľných sacharidov. Po porovnaní účinnosti obidvoch prípravkov je možné konštatovať, že pôsobením glukoamylázy Glm (v koncentrácii 75 U.g⁻¹ škrobu) sa dosiahol prírastok skvasiteľných sacharidov buď podobný ako pôsobením komerčného prípravku (dávkovaným v koncentrácii odporúčanej výrobcom) alebo vyšší.

Aplikáciou glukoamylázy Glm (v zvolených experimentálnych podmienkach) sa dosiahli prakticky vo všetkých uskutočnených experimentoch prírastky skvasiteľných sacharidov vyššie takmer o 50 % (v porovnaní s komerčnou glukoamylázou). Laboratórne výsledky prezentované v tejto práci by však bolo vhodné doplniť pekárskymi pokusmi, pretože poskytujú podklady pre ich komplexnejšie posúdenie.

Podakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore vedeckej grantovej agentúry VEGA, číslo projektu 1/0101/03.

Literatúra

1. MUCHOVÁ, Z. - FRANČÁKOVÁ, H. - BOJŇANSKÁ, T.: Technológie spracovania cereálií. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1996. 131 s.
2. DODOK, L.: Chémia a technológia trvanlivého pečiva. Bratislava : ALFA, 1988. 300 s.
3. POLDERMANS, B. - SCHOPPINH, P.: Controlling the baking process and product quality with enzymes. *Bakery Ingredients*, 4, 1999, s. 132-135.
4. ROSELL, C. M.: Experimental approach to optimize the use of α -amylases in breadmaking. *Food Chemistry*, 78, 2001, s. 619-624.
5. MATHEWSON, P. R.: Enzymes. Practical guides for the food industry. St. Paul : American Association of Cereal Chemists, 1998. 109 s.
6. TENKANEN, M. - SALMENKALLIO MARTILLA, M. - POUTANEN, K.: Baking with enzymes. *The World of Food Ingredients*, 2000, April/May, s. 41-46.
7. PRÍHODA, J. - NOVOTNÁ, D.: Zlepšovacie prostriedky v pekárskych a cukrářských technológiách. Ročenka pekaře a cukráře, 1996, s. 29-38.
8. SZEMES, V. - MAINITZ, R.: Technológia pekárskej výroby. Bratislava : Cech pekárov a cukrářov regiónu západného Slovenska, 1999. 147 s.
9. BARTOVÁ, D.: Amyloglukosidáza a amylolytické enzýmy dosud používané v pekárskom priemysle. *Mlýnsko-pekársky priemysl*, 22, 1976, s. 144-146.
10. CORNETT, C. A. G. - FANG, T. Y. - REILLY, P. J. - FORD, C.: Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Protein Engineering*, 16, 2003, s. 521-529.
11. COUTINHO, P. M. - REILLY, P.: Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 29, 1997, s. 334-347.
12. PANDEY, A. - NIGAM, P. - SOCCOL, C. R. - SOCCOL, V. T. - SINGH, D. - MOHAN, R.: Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 2000, s. 135-152.
13. ALLEN, M. J. - FANG, T. Y. A. - LI, Y. - LIU, H. L. - CHEN, H. M. - COUTINHO, P. - HONZATKO, R.: Protein engineering of glucoamylase to increase pH optimum, substrate specificity and thermostability. US Patent 6537792, 2003.
14. SVENSSON, B. - PEDERSEN, T. G. - SVENDSEN, I. B. - SAKAI, T. - OTTESEN, M.: Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communications*, 47, 1982, s. 55-69.
15. PENNINGA, D. - VAN DER VEEN, B. A. - KNEGTTEL, R. M. - VAN HIJUM, S. A. - ROZEBOOM, H. J. - KALK, K. H. - DIJKSTRA, B. W. - DIJKHUIZEN, L. J.: The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1996, s. 32777-32784.

16. IEFUJI, H. - CHINO, M. - KATO, M. - IIMURA, Y.: Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochemical Journal*, 318, 1996, s. 989-996.
17. CHEN, L. - COUTINHO, P. M. - NIKOLOV, Z. - FORD, C.: Deletion analysis of the starch-binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein Engineering*, 8, 1995, s. 1049-1055.
18. SOUTHALL, S. M. - SIMPSON, P. J. - GILBERT, H. J. - WILLIAMSON, G. - WILLIAMSON, M. P.: The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Letters*, 447, 1999, s. 58-60.
19. JUGE, N. - LE GAL-COÉFFET, M. F. - FURNIS, C. S. M. - GUNNING, A. P. - KRAMHØFT, B. - MORRIS, V. J. - WILLIAMSON, G. - SVENSSON, B.: The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its structure, function, and role in raw- starch hydrolysis. *Biologia (Bratislava)*, 57, 2002, supp. 11, s. 239-245.
20. JANEČEK, Š. - ŠEVČÍK, J.: The evolution of starch-binding domain. *FEBS Letters*, 456, 1999, s. 119-125.
21. DALMIA, B. K. - SCHÜTTE, K. - NIKOLOV, Z. L.: Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: An independent starch-binding domain. *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 1995, s. 575-584.
22. HOSTINOVÁ, E.: Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia (Bratislava)*, 57, 2002, supp. 11, s. 247-251.
23. HORVÁTHOVÁ, V. - ŠLAJSOVÁ, K. - ŠTURDÍK, E.: Evaluation of the glucoamylase Gln from *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 in hydrolysing the corn starch. *Biologia (Bratislava)*, 59, 2004, s. 361-365.
24. GAŠPERÍK, J. - HOSTINOVÁ, E.: Structure-function characterization of chimerical glucoamylases from yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. In: *CHEMICA 43S*, Zborník z 19. Biochemického zjazdu v Olomouci. Olomouc : Univerzita Palackého, 2004, s. 60-61.
25. AMG®300L. Bagsvaerd, Dánsko : Novozymes, 2005. 2 s.
26. SOMOGYI, M.: Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195, 1952, s. 19-22.
27. ISI 07-2e Determination of starch in pulp by Ewers. In: *Laboratory Methods* [online]. Science Park Aarhus, Dánsko : International Starch Institute. Publikované 11. 12. 1997 [citované 25. 4. 2005]. <<http://www.starch.dk/isi/methods/07st.htm>>
28. SMELÍK, A. - DANDÁR, A. - MÓROVÁ, E. - DODOK, L. - ZAJAC, P. - HALÁSOVÁ, G.: *Laboratórium odboru - Chémia a technológia sacharidov*. Bratislava : Edičné stredisko SVŠT, 1987. 334 s.

Do redakcie došlo 29. 4. 2005.

Applications of the yeast glucoamylase Gln in the bakery technology

HORVÁTHOVÁ, V. - VALACHOVÁ, K.: Bull. potrav. Výsk., 44, 2005, p. 261-271.

SUMMARY. Glucoamylase Gln produced by *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111) is, as the only yeast glucoamylase, is able to cleave the native starch. In the presented study, activity of the glucoamylase was studied using two types of flour (wheat flour and rye flour) under the conditions of the simulation of dough kneading and ripening. Its effectiveness was compared to the effectiveness of a commercial glucoamylase preparation. The activity of the glucoamylases was analysed on the basis of the determination of the contents of the produced fermentable saccharides (glucose and maltose). An increase in the amount of fermentable saccharides was determined as a result of the activity of both preparations under the defined conditions of hydrolysis and concentrations of the tested enzymes. The highest concentration of fermentable saccharides (7.3 %) was recorded at the hydrolysis of the rye flour using Gln glucoamylase at conditions of the simulation of dough kneading and ripening phases (28 °C, 55 min).

KEYWORDS: flour; fermentable saccharides; yeast glucoamylase