

# Stanovení aktivity $\alpha$ -amylasy a $\beta$ -amylasy ve sladu

577.154.31  
683.439.1

Ing. IVAN HLAVÁČEK, Západočeské pivovary, n. p., Plzeň, Ing. BLANKA KRÁLOVÁ, CSc., Prof. Ing. JOSEF MOŠTEK, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

## 1. ÚVOD

Základem výroby piva je velký počet biochemických reakcí, které jsou umožněny enzymovou činností. Ve většině úseků výroby jde o reakce, které jsou spojeny se štěpením vysokomolekulárních látek sladu a ostatních pivovarských surovin. Největší počet těchto štěpných procesů probíhá ve varně, kde jsou umožňovány

jednak aktivitou sladových enzymů a jednak přidáváním vhodných enzymových preparátů.

Hlavními enzymy, které se vyskytují ve sladu, jsou enzymy štěpící škrob, zv. amylolytické enzymy, *amylasy*. Jde většinou o enzymy, které štěpí  $\alpha$ -1,4-glykosidické vazby v polysacharidech a jejich degradačních produktech (hlavně ve škrobu a dextrinech). Podle způsobu

štěpení substrátu je lze rozdělit do tří základních skupin:

$\alpha$ -amylasa ( $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanohydrolasa 3.2.1.1), která štěpí glykosidické vazby uvnitř molekuly (endo-amylasa) a produkty vzniklé štěpením mají  $\alpha$ -anomerní konfiguraci [1, 2, 3].

$\beta$ -amylasa ( $\alpha$ -1,4-glukan maltohydrolasa 3.2.1.2), která uvolňuje maltosu z neredukujícího konce polysacharidového řetězce [4, 5].

Q-enzym ( $\alpha$ -1,4-glukohydrolasa 3.2.1.3), nazývaná též glukamylasa nebo amyloglukosidasa, která odštěpuje glukosové jednotky z neredukujícího konce molekuly substrátu [6, 7]. Glukoamylasa není přísně specifická, neboť je schopna štěpit vazby  $\alpha$ -1,3 a  $\alpha$ -1,6 stejně jako  $\alpha$ -1,4 [8].

Amylasy (dříve označovány sumárně též diastasy) obsažené ve sladtech běžných typů a ve speciálním diastatickém sladu je přirozenou směsí  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy. Oba tyto enzymy mají v pivovarství základní technologický význam zejména ve rmutovacím procesu, kde se podílejí na tvorbě zkvasitelných cukrů v extraktu získané mladiny.

Zcučující  $\beta$ -amylasa je aktivní již v nenaklíčeném ječmeni. Její obsah při sladování stoupá. Ve sladu kvantitativně převládá nad dextrinující  $\alpha$ -amylasou, jejíž celý podíl se aktivuje, respektive tvoří, teprve při klíčení ječmene [9]. Při současném působení obou amylas je hydrolyza škrobu mnohem hlubší než při samotném působení jednoho z obou enzymů.

Amylasy, které štěpí škrob, se v současné době stále více dostávají do popředí zájmu v pivovarské technologii. Z toho vyplývá i snaha vypracovat jednoduchou metodu na stanovení enzymů s  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasovou aktivitou, která by rozlišila tyto dva příbuzné enzymy vedle sebe bez předchozí separace a již by bylo možno použít i v provozní laboratoři.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Materiály

Rozpustný škrob podle Zulkowskyho, p. a. výrobce fy Merck; amylasový preparát Brew-N-Zyme, výrobce Nardén; amylasový preparát Bacterial Amylase, výrobek fy Novo; slad zelený a hvozďený; ostatní použité chemikálie n. p. Lachema.

### 2.2 Přístroje

Spektrální fotometr VSU 2, Carl Zeiss, Jena.

Magnetická míchačka MMI, Laboratorní přístroje, Praha.

Odstředivka (3000 ot/min), Chirota, n. p., Chirana.

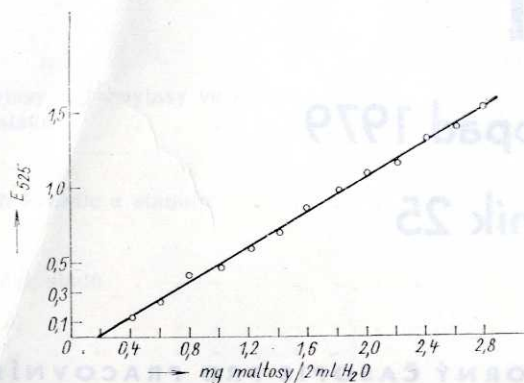
### 2.3 Metody

Stanovení aktivity amylasy podle Sumnera [10].

Tato metoda je založena na zvýšení redukční mohutnosti rozpustného škrobu vzniklé při enzymovém štěpení. Množství redukujících látek se stanovuje reakcí s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou a proměřením vzniklého žlutohnědého zbarvení fotometricky při vlnové délce 525 nm. Jako srovnávací roztok použijeme slepý pokus, v němž místo enzymu je přidán stejný objem fosfátového pufru.

Kalibrační křivka (obr. 1) se připraví tak, že 2 ml roztoku kyseliny 3,4-dinitrosalicylové reagují se 2 ml roztoku maltosy (v rozsahu koncentrací maltosy 0,01 g/100 ml — 0,14 g/100 ml) za stejných podmínek jako při vlastním měření aktivity. Hodnoty absorbance fotometrického proměření jednotlivých standardů se pak vynesou do grafu proti hodnotám koncentrace maltosy.

Aktivita amylasy je určena množstvím maltosy, které se uvolní ze škrobu při 20 °C za 3 min.



Obr. 1. Kalibrační křivka pro Sumnerovu metodu

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Příprava sladového extraktu

Předsušený slad byl namlet mlýnkem Retsch (2000 ot/min). 3 g mletého sladu extrahujeme 15 ml 20% etanolu, mícháme 15 min na magnetické míchačce (3000 ot/min) ve 150 ml kádince. Suspenzi poté odstředíme na odstředivce (3000 ot/min). Doba odstředění je 5 minut. Amylasy ze sladu je obsažena v čirém supernatantu. Abychom zjistili reprodukovatelnost této metody, připravili jsme z jednoho vzorku sladu 5 různých extraktů a porovnali jejich amylasovou aktivitu. Aktivita byla měřena metodou „Amylochrome Roche“ [11] a výsledky shrnuje tabulka 1.

Z výsledků, uvedených v tab. 1 je patrné, že hodnoty amylasové aktivity u jednotlivých extraktů kolísají

Tab. 1. Porovnání amylasové aktivity různých extraktů téhož vzorku sladu. Extrakce byla prováděna 20% etanolem

Č. vzorku	Aktivita (U/l)	Odhylka od $\bar{x}$ (U/l)	Střed. odchylka (%)
1	1 208	+136	±7,1
2	1 022	— 50	
3	1 100	+ 28	
4	989	— 83	
5	1 041	— 41	
$\bar{x}$	1 072	± 76,9 směrodatná odchylka	

Tab. 2. Podíl preexistujících redukcí látek na celkovém obsahu redukujících látek po hydrolyze škrobu amylasami

Aktivita amylasy měřena Sumnerovou metodou.

Vzorek 1 — amylasový extrakt 20krát zředěný

Vzorek 2 — amylasový extrakt 50krát zředěný

Vzorek 3 — amylasový extrakt 100krát zředěný

Hodnoty aktivity A byly odečteny z kalibrační křivky (obr. 1).

E<sub>525</sub> — extinkce při 525 nm.

Vzorek č.	Preexistující redukující látky—P		Celkové redukující látky—C		P—C
	E <sub>525</sub>	A	E <sub>525</sub>	A	
1	0,325	0,67	1,22	2,20	1,53
2	0,100	0,3	0,563	1,10	0,80
3	0,019	0,0	0,254	0,55	0,55

v rozmezí ±7,1 %, což je přesnost vyhovující pro provozní laboratoř.

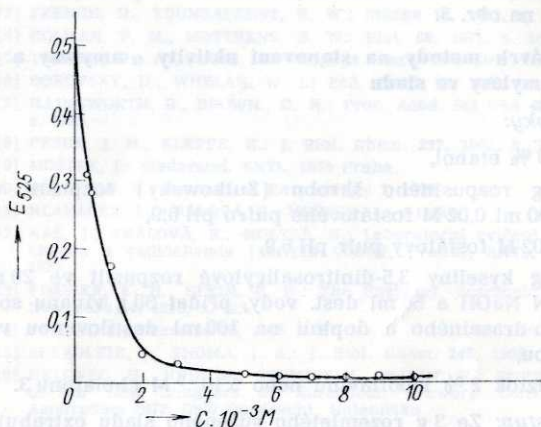
Tento způsob extrakce amylasy ze sladu je rychlý,



dostatečně přesný a lze jej proto doporučit pro stanovení amylasové aktivity sladu.

### 3.2 Úprava Sumnerovy metody pro stanovení aktivity amylasy ve sladu

Stanovení redukujících látek, které vznikají při hydrolyze škrobu účinkem amylasy, je rušeno redukujícími cukry přítomnými ve sladu. Tyto látky, i když jsou obsaženy ve sladu v malém množství, není možno zanedbat, protože by značně zkreslovaly výsledky stanovení amylasové aktivity. Tabulka 2 ukazuje podíl těchto preexistujících redukujících látek ve sladu a uvádí je do relace k celkovému obsahu redukujících látek po hydrolyze škrobu.



Obr. 2. Závislost aktivity  $\alpha$ -amylasy na koncentraci chelatonu 3. Koncentrace chelatonu je udána v přepočtu na objem reakční směsi

Tab. 3. Ověření inaktivace  $\alpha$ -amylasové aktivity. Výsledky jsou uvedeny v jednotkách Sumnerovy metody, tj. v mg maltosy/2 ml  $H_2O$

Celková aktivita $\alpha + \beta$ amylasy	$2 \cdot 10^{-3} M$ riboflavin $\beta$ -amylasy	$5 \cdot 10^{-3} M$ chelaton 3 $\beta$ -amylasy	$70^\circ C$ , 10 min $\alpha$ -amylasy
1,4	1,26	1,21	0,20

Z tabulky 2 vidíme, že teprve při stonásobném zředění extraktu amylasy ze sladu jsou preexistující redukující cukry ze sladu zanedbatelné a neruší stanovení amylasové aktivity. Je proto nutno vždy při stanovení aktivity amylasy uvedenou metodou preexistující redukující látky stanovit a odečíst je od celkového výsledku stanovení redukujících látek.

Všechny výsledky stanovení amylasové aktivity Sumnerovou metodou uvedené v této práci uvádíme po odečtení preexistujících redukujících látek.

### 3.3 Rozlišení $\alpha$ -amylasové a $\beta$ -amylasové aktivity

Rozlišení  $\alpha$ -amylasové a  $\beta$ -amylasové aktivity při stanovení sladových amylas je z hlediska pivovarské praxe velmi důležité. V literatuře je popsána metoda na rozlišení obou enzymů při stanovení (bez předchozího oddělení) na základě tepelné denaturace  $\beta$ -amylasy [12], která je inaktivována při  $70^\circ C$ . Tento způsob rozlišení aktivity obou amylas je však velmi náročný na přesné dodržení reakčních podmínek (teploty, pH, času), aby se částečně neinaktivovala i  $\alpha$ -amylasa. Tato metoda se nám proto nezdá vhodná pro použití v provozní laboratoři.

Další možností je využití specifických inhibitorů jednotlivých amylas.  $\alpha$ -amylasy byly klasifikovány jako me-

Tab. 4. Závislost aktivity sladové  $\alpha$ -amylasy na koncentraci riboflavinu. Aktivita měřena Sumnerovou metodou

Koncentrace riboflavinu $M$	mg maltosy/2 ml $H_2O$
$2 \cdot 10^{-4}$	1,65
$1 \cdot 10^{-3}$	1,50
$2 \cdot 10^{-3}$	1,10
$3 \cdot 10^{-3}$	1,10
$4 \cdot 10^{-3}$	1,10

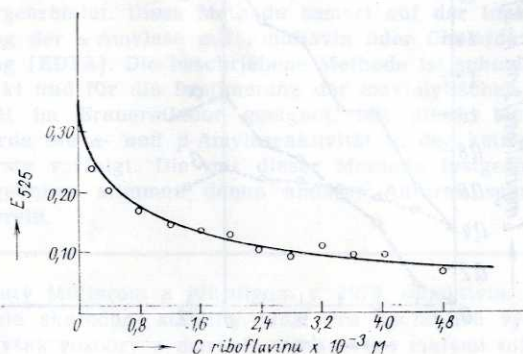
taloenzymy s vápníkem jako kofaktorem [13]. Odstraněním vápníku je enzym téměř úplně inaktivován. Proto inhibiční účinek vůči  $\alpha$ -amylasám vykazují především různá chelatační činidla vážící vápník (EDTA, oxalát), dále riboflavin a ionty těžkých kovů.  $\beta$ -amylasy naproti tomu jsou enzymy, obsahující skupinu SH a jsou tedy citlivé k oxidaci a k účinku činidel, která s touto skupinou reagují (p-chlormercuribenzoát, N-ethylmaleinimid) [14, 15].

#### 3.3.1 Inhibice $\alpha$ -amylasy

Byla sledována závislost aktivity  $\alpha$ -amylasy na koncentraci chelatonu 3 (dvojná sůl EDTA) a riboflavinu, tj. látek, které prokazují inhibiční účinek vůči  $\alpha$ -amylasám. Tyto závislosti byly sledovány na modelových vzorcích: místo sladové amylasy byl použit k pokusu preparát mikrobiálního původu, Bacterial Amylase Novo (fy Novo), a to 5% roztok tohoto preparátu ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl). Uvedená bakteriální amylasa obsahuje převážně  $\alpha$ -amylolytickou aktivitu.

Metoda byla upravena tak, že k 1 ml substrátu byl přidán ještě před roztokem enzymu 1 ml inhibičního roztoku chelatonu různé koncentrace ( $10^{-4}$  —  $10^{-2} M$ ) nebo 1 ml roztoku riboflavinu ( $2 \cdot 10^{-3}$  —  $5 \cdot 10^{-2} M$ ). Potom pokračuje Sumnerova metoda jako bez inhibice.

Závislost aktivity  $\alpha$ -amylasy na koncentraci chelatonu znázorňuje obr. 2. Z výsledků uvedených na tomto obrázku plyne, že chelaton je účinným inhibitorem  $\alpha$ -amylasy a že k inhibici námi použitého roztoku enzymu (5 % Bacterial Amylase Novo) stačí  $5 \cdot 10^{-3} M$  roztok chelatonu 3. Tento výsledek platí ovšem jen tehdy, byl-li jako substrát použit rozpustný škrob podle Zulkowskyho, který obsahuje přesně definované množství  $Ca^{2+}$ .



Obr. 3. Závislost aktivity  $\beta$ -amylasy na koncentraci riboflavinu. Koncentrace riboflavinu je udávána v přepočtu na objem reakční směsi

Závislost  $\alpha$ -amylasové aktivity na koncentraci riboflavinu je zachycena na obr. 3. Vidíme, že se stoupající koncentrací riboflavinu limitně klesá aktivita  $\alpha$ -amylasy k určité hodnotě, již už není možno zvyšováním koncentrace riboflavinu překročit.



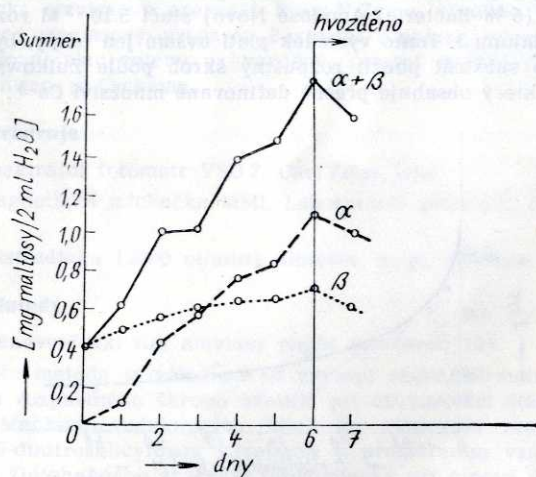
Tab. 5. Sledování  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasové aktivity během klíčení sladovnického ječmene. Aktivita měřena Sumnerovou metodou. Inaktivace  $\alpha$ -amylasy provedena pro sklizeň 1977 riboflavinem a pro sklizeň 1978 chelatonem 3

Dny	Sklizeň 1977			Sklizeň 1978		
	Aktivita $\alpha + \beta$ — amylasy	$2 \cdot 10^{-3}$ M riboflavin aktivita $\beta$ -amylasy	Vypočtená aktivita $\alpha$ -amylasy	Aktivita $\alpha + \beta$ — amylasy	$5 \cdot 10^{-3}$ M chelaton 3 aktivita $\beta$ -amylasy	Vypočtená aktivita $\alpha$ -amylasy
0.	0,400	0,400	0,000	0,300	0,300	0,000
1.	0,600	0,500	0,100	0,450	0,350	0,100
2.	1,030	0,550	0,420	0,850	0,400	0,450
3.	1,175	0,600	0,575	1,105	0,445	0,650
4.	1,390	0,630	0,760	1,350	0,550	0,800
5.	1,475	0,660	0,815	1,550	0,60	0,950
6.	1,810	0,700	1,110	1,890	0,790	1,100
hvozď	1,600	0,600	1,000	1,620	0,620	1,000

### 3.3.2 Ověření inaktivace $\alpha$ -amylasové aktivity

Abychom ověřili, zda inaktivace  $\alpha$ -amylasové aktivity zkoumanými inhibičními činidly je dostatečná [zejména s riboflavinem nebyl pokus na Bacterial Amylase Novo dostatečně průkazný], zařadili jsme ještě pokus na enzymovém preparátu, který obsahuje výraznou aktivitu jak  $\alpha$ -, tak  $\beta$ -amylasovou. Je to preparát Brew-N-Zyme vyráběný holandskou firmou Naarden.

Ověření jsme provedli tak, že jsme stanovili Sumnerovou metodou nejprve celkovou amylasovou aktivitu. Poté byla roztokem riboflavinu ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) nebo chelatonu 3 ( $5 \cdot 10^{-3}$ ) inaktivována  $\alpha$ -amylasová aktivita a změřena zbytková aktivita. Koncentrace riboflavinu a chelatonu byla určena z výsledků předchozího pokusu (obr. 2 a 3). Pro kontrolu byla pak tepelným záhřevem (70 °C, 10 min) inaktivována  $\beta$ -amylasa a opět změřena zbytková aktivita. Výsledky měření  $\alpha$ -amylasové aktivity (po inaktivaci  $\beta$ -amylasy) a  $\beta$ -amylasové aktivity (po inaktivaci  $\alpha$ -amylasy) byly sečteny a porovnány s naměřenou celkovou amylasovou aktivitou. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.



Obr. 4. Průběh aktivity  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy v jednotlivých dnech klíčení ječmene  
 $(\alpha + \beta)$  — celková aktivita amylas měřená Sumnerovou metodou,  
 $\beta$  —  $\beta$ -amylasa ( $\alpha$ -amylasa je inhibována chelatonem 3),  
 $\alpha$  —  $\alpha$ -amylasa vypočtená;  $\alpha = (\alpha + \beta) - \beta$ .

Výsledky z tabulky 3 jasně prokazují, že inaktivace  $\alpha$ -amylasové aktivity  $2 \cdot 10^{-3}$  M roztokem riboflavinu nebo  $5 \cdot 10^{-3}$  M roztokem chelatonu 3 je prakticky úplná. Obou

těchto látek je tedy možno použít jako inhibitorů  $\alpha$ -amylasy, chceme-li stanovit pouze  $\beta$ -amylasovou aktivitu.

### 3.4 Inhibice sladové $\alpha$ -amylasy riboflavinem

Pro úplnost byl vliv riboflavinu na aktivitu  $\alpha$ -amylasy sledován též pro extrakt amylasy ze sladu. Amylasový extrakt byl připraven uvedeným způsobem a pro stanovení vlastní byl 20krát zředěn.

Výsledky stanovení závislosti  $\alpha$ -amylasové aktivity sladu na koncentraci riboflavinu ukazuje tabulka 4.

Z tabulky je zřejmé, že po dosažení koncentrace riboflavinu  $2 \cdot 10^{-3}$  M již aktivita amylasy neklesá, takže můžeme považovat veškerou  $\alpha$ -amylasu za inaktivovanou. To je v souladu s výsledky modelového pokusu, uvedeného na obr. 3.

### 3.5 Návrh metody na stanovení aktivity $\alpha$ -amylasy a $\beta$ -amylasy ve sladu

#### Roztoky:

- 20 % etanol,
- 1 g rozpustného škrobu [Zulkowsky] rozpustit ve 100 ml 0,02 M fosfátového pufru pH 6,9,
- 0,02 M fosfátový pufr pH 6,9,
- 1 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové rozpustit ve 20 ml 2N NaOH a 50 ml dest. vody, přidat 30 g vinanu sodno-draselného a doplnit na 100 ml destilovanou vodou,
- roztok 2 % riboflavinu nebo  $5 \cdot 10^{-3}$  M chelatonu 3.

**Postup:** Ze 3 g rozemletého sušeného sladu extrahuje se amylasy 15 ml 20 % etanolu tak, že suspenzi ve 150 ml kádince mícháme 15 min na magnetické míchačce. Pak suspenzi rozdělíme odstředěním (3000 ot/min) po dobu 5 minut. K vlastnímu stanovení zředíme amylasový extrakt 20krát.

Ze vzorku amylasy pak odpipetujeme 1 ml pro stanovení celkové amylasové aktivity a paralelně 1 ml pro stanovení  $\beta$ -amylasové aktivity. Ke vzorku pro stanovení  $\beta$ -amylasové aktivity přidáme 1 ml 2 % roztoku riboflavinu nebo 1 ml roztoku chelatonu (roztoky 5) a necháme stát 10 min při laboratorní teplotě. Po této době přidáme k oběma vzorkům (pro stanovení celkové aktivity i pro stanovení  $\beta$ -amylasové aktivity) 1 ml substrátu (roztok 2) a inkubujeme 3 min při 20 °C. Reakci přerušíme přidáním 2 ml roztoku kyseliny 3,5-dinitrosalicylové (roztok 4) a směs zahřejeme 5 min na vroucí vodní lázni. Ochladíme pod tekoucí vodou, přidáme 20 ml destilované vody a při vlnové délce 525 nm proměříme optickou hustotu barevných roztoků. Z kalibrační křivky (obr. 1) odečteme odpovídající množství maltosy ve 2 ml H<sub>2</sub>O, čímž vyjadřujeme aktivitu amylasy.

V prvním vzorku máme údaj celkové amylasové aktivity ( $\alpha$  i  $\beta$ ), ve druhém vzorku (s riboflavinem nebo chelatonem) jsme získali údaj  $\beta$ -amylasové aktivity. Hodnotu  $\alpha$ -amylasové aktivity získáme po odečtení  $\beta$ -amylasy od celkové amylolytické aktivity.

**Poznámka:** Pro každý vzorek sladové amylasy je třeba stanovit preexistující cukry v amylasovém extraktu a odečítat od vlastního stanovení amylasové aktivity.

### 3.6 Sledování aktivity $\alpha$ -amylasy a $\beta$ -amylasy v klíčícím ječmeni

Popsanou metodou jsme sledovali aktivitu  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasy během klíčení ječmene. Vzorky byly odebírány ze sladovny humnového typu v jednotlivých dnech klíčení až po odhvozdný slad. Vzorky byly po předsušení na vláhu asi 5 % připraveny podle 3.1 a 20krát zředěny. Získané výsledky po přepočítání na sušinu jsou uvedeny v tab. 5. K inaktivaci  $\alpha$ -amylasy byl pro sklizeň r. 1977 použit riboflavin a pro sklizeň r. 1978 chelaton 3. Akti-



vita  $\alpha$ -amylasy je vypočtena z rozdílů celkové aktivity a aktivity  $\beta$ -amylasy.

Výsledky obou sklizní jsou v dobré shodě, což ukazuje na reprodukovatelnost použité metody [16]. Průměrné výsledky jsou pro větší názornost zachyceny na obr. 4. Průběh amylasové aktivity v jednotlivých dnech sledování je v souladu s teorií. První dva dny se  $\alpha$ -amylasa prakticky nevyskytuje, kdežto  $\beta$ -amylasa se již vyskytuje ve vymáčeném ječmeni (0. den). Výsledky ukazují, že uvedené metody lze použít v pivovarství.

#### Literatura

- [1] WATRIN, J., ROBINSON, M., THOMA, J. A.: Carbohydr. Res. **10**, 1969, s. 487.
- [2] NORIM, P., FRENCH, D.: J. Am. Chem. Soc. **80**, 1958, s. 1145.
- [3] FRENCH, D., YOUNGAPENST, R. W.: Stärke **12**, 1963, s. 425.
- [4] COLMAN, P. M., MOTTBENS, B. W.: Biol. **60**, 1971, s. 163.
- [5] TAKEDA, Y., HIZUKURI, S.: Biophys. Acta **185**, 1969, s. 469.
- [6] BOROVSKEJ, D., WHELAN, W. J.: Fed. Proc. **31**, 1972, s. 477.
- [7] ILLINGWORTH, B., BROWN, D. H.: Proc. Acad. Sci. USA **48**, 1962, s. 1619.
- [8] PEZUR, J. H., KLEPPE, K.: J. Biol. Chem. **237**, 1962, s. 1002.
- [9] MOŠTEK, J.: Sladařství, SNTL, 1975 Praha.
- [10] BERUFELD, P.: Methods in Enzymology **1**, 1955, s. 149.
- [11] HLAVÁČEK I., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: v tisku
- [12] KAŠ, J., KRÁLOVÁ, B., MOLTAŠ, K.: Laboratorní cvičení z biochemie a radiochemie (skripta VŠCHT, Praha), SNTL, Praha 1977.
- [13] FISCHER, E. H., STEIN, E. H.: The Enzymes, Academic Press, New York, **4**, 1960, s. 313.
- [14] SRIBAN, R.: Braserie **20**, 1965 s. 67.
- [15] SPRADLEIE, J., THOMA, J. A.: J. Biol. Chem. **245**, 1969, s. 117.
- [16] DELLWEG, H., JOHN M., SCHMIDT, J., FLINDT, E.: Proceedings of the 18th Congress of European Brewery Convention, Amsterdam 1977, DSW Dordrecht, Holandsko.

**Hlaváček I., Králová B., Moštek J.: Stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy a  $\beta$ -amylasy ve sladu.** Kvas. prům., **25**, 1979, č. 11, s. 241–245.

Byla studována inhibice aktivity amylasy riboflavinem a chelatonem 3 a hledány podmínky, při nichž je aktivita  $\alpha$ -amylasy prakticky zcela inhibována, zatímco aktivita  $\beta$ -amylasy zůstane nedotčena.

Na základě těchto pokusů byla vypracována rychlá a jednoduchá metoda stanovení  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasové aktivity v pivovarském sladu. Metoda je založena na inaktivaci  $\alpha$ -amylasy roztokem riboflavinu nebo chelatonu 3 (dvojsodná sůl EDTA).

Navržená metoda je rychlá a přesná a je vhodná pro stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy a  $\beta$ -amylasy v pivovarské provozní laboratoři.

Popsanou metodou byla sledována  $\alpha$ - a  $\beta$ -amylasová aktivita při klíčení ječmene. Výsledky získané touto metodou jsou ve velmi dobré shodě s výsledky jiných autorů.

Главачек, И. — Кралова, Б. — Моштек, И. Определение активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы в солоде. Квас. прум., **25**, 1979, № 11, стр. 241–245.

Авторы исследовали ингибицию активности амилазы рибофлавином и хелатоном и искали условия, при которых активность  $\alpha$ -амилазы практически вполне ингибируется, а активность  $\beta$ -амилазы остается неизменной.

На основе этих экспериментов был разработан скорый и простой метод определения активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы в пивоваренном солоде. Этот метод обоснован на инаktivации  $\alpha$ -амилазы раствором рибофлавина или хелатона 3 (двойная соль EDTA).

Предложенный метод является быстрым и точным, удобным для установления активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы в условиях лаборатории пивоваренного завода.

При помощи описанного метода было произведено исследование активности  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы во всходящем ячмене. Результаты, полученные при помощи этого метода, соответствуют результатам других авторов.

**Hlaváček I., Králová B., Moštek J.: Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amylase Activity in the Malt.** Kvas. prům., **25**, 1979, No. 11, pp. 241–245.

In the presented study the authors followed the inhibition of the amylase activity using riboflavin and the chelating agent. Conditions under which the  $\alpha$ -amylase activity is practically completely inhibited, while the  $\beta$ -amylase activity remains untouched, were also studied. A rapid and simple method of determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activity in the malt was established. The method is based on the inactivation of  $\alpha$ -amylase with riboflavin or Chelaton 3 solution (EDTA), is precise, rapid, and suitable for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activity in the germinating barley, performed in control brewery laboratories. The results obtained by this method are in full agreement with those obtained by other authors.

**Hlaváček I., Králová B., Moštek J.: Bestimmung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylaseaktivität im Malz.** Kvas. prům., **25**, 1979, No. 11, S. 241–245.

Die Hemmung der amylolytischen Aktivität mit Riboflavin und Chelaton 3 (EDTA) wurde verfolgt. Es wurden auch die Bedingungen gesucht, bei denen die  $\alpha$ -Amylaseaktivität praktisch behemmt ist, und dabei die  $\beta$ -Amylaseaktivität unberührt bleibt. Es wurde eine einfache und schnelle Methode der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylaseaktivität im Malz ausgearbeitet. Diese Methode basiert auf der Inaktivierung der  $\alpha$ -Amylase mit Riboflavin oder Chelaton 3 Lösung (EDTA). Die beschriebene Methode ist schnell und exakt und für die Bestimmung der amylolytischen Aktivität im Brauereilabor geeignet. Mit dieser Methode wurde die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylaseaktivität in der keimenden Gerste verfolgt. Die mit dieser Methode festgestellten Ergebnisse stimmen denen anderer Autoren sehr gut überein.