

Využití chromogenních substrátů při stanovení enzymů v pivovarství

663.41:543
577.154.31

Ing. BLANKA KRÁLOVÁ, CSc., Ing. IVAN HLAVÁČEK, Prof. Ing. JOSEF MOŠTEK, DrSc. Katedra biochemie a mikrobiologie, Katedra kvasné chemie a technologie, VŠCHT, Praha

1. ÚVOD

Slad jako jedna z nejdůležitějších surovin pivovarského průmyslu obsahuje amylolytické enzymy, které katalyzují degradaci škrobu na nižší sacharidy. Tyto enzymy značně ovlivňují technologický proces v pivovarství a je proto nezbytné sledovat jejich aktivitu jak v surovině, tak i při vlastním technologickém procesu. Aby provozní laboratoř pivovaru mohla měřit amylolytické aktivity sériově, hledají se nenáročné, reprodukovatelné a citlivé metody, které by tato měření umožnily. Pro zdravotnické laboratoře začaly některé firmy vyrábět sady pro stanovení aktivity amylas, založené na degradaci uměle připravených barevných látek, tzv. chromogenních substrátů, s nimiž je práce jednodušší.

Možnost jednoduchého stanovení aktivity amylas jistě uvítají i pracovníci provozních laboratoří v pivovaru. Ve sladu se ovšem vedle sebe vyskytují α -amylasa i β -amylasa, které obě mají pro technologický proces význam. Tím se stanovení celkové amylasové aktivity poněkud komplikuje. V naší práci se zabýváme možností využít obchodně vyráběných sad pro stanovení amylas v pivovarské laboratoři a předkládáme výsledky srovnání těchto metod s klasickými metodami.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Metody stanovení bílkovin s amylasovou aktivitou jsou založeny na pozorování změn při štěpení škrobu amylasami. Jde v podstatě o tři typy metod:

a) Metody založené na zvýšení redukční síly amylopektinu nebo rozpustného škrobu [1, 2, 3]. Čím je enzym aktivnější, tím více vzniká štěpů s redukčními vlastnostmi a tím je také větší celková redukční síla roztoku. Tyto metody mají řadu modifikací a odlišují se zejména způsobem stanovení redukční mohutnosti. Metody to-

hoto typu jsou vhodné pro stanovení aktivity α -amylas i β -amylas.

b) Metody založené na změně zbarvení jodoškrobového komplexu [4, 5]. Jod tvoří se škrobem modře zbarvený komplex. Při naštěpení amylasového řetězce se zbarvení komplexu mění přes purpurovou a červenou, dextriny složené ze 4–6 glukosových zbytků se jodem již nebarví.

c) Metody založené na snížení viskozity škrobové pasty [6]. Dva poslední typy metod jsou vhodné pro stanovení aktivity α -amylasy.

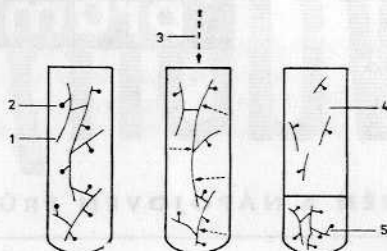
V nedávné době se objevily nové metody pro stanovení aktivity amylas. Tyto metody jsou založeny na využití nerozpustných barevných substrátů, které činností amylas přecházejí do roztoku. Jsou to obvykle polysacharidy typu amylopektinu, na něž jsou navázána různá barviva. Škrobový substrát je pak činností amylas hydrolyzován, barvivo přechází do roztoku a intenzita zbarvení roztoku se fotometricky proměří (obr. 1). Množství uvolněného barviva je pak přímo úměrné aktivitě enzymu [2]. Mezi barviva, která se nejčastěji používají pro přípravu chromogenních substrátů, patří Remazolbrilantová modř (obr. 2) [7, 8], Reaktonová červeně (obr. 3) [9, 10], Cibachrom F3GA [11, 12] a Amylose azure B [7].

Jak jsme se již zmínili v úvodu, některé firmy, zabývající se přípravou chemikálií, aby co nejvíce zjednodušily situaci ve zdravotnických laboratořích, připravují testovací sady, které obsahují vedle chromogenních substrátů i hotové roztoky, potřebné k práci. V sadách jsou přiloženy i kalibrační grafy, event. tabulky, které umožňují výpočet aktivity enzymu z hodnoty absorpce. Aktivita je ve všech případech udávána v mezinárodních jednotkách U/l.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

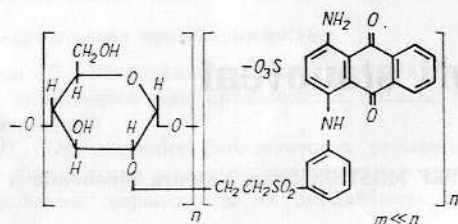
3.1 Materiály

Sada pro stanovení amylasy „Amylochrome Roche“
substrát: Amylosa s „Cibacrom Blue 3G-A“ v tabletách
srážecí roztok: roztok NaH_2PO_4 , pH = 4,3
standardní roztok: „Cibacrom Blue 3G-A“ prokazující
aktivitu 460 U/l.

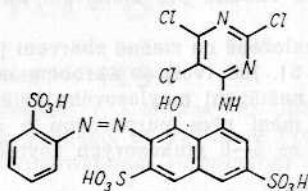


Obr. 1. Princip působení α -amylasy na nerozpustný chromogenní substrát

1 — nerozpustný škrob, 2 — barvivo, 3 — působení α -amylasy, 4 — rozpustné modré barvivo, 5 — nezhydrolyzovaný škrob



Obr. 2. Remazolbrilantová modř



Obr. 3. Reaktonová červec B

Bližší údaje o jednotlivých složkách výrobce nesdělujeme. Sada pro stanovení amylasy „Phadebas Amylase Test“ - Pharmacia:

substrát: Amylosa s „Remazolbrillantblau R“ v tabletách

srážecí roztok: 2% NaOH

Další údaje výrobce nesdělujeme.

Sada pro stanovení amylasy „Bio-La-Test“, Lachema, n. p.

substrát: Amylosa s „Remazolbrillantblau R“ v tabletách

tlumivý roztok, srážecí roztok — oba bez bližšího určení.

Rozpustný škrob podle Zulkowského, výrobce Merck, NSR
Ostatní chemikálie kromě enzymových preparátů z n. p. Lachema, Brno.

Enzymové preparáty:

Bacterial Amylase Novo (BAN), fy NOVO, Dánsko

Brew, „N“ zyme L 100, Narden, Holandsko

Amylase Sp-100

Sladové extrakty:

alkoholové extrakty pivovarských sladů [16]
kongresní sladina.

3.2 Přístroje

Spektrofotometr zn. VSZ 2, Carl Zeiss, Jena, NDR

Ostředivka zn. Mechanika Precyzyjna, typ 310, PLR

Magnetická míchačka MM1, n. p. Laboratorní přístroje, Praha

Vysokootáčkový mlýnek, vrtulkový, 12 000 ot/min.

Tabulka 1. Postup při stanovení amylasové aktivity metodou „Amylochrome Roche“

	Vzorek	Standard S	Slepý pokus SP
substrát (tableta)	1	—	1
destilovaná voda (ml)	1	1	1
inkubace 5 min při 37 °C			
vzorek amylasy (ml)	0,05	—	—
standard (ml)	—	0,05	—
mixovat a pak inkubace 15 min při 37 °C			
srážecí roztok (ml)	4	4	4

Mixovat a odstředit (3000 ot/min) po dobu 10 min. Měří se absorbance čirého roztoku proti slepému pokusu při 630 nm. Standard se měří proti destilované vodě při téže vlnové délce.

Tabulka 2. Postup při stanovení amylasové aktivity metodou „Phadebas Amylase Test“

	Vzorek	Slepý pokus
vzorek (ml)	0,2	—
destilovaná voda (ml)	4,0	4,2
inkubace při 37 °C po dobu 5 min		
substrát (tableta)	1	1
inkubace při 37 °C po dobu 15 min		
2% NaOH (ml)	1	1

Promíchat a odstředit při 3000 ot/min po dobu 5 min. Absorbance čirého roztoku se měří proti slepému pokusu při vlnové délce 620 nm.

3.3 Metody

3.3.1 Metody pro stanovení amylasy s použitím chromogenních substrátů

3.3.1.1 Metoda „Amylochrome Roche“

Postup stanovení je uveden v tabulce 1.

Aktivita amylasy ve vzorku (v mezinárodních jednotkách U/l) se vypočte ze vztahu

$$U/l = \frac{\text{abs. vzorku}}{\text{abs. standardu}} \times 460$$

Tabulka 3. Postup při stanovení amylasové aktivity metodou „Bio-La-Test“ Lachema

	Vzorek	Slepý pokus
suspenze substrátu (ml)	1	1
předeřhát 5 min při 37 °C		
vzorek amylasy (ml) destilovaná voda (ml)	0,1 —	— 0,1
míchat 15 min při 37 °C		
srážecí roztok (ml)	2	2

Promíchat, nechat stát 15 min, odstředit při 5000 ot/min. Absorbance čirého roztoku se měří proti slepému pokusu při 590 nm.

3.3.1.2 Metoda „Phadebas Amylase Test“

Postup při stanovení aktivity amylasy touto metodou udává tabulka 2.

Aktivita vzorku se odečte po proměření na fotometru z kalibrační křivky, která je přiložena výrobcem ke každé sadě. Příklad kalibrační křivky, přiložené k námi používané sadě udává obrázek 4.

3.3.1.3 Metoda „Bio-La-Test“ Lachema [13]

Chromogenní substrát pro tuto metodu je ve formě prášku a před vlastním stanovením je nutno ho suspendovat v tlumivém roztoku. Suspenze se připraví tak, že obsah trubičky se substrátem se přidá k 10 ml tlumiče a míchá se na magnetické míchačce asi 15 min až vznikne homogenní suspenze. Takto připravenou suspenzi je možno přechovávat nejvýše dva dny. Postup stanovení je shrnut v tabulce 3.

Aktivita amylasy ve vzorcích v mezinárodních jednotkách U/l se odečte z tabulky přiložené ke každé sadě (tabulka 4).

3.3.2 Stanovení amylasové aktivity na základě jodoškrobové reakce [14]

V této metodě se stanoví doba potřebná k enzymovému rozštěpení 1 g škrobu, která je indikována negativní jodoškrobovou reakcí (ztráta modrého zbarvení). Podle

Tabulka 4. Kalibrační tabulka pro metodu „Bio-La-Test“ Lachema

Aktivita enzymu U/l	Absorbance	Aktivita enzymu U/l	Absorbance
40	0,042	400	0,395
60	0,062	450	0,443
80	0,083	500	0,491
100	0,103	550	0,539
110	0,113	600	0,586
120	0,123	700	0,681
140	0,142	800	0,776
160	0,162	900	0,870
180	0,182	1 000	0,946
200	0,201	1 100	1,057
220	0,221	1 200	1 151
250	0,250	1 300	1 244
280	0 279	1 600	1 522
300	0,299	1 800	1 707
350	0,347	2 000	1 891

doby potřebné k dosažení negativní reakce na škrob se z přiloženého grafu odečtou jednotky amylasové aktivity, které se přepočtou na 1 g původního vzorku enzymového preparátu.

Do zkumavek se napipetuje po 10 ml indikačního roztoku (120 ml vody + 0,4 ml 0,1 M roztoku jodu. Používat vždy čerstvý). Do škrobového roztoku (škrob + 10 ml studené vody) se dá množství odpovídající přesně 1 g sušiny. Vzniklá suspenze se vlije do 80 ml vroucí vody a vaří 3 min, vytemperuje se na 38 °C a vlije se roztok enzymového preparátu, kádinka se ještě rychle spláchne 10 ml vody 38 °C teplé. Reakční směs se inkubuje v termostatu za stálého míchání 5 min, pak se v jednominutových intervalech zjišťuje, zda byl již veškerý škrob rozštěpen. Zjistíme-li podle barvy indikačního roztoku, že štěpení škrobu značně pokročilo, sledujeme postup hydrolýzy škrobu v půlminutových intervalech. Z reakční směsi se odebírá vždy 0,1 ml a přidá se do předem připravené zkumavky s 10 ml indikačního roztoku. Potom se obsah zkumavky promísí. Je-li přítomen škrob, zbarví se obsah zkumavky modře, je-li škrob zhydrolyzován, obsah zkumavky se nezbarví. Zbarvení zůstane stejné jako u kontrolní zkumavky, obsahující pouze indikační roztok.

Tabulka 5. Amylasová aktivita jednotlivých vzorků měřená různými metodami

Metoda	Jednotky	BAN	BNZ	ASP	SP 1	SP 2	S
jodoškrobová	jednotky aktivity (j.a.)	85,2 % 100 %	115 139 %	100 121 %	93 113 %	0 —	0 —
Sumnerova	mg maltosy na 1 ml enzymu	1,13 100 %	1,5 134 %	1,25 111 %	1,6 141 %	0 —	0 —
Amylochrome	U/l	1 900 100 %	2 100 111 %	2 050 108 %	1 038 55 %	906 48%	405 24%
Phadebas Amylase Test	U/l	2 100 100 %	2 250 107 %	2 200 105 %	1 200 57 %	1 050 50%	450 21%
Bio-La-Test	U/l	320 100 %	700 218 %	650 203 %	1 000 312 %	700 218%	300 93%

Poznámka: Pod absolutními hodnotami amylasové aktivity jsou uvedena procenta enzymové aktivity vztažené k aktivitě BAN jako hodnotě 100 %. Uvedené hodnoty jsou průměrem několika stanovení.

Z doby potřebné k odbarvení se vypočte aktivita I podle vztahu:

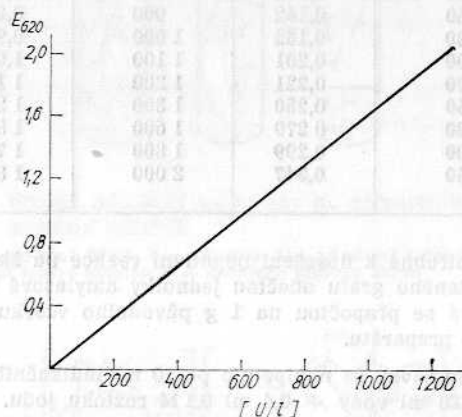
$$I = \frac{a}{n}$$

I je počet jednotek amylasové aktivity v 1 g testovaného enzymového preparátu,

a — jednotky aktivity v reakční směsi odečtené z předloženého grafu (obr. 5),

n — množství použitého testovaného preparátu v g.

Používáme-li tekutý amylasový preparát, vyjádříme aktivitu na 1 ml.



Obr. 4. Kalibrační křivka pro stanovení amylasy metodou „Phadebas Amylase Test“

3.3.3 Stanovení aktivity amylasy na základě zvýšené redukční mohutnosti reakční směsi — metoda podle Sumnera [15, 2]

Tato metoda je založena na zvýšení redukční síly rozpustného škrobu vzniklé při jeho enzymovém štěpení amylasami. Množství redukujících látek je přímo úměrné žlutohnědému zbarvení, které vznikne přidáním roztoku kyseliny 3,5-dinitrosalicylové. Amylasová aktivita při této metodě se vyjadřuje v mg maltosy, která vznikne při třiminutové inkubaci reakční směsi s 1 ml enzymu při 20 °C. Metoda je přesně popsána v citované literatuře.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Porovnání metod stanovení aktivity amylas chromogenními substráty s metodou podle Sumnera a s metodou jodoškrobovou

Amylolytická aktivita různých uvedených vzorků byla stanovena s použitím chromogenních substrátů, a to metodou „Phadebas Amylase Test“, metodou „Amylochrome Roche“ a metodou „Bio-La-Test“.

Pro srovnání byla v týchž vzorcích stanovena aktivita amylas též metodou jodoškrobovou a metodou podle Sumnera.

0,075% roztok preparátu Bacterial Amylase Novo (BAN)

0,075% roztok preparátu Brew, „N“ zyme L 100 (BNZ)

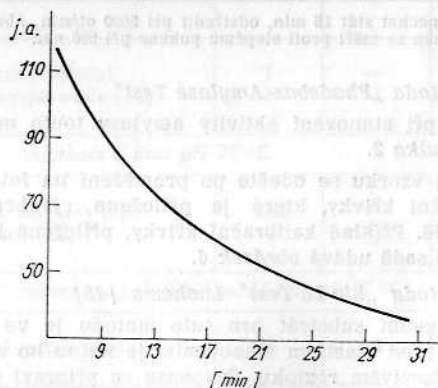
0,075% roztok preparátu Amylase SP-100 (ASP)

sladové extrakty z pivovarských sladoven (SP 1 a SP 2), 20krát zředěné,

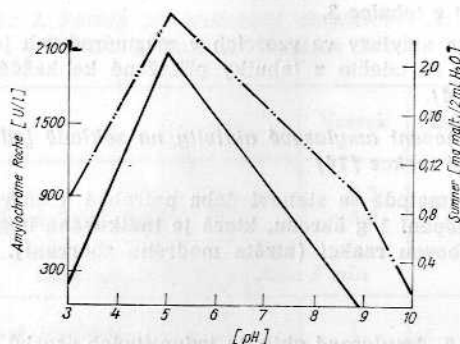
kongresní sladina (S)

Výsledky měření amylasové aktivity uvedených vzorků různými metodami jsou uvedeny v tabulce 5.

Z výsledků v tabulce 5 můžeme odvodit několik závěrů. Předně, srovnání výsledků amylasové aktivity měřené různými metodami v absolutních hodnotách není možné, protože polymerní substrát (škrob nebo amylosa) nemá přesně definovanou relativní molekulovou hmotnost a nelze proto různé smluvní jednotky amylasové aktivity, získané při použití různých metod, navzájem přepočítat na společnou jednotku. Srovnávat v absolutních hodnotách lze pouze výsledky metod používajících chromogenních substrátů, kde je aktivita amylas vyjádřena v mezinárodních jednotkách U/l. Z toho důvodu byly ještě vypočteny relativní hodnoty amylasové aktivity jednotlivých vzorků, přičemž jako hodnota 100 % byla uvažována amylasová aktivita vzorku BAN (je to preparát, obsahující převážně α -amylasu). Pouze na základě těchto relativních hodnot můžeme pak srovnávat výsledky získané různými metodami.



Obr. 5. Kalibrační křivka pro stanovení aktivity amylasy jodoškrobovou metodou



Obr. 6. Závislost aktivity sladové amylasy na pH

— „Amylochrome Roche“
— — — „Sumnerova metoda“

Dalším poznatkem je, že jodoškrobová metoda a metoda podle Sumnera mají relativní výsledky ve velmi dobré shodě, jsou však méně citlivé k nižším enzymovým aktivitám než metody s chromogenními substráty. Je nutno si povšimnout i toho, že jodoškrobová metoda dává v některých případech výsledky nižší než metoda podle Sumnera (vzorek SP1), což si vysvětlujeme tím, že jodoškrobová metoda je málo citlivá pro stanovení aktivity β -amylasy. Metody s chromogenními substráty dávají výsledky poněkud nižší než dvě uvedené metody, avšak nelze jimi stanovit i vzorky s nižší enzymovou aktivitou. Jejich výsledky lze srovnávat v absolutních hodnotách a u metody „Amylochrome“ a „Phadebas“ se výsledky velmi dobře shodují a jsou reprodukovatelné. Výsledky metody „Bio-La-Test“ jsou značně odlišné od výsledků obou dalších metod a jejich reprodukovatelnost

je velmi špatná. Tuto metodu nemůžeme v současné době doporučit pro stanovení aktivity amylas v pivovarském materiálu.

Metody „Amylchrome“ a „Phadebas“ jsou velmi jednoduché, nejsou náročné na čas a na technické vybavení laboratoře ani na kvalifikaci pracovníka a jejich výsledky jsou dobře srovnatelné s výsledky jodoškrobové metody. Proti metodě Sumnerově dávají výsledky poněkud nižší, což lze opět vysvětlit jejich sníženou citlivostí k β -amylasové aktivitě, i když β -amylasa zřejmě přispívá alespoň částečně ke konečnému výsledku (obr. 1).

4.2 Stanovení závislosti amylolytické aktivity sladu na pH

Pro další ověření metod s chromogenními substráty byla metodou Amylchrome a metodou podle Sumnera stanovena závislost amylasové aktivity sladu na pH.

Tato závislost byla sledována na vzorku sladového extraktu, který byl připraven extrakcí sladu 20% etanolem [16] a před použitím 20krát zředěn.

Výsledky stanovení závislosti amylasové aktivity sladu na pH, získané metodou Sumnerovou a metodou Amylchrome, jsou uvedeny na obr. 6.

Z grafu je patrné, že optimální pH pro sladovou amylasu se shoduje u obou metod a v podstatě se shoduje i průběh křivek závislosti aktivity na pH. Zdálnivou vyšší citlivostí Sumnerovy metody a méně strmý průběh křivky stanovení touto metodou oproti křivce stanovení metodou Amylchrome si vysvětlujeme vyšší citlivostí Sumnerovy metody vůči β -amylase.

4.3 Stanovení amylasové aktivity v klíčicím ječmeni

Metodou s chromogenním substrátem [Amylchrome Roche] byl sledován obsah amylasové aktivity při sladování ječmene. Současně byla u těchto vzorků sledována amylasová aktivita Sumnerovou metodou a jodoškrobovou metodou. Účelem těchto srovnávacích pokusů bylo zjistit použitelnost metody s chromogenním substrátem pro vzorky, v nichž se postupně mění poměr mezi aktivitou β -amylasy a α -amylasy.

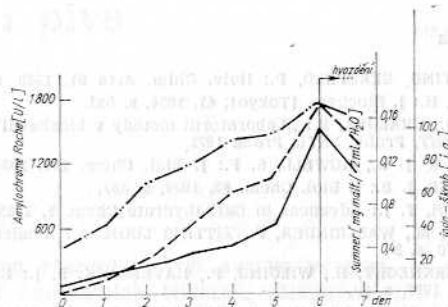
Aktivita amylas byla sledována v 1. až 7. dnu sladování ječmene; vzorky byly odebrány v jednotlivých dnech klíčení ze sladovny 1 — Plzeň. Vzorky sladovaného sladovnického ječmene byly předsušeny na vláhu asi 5 %, a z nich připraven extrakt amylasy [16]. Extrakt byl pro stanovení 20krát zředěn.

Získané výsledky přepočtené na 1 g sušiny shrnuje obr. 7.

Budeme-li posuzovat výsledky uvedené na obr. 7 z hlediska srovnání jednotlivých metod, uvidíme, že na počátku sledování dává jodoškrobová metoda výsledky nulové, o něco vyšší jsou údaje získané metodou s chromogenním substrátem (asi 5 % hodnoty 6. dne), nejvyšší jsou výsledky získané Sumnerovou metodou. To v podstatě odpovídá našim znalostem o aktivitě α -amylasy a β -amylasy během sladování [17]. V ječmeni je aktivní pouze β -amylasa, zatímco α -amylasová aktivita se objevuje až asi 2. den sladování. Protože jodoškrobová metoda je citlivá na α -amylasu, jsou výsledky na počátku sladovacího procesu nulové. Metoda s chromogenním substrátem dává na počátku výsledky nižší než Sumnerova metoda, ale amylasová aktivita je stanovena. To svědčí o tom, že metoda s chromogenním substrátem je částečně citlivá i na aktivitu β -amylasy. Z tohoto hlediska nevysvětlené zůstávají nízké hodnoty metody s chromogenními substráty zejména 3. a 4. den sladování.

Na tomto místě znovu zdůrazňujeme, že uvedené tři metody nemůžeme srovnávat v absolutních hodnotách,

protože z každé z nich získáme údaje o aktivitě v rozdílných jednotkách, které nelze navzájem přepočítat.



Obr. 7. Porovnání metod stanovení amylasové aktivity. Vzorek: klíčící ječmen odebrávaný v jednotlivých dnech sladování

— — — „Sumnerova metoda“ (stanovení redukční mohutnosti)
— — — „Amylchrome Roche“ (chromogenní substráty)
— — — „jodoškrobová metoda“

V našem případě jsme srovnávali procenta amylasové aktivity vzhledem ke stavu 6. dne klíčení ječmene, tj. před hvozďením (100 %) a můžeme tedy srovnávat pouze v relativních hodnotách, podle průběhu křivek. Poslední hodnota na křivkách je hodnota amylasové aktivity po hvozďení, na níž je jasně patrný pokles.

5. ZÁVĚR

Při studiu stanovení amylasové aktivity sladu za použití obchodně vyráběných testovacích sad „Amylchrome Roche“ a „Phadebas Amylase Test“ založených na použití chromogenních substrátů, jsme získané výsledky porovnávali s výsledky dalších dvou metod, založených na odlišných principech: se Sumnerovou metodou hodnotící nárůst redukční mohutnosti a s jodoškrobovou metodou sledující stupeň degradace škrobu. Srovnávání výsledků těchto čtyř metod je ovšem možno uskutečnit pouze s relativními hodnotami, protože uznané jednotky získané Sumnerovou metodou a jiné získané metodou jodoškrobovou není možno přepočítat na mezinárodní jednotky U, v nichž jsou vyjádřeny výsledky obou metod s chromogenními substráty.

Metody s chromogenními substráty dávaly ve většině případů nižší výsledky než Sumnerova metoda (nárůst redukční mohutnosti), zejména u vzorků s vyšší aktivitou β -amylasy. To lze vysvětlit sníženou citlivostí metod s chromogenními substráty na aktivitu β -amylasy, zatímco metoda Sumnerova stanoví v plné míře aktivitu α -amylasy i β -amylasy. Metoda jodoškrobová, která je citlivá v podstatě jen na α -amylasu, dává výsledky celkem shodné s metodami používajícími chromogenní substráty.

I z ověřovacích pokusů, při nichž bylo různými metodami stanoveno optimální pH pro aktivitu amylolytických enzymů ve sladu a sledována aktivita amylolytických enzymů při klíčení ječmene, lze odvodit obdobné závěry.

Přestože metodou s chromogenními substráty nedávají pro stanovení aktivity sladových amylas výsledky tak spolehlivé jako Sumnerova metoda a není možno jich využít k rozlišení aktivity α -amylasy a β -amylasy, předčí svou spolehlivostí, snadností provedení a citlivostí metody založené na vzniku jodoškrobového komplexu, které jsou v různých modifikacích dnes běžně používány v provozních pivovarských laboratořích. Předností metod používajících chromogenní substráty je rychlost a v případě použití obchodních testů i nenáročnost, dále jejich citlivost i v oblastech nižších enzymových aktivit.

Lze proto tyto metody doporučit pro rychlé orientační stanovení amylasové aktivity sladu v provozních laboratořích.

Literatura

- [1] NOETTING, BEROFELD, P.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 1948, s. 286.
- [2] FUWA, H.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **41**, 1954, s. 583.
- [3] KÁŠ, J., KRÁLOVÁ, B.: „Laboratorní metody v biochemii“, skriptum VŠCHT, Praha, SNTL, Praha 1971.
- [4] SUMNER, J. B., HOWELL, S. F.: *J. Biol. Chem.* **108**, 1935, s. 51.
- [5] SUMNER, J. B.: *J. Biol. Chem.* **62**, 1924, s. 287.
- [6] SCHOCH, T. J.: *Advances in Carbohydrate Chem.* **1**, 1945, s. 247.
- [7] LINKO, M., WALLINDER, P., ZITTING LUOM, A.: *Kemistilehti B* **43**, 1970, s. 3.
- [8] RINDERKNECHT, H., WILGING, P., HAVERBACK, B. J.: *Experientia* **23**, 1967, s. 80.
- [9] GROKAS, M. C., WILDING, P., RINDERKNECHT, H., HAVERBICK, B. J.: *Clin. Biochem.* **1**, 1968, s. 251.
- [10] BABSON, A. L., TENNEY, S., MEGRAW: *Clin. Chem.* **16**, 1970, s. 39.
- [11] ČESKA, M., HULTMAN, E., INGELMAN, B. G.: *Experientia* **25**, 1969, s. 555.
- [12] KLEIN, B., FONMAN, B. L.: *Anal. Biochem.* **31**, 1969, s. 412.
- [13] FISCHER, J., TOVÁREK, J.: *Clin. Chem.* **21**, 1975, s. 166.
- [14] JANÍČEK, B. a kol.: „Rukověť potravinářské analytiky“, SNTL 1982.
- [15] BERNFELD, P.: *Methods in Enzymology* **1**, 1955, s. 149.
- [16] HLAVÁČEK, I., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: *Kvasný průmysl* **25**, 1979, s. 241.
- [17] MOŠTEK, J.: „Sladářství-biochemie a technologie“, SNTL, Praha 1975.
- [18] Die Stärke 26 Jhy 1979 No. G.: „Determination of Cereal Alpha Amylase using a commercially available dyc — labelled Substrate by W. C. Barnes; A. B. Blakeney, Rydakuere.

Králová, B., Hlaváček, I., Moštek, J.: Využití chromogenních substrátů při stanovení amylolytických enzymů v pivovarnictví. *Kvas. prům.*, **26**, 1980, č. 8, s. 169—174.

Porovnáním metod stanovení aktivity amylolytických enzymů byla sledována možnost využití obchodně vyráběných testů s chromogenními substráty v pivovarských laboratořích. Výsledky srovnávacích pokusů prokázaly, že sady „Amylochrome Roche“ a „Phadebas Amylase Test“, které stanovují amylasovou aktivitu za použití chromogenních substrátů, jsou dostatečně přesné, citlivé a vhodné k rutinnímu použití v provozní laboratoři pivovaru. Pro rozlišení aktivity α -amylasy a β -amylasy je nutno použít jiných metod.

Кралова, В. — Главачек, И. — Моштей, И. Использование хроматогенных субстантов для определения амилолитических ферментов в пивоварении. *Квас. прум.* **26**, 1980, №8, стр. 169—174.

При помощи сравнения методов определения активности амилолитических ферментов авторы исследовали возможность использования в ривоваренных лабораториях стандартно производящихся наборов с хроматогенными субстратами. Результаты сравнительных опытов доказали, что наборы Амилохроме Роке и Пхадэбас Амиласе Тест, которые определяют активность амилаз при употреблении хромогенных субстратов, являются достаточно точными, чувствительными и подходящими для употребления в производственной лаборатории нивоваренного завода. Для различения активности α — и β — амилаз приходится употреблять другие методы.

Králová, B. - Hlaváček, I. - Moštek, J.: Utilization of Chromogenic Substrates in Determining Amylolytic Enzymes in the Brewing Process. *Kvas. prům.*, **26**, 1980, No. 8, pp. 169—174.

The possibility of utilization of standard tests with chromogenic substrates was followed by comparing various methods for the determination of activity of amylolytic enzymes in the brewing laboratories. The experiments revealed that the series of „Amylochrome Roche“ and „Phadebas Amylase Test“, which determines the amylase activity in using chromogenic substrates, are sufficiently precise, sensitive, and suitable for current application in brewery laboratories. In order to differentiate the α - and β -amylase activity, it is necessary to use another method.

Králová, B. - Hlaváček, I. - Moštek, J.: Der Gebrauch von Chromogensubstraten zur Bestimmung der amylolytischen Enzyme in der Brauindustrie. *Kvas. prům.*, **26**, 1980, No. 8, S. 169—174.

Die Möglichkeit des Gebrauchs der Standardteste mit Chromogensubstraten wurde verfolgt durch vergleichende Methoden der Bestimmung der Aktivität amylolytischer Enzyme in den Brauereilaboren. Die Ergebnisse der vergleichenden Versuche zeigten, daß die Serien „Amylochrome Roche“ und „Phadebas Amylase Test“, die Amylaseaktivität zum Gebrauch der Chromogensubstrate bestimmen, sind vollständig genau, sensitiv und geeignet zur Benutzung in den Brauereilaboren. Zur Unterscheidung der Aktivität der α - und β -Amylasen ist es notwendig andere Methoden zu gebrauchen.