Die Problematik der Bestimmung von Enzymaktivitäten in Lebensmitteln am Beispiel der -Amylase = The difficulties of determination of enzyme activity in food using -amylase determination as an example

Autor(en): **Amadò, R. / Steffen, H.R. / Ugrinovits, M.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **78 (1987)**

Heft 1

PDF erstellt am: **26.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982976

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **78**, 36–43 (1987)

R. Amadò, H. R. Steffen**, M. Ugrinovits*** und J.-C. Villettaz*****

Die Problematik der Bestimmung von Enzymaktivitäten in Lebensmitteln am Beispiel der α-Amylase

The Difficulties of Determination of Enzyme Activity in Food Using α-Amylase Determination as an Example

Einleitung

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Lebensmitteln ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. Lebensmitteleigene oder mikrobielle Enzyme katalysieren Reaktionen, welche zum Teil erwünscht, zum Teil unerwünscht sind. So sind zum Beispiel die fruchteigenen Pektinenzyme beim Reifungsprozess notwendig, eine zu grosse Aktivität dieser Enzyme führt aber zu Mazerierungseffekten und zum Zerfall des pflanzlichen Gewebes. Polyphenoloxidasen haben einen positiven Effekt bei der Fermentation von Tee, Kaffee und Tabak, in Früchten hingegen ist deren Aktivität unerwünscht, weil sie zur enzymatischen Bräunung führen. Technische Enzyme werden vermehrt auch bei der Lebensmittelbereitung und -verarbeitung eingesetzt, für die Herstellung verschiedener Produkte sind Enzyme gemäss der Zusatzstoffverordnung zugelassen. Schliesslich werden einzelne in Lebensmitteln enthaltene Enzymaktivitäten auch als Indikatoren zur Feststellung des Verlaufs technologischer Prozesse und/oder zum Nachweis von mikrobiellen Kontaminationen gemessen (z. B. alkalische Phosphatase zum Nachweis der Pasteurisation von Milch, Peroxidase als Indikator für ausreichende Hitzebehandlung eines Lebensmittels, Diastase im Honig zur Prüfung der Naturbelassenheit).

Zum Nachweis von Enzymen in Lebensmitteln oder zur Überprüfung von Enzympräparaten werden verschiedene Methodiken angewendet. Im allgemei-

* Institut für Lebensmittelwissenschaft, ETH, Zürich
** Boehringer Mannheim (Schweiz) AG, Rotkreuz
*** Wander AG, Neuenegg
**** Novo Ferment (Schweiz) AG, Basel

nen wird die Enzymaktivität durch Messung der Geschwindigkeit der von ihr katalysierten Reaktion ermittelt. Die Versuchsbedingungen müssen hierbei so gewählt werden, dass eine möglichst lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration, Reaktionsdauer und Substratumsatz gewährleistet ist. Als Mass für die Enzymwirkung dient dabei die *Enzymeinheit* (siehe auch (1)). Leider ist in der einschlägigen Literatur ein «Einheiten-Salat» zu beobachten, selbst die relativ gut definierten «internationalen Einheiten» (= I. E. oder U) und die seit Inkrafttreten des SI-Systems gültige Einheit «Katal» lassen einen Freiraum zu bei der Festhaltung der optimierten Bedingungen, unter denen Enzymaktivitätsmessungen ausgeführt werden (pH, Temperatur, Aktivatoren, Puffer usw.). Enzymaktivitätsmessungen mit «Reinenzymen» bereiten bereits Probleme bei der Reproduzierbarkeit, besonders dann, wenn hochmolekulare Substrate umgesetzt werden (z. B. Proteasen). Bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten in Lebensmitteln treten erschwerend noch Matrixeffekte auf, so dass für jede Lebensmittelgruppe (= Enzymquelle) die zur Aktivitätsbestimmung optimalen Bedingungen neu festgelegt werden müssen.

Die Subkommission (SK) 26 der Schweiz. Lebensmittelbuch-Kommission erhielt im Jahre 1982 von der Hauptkommission den Auftrag, das Kapitel 61 des Schweiz. Lebensmittelbuches (LMB) mit einem Abschnitt über die Messung von Enzymaktivitäten auszubauen. In einer ersten Phase wurde bei kantonalen Laboratorien sowie Kontroll-Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Umfrage durchgeführt, um abzuklären, welche Enzymaktivitätsmessungen von besonderem Interesse sind. Von total 230 verschickten Fragebögen wurden deren 63 beantwortet, wobei sich herausstellte, dass die Bestimmung der α-Amylase eindeutig am meisten erwünscht ist. In einer zweiten Phase versuchte die Arbeitsgruppe «Enzymaktivitätsbestimmungen» der SK 26 die Möglichkeiten zur Bestimmung der α-Amylaseaktivität zusammenzustellen und eine geeignete Methode zuhanden der Hauptkommission LMB vorzuschlagen. Im folgenden werden die verschiedenen Methoden vorgestellt und kurz erläutert.

Stärkeabbauende Enzyme

In Abbildung 1 sind die Angriffspunkte der drei wichtigsten stärkeabbauenden Enzyme schematisch dargestellt. Das Enzym α-Amylase (1,4-α-D-Glucan-Glucanohydrolase, E. C. 3.2.1.1.) katalysiert die Hydrolyse von α-1,4-Glucanen zu Maltose und höheren Oligomeren. Amylose wird zu Maltose und Maltotriose abgebaut, während Amylopektin zu Maltose, Maltotriose und sogenannten Grenzdextrinen gespalten wird. Die α-Amylase ist spezifisch für α-1,4-glycosidische Bindungen, kann die Verzweigungsstellen im Amylopektinmolekül (α-1,6-Bindungen) nicht spalten und baut die Polysaccharidketten statistisch ab. Es handelt sich also um ein Endoenzym. α-Amylasen sind sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in Mikroorganismen nachgewiesen und aus verschiedenen Quellen kristallin gewonnen worden. Im Gegensatz dazu spaltet das zweite stärkeabbauende Enzym, die β-Amylase, Maltose von nichtreduzierenden Enden der Polysaccha-

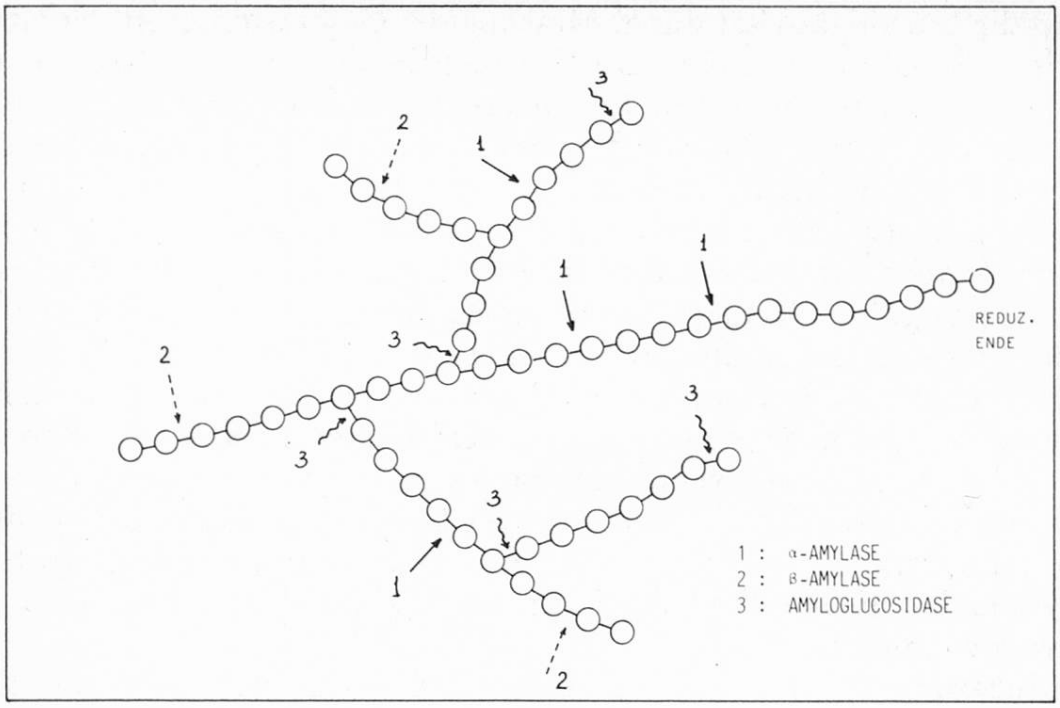

Abb. 1. Stärkeabbauende Enzyme
Angriffsstellen der verschiedenen Enzyme in einem Amylopektinmolekül (schematisch)

ridketten her ab. Die β-Amylase ist ein Exoenzym und ist ebenfalls spezifisch für α-1,4-Bindungen. Die Amyloglucosidase (Glucoamylase) ist ebenfalls ein Exoenzym, greift das Makromolekül von den nichtreduzierenden Enden an und spaltet Glucose ab. Im Gegensatz zur α- und β-Amylase greift dieses Enzym auch die α-1,6-Bindungen an, so dass durch die Wirkung der Amyloglucosidase ein vollständiger Abbau von Stärke zu Glucose möglich ist. Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, dass auch sogenannte «debranching enzymes» (z. B. die Pullulanase) bekannt sind, welche die Verzweigungsstellen im Amylopektinmolekül angreifen können. Diese Enzyme spielen aber in Lebensmitteln eine untergeordnete Rolle.

Methoden zur Bestimmung der α-Amylaseaktivität

Zur Bestimmung der α-Amylaseaktivität sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, welche sich in 5 Hauptklassen einteilen lassen:

- Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Gruppen
- Methoden, beruhend auf der Messung der Färbung des Iod-Stärke-Komplexes (amyloklastische Methoden)
- Methoden, beruhend auf der Messung der Farbintensität löslicher Hydrolyseprodukte von unlöslichen Stärkederivaten
- Methoden, beruhend auf der Messung der Farbintensität löslicher Hydrolyseprodukte von kurzkettigen, löslichen Stärkederivaten (meist oligomere Glucosederivate)

– Methoden, beruhend auf der Messung der Viscositätsabnahme von Stärkekleistern.

Innerhalb der einzelnen Methodengruppen sind verschiedene Variationen bekannt. In der Arbeit von *Marciniak* et al. (2) sind die verschiedenen Methoden zusammengefasst, deren Prinzipien beschrieben und auf die verwendeten Enzymeinheiten eingegangen. In der Lebensmittelindustrie werden zum Teil noch Methoden eingesetzt, welche nur die Bestimmung der Summe der stärkeabbauenden Enzymaktivitäten erlauben. Die Aktivität wird in diesen Fällen als diastatische Kraft in unterschiedlichen Einheiten angegeben (z. B. Grad Lintner, Grad Windisch-Kolbach, Grad Pollak-Egloffstein). *Bergmeyer* (3) gibt in der neuesten Ausgabe seiner Methodensammlung eine Reihe kolorimetrischer Methoden zur Bestimmung der α-Amylase an. Bergmeyers Angaben beziehen sich vorwiegend auf Methoden, die in der klinischen Chemie eingesetzt und nur nach Anpassung auf die Lebensmittelanalytik übertragen werden können.

Einige Fachgremien haben für ihre Methodensammlungen offizielle Bestimmungsmethoden für die α-Amylaseaktivität vorgeschlagen. So empfehlen sowohl die Association of Official Analytical Chemists (AOAC) als auch die American Association of Cereal Chemists (AACC) amyloklastische Methoden (4, 5), die Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK) schlägt als Referenzmethode eine von *Anderegg* et al. (6) beschriebene viscosimetrische Amylasebestimmung vor. In den letzten Jahren rückte auch im Lebensmittelbereich immer mehr eine, im klinischen Bereich seit langem erfolgreich eingesetzte Methode, der Phadebas-Test (7), als Methode der Wahl in den Vordergrund (8–10). Bei dieser Bestimmung handelt es sich um einen einfachen und raschen Test zur Ermittlung der α-Amylaseaktivität, der zur quantitativen Analyse der Enzymaktivität in Körperflüssigkeiten des Menschen entwickelt wurde. Ähnliche, auf dem gleichen Prinzip beruhende Test-Kits werden auch von anderen Herstellern angeboten (z. B. Amylochrom-Roche). Als Substrat für die Bestimmung der α-Amylase wird ein blau gefärbtes, durch Quervernetzung wasserunlöslich gemachtes Stärkepolymer eingesetzt. Dieses wird unter Mitwirkung des Enzyms zu wasserlöslichen blauen Fragmenten hydrolysiert, deren Farbintensität bei 620 nm im Photometer gemessen wird. Die Extinktion der blauen Lösung ist direkt von der Aktivität der α-Amylase in der untersuchten Probe abhängig. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich mit einer für jeden «Batch» Substrat vom Hersteller mitgelieferten Eichkurve. Bei den für Lebensmittel veröffentlichten Bestimmungen wurde, sofern möglich und bekannt, der eingesetzte Puffer dem pH-Optimum der betreffenden α-Amylase angepasst. Eine weitere, einfache Methode stellt der PNP-Test (PNP = p-Nitrophenol) dar, der ebenfalls für die klinische Chemie entwickelt wurde und heute als Alternative zum Phadebas-Test immer häufiger im Einsatz steht (11). Bei dieser Bestimmung wird als Substrat das Oligosaccharid p-Nitrophenylmaltoheptaosid eingesetzt, welches durch die α-Amylase unter anderem zu p-Nitrophenylmaltotriosid umgesetzt wird. Dieses Trisaccharidderivat wird in einem zweiten Schritt durch eine im Testsystem vorgegebene α-Glucosidase abgebaut, so dass PNP freigesetzt wird, welches im Photometer bei 405 nm quantitativ bestimmt werden kann. Diese beiden Methoden

scheinen besonders vorteilhaft zu sein, weil sie neben der einfachen Durchführbarkeit die Enzymaktivität direkt in internationalen Einheiten messen, so dass Quervergleiche von Resultaten zwischen verschiedenen Laboratorien im Prinzip möglich sein sollten.

Eigene Untersuchungen mit dem Phadebas- und dem PNP-Test

In einer ersten Phase wurde abgeklärt, ob der Phadebas-Test reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dazu wurde die α-Amylaseaktivität in einem Malzextrakt und in einem inländischen Honig bestimmt. Die erhaltenen Werte wichen bei einer Versuchszahl von zweimal 7 Bestimmungen an verschiedenen Tagen um ± 2% ab. Es darf also festgehalten werden, dass mit Hilfe des Phadebas-Tests gut reproduzierbare Resultate erhalten werden.

Mit dem gleichen Testsystem wurde anschliessend versucht, die α-Amylaseaktivität in einem Handelsenzympräparat (Fungamyl^R, Novo-Ferment AG, Basel) zu bestimmen. Dabei zeigte es sich, dass die mit Hilfe der firmeneigenen Methode (12) festgestellte Enzymaktivität nicht direkt mit den mit dem Phadebas-Test erhaltenen Resultaten vergleichbar ist. Die α-Amylaseaktivität eines bakteriellen Enzympräparates, Termamyl^R wurde von der Novo Industri, Kopenhagen, mit einem «massgeschneiderten» Phadebas-Test bestimmt (13). Um eine Korrelation zwischen den von der Novo Industri definierten KNU (Kilo Novo Units) und der Extinktion bei 620 nm (Phadebas-Test) zu erhalten, musste der pH-Wert der Phadebas-Inkubationsmischung auf das pH-Optimum der α-Amylase des Termamyls eingestellt werden. Dabei war zu beachten, dass die Anpassung des pH unbedingt mit dem pH-Meter kontrolliert wurde, die Zugabe von Pufferlösung mit dem optimalen pH-Wert reichte nicht aus, um die in den Phadebas-Tabletten enthaltenen Puffersalze umzupuffern. Zusätzlich war auch eine Zugabe von Ca^{2+}-Ionen in der für die Enzymwirkung optimalen Konzentration notwendig. Diese Resultate machen deutlich, dass es nur mit einem relativ grossen Aufwand möglich ist, Angaben, welche von einem Enzymproduzenten für das von ihm hergestellte Präparat publiziert wurden, mit Hilfe des Phadebas-Tests zu überprüfen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Calciumionen auf die Aktivität der α-Amylase abgeklärt. Es ist bekannt, dass Ca-Ionen als Aktivatoren die α-Amylaseaktivität erhöhen (14). Ein Ca-Ionen-Zusatz zum vorgeschriebenen Puffersystem für den Phadebas-Test beeinflusste die Ausbeute an α-Amylaseaktivität erheblich. Allfällig in einem Lebensmittelhomogenisat vorliegende Ca-Ionen verfälschen demnach die Bestimmung der α-Amylaseaktivität, sie müssten z. B. mit EDTA maskiert oder aber deren Konzentration bestimmt werden.

Die für einen Malzextrakt mit dem Phadebas-Test ermittelten α-Amylasewerte wurden mit dem PNP-Test überprüft. Dabei zeigte sich, dass die beiden Methoden nicht direkt vergleichbar sind, obwohl in beiden Fällen eine Angabe der Enzymaktivität in I. E. erfolgt. Dies ist auf die verschiedenen Substrate, Reaktionskinetik und die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zurückzuführen. Mit dem Phadebas-Test wurden 18,2 I. E., mit dem PNP-Test 23,4 I. E. α-Amylaseaktivität pro Liter Malzextrakt gefunden.

Schliesslich wurden Versuche durchgeführt, um abzuklären, ob allfällig in den untersuchten Proben vorhandene β-Amylaseaktivität die beiden Tests stört. Zu diesem Zwecke wurden sowohl der Phadebas- als auch der PNP-Test mit einer kristallinen β-Amylase (Calbiochem AG, Luzern) durchgeführt. In beiden Fällen zeigte es sich, dass die Testsysteme stark mit β-Amylase reagieren, d. h. dass diese Tests nicht nur die α-, sondern auch die β-Amylaseaktivität einer Enzymquelle miterfassen. Es ist klar, dass die Hersteller dieser Enzymkits diesem Umstand nicht Rechnung tragen, wurden doch beide Verfahren für die Bestimmung der α-Amylase in menschlichen Körperflüssigkeiten entwickelt, wo mit Sicherheit keine β-Amylaseaktivität vorhanden ist. Es ist aber interessant festzustellen, dass der Phadebas-Test von verschiedenen Arbeitsgruppen auch für die α-Amylaseaktivitätsbestimmung in Lebensmitteln eingesetzt wird, ohne deren Störung durch die β-Amylase zu berücksichtigen. In einzelnen Publikationen wird zwar auf eine Störung des Tests durch β-Amylase hingewiesen (15, 16), in anderen Artikeln wird allerdings ausdrücklich festgehalten, dass dieses Enzym den Test nicht stört (z. B. 17). Es wird zudem, vor allem in Arbeiten, die sich mit der amylolytischen Aktivität von Getreidekörnern und -mehlen beschäftigen, darauf hingewiesen, dass die α-Amylase wesentlich hitzestabiler ist als die β-Amylase, so dass durch Erhitzen des zu untersuchenden Materials eine differenzierte Bestimmung dieser beiden stärkeabbauenden Enzyme möglich wird (15). Es ist aber nirgends abgeklärt worden, inwieweit durch diese Hitzebehandlung auch die α-Amylase geschädigt und somit nur eine Restaktivität gemessen wird.

Schlussfolgerungen

Die in eigenen Versuchen mit dem Phadebas- und dem PNP-Test erhaltenen Resultate haben deutlich aufgezeigt, dass diese beiden Methoden nicht nur die α-Amylase-, sondern auch die β-Amylaseaktivität einer Enzymquelle (Lebensmittel oder Enzympräparat) miterfassen. Die Anwendung dieser Schnelltests darf demnach in der Lebensmittelanalytik nicht ohne weiteres empfohlen werden. Es muss dem Analytiker ganz klar bewusst sein, dass mit diesen beiden Methoden nur die Summe der amylolytischen Enzymaktivitäten eines Lebensmittels oder eines Enzympräparates gemessen wird, d. h. es wird die früher als «diastatische Kraft» bezeichnete Enzymaktivität gemessen. *Bogdanov* (9) hat in seiner Arbeit über die Honig-α-Amylase die Zusammenhänge zwischen Phadebas-Test und Messung der diastatischen Kraft sehr schön aufgezeichnet. Ein potentieller Anwender dieser beiden Methoden muss in erster Linie abklären, was er mit einer Aktivitätsbestimmung bezweckt. Interessiert ihn primär der Abbau von Stärke durch die im Lebensmittel vorhandenen Stärkeenzyme, eignen sich sowohl der Phadebas-Test als auch der PNP-Test ausgezeichnet, sofern konsequent mit der einen oder der anderen Methode gearbeitet wird. Beide Methoden sind einfach durchzuführen und ergeben gut reproduzierbare Ergebnisse. In jedem Falle müssen aber sowohl der pH, als auch die Ca^{2+}-Ionen-Konzentration auf das Untersuchungsmaterial angepasst werden. Soll aber spezifisch die α-Amylaseaktivität eines Lebensmittels oder eines Enzympräparates bestimmt werden, müssen alter-

native Methoden, z. B. die viscosimetrische Bestimmung der α-Amylaseaktivität (6), gekoppelt mit der Bestimmung der Zunahme der reduzierenden Endgruppen (18), eingesetzt werden.

Dank

Die Autoren (Arbeitsgruppe «Enzymaktivitätsbestimmungen» der SK 26) danken den beiden Firmen Pharmacia-pdf-AG (Dübendorf, Schweiz) und Boehringer Mannheim (Rotkreuz, Schweiz) für die Überlassung mehrerer Enzymkits. Den Mitgliedern der Subkommission «Enzymatische Bestimmungen» des LMB danken wir für die kritischen und anregenden Diskussionen. Schliesslich gilt unser Dank auch Herrn *M. Perren*, der die praktischen Arbeiten mit grossem Fleiss und Sachverständnis ausgeführt hat.

Zusammenfassung

Am Beispiel der α-Amylasebestimmung wird auf die Probleme der Enzymaktivitätsmessungen in Lebensmitteln hingewiesen. Die mit unterschiedlichen Methoden erhaltenen Resultate sind kaum vergleichbar, weil die festgelegten Enzymeinheiten verschieden definiert sind. Bei einigen Verfahren werden neben der α-Amylase auch andere, allenfalls vorliegende stärkeabbauende Enzyme miterfasst, so dass keine spezifische Bestimmung der α-Amylase möglich ist. Der Einfluss verschiedener Faktoren sowie die Spezifität des Phadebas- und des PNP-Tests werden ebenfalls besprochen.

Résumé

La détermination de l'activité de l'α-amylase a été choisie pour démontrer les problèmes qu'implique la mesure des activités enzymatiques dans des denrées alimentaires. Les résultats obtenus par les diverses méthodes ne sont presque jamais comparables, étant donné les différentes unités d'activité enzymatique appliquées. Dans certaines méthodes, l'activité d'autres enzymes amylolytiques interfère avec celle de l'α-amylase, le résultat obtenu représentant alors la somme de ces activités. L'influence de divers facteurs sur les tests Phadebas et PNP est également discutée.

Summary

The determination of the α-amylase activity has been chosen as an example to show the problems encountered in the measurement of enzyme activities in food. The results obtained with different methods are hardly comparable, due to the different enzyme units used for the different methods. Some of the α-amylase methods are not specific for this enzyme, other amylolytic activities present in the food sample interfere, in order to allow only the determination of the sum of starch degrading enzyme activities. The influence of different factors on the Phadebas- and PNP-test systems are briefly discussed.

Literatur

1. Schweiz. Lebensmittelbuch, Band 2, Kapitel 61A, S. 8. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1981.
2. *Marciniak, G. P.* und *Kula, M. R.:* Vergleichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller α-Amylasen. Stärke **34**, 422–430 (1982).
3. *Bergmeyer, H. U.:* Methods of enzymatic analysis, 3rd. Ed., Vol. IV, S. 146–177. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1984.
4. AOAC Official Methods Nr. 10.107–10.110.
5. AACC Official Method Nr. 22–01.
6. *Anderegg, P., Schur, F.* und *Pfenninger, H.:* Bestimmung der α-Amylaseaktivität in Cerealien und mikrobiellen Enzympräparaten. Schweiz. Brauerei Rundsch. **87**, 239–248 (1976).
7. Phadebas-Test, Arbeitsanleitung der Fa. Pharmacia AB, Uppsala (Schweden) 1979.
8. *Siegenthaler, U.:* Bestimmung der α-Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 393–399 (1975).
9. *Bogdanov, S.:* Honigdiastase: Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **75**, 214–220 (1984).
10. *Mathewson, P. R.* and *Pomeranz, Y.:* Modified chromogenic α-amylase assay for sprouted wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 198–200 (1979).
11. *Rauscher, E., von Bülow, S.* and *Haegele, E.-O.:* Optimized determination of α-amylase in serum and urine using p-nitrophenyl-α, D-maltoheptaoside as substrate. Fresenius Z. Anal. Chem. **311**, 454 (1982).
12. Interne Arbeitsvorschrift Novo-Industri, Kopenhagen, Dänemark.
13. Persönliche Mitteilung Zentrallaboratorium Novo-Industri, Kopenhagen, Dänemark.
14. *Whitaker, J. R.:* In: Principles of enzymology for the foods sciences, p. 447–450. Marcel Dekker Inc., New York 1972.
15. *Barnes, W.-C.* and *Blakeney, A. B.:* Determination of cereal α-amylase using a commercially available dye-labelled substrate. Stärke **26**, 193–197 (1974).
16. *Párkány-Gyárfás, A.* and *Vámos-Vigyázó, L.:* Determination of amylase activity in corn using a chromogenic substrate. Stärke **31**, 328–332 (1979).
17. *Fuller, P.:* Rapid sorting test for α-amylase activity in home grown wheat. Milling **154**, 29–30 (1972).
18. *Lever, M.:* A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. **47**, 273–279 (1972).

M. Ugrinovits
Wander AG
FEN-Zentralanalytik
CH-3176 Neuenegg

Prof. Dr. R. Amadò
Institut für Lebensmittelwissenschaft
Eidg. Technische Hochschule
ETH-Zentrum
CH-8092 Zürich

Dr. J.-C. Villettaz
Novo Ferment (Schweiz) AG
Vogesenstrasse 132
CH-4056 Basel 13

H.-R. Steffen
Boehringer Mannheim (Schweiz) AG
Industriestrasse
CH-6343 Rotkreuz