Honigdiastase : Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden = Honey diastase : comparison of different methods for activity determination

Autor(en): **Bogdanov, S.**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **75 (1984)**

Heft 2

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982709

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. 75, 214–220 (1984)
Eingegangen 17. April 1984. Angenommen 30. April 1984

Honigdiastase: Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden

Honey Diastase: Comparison of Different Methods for Activity Determination

S. Bogdanov
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld

Einleitung

Die Aktivität der Honigdiastase (α-Amylase) ist neben dem Gehalt an Hydroxymethylfurfural (HMF) das am häufigsten bestimmte Qualitätskriterium für Naturbelassenheit des Honigs. Die alten Methoden, die auf der Messung der Stärkehydrolyse beruhen (1, 2, 3), sind sehr arbeitsaufwendig, zudem hängt das Resultat von der verwendeten Stärke ab (1, 2), was wohl der Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit in einem kürzlich durchgeführten Ringversuch war (4). Die Bestimmung der α-Amylaseaktivität mit künstlichen Substraten hat sich bei klinischen Analysen schon seit längerer Zeit durchgesetzt. Zwei dieser Methoden wurden auch für die Bestimmung der Honigdiastase vorgeschlagen (5, 6). *Ewards* (5) benützte den Amylochlor-Test und *Siegenthaler* (6) den Phadebas-Test: Beide beruhen auf dem Abbau eines künstlichen blauen Substrates. Die Amylochrom-Methode hat sich jedoch seit der Untersuchung von Edwards geändert, so daß man seine Resultate nicht mehr mit den Resultaten im heutigen Test vergleichen kann. Die für den Phadebas-Test verwendeten Tabletten sind in ihrer ursprünglichen Zusammensetzung verändert worden: Seit 5 Jahren enthalten sie zusätzlich Rinderserumalbumin. Es ist also notwendig, die Korrelationen zwischen diesen beiden Tests mit der Diastasezahl experimentell neu zu bestimmen. In letzter Zeit gibt es im Handel neue kinetische Tests für die Bestimmung der α-Amylase in der Klinik. Sie beruhen auf der Spaltung von p-Nitrophenylmalto-pentaosid und -hexaosid (Behring-Höchst-Test nach Referenz 7.) oder von p-Nitrophenylmaltoheptaosid (Böhringer-Test, Referenz 8.). Die in diesen Tests vorhandene α-Glukosidase setzt p-Nitrophenol frei, das bei 405 nm im Spektrophotometer gemessen wird. Der Vorteil dieser Methoden liegt in ihrer Schnelligkeit: Der bei den Amylochrom- und Phadebas-Tests notwendige Filtrationsschritt ist nicht mehr nötig.

In der vorliegenden Arbeit verglichen wir die Phadebas-, die Amylochrom- sowie 2 kinetische Methoden mit der Diastasebestimmung nach der klassischen

Stärkeabbaumethode. Dabei verwendeten wir die kinetische Methode von *Zürcher* und *Hadorn* (2), die die gleichen Resultate liefert wie die im Schweizerischen Lebensmittelbuch beschriebene Methode (3). Diese Methode wurde auch bei der Untersuchung von *Siegenthaler* (6) angewendet.

Material

Stärkeabbautest nach Zürcher und Hadorn

Die gleiche Stärke, die *Zürcher* und *Hadorn* (2) sowie *Siegenthaler* (6) benutzten, wurde auch von uns verwendet: Noredux-Standard (Siegfried, Zofingen).

α-Amylase-Tests

Alle α-Amylase-Tests sind im Handel in gebrauchsfertiger Form erhältlich:
Amylochrom (Hoffmann-La Roche, Basel)
Phadebas (Pharmacia Diagnostics, Dübendorf)
α-Amylase PNP (Böhringer-Mannheim, Rotkreuz)
α-Amylase Testomar (Behring-Höchst Pharma, Zürich).

Methoden

Bei den Phadebas- und Amylochrom-Methoden wurde zum besseren Vergleich mit den vorangegangenen Arbeiten (2, 6) 40 °C als Inkubationstemperatur gewählt. Bei den kinetischen Methoden wurde jedoch 37 °C gewählt, weil viele moderne Photometer für Kinetikmessungen mit Temperatureinstellung von 37 °C ausgerüstet sind. Die Aktivität der Amylase bei dieser Temperatur ist nur wenig kleiner als bei 40 °C.

Phadebas-Methode

Der gleiche Ansatz wie bei *Siegenthaler* (6), wurde verwendet: 1%ige Honiglösung (Gew./Vol.) in 0,1 *n* Na-Acetat-Puffer pH 5,2. 5 ml davon in Reagenzglas mindestens 5 Minuten bei 40 °C vorwärmen. Gleichzeitig 5 ml Acetatpuffer als Blindprobe unter gleichen Bedingungen ansetzen. Mit Pinzette in jedes Röhrchen eine Phadebas-Tablette werfen, 10 Sekunden auf Vibrator mischen und weiter inkubieren. Nach genau 15 Minuten Reaktion durch Zugabe von 1 ml 0,5 *n* NaOH sistieren. Reaktionsgemisch filtrieren und Probenfiltrat gegen Blindprobenfiltrat bei 620 nm messen.

Amylochrom-Methode

2 ml 1%ige Honiglösung in 0,1 *n* Na-Acetat pH 5,2 und 2 ml Acetatpuffer (Blindprobe) mindestens 5 Minuten bei 40 °C vorwärmen. Amylochrom-Tablette mit einer Pinzette in jedes Röhrchen werfen, 10 Sekunden auf Vibrator mischen und weiter inkubieren. Nach 15 Minuten durch Zugabe von 4 ml Verdünnungspuffer (enthalten im Test) Reaktion sistieren und Gemisch filtrieren. Probenfiltrat gegen Blindprobenfiltrat bei 642 nm messen.

Kinetische Methoden

Reagenz nach Vorschrift der Hersteller (Böhringer und Behring-Höchst) vorbereiten. 1 ml Reagenz mindestens 5 Minuten bei 37 °C in Mikroküvette vorwärmen. 100 μl 20%ige wässerige Honiglösung zugeben, Küvette mit Stopfen schließen und gut mischen. Im bei 37 °C temperierten Küvettenhalter des Spektrophotometers die Extinktion bei 495 nm verfolgen. Nach der «Lag»-Phase (ca. 5 Minuten) folgt während 10–15 Minuten die lineare Zunahme der Extinktion. Während dieser linearen Phase die Extinktionsänderung pro 10 Minuten ablesen oder berechnen.

Resultate und Diskussion

In Tabelle 1 sind die Resultate der vergleichenden Messungen an 10 Honigen unterschiedlicher Herkunft mit 5 verschiedenen Methoden wiedergegeben. In Tabelle 2 sind die Meßparameter der 4 modernen Amylase-Bestimmungsmethoden mit der Diastasezahl korreliert (lineare Regression).

Vergleichen wir zuerst die Phadebas- und die Amylochrom-Methoden, weil bei beiden Methoden ähnliche Substrate benützt werden und beide als «2-Punkt-Methoden» zu bezeichnen sind. Die Phadebas-Methode ist bei den gleichen Versuchsbedingungen fast dreimal empfindlicher und korreliert etwas besser mit der Diastasezahl. Bei Bestimmungen von pflanzlicher α-Amylase sind beide Methoden gleich empfindlich (9). Vergleicht man die von uns erhaltene Korrelation zwischen Diastasezahl und Extinktion bei 620 nm mit der von Siegenthaler (6) erhaltenen, so zeigen sich folgende Unterschiede: Nach unserer Formel erhalten wir bei Honig Nr. 1 8%, bei Honig Nr. 10 31% niedrigere Diastasezahlen als nach der Formel von Siegenthaler. Dieser Unterschied ist wohl mit dem Vorhandensein von Albumin in den Substrattabletten zu erklären. Nach Angaben der Firma Pharmacia erhält man mit den neuen Tabletten um 10–15% niedrigere Werte. *Edwards* (5) verwendete bei seinem Amylochrom-Test Phosphatpuffer in volumenmäßig gleichem Ansatz wie wir in dieser Arbeit und stoppte die Reaktion mit der Zugabe von 8 ml Verdünnungspuffer. Weil bekannt ist, daß Phosphat die Honigamylaseaktivität hemmt, verwendeten wir Acetatpuffer, der für die Amylaseaktivität optimal sein soll (6). Wir reduzierten das Volumen des Verdünnungspuffers auf die Hälfte,weilVorversuchezeigten,daßman mit 4 ml die Reaktion auch abstoppen kann.

Tabelle 1. Honigdiastase: Vergleich von 5 verschiedenen Methoden (Mittelwerte aus zwei verschiedenen Versuchen)

Honig Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Methode	Meßparameter										
Stärkeabbau	Diastasezahl	4,5	5,0	6,8	12,0	12,7	18,8	22,5	24,9	25,6	31,7
Phadebas	E_{620}	0,11	0,22	0,28	0,46	0,48	0,66	0,87	1,08	1,09	1,17
Amylochrom	E_{642}	0,07	0,10	0,22	0,21	0,21	0,28	0,32	0,35	0,40	0,51
Kinetik Bö	Δ E/10 min	0,04	0,07	0,07	0,12	0,10	0,14	0,15	0,15	0,17	0,18
Kinetik Be	Δ E/10 min	0,06	0,09	0,14	0,19	0,20	0,25	0,27	0,27	0,30	0,28

Kinetik Bö: Kinetikmethode Böhringer
Kinetik Be: Kinetikmethode Behring-Höchst

Honigproben:

1. Orangenblüten Ausland (enzymarm)
2. Sonnenblumenhonig Ausland
3. Blütenhonig Ausland (überhitzt)
4. Alpenrosenhonig Schweiz
5. Zuckerfütterungshonig
6. Honigtauhonig Schweiz
7. Blütenhonig Schweiz
8. Rapshonig Schweiz
9. Honigtauhonig Schweiz
10. Honigtauhonig Schweiz

Tabelle 2. Korrelation zwischen Diastasezahl und Meßparametern von Diastasebestimmungen mit künstlichen Substraten: Lineare Regression mit y = Diastasezahl und x = Meßparameter der verschiedenen Methoden aus Tabelle 1. r = Korrelationskoeffizient

Methode	Meßparameter (x)	Diastasezahl (y)	r
Phadebas	E_{620}	24,24.x + 0,69	0,99
Amylochrom	E_{642}	68,74.x − 2,10	0,96
Kinetik Bö	Δ E/10 min	194,00.x − 6,84	0,96
Kinetik Be	Δ E/10 min	105,46.x − 5,37	0,93

Die Extinktionsänderung pro 10 Minuten, gemessen mit beiden kinetischen Methoden (Tabelle 1) korrelliert gut mit der Diastasezahl (Tabelle 2). Dabei ist der Test der Firma Behring etwa doppelt so empfindlich wie jener von Böhringer.

Die kinetischen Methoden haben folgende Vorteile gegenüber den «2-Punkt-Methoden»: Der Filtrationsschritt ist nicht mehr nötig, es ist auch kein Blindversuch notwendig. Somit ist der Zeitaufwand dieser Methoden nur ungefähr halb so groß. Der Nachteil liegt im höheren Preis und in der kürzeren Haltbarkeit der Tests. Die verwendeten künstlichen Substrate (p-Nitrophenylmalto, -penta, -hexa- und -heptaosid) sind im Handel auch separat erhältlich, so daß man das Reagenz selber nach Bedarf herstellen kann. Sogar dann ist eine Bestimmung mit der kinetischen Methode heute doppelt so teuer wie eine Bestimmung mit der Phadebas- oder mit der Amylochrom-Methode. Ein weiterer Nachteil liegt auch darin, daß das Spektralphotometer für Enzymkinetik eingerichtet sein muß (temperierbarer Küvettenhalter und Schreiber oder Kinetiksoftware für Direktberechnung der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit).

Alle 4 Tests können nur mit Hilfe der in Tabelle 2 angegebenen Umrechnungsformeln für die Bestimmung der Diastasezahl verwendet werden.

Wir geben im Moment der Phadebas-Methode aus folgenden Gründen den Vorzug:

1. Die Diastaseaktivität, bestimmt mit dem Phadebas-Test, korreliert am besten mit der Diastasezahl und ist bei den verwendeten Ansätzen der empfindlichste Test (zeigt die größte Extinktionsänderung bei den verwendeten Inkubationsansätzen).
2. Der in dieser Arbeit verwendete Phadebas-Test wurde in der von *Siegenthaler* (6) vorgeschlagenen Form benutzt. Laboratorien, die diesen Test benützen, müßten nur eine andere Umrechnungsformel verwenden.
3. Die Phadebas-Methode kann auch in Laboratorien mit weniger modernen Photometern kostengünstig und schnell durchgeführt werden. Dabei hat das Präparat eine relativ lange Verfallsfrist (2,5 bis 3 Jahre), so daß der Test besonders bei der Lebensmittelkontrolle, wo nur wenige Honige pro Jahr untersucht werden müssen, kostensparend ist.

Bei einer allfälligen Revision des Kapitels Honig im Lebensmittelbuch sollten alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden aufgenommen werden. Die einfachste der klassischen Stärkeabbaumethoden ist wohl die in dieser Arbeit verwendete Methode von *Zürcher* und *Hadorn* (2). Die Aufnahme der modernen Diastase-Bestimmungsmethoden ist wegen ihrer Schnelligkeit und Einfachheit zu rechtfertigen. Es ist besser, sich auf verschiedene Methoden mit künstlichen Substraten abzustützen, da ihre Verfügbarkeit im Handel von Ihrer Anwendung in der Klinik abhängig ist.

Dank

Für die zuverlässige technische Mithilfe von *Marc Bourquin* sei herzlich gedankt.

Zusammenfassung

Die α-Amylaseaktivität im Honig wurde mit 4 verschiedenen im Handel erhältlichen Tests bestimmt. Diese Methoden beruhen auf der Umsetzung mit künstlichen Substraten, wobei farbige Reaktionsprodukte freigesetzt werden. Alle Methoden liefern Meßwerte, die gut mit der Diastasezahl korrelieren: Die Korrelationskoeffizienten r variieren von 0,93 bis 0,99. Mit einer einfachen Formel, die mit Hilfe einer linearen Regression berechnet wurde, läßt sich aus dem entsprechenden Meßparameter die Diastasezahl berechnen.

Résumé

L'activité de l'α-amylase dans le miel a été déterminée par 4 tests disponibles dans le commerce. Ces méthodes sont basées sur la réaction de l'α-amylase avec des substrats artificiels et formation de produits colorés. Toutes les méthodes donnent des valeurs en bonne corrélation avec l'indice diastasique: le coefficient de corrélation r varie de 0,93 à 0,99. A l'aide d'une formule simple, obtenue à partir de la droite de régression, on peut calculer l'indice diastasique.

Summary

The α-amylase activity in honey was determined with 4 different, commercially available tests. They are based on the reaction of α-amylase with artificial substrates, whereby coloured reaction products are liberated. All of these methods yield values, which correlate well with the diastase number: the correlation coefficient varies from 0.93 to 0.99. With the help of a simple formula, derived by a linear regression, one can calculate the diastase number.

Literatur

1. *Hadorn, H.:* Zur Problematik der quantitativen Diastasebestimmung im Honig. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **52**, 67–103 (1961).
2. *Zürcher, K.* und *Hadorn, H.:* Eine einfache kinetische Methode zur Bestimmung der Diastase in Honig. Deut. Lebensm. Rundschau **68**, 209–216 (1972).

3. *Hadorn, H.* und *Zürcher. K.:* Erfahrungen mit einer neuen kinetischen Methode zur Bestimmung der Diastasezahl in Honig und über Eigenschaften der Honig-Diastase. Apidologie **4**, 65–80 (1973).
4. *Dustman, J,. van Praag, J.* und *Bote, K.:* Zur Bestimmung von Diastase, Invertase und HMF in Honig. Manuskript unterbreitet zur Veröffentlichung in Apidologie (1984).
5. *Edwards, R. A., Faraji-Haremi, R.* and *Wooton, M.:* A rapid method for determining the diastase activity in honey. J. Apic. Res. **14**, 47–50 (1975).
6. *Siegenthaler, U.:* Bestimmung der Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 393–399 (1975).
7. *Wallenfels, K., Foldi, P., Nierman, H.* and *Bender, H.:* The enzymatic synthesis, by transglucosylation of a homologous series of glycosidically substituted malto-oligosaccharides, and their use as amylase substrates. Carbohydr. Res. **61**, 359–368 (1978).
8. *Rauscher, E., von Buelow, S., Neumann, U.* and *Schaich, E.:* Determination of the activity of amylase by continous monitoring with p-nitrophenylmaltohepaosid as substrate. Ber. Oester. Ges. Klin. Chem. **4**, 150 (1981).
9. *Mathewson, P. R.* and *Pomeranz, Y.:* Modified chromogenic amylase assay for sprouted wheat. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 198–200 (1979).

Dr. S. Bogdanov
Sektion Bienen
Eidg. Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld