

Bestimmung der -Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat

Autor(en): **Siegenthaler, U.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **66 (1975)**

Heft 4

PDF erstellt am: **10.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982680>

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.

Bestimmung der α -Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat

U. Siegenthaler

Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Sektion Bienen, Liebefeld-Bern

Einleitung

Von den im Bienenhonig vorkommenden Enzymen wird die Amylase (Diastase) wohl am häufigsten quantitativ bestimmt, um Honige auf Naturbelassenheit oder unzulässige Erwärmung zu prüfen. Im Prinzip beruhen alle Bestimmungen der α -Amylase auf der Erfassung der durch dieses Enzym bewirkten Stärkehydrolyse. *Hadorn* (1) gibt eine ausführliche Diskussion der verschiedenen klassischen Methoden. *Zürcher* und *Hadorn* (2) haben auch eine neue, kinetische Methode zur Bestimmung der Diastasezahl entwickelt und über ihre Erfahrungen damit berichtet (3).

Alle diese Methoden bedingen die recht arbeitsaufwendige Herstellung vieler Lösungen mit genau bekanntem Gehalt und eine gewisse Routine für die Durchführung der Versuche.

Edwards et al. (4) bestimmten erstmals mit einem Amylase-Diagnostik-Kit die Diastasezahlen von sechs australischen Honigen und verglichen diese mit den entsprechenden Werten nach der Methode von *Schade* et al. (5). *Ceska* et al. (6) entwickelten 1969 ein mit 1,4-Butandiol diglycidäther quervernetztes Perlpolymersat aus löslicher Kartoffelstärke, an welches blaue Farbstoffgruppen kovalent gebunden sind. Dieses neue Enzymsubstrat quillt in Wasser auf, bleibt aber unlöslich; durch α -Amylase wird es hydrolysiert, wobei die farbmarkierten Fragmente in Lösung gehen und nach Abfiltrieren vom Substratüberschuß photometrisch erfaßt werden können.

Dieses Substrat wird von Pharmacia AB, Uppsala, Schweden, hergestellt und ist als Phadebas®-Amylase-Test im Handel erhältlich. Jede Testtablette enthält 45 mg Stärkepolymer und 25 mg Puffersalze in trocken gepreßter Form. Die Salze ergeben mit 4 ml Wasser 0,02 n Phosphatpuffer pH 7 und 0,05 n NaCl-Lösung (die Tablette wird hauptsächlich zur Bestimmung der α -Amylase in Serum und Urin verwendet und ist daher auf das pH-Optimum der Serumamylase abgepuffert).

Phadebas®-Amylase-Test wird in neueren Arbeiten (7, 8) zur Untersuchung von Getreideprodukten eingesetzt; es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Verwendungsmöglichkeit des Tests zur raschen und einfachen Bestimmung der Honigamylase zu untersuchen. Da nach *Hadorn* (2, 3) die Honigamylase ein von der Serumamylase verschiedenes pH- und Temperaturoptimum aufweist, erschien es ferner angezeigt, optimale Bedingungen mit der Phadebas®-Tablette zu eruieren und den Einfluß der verwendeten Pufferlösungen auf die Enzymaktivität abzuklären.

Untersuchungsmaterial

Phadebas®-Amylase-Test wird in der Schweiz von Opopharma AG, Zürich, vertrieben. Acetatpuffer 0,1 n, Trismaleatpuffer 0,2 n, Citratpuffer 0,2 n und Phosphatpuffer 0,2 n nach Angaben in (9).

Die untersuchten Honige sind z. T. der Forschungsanstalt Liebefeld eingesandte Honigproben oder wurden in anstaltseigenen Bienenständen produziert.

Phadebas®-Methode

1,00 g Honig werden in 0,1 n Acetatpuffer pH 5,2 (10,45 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 1,32 \text{ ml}$ Eisessig, H_2O ad 1000 ml) gelöst und im Meßkolben auf 100 ml verdünnt. Diese Lösung bildet mit den Puffersalzen der Testtablette einen Puffer mit dem pH-Wert 5,4; sie ist nicht lange haltbar (Aufbewahrung bei Raumtemperatur ergibt einen Aktivitätsverlust der α -Amylase von etwa 2% der Anfangsaktivität pro Tag).

5 ml dieser Honiglösung werden in ein Zentrifugenglas pipettiert und während 5 Minuten im Wasserbad bei 40°C vorgewärmt. Gleichzeitig wird eine Blindprobe aus 5 ml Acetatpuffer 0,1 n pH 5,2 unter gleichen Bedingungen angesetzt. Nun wirft man mit einer Pinzette in jedes Röhrchen eine Phadebas®-Tablette, mischt 10 Sekunden auf einem Vibrator und inkubiert die Röhrchen bei 40°C. Genau 15 Minuten nach dem Einwerfen der Tablette wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 1,0 ml 0,5 n NaOH gestoppt. Das Reaktionsgemisch kann direkt in 1-cm-Küvetten filtriert und die Extinktion bei 620 nm gegen die Blindprobe gemessen werden.

Berechnung der Resultate

Die α -Amylaseaktivität in U/kg Honig (von der International Union of Biochemistry empfohlene Standardeinheit) kann aus der Eichkurve, welche jeder Phadebas®-Packung beiliegt, berechnet werden. Da die Eichkurve für einen Testansatz von 0,2 ml Serum gilt, muß der gefundene Wert mit 4,615 multipliziert werden (eingesetzt werden 5,0 ml Lösung, welche 50 mg Honig enthalten, anstelle von 4 ml Wasser + 0,2 ml Serum. Am Schluß der Enzymreaktion wird je

1,0 ml 0,5 n NaOH zugegeben; die Volumina betragen somit $5 + 1 = 6$ ml für die Honig-Meßlösung und $4,2 + 1 = 5,2$ ml für den Serumansatz). Die Umrechnungsformel lautet somit:

$$\frac{U}{\text{Liter}} \text{ (aus Eichkurve)} \cdot \frac{6,0}{5,2} \cdot \frac{200}{50} =$$

$$\frac{U}{\text{Liter}} \text{ (aus Eichkurve)} \cdot 4,615 = U/\text{kg Honig} \quad [1]$$

Bemerkung: Die nach [1] gefundenen Werte in U/kg sind als Näherungswerte zu verstehen, da sich je nach Amylasepräparat eine andere Eichkurve ergeben kann; zudem wird nach der oben gegebenen Arbeitsvorschrift die Bestimmung bei um 3°C höherer Temperatur durchgeführt als Serumamylasebestimmungen. O'Donnell (10) hat ferner gefunden, daß auch ein Vorhandensein anderer Proteine in der Substratsuspension einen gewissen Einfluß auf die α -Amylaseaktivität ausüben kann.

Abbildung 1 zeigt die Korrelation der Extinktion bei 620 nm nach der Phadebas[®]-Methode mit den entsprechenden Diastasezahlen (DZ) nach der Methode von Zürcher und Hadorn (2). Sie ist linear von DZ 3,3 bis (theoretisch)

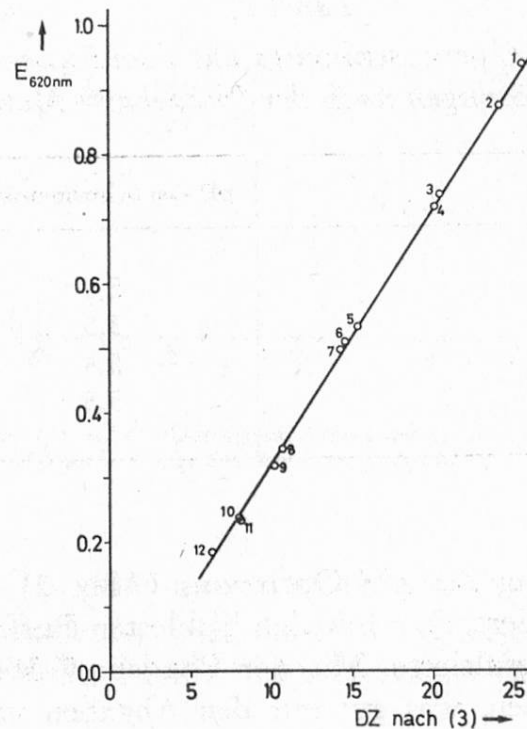


Abb. 1. Korrelation der Extinktion bei 620 nm nach der Phadebas[®]-Methode mit der Diastasezahl nach Zürcher und Hadorn (2).

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1 = Alpenrosenhonig Susten 1974 | 7 = Zuckerfütterungshonig 1972 |
| 2 = Blüten-/Honigtauhonig Ajoie | 8 = Blüten-/Honigtauhonig Jugoslawien |
| 3 = Alpenrosenhonig Wallis | 9 = Alpenrosenhonig Susten 1973 |
| 4 = Honigtauhonig Schweiz 1974 | 10 = Honigtauhonig Frankreich |
| 5 = Blütenhonig Mexiko | 11 = Blütenhonig USA (Portionenpackung) |
| 6 = Kastanienhonig Tessin | 12 = Blütenhonig Kärntner Alpen |

DZ 250. Aus den durchgeführten Analysen ergibt sich die empirische Umrechnungsformel [2]

$$DZ = 2,08 + 25,13 \cdot E_{620 \text{ nm}} \quad [2]$$

Die Standardabweichungen betragen für die Steigung der Geraden 0,24 und für den Abszissenabschnitt 0,04.

Die Reproduzierbarkeit der Phadebas®-Methode ist gut (Standardabweichung von 25 Einzelbestimmungen = 4,4%).

Abhängigkeit der Phadebas®-Methode von Pufferzusammensetzung, Temperatur und pH-Wert

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 2 ersichtlich ist, ergeben sich bei der α -Amylasebestimmung eines Honigs in verschiedenen Pufferlösungen signifikante Unterschiede; da es sich bei den α -Amylasen um Calciummetalloproteine handelt, ist die Ursache dafür wahrscheinlich in der Entfernung von Calciumionen durch Komplexbildung in Phosphat- oder Citratpufferlösungen zu suchen.

Tabelle 1

α -Amylaseaktivität eines Alpenrosenhonigs aus dem Sustengebiet in verschiedenen Pufferlösungen nach der Phadebas®-Methode

Puffer	pH Reaktionsgemisch	Aktivität (U/kg)
Acetatpuffer 0,1 n	5,6	3 093
Trismaleatpuffer 0,2 n	5,5	2 994
Citratpuffer 0,2 n	5,4	2 195
Phosphatpuffer 0,2 n	5,5	1 974

Die für die Ermittlung des pH-Optimums (Abb. 2) verwendeten Pufferlösungen wurden so konzipiert, daß mit den Tabletten-Puffersalzen ein Puffer mit gewünschtem pH-Wert resultierte. Mit der Phadebas®-Methode wurde ein pH-Optimum von 5,4 gefunden, was gut mit den Angaben von *Hadorn* (1, 3) übereinstimmt.

Die Abhängigkeit der α -Amylaseaktivität von der Inkubationstemperatur ist in Abbildung 3 wiedergegeben; bei 45°C erreicht die Aktivität den größten Wert und sinkt oberhalb 50°C rasch ab. Da alle älteren Bestimmungsmethoden bei 40°C durchzuführen sind, wurde diese Temperatur aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit auch in die wiedergegebene Arbeitsvorschrift aufgenommen.

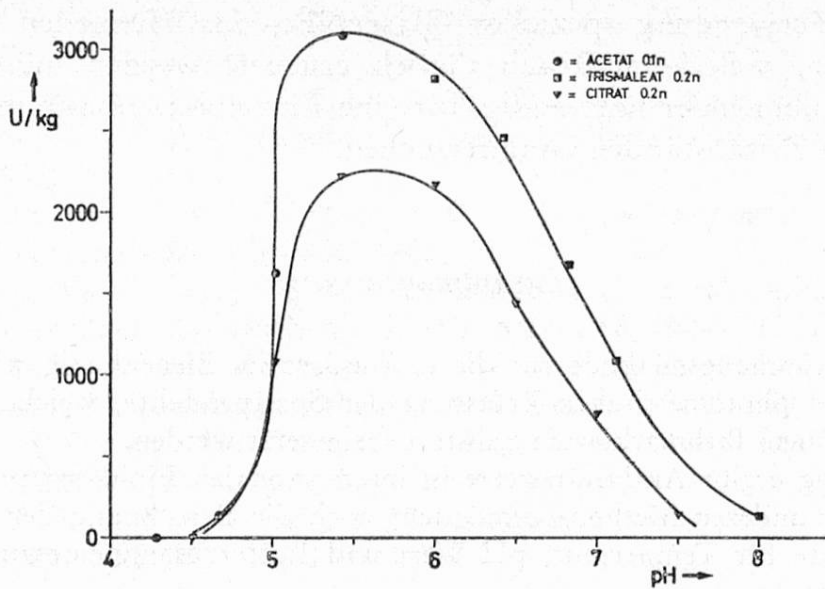


Abb. 2. pH-Optimum der α -Amylase eines Blütenhonigs aus dem Genferseegebiet nach der Phadebas[®]-Methode (bei 40°C).

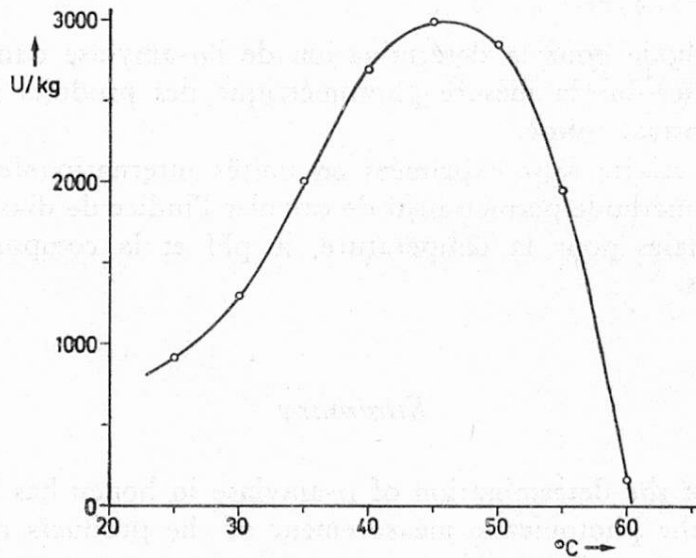


Abb. 3. Temperaturoptimum der α -Amylase eines Alpenrosenhonigs aus dem Sustengebiet nach der Phadebas[®]-Methode (0,1 n Acetatpuffer, pH der Reaktionsmischung = 5,4).

Die für klassische Bestimmungen erforderliche NaCl-Beigabe in das Reaktionsgemisch (tierische Amylase wird durch Cl^{\ominus} -Ionen aktiviert) erübrigt sich mit der Phadebas[®]-Methode, da die Tablette bereits genügend NaCl enthält.

Diskussion

Die vorliegende Methode liefert für die Bestimmung der α -Amylase im Bienenhonig genaue und gut reproduzierbare Resultate und ist — verglichen mit den bestehenden konventionellen Methoden — bedeutend einfacher und schneller aus-

zuführen. Die Verwendung spezieller Glasgefäße, das Herstellen von Substrat- und Jodlösungen, welche praktisch täglich erneuert werden müssen, entfallen, und es ist auch nicht mehr notwendig, für eine Einzelbestimmung mehrere Proben in verschiedenen Zeitabständen zu untersuchen.

Zusammenfassung

Eine neue Bestimmungsmethode für die α -Amylase im Bienenhonig wird beschrieben. Sie beruht auf der photometrischen Erfassung der Spaltprodukte, welche durch α -Amylasewirkung aus einem farbmarkierten Substrat freigesetzt werden.

Die Berechnung ergibt Aktivitätswerte in internationalen Einheiten pro kg. Die Korrelation mit einer anderen Methode ermöglicht auch die Berechnung der Diastasezahl.

Optimale Werte für Temperatur, pH-Wert und Pufferzusammensetzung sind für die Methode angegeben.

Résumé

Une nouvelle méthode pour la détermination de l' α -amylase dans le miel a été mise au point. Elle est basée sur la mesure photométrique des produits issus par l'action de l' α -amylase sur un substrat coloré.

Les valeurs de l'activité sont exprimées en unités internationales par kg. La corrélation avec une autre méthode permet aussi de calculer l'indice de diastase.

Les valeurs optimales pour la température, le pH et la composition de la solution tampon sont indiquées.

Summary

A new method for the determination of α -amylase in honey has been developed. The method is based on the photometric measurement of the products released from a dye-labelled substrate by action of α -amylase.

Results are obtained in international units per kg. Correlation with another method permits to calculate the diastase number.

Optimum values for the temperature, pH and composition of the buffer solutions are given.

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 Diastasezahl 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. *Edwards, R. A., Faraji-Haremi, R. and Wootton, M.*: A rapid method for determining the diastase activity in honey. *J. apic. Res.* **14**, 47—50 (1975).
5. *Schade, J. E., Marsh, G. L. and Eckert, J. E.*: Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulteration. *Food Res.* **23**, 446—463 (1958).
6. *Ceska, M., Hultman, E. and Ingelman, B. G. A.*: A new method for determination of α -amylase. *Experientia* **25**, 555—556 (1969).
7. *Barnes, W. C. and Blakeney, A. B.*: Determination of cereal alpha-amylase using a commercially available dye-labelled substrate. *Stärke* **26**, 193—197 (1974).
8. *Regula, E., Kohn, M. und Wassermann, L.*: Eine einfache Methode zur Bestimmung der α -Amylase in Lebensmitteln. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **7**, 57—59 (1974).
9. *Diem, K. und Lentner, C.*: Documenta Geigy/Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage, S. 274—276. J. R. Geigy AG, Basel 1968.
10. *O'Donnel, M. D. and McGeeney, K. F.*: Activation of α -amylase by protein and detergents. *Enzyme* **18**, 356—367 (1974).

U. Siegenthaler
Eidgenössische Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
Sektion Bienen
CH - 3097 Liebefeld-Bern