

Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der -Glucosidase (Saccharase) im Honig

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

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **68 (1977)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982229>

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.

Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase (Saccharase) im Honig

U. Siegenthaler

Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Sektion Bienen, Liebefeld-Bern

Einleitung

Der als Invertase oder Saccharase (α -Glucosidase EC 3.2.1.20) bezeichnete Enzymkomplex bewirkt wohl die tiefgreifendsten Veränderungen während der Entstehung des Honigs von den Rohstoffen bis zum konsumfertigen Produkt. Neben der Spaltung von α -Glucosidbindungen bewirkt er ebenfalls Transglucosidierungen (1). Der Ursprung dieser Honig-Saccharase wurde von *Rinaudo* et al. (2) untersucht.

Die α -Glucosidase ist wesentlich wärmeempfindlicher als die auch im Honig vorkommende α -Amylase (EC 3.2.1.1); nach Berechnungen von *White* et al. (3) nimmt ihre Aktivität im Honig bei 20°C 1,8mal schneller, bei 40°C sogar 3,2mal schneller ab als die der α -Amylase. Zum Nachweis von Wärmeschäden eines Honigs kommt daher der Bestimmung der α -Glucosidaseaktivität große Bedeutung zu; das Aktivitätsverhältnis der beiden Enzyme wurde als Maß der Wärmeschädigung eines Honigs vorgeschlagen (4). In der Tat bieten die Honigenzyme diesbezüglich eine wesentlich empfindlichere Beurteilungsgrundlage als etwa der Gehalt an Hydroxymethylfurfural.

Kiermeier und *Köberlein* (4), *Gontarski* (5) sowie *Duisberg* und *Gebelein* (6) haben unterschiedliche Methoden zur Aktivitätsbestimmung der α -Glucosidase im Honig entwickelt. *Hadorn* und *Zürcher* (7) haben diese Methoden miteinander verglichen und die polarimetrische Methode von *Duisberg* und *Gebelein* verbessert (8). Letztere findet sich auch im Schweizerischen Lebensmittelbuch (9).

Bei allen diesen Methoden werden Saccharoselösungen als Substrat eingesetzt und entweder die Konzentrationszunahme der reduzierenden Zucker oder die -abnahme der Saccharose verfolgt. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese recht arbeitsaufwendigen Methoden durch den Einsatz von p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (in der Folge mit pNPG abgekürzt) als Substrat zu vereinfachen; *Huber* und *Mathison* (10) haben gezeigt, daß die im Honig vorkommende α -Glucosidase eine hohe Affinität zu diesem Substrat aufweist. Als Produkte der Enzymreaktion entstehen Glucose und p-Nitrophenol; durch Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich wird einerseits die Reaktion gestoppt und andererseits Nitrophenol in das Nitrophenolat-Anion übergeführt, welches sich spektralphotometrisch quantitativ bestimmen läßt.

Reagenzien und Untersuchungsmaterial

pNPG Fluka AG, Buchs; Pufferlösungen aus p. A. Substanzen E. Merck, Darmstadt, nach Angaben in (11). D-(+)-Glucose, D-(—)-Fructose, Saccharose und Maltose für biochem. Zwecke sowie p-Nitrophenol (Indikatorsubstanz) E. Merck, Darmstadt. Alle verwendeten Honige stammen von anstaltseigenen Bienenvölkern aus den Ernten 1973 bis 1976. Spektralphotometer Varian Techtron UV-VIS 635.

Auswahl geeigneter Arbeitsbedingungen

Wie Abbildung 1 zeigt, liegt das bei der Enzymreaktion entstehende p-Nitrophenol erst bei pH-Werten über 9 praktisch vollständig in der anionischen Form vor, welche bei der Wellenlänge 400 nm ein starkes Absorptionsmaximum aufweist. Im Bereich der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen folgt die Absorption dem Lambert-Beer-Gesetz. Die Absorption von Honiglösungen ist bei dieser Wellenlänge recht unterschiedlich und in geringem Maße pH-abhängig. Dieser Erscheinung muß durch Messung gegen geeignete Blindlösungen (siehe unten, Standardisierte Methode) begegnet werden.

Das pH-Optimum der Reaktion selbst liegt bei 6 (Abb. 2). Diesen Wert haben auch *Hadorn* und *Zürcher* (7) mit Saccharoselösung als Substrat gefunden. *Huber*

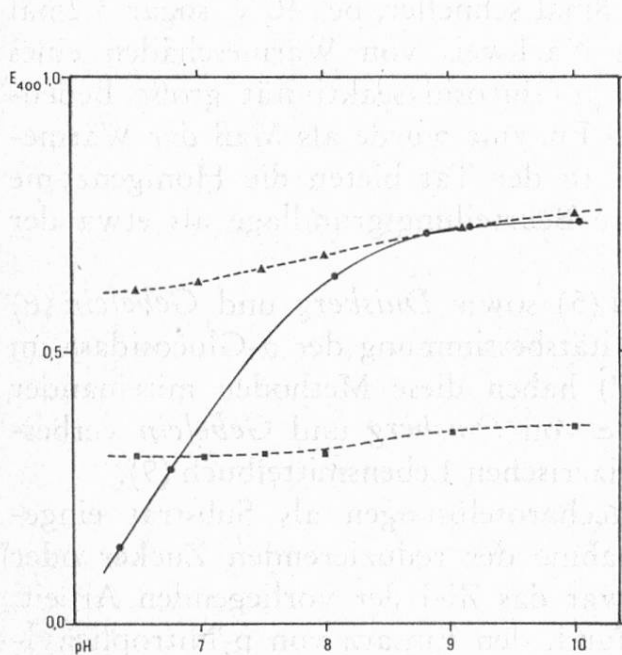


Abb. 1. Abhängigkeit der Extinktion bei 400 nm vom pH-Wert

- = p-Nitrophenol 5,9 µg/ml
- ▲---▲ = dunkler (Wald-)Honig, 10%ige Lösung (w/v)
- = heller (Blüten-)Honig, 10%ige Lösung (w/v)

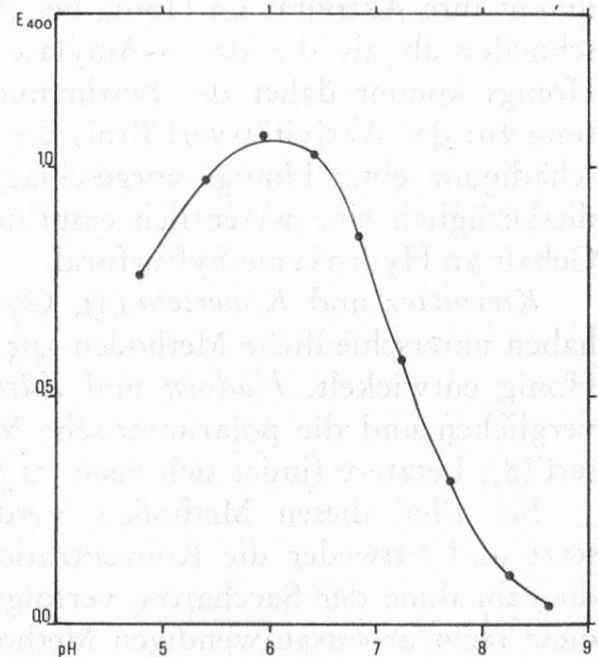


Abb. 2. pH-Optimum der Enzymreaktion Bestimmungen in einem Waldhonig nach der standardisierten Methode in entsprechend eingestellten 0,1 M Phosphatpufferlösungen.

und *Mathison* (10) finden für Saccharose pH 5,5 und für pNPG pH 6,5. Diese Autoren arbeiten aber mit isoliertem Enzym; daß sich bei Glucosidasen je nach Reinheit des Enzyms gewisse Unterschiede für die optimalen Reaktionsbedingungen ergeben können, wurde schon 1948 beschrieben (12). Die für die Enzymversuche optimale Temperatur liegt bei etwa 40°C (Abb. 3).

Zum Festlegen einer zweckmäßigen Inkubationsdauer wurde eine Zeit-Umsatzkurve aufgenommen (Abb. 4). Es ist ersichtlich, daß während der ersten Stunde die Reaktionsgeschwindigkeit praktisch unverändert bleibt, danach sinkt sie langsam ab. Nach etwa drei Stunden wird kein Substrat mehr umgesetzt. Die Reaktionsdauer für die standardisierte Methode wurde mit 20 Minuten festgelegt; zu diesem Zeitpunkt verläuft die Reaktionskurve in jedem Fall noch linear und es ist bereits eine vernünftig meßbare Produktkonzentration vorhanden.

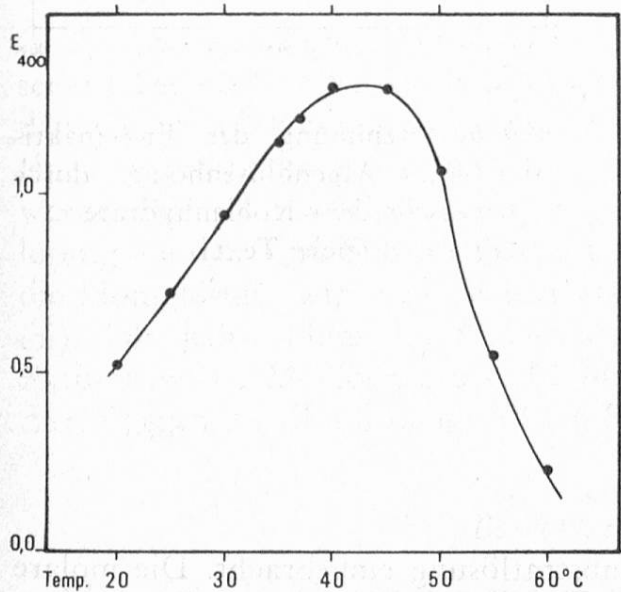


Abb. 3. Temperaturoptimum der Enzymreaktion

Bestimmungen in einem Waldhonig nach der standardisierten Methode bei entsprechenden Temperaturen.

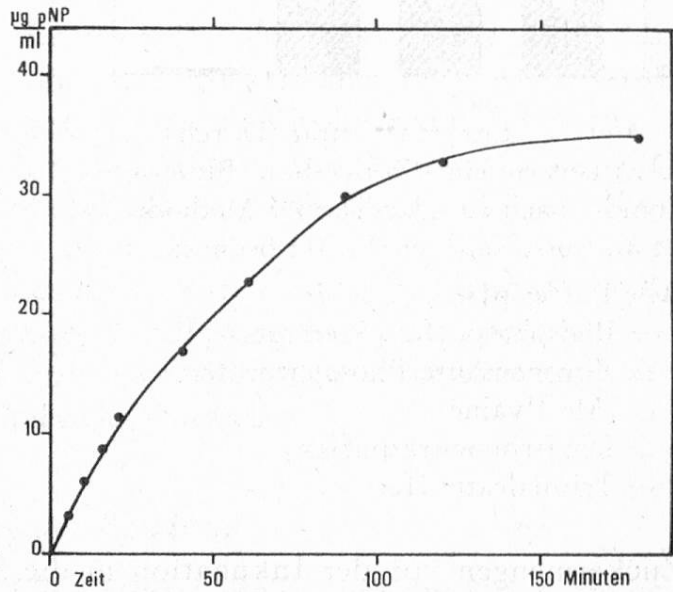


Abb. 4. Zeit/Umsatzkurve der Enzymreaktion

Ansatz mit einem Alpenblütenhonig nach standardisierter Methode, jedoch mit zehnfachen Volumina. Entnahme von 5,5 ml in entsprechenden Zeitabständen, jeweils vermischt mit 0,5 ml Sistierlösung.

Bereits bei der Bestimmung der α -Amylaseaktivität im Honig (13) wurden mit verschiedenen Pufferlösungen unterschiedliche Resultate erhalten. Dies gilt auch für die Versuche mit α -Glucosidase, wie Abbildung 5 zeigt. Die höchste Aktivität ist in 0,1 M Phosphatpuffer festzustellen; in Dinatriumcitrat- und Zitronensäure/Phosphatpufferlösungen ist die Aktivität etwas geringer. Der in Trismaleatpuffer kaum noch meßbare Substratumsatz ist darauf zurückzuführen, daß Tris-Ionen für einige Glucosidasen als starke Inhibitoren gelten (10, 14). In diesem Zusammenhang wurde auch die Hemmwirkung einiger im Honig vorkommender Zuckerarten untersucht. Bei diesen Versuchen wurden entsprechende

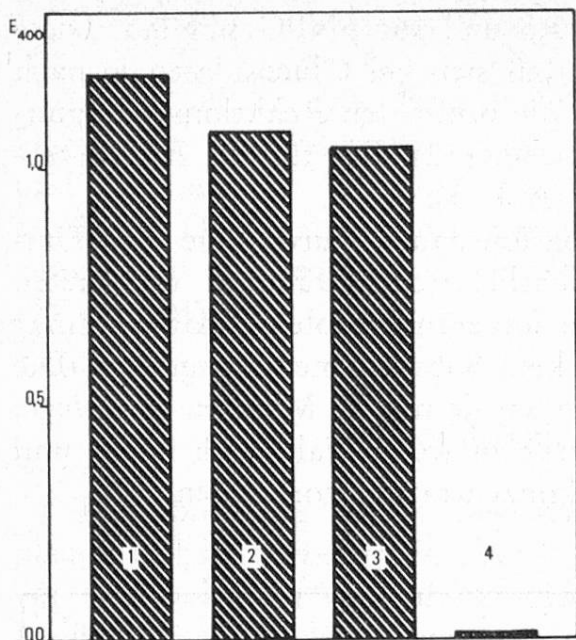


Abb. 5. Enzymaktivität (Durchschnittswerte eines Wald- bzw. Blütenhonigs) nach standardisierter Methode in verschiedenen Pufferlösungen

Alle Puffer pH 6,0/0,1 M;

1 = Phosphatpuffer (Soerensen)

2 = Zitronensäure/Phosphatpuffer (Mc Ilvaine)

3 = Dinatriumcitratpuffer

4 = Trismaleatpuffer

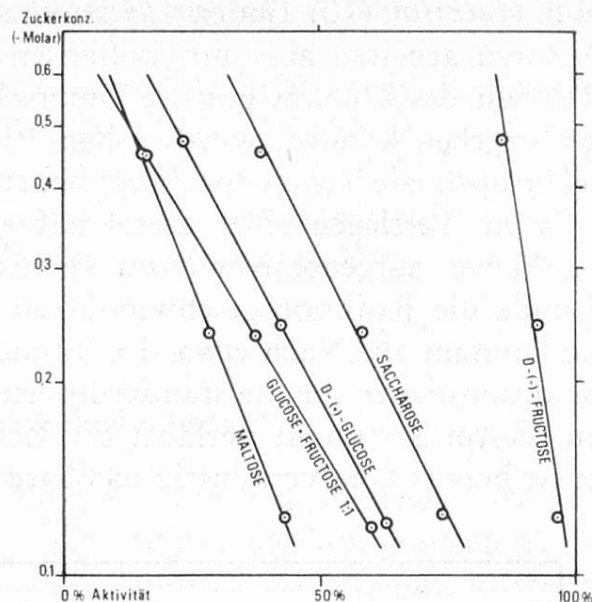


Abb. 6. Hemmung der Enzymaktivität eines Alpenblütenhonigs durch verschiedene Kohlenhydrate (siehe Text)

Zuckermengen vor der Inkubation in die Substratlösung eingebracht. Die molare Zuckerkonzentration im Enzymversuch ist in Abbildung 6 (logarithmisch) gegen die Restaktivität in % aufgetragen, wobei der 100%-Wert aus einem gleichen Ansatz ohne Zuckerbeigabe ermittelt wurde. Da Maltose und Saccharose ebenfalls Substrate der α -Glucosidase sind, ist deren Aktivitätsverminderung bezüglich dem Substrat pNPG wohl als kompetitive Hemmung anzusehen. Die Aktivitätsherabsetzung durch Glucose, Fructose und der 1:1 Mischung dieser beiden Monosaccharide ist dagegen eher eine Produkthemmung.

Standardisierte Methode

Reagentien

0,1 M Phosphatpuffer

pH = 6,0

Substratlösung

11,66 g KH_2PO_4 und 2,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1000 ml mit Wasser auffüllen.

0,02 M Lösung von pNPG in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 (6,0252 g ad 1000 ml). pNPG ist schlecht wasserlöslich; der zum Lösen verwendete Puffer kann auf etwa

60°C erwärmt werden. Die Lösung ist sofort wieder abzukühlen und ist in einer Braunglasflasche längere Zeit (über 1 Monat) im Kühlschrank haltbar.

Honiglösung

5,00 g Honig werden mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 quantitativ in einen 25-ml-Meßkolben übergeführt und zur Marke aufgefüllt (Honiglösung 20% w/v). Die Lösung ist 1 Tag im Kühlschrank haltbar.

Sistierlösung

3 M Trispuffer pH 9,5: Eine Lösung von 363,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan pro Liter wird mit 3 M Salzsäure auf pH 9,5 eingestellt (Glaselektrode).

Ausführung der Bestimmung

5 ml Substratlösung werden in einem Reagenzglas oder Plastikröhrchen im Wasserbad bei 40°C während 5 min vorgewärmt. Mittels Kolbenhubpipette werden danach 0,5 ml Honiglösung zugegeben (Startzeit); der Röhrcheninhalt wird auf einem Vibrator kurz durchmischt. Nach genau 20 min Inkubationszeit bei 40°C werden 0,5 ml Sistierlösung zupipettiert und erneut durchmischt. Für die Blindlösung werden 5 ml Substratlösung über die gleiche Zeitdauer bei 40°C inkubiert; die Honiglösung wird jedoch hier erst *nach* der Sistierlösung zupipettiert (je 0,5 ml). Für jeden Honig muß eine separate Blindlösung hergestellt werden. Die Extinktion der Meßlösung bei 400 nm wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur direkt gegen die Blindlösung in 1 cm Küvetten gemessen.

Berechnung der Resultate

Aus einer Eichkurve mit reinem p-Nitrophenol ergibt sich die Umrechnungsformel [1]:

$$\text{Konz. p-Nitrophenol } (\mu\text{g/ml}) = E_{400} \cdot 7,37 \quad [1]$$

Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von p-Nitrophenol (139,11) ergibt sich die molare Konzentration nach [2]:

$$\text{Konz. p-Nitrophenol } (\mu\text{mol/ml}) = E_{400} \cdot 0,05298 \quad [2]$$

Da beim Enzymversuch die produzierte Anzahl μmol p-Nitrophenol genau der Anzahl μmol umgesetztes Substrat entspricht, kann die α -Glucosidaseaktivität in U/kg Honig aus der gemessenen Extinktion bei 400 nm berechnet werden. Dabei sind die eingesetzte Honigmenge von 0,1 g (Faktor 10^4), das Gesamtvolumen der Meßlösung von 6 ml (Faktor 6) und die Reaktionszeit von 20 min (Faktor 0,05) in Rechnung zu setzen. Es ergibt sich mit [2]:

$$\text{U/kg Honig} = E_{400} \cdot 10^4 \cdot 6 \cdot 0,05 \cdot 0,05298$$

oder zusammengefaßt:

$$\text{U/kg Honig} = E_{400} \cdot 158,94 \quad [3]$$

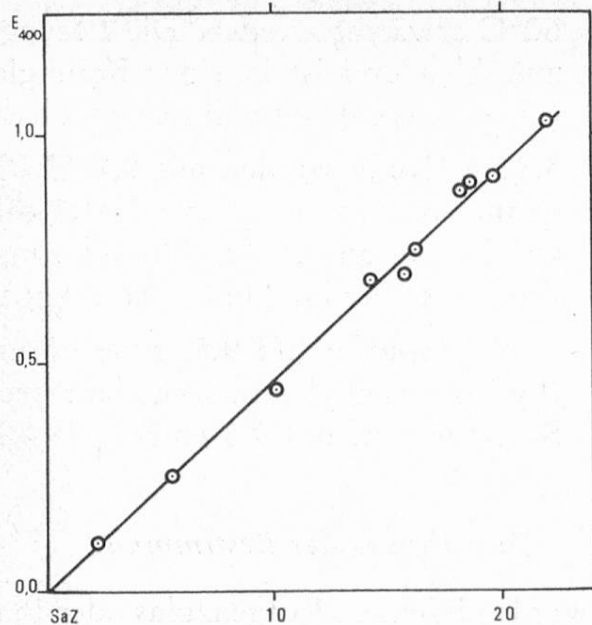


Abb. 7. Korrelation der Saccharasezahl (SaZ) nach (8, 9) mit der E₄₀₀ nach der standardisierten Methode
Gleichzeitige Bestimmung von 10 Schweizer Honigen.

Für zehn verschiedene Honige wurde gleichzeitig die Saccharasezahl (SaZ) nach der Methode von *Hadorn* und *Zürcher* (8, 9) bestimmt. Es ergibt sich eine lineare Korrelation zwischen der SaZ und der mit pNPG als Substrat ermittelten E₄₀₀ (Abb. 7). Der mittlere Korrelationskoeffizient (SaZ/E₄₀₀) beträgt 21,64 (Standardabweichung 0,69); die SaZ läßt sich also auch aus der E₄₀₀ nach Gleichung [4] berechnen:

$$\text{SaZ} = E_{400} \cdot 21,64 \quad [4]$$

Reproduzierbarkeit der pNPG-Methode: 25 Einzelbestimmungen ergaben eine mittlere E₄₀₀ von 0,754 mit einem Streubereich von $\pm 0,065$ (Vergleichsstandardabweichung = $\pm 0,023$, statistische Sicherheit 99%).

Diskussion

Nitrophenylglycoside werden in der modernen Biochemie sehr häufig zur Aktivitätsbestimmung von Glycosidasen eingesetzt; es ist dabei natürlich zu beachten, daß die Affinität der Enzyme zu solchen Substraten nie die gleiche ist wie bei Inkubationen mit Di- bzw. Trisacchariden. Wenn lediglich Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Proben erfaßt werden sollen, wie dies bei Lebensmitteluntersuchungslabors bei Honigen der Fall ist, kann aber doch mit der pNPG-Methode beträchtlich Arbeitszeit eingespart werden.

Wird die α -Glucosidaseaktivität nach den klassischen Methoden (4—9) über die SaZ in U/kg errechnet, ergeben sich proportional wesentlich höhere Werte als mit der pNPG-Methode. Dies hat verschiedene Gründe; es sind die bereits oben erwähnten Affinitätsunterschiede zu berücksichtigen, ferner wird mit der be-

schriebenen pNPG-Methode nicht bei optimalen Konzentrationsverhältnissen gearbeitet. Wegen der sehr beschränkten Wasserlöslichkeit und dem relativ hohen Preis des pNPG mußte eine Kompromißlösung gefunden werden, welche sich aber aufgrund der guten linearen Korrelation mit den klassischen Methoden durchaus rechtfertigen läßt. Wollte man die wahre Aktivität der α -Glucosidase von Honig bestimmen, müßte das Enzym ohnehin vorerst in sehr aufwendigen Arbeitsschritten aus dem Honig isoliert werden, wie dies *Huber* und *Mathison* (10) getan haben, da u. a. durch die im Honig selbst vorhandenen Kohlenhydrate seine Aktivität gehemmt wird, wie in Abbildung 6 dargestellt. Auch *Dustmann* (15) hat gezeigt, daß sich nach einfacher Dialyse der Honiglösung (wobei der größte Teil der Kohlenhydrate entfernt wird) bereits um etwa 17% höhere Aktivitätswerte ergeben. Für die Kontrolle der Naturbelassenheit von Honig ist dies aber nicht direkt von Interesse, und es wurde deshalb eine möglichst einfache, für größere Probenreihen geeignete Routinemethode angestrebt.

Zusammenfassung

Eine neue Bestimmungsmethode für die α -Glucosidase (Saccharase) im Honig wird beschrieben. Sie beruht auf der spektralphotometrischen Erfassung von p-Nitrophenol, welches durch α -Glucosidasewirkung aus p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (Substrat) freigelegt wird.

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

Der Einfluß der Temperatur, des pH-Wertes, der Pufferzusammensetzung und verschiedener Kohlenhydrate auf die Enzymaktivität wurde untersucht.

Résumé

Une nouvelle méthode pour la détermination de l' α -glucosidase (saccharase) dans le miel a été mise au point. Elle est basée sur la mesure spectrophotométrique du p-nitro-phénol issu du p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (substrat) par l'action de l' α -glucosidase.

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

L'influence de la température, du pH, de la composition de la solution tampon et de divers hydrates de carbone est indiquée.

Summary

A new method for the determination of α -glucosidase (saccharase) in honey has been developed. The method is based on the spectrophotometric measurement of the p-nitrophenol released from p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside as substrate by action of α -glucosidase.

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

The influence of temperature, pH, composition of the buffer solution and several carbohydrates was examined.

Literatur

1. White, J. W., Jr. and Maher, J.: Transglucosidation by honey invertase. Arch. Biochem. Biophys. **42**, 360—367 (1953).
2. Rinaudo, M. T., Ponzetto, C., Vidano, C. and Marletto, F.: The origin of honey saccharase. Comp. Biochem. Physiol. **46B**, 245—251 (1973).
3. White, J. W., Jr., Kushnir, I. and Subers, M. H.: Effect of storage and processing temperatures on honey quality. Food. Technol. **18**, 153—156 (1964).
4. Kiermeier, F. und Köberlein, W.: Ueber die Hitzeinaktivierung von Enzymen im Honig. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **98**, 329—347 (1954).
5. Gontarski, H.: Eine Halbmikromethode zur quantitativen Bestimmung der Invertase im Bienenhonig. Z. Bienenforsch. **4**, 41—45 (1957).
6. Duisberg, H. und Gebelein, H.: Ueber die Kontrolle von Erhitzungsschäden bei Honigen. Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch. **107**, 489—501 (1958).
7. Hadorn, H. und Zürcher, K.: Zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität in Honig. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **53**, 6—28 (1962).
8. Hadorn, H. und Zürcher, K.: Eine verbesserte polarimetrische Methode zur Saccharasezahl-Bestimmung in Honig. Deut. Lebensm. Rundschau **62**, 195—201 (1966).
9. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, Kap. 23: Honig und Kunsthonig, 5. Auflage. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1967.
10. Huber, R. E. and Mathison, R. D.: Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose of honey bees (*Apis mellifera*). Can. J. Biochem. **54**, 153—164 (1976).
11. Documenta Geigy / Wissenschaftliche Tabellen. Hrsg. Diem, K. und Lentner, C. 7. Auflage, S. 274—276, J. R. Geigy AG, Basel 1968.
12. Pigman, W. W. and Goepf, R. M., Jr.: Chemistry of the carbohydrates, p. 489 f. Academic Press, New York 1948.
13. Siegenthaler, U.: Bestimmung der α -Amylase im Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **66**, 393—399 (1975).
14. Agarwal, A. K.: Melezitase and maltase from the midgut of *Sesamia inferens* Walker. Experientia **32**, 876—877 (1976).
15. Dustmann, J. H.: Einfluß der Dialyse bei der Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig. Lebensm.-Wiss. Technol. **5**, 70—71 (1972).

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