

Bestimmung der Saccharase-Aktivität

Teil 1: Verfahren nach Siegenthaler

DIN
10759-1

ICS 67.180.10

Deskriptoren: Honig, Saccharase, Bestimmung, Siegenthaler

Analysis of honey — Determination of saccharase activity — Part 1: Siegenthaler method

Analyse du miel — Détermination de l'activité de saccharase — Partie 1: Méthode selon Siegenthaler

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß „Honiguntersuchung“, erarbeitet.

Der Anhang A ist informativ.

DIN 10759 „Untersuchung von Honig — Bestimmung der Saccharase-Aktivität“ besteht aus:

Teil 1: Verfahren nach Siegenthaler

Teil 2: Verfahren nach Hadorn

Die Werte für die Wiederholgrenze und die Vergleichgrenze sind aus Ringversuchen gewonnen worden. Sie gelten mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %. Das bedeutet, daß im Durchschnitt bei 20 Untersuchungen einmal eine Überschreitung der angegebenen Werte erwartet werden kann.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität (α -Glucosidase) in Honig fest.

ANMERKUNG: Es gibt keine signifikante Korrelation zwischen dem mit diesem Verfahren bestimmten Wert der Saccharase-Aktivität und der Saccharasezahl $S_{Z(Hadorn)}$ nach DIN 10759-2.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN ISO 5725-1

Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1 : 1994)

E DIN ISO 5725-2

Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 2: Ein grundlegendes Verfahren für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision von festgelegten Meßverfahren; Identisch mit ISO/DIS 5725-2 : 1990

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Norm gilt die folgende Definition:

Saccharase-Aktivität (nach dem Siegenthaler-Verfahren):

Der nach dem Verfahren nach Siegenthaler ermittelte Abbau des Substrates p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (p-NPG) zum Produkt p-Nitrophenol.

ANMERKUNG: Die Berechnung der Saccharase-Aktivität ergibt den Aktivitätswert U in Einheiten je kg Honig. 1 U ist die Enzymaktivität, die eine Substratmenge von 1 μ mol je min unter festgelegten, für das jeweilige Enzym optimalen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur) umsetzt.

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Bei dem photometrischen Meßverfahren werden definierte Volumina an Probenlösung und Substratlösung gründlich vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei $(40,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ wird die Reaktion mittels einer Sistierlösung gestoppt. Die Honiglösung wird erst nach der Zugabe der Sistierlösung in die Blindprobe pipettiert. Die Extinktion wird gegen die Blindprobe gemessen, und daraus wird die Saccharase-Aktivität in Einheiten je kg Honig errechnet.

Fortsetzung Seite 2 bis 4

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

5 Chemikalien

5.1 Allgemeines

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muß destilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein. Unter Lösung ist eine wäßrige Lösung zu verstehen.

5.2 Phosphat-Pufferlösung,

$c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,086 \text{ mol/l}^{1)}$,
 $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}) = 0,014 \text{ mol/l}^{1)}$,
 $c(\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}^{1)}$, pH = 6,0
Es werden 11,66 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und 2,56 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$) in etwa 900 ml Wasser gelöst und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

5.3 Substratlösung,

$c(\text{p-NPG}) = 0,02 \text{ mol/l}^{1)}$, pH = 6,0

In einem 1 000-ml-Meßkolben werden 6,025 g p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (p-NPG) in Phosphat-Pufferlösung (siehe 5.2) gelöst. Da p-NPG schwer wasserlöslich ist, kann der zum Lösen verwendete Puffer auf etwa 60 °C erwärmt werden. Die Lösung ist danach sofort wieder abzukühlen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit der angegebenen Phosphat-Pufferlösung auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist sofort verwendbar. Sie ist bei Lagerung in einer Lichtschutzflasche bei etwa 4 °C im Kühlschrank nicht länger als 1 Woche haltbar.

5.4 Sistierlösung, $c(\text{Tris}-(\text{hydroxymethyl})\text{-aminomethan}) = 3 \text{ mol/l}^{1)}$, pH = 9,5

In einem 1 000-ml-Meßkolben werden 363,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in Wasser gelöst. Mit Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}^{1)}$, wird die Lösung auf pH = 9,5 eingestellt und auf 1 000 ml aufgefüllt.

6 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laboratoriumsgeräte und insbesondere die Geräte nach 6.1 bis 6.10:

6.1 Sieb aus nichtrostendem Edelstahl, Maschenweite 0,50 mm

6.2 Reagenzglasschüttler

6.3 Wasserbad mit Thermostat, geeignet zur Einhaltung der Temperatur auf $(40,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$

6.4 Spektralphotometer, zur Messung bei 400 nm

6.5 Stoppuhr (Enzymuhr)

6.6 Pipetten

6.7 Meßkolben, Nennvolumen 25 ml und 1 000 ml

6.8 Reagenzgläser aus Glas, Nennvolumen 10 ml

6.9 Meßküvetten aus Glas oder Kunststoff, Schichtdicke 10 mm

6.10 Bechergläser

Die zur Durchführung der Bestimmung und zur Aufbewahrung von Reagenzien verwendeten Geräte müssen frei von Detergenzien sein.

¹⁾ Stoffmengenkonzentration

7 Probenahme

Bis zum Erscheinen einer Norm ist die Probenahme zu vereinbaren. Für die Untersuchung ist eine repräsentative Laboratoriumsprobe von mindestens 200 g zu verwenden.

8 Durchführung

8.1 Probenvorbereitung

8.1.1 Flüssiger oder kandierter Honig ohne Verunreinigungen

Die Laboratoriumsprobe ist durch intensives Rühren (mindestens 3 min) ausreichend zu homogenisieren. Dabei ist darauf zu achten, daß — insbesondere bei Weiterverwendung der Laboratoriumsprobe zur Bestimmung von Hydroxymethylfurfural (HMF) — möglichst wenig Luft eingeührt wird.

8.1.2 Flüssiger oder kandierter Honig mit Verunreinigungen

Nach Entfernung der Verunreinigungen wird der Honig bei Raumtemperatur glattgerührt und durch ein Sieb nach 6.1 gegeben. Kandierter Honig wird mit einem Spatel durch das Sieb nach 6.1 gerührt.

8.1.3 Wabenhonig

Falls die Waben noch geschlossen sind, werden sie zunächst entdeckelt. Mit Hilfe eines Siebes nach 6.1 wird der Honig ohne Erwärmung vollständig von den Waben getrennt.

8.2 Herstellung der Probenlösung

Es werden 4 g Honig auf 0,01 g abgewogen, in etwa 15 ml Phosphat-Pufferlösung (siehe 5.2) gelöst und quantitativ in einen 25-ml-Meßkolben übergeführt. Die Lösung wird danach mit der Phosphat-Pufferlösung bis zur Marke aufgefüllt, und der Meßkolben wird nach dem Verschließen kräftig geschüttelt. Die Probenlösung ist gekühlt etwa 24 h haltbar.

8.3 Bestimmung

In ein Reagenzglas werden 5 ml Substratlösung (siehe 5.3) pipettiert. Nach etwa 5 min Vorwärmzeit bei $(40,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ im Wasserbad werden 0,5 ml Probenlösung (siehe 8.2) einpipettiert. Der Zeitpunkt des Einpipettierens der Probenlösung ist die Startzeit. Sofort anschließend wird der Reagenzglasinhalt mittels Reagenzglasschüttler max. 10 s durchmischt. Das Reagenzglas wird in das Wasserbad bei $(40,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ zurückgestellt. Nach $20 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$ Inkubationszeit werden 0,5 ml Sistierlösung (siehe 5.4) einpipettiert, und der Reagenzglasinhalt wird erneut mittels Reagenzglasschüttler durchmischt. Die Zugabe der stark alkalischen Sistierlösung stoppt die Enzymreaktion. Aus dem Produkt p-Nitrophenol entsteht das p-Nitrophenolat-Anion.

Der Ansatz einer Blindprobe (Leerwert) erfolgt parallel zur Analysenprobe. Für die Blindprobe werden ebenfalls 5 ml Substratlösung (siehe 5.3) in ein Reagenzglas pipettiert, im Wasserbad bei $(40,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ vorgewärmt und — im Gegensatz zur Analysenprobe — ohne Probenlösung (siehe 8.2) 20 min inkubiert. Danach werden ebenfalls 0,5 ml Sistierlösung (siehe 5.4) einpipettiert, und der Inhalt wird durchmischt. Erst jetzt werden in die Blindprobe 0,5 ml der Probenlösung (siehe 8.2) pipettiert. Der Inhalt wird erneut durchmischt.

Nach Ablauf der Inkubation werden die Reagenzgläser aus dem Wasserbad genommen. Wenn die Ansätze auf Raumtemperatur abgekühlt sind, wird die Extinktion der Analysenprobe gegen die Blindprobe im Spektralphotometer bei 400 nm gemessen.

