

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie
Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie

NÁVODY NA CVIČENÍ

Stanovení aktivity diastázy v medu enzymovou metodou Phadebas®

IVA 2020FVHE/2360/47

Mgr. Matej Tkáč
Mgr. Jan Pospíšil
Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

BRNO 2020

Stanovení aktivity diastázy v medu enzymovou metodou Phadebas®

Princip:

Metoda Phadebas® je určena pro stanovení aktivity α -amylázy ve všech druzích medu. Jako substrát slouží nerozpustný modře zbarvený zesíťovaný škrob, v podobě komerčně dostupných tablet Phadebas® Honey Diastase Test. Substrát je hydrolyzovaný α -amylázou, čím se uvolňují modře zbarvené hydrosolubilní fragmenty a zvyšuje se absorbance roztoku. Po uplynutí přesně stanoveného času inkubace je spektrofotometricky měřena absorbance modře zbarveného produktu při vlnové délce 620 nm.

Reagencie:

- tablety Phadebas® Honey Diastase Test
- roztok hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol/l}$)
- acetátový pufr (pH 5,2; $c = 0,1 \text{ mol/l}$): 13,6 g trihydrátu octanu sodného se rozpustí v kádince s 800 ml destilované vody, hodnota pH roztoku se upraví na 5,2 pomocí ledové kyseliny octové (1-2 ml) a získaný pufr se analyticky převede do odměrné baňky a doplní destilovanou vodou na celkový objem 1 litru a promíchá.

Přístroje a pomůcky:

- analytické váhy
- předvážky
- spektrofotometr
- vodní lázeň
- vortex
- filtrační papír
- laboratorní sklo:
 - kádinka 50 ml, skleněná tyčinka
 - odměrná baňka 100 ml se zátkou
 - zkumavky s kulatým dnem
 - filtrační nálevky
- mikropipeta 5,0 ml, stopky, pinzeta, stojan na nálevky, stojan na kyvety, křemenné, nebo jednorázové plastové kyvety.

Postup:

Příprava roztoku medu

1,00 g vzorku medu se odváží do kádinky o objemu 50 ml a rozpustí ve 40 ml acetátového pufru o koncentraci 0,1 mol/l a pH 5,2. Po úplném rozpuštění se vzorek analyticky převede do zábrusové odměrné baňky o objemu 100 ml, doplní acetátovým pufrem po rysku a důkladně promíchá.

Vlastní stanovení

Na dno zkumavky se odpipetuje 5,0 ml připraveného roztoku medu a inkubuje 5 minut ve vodné lázni při 40 °C. Po 5 minutách se do zkumavky vloží pomocí pinzety tableta Phadebas®, roztok ve zkumavce se promíchá na vortexu (po dobu cca 10 sekund). Zkumavka se vrátí zpět do vodní lázně a inkubuje přesně 30 minut. Pro ukončení reakce se přidá 1 ml roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) a zkumavka se důkladně promíchá na vortexu. Obsah zkumavky se zfiltruje přes filtrační papír. Absorbance získaného filtrátu se měří při 620 nm proti destilované vodě. Absorbance slepého pokusu se odečte od absorbance vzorku.

Pozn. Když je absorbance vyšší než 1,0 filtrát se zředí destilovanou vodou a při výpočte výsledku se zohlední faktor ředění.

Slepá zkouška:

S každou sadou vzorků je třeba připravit i slepou zkoušku. Na dno zkumavky se odpipetuje 5,0 ml acetátového pufru a inkubuje 5 minut ve vodné lázni při 40 °C. Po 5 minutách se do zkumavky vloží pomocí pinzety tableta Phadebas®, roztok ve zkumavce se promíchá na vortexu (po dobu cca 10 sekund). Zkumavka se vrátí zpět do vodní lázně a inkubuje přesně 30 minut. Pro ukončení reakce se přidá 1 ml roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) a zkumavka se důkladně promíchá na vortexu. Obsah zkumavky se zfiltruje přes filtrační papír. Absorbance získaného filtrátu se měří při 620 nm proti destilované vodě.

Výpočet:

Ke zjištěné absorbanci se vyhledá v tabulce odpovídající aktivita diastázy vyjádřená jako diastatické číslo (diastatic number = DN).

A (620 nm)	DN	A (620 nm)	DN	A (620 nm)	DN	A (620 nm)	DN	A (620 nm)	DN	A (620 nm)	DN
0,040	0,9	0,200	8,3	0,360	12,8	0,540	17,9	0,860	26,9	1,180	35,9
0,045	1,1	0,205	8,4	0,365	12,9	0,550	18,2	0,870	27,2	1,190	36,2
0,050	1,3	0,210	8,6	0,370	13,1	0,560	18,4	0,880	27,5	1,200	36,5
0,055	1,5	0,215	8,7	0,373	13,2	0,570	18,7	0,890	27,7	1,220	37,0
0,060	1,7	0,220	8,8	0,380	13,4	0,580	19,0	0,900	28,0	1,240	37,6
0,065	1,8	0,225	9,0	0,385	13,5	0,590	19,3	0,910	28,3	1,260	38,2
0,070	2,0	0,230	9,1	0,390	13,6	0,600	19,6	0,920	28,6	1,280	38,7
0,075	2,2	0,235	9,3	0,395	13,8	0,610	19,8	0,930	28,9	1,300	39,3
0,080	2,4	0,240	9,4	0,400	13,9	0,620	20,1	0,940	29,1	1,320	39,9
0,085	2,5	0,245	9,5	0,405	14,1	0,630	20,4	0,950	29,4	1,340	40,4
0,090	2,7	0,250	9,7	0,410	14,2	0,640	20,7	0,960	29,7	1,360	41,0
0,095	2,9	0,255	9,8	0,415	14,3	0,650	21,0	0,970	30,0	1,380	41,6
0,100	3,1	0,260	10,0	0,420	14,5	0,660	21,3	0,980	30,3	1,400	42,1
0,105	3,2	0,265	10,1	0,425	14,6	0,670	21,5	0,990	30,6	1,420	42,7
0,110	3,4	0,270	10,3	0,430	14,8	0,680	21,8	1,000	30,8	1,440	43,2
0,115	3,6	0,275	10,4	0,435	14,9	0,690	22,1	1,010	31,1	1,460	43,8
0,120	3,8	0,280	10,5	0,440	15,0	0,700	22,4	1,020	31,4	1,480	44,4
0,125	3,9	0,285	10,7	0,445	15,2	0,710	22,7	1,030	31,7	1,500	44,9
0,130	4,1	0,290	10,8	0,450	15,3	0,720	22,9	1,040	32,0	1,520	45,5
0,135	4,3	0,295	11,0	0,455	15,5	0,730	23,2	1,050	32,3	1,540	46,1
0,140	4,5	0,300	11,1	0,460	15,6	0,740	23,5	1,060	32,5	1,560	46,6
0,145	4,6	0,305	11,2	0,465	15,8	0,750	23,8	1,070	32,8	1,580	47,2
0,150	4,8	0,310	11,4	0,470	15,9	0,760	24,1	1,080	33,1	1,600	47,8
0,155	5,0	0,315	11,5	0,475	16,0	0,770	24,4	1,090	33,4	1,620	48,3
0,160	5,2	0,320	11,7	0,480	16,2	0,780	24,6	1,100	33,7	1,640	48,9
0,165	5,3	0,325	11,8	0,485	16,3	0,790	24,9	1,110	33,9	1,660	49,5
0,170	5,5	0,330	11,9	0,490	16,5	0,800	25,2	1,120	34,2	1,680	50,0
0,175	5,7	0,355	12,1	0,495	16,6	0,810	25,5	1,130	34,5	1,700	50,6
0,180	5,9	0,340	12,2	0,500	16,7	0,820	25,8	1,140	34,8	1,720	51,1
0,185	6,1	0,345	12,4	0,510	17,0	0,830	26,0	1,150	35,1	1,740	51,7
0,190	8,0	0,350	12,5	0,520	17,3	0,840	26,3	1,160	35,4	1,760	52,3
0,195	8,1	0,355	12,7	0,530	17,6	0,850	26,6	1,170	35,6	1,780	52,8

Zdroj:

Phadebas® Honey Diastase Test, Instruction for use, 2018. Dostupné z: <https://www.phadebas.com/wp-content/uploads/SPE9047-02-Bilaga-1.pdf>

Práce vznikla za finanční podpory projektu IVA 2020FVHE/2360/47.