

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.

Postup:

Příprava roztoku medu

1,00 g vzorku medu se odváží do kádinky o objemu 50 ml (1) a rozpustí ve 40 ml acetátového pufru o koncentraci 0,1 mol/l a pH 5,2 (2).



Po úplném rozpuštění se vzorek analyticky převede do zábrusové odměrné baňky o objemu 100 ml, doplní acetátovým pufrům po rysku a důkladně promíchá (3).



Vlastní stanovení

Na dno zkumavky se odpipetuje 5,0 ml připraveného roztoku medu (4) a inkubuje se 5 minut při 40 °C ve vodné lázni (5).



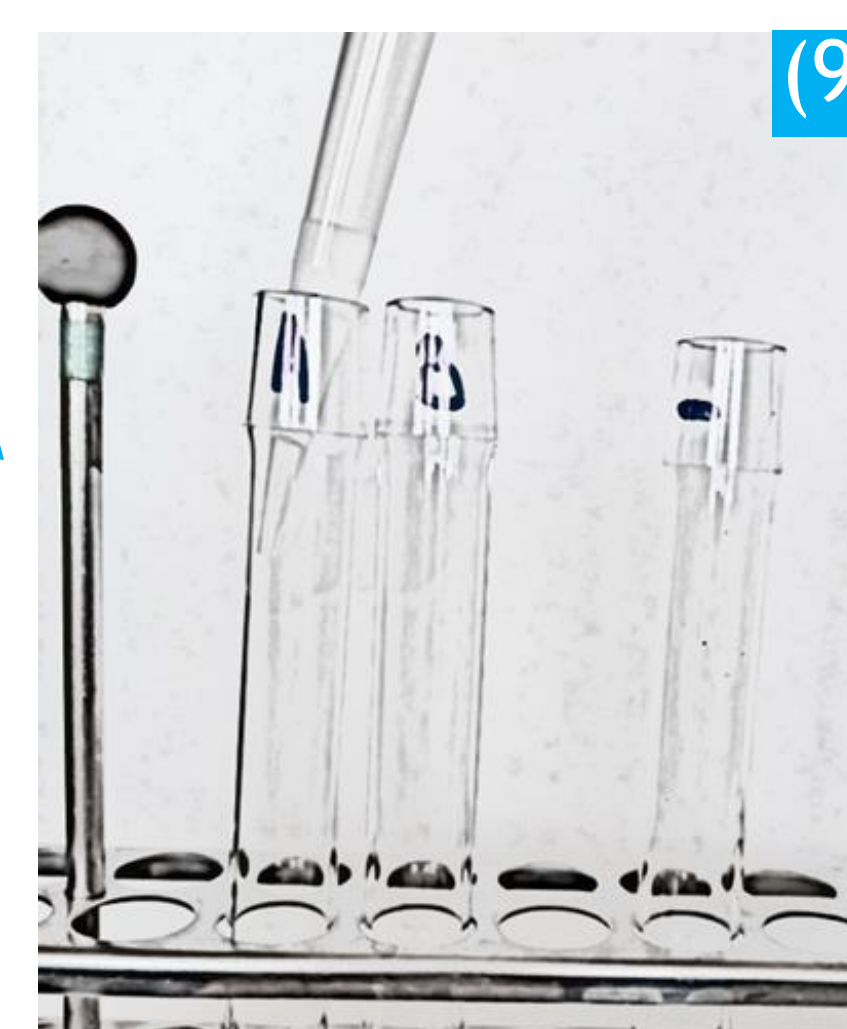
Po 5 minutách se do zkumavky vloží pomocí pinzety tableta Phadebas® (6) a roztok ve zkumavce se promíchá na vortexu (7).



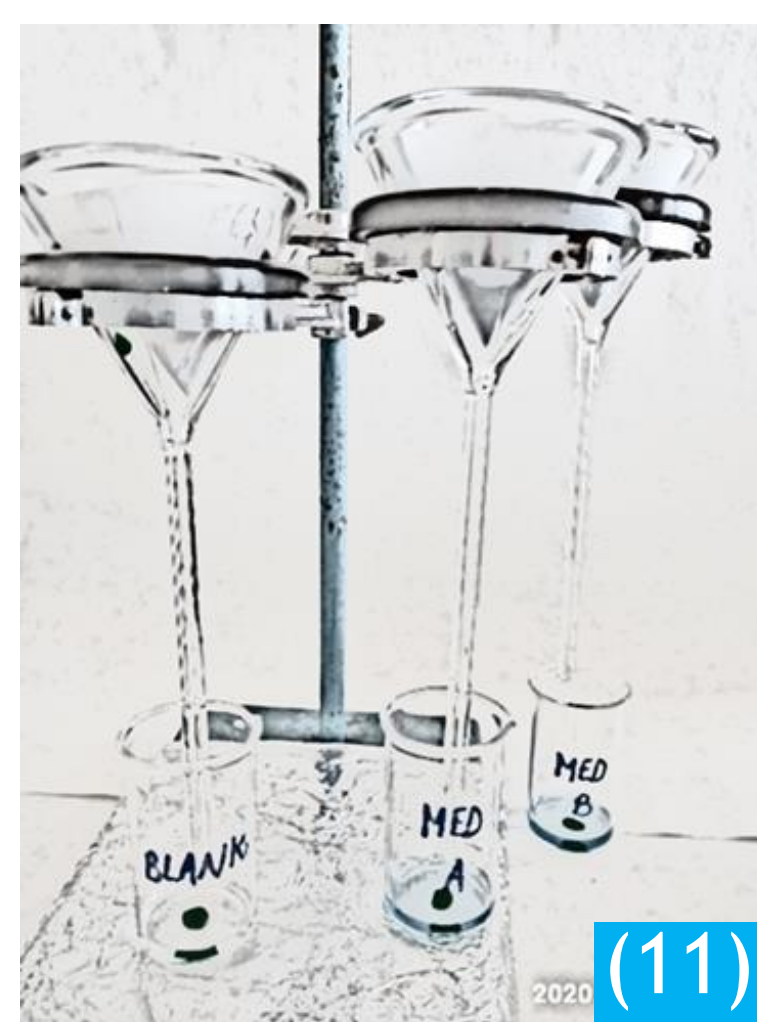
Zkumavka se vrátí zpět do vodní lázně a inkubuje přesně 30 minut (8).



Pro ukončení reakce se přidá 1 ml roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) (9) a zkumavka se důkladně promíchá na vortexu (10).



Obsah zkumavky se zfiltruje přes filtrační papír (11). Absorbance získaného filtrátu se měří při 620 nm proti destilované vodě (12). Absorbance slepého pokusu se odečte od absorbance vzorku.



Ke zjištění absorbance se vyhledá v tabulce odpovídající aktivita diastázy (13).



A (620nm)	DN (620nm)	A (620nm)	DN (620nm)	A (620nm)	DN (620nm)	A (620nm)	DN (620nm)
0.040	0.9	0.200	8.3	0.360	12.8	0.520	17.9
0.045	1.1	0.205	8.4	0.365	12.9	0.525	18.2
0.050	1.3	0.210	8.5	0.370	13.1	0.530	18.4
0.055	1.5	0.215	8.7	0.375	13.2	0.535	18.7
0.060	1.7	0.220	8.8	0.380	13.4	0.540	19.0
0.065	1.9	0.225	9.0	0.385	13.5	0.545	19.3
0.070	2.0	0.230	9.1	0.390	13.6	0.550	19.6
0.075	2.2	0.235	9.3	0.395	13.8	0.555	19.8
0.080	2.4	0.240	9.4	0.400	13.9	0.560	20.1
0.085	2.5	0.245	9.5	0.405	14.1	0.565	20.4
0.090	2.7	0.250	9.7	0.410	14.2	0.570	20.7
0.095	2.9	0.255	9.8	0.415	14.3	0.575	21.0
0.100	3.1	0.260	10.0	0.420	14.5	0.580	21.3
0.105	3.2	0.265	10.1	0.425	14.6	0.585	21.6
0.110	3.4	0.270	10.3	0.430	14.8	0.590	21.8
0.115	3.6	0.275	10.4	0.435	14.9	0.595	22.1
0.120	3.8	0.280	10.6	0.440	15.1	0.600	22.4
0.125	3.9	0.285	10.7	0.445	15.2	0.605	22.7
0.130	4.1	0.290	10.8	0.450	15.3	0.610	23.0
0.135	4.3	0.295	11.0	0.455	15.5	0.615	23.2
0.140	4.5	0.300	11.1	0.460	15.6	0.620	23.5
0.145	4.6	0.305	11.2	0.465	15.7	0.625	23.8
0.150	4.8	0.310	11.4	0.470	15.9	0.630	24.1
0.155	5.0	0.315	11.5	0.475	16.0	0.635	24.4
0.160	5.2	0.320	11.7	0.480	16.2	0.640	24.6
0.165	5.3	0.325	11.8	0.485	16.3	0.645	24.9
0.170	5.5	0.330	11.9	0.490	16.5	0.650	25.2
0.175	5.7	0.335	12.1	0.495	16.6	0.655	25.5
0.180	5.9	0.340	12.2	0.500	16.7	0.660	25.8
0.185	6.1	0.345	12.3	0.505	17.0	0.665	26.1
0.190	6.3	0.350	12.5	0.510	17.1	0.670	26.4
0.195	6.5	0.355	12.7	0.515	17.3	0.675	26.7

Autoři: Mgr. Matej Tkáč, Mgr. Jan Pospíšil, Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. Copyright © 2020 Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, VFU Brno.

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

Obrázky: Mgr. Matej Tkáč.

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