

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OVĚŘENÍ METOD STANOVENÍ PŘÍROZENÝCH A CIZÍCH AMYLAS V MEDU

VOJTĚCH KRUŽÍK*, ADÉLA GRÉGROVÁ
a HELENA ČÍŽKOVÁ

Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
kruzikv@vscht.cz

Došlo 8.3.18, přijato 11.5.18.

Klíčová slova: amylasa, diastasa, med, enzymy, falšování

Úvod

Enzymy patří k významným složkám medu, které se podílejí na jeho biologické aktivitě¹ a jsou důležité pro transformaci nektaru či medovice na med². Ve většině zemí slouží jejich aktivita jako závazný ukazatel kvality a indikátor čerstvosti či zpracování³. Enzymy v medu jsou v odborné literatuře často diskutovány, ale komplexní práce zaměřené na méně běžné a nepřírodní enzymy jsou obtížně dohledatelné^{4,5}.

Mezi obvykle sledovanou skupinou enzymů v medu patří amylasy. Do této skupiny enzymů se řadí tři základní

druhy amylas⁶ (tab. I). Jedinou přirozeně se vyskytující amylasou, která byla izolována z medu, je α -amylasa; často označovaná také jako diastasa^{4,7,8}. V některých dříve publikovaných studiích se můžeme setkat s chybnou definicí diastasy, neboť je za tento enzym považována vedle α -amylasy i β -amylasa^{12,13}. Tvzení, že med přirozeně obsahuje β -amylasu, bylo definitivně vyvráceno^{4,7,8}. Tyto informace pravděpodobně vznikly z nesprávného odvození specifity původní metody dle Schadeho^{14,15}.

Mezi nejčastější způsob falšování medu patří přídavek škrobových sirupů^{16,17}. Jednou z možností pro potvrzení tohoto způsobu falšování je stanovení zbytkové aktivity cizích enzymů. Jedná se především o identifikaci β - a γ -amylasy⁴. Škrobové sirupy jsou v dnešní době vyráběny především enzymaticky katalyzovanou hydrolyzou škrobu. Nejvýznamnějším světovým zdrojem škrobu pro výrobu škrobových hydrolyzátů je kukuřice¹⁸. Enzymová hydrolyza škrobu zahrnuje dva základní kroky: zkapalnění (ztekucení) a sacharifikaci (zocukření). Při zkapalňovací fázi se uplatňuje dominantně α -amylasa a naopak pro sacharifikaci je používána γ - nebo β -amylasa^{18,19}.

Diastasa je dlouhou dobu v Evropě používána jako indikátor čerstvosti medu, neboť její aktivita klesá během skladování či tepelného ošetření²⁰. Naopak zvýšená aktivita tohoto enzymu může být způsobena botanickým původem (např. med kaštanový, tymiánový²¹) nebo přídavkem cizí amylasy (např. pekařské α -amylasy)⁵. Aktivita diastasy v medu je tradičně měřena pomocí klasické metody dle Schadeho^{14,15} nebo pomocí komerčních výrobků, jako je Phadebas metoda²², případně Alfa Amylase Megazyme test²³ (tab. II). Aktivita diastasy se vyjadřuje jako tzv. diastasové číslo (DN, diastase number) v jednotkách Schadeho, jež je definováno následovně: 1 diastasová jed-

Tabulka I
Přirozené a cizí amylasy v medu^{4,7–11}

Kód	Název enzymu	Typ enzymu; Systematický název	Výskyt v medu	Významné zdroje enzymu
EC 3.2.1.1	α -amylasa	endoglykosidasa; 1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasa	přirozeně se vyskytuje; jediná medová amylasa neboli diastasa	sekret slinných žláz včel; další zdroje <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> aj.
EC 3.2.1.2	β -amylasa	exoglykosidasa; 4- α -D-glukan-maltohydrolasa	nevyskytuje se přirozeně v medu (nektar, medovice ani slinné žlázy včel nejsou zdrojem)	zejména rostlinného původu (ječmen, pšenice, sója); další zdroje bakterie (např. <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> aj.), kvasinky, plísně
EC 3.2.1.3	γ -amylasa	exoglykosidasa; 1,4- α -D-glukan-glukohydrolasa	nevyskytuje se přirozeně v medu (nektar, medovice ani slinné žlázy včel nejsou zdrojem)	zejména mikrobiálního původu (<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>R. delemar</i>)

Tabulka II
Metody stanovení aktivity diastasy v medu^{24–27}

Název stanovení	Substrát	Princip	Výhody; omezení
Metoda podle Schadeho	škrob	komplex škrobu a jodu modré barvy je degradován enzymem za standardních podmínek; měření pokles zbarvení	jednoduchá a finančně nenáročná metoda; měření v omezeném rozsahu absorbancí, časová náročnost
Phadebas metoda	nerozpustný zesíťovaný škrob obsahující modré barvivo	substrát je enzymem hydrolyzován za vzniku modrých, ve vodě rozpustných fragmentů; absorbance roztoku je přímo úměrná aktivitě diastasy	rychlost provedení; větší finanční náročnost, často nutné ředění vzorku
Alfa Amylase Megazyme test	4,6- <i>O</i> -ethyliden- α -4-nitrofenyl-maltoheptaosid (EtPNPG7)	působením enzymu je ze substrátu odštěpen <i>p</i> -nitrofenyl- α -glukopyranosid, který je dále působením α -glukosidasy rozložen na glukosu a <i>p</i> -nitrofenol	rychlost provedení; větší finanční náročnost, stanovení není standardně používáno pro med

notka odpovídá enzymové aktivitě 1 g medu, který může zhydrolyzovat 0,01 g škrobu za 1 h při 40 °C (cit.²⁰). Česká vyhláška č. 76/2003 Sb. (cit.²⁸) definuje minimální aktivitu diastasy na 8 stupňů podle Schadeho. Výjimku tvoří medy s přirozeně nízkým obsahem enzymů (citrusové medy) a obsahem 5-hydroxymethylfurfuralu nižším než 15 mg kg⁻¹, které musí mít aktivitu diastasy nejméně 3 (cit.^{28,29}).

Hlavním cílem této studie bylo zhodnotit specifitu standardních metod pro stanovení aktivity amylas a následně využít zjištěné charakteristiky metod v oblasti hodnocení kvality a autenticity medu. Pro ověření byly využity modelové vzorky medů s přidávkou jednotlivých typů komerčních amylas a reálné vzorky z české tržní sítě. Pro stanovení aktivity diastasy byly ověřeny 3 dostupné metody: metoda podle Schadeho, Phadebas metoda a Alfa Amylase Megazyme test. Pro stanovení β -amylasy byl otestován Beta Amylase Megazyme test, který je založen na štěpení specifického substrátu (*p*-nitrofenyl- β -D-maltotriosid; PNP β -G3) pomocí β -amylasy³⁰. Principem této metody je spektrofotometrické stanovení fenolátového iontu (žlutá barva) při vlnové délce 400 nm, který vzniká při zastavení enzymové reakce z *p*-nitrofenolu³⁰.

Experimentální část

Použité chemikálie a standardy

α -Amylasy (*Aspergillus oryzae*, 30 U/mg, Sigma-Aldrich), β -amylasy (Ječmen, 42 U/mg, Sigma-Aldrich), γ -amylasy (*Aspergillus niger*, 62 U/mg, Sigma-Aldrich), octan sodný trihydrát p.a. (Lach-Ner), hydroxid sodný p.a. (Lach-Ner), kyselina octová ledová 99% (Penta), rozpustný škrob (bramborový, Sigma-Aldrich), jod p.a. (Penta), jodid draselný p.a. (Penta), kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta).

Vzorky

Experimenty byly prováděny na souboru modelových vzorků medů s přidávkou α -, β - nebo γ -amylasy a na reálných vzorcích (H1–H5). Pro modelové vzorky sloužil řepkový med z roku 2016 původem z ČR. Enzymy (α -, β - a γ -amylasy) byly přidávány formou vodného roztoku komerčních preparátů s definovanou aktivitou daného enzymu, přidané množství enzymů bylo následující: autentický med (přídavek 0,0 U/g medu), přídavek 3,0 U/g, přídavek 15,0 U/g a přídavek 30,0 U/g. Reálné vzorky medů pocházely z české tržní sítě; tyto medy byly vytipovány jako podezřelé z falšování na základě předchozí studie³¹ (deklarovaný původ z EU a mimo EU).

Na základě návrhu metody DOE (Design of Experiments) byly ověřeny 4 nedefinované faktory, u kterých bylo předpokládáno, že ovlivňují naměřenou aktivitu diastasy: přídavek α -amylasy, přídavek β -amylasy, přídavek γ -amylasy a tepelný záhřev. Vzorky byly připraveny na základě neúplného faktoriálního experimentu (2ⁿ⁻¹) a jejich označení a specifikace je uvedena v tab. III.

Stanovení aktivity amylas

Pro stanovení aktivity diastasy byly nejprve použity standardní metody pro med: Phadebas metoda²⁶ (Phadebas Honey Diastase test, Magle AB) a metoda podle Schadeho³. Odstředění vzorků bylo provedeno na přístroji Eppendorf centrifuge 5430 a spektrofotometrická koncovka na přístroji Lambda 25 PerkinElmer.

Pro analýzu aktivity vybraných enzymů byly dle návodu výrobce použity následující metody: stanovení aktivity α -amylasy (Alfa Amylase Megazyme test²⁷, Megazyme); stanovení β -amylasy (Beta Amylase Megazyme test³⁰, Megazyme). Spektrofotometrická koncovka analýzy byla provedena na přístroji Lambda 25 PerkinElmer.

Tabulka III

Specifikace modelových vzorků a zjištěná aktivita diastasy

Vzorek	Přídavek α -amylasy	Přídavek β -amylasy	Přídavek γ -amylasy	Záhřev 30 min, 100 °C	Aktivita diastasy [DN] ^a	Aktivita diastasy [DN] ^b
M1	+	–	+	–	42,7	57,4
M2	–	+	+	–	26,9	45,9
M3	+	+	–	–	44,6	61,9
M4	–	–	+	+	0,3	1,6
M5	+	–	–	+	0,1	0,5
M6	–	–	–	–	10,5	14,5
M7	+	+	+	+	0,6	3,2
M8	–	+	–	+	0,3	1,5

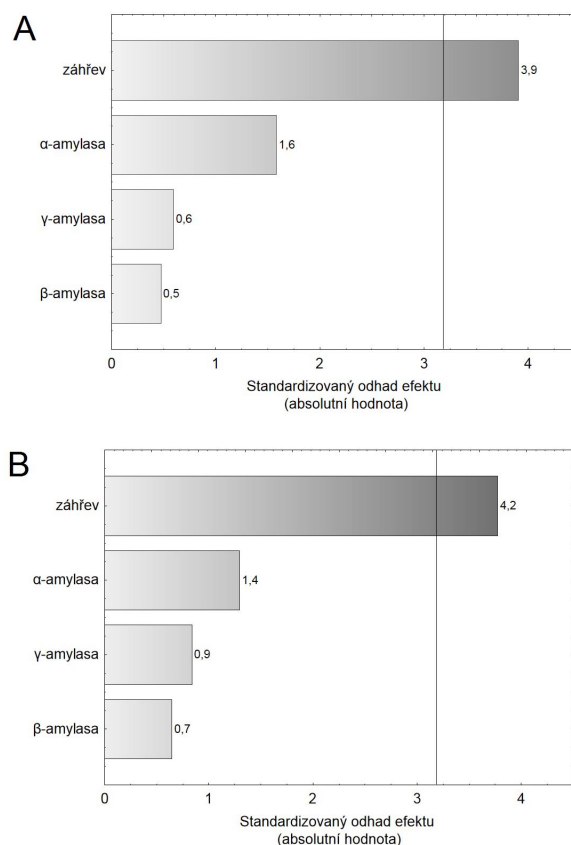
^a DN – Phadebas metoda; ^b DN – metoda podle Schadeho

Výsledky a diskuse

Ověření faktorů, které ovlivňují naměřenou hodnotu aktivity diastasy

Z dostupných zdrojů odborné literatury je zřejmé, že aktivita diastasy je vedle experimentálních podmínek měření ovlivněna celou řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější faktory patří teplota a doba ztekučení, podmínky skladování či intenzita a zdroj snůšky³². V rámci této práce byly pro ověření Phadebas metody a metody podle Schadeho zvoleny takové aspekty (faktory), které mají či mohou mít přímou souvislost s častými způsoby falšování medu. Mezi nejběžnější způsob falšování (poškození) patří nešetrný záhřev, který může být maskován přídavkem cizích amylas^{4,5}. Modelové vzorky byly připraveny pomocí návrhu metody DOE (Design of Experiments), pro kterou byly vybrány 4 faktory: přídavek α -amylasy (+ ANO; – NE), β -amylasy (+ ANO; – NE), γ -amylasy (+ ANO; – NE), záhřev vzorku po dobu 30 min při teplotě 100 °C (+ ANO; – NE). Vzhledem k použití metody DOE bylo možné efektivně snížit počet měření. Složení modelových vzorků medů (M1–M8) je uvedeno v tab. III. Modelové vzorky byly připraveny z řepkového medu a jednotlivé enzymy přidány v množství 15 U/g medu.

Aktivita diastasy jednotlivých modelových vzorků vyjádřená jako DN je uvedena v tab. III. Mezi vzorky jsou na první pohled vidět podstatné rozdíly, které korespondují se způsobem jejich přípravy. Vzorek M6 splňuje hodnotu DN pro autentický med²⁸. Největší hodnoty DN mají vzorky M1 a M3, které obsahují přídavek α -amylasy a β -amylasy nebo γ -amylasy. Nejmenší DN mají naopak vzorky, které byly podrobeny záhřevu (M4, M5, M7 a M8). Vliv jednotlivých faktorů na hodnotu DN je vyjádřen pomocí Paretova diagramu (obr. 1). Z uvedených grafů je zřejmé, že největší vliv na výslednou hodnotu DN má



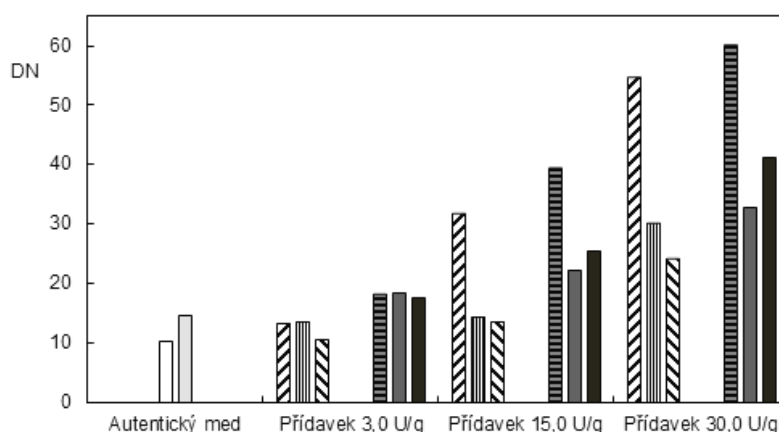
Obr. 1. Pareto diagram standardizovaných efektů ($P = 95\%$); Vliv jednotlivých faktorů (přídavek amylasy; záhřev) na hodnotu DN stanovenou A) Phadebas metodou, B) metodou podle Schadeho

záhřev. Nešetrně vedený záhřev způsobí destrukci většiny přítomných enzymů a tím sníží celkovou nutriční kvalitu medu³³. Ostatní tři uvedené faktory jsou statisticky nevýznamné. Tento fakt může být vysvětlen množstvím přídavných enzymů. Z provedeného měření je možné dojít k závěru, že Phadebas metoda a metoda dle Schadeho jsou vhodné k odhalování záhřevu či dlouhodobého skladování, ale naopak nejsou spolehlivé pro určení přítomnosti cizích enzymů. Ověření faktorů u obou metod poskytlo srovnatelné výsledky.

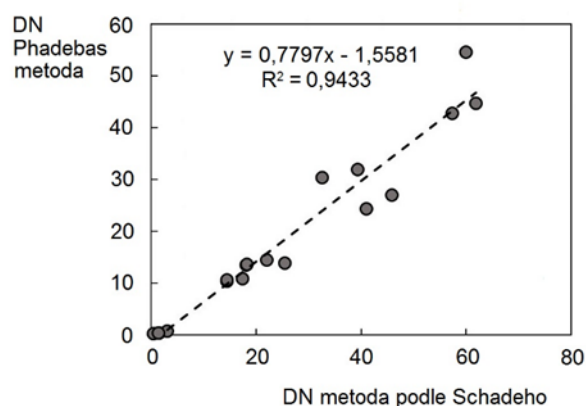
Stanovení aktivity diastasy v medu pomocí standardních metod

První částí měření bylo ověření standardních mezinárodně uznávaných metod pro stanovení aktivity diastasy, tj. Phadebas metody a metody podle Schadeho. Specifita těchto metod byla posouzena měřením modelových vzorků s přídavkem různého množství třech základních typů amylas. Na obr. 2 jsou znázorněny výsledné hodnoty DN pro jednotlivé vzorky. Bylo prokázáno, že metoda podle Schadeho a Phadebas metoda není specifická pouze pro přirozeně se vyskytující α -amylasu. Pomocí Studentova t-testu pro dva výběry s rovností rozptylů byly posouzeny hodnoty DN změřené u vzorků s různými přídavky jednotlivých druhů amylas a porovnány s medem bez přídavných enzymů. V případě α - a β -amylasy je statisticky významné navýšení DN ($P < 0,05$) zaznamenatelné od přídavku 3 U/g medu, uvedené množství cizích enzymů již způsobuje falešně pozitivní nárůst DN. Naopak stejný přídavek γ -amylasy nevyvolá statisticky významnou změnu DN ($P > 0,05$) a přídavek γ -amylasy navyšuje DN od koncentrace 15 U/g medu. Tyto závěry platí pro obě posuzované metody.

Obě metody jsou ze svého principu nejvíce citlivé na zvýšený přídavek cizí α -amylasy, kterou nerozlišují od



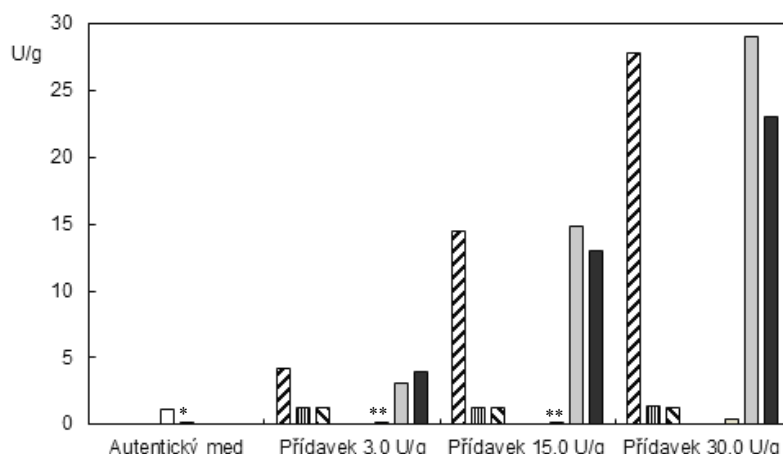
Obr. 2. Ověření standardně užívaných metod: Phadebas metoda (P) a metoda podle Schadeho (S); Závislost hodnoty DN na přídavku jednotlivých amylas; □ P bez přídavku, ▨ P α -amylasa, ▤ P β -amylasa, ▩ P γ -amylasa, ■ S bez přídavku, ▨ S α -amylasa, ▤ S β -amylasa, ▩ S γ -amylasa



Obr. 3. Korelace mezi aktivitou diastasy (DN) stanovenou Phadebas metodou a metodou podle Schadeho; Hodnoceno na modelových vzorcích (celkem 18 hodnot: 8 DOE, 10 přídavky enzymů)

přirozeně se vyskytující diastasy. Zároveň bylo zjištěno, že při použití Phadebas metody, pokud je přidána β -amylasa či γ -amylasa do vzorku (30 U/g medu), je výsledná hodnota DN o 40 %, resp. 50 % nižší než při přídavku α -amylasy o stejné aktivitě (obr. 2); přesto však dojde k navýšení hodnoty DN. Stejný trend lze pozorovat také při použití metody podle Schadeho. Z tohoto faktu je zřejmé, že se reakce zúčastňují všechny přítomné typy amylas, což je velká nevýhoda při posuzování autenticity.

Původní a nejrozšířenější metodou pro hodnocení enzymové aktivity medu je metoda podle Schadeho. V porovnání s výsledky získanými pomocí Phadebas metody je možné pozorovat, že tato metoda poskytuje vyšší hodnoty aktivity diastasy, přesto však výsledky obou metod spolu silně korelují (Pearsonův korelační koeficient $r =$



Obr. 4. Ověření metod pro stanovení α - a β -amylasy: Alfa Amylase Megazyme test (A), Beta Amylase Megazyme test (B); Závislost stanovené aktivity enzymu (U/g) na přídavku jednotlivých amylas; □ A bez přídavku, ▨ A α -amylasa, ▤ A β -amylasa, ▩ A γ -amylasa, ■ B bez přídavku *, ▨ B α -amylasa **, ▤ B β -amylasa, ▩ B γ -amylasa; * U/g < 0,01; ** U/g < 0,10

0,97; obr. 3). Problém s navýšením hodnot u metody podle Schadeho je s velkou pravděpodobností způsoben použitým škrobem. Zjištěné závěry jsou v souladu s dalšími studiemi, v nichž autoři potvrzují silnou korelaci obou metod a uvádějí, že metoda podle Schadeho poskytuje o 30–40 % vyšší hodnoty DN oproti Phadebas metodě^{5,34,35}. Dále je nutné podotknout, že specifita obou metod je velmi podobná. Přidávky α -, β - či γ -amylasy poskytly prakticky stejné navýšení DN. Vzhledem k obtížnosti získávání standardizovaného škrobu a k nespecifickým reakcím na jednotlivé typy amylas, se metoda podle Schadeho jeví jako překonaná.

Kvantifikace vybraných enzymů

Pro kvantifikaci vybraných enzymů byly použity metody založené na specifitě enzymů k substrátu. Tyto metody nejsou běžně používány pro hodnocení medu, přesto se však pro řadu dalších potravinových matric používají. Pro stanovení α -amylasy byl použit enzymový set Alfa Amylase Megazyme test, který využívá substrát EtPNPG7

(cit.²⁷). Tato metoda vykazuje vysokou citlivost a specifitu vůči α -amylase (obr. 4). Stanovená aktivita α -amylasy byla u vzorků s přídavkem β - či γ -amylasy totožná s autentickým vzorkem (bez přídavku cizích enzymů). Z uvedeného je zřejmé, že tato metoda je vhodná pro stanovení α -amylasy a poskytuje významné informace pro hodnocení falšování medu.

β - či γ -amylasa se přirozeně v medu nevyskytuje, a proto je její přítomnost považována za indikátor falšování. Stanovení těchto enzymů provádí v oblasti Střední Evropy především laboratoř Intertek Bremen (Německo)⁴. Pro stanovení β -amylasy byl ověřen komerčně dostupný set Beta Amylase Megazyme test, který je založen na reakci β -amylasy s PNP β -G3 (cit.³⁰). Získané výsledky jsou znázorněny na obr. 4. Tento substrát je výhodný pro svoji absolutní rezistenci vůči α -amylase, ale naopak byla potvrzena jeho reaktivita s β - a γ -amylasou. Pro tyto dva enzymy byly stanoveny velmi podobné hodnoty, tudíž se toto stanovení jeví jako vhodné pro kvantifikaci sumy přítomné β - a γ -amylasy.

Tabulka IV
Analýza medů z tržní sítě

Vzorek	Phadebas metoda [DN]	Metoda podle Schadeho [DN]	Alfa Amylase Megazyme test [U/g]	Beta Amylase Megazyme test [U/g]
H1	3,62	6,50	0,42	< 0,01
H2	4,05	6,41	0,44	< 0,01
H3	6,70	8,63	0,90	0,06
H4	23,64	30,70	1,13	0,09
H5	4,30	7,83	0,91	0,07

Použití metod pro identifikaci falšování medu

Pro posouzení vhodnosti jednotlivých metod pro hodnocení autenticity medu byla provedena analýza podezřelých vzorků dostupných z tržní sítě (tab. IV). Legislativně definovaná minimální hodnota aktivity diastasy je 8 stupňů podle Schadeho; pro β - a γ -amylasu je navržena referenční hodnota $\leq 0,005$ U/g, vzorky s větší aktivitou jsou považovány za falšované⁴. Aktivitu diastasy (stanovenou Phadebas metodou a metodou podle Schadeho) nesplňují vzorky H1, H2 a H5, které byly pravděpodobně zahřáty nebo vystaveny dlouhodobému skladování. U vzorků H3, H4 a H5 byla detegována nadlimitní aktivita β -amylasy. Tyto nálezy nasvědčují, že uvedené medy byly poškozeny přidávkou škrobového hydrolyzátu se zbytkovou aktivitou β - a nebo γ -amylasy.

Závěr

V rámci této studie bylo prokázáno, že Phadebas metoda a metoda podle Schadeho spolu uspokojivě korelují. Hodnota DN stanovená metodou podle Schadeho je však významně ovlivněna výběrem škrobu jako substrátu a v provedeném experimentu poskytovala v průměru o 28 % vyšší výsledky. Obě metody dávají dobré informace o tepelném zacházení s medem, nejsou však schopny odlišit přirozeně přítomné enzymy od těch cizích. Pro bližší rozlišení původu amylas se osvědčily komerční sady. Alfa amylase Megazyme test obsahuje specifický substrát (4,6-O-ethyliden- α -4-nitrofenyl-maltoheptaosid), který je hydrolyzován pouze přítomnou α -amylasou, tudíž nedochází k navýšení hodnoty ostatními amylasami. Pro hodnocení autenticity medu se zdá být nezbytné stanovovat také aktivitu β - a γ -amylasy, což specializované laboratoře již provádějí; testování katalytické aktivity cizích amylas pomocí specifického chromogenního substrátu (*p*-nitrofenyl- β -D-maltotriosid) se jeví pro tyto účely jako slibné. V legislativních předpisech však metody využívající specifické substráty nejsou uvedeny a pro hodnocení medu jsou veřejně dostupné pouze standardní metody schválené Mezinárodní komisí pro med (IHC). Pro kontrolu kvality a autenticity medu by bylo žádoucí navázat na provedený výzkum dalším ověřením navrženého postupu a následným zavedením do kontrolní praxe. Negativním aspektem může být cena analýz, která by byla až 3× vyšší než u standardních metod.

LITERATURA

- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P.: J. Am. Coll. Nutr. 27, 677 (2008).
- Oddo L. P., Baldi E., Accorti M.: Apidologie 21, 17 (1990).
- Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C.: Apidologie extra issue, 1 (1997).
- Intertek Food Services GmbH: *Determination of foreign enzymes in honey to detect adulterations with sugar syrup*. Bremen, Germany 2010.
- Voldřich M., Rajchl A., Čížková H., Cuhra P.: Czech J. Food Sci. 27, 280 (2009).
- Zojancová L., Šebela M.: Chem. Listy 101, 36 (2007).
- Babacan S., Rand A. G.: J. Food Sci. 72, 50 (2007).
- Babacan S., Rand A. G.: J. Food Sci. 70, 413 (2005).
- Stadelmeier M., Berger K. G.: Z. Lebensm. Unters. Forch. 182, 196 (1986).
- Rinaudo M. T., Ponzetto C., Vidano C., Marletto F.: Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 46, 253 (1973).
- Ohashi K., Natori S., Kubo T.: Eur. J. Biochem. 265, 127 (1999).
- Vorlová L., Čelechovská O.: Acta Vet. Brno 71, 375 (2002).
- Huidobro J. F., Santana F. J., Sanchez M. P., Sancho M. T., Muniategui S., Simal-Lozano J.: J. Apic. Res. 34, 39 (1995).
- Schade J. E., Marsh G. L., Eckert J. E.: J. Food Sci. 23, 446 (1958).
- White J. W.: J. Assoc. Off. Agric. Chem. 42, 341 (1959).
- Bogdanov S., Martin P.: Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 93, 232 (2002).
- European Commission, JRC Technical reports: *Results of honey authenticity testing by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry*, JRC104749 (2016).
- Chaplin M., Bucke Ch.: *Enzyme Technology*. Cambridge University Press, Cambridge 1990.
- Polaina J., MacCabe A. P. (ed.): *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, Netherlands 2007.
- White J. W.: Bee World 75, 104 (1994).
- Thrasylvoulou A., Manikis J.: Apidologie 26, 441 (1995).
- Oddo L. P., Pulcini P.: Apidologie 30, 347 (1999).
- McCleary B. V., Sturgeon R.: Cereal Foods World 47, 299 (2002).
- Teitelbaum R. C., Ruby S. L., Marks T. J.: J. Am. Chem. Soc. 100, 3215 (1978).
- Sak-Bosnar M., Sakač N.: Food Chem. 135, 827 (2012).
- Magle AB: *Phadebas Honey Diastase Test: Instructions for use*. Lund, Sweden 2010. <http://www.phadebas.com>, staženo 19. února 2018.
- Megazyme: *Alpha-amylase assay procedure: High sensitivity method for the measurement of α -amylase in cereal grains and food products*. Bray, Ireland 2017. <http://secure.megazyme.com>, staženo 19. února 2018.
- Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Sbírka zákonů 2003, částka 32, str. 2470.
- Směrnice rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 o medu. Úřední věstník Evropské unie 2002, L10/47, str. 47.

30. Megazyme: *Beta-amylase assay procedure*. Bray, Ireland 2010. <http://secure.megazyme.com>, staženo 19. února 2018.
31. Kružík V., Grégrová A., Rajchl A., Čížková H.: *J. Apic. Sci.* 61, 17 (2017).
32. Bogdanov S.: *The Book of Honey*. Bee Product Science 2009. <http://www.bee-hexagon.net>, staženo 19. února 2018.
33. Tosi E., Martinet R., Ortega M., Lucero H., Ré E.: *Food Chem.* 106, 883 (2008).
34. Sakač N., Sak-Bosnar M.: *Talanta* 93, 135 (2012).
35. Kuc J., Grochowalski A., Kostina M.: *Tech. Trans.* 8, 29 (2017).

V. Kružík, A. Grégrová, and H. Čížková
(*Department of Food Preservation, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Verification of Methods Used for Determination of Natural and Foreign Honey Amylases**

Honey is a traditional food with unique nutritional and sensory properties. On the Czech market, however, a large amounts of adulterated honey still appears. The

presence of foreign amylases indicates the addition of starch syrups. Our work focuses on the verification of selected methods for determination of amylases activity in honey. The methods were tested on samples containing defined additions of amylases (α -, β - or γ -amylase) and on the real samples from the Czech market. α -Amylase activity was measured by 3 methods (Schade method, Phadebas method, Alpha Amylase Megazyme test). Beta Amylase Megazyme test was used for determination of β -amylase. The results of the measurements show that the Schade and Phadebas methods are not specific to α -amylase, as opposed to the Alpha Amylase Megazyme test. For determination of foreign amylases (β - and γ -amylase) derived from starch syrups, a Beta Amylase Megazyme test containing *p*-nitrophenyl- β -D-maltotriose substrate is advisable. The analyses carried out show that the methods based on the specific enzyme-catalyzed reaction are suitable for the assessment of honey quality and authenticity, and together with other parameters could contribute significantly to detection of adulterated samples.

Keywords: amylase, diastase, honey, enzymes, adulteration