

Bepaling van het enzym glucose-oxidase in honing

J.D. Kerkvliet, Inspectie Gezondheidsbescherming
Keuringsdienst van Waren, Amsterdam

Samenvatting

Beschreven wordt een snelle semi-kwantitatieve screeningsmethode voor de bepaling van het enzym glucose-oxidase in honing. Bij verdunning van honing met water maakt dit enzym waterstofperoxide vrij. Hiervoor wordt 10 g honing opgelost in 40 ml water. Na 1 uur wordt een peroxide teststrip (Merck) gedurende 1 seconde in de oplossing gestoken en na 15 seconden wordt de blauwe kleur afgelezen met behulp van de kleurschaal. Een waarde 0 kan veroorzaakt zijn door te sterke verwarming van honing, vitamine C of door de eventuele aanwezigheid van het enzym katalase. De verkregen waarde geeft na vermenigvuldiging met 5 de activiteit van glucose-oxidase in microgrammen per gram honing per uur bij 20°C.

Summary

A fast semi quantitative screening procedure is described for the determination of the enzyme glucose-oxidase in honey. Upon dilution of honey with water this enzyme releases hydrogenperoxide. For this 10 g of honey is dissolved in 40 ml water. After 1 hour a peroxide teststrip (Merck) is dipped into the honey solution during one second and the obtained blue colour is read after 15 seconds by means of the colour scale. The obtained value, multiplied by 5, gives the amount of hydrogenperoxide in microgram/gram honey/ hour at 20°C. Zero value may be caused by heated honey, by the presence of vitamine C or by the presence of the enzyme katalase.

Inleiding

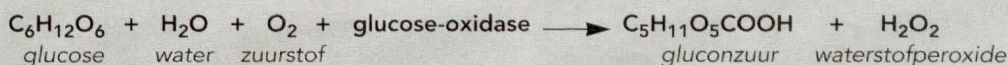
In honing komen verscheidene enzymen voor zoals amylase (diastase) - dat zetmeel omzet in maltose - en invertase, dat saccharose omzet in glucose en fructose. Ook het enzym glucose-oxidase komt in honing voor. Het zet de suiker glucose gedeeltelijk om in

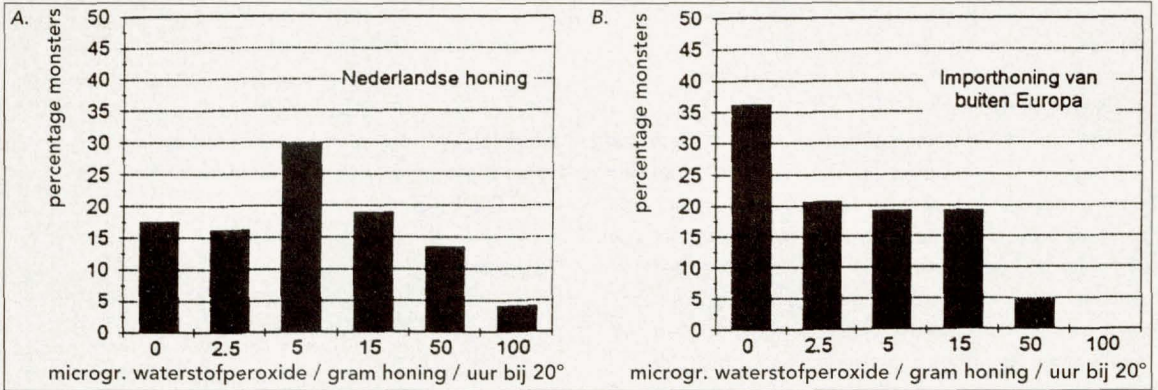
gluconzuur en waterstofperoxide maar alleen als voldoende water (bijvoorbeeld speeksel in de mond) aanwezig is. Voor chemisch geïnteresseerden is het verloop van de reactie onderaan weergegeven.

In honing zelf vindt deze reactie dus niet plaats; pas als honing met voldoende water verdund is kan waterstofperoxide ontstaan. Het glucose-oxidase is - in tegenstelling tot de beide andere genoemde enzymen in honing - wel van belang voor de mens. Het ontstane waterstofperoxide werkt remmend op de groei van ziekteverwekkende bacteriën; vandaar het gebruik van honing bij keelontstekingen. Daar komt bij dat dit waterstofperoxide in honing veel effectiever werkt dan zuiver gekocht waterstofperoxide. Dit vindt zijn ooraak in het feit dat in honing nog allerlei flavonoïden aanwezig zijn die de werking van waterstofperoxide versterken. Zo wordt er ook de laatste jaren in Nederland onderzoek verricht naar de gunstige eigenschappen van honing bij de genezing van brandwonden (1). De bacteriegroeiremmende eigenschappen van honing worden dus veroorzaakt door het enzym glucose-oxidase, door flavonoïden en wellicht nog door andere stoffen zoals onlangs aangetroffen in Manuka honing (2). Het totaal aan deze bacteriegroei remmende stoffen wordt onder de verzamelnaam inhibinen samengevat.

Bepaling van glucose-oxidase

Een bekende methode om het gehalte aan glucose-oxidase in honing te bepalen is de volgende: uit een op een constante pH gehouden verdunde honing-oplossing (pH=6,5) wordt bij 37°C waterstofperoxide ontwikkeld door de activiteit van het in de honing aanwezige glucose-oxidase. Vervolgens wordt de kleur gemeten die met 0-dianisidine en peroxidase in aanwezigheid van waterstofperoxide ontstaat (3). Recent is door het laboratorium van de Keuringsdienst van Waren een zeer eenvoudige semi-kwantitatieve screeningsmethode ontwikkeld. De methode maakt gebruik van de peroxide-teststrips van de firma Merck. Hoewel deze teststrips niet zijn bedoeld voor honing, kunnen ze wel op eenvoudige wijze voor meting in





Figuur. Activiteit van glucose-oxidase uitgedrukt in microgrammen waterstofperoxide gevormd uit één gram honing in één uur bij 20°C. De activiteit van glucose-oxidase werd gemeten m.b.v. de beschreven semi-kwantitatieve test-stripmethode.

honing gebruikt worden. Indien honing (bij voorkeur 10 gram) met de viervoudige hoeveelheid water verdund (40 ml) wordt, vormt zich bij kamertemperatuur (20°C) waterstofperoxide. Uit proefnemingen door de keuringsdienst blijkt dat na ongeveer 1 uur deze ontwikkeling zijn maximum waarde bereikt heeft. Na dat uur wordt een peroxide teststrip 1 seconde in de oplossing gestoken en na 15 seconden de ontstane blauwe kleur afgelezen met behulp van de kleurschaal. Deze schaal loopt van 0 tot 25 mg waterstofperoxide/liter. Het gevonden getal vermenigvuldigd met 5 geeft het aantal microgrammen (1 microgram is 1/1000 mg) waterstofperoxide aan, gevormd door 1 gram honing in 1 uur. Hoe hoger het getal hoe hoger de activiteit van glucose-oxidase in de honing.

Technische uitvoering

Om de bepaling uit te voeren zijn nodig:

- gedestilleerd of gedemineraliseerd water, te koop in elke supermarkt vaak onder de naam demiwater (bijvoorbeeld voor stoomstrijkijzers) voor ca. f 1,- per liter.
- doosje à 100 stuks peroxide teststrips, Merckoquant art.nr. 10.011. Helaas levert de Fa. Boom in Meppel niet langer aan particulieren; de strips moeten gekocht worden via een apotheek of bij voldoende belangstelling via Het Bijenhuis. De kosten zijn ca. f45,- per doosje.

De uitvoering geschiedt als volgt:

Weeg 10 gram honing af en voeg 40 ml (=40 gram) water toe. Los de honing op zonder te verwarmen. Laat de oplossing 1 uur bij kamertemperatuur staan. Steek na die tijd 1 teststrip gedurende 1 seconde in de oplossing en vergelijk na 15 seconden de ontstane

blauwe kleur met de bijgeleverde kleurschaal. Lees het gehalte in mg/liter af. Vermenigvuldig dit getal met 5. Het verkregen getal geeft het gehalte waterstofperoxide in microgrammen afkomstig van het enzym glucose-oxidase uit 1 gram honing in 1 uur bij 20°C. Voorbeeld: een aflezing 2 mg waterstofperoxide/liter betekent dat er 10 microgram waterstofperoxide per gram honing per uur bij 20°C is ontstaan.

In de figuur zijn de resultaten van het onderzoek van 74 Nederlandse honingen en 130 van buiten Europa geïmporteerde honingen in de vorm van een staafdiagram uitgezet.

- resultaten van 74 Nederlandse honingsoorten
- resultaten van 130 buitenlandse honingsoorten

Een waarde 0

Door diverse oorzaken kan een gehalte 0 gevonden worden:

- indien de honing te langdurig en/of bij te hoge temperatuur verhit is geweest. Verwarming van honing bij 70°C gedurende een half uur doet het enzym geheel verdwijnen, terwijl dan toch het enzym amylase (diastase) en invertase voor een groot deel intact blijven. Ook als honing langere tijd wordt bewaard neemt het gehalte sterk af.
- Indien in de honing vitamine C aanwezig is. In dat geval wordt het waterstofperoxide gebruikt om vitamine C te oxideren waardoor geen waterstofperoxide overblijft. Voor zover bekend bevatten alleen thijm- en munthoning vitamine C.
- Indien het enzym katalase aanwezig is. Dit enzym kan in sommige stuifmeelsoorten aanwezig zijn. Katalase ontleedt waterstofperoxide (in water en zuurstof) afkomstig van glucose-oxidase zodra het ontstaat. Het is op dit moment niet bekend of er nog andere

factoren in honing aanwezig zijn die de activiteit van glucose-oxidase remmen.

Resultaten

Gemiddeld is de activiteit van glucose-oxidase in de onderzochte Nederlandse honingmonsters hoger dan in de onderzochte buitenlandse monsters, maar toch heeft 15% van de onderzochte Nederlandse honingen een waarde 0 door één van de hierboven genoemde oorzaken. Ruim 36% van de geïmporteerde honingen bezit de waarde 0, waarschijnlijk ten gevolge van het afvullen van de potjes in Nederland. Wel moet er met nadruk op gewezen worden dat ook al is de waarde 0 de honing meestal wel aan de eisen van het Honingbesluit (Warenwet) voldoet, er zijn geen wettelijke eisen aan het gehalte glucose-oxidase. Wel zou een hoog gehalte bijvoorbeeld kunnen dienen als criterium voor enzymrijke honing. Vergelijken we de gevonden gehalten met de literatuurwaarden (4) dan

blijkt dat de laatste een factor 5-6 hoger liggen dan de screeningswaarden. Dit komt omdat de officiële methode werkt in een gebufferde honingoplossing bij 37°C; onder deze omstandigheden werkt het enzym optimaal. De beschreven methode is als screeningsmethode te gebruiken mits men er bij vermeldt 'bij 20°C'.

Literatuur

- Postmes, Th. (1994). Honing en brandwonden. Tijdschrift voor integrale geneeskunde 9(5): 180-192. (1)
 Molan, P.C., Smith, I.M., Reid, G.M. (1988). A comparison of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. J. Apic. Res. 27(4): 252-256. (2)
 White jr., J.W., Subers, M.H. (1963). Studies on honey Inhibine 2. A chemical assay. J. Apic. res. 2(2): 93-100. (3)
 Dustmann, J.H. (1972). Über den Einfluss des Lichtes auf den peroxid-Wert (Inhibin) des Honings. Z. Lebens.-Unters. u. Forsch. 148(5): 263-268. (4)

bijen

ROBIN



vervolg van vorige maand

