



A kép illusztráció / The picture is illustration

Hársméz diasztázaktivitásának változása hőkezelés hatására, illetve a tárolás során

1. Bevezetés

A mézben található enzimek közül a diasztáz az egyik legnagyobb jelentőségű, a Magyar Élelmiszerkönyv mézre vonatkozó előírása külön határértékeket ad meg erre a paraméterre. A diasztáz-szám általánosan minimum 8 (a definíciót lásd később), illetve az elvárt érték nagyon kis természetes enzimentartalmú mézek esetében legalább 3. A diasztáz (α - és β -amiláz keveréke) keményítő bontó enzim, működése nyomán főleg maltóz keletkezik. Az enzim a méh garatmirigy-váladékából kerül a mézbe az érlelési folyamat során, mennyiségét befolyásolja a nektár összetétele és koncentrációja, a méhek kora és a nektár folyásának intenzitása is [3]. Jelenlétének mértéke a mézben a hamisítatlanság egyik alapvető kritériuma. A jó minőségű mézek diasztázaktivitása általában magas.

A mézek diasztáz tartalma a hosszú ideig tartó tárolás vagy hőkezelés hatására jelentősen csökkenhet, de ismert tény az is, hogy bizonyos mézek esetében (pl. akác, narancs, eukaliptusz) eleve alacsony. Ennek az a magyarázata, hogy egyes növények nektárjaiban nagyobb a szárazanyag tartalom, vagyis a méhek a rövidebb ideig tartó sűrítés során kevesebb enzimanyagot kevernek hozzá. A mézek rutinszerűen vizsgált paramétereinek közül a legnagyobb mérési bizonytalanság a diasztázaktivitás meghatározása során lép fel, ezért nemzetközi körvizsgálatok során az akkreditáló szervezetek az átlagtól való viszonylag nagy (20-30 %-os) eltérést is elfogadnak.

Mézek diasztázaktivitása a keményítőtartalom mértéke alapján határozható meg [2],[4],[6],[7],[8],[9]. A mérés során általában adott koncentrációjú keményítőoldatot és mézet inkubálnak együtt, és a kísérlet végén meghatározzák a visszamaradt (lebontatlan) keményítőoldatot vagy a fragmentumok mennyiségét, többnyire spektrofotometriás módszerrel. Az így meghatározott jellemző érték a Goethe-szám (diasztáz szám), amely megadja, hogy 1 g mézben levő diasztáz enzim hány ml 1 %-os keményítőoldatot képes 1 óra alatt 45-50 °C között lebontani. Általában 10-18 közötti az értéke, egyes fajtamézeknél azonban fajtából eredően lehet alacsonyabb (8-10), illetve magasabb is. Az alsó határ a 8-as érték, ez alatt már romlottnak, rossz minőségűnek tekintik a mézet. A túl alacsony enzimaktivitás éretlenségre, helytelen tárolásra vagy szakszerűtlen hőkezelésre utalhat, ezért a diasztázaktivitás a mézminőség egyik fontos paramétere [1]. Ezt (a tényezőt) nagymértékben befolyásolja a méz savtartalma is: működési optimuma pH 5,0-5,2 között van, semleges pH-n már gyenge az enzimhatás, erősen savas körülmények között (pH < 3,3) pedig gyorsan bomlik.

Jelen közleményünkben a tárolás, illetve a hőkezelés diasztázaktivitásra kifejtett hatásának vizsgálatáról számolunk be hársméz esetén.

¹ Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék - andras.szabo@uni-corvinus.hu

¹ Corvinus University of Budapest, Department of Food Chemistry and Nutrition - andras.szabo@uni-corvinus.hu

2. Anyag és módszer

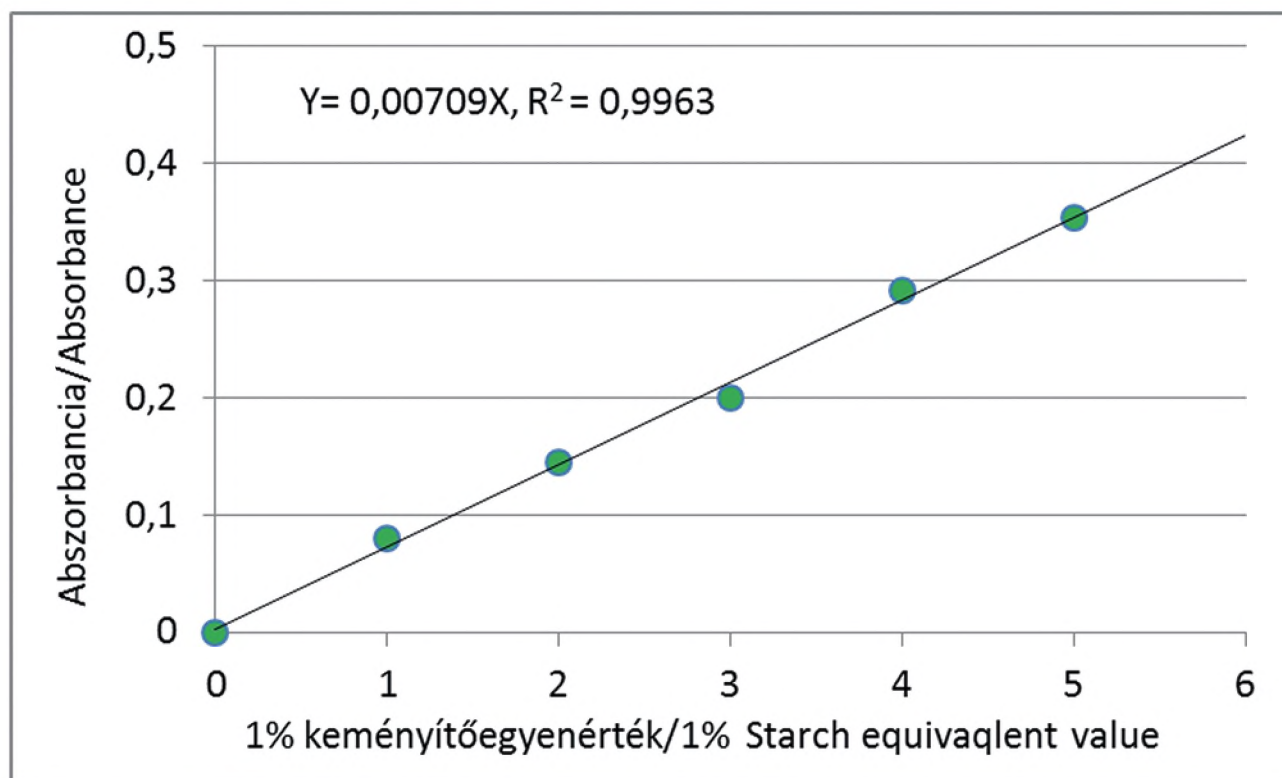
A diasztázaktivitás vizsgálatára saját módszert dolgoztunk ki, amely lényegében hasonló a széles körben alkalmazott Goethe-féle eljáráshoz, amellyel nem dinamikus, hanem statikus módon vizsgálja a diasztázaktivitást: adott ideig (1 óráig) zajló enzimreakciót valósít meg. Hasonlít ugyanakkor a Schade-White-Hadorn módszerhez is, mivel a meghatározás jód-keményítő színreakció vizsgálatán alapul, és a diasztázaktivitást spektrofotometriás úton adja meg. A szabványban rögzített módszerektől eltérően a kidolgozott metodikában az eredményeket kalibrációs egyenes segítségével lehet értelmezni.

Vizsgálatainkhoz kereskedelmi forgalomból származó hársmézet használtunk. A hőkezelés enzimaktivitásra kifejtett hatását 75 illetve 90 °C-on történő kezeléssel, a tárolás hatását pedig 10 és 30 °C-on való tárolással modelleztük. A keményítőt bontást és a jódvaló színreakciót követően 600 nm-en spektrofotometriás vizsgálatot végeztünk. A külön-

böző koncentrációjú keményítőoldatok segítségével felvett kalibrációs egyenessel meghatározható az adott kémcsőben le nem bontott 1 %-os keményítőnek megfelelő keményítő mennyiség.

3. Vizsgálati eredmények és értékelésük

A diasztáz aktivitás mérésére kidolgozott módszer alapján kalibrációs egyenes segítségével lehet az eredményeket megadni. A vizsgálatnál alkalmazott kalibrációs egyenes lefutása, egyenlete és a korrelációs koefficiens az **1. ábrán** látható. Mivel módszerünk - eltérően a döntő módszertől - nem figyeli az enzimreakció időbeli lefutását, hanem csak egy konkrét, 1 órás időintervallumot vizsgál, így statikus diasztázaktivitás-vizsgálatnak neveztük el, a megadandó eredményt pedig megkülönböztetésül statikus diasztázaktivitásnak. Az alkalmazott új módszert összevetettük a szabványban rögzített, Goethe-féle módszerrel, melynek eredménye saját módszerünk alkalmazását támasztotta alá.



1. ábra. A diasztáz aktivitás mérésnél alkalmazott kalibrációs egyenes (mérési hullámhossz: 600 nm)
Figure 1 Measurement calibration curve of the diastase activity (the used wavelength 600 nm)

A hőkezelés enzimtevékenységre gyakorolt hatását vizsgálva arra az eredményre jutottunk, hogy mind a 75 °C-os, mind a 90 °C-os hőterhelés hatására csökkent a diasztáz aktivitás. Ez a jelenség az enzim fehérje természetével magyarázható, mivel az a hőkezelés hatására – részben vagy egészben – denaturálódott, így keményítőt bontó tulajdonsága is károsod-

dást szenvedett. A grafikus ábrázolásból (**2. ábra**) jól kitűnik, hogy a statikus diasztázaktivitás-csökkenés sokkal nagyobb mértékű a magasabb hőmérsékletű kezelés hatására (több mint 7-szeres), ugyanakkor mindkét hőmérséklet esetében lineáris jellegű a változás.

Changes in the diastase activity of linden honey due to heat treatment, and during storage

Mariann Csóka¹, Pál Tolnay¹, András S. Szabó¹

1. Introduction

Of the enzymes found in honey, diastase is one of the most important ones, in fact, there is a separate limit value given for this parameter in the regulation of the Hungarian Food Codex regarding honey. Generally, the minimum diastase number is 8 (see definition later), or in the case of honey with low natural enzyme content, the expected value is at least 3. Diastase (a mixture of α - and β -amylase) is an enzyme that breaks down starch, which results mainly in maltose. The enzyme enters the honey during ripening from the hypopharyngeal secretions of bees, and its quantity is influenced by the composition and concentration of the nectar, the age of the bees and the intensity of the nectar flow [3]. Its presence in honey is one of the basic criteria of genuineness. Good quality honey usually has a high diastase activity.

The diastase content of honey can decrease significantly due to long-term storage or heat treatment, but is also known that certain types of honey (e.g. acacia, orange, eucalyptus) contain low concentrations of diastase to begin with. This is explained by the fact that the nectar of certain plants has a higher dry matter content, therefore, less enzyme material is added to it during the shorter thickening period by the bees. Of the parameters routinely analyzed in honey, determination of diastase activity has the highest measurement uncertainty, therefore, relatively large deviations (20 to 30%) from the average are accepted by accreditation bodies during international proficiency tests.

The diastase activity of honey can be determined based on the degree of degradation of starch [2],[4],[6],[7],[8],[9]. Generally, a starch solution of a given concentration and honey are incubated together, and at the end of the experiment either the amount of remaining (undegraded) starch solution or that of the fragments is determined, usually by a spectrophotometric method. The characteristic value thus determined is the Goethe number (diastase number), which specifies the amount of 1% starch solution in ml that is degraded over one hour at 45-50 °C by the diastase enzyme contained in 1 g of honey. This value is usually somewhere between 10 and 18, but in the case of certain types of honey it can be lower (8-10) or higher, depending on the species. The lower limit is 8, below this the honey is considered spoiled or bad quality. Too low enzyme activity might indicate unripeness, inappropriate storage or improper heat treatment, therefore, diastase activity is one of the important parameters of honey qualification [1]. This factor is also greatly influenced by the acid content of honey: its optimum operating pH is between 5.0 and 5.2, at neutral pH the enzyme activity is low, and at strongly acidic pH (pH < 3.3) the enzyme decomposes rapidly.

In the present paper, investigations of the effects of storage and heat treatment on diastase activity are reported, in the case of linden honey.

2. Materials and methods

A proprietary method for the determination of diastase

activity was developed, which is essentially similar to the widely used Goethe procedure, measuring diastase activity not in a dynamic, but a static way: it is an enzyme reaction lasting a certain amount of time (1 hour). It is also similar to the Schade-White-Hadorn method, because the measurement is based on a colour reaction between iodine and starch, and diastase activity is determined spectrophotometrically. Unlike the methods listed in the standards, interpretation of the results in the newly developed method is performed with the help of a calibration curve.

For our analyses we used commercially available linden honey. The effect of heat treatment on enzyme activity was simulated by treatment at 75 and 90 °C, while that of storage by storage at 10 and 30 °C. Spectrophotometric analysis was performed at 600 nm after starch degradation and the colour reaction with iodine. The amount of starch corresponding to the 1% starch solution not degraded in the given test tube can be determined using the calibration curve recorded with the help of different concentration starch solutions.

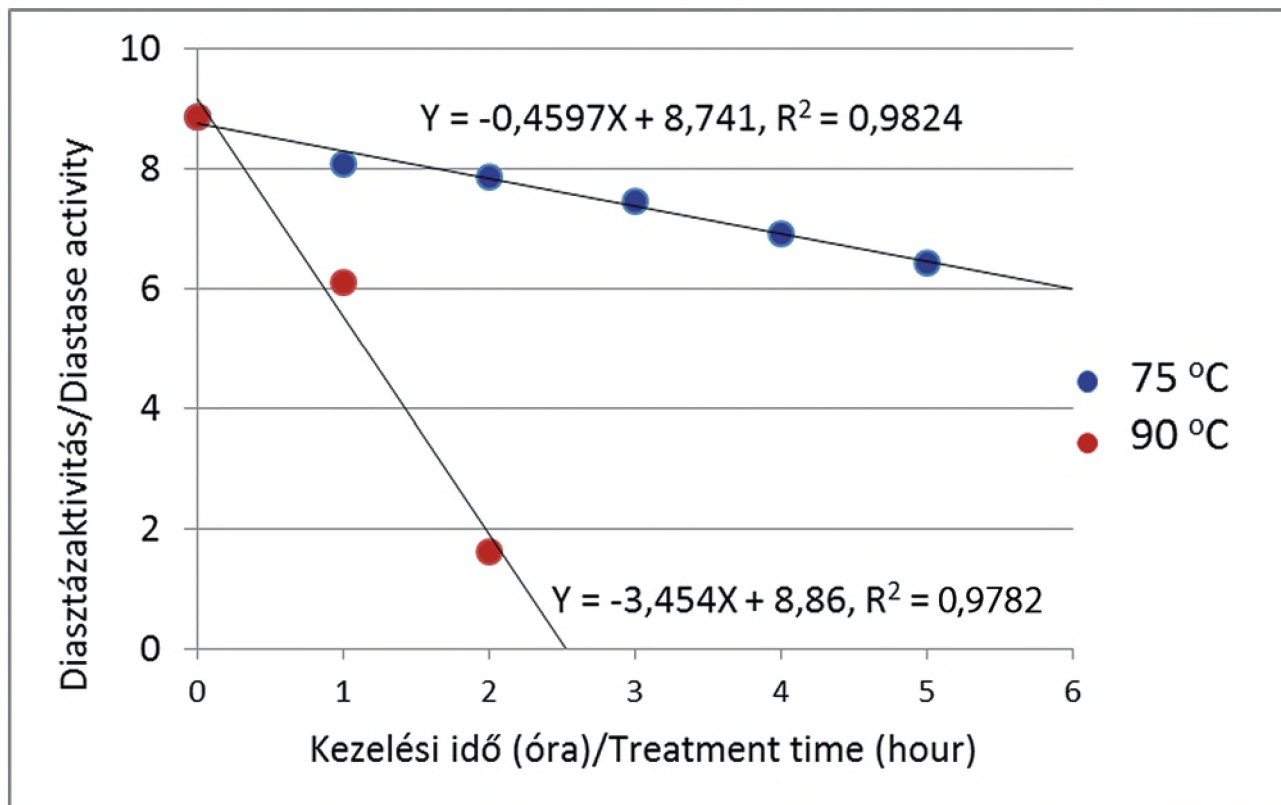
3. Analytical results and their interpretation

Based on the method developed for the measurement of diastase activity, results are given with the help of a calibration curve. The run of the calibration curve, its equation and the correlation coefficient are shown in **Figure 1**. Since our method – unlike the decisive method – does not monitor the course of the enzyme reaction over time, but only analyses a specific 1-hour time period, therefore, we decided to call it a static diastase activity test, and the result we call static diastase activity, to differentiate from the previous one. The newly developed method was compared to the standard Goethe method, and the result proved the suitability of our proprietary method.

When investigating the effect of heat treatment on enzyme activity, it was found that heat treatment at both 75 and 90 °C resulted in decreased diastase activity. This phenomenon can be explained by the protein nature of the enzyme, because it was – partially or completely – denatured due to heat treatment, and so its starch degrading property was damaged. It is clear from the graphic representation (**Figure 2**) that the decrease in static diastase activity is much more pronounced (more than 7-fold) when heat treatment is performed at a higher temperature, but changes are linear in the case of both temperatures.

Despite different storage conditions (10 °C and 30 °C), changes in diastase enzyme activity were similar (**Figure 3**). In both cases, enzyme activity decreased, the decrease was linear, but approximately 1.6 times faster when stored at 30 °C than at 10 °C. After storing honey for 90 days at the latter temperature, diastase activity was almost as low as that after heat treatment at 75 °C for 5 hours. In other words, prolonged storage at low temperatures has a similar inhibitory effect on enzyme activity as heat treatment at 75 °C for 5 hours. Storage at 30 °C decreased enzyme activity even more forcefully. Based on the results described above it can be stated that the extent of enzyme damage due to improper storage can be even greater than changes in the case of honey undergoing a short heat treatment.

The slopes of the calibration curves obtained for honey samples stored at 30 °C, and heat treated at 75 and 90 °C were plotted as a function of the temperature, and a curve



2. ábra A vizsgált méz minta statikus diasztáz aktivitásának változása 75 és 90 °C-os hőkezelés hatására a kezelési idő függvényében
 Figure 2 Alteration of static diastase activity on 75 and 90 °C in the versus of time

A diasztáz enzim aktivitása az eltérő tárolási körülmények (10 °C és 30 °C) ellenére jellegében hasonló változást mutatott (3. ábra). Mindkét esetben csökkent az enzimaktivitás, a csökkenés lineáris, ugyanakkor 30 °C-os tárolás hatására mintegy 1,6-szor gyorsabb, mint 10 °C-on. Ez utóbbi hőmérsékleten 90 napig tárolva a mézet, a diasztáz aktivitás közel olyan alacsony szintre csökkent, mint az 5 órán át tartó 75 °C-os hőkezelés hatására. Vagyis a huzamosabb ideig tartó alacsony hőmérséklet, hasonló gátló

hatást fejt ki az enzim működésére, mint az 5 órán át tartó 75 °C-os hőmérsékletű hőkezelés. A 30 °C-os tárolás még erőteljesebben csökkentette az enzimaktivitást. A leírt eredményekből megállapítható, hogy a helytelen tárolás hatására az enzimmárosodás mértéke akár nagyobb is lehet, mint egy rövid ideig tartó hőkezelésnek alávetett méz esetében fellépő változás.



A kép illusztráció / The picture is illustration

was fitted to these points. This showed an exponential relationship. Based on the curve obtained, one can estimate the expected hourly decrease in diastase activity of a honey stored/treated at a given temperature, as shown in **Figure 4**. It can be calculated from this, how long a honey with a given diastase activity stored or treated at a certain temperature will satisfy the requirements of the Hungarian Food Codex [5]. According to the equation describing the curve, it can be estimated, for example, that the shelf life of a honey with a diastase activity of 15 (and with low HMF content) will be roughly 200 days when stored at 35 °C, but at 100 °C, even a treatment of 55 minutes has fatal effects.

This means that processes that take place in honey due to storage or heat treatment can be followed by analysing

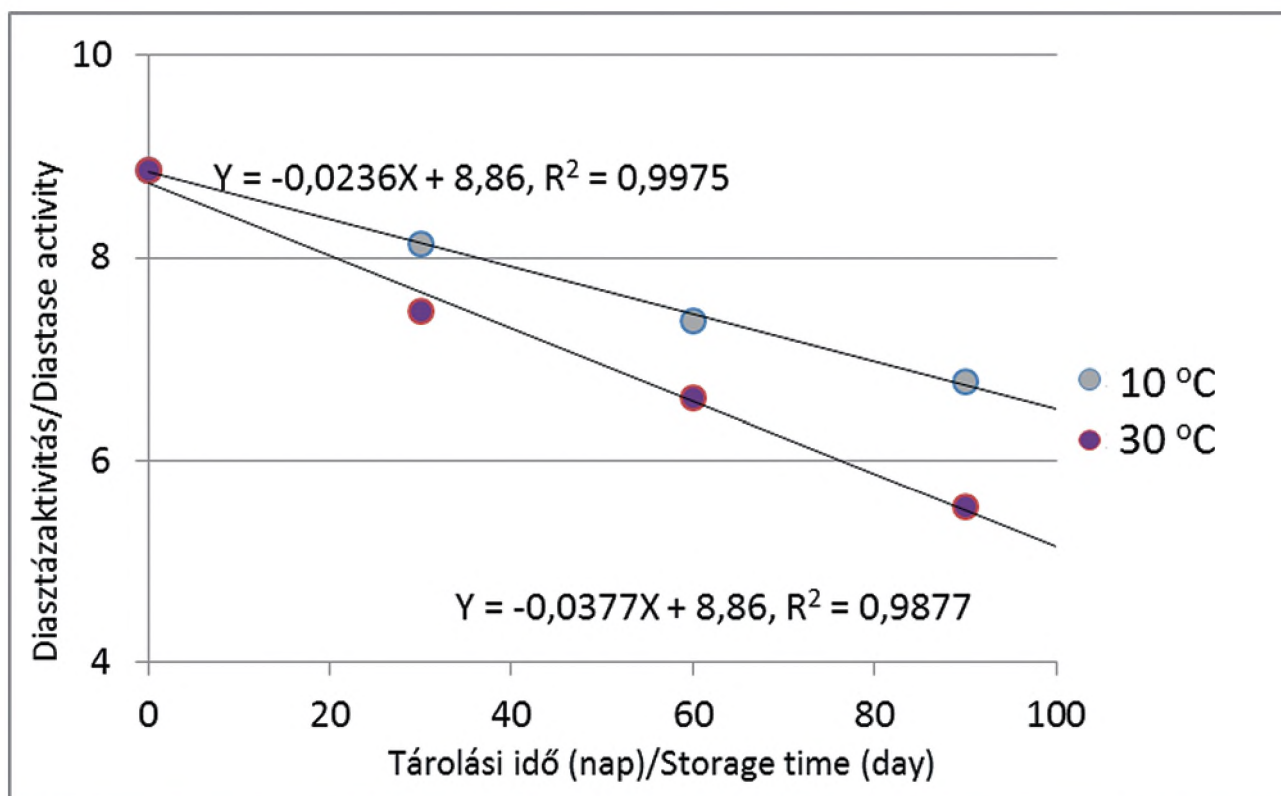
changes in diastase activity. Due to improper storage or processing the diastase activity of honey can easily fall below levels prescribed by relevant regulations.

4. Summary

Improper storage or excessive heat treatment of honey is indicated by the decrease in diastase enzyme activity. Because of the protein nature of the enzyme, this decrease in activity is more pronounced at higher temperatures. Damage to diastase – and, thus, a decrease in its operability – was already observable during the treatment of linden honey at 75 °C, but at 90 °C, the starch degrading activity of the enzyme was completely gone in a few hours. The activity of the enzyme also decreased during storage, but this decrease proved to be marginal.



A kép illusztráció / The picture is illustration



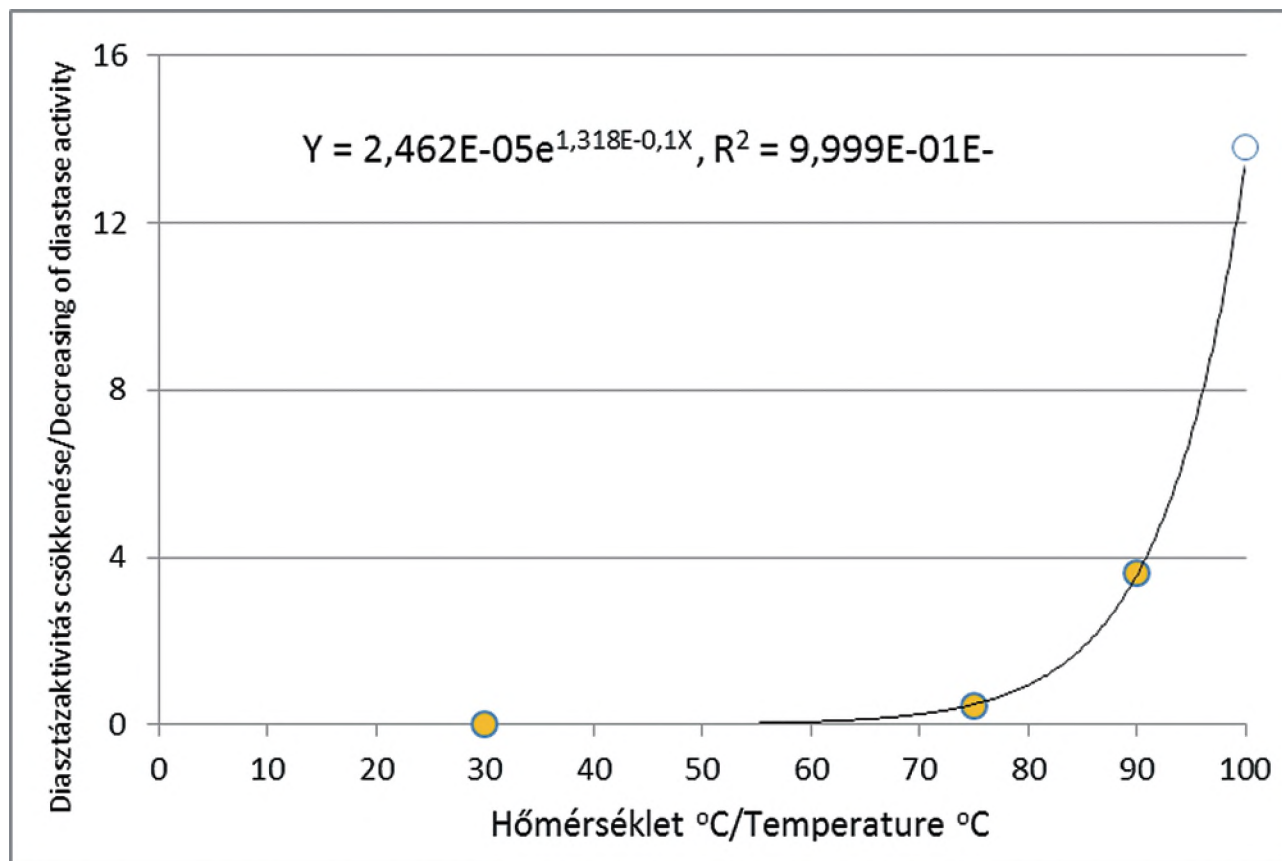
3.ábra A statikus diasztáz aktivitás változása 10 és 30 °C-on tárolt méz minta esetében a tárolási idő függvényében
 Figure 3 Alteration of static diastase activity of honey sample on 10 and 30 °C in the versus of storage time

A 30 °C-on tárolt, valamint a 75 és 90 °C-on hőkezelt méz mintákra kapott egyenesek iránytangenseit a hőmérséklet függvényében vettük fel, illetve görbét illesztettünk rá. A kapott összefüggés exponenciális jellegű volt. A kapott görbe alapján megbecsülhető egy adott hőmérsékleten tárolt-kezelt méz várható diasztázaktivitás-csökkenése óránként, amint az a **4. ábrán** is látható. Ebből kiszámítható, hogy egy adott diasztázaktivitású méz az alkalmazott tárolási-keze-

lési hőmérsékleten mennyi ideig felel meg a Magyar Élelmiszerkönyvben [5] előírt követelménynek. A görbét leíró egyenlet alapján megbecsülhető például, hogy egy 15-ös diasztázaktivitású (és egyben alacsony HMF tartalmú) méz 35 °C-on tárolva mintegy 200 napig tartja meg minőségét, 100 °C közelében pedig már 55 perces kezelés is végzetes hatású.



A kép illusztráció / The picture is illustration



4. ábra. A diasztáz aktivitás csökkenése óránként a tárolási-kezelési hőmérséklet függvényében
Figure 4 Decreasing of diastase activity in the versus of the temperature of storage and treatment

A mézben a tárolás illetve a hőkezelés hatására végbemenő folyamatok tehát a diasztázaktivitás alakulásának vizsgálatával is nyomon követhetők. A helytelen tárolás illetve feldolgozás hatására a méz diasztáz aktivitása akár a vonatkozó előírás által megengedett érték alá is csökkenhet.

4. Összefoglalás

A méz nem megfelelő tárolását illetve túlzott hőkezelését a diasztáz enzim aktivitásának csökkenése jelzi. Az enzim fehérje jellegének köszönhetően ez az aktivitáscsökkenés magasabb hőmérsékleten intenzívebb. A diasztáz károsodása – és így működőképességének csökkenése – már a hárméz 75 °C-on történő kezelése során észrevehető volt, de 90 °C-on az enzim keményítőbontó aktivitása néhány óra alatt teljesen megszűnt. A tárolási vizsgálat során is csökkent az enzim működése, de ez a csökkenés csak csekély mértékűnek bizonyult.

5. Irodalom / References

- [1] Amtmann, M. (2009): Különleges fajtamézek botanikai eredetének és illó komponenseinek összefüggése, Doktori értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, p. 131
- [2] Bentabol Manzanares, A., Hernández García, Z., Rodríguez Galdrón, B., Rodríguez Rodríguez, E., Díaz Romero, C. (2014): Physicochemical Characteristics of Minor Monofloral Honeys from Tenerife, Spain,

LWT - Food Science and Technology, 55 p. 572-578

- [3] Czipa, N. (2010): Különböző eredetű mézek összehasonlító vizsgálata és a gyártmánykialakítás hatása a minőségre, Doktori értekezés, Debreceni Egyetem, p. 142

- [4] Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. (2007): Biological Activities and Chemical Composition of three Honeys of Different Types from Anatolia, Food Chemistry, 100 p. 526-534

- [5] Magyar Élelmiszerkönyv, 1-3-2001/110 számú előírása a mézről / Codex Alimentarius Hungaricus, 1-3-2001/110 Honey

- [6] Moreira, R. F. A., De Maria, C. A. B., Pietrolungo, M., Trugo, L. C. (2007): Chemical Changes in the Non-volatile Fraction of Brazilian Honeys During Storage Under Tropical Conditions, Food Chemistry, 104 p. 1236-1241

- [7] Özcan, M., Arslan, D., Ceylan, D. A. (2006): Effect of Inverted Sacharose on Some Properties of Honey, Food Chemistry, 99 p. 24-29

- [8] Tosi, E., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L. (2004): Effect of Honey High-temperature Short-Time Heating on Parameters Related to Quality, Crystallisation Phenomena and fungal Inhibition, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 37 p. 669-678

- [9] Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Ré, E. (2008): Honey Diastase Activity Modified by Heating, Food Chemistry, 106 p. 883-887