Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 53 (1962)

Heft: 1

Artikel: Zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität in Honig

Autor: Hadorn, H. / Zürcher, K.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982547

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 22.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität in Honig

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*
(Laboratorium VSK, Basel)

Von den verschiedenen im Bienenhonig vorkommenden Enzymen eignet sich die Saccharase besonders gut zum Nachweis von Ueberhitzungsschäden, weil sie zu den wärmeempfindlichsten Honigenzymen gehört. *Kiermeier* und *Köberlein* [1] haben als erste vorgeschlagen, zum Erhitzungsnachweis neben der Amylase- auch die Saccharase-Aktivität heranzuziehen. Aus der Bestimmung nur eines Enzyms läßt sich nach diesen Autoren nicht mit Sicherheit auf die Stärke des Erhitzungseinflusses schließen.

Gontarski [2] einerseits, *Duisberg* und *Gebelein* [3] anderseits haben die Befunde von *Kiermeier* und *Köberlein* überprüft und bestätigt. Nach *Gontarski* wird bei 24stündiger Erwärmung des Honigs auf 50° die Diastase nicht oder nur unbedeutend geschädigt, während die Saccharase in allen Honigen ziemlich stark geschädigt wird. Die Bedeutung der Honigsaccharase für die Beurteilung von Wärmeschädigungen von Honig ist somit unbestritten.

Die vorgeschlagenen Methoden zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität und die Einheiten, in denen die Saccharase-Aktivität ausgedrückt werden, sind je nach Autoren vollständig verschieden. Für die neue Auflage des Schweizerischen Lebensmittelbuches sollte eine geeignete Methode zur Saccharasebestimmung in Honig gewählt werden. Erwünscht wäre eine möglichst einfache Methode, die gut reproduzierbare Werte liefert und auch für Serienuntersuchungen brauchbar wäre. In dieser Arbeit sollen 3 Methoden überprüft und diskutiert werden. Damit die Resultate der verschiedenen Autoren miteinander verglichen werden können, wurde eine neue Kennzahl für Honig, die sogenannte Saccharasezahl (Sa-Z) eingeführt. Die bereits veröffentlichten Saccharase-Aktivitäten lassen sich auf diese Weise in vergleichbare Einheiten umrechnen.

An verschiedenen Honigen des In- und Auslandes sollen anschließend die Saccharasezahlen sowie einige andere wichtige Kennzahlen bestimmt werden, um die nötigen Grundlagen für die Beurteilung von Honigen zu erhalten.

Methoden zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität

Die Saccharase-Aktivität wird immer nach dem gleichen Prinzip bestimmt. Unter genau vorgeschriebenen Versuchsbedingungen (konstante Temperatur, pH-Wert usw.) läßt man die Saccharase oder die Honiglösung auf eine Saccharoselösung einwirken und bestimmt die in einer gewissen Zeit gebildete Menge Invertzucker entweder chemisch oder polarimetrisch.

Ueber die Bestimmung der Saccharase-Aktivitiät in Honig sind in neuerer Zeit 3 Methoden veröffentlicht worden. Die Versuchsbedingungen wurden von den verschiedenen Autoren recht unterschiedlich gewählt. In der Tabelle 1 sind

Tabelle 1

Beaktionsbedingungen für Saccharasebestimmung nach verschiedenen Autoren

Versuchsbedingungen	*Kiermeier* und *Köberlein* [1]	*Gontarski* [2]	*Dusiberg* und *Gebelein* [3]
Pufferung	pH = 4,6	pH = 6,8 pH = 6,3 pH = 6,0 } 3 Ansätze	pH = 6,2—6,45
Temperatur	30° C	35° C	40° C
Reaktionszeit	2 Stunden	2 Stunden	1½ Stunden
In 100 ml Reaktionsmischung sind enthalten:			
Honig	1—1,6 g (Honig dialysiert)	2,5 g	10 g
Saccharose	5,0 g	10,0 g	20 g
Puffer (1-m)	4 ml	~ 3 ml	6 ml
Bestimmung des gebildeten Invertzuckers	jodometrisch mit Hypojodit	jodometrisch mit $K_3[Fe(CN)_6]$	polarimetrisch
Berechnung und Angabe der Aktivität	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k in ml 0,1-n $Na_2S_2O_3 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$	mg Saccharose, die in 2 Stunden von 50 mg Honig gespalten werden	Aenderung der opt. Drehung in Kreisgraden pro Stunde

die Reaktionsbedingungen und die wichtigsten Merkmale der 3 Methoden zusammengestellt.

Eine Schwierigkeit bei der Saccharasebestimmung besteht darin, daß durch die stets nur in sehr geringer Menge vorhandene Honigsaccharase in den gewählten Zeiträumen von 1 bis 2 Stunden nur relativ wenig Invertzucker gebildet wird. Diese kleinen Mengen Invertzucker müssen neben viel Glucose und Fructose, die aus dem Honig stammen, bestimmt werden. Durch diese Differenzbestimmung wird die Methode, vor allem, wenn die Zucker chemisch bestimmt werden, etwas ungenau.

Kiermeier und *Köberlein* [1] dialysieren daher die abgewogene Honigprobe in einem Cellophanschlauch, bis sie zuckerfrei ist. Die gepufferte Enzymlösung lassen sie auf eine Saccharoselösung einwirken und bestimmen von Zeit zu Zeit die durch Inversion gebildete Glucose jodometrisch. Das Verfahren ist etwas umständlich, aber genau. Nach Angaben der Autoren beträgt die Streuung ± 3,1 %.

Gontarski [2] arbeitet unter anderen Bedingungen. Er läßt den Honig direkt auf die gepufferte Saccharoselösung einwirken und bestimmt nach 2 Stunden die Zunahme der reduzierenden Zucker nach *Issekutz* [4] mit Kaliumferricyanidlösung jodometrisch.

Duisberg und *Gebelein* [3] wählten wiederum andere Versuchsbedingungen und bestimmen die durch die Honiginvertase verursachte Abnahme der optischen Drehung polarimetrisch (Inversion von Saccharose).

Definition und Berechnung der Saccharasezahl

Die verschiedenen Autoren geben die im Honig gefundenen Saccharase-Aktivitäten in ganz unterschiedlichen Einheiten an. *Kiermeier* und *Köberlein* berechnen die Geschwindigkeitskonstante. *Gontarski* gibt an, wie viele mg Saccharose in 2 Stunden durch 50 mg Honig invertiert werden. *Duisberg* wiederum drückt seine polarimetrisch bestimmten Saccharase-Aktivitäten in Kreisgraden aus (siehe Tabelle 1). Es ist daher kaum möglich, die nach den 3 Methoden erhaltenen Werte auch nur größenordnungsmäßig miteinander zu vergleichen. Wir möchten daher vorschlagen, für die Saccharase-Aktivität eine analoge Einheit zu definieren, wie dies *Schade, Marsh* und *Eckert* [5] für die Diastase gemacht haben. In Analogie zu jener Definition versteht man unter einer *Saccharase-Einheit* jene Enzymmenge, die unter den vorgeschriebenen Versuchsbedingungen in 1 Stunde 10 mg Saccharose spaltet. Die *Saccharasezahl* (Sa-Z) gibt an, wie viele Saccharase-Einheiten in 1 g Honig enthalten sind. Etwas anders und einfacher ausgedrückt lautet die gleiche Definition für die Saccharasezahl (in Analogie zur Jodzahl) wie folgt:

Die Saccharasezahl gibt an, wieviel g Saccharose unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in einer Stunde von den in 100 g Honig enthaltenen Enzymen gespalten werden.

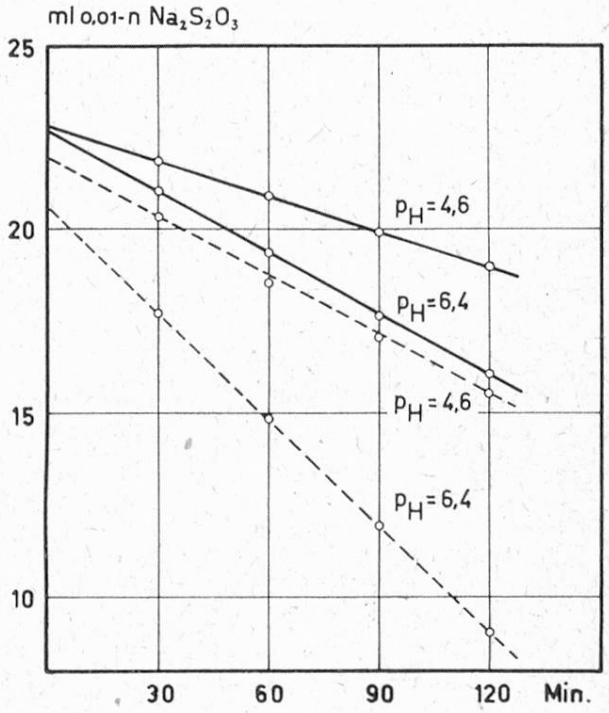
Wie später gezeigt wird, laufen in der Praxis neben der Inversion von Saccharose noch Nebenreaktionen ab. Die Saccharasezahl gibt daher meistens keine absoluten Werte und variiert auch etwas je nach der angewandten Zuckerbestimmungsmethode. Um die Resultate streng miteinander vergleichen zu können, müssen die Saccharasezahlen nach ein und derselben Methode bestimmt werden.

Mittels dieser Definition lassen sich die von verschiedenen Autoren gefundenen Werte in vergleichbare Einheiten umrechnen. Die von *Gontarski* angegebenen Werte stimmen zahlenmäßig bereits mit unserer Definition überein. Die Umrechnungsfaktoren für die beiden andern Methoden werden in den entsprechenden Abschnitten bei der Besprechung dieser Methoden abgeleitet.

Versuche zur Methode von *Kiermeier* und *Köberlein*

Kiermeier und *Köberlein* [1] dialysieren die Honigprobe in einem Cellophanschlauch, um den Zucker zu entfernen. Die von Zuckern und andern niedermolekularen Bestandteilen befreiten Honigenzyme werden unter definierten Bedingungen auf eine Saccharoselösung einwirken gelassen. Von Zeit zu Zeit werden Proben aus dem Reaktionsgemisch herauspipettiert und die aus dem Rohrzucker gebildete Glucose jodometrisch bestimmt (Aldosenbestimmung mit Hypojodit).

Die von den Autoren gewählten Bedingungen sind jedoch nicht optimal. Die benutzte Pufferlösung pH = 4,6 ist viel zu sauer. Bei höherem pH ist nach Versuchen von *Gontarski* [2], der ein Optimum der Honigsaccharase ungefähr bei pH = 6,3 festgestellt hat, mit einer höheren Saccharase-Aktivität zu rechnen. Um dies zu überprüfen, haben wir Honigproben von 1,4 bis 2 g nach *Kiermeier* und *Köberlein* während 3 bis 4 Stunden dialysiert und die dialysierte Lösung aus dem Cellophanschlauch in ein 50-ml Meßkölbchen übergeführt. In aliquoten Teilen (je 20 ml) dieser Stammlösung wurde die Saccharase-Aktivität nach *Kiermeier* und *Köberlein* bestimmt. Ein Versuch wurde bei pH = 4,6, der andere bei pH = 6,4 durchgeführt. Dazu werden je 20 ml Stammlösung in ein 50-ml Meßkölbchen abpipettiert, mit 1 ml 1-m Acetatpuffer versetzt und auf 30° C



Figur 1

Saccharase-Aktivität nach *Kiermeier* und *Köberlein*. Zeit-Umsatz-Kurven bei verschiedenem pH

——— Mexikanischer Honig
- - - - Schweizer Honig

thermostatiert. Nach ca. 15 Minuten wurden genau 2,5 g Saccharose zugegeben und durch Schütteln möglichst rasch in Lösung gebracht. Anschließend wurde das Kölbchen mit 30° warmem Wasser zur Marke aufgefüllt. In Abständen von je 30 Minuten wurden aus dem Reaktionsgemisch mittels Pipette 4mal Proben von je 10 ml entnommen. Zur Bestimmung der gebildeten Glucose trägt man die 10 ml Lösung in 25 ml 0,01-n Jodlösung ein, versetzt mit ca. 10 ml 0,1-n Natriumkarbonatlösung, läßt 30 Minuten verschlossen stehen und titriert nach dem Ansäuern mit 5 ml 0,5-n Schwefelsäure den Jodüberschuß mit 0,01-n Thiosulfat zurück.

Aus den Zeit-Umsatz-Kurven der Figur 1 ist zunächst ersichtlich, daß die Saccharosespaltung linear verläuft (Reaktion nullter Ordnung), womit die Befunde von *Kiermeier* und *Köberlein* bestätigt wurden. Bei pH = 6,4 ist die Hydrolysengeschwindigkeit nahezu doppelt so groß wie bei pH = 4,6 (siehe Tabelle 2).

Kiermeier und *Köberlein* berechnen die Geschwindigkeitskonstante nach folgender Formel *:

$$k = \frac{R}{E \cdot 60 \cdot 10} \text{ ml } 0{,}1\text{–n } Na_2S_2O_3 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$$

Die Geschwindigkeitskonstante k gibt an, wie viele ml 0,1-n Jod verbraucht werden, um die von 1 g Honig in 1 Minute aus der Saccharose abgespaltene Glucose zu oxydieren.

R = «Richtungskoeffizient»
= Anzahl ml 0,01-n J, die zur Oxydation der in 60 Minuten gebildeten Glucose verbraucht werden.
E = Einwaage (g Honig in 10 ml Reaktionsmischung).

Um die nach *Kiermeier* und *Köberlein* ermittelte Geschwindigkeitskonstante in Saccharasezahlen umzurechnen, gilt folgende Ueberlegung:

Unter Saccharasezahl versteht man die in 1 Stunde von 100 g Honig gespaltene Saccharose in g. Wir multiplizieren die korrigierte Geschwindigkeitskonstante (5 · k) zunächst mit 60 (60 Minuten) und mit 100 (100 g Honig) und

---

* In der Dissertation von *Köberlein* [6] sowie in der Arbeit von *Kiermeier* und *Köberlein* [1] haben sich leider einige Druckfehler eingeschlichen. In Abbildung 9 auf Seite 345 der zuletzt erwähnten Arbeit ist ein unrichtiger Maßstab eingezeichnet. Er muß für die 0,01-n $Na_2S_2O_3$-Lösung lauten: 10, 15, 20 ml (nicht 0, 1,5, 2,0 ml).

Die Formel auf Seite 345 unten stimmt nicht mit der Dimension für k überein. Nach einer Mitteilung von Herrn Dr. *Köberlein* soll der Faktor im Nenner der Formel nicht 100, sondern 10 lauten. Die Dimension ml 0,1-n $Na_2S_2O_3 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ ist richtig.

Kiermeier und *Köberlein* machten bei ihren Berechnungen von k noch einen systematischen Fehler:

Unter E = Einwaage setzten sie die abgewogene Honigmenge in die Formel ein. Zu den einzelnen Titrationen wird jedoch nicht die gesamte Einwaage, sondern jeweils nur ein aliquoter Teil (1/5) der dialysierten Honiglösung benützt. Alle von *Kiermeier* und *Köberlein* angegebenen Geschwindigkeitskonstanten (k-Werte) müssen daher mit 5 multipliziert werden, damit die Zahlenwerte mit der Definition von k übereinstimmen.

erhalten somit die Saccharasezahl, ausgedrückt in ml 0,1-n Jod, die zur Oxydation der äquivalenten Menge Glucose verbraucht werden. Die Oxydation der Glucose mit alkalischer Jodlösung erfolgt nach der Gleichung:

$$R \cdot CHO + J_2 + H_2O + 2Na_2CO_3 \rightarrow R \cdot COOH + 2NaJ + 2NaHCO_3$$

1 ml 0,1-n Jodlösung entspricht = 0,009008 g Glucose oder
1,9 · 0,009008 = 0,0171 g Saccharose.

Für die Umrechnung der von *Kiermeier* und *Köberlein* angegebenen Geschwindigkeitskonstanten (k) in Saccharasezahl (Sa-Z) ergibt sich nachstehender Faktor:

$$Sa\text{-}Z = k \cdot 5 \cdot 60 \cdot 100 \cdot 0{,}0171$$
$$Sa\text{-}Z = 513 \cdot k$$

In der Tabelle 2 sind die Werte für 2 Honige angegeben.

Tabelle 2

Saccharase-Aktivität nach Kiermeier und Köberlein bei verschiedenen pH-Werten bestimmt

Pufferung	Schweizer Honig		Mexikanischer Honig leicht wärmegeschädigt	
	k . 10²	Sa-Z	k . 10²	Sa-Z
pH = 4,6	0,945 0,95	4,85 4,88	0,412 0,384	2,12 1,97
pH = 6,4	1,76 1,72	9,05 8,84	0,72	3,71

k = Geschwindigkeitskonstante berechnet nach *Kiermeier* und *Köberlein* (korrekterweise sollten diese Werte mit 5 multipliziert werden).
Sa-Z = Saccharasezahl.

Die Methode *Kiermeier* und *Köberlein* gibt nach unseren Erfahrungen gut reproduzierbare Werte. Wie später gezeigt wird, liefert diese Methode jedoch wesentlich niedrigere Enzymaktivitäten als die Methode *Gontarski* oder die polarimetrische Methode *Duisberg* und *Gebelein* (siehe Tabelle 10). Durch Erhöhung des pH-Wertes läßt sich die Enzymaktivität bereits wesentlich erhöhen. Die übrigen Versuchsbedingungen, wie Reaktionstemperatur und Saccharosekonzentration scheinen auch nicht optimal gewählt zu sein. Möglicherweise werden durch das Dialysieren die Honigenzyme teilweise inaktiviert. Die Methode *Kiermeier* und *Köberlein* ließe sich zweifellos verbessern und wesentlich empfindlicher gestalten. Auf weitere Versuche in dieser Richtung wurde aber verzichtet, weil uns die Technik für Serienuntersuchungen wegen des Dialysierens etwas umständlich und zeitraubend erschien.

Versuche zur Methode *Gontarski*

Gontarski[2] schlägt vor, die Saccharase-Aktivität bei 3 verschiedenen pH-Werten zu bestimmen, um auf diese Weise für jeden Honig den individuellen Optimalwert zu erhalten. Dadurch wird die Methode recht umständlich und zeitraubend, weil für jeden Honig 3 Enzymversuche und 3 Blindwerte angesetzt werden müssen. Es resultieren schließlich pro Honig 6 Zuckerbestimmungen.

Bei eigenen Versuchen haben wir nach der Methode *Gontarski* oft ziemlich stark schwankende und nicht sehr gut reproduzierbare Werte gefunden. Die Schwankungen waren größer als die durch den pH-Wert verursachten Unterschiede, was durch die Zahlen in Tabelle 3 veranschaulicht wird.

Tabelle 3

Saccharase-Aktivität nach Gontarski für Schweizer Bienenhonig

Datum der Untersuchung	pH = 6,0	pH = 6,3	pH = 6,8
3. 10. 61	19,9	15,6	19,8
4. 10. 61	20,6	19,5	15,6
4. 10. 61	20,6	20,3	23,4

Eine gesicherte pH-Abhängigkeit der Saccharase-Aktivität läßt sich aus diesen Zahlen nicht herauslesen. Wie später noch gezeigt wird, ändert die Saccharase-Aktivität im Bereich zwischen pH = 5,8 und 6,5 nur wenig, so daß es nicht nötig ist, für jeden Honig die Saccharase-Aktivität genau bei dem für den betreffenden Honig optimalen pH-Wert zu bestimmen. Bei der Methode *Gontarski* könnte infolge der recht großen Versuchsstreuung, wenn bei jedem pH-Wert nur eine Bestimmung ausgeführt wird, irrtümlich auf eine große pH-Abhängigkeit der Saccharase-Aktivität geschlossen werden.

Ueberprüfung der polarimetrischen Methode *Duisberg* und *Gebelein*[3]

Auf Grund einiger Vorversuche schien die polarimetrische Saccharasebestimmung für Serienuntersuchungen die am besten geeignete Methode zu sein. Da aus der Arbeit der beiden Autoren nicht entnommen werden kann, ob die Methode einigermaßen unter optimalen Bedingungen arbeitet, sollte sie kurz überprüft und dann die Resultate mit den beiden anderen Methoden verglichen werden.

1. Konzentration der Endlösung

Duisberg und *Gebelein* entnehmen in bestimmten Zeitabständen Proben von 10 ml des Reaktionsgemisches und pipettieren sie zur Unterbrechung in 10 ml

Natriumkarbonat-Sistierlösung. Die Aenderung der optischen Drehung zwischen den einzelnen Proben ist meistens nur gering. Einstell- und Ablesefehler am Polarimeter können sich daher auf das Endresultat ziemlich stark auswirken. Unser Polarimeter gestattet die Ablesung auf ± 0,02°. Um die Genauigkeit zu erhöhen, haben wir versucht, die Konzentration in der Endlösung zu erhöhen. Wir pipettierten statt 10 ml jeweils 15 ml des genau nach den Angaben der Autoren hergestellten Reaktionsgemisches in 5 ml Natriumkarbonat-Sisterlösung. Auf diese Weise werden die Unterschiede in den optischen Drehungen gegenüber den Bedingungen von *Duisberg* und *Gebelein* um 50 % erhöht und die Resultate entsprechend genauer. Die zum Sistieren benützte Natriumkarbonat-Sistierlösung wurde konzentrierter gewählt, damit der pH-Wert der Endlösung genügend hoch wird, um die Wirkung der Honigsaccharase zu unterbrechen. Die potentiometrische Titration eines gepufferten Honigsubstratgemisches ergab, daß 5 ml 7,5%ige Natriumkarbonat-Sistierlösung ausreichen, um 15 ml des Honigsubstratgemisches auf pH = 10,2 zu puffern. Unter den Versuchsbedingungen von *Duisberg* und *Gebelein* (10 ml Honiglösung + 10 ml Natriumkarbonatlösung 5%ig) beträgt das pH der sistierten Endlösung 10,4.

2. Saccharosekonzentration im Enzymversuch

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, arbeiten alle 3 Autoren mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen (5,0; 10,0; 20,0 g/100 ml). Die Saccharase-Aktivität ist ziemlich stark abhängig von der Substratkonzentration. Nach Versuchen von *Kiermeier* und *Köberlein* [1] liegt das Optimum der dialysierten Honigsaccharase bei einer Saccharosekonzentration von ca. 3,2 %. In konzentrierteren Saccharoselösungen (10 bis 32 g in 100 ml) soll die Aktivität des Enzyms stark abnehmen.

Gontarski [7] kommt in seinen «Fermentbiologischen Studien an Honigen» zu gegensätzlichen Resultaten. Für das Pharynxdrüsenferment, das für die Honigbereitung in Frage kommt, liegt der optimale Konzentrationsbereich des Substrates bei ca. 28 % Saccharose.

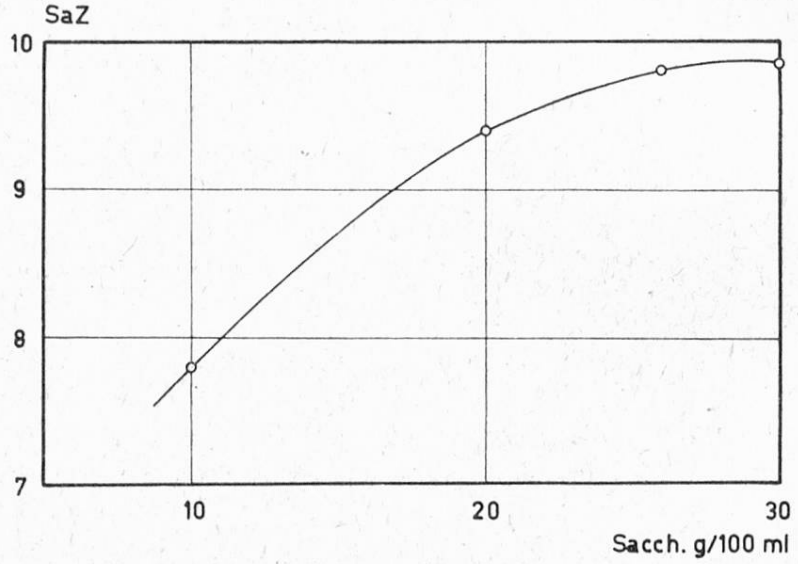
Tabelle 4

Abhängigkeit der Sacharase-Aktivität von der Saccharosekonzentration

Saccharose-konzentration g in 100 ml	pH der Lösung am Ende des Versuchs	Saccharase-Aktivität	
		Δ α in 60 Min.	Saccharasezahl Sa-Z
10	5,98	1,17°	7,8
20	5,92	1,41°	9,4
26	6,00	1,47°	9,8
30	6,00	1,48°	9,9

Eigene Versuche, die in Tabelle 4 und Figur 2 dargestellt sind, haben diese Beobachtung von *Gontarski* bestätigt. Das Optimum der Substratkonzentration scheint auch für die Honigsaccharase bei ca. 30 g Saccharose pro 100 ml zu liegen. Bei niedrigerer Saccharosekonzentration ist das Enzym bedeutend unwirksamer. In 10%iger Zuckerlösung beträgt die Aktivität nur 79 % derjenigen in 30%iger Zuckerlösung.

Die Befunde von *Kiermeier* und *Köberlein* lassen sich nicht recht erklären. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, daß sie den Honig vorerst dialysiert haben und in einem ganz anderen pH-Bereich (pH = 4,6) arbeiten, während bei *Gontarski* das pH = 6,3 und in unseren Versuchen das pH = 6,0 betrug.



Figur 2
Einfluß der Saccharosekonzentration auf die Saccharasezahl

Es liegt kein Grund vor, in der Arbeitsvorschrift die von *Duisberg* und *Gebelein* gewählte Substratkonzentration (20 g Saccharose in 100 ml) zu verändern, da eine Erhöhung auf 30 g/100 ml keine beträchtliche Erhöhung der Enzymaktivität bewirken würde (ca. 5 %). Kleine Abweichungen von der vorgeschriebenen Saccharosekonzentration wirken sich in diesem Bereich nicht stark aus, weil die Kurve ziemlich flach verläuft.

3. Mutarotation

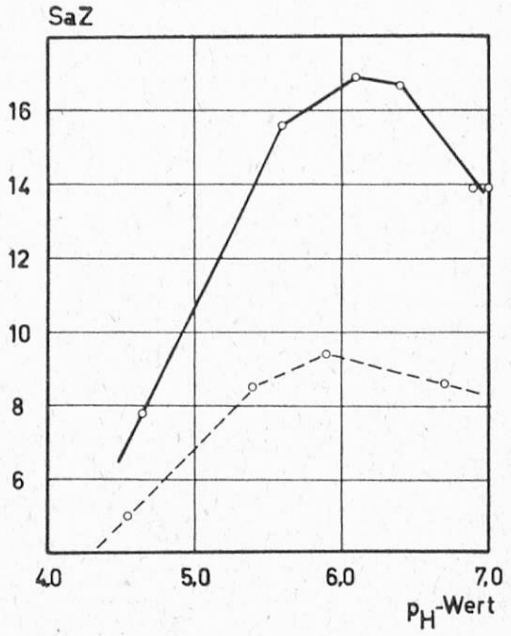
Invertzucker zeigt Mutarotation. Die bei den Enzymversuchen erhaltenen, mit Natriumkarbonat sistierten Reaktionsgemische ändern im Anfang ihre optische Drehung in unkontrollierbarer Weise. Die Lösungen müssen mindestens 3 bis 4 Stunden stehen, damit sich das Gleichgewicht einstellen kann, bevor man sie polarimetrieren darf. Nach 4 Stunden bleibt die optische Drehung einigermaßen konstant.

4. pH-Optimum

Die verschiedenen Autoren bestimmen die Saccharase-Aktivität bei ganz unterschiedlichen pH-Werten. *Kiermeier* und *Köberlein* puffern auf pH = 4,6 (Acetatpuffer), *Gontarski* bestimmt die Saccharase-Aktivität für jeden Honig bei 3 verschiedenen pH-Werten 6,0; 6,3; 6,8, weil das pH-Optimum angeblich nicht bei allen Honigen gleich liegt, und berücksichtigt nur den Höchstwert. *Duisberg* und *Gebelein* stellen einen pH-Wert zwischen 6,2 und 6,45 ein.

Um abzuklären, wo das pH-Optimum der Honigsaccharase liegt, haben wir nach der Vorschrift von *Duisberg* und *Gebelein* gearbeitet und mit Acetatpuffern die gewünschten pH-Werte eingestellt. Am Schluß der Enzymversuche wurde mittels Glaselektrode das pH nochmals gemessen, wie dies auch *Duisberg* und *Gebelein* vorschlagen.

Aus der graphischen Darstellung in Figur 3 ist deutlich ersichtlich, daß das Optimum ungefähr bei pH = 6 liegt. Wie bereits erwähnt, hat *Gontarski*[2] gefunden, daß das Optimum nicht für jeden Honig beim gleichen pH-Wert liegt. Er erachtet es daher als notwendig, den Reaktionsverlauf oberhalb und unterhalb des statistischen pH-Optimums von 6,3 zu untersuchen, um den individuellen Optimalwert des betreffenden Honigs zu ermitteln (pH = 6,0; 6,3; 6,8). Für die Praxis der laufenden Honigkontrolle ist dieses Vorgehen wenig geeignet. Es ist praktischer, analog wie *Duisberg* und *Gebelein* auf einen definierten, mittleren pH-Wert zu puffern. Da die Kurven ziemlich flach verlaufen, sind kleine Abweichungen vom optimalen pH-Wert ohne große Bedeutung. Aus den Kurven in Figur 3 kann entnommen werden, daß bei Abweichungen vom pH-Optimum um 0,3 pH-Einheiten nach oben oder unten an der Saccharasezahl relative Fehler in der Größenordnung von 3 bis 5 % entstehen, was durchaus tragbar ist.



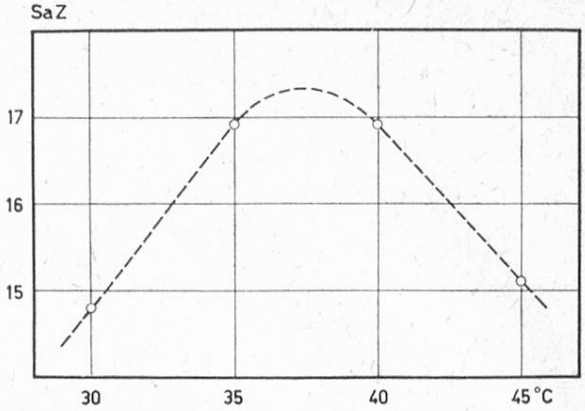
Figur 3
pH-Abhängigkeit der Saccharasezahl

– – – – – mexikanischer Blürenhonig, leicht wärmegeschädigt

——— enzymreicher Schweizer Waldhonig

5. Temperaturoptimum

Die Enzymversuche werden je nach Autor bei 30°, 35° oder 40° C durchgeführt. Um die Optimaltemperatur festzustellen, haben wir die Saccharase-Aktivität eines Schweizer Honigs im pH-Optimum bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Aus den Zahlen der Tabelle 5 und der Figur 4 ist ersichtlich, daß das Temperaturoptimum zwischen 35 und 40° C liegt.



Figur 4
Temperaturabhängigkeit der Saccharasezahl eines Schweizer Waldhonigs

Da bereits die Diastasezahl des Honigs bei 40° bestimmt wird, ist es zweckmäßig, auch die Saccharasezahl bei der gleichen Temperatur zu bestimmen, obschon sie etwas über dem Optimum zu liegen scheint.

Tabelle 5
Temperaturabhängigkeit der Saccharasezahl

Temperatur	pH am Ende des Versuchs gemessen	Δ α in 60 Min. gemessen mit Hg-Lampe	Δ α in 60 Min. gemessen mit Na-Lampe	Saccharase-zahl
30°	6,10	2,21	2,08	14,8
35°	6,10	2,53	2,19	16,9
40°	6,10	2,53	2,20	16,9
45°	6,10	2,27	1,92	15,1

6. Schütteln der Reaktionslösungen

Gelegentlich stößt man in der Literatur auf die Behauptung, daß Enzyme durch kräftiges Schütteln ihrer wässerigen Lösungen teilweise inaktiviert werden [8–10]. Um dies für die Honigsaccharase unter den Versuchsbedingungen der Methode *Duisberg* zu überprüfen, haben wir zwei Versuche nebeneinander mit einem mexikanischen Honig durchgeführt. Im 1.Versuch wurde im Reaktionskölbchen die gepufferte, temperierte Honiglösung mit der Saccharoselösung durch vorsichtiges Umkippen des Kolbens vermischt. Im 2.Versuch wurden die Lösungen vermischt, indem das Kölbchen während einer halben Minute kräftig geschüttelt wurde. Beide Versuche ergaben das gleiche Resultat. Die Saccharase ist demnach durch kräftiges Schütteln nicht nachweisbar inaktiviert worden, wie die Resultate der Tabelle 6 zeigen. Zur möglichst raschen Durchmischung der beiden Lösungen wird das Kölbchen am zweckmäßigsten einige Sekunden kräftig geschüttelt.

Tabelle 6

Art des Vermischens von Honig- und Substratlösung

(Mexikanischer Honig)

	Optische Drehung			Δ α in 60 Min.	Sa-Z
	nach 1 Min.	nach 31 Min.	nach 61 Min.		
Lösungen sorgfältig vermischt	20,90	20,00	19,11	1,79	11,9
Lösungen 1/2 Minute kräftig geschüttelt	20,93	20,00	19,13	1,80	12,0

7. Berechnung der invertierten Saccharosemenge aus der Aenderung der optischen Drehung

Die Saccharasezahl, d.h. die in einer Stunde von 100 g Honig invertierte Menge Saccharose läßt sich aus der Aenderung der optischen Drehung berechnen. Man muß lediglich wissen, welche Menge Saccharose invertiert worden ist, wenn eine Aenderung der optischen Drehung um 1° beobachtet wird. Aus der spezifischen Drehung der Saccharose und des Invertzuckers läßt sich dieser Umrechnungsfaktor einfach berechnen. Für die spezifische Drehung von Saccharose und Invertzucker bei verschiedenen Wellenlängen des Lichtes findet man in der Literatur zum Teil voneinander abweichende Angaben. Zudem ist die spezifische Drehung des Invertzuckers konzentrationsabhängig. Wir haben daher die entsprechenden Umrechnungsfaktoren von Drehwertsänderung in invertierte Saccharosemenge durch Modellversuche experimentell bestimmt. Die Konzentrationen wurden ähnlich gewählt, wie sie bei der Bestimmung der Saccharase-Aktivität im Honig vorliegen. Zur Messung benützten wir die grüne Hg-Linie und die gelbe Na-Linie. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

In einem 100-ml Meßkolben wurden 2,000 g Saccharose in 50 ml Wasser gelöst, mit 2 ml n-Salzsäure versetzt und während 20 Minuten im siedenden Wasserbad invertiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung neutralisiert, dann 18,000 g Saccharose zugegeben, mit 25 ml Natriumkarbonatlösung (7,5 %) alkalisch gemacht und die Lösung bis zur Marke aufgefüllt. Diese Modelllösung entspricht einem Enzymversuch, bei welchem von 20 g Saccharose (in 100 ml Endlösung) genau 2 g Saccharose invertiert worden sind.

In einem zweiten, analogen Versuch wurden 4 g Saccharose invertiert und nachher noch 16 g Saccharose zugesetzt.

Die in den beiden Versuchen erhaltenen Endlösungen sowie eine Vergleichslösung mit 20 g reiner Saccharose und 25 ml Natriumkarbonat in 100 ml wurden nach 4 Stunden bei verschiedenen Wellenlängen polarimetriert. Die abgelesenen Resultate sowie die Aenderung der optischen Drehung und die daraus berechneten Umrechnungsfaktoren sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Modellversuche zur Bestimmung der Umrechnungsfaktoren

	Kontrolle reine Saccharose	Modell-versuch 1	Modell-versuch 2
Invertierte Saccharose g/100 ml	0	2,00	4,00
Nicht invertierte Saccharose g/100 ml	20,00	18,00	16,00
Optische Drehung in Kreisgraden im 2 dm-Rohr (Mittel aus 5—7 Ablesungen)			
bei Na-Linie 5893 Å	26,35°	22,92°	19,54°
bei Hg-Linie 5461 Å	31,10°	27,10°	23,13°
Aenderung der Drehung gegen Kontrolle ($\Delta\alpha$)			
bei Na-Linie	—	— 3,43°	— 6,81°
bei Hg-Linie	—	— 4,00°	— 7,97°
Umrechnungsfaktor 1° Unterschied in der opt. Drehung entspricht invertierter Saccharose			
bei Na-Linie (g in 100 ml)		0,584	0,587
bei Hg-Linie (g in 100 ml)		0,500	0,502
Verhältnis $\frac{\Delta\alpha_{Hg}}{\Delta\alpha_{Na}}$		1,168	1,17

Die aus Modellversuch 1 und 2 (mit verschiedenen Mengen invertierter Saccharose) berechneten Umrechnungsfaktoren stimmen gut überein.

Diese Faktoren wurden auch aus den in der Literatur angegebenen spezifischen Drehungen von Saccharose und Invertzucker berechnet (siehe Tabelle 8). Die theoretisch berechneten Umrechnungsfaktoren stimmen bei Messungen mit der Hg-Linie gut mit den selber ermittelten Werten überein (relative Abweichung 1 %). Bei Messungen mit der Na-Linie ergaben sich etwas größere Unterschiede (relative Abweichung 2,5 bis 3,0 %).

8. Einfluß der Wellenlänge und Berechnung der Umrechnungsfaktoren auf die Saccharasezahl

Duisberg und *Gebelein* schreiben vor, daß zur polarimetrischen Messung als Beleuchtung ein Quecksilberbrenner und ein Zeiß-Filter Hg 546/52 zu benutzen seien. Mit den üblichen Brennern, die mit der Natrium-D-Linie arbeiten, seien die Messungen schlecht durchführbar, weil die Honiglösungen zu viel Licht absorbieren.

Tabelle 8

Berechnung der theoretischen Umrechnungsfaktoren nach Angaben der Literatur

	Na- Linie 5893 Å		Hg-Linie 5461 Å
Spezifische Drehung			
für Invertzucker [α]	— 22,5°		— 21,5°
für Saccharose [α]	+ 66,45°		+ 78,16°
Optische Drehung einer Lösung von 10 g Zucker in 100 ml (2 dm-Rohr) in Kreisgraden			
Invertzucker	— 4,10 [1]	— 4,01 [2]	— 4,30 [2]
Saccharose	+13,30	+13,30	+ 15,63
Optische Drehung von 10,52 g Invertzucker [3] in Kreisgraden	— 4,32	— 4,22	— 4,53
Aenderung der Drehung bei Inversion von 10 g Saccharose in 100 ml (⊿α)	17,62°	17,52°	20,16°
Umrechnungsfaktor			
1° Unterschied in der optischen Drehung (⊿α) entspricht invertierter Saccharose, g in 100 ml	**0,568**	**0,571**	**0,496**
Nach eigenen Versuchen (Mittelwerte aus Tabelle 7)	0,585		0,501
Relative Abweichung	3,0 %	2,5 %	1,0 %

[1] Schweizerisches Lebensmittelbuch, 5. Aufl., Bd. I (im Druck).
[2] Chemisch Jaarboekje, Centen's Uitgeverij, Amsterdam, S. 107 (1938)
[3] Aus 10 g Saccharose entstehen bei der Inversion 10,52 g Invertzucker.

Eigene Versuche mit der Na-Linie ergaben, daß mit der von uns benutzten Na-Dampflampe sämtliche Honiglösungen bequem ausgemessen werden konnten. Mittels der experimentell bestimmten Umrechnungsfaktoren sollte es möglich sein, mit beiden Lichtquellen übereinstimmende Werte für die Saccharasezahl zu erhalten. Bei Modellversuchen mit reinen Saccharose-Inverzucker-Gemischen ist das Verhältnis zwischen beobachteter Aenderunge der optischen Drehung, gemessen mit Hg-Linie, und der jenigen, gemessen mit der Na-Linie, konstant. Der Quotient $\frac{\triangle \alpha_{Hg}}{\triangle \alpha_{Na}}$ beträgt 1,17.

Die Praxis hat nun ergeben, daß bei Saccharasezahl-Bestimmungen in Honigen die gleichen Versuchslösungen, bei verschiedenen Wellenlängen ausgemessen, oft ganz verschiedene Saccharasezahlen ergeben. Das Verhältnis $\frac{\triangle \alpha_{Hg}}{\triangle \alpha_{Na}}$ ändert innerhalb ziemlich weiter Grenzen (± 10 %).

Würde in dem Honig-Substrat-Gemisch unter den Bedingungen, wie sie bei der Bestimmung der Saccharase-Aktivität nach *Duisberg* vorliegen, ausschließlich Saccharose in Invertzucker gespalten, so müßte auch der genannte Quotient konstant bleiben. Die beobachteten Unstimmigkeiten deuten darauf hin, daß im Reaktionsgemisch noch andere Reaktionen ablaufen, welche die optische Drehung verändern. Dies ist durchaus wahrscheinlich, da im Honig zahlreiche Enzyme enthalten sind.

Von *White* und Mitarbeitern [11] ist in neuester Zeit gezeigt worden, daß im Honig während der Lagerung verschiedenartige Reversionsprodukte (Oligosaccharide) entstehen. Die Glucose- und Fructosegehalte nehmen während der Lagerung ab, Disaccharide und Oligosaccharide werden in recht unübersichtlicher Weise neu gebildet. Auch *Maurizio* [12] erwähnt in ihrer ausführlichen Arbeit «Ueber papierchromatographische Untersuchungen an Blütenhonigen und Nektar» den Umstand, daß die pflanzlichen und tierischen Karbohydrasen nicht nur zur Spaltung höherer Zucker in einfache befähigt sind, sondern auch zur gleichzeitigen Synthese von Oligosacchariden nach dem Prinzip der Gruppenübertragung. Vermutlich werden auch während unserer Enzymversuche im Honig-Substrat-Gemisch, neben der Inversion von Saccharose, in geringerem Umfang andere Zuckerarten auf- oder abgebaut. Durch diese Nebenreaktion dürften die Drehwerte und der Quotient aus den Drehwertsdifferenzen bei verschiedenen Wellenlängen merklich beeinflußt werden. Daraus folgt, daß man sich für die polarimetrischen Messungen auf eine Wellenlänge einigen muß, weil sonst die Resultate nicht vergleichbar sind. *Duisberg* und *Gebelein* haben alle Messungen mit der grünen Hg-Linie durchgeführt. Wir haben für alle weiteren Untersuchungen ebenfalls diese Wellenlänge benutzt und die Resultate in Saccharasezahlen umgerechnet.

Da nach unserer Vorschrift in 20 ml Endlösung, die polarimetriert werden, 1,5 g Honig enthalten sind und nach Tabelle 7 eine Aenderung der optischen Drehung um 1^0 im Mittel 0,501 g invertierter Saccharose pro 100 ml entsprechen, gilt folgende Formel:

$$\text{Sa-Z} = \frac{\Delta\alpha \cdot 0{,}501 \cdot 20 \cdot 100}{1{,}5 \cdot 100} = 6{,}68 \cdot \Delta\alpha$$

Die von *Duisberg* und *Gebelein* veröffentlichten Werte (Differenz in Kreisgraden) sind mit 10,02 zu multiplizieren, um die Saccharasezahl zu erhalten, weil die Honig- und Substratkonzentrationen nur $^2/_3$ derjenigen in unsern Versuchen betragen ($^2/_3 \cdot 6{,}68 = 10{,}02$).

9. Polarimetrische und komplexometrische Zuckerbestimmung

Interessehalber wurde in einigen Honig-Substrat-Lösungen, die nach der Methode *Duisberg* erhalten und polarimetriert worden waren, noch die Zucker-

bestimmung nach der chemischen Methode *Potterat-Eschmann* [13, 14] durchgeführt. Die Zunahme des Reduktionsvermögens entspricht dem durch die Saccharase gebildeten Invertzucker.

Es wurde wie folgt vorgegangen: Je 10 ml der polarimetrierten Endlösung wurden abpipettiert und im Meßkolben auf 500 ml verdünnt. Je 10 ml dieser Verdünnung (enthaltend 30 mg Honig) wurden für die komplexometrische Zuckerbestimmung verwendet.

Die polarimetrischen und komplexometrischen Resultate sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Die Saccharasezahlen stimmen größenordnungsmäßig überein. Die komplexometrisch ermittelten Werte liegen um 11 bis 25 % höher als die polarimetrisch gefundenen. Die komplexometrische Methode ist zeitraubender und nicht genauer als die polarimetrische, weil die Unterschiede im Reduktionsvermögen relativ gering sind.

Tabelle 9

Komplexometrische und polarimetrische Saccharasezahlbestimmung

Bezeichnung des Honigs	Polarimetrisch			Komplexometrisch			
	Incubationszeit Minuten	$\Delta\alpha_{Hg}$	Saccharasezahl	Incubationszeit Minuten	ml Kompl. 0,02-n	mg Saccharose	Saccharasezahl
Honig, nicht erwärmt	1	21,43°		3	29,32	22,25	
	31	20,75°		33	31,05	23,70	
	61	20,09°		63	32,98	25,35	
Differenz Δ	60	1,34°	**9,0**	60	—	3,10	**10,0**
Honig aus gleichem Faß, während 72 Std. bei 43° aufgewärmt	1	21,15°		1	29,03	22,02	
	31	20,60°		31	30,88	23,55	
	61	20,00°		61	32,54	24,96	
Differenz Δ	60	1,15°	**7,7**	60	—	2,94	**9,8**

Vergleich der nach 3 Methoden gefundenen Saccharase-Aktivitäten

Die 3 Methoden wurden nun an 2 Honigen, einem Schweizer Blütenhonig mit relativ hoher Saccharase-Aktivität und einem mexikanischen, leicht wärmegeschädigten Honig ausprobiert. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, sind sämtliche Resultate in Saccharasezahlen ausgerechnet und in Tabelle 10 zusammengestellt worden.

Die Methode *Gontarski* und die Methode *Duisberg* liefern Resultate, die recht gut miteinander übereinstimmen. Dies war einigermaßen zu erwarten, da

Tabelle 10

Saccharase-Aktivität ausgedrückt in «Saccharasezahlen», nach verschiedenen Methoden bestimmt

Methode	pH-Wert	Schweizer Honig 1124	Mexikanischer Honig 2352
Kiermeier und *Köberlein* Original-Vorschrift	4,6	4,85 4,88	2,12 1,97
Kiermeier und *Köberlein* Modifiziert (optimales pH)	6,4	9,05 8,84	3,71
Gontarski	6,3	19,5 20,3	9,35
Duisberg (polarimetr.)	6,1	17,1	9,55

die Versuchbedingungen während der Inkubation bei den beiden Methoden nicht allzu stark voneinander abweichen und die Methode der Zuckerbestimmung theoretisch ohne Einfluß auf die Saccharasezahl sein sollte.

Die Methode *Kiermeier* und *Köberlein* dagegen gibt viel niedrigere Saccharasezahlen. Nach der Originalvorschrift bei pH = 4,6 findet man Saccharasezahlen, die nur 20 bis 30 % der Saccharasezahlen der Methode *Duisberg* und *Gebelein* ausmachen. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf das ungefähre Optimum von pH = 6,4 werden, wie erwähnt, bereits wesentlich höhere Saccharase-Aktivitäten gefunden. Die übrigen Versuchsbedingungen (Temperatur, Saccharosekonzentration) sind bei dieser Methode ebenfalls nicht optimal gewählt worden, so daß sich die viel niedrigeren Saccharasezahlen durchaus erklären lassen.

Saccharase-Aktivitäten von Honigen des Handels

Die von verschiedenen Autoren publizierten Saccharase-Aktivitäten von Handelshonigen haben wir in Saccharasezahlen umgerechnet, um die Werte miteinander vergleichen zu können. Die Mittelwerte sowie die beobachtete Schwankungsbreite sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Selbstverständlich sind die in Saccharasezahlen umgerechneten Werte der verschiedenen Autoren nicht streng miteinander vergleichbar, weil die Reaktionsbedingungen, unter denen die Saccharase-Aktivitäten bestimmten worden sind,, zum Teil merklich voneinander abweichen (Temperatur, pH-Wert). Unsere eigenen Werte sind unter den gleichen Bedingungen wie diejenigen von *Duisberg* und *Gebelein* bestimmt worden und daher mit diesen vergleichbar.

Die niedrigsten Saccharase-Aktivitäten gibt die Methode von *Kiermeier* und *Köberlein*. Dies ist ohne weiteres verständlich, weil diese Autoren nicht im pH-

Optimum der Honigsaccharase gearbeitet haben. Die in 39 deutschen Honigen von *Köberlein* gefundenen Saccharase-Aktivitäten, umgerechnet in Saccharasezahlen, schwanken zwischen 3,6 und 10,0. Bei eigenen Versuchen (Tabelle 10) ergab sich, daß die nach der Methode *Kiermeier* und *Köberlein* erhaltenen Aktivitäten nur 20 bis 30 % der Saccharase-Aktivität nach *Duisberg* und *Gebelein* ausmachen.

Die höchsten Saccharase-Aktivitäten findet *Gontarski.* Seine Werte liegen für 12 deutsche, nicht wärmegeschädigte Honige zwischen 18,9 und 32,7. Nach 24stündiger Erwärmung der Honige auf 50° C betrug der Verlust der Saccharase-Aktivität 14,6 bis 83,8 % der Anfangsaktivität.

Die von *Duisberg* und *Gebelein* gefundenen Saccharase-Aktivitäten stimmen nach der Umrechnung in Saccharasezahlen recht gut mit unseren Werten überein. Die beiden Autoren haben an einem recht umfangreichen Material die Saccharase- und Amylase-Aktivität bestimmt. Bei den 13 von ihnen untersuchten deutschen Honigen liegt die Saccharasezahl im Durchschnitt etwas niedriger (9,0) als bei den von uns geprüften authentischen Schweizer Honigen (15,2). Bei den außereuropäischen Honigen (89 Proben) finden *Duisberg* und *Gebelein,* abgesehen von einigen zweifellos wärmegeschädigten Honigen, ähnliche Werte, wie wir sie für die überseeischen Honige ermittelt haben (Sa-Z 3—18).

Tabelle 11

Saccharasezahlen verschiedener Honige

(nach Literaturangaben umgerechnet)

Autor und Bezeichnung der Honige	Anzahl Proben	Saccharasezahl	
		Mittelwert	Schwankungsbreite
Kiermeier und *Köberlein* [1]			
Deutsche Honige	39	**5,9**	3,6—10,0
Gontarski [2]			
Deutsche Honige (naturrein)	12	**24,9**	18,91—32,71
Deutsche Honige (nach 24stündiger Erwärmung auf 50°)	12	**13,2**	3,47—26,1
Duisberg und *Gebelein* [3]			
Deutsche Honige	13	**9,0**	2,9—14,3
Außereuropäische Honige	89	**8,4**	0—18,6
Eigene Werte (Methode Duisberg)			
Schweizer Honige	30	**15,5**	8,1—24,7
Ueberseeische Honige	31	**8,3**	0,2—18,4

Den Einfluß der Erwärmung des Honigs auf die Saccharase- und Amylase-Aktivität haben *Kiermeier* und *Köberlein* bereits eingehend untersucht. Bei mehrtägiger Erwärmung des Honigs auf 40 bis 50°, aber auch bei monatelanger Lagerung bei Zimmertemperatur nimmt die Saccharase-Aktivität merklich ab. Gleichzeitig steigt der Hydroxymethylfurfurolgehalt an. In einer späteren Arbeit soll über eigene diesbezügliche Versuche, sowie über Vorschläge zur Beurteilung von Honig auf Grund der Diastase- und Saccharasezahl und des Hydroxymethylfurfurolgehaltes berichtet werden.

Saccharasezahl-Bestimmung in Honig
(standardisierte Methode)

1. Prinzip

Eine gepufferte Honiglösung und eine Rohrzuckerlösung werden in einem geeigneten Apparätchen getrennt thermostatiert, dann gemischt, worauf die enzymatische Spaltung der Saccharose beginnt. In bestimmten Zeitabständen werden Proben des Reaktionsgemisches herauspipettiert, mit Natriumkarbonatlösung sistiert, und anschließend wird die optische Drehung gemessen. Die Abnahme der Drehung in 1 Stunde ist ein Maß für die Saccharase-Aktivität. Sie wird ausgedrückt als Saccharasezahl.

2. Definition

Die Saccharasezahl gibt an, wie viele g Saccharose von den in 100 g Honig enthaltenen Enzymen in 1 Stunde unter den beschriebenen Versuchsbedingungen gespalten werden.

3. Reagenzien

Natriumcarbonatlösung 0,1-m. 1,06 g Natriumcarbonat wasserfrei oder 2,86 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ werden in Wasser gelöst und auf 100 ml verdünnt.

Natriumcarbonatlösung 0,01-m, hergestellt durch Verdünnen von 10 ml 0,1-m Lösung auf 100 ml.

Natriumcarbonat-Sistierlösung. 7,5 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ werden in Wasser gelöst und auf 100 ml verdünnt.

Pufferlösung pH = 6,4. 6 Teile m-Essigsäure und 320 Teile m-Natriumacetatlösung werden gemischt. (m-Essigsäure erhält man durch Verdünnen von 6,0 g oder 5,72 ml Eisessig 100 % auf 100 ml. m-Natriumacetat enthält im Liter 136,09 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$).

Rohrzuckerlösung, 40 g in 100 ml. 200 g Rohrzucker (Feinkristall- oder Hutzucker) werden in einem 500 ml-Stehkolben mit kochendem dest. Wasser übergossen, einige Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, abgekühlt, in einen 500 ml-Meßkolben übergeführt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt (Haltbarkeit 1—2 Tage, die Lösung beginnt zu schimmeln).

Bemerkung. Für alle Reagenzien und Versuche ist frisch ausgekochtes dest. Wasser zu verwenden. Alle Glasgefäße müssen tadellos gereinigt und ausgedämpft werden.

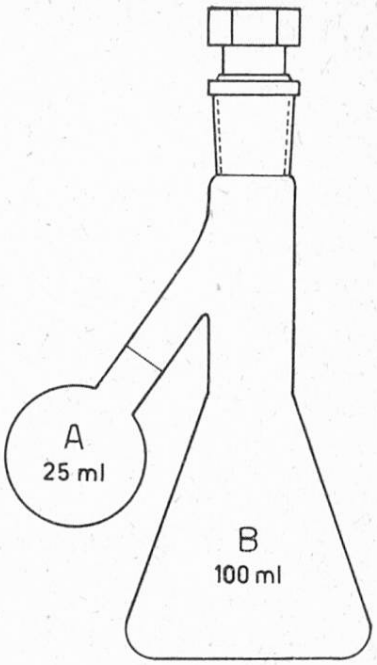
4. Apparatur

Reaktionsgefäß, bestehend aus einem Erlenmeyerkolben (B) mit verlängertem Hals, Schliffstopfen und seitlich angeschmolzenem Meßgefäß (A), das bei 25 ml eine Marke trägt (siehe Fig. 5).

Trichter mit abgebogenem Rohr zum Einfüllen der Honiglösung in das Reaktionsgefäß A.

Wasserbad mit Thermostat 40 ± 0,3° C.

Vollpipette von 15 ml mit großer Auslauföffnung (abgeschliffene Spitze).



Figur 5

5. Ausführung der Bestimmung

Einstellen des pH-Wertes (Vorversuch). 1,00 g Honig werden in einem 25 ml-Becherglas abgewogen. Der Honig wird mit 2 bis 3 ml Wasser verrührt, dann gibt man mittels Pipette 0,6 ml Pufferlösung und 5,0 ml Zuckerlösung zu. Am pH-Gerät mit Glaselektrode wird diese Lösung mit 0,01-m Natriumkarbonatlösung titriert, bis der pH-Wert zwischen 6,2 und 6,4 liegt. Der Verbrauch an 0,01-m Natriumkarbonat wird notiert. Er beträgt in der Regel 0,5 bis 1,5 ml. Im Hauptversuch wird für 10 g Honig die gleiche Menge 0,1-m Natriumkarbonatlösung zugesetzt.

Ansatz des Enzymversuchs. 10,00 g Honig werden in einem 25 ml-Bechergläschen abgewogen, mit wenigen Tropfen Wasser verrührt, 6,0 ml Pufferlösung pH = 6,4 und die im Vorversuch ermittelte Menge 0,1-m Natriumkarbonatlösung zugegeben. Das Gemisch wird, eventuell durch kurzes Einstellen in das Wasserbad von 40° C, verflüssigt und mittels Spezialtrichter quantitativ in das Meßgefäß A des Reaktionskolbens gespült. Nach mehrmaligem Umschwenken wird mit Wasser bis zur Marke (25 ml) aufgefüllt. Es muß speziell darauf geachtet werden, daß keine Spur der Honiglösung in das Gefäß B hinüberlaufen kann.

In den Teil B des Reaktionsgefäßes pipettiert man 50 ml Zuckerlösung und 25 ml Wasser. Das Reaktionsgefäß hängt man zum Vorwärmen mittels passender Klammer in den Thermostaten von 40° C. Dabei dürfen die Lösungen noch nicht vermischt werden. Nach 15 Minuten kippt man das Gefäß, so daß die Honiglösung innerhalb von wenigen Sekunden in die Zuckerlösung einfließt, und schüttelt kräftig, damit die Flüssigkeit gut durchgemischt und das Gefäß A, in welchem sich die Honiglösung befand, gut ausgespült wird. Der genaue Zeitpunkt des Vermischens wird notiert.

Genau 1 Minute nach dem Vermischen wird mittels der 15 ml-Vollpipette mit weiter Ausflußöffnung die erste Probe entnommen und in ein Erlenmeyerkölbchen, in dem sich bereits 5,00 ml Natriumkarbonat-Sistierlösung (7,5 %)

befinden, unter Umschwenken einpipettiert. Die Pipette soll nach 5 bis 8 Sekunden leergelaufen sein. Man läßt sie während 60 Sekunden nachfließen.

Diese Entnahme wiederholt man nach 31 und nach 61 Minuten vom Zeitpunkt des Vermischens an gerechnet (vgl. Bemerkung).

Für alle Entnahmen der gleichen Honiglösung kann man die gleiche Vollpipette verwenden, die man inzwischen ohne vorheriges Ausspülen zum völligen Austropfen mit der Spitze nach unten auf Filtrierpapier aufsetzt. Nach Beendigung der Entnahmen füllt man noch einige ml der verbleibenden Reaktionslösung in ein Reagensglas ab und kontrolliert den pH-Wert mittels der Glaselektrode.

Bemerkung. Legt man besonderen Wert auf eine graphische Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve, so entnimmt man nach *Duisberg* Proben nach 15, 30, 45, 60, 75 Minuten.

Polarimetrische Messung. Die Lösungen mit den entnommenen und sistierten Proben des Reaktionsgemisches werden durch 9 cm-Faltenpapier Schleicher & Schüll Nr. 589[3] filtriert und die Filtrate 3 bis 4 Stunden verkorkt stehen gelassen (Mutarotation). Sie werden im 200 mm-Rohr polarimetriert. Als Beleuchtungslampe dient ein Hg-Brenner mit Interferenz-Grünfilter Hg 546/52 (Zeiß).

6. Berechnung

Die einzelnen Drehungswerte können auf Millimeterpapier gegen die Zeit aufgetragen werden und sollen eine Gerade ergeben. Man liest ab, wie groß die Abnahme des Drehwinkels (in Kreisgraden) während 1 Stunde ist. In der Regel genügt eine Rechnung nach folgender Formel:

$$\text{Saccharasezahl} = 6{,}68\ (\alpha_1 - \alpha_{61})$$

Es bedeuten:

α_1 = abgelesener Drehungswinkel nach 1 Minute
α_{61} = abgelesener Drehungswinkel nach 61 Minuten

Der Faktor 6,68 berechnet sich aus den experimentell bestimmten spezifischen Drehungen von Saccharose und Invertzucker unter den Versuchsbedingungen.

Angabe der Resultate mit 1 Dezimale.

Genauigkeit

Die Methode ist gut reproduzierbar. Aus 36 Einzelbestimmungen an 16 verschiedenen Honigen berechnet sich eine relative Standard-Abweichung (s %) von ± 4,7 %.

Die berechneten Saccharasezahlen entsprechen nicht genau der in Wirklichkeit invertierten Saccharosemenge, weil neben der Inversion gleichzeitig durch Reversion höhere Zuckerarten (Oligosaccharide) gebildet werden, welche die optische Aktivität der Lösung ebenfalls etwas beeinflussen.

Zusammenfassung

1. 3 verschiedene Methoden zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität in Honig wurden besprochen und auf ihre Eignung zur Aufnahme in die 5. Auflage des Schweizerischen Lebensmittelbuches überprüft.
2. Um die von verschiedenen Autoren veröffentlichten Werte für die Saccharase-Aktivitäten einigermaßen miteinander vergleichen zu können, wurde eine neue Kennzahl für Honig, die sogenannte «Saccharasezahl» (Sa-Z) eingeführt und alle Resultate auf Sa-Z umgerechnet.
   Definition: Die Saccharasezahl gibt an, wieviel g Saccharose unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in 1 Stunde von den in 100 g Honig enthaltenen Enzymen gespalten werden.
3. Die Methode von *Kiermeier* und *Köberlein*, bei welcher der Honig vorerst dialysiert wird, ist ziemlich umständlich und zeitraubend, sie liefert jedoch gut reproduzierbare Resultate. Verglichen mit den beiden andern Methoden findet man die niedrigsten Enzym-Aktivitäten, weil die Versuche nicht unter optimalen Bedingungen ausgeführt werden.
4. Die Methode *Gontarski* ist ebenfalls umständlich und gibt ziemlich stark streuende Resultate.
5. Die polarimetrische Methode von *Duisberg* und *Gebelein* erwies sich für die praktische Honiganalyse als am zweckmäßigsten. Sie ist relativ einfach, und die Werte sind gut reproduzierbar.
6. Wir haben die Methode *Duisberg* und *Gebelein* in verschiedenen Punkten (Temperatur- und pH-Optimum, Saccharosekonzentration) überprüft und sie geringfügig modifiziert, um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Es wird nahezu unter den für Honigsaccharase optimalen Bedingungen gearbeitet. Die Methode liefert ungefähr die gleichen Saccharase-Aktivitäten wie die Methode *Gontarski*.

Résumé

1. Examen pratique et critique des méthodes de a) *Kiermeier* et *Köberlein*, b) *Gontarski* et c) *Duisberg* et *Gebelein* pour la détermination de l'activité de la saccharase dans le miel.
2. La méthode de *Duisberg* et *Gebelein* (par polarimétrie) est celle qui s'est révélée la meilleure pour l'analyse pratique du miel; elle est relativement simple et sa fidélité est bonne. En la modifiant légèrement sa sensibilité a pu être élevée.
3. Pour assurer la comparaison des valeurs obtenues par les 3 méthodes précitées on a été amené à introduire un nouvel indice baptisé «indice de saccharase» (I-Sa), auquel on a rapporté tous les résultats. L'indice de saccharase exprime le nombre de grammes de saccharose scindé, en 1 heure et dans les conditions expérimentales décrites, par les enzymes contenues dans 100 g de miel.

Summary

Practical and critical examination of 3 methods (a) *Kiermeier* and *Köberlein;* b) *Gontarski;* c) *Duisberg* and *Gebelein*) for the determination of the activity of saccharase in honey. The polarimetric method of *Duisberg* and *Gebelein* gives the best results and can be recommended.

Literatur

[1]) *F. Kiermeier* und *W. Köberlein*, Z.U.L. **98**, 329 (1954).
[2]) *H. Gontarski*, Ztschr. für Bienenforschung **4**, 41 (1957).
[3]) *H. Duisberg* und *H. Gebelein*, Z.U.L. **107**, 489 (1958).

4) *Issekutz*, zit. nach P. Rona, Praktikum der physiol. Chemie II. Teil, S. 208, Springer, Berlin (1929).
5) *J. E. Schade, G. L. Marsh* und *J. E. Eckert*, Food Research **23**, 446 (1958).
6) *W. Köberlein*, Untersuchungen zur Hitzeinaktivierung von Enzymen in Honig. Dissertation München (1953).
7) *H. Gontarski*, Ztschr. für Bienenforschung **5**, 1 (1960).
8) *Schmitt-Nielsen*, Ztschr. physio. Chem. **60**, H. 6 (1909).
9) *Shaklee* und *Meltzer*, Americ. Journ. Physiol. 1909/10, 23 und 25.
10) *F. Gothe*, Z.U.L. **28**, S. 304 (1914).
11) *J. W. White, L. Riethof* und *Irene Kushnir*, Journ. Food. Science **26**, 63 (1961).
12) *A. Maurizio*, Papierchromatographische Untersuchungen an Blütenhonig und Nektar. Annales de l'abeille **4**, 291 (1959).
13) *M. Potterat* und *H. Eschmann*, diese Mitt. **45**, 312 (1954).
14) *M. Potterat*, Revue int. choc. **10**, 1 (1955).

Ueber Veränderungen im Bienenhonig bei der großtechnischen Abfüllung

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*
(Laboratorium VSK, Basel)

Ausländischer Bienenhonig wird in der Regel in größeren Gebinden importiert. Die mexikanischen Honige werden zur Zeit in Eisenfässern à 300 kg Netto-Inhalt versandt. Beim Eintreffen in die Schweiz ist der Honig meistens kandiert und bildet eine feste, zähe Masse. Die Fässer besitzen gewöhnlich nur ein relativ kleines Spundloch. Um den Honig aus dem Faß zu entleeren, muß er vorerst durch Aufwärmen verflüssigt werden. Diesem Aufwärmen und Verflüssigen des Honigs ist während Jahren viel zuwenig Beachtung geschenkt worden. Es ist zwar längst bekannt, daß Honig durch übermäßig hohes und zu langes Erhitzen geschädigt wird. Bei der Kontrolle begnügte man sich in der Regel mit einer Prüfung auf Diastase nach *Auzinger* [1]. Wurde bei dieser Prüfung die Wirksamkeit der Honigdiastase festgestellt, so nahm man an, daß der Honig nicht hitzegeschädigt sei.

Ueber die Problematik der Diastasezahl zum Nachweis einer Wärmeschädigung des Honigs sind in neuerer Zeit zahlreiche Arbeiten [2, 3, 4] erschienen. Die Beurteilung auf Grund der Honigdiastase ist recht unsicher, weil einerseits der natürliche Diastasegehalt des Honigs stark variieren kann und anderseits die Honigdiastasen (α- und β-Amylasen) relativ wärmeresistent sind. Die Abwesenheit von Diastase zeigt somit nur Schädigungen durch extreme Wärmeeinwirkung an. Nach *Kiermeier* und *Köberlein* [2] wird die Honigdiastase bei ein- bis zweistündigem Erhitzen auf 60 bis 70° nur wenig geschädigt. Diese Autoren schlagen daher vor, zum Nachweis einer Wärmeschädigung neben der Diastase auch noch die Saccharase-Aktivität zu bestimmen, weil die Saccharase gegen Erwärmung viel empfindlicher ist.