

# Natürliche Bestandteile des Honigs: Hefen und deren Stoffwechselprodukte – Teil 3: Der Ethanol- und der Glyceringehalt als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum

G. Beckh, P. Wessel und C. Lüllmann

Institut für Honiganalytik, Flughafendamm 9A, D-29199 Bremen

## Zusammenfassung

Es existieren für Honig verschiedene Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum – in der vorliegenden Untersuchung wurde der Schwerpunkt auf die Parameter Ethanol- und Glyceringehalt gelegt.

Die beiden Messgrößen stehen in Beziehung zueinander: während der alkoholischen Gärung entstehen Ethanol als Hauptprodukt und Glycerin als Nebenprodukt. Die Mengen hängen entscheidend von der Art resp. Stamm der gärenden Hefe und den entsprechenden Bedingungen wie Wasserverfügbarkeit oder osmotischem Stress ab.

Anhand von insgesamt 119 Honigproben – überwiegend Rohwarenmuster aus von der Gärungsproblematik betroffenen Regionen – wurden deren Ethanol- resp. Glyceringehalte enzymatisch ermittelt. Die Fragestellung, ob eine mathematisch starke Korrelation besteht, kann bei einem Korrelationskoeffizient von 0,753 mit nein beantwortet werden.

Aufgrund dieser Tatsachen ist die Abschätzung von Gärung bzw. abgestoppter Gärung in Honig alleine über einen Grenzwert von Glycerin oder/und Ethanol nicht gerechtfertigt.

## Summary

There are several parameters on quality linked with the growth of yeasts – this examination focused on ethanol- and glycerol content.

Both parameters are correlated in such a way that ethanol is the main end product, glycerol a by-product of alcoholic fermentation. The correlation depends on several factors such as species resp. strain of the fermenting yeast, availability of water or osmotic stress.

The analysis of 119 honey samples – mostly from origins negatively related to fermentation – focused on ethanol and glycerol content detected enzymatically. The question on a mathematically strong correlation between both parameters could be answered negative due to the correlation coefficient 0.753.

Due to this fact it is not justifiable to set limits for glycerol and/or for ethanol as a clear indication for fermented honey or stopped fermentation.

**Keywords:** Honig, Hefe, Wachstum, Ethanol, Glycerin / honey, yeast, growth, ethanol, glycerol

## Zusammenhang von Ethanol- und Glyceringehalt

Wie bereits in Teil 1 der Reihe „Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte“ erläutert, können einige Hefen unter bestimmten Voraussetzungen den Honig in Gärung übergehen lassen<sup>1)</sup>. Ethanol ist das Endprodukt der alkoholischen Gärung und wäre somit eindeutiger Parameter für eine Gärung im Honig.

Aufgrund der leichten Flüchtigkeit kann es jedoch während

der Verarbeitungsschritte des Honigs, z. B. bei der Verflüssigung kristallinen Honigs zum Abfüllen, zumindest teilweise aus dem Produkt entfernt werden. Daher sind Nebenprodukte der alkoholischen Gärung wie Glycerin als Parameter in die Diskussion gekommen. Es gibt zurzeit weder zu Ethanol noch zu Glycerin gesetzlichen Höchstmengen. Empfehlungen staatlicher Laboratorien gehen jedoch schon bei 20 mg Ethanol pro Kilogramm Honig von Gärung aus. Zusätzlich hat sich für Glycerin im Handel für Blütenhonig ein maximaler Grenzwert von 300 mg/kg etabliert, der maßgeblich auf *Rußmanns*<sup>2)</sup> Arbeit zurückgeht. Bei Honigtau-honigen bzw. Waldhonigen geht man von einem natürlich vorkommenden, höheren Gehalt an Glycerin aus. Die genaue Herkunft ist aber noch ungeklärt.

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Korrelation zwischen Glycerin- und Ethanolgehalten<sup>3,4)</sup> in gärenden Honigen. Nach *Hariris* Untersuchungen<sup>3)</sup> waren bei Gärung die Glycerin- und Ethanolgehalte erhöht.

Die Fragestellung, unter welchen Bedingungen Ethanol bzw. Glycerin im Honig in welchen Mengen gebildet werden, inwiefern beide Parameter korrelieren und ob ein Rückschluss auf eine Gärung zulässig ist, liegt der vorliegenden Arbeit im Rahmen eines Projekts zugrunde. Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit/AiF) über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: AiF-FV 12521 BG.

## Die Herkunft des Ethanols und Glycerins im Honig

Die Dissimilation der Zucker kann durch Gärung oder Atmung erfolgen – abhängig von Hefeart bzw. Stamm und den entsprechenden Umweltbedingungen. Die meisten Hefen sind aerobe Organismen. Bezüglich der Gärungsfähigkeit unterscheidet man obligate Gärer, fakultative Gärer und Hefen, die gar nicht gären können.

Sowohl bei der Atmung als auch bei der Gärung werden die Zucker in einem ersten Schritt, der Glykolyse, zu Pyruvat abgebaut, welches anschließend bei der alkoholischen Gärung zu Ethanol und CO<sub>2</sub> abgebaut wird (vgl. *Boulton* und *Quain*<sup>5)</sup>).

Bei der Atmung wird Pyruvat über den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette unter hohem Energiegewinn vollständig zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut. Daher wird

unter aeroben Bedingungen hauptsächlich Biomasse gebildet. Sauerstoff ist zudem ein wesentlicher Wachstumsfaktor für die Bildung von Fettsäuren (Aufbau der Zellmembran) und deren Sterolbiosynthese.

Bei der alkoholischen Gärung entsteht eine Vielzahl von Nebenprodukten wie sogenannte Fuselalkohole, höhere Alkohole wie z. B. Glycerin, organische Säuren, Aldehyde und deren Ester. Menge und Zusammensetzung dieser Nebenprodukte – so weiß man aus der Brauereiforschung – variieren sogar von Stamm zu Stamm einer verwendeten Hefeart und zusätzlich sind sie noch abhängig von den Nährstoffverhältnissen und Temperaturen. Vor diesem Hintergrund wird klar, dass „die Gärung im Honig“ kein einheitlicher Vorgang sein kann, da eine Vielzahl von Hefearten und Stämmen kombiniert mit einer Vielzahl an Honigarten diesem Prozess zugrunde liegen.

Glycerin wird darüber hinaus bei osmotoleranten Hefen unabhängig von der Gärung als osmotisch regulierende Substanz gebildet bzw. gespeichert<sup>6)</sup>. Bestimmte Hefearten z. B. *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii* verfügen dazu offensichtlich über einen speziellen Regulationsmechanismus<sup>7-9)</sup>, der es bei osmotischem Stress erlaubt, aktiv Glycerin abzugeben bzw. aufzunehmen, den so genannten HOG-pathway (high osmolarity glycerol pathway).

„The channel is thought to control both influx and efflux of glycerol and thus plays an important role in osmoregulation when yeast cells synthesize glycerol as a compatible solute in times of osmotic stress<sup>7)</sup>“.

Hier handelt es sich also um Aufnahme und Abgabe von Glycerin als Strategie zur Bewältigung von Stress durch osmotischen Druck, der unabhängig von Gärung auch von nicht fermentierenden Hefen genutzt werden kann. Die Glycerinmengen unterliegen dabei einer Dynamik, die so komplex ist, dass der Glyceringehalt als alleiniger Parameter zur Abschätzung von Gärung wenig Aussagekraft hat.

### Ermittlung des Zusammenhangs von Ethanol- und Glyceringehalt

Die Bestimmung des Glyceringehalts erfolgte enzymatisch mit einem Testkit von *Boehringer* (Nachweisgrenze 0,4 g). Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten; bei Einsatz des maximalen Probevolumens ergibt sich eine Empfindlichkeit von 0,1 mg/l, bei Einsatz des minimalen Probevolumens liegt sie bei 2 mg/l. In den hier durchgeführten Tests wurden in der Regel 0,5 ml Probe eingesetzt. Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist in Bezug auf die Präzision mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Die Bestimmung ist spezifisch für Glycerin<sup>10)</sup>.

Die Bestimmung des Ethanolgehalts wurde enzymatisch mit einem Testkit von *Boehringer* durchgeführt (Nachweis-

grenze 0,5 mg/l). Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Bei Einsatz des maximalen Probevolumens ergibt sich eine Empfindlichkeit von 0,1 mg/l. In den hier durchgeführten Tests wurden in der Regel 0,1 ml Probe eingesetzt. Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist in Bezug auf die Präzision mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Bezüglich der Spezifität wird der Einfluss von Aldehyden und Ketonen durch die Reihenfolge der Reagenzienzugabe ausgeschaltet. Methanol wird aufgrund bestimmter Eigenschaften der verwendeten Enzyme nicht umgesetzt. *n*-Propanol und *n*-Butanol werden unter Testbedingungen quantitativ umgesetzt, höhere primäre Alkohole führen zu probeabhängigen Schleichreaktionen. Sekundäre, tertiäre und aromatische Alkohole reagieren nicht. Glycerin stört den Test auch bei höheren Konzentrationen nicht<sup>11)</sup>.

Die Tests wurden in Doppelbestimmung unter Mitführung eines internen Standards mit Wiederfindungsberechnung sowie einem qualitativen Nachstart durchgeführt, um Fehler in der Analytik zu minimieren. Des Weiteren wurde ein so genannter Standardhonig in den Untersuchungen mitgeführt.

Die Untersuchungen wurden zunächst an 23 Rohwarenmustern mit Schwerpunkt China durchgeführt, die nicht zur Abfüllung erhitzt worden waren und darum von einem ursprünglichen Gehalt an Ethanol ausgegangen werden konnte. Diese Ergebnisse sollten später an weiteren Handelshonigen (n = 96) verifiziert werden.

Bei den Korrelationsberechnungen wurde der empirische Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson ermittelt, wobei  $-1 \leq r \leq 1$ . Die Klassifizierung in die Stärke der Korrelation lautet: „schwache Korrelation“  $r < 0,5$ ; „mittlere Korrelation“  $0,5 \leq r < 0,8$ ; „starke Korrelation“  $0,8 \leq r$ <sup>12)</sup>.

Die Bestimmung der Zellzahl wurden wie folgt durchgeführt: 10 g Honig werden in Wasser aufgelöst und das Sediment des Honigs durch zweimalige Zentrifugation bei 2000 U/min gewonnen. Anschließend wird das Sediment mit 1 ml Wasser verdünnt und gut geschüttelt, z. B. mit einem Vibrofix, um eine homogene Verteilung der Hefen zu gewährleisten. Die Zählkammer (Objektträger mit geeichten quadratischen Kammern unterschiedlicher Fläche je nach Hersteller z. B. 0,04 mm<sup>2</sup> oder 0,0625 mm<sup>2</sup>, aber gleicher Tiefe 0,1 mm) wird wie folgt befüllt: das Deckglas wird aufgelegt und am Rande fest auf den Objektträger gedrückt, anschließend wird mit einer Pipette (kleines Volumen, ca. 20 µl) die Sedimentlösung des Honigs vom Rande her zugegeben, dass der Raum über dem Steg gerade gefüllt ist und mehrere Quadrate ausgezählt. Der Durchschnittswert dieser Zählungen wird auf das Ausgangsvolumen von 1 ml (entspricht 10 g Honig) rückgerechnet. Durch 10 dividiert ergibt sich die Anzahl der Hefen pro g/Honig.

Diese Methode kann mit systematischen Fehlern behaftet sein, bedingt durch falsche Identifikation bzw. nicht realisierbare Differenzierung zwischen Hefezellen und ähnlichen Par-

Tab. 1 Ethanol- und Glyceringehalte von 23 Rohwarenmustern

Herkunft	Zustandsbeschreibung	Glycerin [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Zellzahl/ml
China	3/2000, nicht gelagert direkt aus Bienenstock	30	255	6,12 · 10 <sup>6</sup>
China	3/2000, direkt vom Imker	130	115	0,4 · 10 <sup>6</sup>
China	Fassrohware	110	39	0,3 · 10 <sup>6</sup>
China Acacia	3/2000, organic Nanjing	30	10	0,06 · 10 <sup>6</sup>
China Acacia	3/2000, organic Nanjing	60	8	0,24 · 10 <sup>6</sup>
China Acacia	Fassrohware	580	140	0,72 · 10 <sup>6</sup>
China 1a	Fassrohware	330	120	1,01 · 10 <sup>6</sup>
China weiß	Fassrohware	620	185	0,93 · 10 <sup>6</sup>
China Raps	Ernte 2000, direkt vom Imker, nur gesiebt	20	5	0,02 · 10 <sup>6</sup>
China Linde	Ernte 1999, direkt vom Imker, unbehandelt	50	15	0,04 · 10 <sup>6</sup>
China Buchweizen	Fassrohware	150	95	0,11 · 10 <sup>6</sup>
Vietnam	Fassrohware	650	310	0,22 · 10 <sup>6</sup>
Vietnam	Fassrohware	580	110	0,4 · 10 <sup>6</sup>
Vietnam	Fassrohware	600	80	0,42 · 10 <sup>6</sup>
Mexico	Rohware direkt aus Mex.	110	20	0,1 · 10 <sup>6</sup>
Mexico	Rohware direkt aus Mex.	100	10	0,04 · 10 <sup>6</sup>
Mexico Yucatan	Fassrohware	1420	1770	0,86 · 10 <sup>6</sup>
Guatemala	Fassrohware	810	650	0,74 · 10 <sup>6</sup>
Guatemala	Fassrohware	490	320	0,56 · 10 <sup>6</sup>
Argentinien	Rohware direkt aus Arg.	250	305	0,26 · 10 <sup>6</sup>
Nicaragua	Fassrohware	70	25	0,06 · 10 <sup>6</sup>
Cuba	Rohware direkt aus Cuba	120	70	0,1 · 10 <sup>6</sup>
Australien ela	Fassrohware	80	4	0,05 · 10 <sup>6</sup>

tikeln. Man hat aber durchaus eine relative Vergleichsmöglichkeit der unterschiedlichen Zellzahlen. In Bereichen um  $\leq 1000$  Zellen/g Honig ist die Methode nicht mehr genau, hier liegt sozusagen die analytische Bestimmungsgrenze vor.

### Die Korrelation von Ethanol- und Glyceringehalt

Die zunächst ermittelten Rohwaredaten von 23 Honigen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bei den untersuchten Rohwaren ist anhand der Grafik (Abbildung 1) ein genereller Zusammenhang erkennbar. Eine Korrelation von Ethanol- und Glyceringehalt nach statistischen Maßstäben<sup>12)</sup> konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der untersuchten Proben verifiziert werden. Der aus dem ermittelten Datenmaterial (siehe Tabelle 1) errechnete Korrelationskoeffizient liegt bei 0,832, d.h. er liegt an der Grenze von mittlerer zu starker Korrelation. Diese 23 Proben zeigen keinen linearen Zusammenhang zwischen Glyceringehalt und Zellzahl (Korrelationskoeffizient 0,003) resp. Ethanolgehalt und Zellzahl (Korrelationskoeffizient 0,162).

### Überprüfung/Konstanz der Ergebnisse

Um sicherzustellen, dass die Zusammenhänge einer Überprüfung standhalten, wurden nach dem gleichen Verfahren

weitere Proben – überwiegend Rohwarenmuster – untersucht. Der Korrelationskoeffizient der in Tabelle 2 aufgeführten Messwerte beträgt 0,751 ( $n = 96, s = 246,021$ ). Somit bestätigen sich insgesamt die Ergebnisse der vorab durchgeführten Messungen. Die Korrelation ist in diesem Fall als grenzwertig von mittlerer zu starker Korrelation zu bewerten. Fasst man alle Messwerte aus den Versuchen in einer Berechnung zusammen, erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,753 ( $n = 119$ ).

Die Korrelation der Proben aus Tabelle 2 von Ethanolgehalt und Zellzahl beträgt 0,599, die von Glyceringehalt und Zellzahl 0,566 – hier ist also ein allgemeiner Zusammenhang gegeben und eine Korrelation mittlerer Stärke statistisch nachzuweisen.

Die Daten finden sich gegeneinander aufgetragen in Abbildung 2.

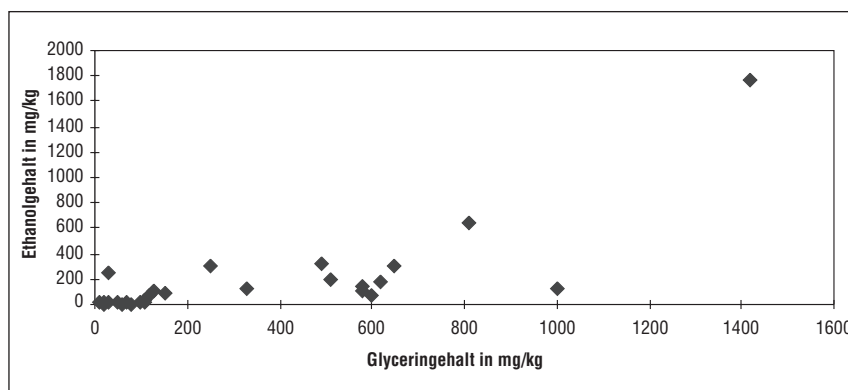


Abb. 1 Die Korrelation von Glycerin- und Ethanolgehalten an 23 Rohwarenmustern

Tab. 2 Ethanol- und Glyceringehalte von 96 Honigmustern

Herkunft	Glycerin [mg/l]	Ethanol [mg/l]	Zellzahl/ml
China	230	54	0,13·10 <sup>6</sup>
China	300	2	0,15·10 <sup>6</sup>
China	70	4	0,03·10 <sup>6</sup>
China Akazie	810	400	1,43·10 <sup>6</sup>
China amber	50	17	0,08·10 <sup>6</sup>
China ELA	1840	1863	53,2·10 <sup>6</sup>
China Linde	260	93	0,2·10 <sup>6</sup>
China Linde	400	156	0,97·10 <sup>6</sup>
China Linde	170	35	0,66·10 <sup>6</sup>
China Linde	210	88	0,69·10 <sup>6</sup>
China Linde	270	126	0,384·10 <sup>6</sup>
China Linde	57	16	0,056·10 <sup>6</sup>
China Linde Bio	40	22	0,09·10 <sup>6</sup>
China Sonnenblume	200	62	7,6·10 <sup>6</sup>
China Vitex	130	46	0,35·10 <sup>6</sup>
China white 34 mm	590	330	24,8·10 <sup>6</sup>
Vietnam Blüte	989	478	0,53·10 <sup>6</sup>
Vietnam Kaffee	1740	259	1,40·10 <sup>6</sup>
Vietnam Kaffee	1100	402	0,73·10 <sup>6</sup>
Vietnam Kaffee	1530	290	1,12·10 <sup>6</sup>
Indien Bio	1750	2657	12,23·10 <sup>6</sup>
Kaschmir	137	91	0,24·10 <sup>6</sup>
Kuba	60	8	0,09·10 <sup>6</sup>
Kuba	40	2	0,04·10 <sup>6</sup>
Kuba	190	135	0,19·10 <sup>6</sup>
Kuba	90	12	0,08·10 <sup>6</sup>
Kuba	90	13	0,05·10 <sup>6</sup>
Kuba	160	129	0,16·10 <sup>6</sup>
Kuba	65	25	0,08·10 <sup>6</sup>
Brasilien	43	4	0,06·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	340	255	0,92·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	260	205	0,23·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	290	251	0,68·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	50	13	0,024·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	210	159	1,12·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	210	139	0,60·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	46	3	0,22·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	113	62	0,156·10 <sup>6</sup>
Brasilien Blüte	150	30	0,264·10 <sup>6</sup>
Brasilien Eucalyptus	140	20	0,17·10 <sup>6</sup>
Brasilien Eucalyptus	140	35	0,12·10 <sup>6</sup>
Mexico	102	31	0,1·10 <sup>6</sup>
Mexico	105	38	0,09·10 <sup>6</sup>
Mexico Yucatan	100	43	0,13·10 <sup>6</sup>
Mexico Yucatan	200	231	0,35·10 <sup>6</sup>
Mexico Yucatan	201	97	0,16·10 <sup>6</sup>
Mexico Yucatan Blüte	153	41	0,19·10 <sup>6</sup>
Argentinien	70	28	0,08·10 <sup>6</sup>

Herkunft	Glycerin [mg/l]	Ethanol [mg/l]	Zellzahl/ml
Argentinien	145	305	0,79·10 <sup>6</sup>
Argentinien Sonnenblumen	130	49	0,064·10 <sup>6</sup>
Salvador	167	32	0,14·10 <sup>6</sup>
Salvador	157	64	0,0001·10 <sup>6</sup>
Salvador Blüte	317	100	0,27·10 <sup>6</sup>
Salvador Blüte	222	83	0,344·10 <sup>6</sup>
Salvador Blüte	326	888	0,344·10 <sup>6</sup>
SO-Europa Sonnenblumen	27	1	0,176·10 <sup>6</sup>
SO-Europa Akazien	19	0	0,016·10 <sup>6</sup>
SO-Europa Akazien	21	0	0,016·10 <sup>6</sup>
SO-Europa Akazien	39	2	0,004·10 <sup>6</sup>
Rumänien Akazien	20	8	n.n.
Rumänien Akazien	24	0	0,012·10 <sup>6</sup>
Rumänien Akazien	42	4	0,004·10 <sup>6</sup>
Rumänien Linden	40	17	0,012·10 <sup>6</sup>
Rumänien Linden	51	0	0,04·10 <sup>6</sup>
Rumänien Linden	57	25	0,016·10 <sup>6</sup>
Rumänien Linden	30	8	0,05·10 <sup>6</sup>
Rumänien Bio Linden	30	5	0,23·10 <sup>6</sup>
Rumänien Sonnenblumen	50	33	0,35·10 <sup>6</sup>
Rumänien Polyflora	59	3	0,07·10 <sup>6</sup>
Bulgarien	40	4	0,09·10 <sup>6</sup>
Bulgarien Akazien	40	2	0,02·10 <sup>6</sup>
Bulgarien Linden	20	1	0,08·10 <sup>6</sup>
Bulgarien Polyflora	62	8	0,064·10 <sup>6</sup>
Tschechien Raps	30	9	0,004·10 <sup>6</sup>
Tschechien Raps	801	1075	6,575·10 <sup>6</sup>
Ungarn Akazien	27	0	0,008·10 <sup>6</sup>
Frankreich Alpenrosenblüte	24	1	0,06·10 <sup>6</sup>
Frankreich Sonnenblumen	600	748	0,88·10 <sup>6</sup>
Frankreich Sonnenblumen	81	3	0,076·10 <sup>6</sup>
Frankreich Sonnenblumen	262	81	0,084·10 <sup>6</sup>
Frankreich Bio Sonnenblumen	225	11	0,16·10 <sup>6</sup>
Frankreich Lavendelblüte	53	1	0,02·10 <sup>6</sup>
Frankreich Provence	74	10	0,16·10 <sup>6</sup>
Spanien Mandelblüten	64	2	0,05·10 <sup>6</sup>
Spanien Orangenblüten	26	4	0,63·10 <sup>6</sup>
Türkei Sonnenblume	459	748	0,592·10 <sup>6</sup>
Türkei Sonnenblume	80	10	0,09·10 <sup>6</sup>
DIB	70	7	0,08·10 <sup>6</sup>
DIB	20	1	0,05·10 <sup>6</sup>
Deutschland Raps	18	7	0,0024·10 <sup>6</sup>
Australien	120	6	0,08·10 <sup>6</sup>
Australien	449	1179	1,1·10 <sup>6</sup>
Kanada	20	1	0,03·10 <sup>6</sup>
Kanada	28	2	0,05·10 <sup>6</sup>
Akazien	40	27	0,1·10 <sup>6</sup>
Raps	58	3	0,024·10 <sup>6</sup>

### Zusammenhang zwischen Ethanol- und Glyceringehalt

Da wie oben dargelegt Glycerin auch aus anderen Quellen als der alkoholischen Gärung stammen kann und auch die Korrelation zwischen Haupt- und Nebenprodukt nicht eindeutig ist, ist der Rückschluss vom Glyceringehalt auf eine vorausgegangene, abgestoppte oder in Prozess befindliche Gärung nicht zulässig.

Da ganz offensichtlich die Hefeart sowie u.U. deren Stämme eine entscheidende Rolle für die Gesamtmenge an gebildetem Glycerin oder Ethanol spielt, wird im Laufe dieser Veröffentlichungsreihe eine Ergebnisdokumentation zu der Thematik der in Honig vorkommenden Hefespezies vorgestellt werden. Dort wird auch die mittlere Stärke des mathematischen Zusammenhangs von Ethanol- oder Glyceringehalt zur Zellzahl detailliert erläutert werden, die unter

anderem sowohl auf hefetyrischen Wachstumsverhalten beruht als auch der Tatsache, dass vitale wie letale Zellen in der Auszählung erfasst werden. Des weiteren ist der Umgang mit statistischen Methoden kritisch zu hinterfragen, da man zur Anwendung gängiger Korrelations- oder Regressionsanalysen von einer Normalverteilung und/oder linearem Zusammenhang ausgeht – Voraussetzungen, die hier gar nicht vorliegen. Auch eine weitere Methode wie beispielsweise der statistische Signifikanztest über die Ermittlung von  $p$  zeigt lediglich, ob ein Ergebnis im statistischen Sinn bedeutend ist, er sagt noch nichts über die Kausalzusammenhänge oder substanzwissenschaftlichen Gesichtspunkte aus (vergleiche auch *Fahrmeir et al.*<sup>12)</sup> und *Liebmann*<sup>13)</sup>).

Die im Rahmen dieser Untersuchung ermittelten Ethanolgehalte sensorisch unauffälliger Proben lagen im Durchschnitt bei 185,6 mg/kg. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Rohwarenmuster fast ausschließlich aus in der Vergangenheit als kritisch bezüglich Gärung aufgefallenen Regionen stammten – vermutlich wäre bei einer Mittelwertbestimmung gemeinsam mit Honigen aus nicht von der Problematik betroffenen Regionen der Durchschnitt niedriger ausgefallen. Jedoch ist bei der Planung eines Grenzwertes zu berücksichtigen, dass auch bei anderen Autoren Ethanolgehalte in unauffälligen Proben detektiert wurden, so lagen z.B. die Ethanolgehalte von 33 spanischen (galicischen) Honigen, die im Hinblick auf die vorangegangene Gärung unauffällig waren, bei 32 Proben zwischen 13,5 und 50,1 mg/kg (Durchschnitt 27,8, eine bei 141,8) – ermittelt über eine enzymatische modifizierte Alkoholdehydrogenase-Methode<sup>14)</sup>. Möglicherweise bedarf es der Diskussion, ob bei einem Grenzwert von nur 20 mg/kg (Empfehlung einiger staatlicher Laboratorien) die Praxis-tauglichkeit des Wertes aber auch der enzymatischen Analysemethoden gewährleistet ist.

Der enzymatische Ethanolnachweis eines Honigs wäre theoretisch ein geeignetes Werkzeug, um Gärung zu detektieren, denn Ethanol ist polar und deshalb auch durch Erwärmung nur anteilig aus dem Honig entfernbar (siehe auch *Schröder*<sup>15)</sup>). Ein im Rahmen des Projekts durchgeführter Versuch zur Vakuumtrocknung zeigte, dass Ethanol auch nach sechzehnständiger Trocknung bei 70 °C in einer Matrix, die nach Hefebeimpfung aktiv war sowohl sensorisch als auch enzymatisch bestimmt nachweisbar blieb (*Beckh, Wessel und Lüllmann*; unveröffentlichte Daten). Für die Routineanalytik wäre aufgrund der Flüchtigkeit von Ethanol der enzymatisch bestimmte Ethanolgehalt als qualitativer Nachweis als Bestätigung von Gärungsvorgängen denkbar – zur Quantifizierung ist er ebenfalls geeignet, aber ein Rückschluss auf eine vorangegangene Trocknung kann nicht gezogen werden – in diesem Falle würde der Wert den

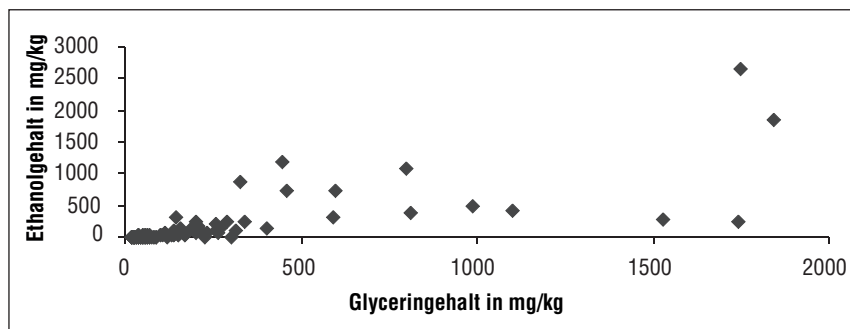


Abb. 2 Die Korrelation von Glycerin- und Ethanolgehalten an 96 Proben

Restgehalt an Ethanol nach vorangegangener Behandlung angeben. Die Etablierung eines Grenzwertes bei z. B. 20 ppb oder weniger erscheint nach obigen Untersuchungen unrealistisch, zumal auch die sensorische Feststellung von Ethanol in Spuren umstritten ist. So finden sich in Lit.<sup>16)</sup> sogar Angaben, dass Gehalte von 615 mg Ethanol pro kg Honig im Triangeltest organoleptisch nicht festzustellen waren. Diese verschiedenen Einschränkungen lassen die Eignung eines bestimmten Ethanolgehalts als Grenzwert nicht zu. Eine gewisse Menge an Ethanol und/oder Glycerin wird vom Verbraucher als nicht störend empfunden – diese Honige werden sogar zum Teil geschmacklich besser eingestuft als Honige ohne Ethanol- und/oder Glycerin-gehalt<sup>15)</sup>. Glycerin fungiert nämlich – nicht nur in Honig sondern auch beispielsweise in Wein – als Aromakomponente<sup>17)</sup>. Ziel einer möglichen Festlegung von Grenzwerten sollte also die Erfassung eines tatsächlich verdorbenen Honigs mittels sensorischer und geräteanalytischer Methoden sein. Ein „Grenzwert“ über festgelegte Ethanol- oder Glycerin-gehalte ist aus oben dargelegten Gründen nicht plausibel.

#### Literatur

- 1) *Beckh, G. und C. Lüllmann*: Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* **11**, 457–463 (1999).
- 2) *Rußmann, H.*: Hefen und Glycerin in Blütenhonigen – Nachweis einer Gärung oder einer abgestoppten Gärung. *Lebensmittelchemie* **52**, 116–117 (1998).
- 3) *Hariri, L., B. Lenz und H. Taschan*: Nachweis einer abgestoppten Gärung in Honig. *Lebensmittelchemie* **55** (1), 12 (2001).
- 4) *von der Ohe, W. und K. von der Ohe*: Honiganalyse: Bedeutung der Parameter Hefen, Glycerin und Ethanol; [www.bieneninstitut.de/jahresbericht.html](http://www.bieneninstitut.de/jahresbericht.html) (2001).
- 5) *Boulton, C. and D. Quain*: *Brewing yeast and fermentation*. Blackwell Science, Oxford (2001).
- 6) *Blomberg, A.*: Osmoregulation and osmotolerance in yeast. Dissertation University of Göteborg, Sweden (1988).
- 7) *Walker, G. M.*: *Yeasts – Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester (1998).
- 8) *Nilson, A.*: Glycerol metabolism and salt tolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Diss. University of Göteborg, Sweden (1988).
- 9) *André, L., A. Nilson and L. Adler*: The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 669–677 (1988).

- 10) Arbeitsvorschrift „Glycerin UV-Test“ der Firma Boehringer Mannheim/R-biopharm AG, Darmstadt.
  - 11) Arbeitsvorschrift „Ethanol UV-Test“ der Firma Boehringer Mannheim/R-biopharm AG, Darmstadt.
  - 12) *Fahrmeir, L., R. Künstler, I. Pigeot und G. Tutz*: Statistik: der Weg zur Datenanalyse. 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin (2003).
  - 13) *Liebmann, P. M.*: Grundlagen der Statistik. [www.kfunigraz.ac.at/fup-www/statistik.html](http://www.kfunigraz.ac.at/fup-www/statistik.html) (2004).
  - 14) *Huidobro, J. F., M. E. Rea, P. C. Branquinho de Andrade, M. P. Sanchez, M. T. Sancho, S. Muniategui and J. Simal Lozano*: Enzymatic determination of primary normal alcohols as apparent ethanol content in honey. *J. Agr. Food Chem.* **42** (9), 1975–1978 (1994).
  - 15) *Schröder, A.*: Charakterisierung der Fermentation von Honig (Honigverderb) anhand chemischer, physikalischer, mikrobiologischer und sensorischer Parameter. Diss. Universität Hohenheim, zgl. Logos Verlag, Berlin (2002).
  - 16) *Papoff, C. M., I. Floris and G. A. Farris*: Ethanol content and yeast fermentation in honey. *Apicoltore Moderno* **87** (3), 123–126 (1996).
  - 17) *Dittrich, H. H.* (Hrsg.): Mikrobiologie der Lebensmittel – Getränke. Behr's Verlag, Hamburg 1993.
-