

Einfluss der natürlichen Hefeflora auf Zusammensetzung und Sensorik des Importhonigs in Deutschland

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Institut für Honiganalytik, Bremen Dr. C. Lüllmann/G. Beckh/M. Lambert
Forschungsstelle II:	Technische Universität Dresden Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. K. Speer
Industriegruppe:	Honig-Verband e.V., Hamburg
	Projektkoordinator: Dr. Hanebuth, Honig-Verband e.V., Hamburg
Laufzeit:	2000 - 2002
Zuwendungssumme:	€ 257.205,- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Honig ist aufgrund seiner natürlichen Zusammensetzung ein Lebensmittel, das selten von mikrobiologischem Verderb betroffen ist. Bislang ist gesetzlich nur geregelt, dass der „Honig nicht in Gärung übergegangen sein darf“ (§ 2 (1) HVO). Den Ansprüchen auf eine adäquate Qualitätssicherung genügt eine solch allgemeine Formulierung heutzutage nicht mehr – eine Verbesserung in den Methoden der Qualitätskontrolle sollte diesen modernen Anforderungen Rechnung tragen.

Das Vorkommen von Hefen im Honig gilt als natürlicher Zustand, offen ist allerdings, ab welchem Hefegehalt die Sensorik abweichend beurteilt werden kann und ob es Unterschiede gibt, die in der Art der vorkommenden Hefe begründet liegen. Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, geeignete Parameter für die (Routine-) Analytik zu identifizieren bzw. adäquate Analysemethoden zu entwickeln. Weiterhin sollte ein Grenzwertvorschlag für ein oder mehrere Parameter erarbeitet werden.

Forschungsergebnis:

Bei Rohwarenmustern aus den Haupterzeugerländern von Honig wurde eine Bestands-

aufnahme des natürlichen Gehalts an Hefen sowie das Hefespektrum dieser Rohwaren bestimmt. Das Institut für Honiganalytik, Bremen, ermittelte darüber hinaus sowohl die handelsüblichen als auch die speziell im Zusammenhang mit Hefevermehrung relevanten Parameter, um so die Rohwarenmuster ausführlich zu charakterisieren. Der Wassergehalt und die Wasseraktivität stehen in Beziehung zueinander. Eine mathematische Formel kann diese Beziehung nicht hinreichend erklären, da sie von mehreren Faktoren – beispielsweise der Konsistenz – abhängt. Anhand von 70 Honigproben wurde das Verhältnis von Wassergehalt zu Wasseraktivität mit 0,803 als Korrelationskoeffizient ermittelt.

In allen Proben wurde Glycerin nachgewiesen, in elf davon Werte über der zur Zeit praktizierten Grenze von 300 mg/kg. In allen Proben wurden Gehalte an Ethanol festgestellt. Sie lagen zwischen 5 und 1.770 mg/kg. Die Hefezählung (vitale und letale Zellen) ergab zwischen 10.000 und 6.120.000 Hefen/g Honig. Die errechneten Korrelationen heferelevanter Parameter der Probehonige lauten wie folgt: Glycerin- zu Ethanolgehalt: 0,756; Säuregrad zu Glyceringehalt: 0,497; Säuregrad zu Ethanolgehalt: 0,457.

Diese Rohwarenmuster aus den wichtigsten Erzeugerländern wurden dem Procedere der Isolierung vorhandener Hefespezies unterzogen,

einerseits um die Arten zu identifizieren, andererseits um authentisches Impfmateriale für die Versuche zu erhalten. Identifiziert in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Berlin, Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, wurden:

- *Zygosaccharomyces rouxii* und *mellis*
- *Schizosaccharomyces octosporus*
- *Debaryomyces hansenii*
- *Candida magnoliae*, *holmii*, *rugosa*, *glabrata* und *parapsilosis*
- *Cryptococcus albidus* und *laurentii*
- *Rhodotorula mucilaginosa*
- *Pichia guilliermondii*
- *Torulasporea delbrueckii*
- *Aspergillus spec.*

Weiterhin wurde an der Forschungsstelle II ein Verfahren zur Isolierung der Lipidbestandteile aus der Honigmatrix entwickelt, um die freien Fettsäuren im Honig bestimmen zu können. Ferner wurde eine gaschromatographische Methode zur simultanen Bestimmung von Brenztraubensäure, DL-Milchsäure, 2-Furancarbonsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure und Citronensäure eingeführt und validiert.

Aus den Versuchshonigen Europäische Linde und Europäische Akazie wurden Honiglösungen hergestellt, die mit den Isolaten aus den Rohwaren beimpft wurden. Zum Vergleich wurden dem Honig nachempfundene Modell-Lösungen mit denselben Isolatn beimpft. Die Auswirkungen, die das Animpfen der Hefen auf den Honig hat, wurden in Abhängigkeit von der Zeit untersucht und dokumentiert. Es erfolgte keine Vermehrung der Hefen in Honiglösungen mit einem Wassergehalt von 25-30 %, wenn in der Praxis vorkommende Hefemengen angeimpft worden waren. Die Untersuchungen der Forschungsstelle II konnten ebenfalls keine signifikanten Säure- respektive Fettsäurebildungen nachweisen. Nur bei sehr hohen Animpfmengen war ein Hefewachstum unter Laborbedingungen auszulösen. Es folgte eine sehr schnelle Vermehrung und Gärung bei Modelllösungen mit einem Wassergehalt von 50 % und eine zur Modelllösung zeitlich etwas verzögerte Gärung in Honiglösungen mit ca. 50 % Wassergehalt. *Zygosaccharomyces rouxii* und *Schizosaccharomyces octosporus* bildeten während der aeroben Anreicherung, d.h. während der Vermehrung der Zellen, Glycerin und Ethanol in unterschiedlichen Mengen und Verhältnissen. Es konnten generell keine signifikanten Korrelationen zwischen den für das Hefewachstum relevanten Parametern festgestellt

werden, aber in den Einzelexperimenten gab es zum Teil für bestimmte Paare sehr hohe Korrelationen. Bei aktiver Gärung (Schäumen der Lösung) wurden Glycerin- und Ethanolwerte von > 3.000 mg/kg gemessen. Sensorisch erfassbar waren Ethanolgehalte ab ca. 1.000 mg/kg.

Die Modellansätze wurden durch die Forschungsstelle II auf organische Säuren untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei entsprechend hoher Zellzahl (ca. 10⁷ Zellen/g) und einem Wassergehalt von 50 % eine deutliche Zunahme von L-Äpfelsäure und Bernsteinsäure zu beobachten war. Aufgrund dieser Resultate wurden unterschiedliche Honige, die bereits auf die im Zusammenhang mit der Hefevermehrung relevanten Parameter durch die Forschungsstelle I untersucht worden waren, enzymatisch auf Bernstein- und L-Äpfelsäure analysiert. Auch hier fielen Honige durch sehr hohe Gehalte auf, allerdings ergab sich nur für wenige Proben eine Korrelation der beiden organischen Säuren mit der Hefezellzahl und dem Glyceringehalt.

Die bisher betrachteten Verbindungen reichten nicht aus, um den Fermentierungsstatus eines Honigs zu beschreiben. Daher wurde noch ein Verfahren zur simultanen Erfassung von Verbindungen unterschiedlichster Stoffklassen durch die Forschungsstelle II entwickelt. Mit dieser einfachen und schnellen GC/MS-Methode erhält man zunächst einen sogenannten Fingerprint, der aber schon für die Festlegung der Authentizität eines Honigs wertvolle Hinweise gibt. Darüber hinaus ist es möglich, einzelne Signale zu identifizieren und zu quantifizieren. Neben organischen Säuren und freien Fettsäuren konnten vor allem aromatische Verbindungen quantifiziert werden.

In Modellversuchen mit den Hefespezies *Zygosaccharomyces rouxii* und *Schizosaccharomyces octosporus* wurden neben 2-Phenylethanol, β-Phenylmilchsäure und α-Ketoglutar säure aber auch noch mehrere unbekannte Komponenten nachgewiesen. In den mit *Zygosaccharomyces rouxii* bebrüteten Akazienhonigen wurde noch C18:3-Ethylester identifiziert. Die Bildung mancher Komponenten ist offensichtlich an ein bestimmtes Nährstoffangebot gekoppelt.

Mit der neuen Methode wurden dann 22 europäische Sortenhonige und 14 tropische Honige analysiert. In europäischen Akazienhonigen mit hoher Hefezahl waren auch die Phenyllessigsäure und β-Phenylmilchsäuregehalte erhöht. In stark

verheften Sonnenblumenhonigen wurden zudem verschiedene Fettsäureethylester detektiert. Im Vergleich zu den europäischen Honigen wiesen die meisten tropischen Honige sehr hohe Glycerin- und Ethanolgehalte bei hoher Hefezahl auf und würden somit den Anforderungen für Blütenhonige nicht entsprechen. Neben 2-Phenylethanol konnten auch Benzoe-, 3,4-Dimethoxybenzoe-, α -Hydroxy-4-methoxyphenyllessig-, 4-Hydroxyphenylpropan-, 4-Methoxybenzoe-, 4-Methoxyphenyllessig-, Phenyllessig-, β -Phenylmilch- und Phenylpropansäure detektiert werden. Die meisten der genannten Methoxy-Verbindungen dürften allerdings als Hydroxyverbindungen vorgelegen haben, da mit dem benutzten Derivatisierungsreagenz (Diazomethan) Hydroxylgruppen unter bestimmten Bedingungen in ihre Methoxyverbindungen übergeführt werden. Kaffeeblütenhonige aus Vietnam enthielten erstaunlicherweise nur sehr geringe Gesamtgehalte an aromatischen Komponenten; sie wiesen aber die höchsten Gehalte an Bernsteinsäure auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Projekt erarbeiteten Verfahren zu völlig neuen Erkenntnissen und Ansätzen in der Qualitätskontrolle geführt haben. Mehrere Verbindungen wie Bernsteinsäure, β -Phenylmilchsäure, 2-Phenylethanol und verschiedene Fettsäureethylester, neben noch zu identifizierenden Komponenten, sind als Indikatorsubstanzen denkbar. Für die Ableitung von Grenzwerten ist das Datenmaterial aber noch nicht ausreichend. Grenzwerte werden aufgrund der Ergebnisse nicht universell definiert werden können, sondern immer nur für einzelne, individuelle Honigtrachten.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse des Forschungsprojekts kommen unterschiedlichen Zielgruppen zugute: Sie helfen Dienstleistern auf dem Gebiet der Qualitätskontrolle, da der Qualitätsfaktor „Hefe und Honig“ zukünftig wissenschaftlich fundiert beurteilt und entsprechend kontrolliert werden kann. Der Honighandel wird mehr Sicherheit bekommen, wie die Hefeproblematik im Honig zu beurteilen ist. Die verbesserte Qualitätskontrolle wird darüber hinaus dazu beitragen, den Handel vor der Einfuhr qualitativ unzureichender Ware und den damit verbundenen finanziellen Risiken besser zu schützen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2003.
2. Pilz-Güther, D., Speer, K., Beckh, G. und Lüllmann, C.: Gehalte von L-Äpfelsäure und Bernsteinsäure in Honigen. Lebensmittelchem. 57, 27-28 (2003).
3. Timmroth, R. und Speer, K.: Development of Analytical Indicator Substances for Honeys Contaminated with Yeasts. Eur. Food Chem. XII, Proceedings 1, 142-145 (2003).
4. Beckh, G., Wessel, P. und Lüllmann, C.: Natürliche Bestandteile des Honigs - Hefen und deren Stoffwechselprodukte, Teil 2: Der Wassergehalt und die Wasseraktivität als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum. Dt. Lebensmittel-Rundsch. 100 (1), 14-17 (2004).
5. Pilz-Güther, D. und Speer, K.: Entwicklung einer GC-Methode für die simultane Bestimmung von organischen Säuren in Honig. Dt. Lebensmittel-Rundsch. 100 (3), 84-87 (2004).
6. Beckh, G., Wessel, P. und Lüllmann, C.: Natürliche Bestandteile des Honigs: Hefen und deren Stoffwechselprodukte – Teil 3: Der Ethanol- und der Glyceringehalt als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum. Dt. Lebensmittel-Rundsch. 101 (1), 1-5 (2005).

Weiteres Informationsmaterial:

Institut für Honiganalytik
Flughafendamm 9 a, 28199 Bremen
Tel.: 0421/5947-70, Fax: 0421/5947-71
E-Mail: info@qsi3.de

Technische Universität Dresden
Institut für Lebensmittelchemie
Bergstr. 66, 01069 Dresden
Tel.: 0351/ 4633-3132, Fax: 0351/4633-2006
E-Mail: Karl.Speer@chemie.tu-dresden.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de