

- 29) Ysart G, Miller P, Crews H, Robb P, Baxter M, De L'Argy C, Lofthouse S, Sargent C, Harrison N: Food Addit Contam **16**, 391–403 (1999).
- 30) Iyengar GV, Wolf WR, Tanner JT, Morris ER: Sci. Total Environ. **256**, 215–226 (2000).
- 31) Wilhelm M, Wittsiepe J, Schrey P, Feldman C, Idel H: Int J Hyg Environ Health **206**, 493–503 (2003).
- 32) Rubio C, Gonzalez-Iglesias T, Revert C, Requera JI, Gutierrez AJ, Hardisson A: J Agr Food Chem **53**, 6543–6549 (2005).
- 33) Leblanc J-C, Guerin T, Noël L, Calamassi-Tran G, Volatier J-L, Verger P: Food Addit Contam **22**, 624–641 (2005).
- 34) Van Cauwenbergh R, Bosscher D, Robberecht H, Deelstra H: Eur Food Res Technol **212**, 13–16 (2000).
- 35) Wilhelm M, Wittsiepe J, Schrey P, Budde U, Idel H: Sci Total Environ **285**, 11–19 (2002).
- 36) Rubio C, Hardisson A, Requera JI, Revert C, Lafuente MA, Gonzalez-Iglesias T: Environ Res **100**, 123–129 (2006).
- 37) Hendrix P, Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Deelstra H: Z Lebensm Unters Forsch A **206**, 222–227 (1998).

## Nachweis von fremder Invertase in Honig

K. Beckmann, G. Beckh und C. Lüllmann

Quality Services International GmbH, Flughafendamm 9a,  
D-28199 Bremen

### Zusammenfassung

Honig kann Ziel von Verfälschungen mit Fremdzuckern sein. Für derartige Beimischungen kommt auch Rübenzucker zum Einsatz, welcher jedoch im Zuckerprofil des Honigs auffallen würde, da Honig üblicherweise nur sehr geringe Mengen an Saccharose enthält. Wird zusätzlich  $\beta$ -Fructofuranosidase zugesetzt, ein Enzym, welches Saccharose in Glucose und Fructose spaltet, ist die Erkennung des Rübenzuckers über das Zuckerprofil jedoch nicht mehr möglich. In dieser Arbeit wird eine Möglichkeit zum Nachweis dieser Invertase vorgestellt, was indirekt auf eine Verfälschung des Honigs hindeuten kann.

### Summary

Honey can be the aim for adulteration with products of foreign sugars. For such admixtures sometimes beet sugar is used. But honey sugar profiles would be conspicuous because honey naturally contains saccharose only in small amounts. However  $\beta$ -fructofuranosidase can be added additionally. This enzyme hydrolyzes saccharose to glucose and fructose, and afterwards the detection of beet sugar by measuring the sugar profiles is not possible anymore. In this work a method for the evidence of this invertase is presented which can indicate an adulteration of honey indirectly.

### Einleitung

Honig besitzt als naturbelassenes Erzeugnis einen hohen Stellenwert. Nach Anl. 2 in Verbindung mit § 2 der deutschen Honigverordnung<sup>1)</sup> dürfen Honig keine fremden Stoffe zugesetzt werden. Es ist daher notwendig, unerlaubte Verschnitte mit Fremdzuckern sicher nachzuweisen.

Zum Nachweis von Beimischungen mit  $C_4$ -Zuckern (Rohrzucker, Maisstärke-Sirupe) ist die  $^{13}C$ -Stabilisotopenanalytik (AOAC-Methode 998.12) etabliert, bei der das Verhältnis der  $^{12}C$ - und  $^{13}C$ -Isotopen des Gesamthonigs mit dem des Honigproteins verglichen wird<sup>2,3)</sup>. Je höher der Anteil von  $C_4$ -Zuckerprodukten im Honig ist, desto negativer wird der Quotient zwischen Protein- und Honigwerten. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass positive Abwei-

chungen ein Vorhandensein von  $C_3$ -Zuckern anzeigen, wozu beispielsweise Rübenzucker (*Beta vulgaris*) gehört. Da allerdings die Verschiebung der Isotopenverhältnisse dabei deutlich geringer ausfällt, ist mit dieser Methode ein Nachweis nur bei hohen Zumischungsgraden möglich<sup>4)</sup>.

Eine weitere Möglichkeit, honigfremde Kohlenhydrate nachzuweisen, besteht in der Aufnahme der Zuckerprofile mittels HPLC mit RI-Detektion nach DIN 10758<sup>5)</sup>. Ein unzulässiger Zusatz an Rübenzucker würde hier auffallen, da Rübenzucker aus Saccharose besteht, welche üblicherweise nur in geringen Mengen im Honig enthalten ist. Nach der Honigverordnung darf Honig maximal 5 % Saccharose aufweisen, lediglich für wenige Honigsorten, wie zum Beispiel Akazie oder Lavendel, gelten höhere Grenzwerte.

Aus diesem Grund wird vermutet, dass derart gestreckten Erzeugnissen zusammen mit dem Rübenzucker das Enzym  $\beta$ -Fructofuranosidase (EC-Nummer: 3.2.1.26) zugesetzt wurde. Dabei handelt es sich um eine Invertase (Saccharase), die Saccharose vollständig in Glucose und Fructose umsetzt. Diese beiden Monosaccharide machen mit mehr als 90 % bereits naturgemäß den größten Teil der Honigzucker aus, so dass das Zuckerprofil auch nach einer derartigen Beimischung unverändert erscheint. Der Nachweis eines Zusatzes an Rübenzucker wäre dann auch mittels HPLC nicht mehr möglich.

Honig enthält natürlicherweise eine Invertase, wobei es sich dabei um  $\alpha$ -Glucosidase handelt<sup>6)</sup>. Diese bleibt zwar unter entsprechenden Bedingungen über eine längere Dauer stabil, aber Versuche haben gezeigt, dass selbst hohe Aktivitäten im Honig nicht ausreichen, um in einem kurzen Zeitraum eine große Menge Saccharose zu hydrolysieren.

Die Aktivität der honigeigenen Invertase wird mit der Methode nach Siegenthaler bestimmt<sup>7)</sup>, bei der von dem Substrat p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid durch dieses Enzym das Produkt p-Nitrophenol abgespalten wird, welches photometrisch gemessen werden kann.  $\beta$ -Fructofuranosidase lässt sich mit dieser Methode jedoch nicht nachwei-

sen, so dass das Ziel dieser Forschungsarbeit war, eine Methode zu erarbeiten, mit der ein eventueller Zusatz von  $\beta$ -Fructofuranosidase in Honig detektiert werden kann. Die Grundlage für die Methodenentwicklung bildete die Spezifität von  $\beta$ -Fructofuranosidase hinsichtlich der Umsetzung des Trisaccharids Raffinose zu Melibiose (Disaccharid) und Fructose, während die honigeigene Invertase auf das Substrat Raffinose nicht reagiert<sup>8,9</sup>. Das natürliche Vorkommen dieser beiden Zucker in Honig ist nur in sehr geringen Mengen beobachtet worden, lediglich Waldhonige können zum Teil höhere Raffinosegehalte aufweisen<sup>10,11</sup>.

**Material und Methode**

Als Referenzzucker wurden D-(+)-Raffinose-pentahydrat (*Sigma*) und D-(+)-Melibiose (*Sigma*) eingesetzt. Als Referenzenzym diente  $\beta$ -Fructofuranosidase (*Fluka*). Für die Dotierungslösung der Honigproben wurden 4 g Raffinose in 50 ml bidest. Wasser gelöst (8 %). Als Vergleichsstandardlösung für die HPLC wurde eine 0,25%ige Lösung von Raffinose und Melibiose in bidest. Wasser/Methanol (3 + 1) angesetzt.

Ein Aliquot der Dotierungslösung wurde mit der gleichen Menge Honigprobe vermischt, und das homogenisierte Gemisch wurde in einem verschlossenen Gefäß ca. 15 h bei 65 °C (Temperaturoptimum der  $\beta$ -Fructofuranosidase) inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Messung der Proben analog der Methode zur Bestimmung der Zuckerprofile in Honig (HPLC mit RI-Detektion; DIN 10758). Parallel dazu wurde ein Blindwert, also ohne Zusatz von Raffinose, ermittelt.

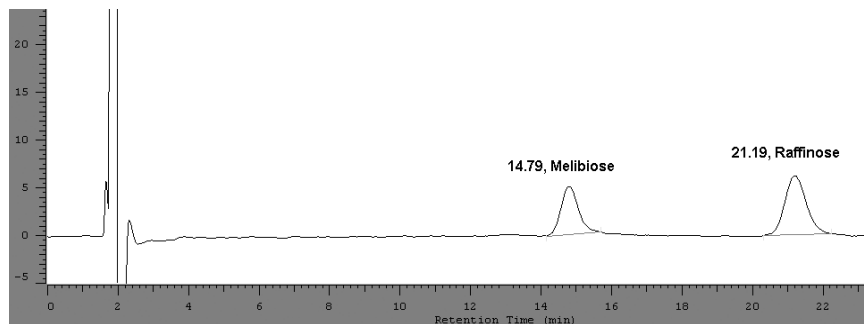
**Ergebnisse und Diskussion**

Die HPLC-Messung der Standardlösungen von Raffinose und Melibiose zeigten eine gute Quantifizierbarkeit und eine ausreichende Trennung der beiden Saccharide untereinander sowie von den anderen Honigzuckern (Abb. 1). Zunächst wurden unverfälschten Honigproben, die unmittelbar von Imkern bezogen wurden und unterschiedliche natürliche Invertasegehalte aufwiesen, 30 % Saccharoselösung (100 g in 40 ml Wasser) zugesetzt und die Zuckerprofile bestimmt. Danach wurde zu einem Teil der Proben eine geringe Menge  $\beta$ -Fructofuranosidase zugegeben (0,05 % be-

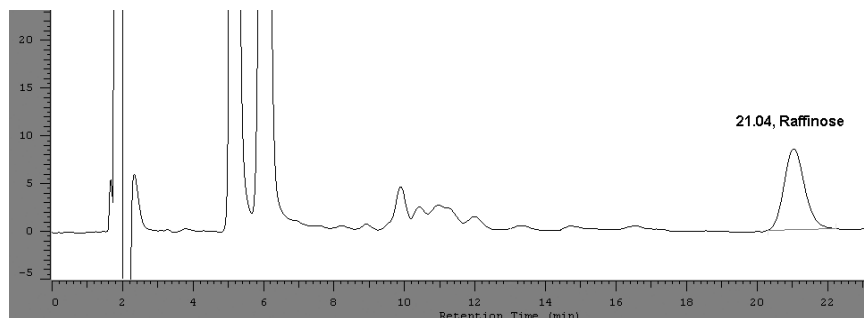
zogen auf die Menge an Saccharose). Nach den anschließenden Zuckermessungen war zu beobachten, dass ein Großteil der Saccharose in den mit Enzym dotierten Proben bereits nach wenigen Stunden hydrolysiert war. Der Grad der Umsetzung war bei den bei 65 °C inkubierten Proben deutlich höher. Dagegen blieb bei den Honigen ohne Enzymbeigabe die Saccharose-Konzentration nahezu unverändert.

Darauf folgend wurden Honigproben mit und ohne Zusatz an  $\beta$ -Fructofuranosidase mit der oben beschriebenen Methode auf Aktivität der honigfremden Invertase analysiert. Die Messungen der undotierten Honige ergaben, dass die Raffinose, wie erwartet, nicht abgebaut wurde und im HPLC-Chromatogramm auch kein Signal der Melibiose zu erkennen war (Abb. 2).

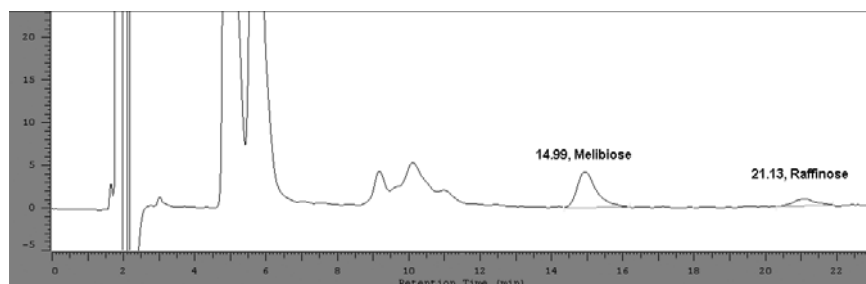
Die Honige, denen  $\beta$ -Fructofuranosidase zugegeben wurde, zeigten indes nach der Inkubationszeit einen ausgeprägten Melibiose-Peak sowie eine signifikante Abnahme des Gehaltes an Raffinose (Abb. 3). Die Blindwerte aller Proben blieben vernachlässigbar, lediglich einige Waldhonige wiesen marginale Konzentrationen an Raffinose auf.



**Abb. 1** Chromatogramm einer Standardlösung von Raffinose und Melibiose (jeweils 0,25 % in H<sub>2</sub>O/MeOH (3+1))



**Abb. 2** Chromatogramm einer mit Raffinose dotierten Honigprobe ohne Zusatz an  $\beta$ -Fructofuranosidase nach Inkubation



**Abb. 3** Chromatogramm einer mit Raffinose und  $\beta$ -Fructofuranosidase dotierten Honigprobe nach Inkubation

Es gelingt mit der vorgestellten Methode somit, anhand der Bildung von Melibiose aus Raffinose die Enzymaktivität von  $\beta$ -Fructofuranosidase in Honigen nachzuweisen. Ein Vorhandensein dieses Enzyms im Honig deutet dabei auf eine mögliche Verfälschung mit hydrolysiertes Saccharose hin. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch Vorsicht geboten, da diese Invertase möglicherweise auch aus anderen Quellen stammen könnte. Beispiel sind Reste von Futterteigen aus der Bienenfütterung, obwohl auch größere Mengen Futter nicht im Honig enthalten sein sollten. In einem solchen Fall wäre aber unter Umständen nicht von einer absichtlichen Verfälschung auszugehen. Somit wird bei einem positiven Befund zunächst eine genauere Überprüfung der Herkunft und der Produktionsbedingungen eines solchen Honigs vorgeschlagen.

#### Literatur

- 1) Honigverordnung v. 16.1.2004 (BGBl. I S. 92) i. d. F. v. 8.8.2007 (BGBl. I S. 1816).
- 2) *White JW, Winters K*: Honey Protein as Internal Standard for Stable Carbon Isotope Ratio Detection of Adulteration of Honey. *J Assoc Off Anal Chem* **72** (6), 907–911 (1989).
- 3) AOAC Official Method 998.12: C-4 Plant Sugars in Honey.
- 4) *Beckmann K, Beckh G, Lüllmann C*: Positive deviations of  $\delta^{13}\text{C}$  IRMS-values between honey and protein – effects of adulterations. *J AOAC Int*, in Planung.
- 5) DIN 10758: Untersuchung von Honig – Bestimmung des Gehaltes an den Sacchariden Fructose, Glucose, Saccharose, Turanose und Maltose – HPLC-Verfahren.
- 6) *von der Ohe W, Raude-Roberg L, Dustmann J*: Comparison of methods for determination of Saccharase activity in honey. *Apidologie* **30** (5), 412–413 (1999).
- 7) DIN 10759-1: Untersuchung von Honig – Bestimmung der Saccharase-Aktivität, Teil 1: Verfahren nach Siegenthaler.
- 8) BRENDA Enzymdatenbank, <http://www.brenda-enzymes.info>.
- 9) *Cho NC*: Purification and characterization of honey sucrase. *J Korean Biochem* **27** (6), 509–513 (1994).
- 10) *Mateo R, Bosch-Reig F*: Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem* **60** (1), 33–41 (1997).
- 11) *Da Costa Leite JM et al.*: Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chem* **70**, 93–98 (1999).

Empfehlung der European Spice Association (ESA)

### Trocknungsfaktoren für Erzeugnisse der Gewürzindustrie zur Anwendung bei der Beurteilung von Pflanzenschutzmittelrückständen

**Gerhard Weber**

Fachverband der Gewürzindustrie e. V., Reuterstraße 151,  
D-53113 Bonn

Durch die Verordnung (EG) Nr. 396/2005 vom 23. Februar 2005 (ABl. L 70 vom 16.3.2005) über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs hat die EG Kommission die gesetzlichen Regelungen über Pflanzenschutzmittelrückstände in Europa vereinheitlicht.

Die Anhänge zu dieser Verordnung mit den Rückstandshöchstmengen an Pflanzenschutzmitteln in und auf Lebensmitteln wurden in der Zwischenzeit im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft veröffentlicht und sind im September 2008 in Kraft getreten. Die Lebensmittel, für die diese Höchstmengen gelten, sind in Verordnung (EG) Nr. 178/2006 vom 1. Februar 2006 (ABl. L 29 vom 2.2.2006) aufgeführt. Dort ist im Anhang unter Gruppe 2 v) festgelegt, dass die Rückstandshöchstmengen an Pflanzenschutzmitteln für **frische** Kräuter gelten.

Für **getrocknete** Kräuter, wie sie von den Firmen der Gewürzindustrie gehandelt werden, sind die gemessenen Pflanzenschutzmittelrückstände auf das frische Erzeugnis „umzurechnen“. Dies ergibt sich aus Artikel 20 der Verordnung 396/2005, wonach durch die Verarbeitung be-

wirkte Veränderungen der Pestizidrückstandsgehalte zu berücksichtigen sind.

#### ESA empfiehlt einheitliche Vorgehensweise

Damit bei der Beurteilung von Pflanzenschutzmittel-Rückständen auf getrockneten Kräutern einheitliche Maßstäbe angelegt werden können, hat der Europäische Verband der Gewürzindustrie, ESA, Trocknungsfaktoren erarbeitet, die im Folgenden abgedruckt sind. Mitglied in der ESA sind Verbände und Firmen der Gewürzindustrie aus 15 Europäischen Ländern sowie aus Ägypten, Indien, Türkei und Sri Lanka. Zur praktischen Anwendung wird empfohlen, die Trocknungsfaktoren in der Form anzuwenden, dass der in der Verordnung festgelegte Höchstwert für ein Pflanzenschutzmittel auf einem bestimmten Lebensmittel mit dem Trocknungsfaktor für das betreffende Kraut multipliziert wird. Das Ergebnis dieser Multiplikation wird mit dem Analysergebnis verglichen.

Die Liste enthält nicht alle von der Gewürzindustrie gehandelten Kräuter, sondern gibt Beispiele. Für Kräuter, die