Die entwickelten Klassifizierungssysteme sind modular aufgebaut, schnell, vollständig automatisierbar und, unter Berücksichtigung der sich überlappenden Klassen, sehr leistungsfähig.

Literatur

1) *Horimoto, Y., K. Lee* and *S. Nakai*: Classification of Microbial Defects in Milk Using A Dynamic Headspace Gas Chromatograph and Computer-Aided Data Processing. J. Agric. Food Chem. **45**, 743-747 (1997).
2) *Lipp, M.*: Determination of the adulteration of butter fat by its triglyceride composition obtained by GC. Food Chem. **55**, 389-95 (1996).
3) *Cao, Z., H. Lin, B. Wang, K. Wang* and *R. Yu*: Piezoelectric crystal sensor array used as an organic vapor sensing system. Microchem. J. **52**, 174-80 (1995).
4) *Montanarella, L., M. R. Bassani* and *O. Breas*: Chemometric classification of some European wines using pyrolysis mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **9**, 1589-93 (1995).
5) *Schreier, P.* and *L. Reiner*: Biometric evaluation of gas chromatographic data in the differentiation of spirits. Dtsch. Lebensm.-Rundsch. **73**, 387-90 (1977).
6) *Otto, M.* : Chemometrie – Statistik und Computereinsatz in der Analytik. VCH Weinheim, 1997.
7) *Berthold, M. R.* und *J. Diamond*: Boosting the performance of rbf networks with dynamic decay adjustment. Advances in Neural Information Processing Systems, Band 7, 1995.
8) *Duda, R.* und *P. Hart*: Pattern Classification and Scene Analysis. Wiley & Sons, 1973.
9) SNNS – Der Stuttgart Neural Network Simulator. Nähere Informationen unter http://www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/SNNS/
10) The Unscrambler. Camo AS, Olav Tryggvasonsgt. 24, N-7011, Trondheim, Norway, http://www.camo.no
11) *Kursawe, P.* : Anwendung multivariater Methoden und künstlicher neuronaler Netze zur Klassifizierung von Spirituosen mittels Headspace-GC/MS-Kopplung, Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1998 (ftp://ftp.anachem.ruhr-uni-bochum.de/pub/chemometrie/kursawe_diplomarbeit.pdf).

Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte

Teil 1: Hefegehalt

G. Beckh und C. Lüllmann

Institut für Honiganalytik, Flughafendamm 9A, D-28199 Bremen

Zusammenfassung

Hefen kommen immer im Honig vor und gehören unbestritten zu den natürlichen Bestandteilen im Sediment des Honigs. Es stellt sich die Frage, welcher Gehalt an Hefen im Honig noch als natürlich bezeichnet werden kann. Rechtliche Rahmenbedingungen für eine eindeutige Bewertung sind nicht vorhanden, so dass es zwangsläufig zu Problemen durch unterschiedliche Bewertung in der Lebensmittelüberwachung und im Handel kommt.

Eine bloße Auszählung von lebensfähigen und/oder stoffwechselinaktiven Hefen kann nicht ausreichen, um einen Honig als nicht verkehrsfähig beurteilen zu können, denn offensichtlich sind im Honig in der Regel sehr unterschiedliche Hefespezies anzutreffen, welche nicht zwangsläufig einen Verderb des Honigs verursachen.

Daher sind grundlegende wissenschaftliche Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen dringend erforderlich.

Summary

Yeasts can always be found in honey thus belonging without any doubts to the natural components of the honey sediment. However, the question which amount of yeasts can be accepted as a maximum natural limit or as indication for fermentation. There is neither a generally accepted recommendation nor a legal limit for yeasts in honey thus causing individual interpretations by the authorities and confusion for importers and producers. A simple microscopic counting of living and/or inactive yeast cells is not adequate for rejecting honey as not suitable for human consumption. Many different yeast species are reported for honey and honey sources not causing necessarily a fermentation. Therefore basic scientific research is required to clear these open questions.

Systematik der Hefen

Hefen gehören in die Mikroorganismengruppe der Pilze. Sie werden auch Sproßpilze genannt, da sie sich durch Sprossung und Teilung vermehren. Hefen sind einzellige Organismen. Gegenwärtig sind 60 Hefegattungen mit mehr als 500 Arten bekannt[1].

Da es international keine einheitliche Systematik für Hefen gibt, finden sich je nach Autor unterschiedlichen Zuordnungen. Zudem gehören die bekannten Hefespezies verschiedenen Klassen an (Ascomyceten, Basidiomyceten, Deuteromyceten[2]). Die meisten für den Honig relevanten Arten finden sich jedoch bei den Ascomyceten, Ordnung Endomycetales und den Deuteromyceten (Fungi imperfecti).

Hefen sind, wie die meisten Pilze, aerob atmende Organismen; unter Luftabschluß können viele Arten jedoch auch Stoffwechselenergie durch alkoholische Gärung gewinnen, dabei entstehen als Hauptprodukte Ethanol und CO_2.

Vorkommen von Hefen

Hefen sind ubiquitär anzutreffen, sie werden durch Wind, Staub, Regen verbreitet. Vorzugsweise findet man sie in der Natur an allen Standorten, an denen zuckerreiche Säfte frei werden: im Nektar von Blüten, auf Früchten und auf Blättern im sog. Honigtau. Eine typische Nektarhefe ist z. B. *Metschnikowia reukauffii*. Als typische Honigtau-„Hefe" bzw. typ. Rußtau-„Pilz" wird *Pullularia* (Dematium) *pullulans* in der Literatur genannt[3]. Bei letzterer muß angemerkt

werden, daß diese mittlerweile systematisch in die Klasse Deuteromycetes (*Fungi imperfecti*), Ordnung Hyphomyceten eingeordnet ist, bei denen sich auch bekannte Schimmelpilzgattungen wie Aspergillus finden. Der aktuelle Name dieser Art ist *Aureobasidium pullulans*. Unter günstigen Lebensbedingungen wächst dieser Pilz fädig, unter ungünstigen bildet er Sproßzellen (= Hefen)[2].

Hefen in Honig

Die Ausgangssubstanzen für Honig, Nektar und Honigtau, sind natürlicher Lebensraum für Hefen, somit gehören Hefen unbestritten zu den natürlichen Bestandteilen im Sediment des Honigs. Aber auch an Pollen haftende Hefen werden von Bienen mit eingetragen. Desweiteren kommt Imkermaterial, z. B. Beuten, als Hefequelle in Frage. Als am häufigsten mit Bienen assoziierte Gattungen werden in der Literatur genannt *Candida, Rhodotorula, Torulopsis, Cryptococcus, Hanseniaspora, Metschnikowia, Pichia, Kloeckera, Zygosaccharomyces*[4-6].

Daher sind bei der mikroskopischen Pollenanalyse zur Herkunftsbestimmung des Honigs Hefen routinemäßig in unterschiedlichen Mengen erkennbar. Schon bei *Zander* findet sich die Aussage: „In keinem Honig fehlen Hefezellen und Bakterien"[7].

Hefen und Gärung: Natürlicher Gehalt von Hefen in Honig

Hefen sind zwar gesundheitlich unbedenklich, aber für die Qualität des Produktes wichtig. Denn unter bestimmten Voraussetzungen können manche Hefearten zum einzigen bekannten Verderb des Honigs durch alkoholische Gärung führen. Daher ist die Frage, welcher Gehalt an Hefen -unabhängig von der Sensorik- für einen Speisehonig noch als natürlich zu akzeptieren ist. In der deutschen Honigverordnung vom 13.12.1976 in der Fassung vom 14.7.1998 werden keine mikrobiologische Höchstmengen erwähnt. Es ist daher fraglich, wie nach Honigverordnung ein „erhöhter" Gehalt an Hefen beurteilt werden kann, z. B. als organische Verunreinigung nach §2 (1) 1: „Honig darf – abgesehen von unvermeidbaren geringen Mengen – keine organischen Verunreinigungen enthalten." Allein eine mikroskopisch feststellbare „erhöhte" Menge an Hefen – ohne sensorisch und optisch erkennbare Gärung – zu beanstanden, setzt" voraus, daß der „Normalgehalt" an Hefen für Honig mit entsprechendem Analyseverfahren einheitlich festgelegt ist.

Derzeit ist der „natürliche" Hefegehalt im Honig stark in Diskussion und wird von unterschiedlichen Expertenkreisen und Überwachungsbehörden sehr uneinheitlich gehandhabt. Das führte mittlerweile dazu, daß im Handel willkürlich festgelegte Grenzwerte ohne fundierte Methodik etabliert wurden[8].

Obwohl von einem „erhöhten" Hefegehalt keine gesundheitliche Schädigung für den Verbraucher ausgeht, ist dieser Punkt jedoch im Sinne des Produktschutzes relevant.

Gärung ist nach § 2 (1) 3 der Honigverordnung als Qualitätsparameter von Honig geregelt. Dort heißt es, daß „Honig nicht in Gärung (Treiben) übergegangen sein darf". Nichts ausgesagt wird über Verursacher von Gärung, wie Hefen oder Bakterien. Im Kommentar nach *Zipfel*[9] beschränkt man sich auf optische Merkmale (Blasen- und Schaumbildung), keine Angabe erfolgt über den Grad der Gärung. So könnten z .B. einzelne Hefen im Honig Gärung verursachen, ohne dass es zwangsläufig zu Blasen- oder Schaumbildung führt. Normalerweise ist bei Feststellung der Gärung i. S. der Honigverordnung auch eine deutliche geruchliche und geschmackliche Abweichung feststellbar, die dann zusätzlich nach § 2 (1) 4 der Honigverordnung als „artfremd" zur Beanstandung führen muß.

Problematisch wird es dann, wenn Honig mit hohem Wassergehalt , aber noch unter dem gesetzlichen Höchstwert von 21% aus z. B. tropischen Erzeugerländern mit beginnender, aber nicht offensichtlicher Gärung in eine Fertigmischung eingeht. Die Fertigware ist nicht gärig im Sinne der HVO, ist geschmacklich nicht auffällig, kann aber einen erhöhten Hefegehalt aufweisen.

Die derzeitige „Grenzwert"-Empfehlung"[8] beruht auf einer mikroskopischen Zählung von Hefen. Mikroskopisch ist eine Zuordnung von Hefen zu einer Gattung oder einer Art nicht möglich. Ebenso ist nicht festzustellen, ob die Hefen tot oder noch stoffwechselaktiv sind. Die Bestimmung von Hefen ist äußerst aufwendig und erfolgt sowohl nach morphologischen Merkmalen, z. B. Sproßformen, Sporenbildung als auch nach physiologischen, wie Gärfähigkeit oder Assimilation bestimmter Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen. Außerdem sind nicht alle Hefen gärfähig, es gibt reine Atmungshefen, wie z. B. *Rhodotorula spec.* oder *Cryptococcus spec.*, die sowohl aus Pollen und Nektar als auch aus Honig nachgewiesen wurden[10-12].

In der Getränketechnologie unterscheidet man in Hinblick auf den Verderb noch zusätzlich nach dem Grad der Gärfähigkeit zwischen gärkräftig, gärfähig, gärschwach[13].

Stoffwechsel, Osmotoleranz, Wachstumsparameter

Da bei der Atmung ca. 20 mal mehr Energie gewonnen wird als bei der alkoholischen Gärung, wachsen und vermehren sich Hefen vorzugsweise unter Sauerstoffzufuhr. Das bedeutet, daß unter günstigen, aeroben Lebensbedingungen der Hefegehalt sich erst einmal erhöht, ohne daß eine Gärung stattfinden muß. Wenn z. B. die Zellzahl im Substrat so hoch wird, daß Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr nicht mehr ausreichend sind, um den Stoffwechsel aerob aufrecht zu erhalten, kann auf Energiegewinnung in Form der alkoholischen Gärung umgestellt werden. Unter optimalen Bedingungen (d. h. ausreichend Nährstoffe und günstiger Wassergehalt bzw. Wasserverfügbarkeit, ausgedrückt als a_w-Wert) liegt die Generationszeit (Verdopplungszeit) von Hefen bei 90 bis 120 min. Je niedriger der a_w-Wert ist, desto weniger Mikroorganismen können wachsen. Für das

Wachstum von Hefen generell wird ein min. a_w-Wert von 0,88 angegeben[2].

Hohe Zuckerkonzentrationen, wie sie im Honig vorhanden sind, bedingen einen niedrigen a_w-Wert und hemmen somit normalerweise das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen. Hefen, die sich unter solchen Bedingungen noch vermehren können, werden osmotolerant genannt. Für das Wachstum osmotoleranter Pilze wird generell ein erforderlicher a_w-Wert von min. 0,62 angegeben, osmotolerante Hefen in Honig können sogar bei a_w-Werten unter 0,60 noch wachsen[2]. Unter solchen minimalen Bedingungen kann die übliche Generationszeit aber auf 2 Monate ansteigen.

Osmotoleranz ist kein Artmerkmal, sondern kann bei Stämmen der verschiedensten Hefearten auftreten. Ursächlich werden die osmophilen Eigenschaften durch die Anreicherung von Glycerol und anderen Polyolen in der Zelle bedingt[3, 14].

Häufig finden sich osmotolerante Arten unter der Gattung Zygosaccharomyces, so wie bekannte Verursacher von Schaumgärung in Honig *Zygos. rouxii* und *bailii*[15].

Obwohl die Wasseraktivität ausschlaggebend ist für die Haltbarkeit des Honigs bezüglich des Hefewachstums, beinhaltet die Honigverordnung diesen Parameter nicht. Es wird lediglich der max. Wassergehalt als wesentlicher Faktor geregelt: 21% bzw. 23% bei Heide- und Kleehonig.

Folglich sind die Angaben über den Wassergehalt, bei dem ein Honig sicher vor Fermentation sein soll, sehr unterschiedlich, z. B. unter 17,1% unabhängig vom Hefegehalt und über 20% Wassergehalt (entspricht noch der Honigverordnung!) soll immer eine Gefahr der Gärung bestehen unabhängig vom ursprünglichen Hefegehalt[16]. Nach *Alcala*[17] besteht zwischen Wassergehalt und Wasseraktivität folgender Zusammenhang: a_w = 0,025 Wassergehalt in g/100g + 0,13.

Zusätzlich zum a_w-Wert beeinflussen andere Parameter wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Ausgangsgehalt an Hefen Wachstum und Vermehrung.

Verbunden mit der Osmotoleranz ist eine größere Hitze- und pH-Toleranz.

So verträgt Zygosaccharomyces rouxii eine Erwärmung auf 85°C für 40 min. Normalerweise werden die vegetativen Zellen von Bakterien und Pilzen bei feuchter Hitze von 60°C in 5–10 min abgetötet, die Sporen jedoch erst oberhalb 80°C. Trockene Hitze erfordert höhere Temperaturen und längere Einwirkzeit[2].

Während niedrige pH-Werte üblicherweise das Wachstum von Mikroorganismen hemmen, können osmotolerante Hefen auch im sauren Bereich noch wachsen – z. B. *Zygosaccharomyces rouxii* von pH 1,5 bis 8,0 – dies deckt den natürlichen Bereich von Honig (pH von 3,2 bis 6,0) ab.

Einfluß auf die Qualität des Endproduktes

Eine starke Vermehrung von Hefen im Endprodukt Honig

Eine »Auslese« aus dem deutschen Weinrecht

Vom Weinberg zur Weinprobe
Von Prof. Dr. Hans-Jörg Koch, Amtsgerichtsdirektor a.D., Lehrbeauftragter für Weinrecht an der Unversität Mainz.
dtv-Band 5637
1999.
Stand: 1. Januar 1999
XVII, 287 Seiten.
Kartoniert DM 19,90

109808/A4142

Koch
Wein und Recht von A–Z

Das in Deutschland geltende Weinrecht

ist ein äußerst komplexes Regelungsgebilde, das ständigen Änderungen unterworfen ist, bedingt durch veränderte Marktsituationen, neue Technologien, die Erwartungen des Verbrauchers und modernisierte Absatzvorstellungen von Produzenten und Vermarktern.

Das erste Lexikon dieser Art

Dieser Band gibt in 569 Stichworten sowohl dem Weinfachmann als auch dem Weinfreund allgemeinverständlich Auskunft u.a. über

- Weinbau und Kellerwirtschaft
- Herstellung, Bezeichnung, Vermarktung und Überwachung
- die wichtigsten in Deutschland angebauten Rebsorten
- Weiterverarbeitungsprodukte des Weines wie Perlwein, Likörwein, Schaumwein, Branntwein.

Ein **Muster-Weinetikett** erklärt, welche Angaben darauf enthalten sein müssen und dürfen bzw. wie sie zu verstehen sind. Der Anhang enthält eine Übersicht der weinrechtlichen Vorschriften der EG und des Bundes sowie die Texte von Weingesetz, Weinverordnung und Wein-Überwachungsverordnung.

Der Band hilft

Juristen in allen Rechtsfragen rund um den Wein weiter. Auch Praktiker anderer Fachgebiete und Weinliebhaber finden hier Antwort auf alles, was sie schon immer wissen wollten.

Beck-Rechtsberater im dtv

ist also im Normalfall aus oben angegebenen Gründen unwahrscheinlich. Doch bietet das Ausgangsmaterial (Nektar und Honigtau) vor und während der Bearbeitung im Bienenstock günstige Bedingungen. Insbesondere die klimatischen Bedingungen in den Tropen begünstigen die Hefevermehrung und erschweren, daß der Nektar „ausreichend" im Sinne der Honigverordnung von den Bienen aufkonzentriert werden kann, da die Wassergehalt des Honigs abhängig ist von relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur[18]. In den Tropen ist auch eine verdeckelte Wabe keine Garantie für niedrigen Wasser- und Hefegehalt. Doch gerade tropische Länder liefern die Hauptmenge an Honig, so lag im Jahr 1998 der Anteil Chinas bei 31%, Mexikos bei 15%, Zentral- und Südamerikas bei 12% am Gesamtexport nach Deutschland[19].

Außer vom Klima wird der Wassergehalt des Honigs noch beeinflußt von der Stärke der Tracht, dem Wassergehalt des Nektars, dem Material der Bienenstöcke und der Stärke des Bienenvolkes.

Allerdings können sich im Endprodukt Honig auch Bedingungen ergeben, die lokale Hefevermehrung begünstigen, z. B. wenn die Oberfläche des Honigs infolge der Hygroskopie Feuchtigkeit anzieht oder der Honig beginnt zu kristallisieren, wodurch sich auf der Oberfläche oder in der flüssigen oberen Phase im Vergleich zur festen Phase der a_w-Wert erhöht.

Tab. 1.1 Erste Serie Honigmuster von Juni bis September 1998

Herkunft	Anzahl	mikroskopische Schätzung	Hefegehalt/g Zählkammerverfahren	
			min	max
China	15	stark erhöht	320 000	10 000 000
China	23	erhöht	100 000	2 400 000
China	7	mittel	39 000	280 000
China	1	gering	29 000	–
China	10	–	26 000	1 200 000
China, gärig*	2	–	750 000	3 500 000
Guatemala	4	stark erhöht	120 000	1 200 000
Guatemala, gärig*	2		150 000	790 000
Salvador	1	mittel	180 000	
Uruguay	1	mittel	190 000	
Uruguay, gärig*	1	–	–	240 000
Cuba	2	mittel	12 000	60 000
Mexico Yucatan	9	erhöht	150 000	400 000
Mexico Hochland	9	–	25 000	1 300 000
Argentin	6	gering	5 000	25 000
Argentin, gärig*	4	–	750 000	3 600 000
Australien	1	mittel	37 000	
Frankreich	4	gering	< 1 000	320 000
Frankreich, gärig*	1	erhöht	–	2 000 000
Deutschland	20	–	< 1 000	85 000
Deutschland, gärig*	1	–	–	610 000
Spanien	2	–	75 000	83 000
Ungarn	1	–	5 000	–
Bulgarien	1	–	< 1 000	–
Rumänien	2	–	24 000	1 900 000
Türkei, gärig*	1	–	–	380 000

* gärig lt. Definition der Honigverordnung, d.h. optisch erkennbare Schaumbildung, Sensorik eindeutig

Quantifizierung von Hefen

Zur Ermittlung des natürlichen Gehalts an Hefen in Honig gibt es prinzipiell zwei Methoden. Der mikrobiologische Ansatz als Koloniezählverfahren auf entsprechendem Selektivnährmedium ergibt die Anzahl lebensfähiger Hefen. Die direktmikroskopische Methode in Zählkammern führt zu einem undifferenzierten, aber relativ schnellen Ergebnis für alle Hefezellen, d. h. inclusive stoffwechselinaktiver bzw. toter Zellen.

Um einen Überblick hinsichtlich des mikroskopisch ermittelten Hefegehalts im Importhonig zu erhalten, führte das Institut für Honiganalytik 1998 eine Reihenuntersuchung an Honigmustern (v. a. Rohwaren) unterschiedlicher Herkunft, unter Berücksichtigung der Hauptimportländer, durch. Die erste Serie (Tab. 1.1) diente dem Vergleich Zählung-Schätzung, die zweite Serie (Tab. 1.2) wurde in Zusammenhang mit Stoffwechselprodukten der Hefen erstellt, die jedoch erst im Teil II behandelt werden.

Durchführung

Benötigtes Gerät:

Zentrifuge (*Heraeus* Varifuge), Vibrofix , Lichtmikroskop evtl. mit Phasenkontrasteinreichtung, 40er Objektiv, amtlich geeichte Zählkammer mit Großquadraten der Fläche: 0,0625 mm² und Kleinquadraten der Fläche 0,0025 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm, z. B. *Neubauer*.

Herstellung des Sediments durch zweimalige Zentrifugation von 10g Honig in 20–40 ml Wasser bei 3000 U/min analog zur Erstellung eines mikroskopischen Präparates zur Pollenanalyse.

Befüllen der Zählkammer nach Vorschrift des Herstellers.

Auszählung bei 400facher Vergrößerung (und falls vorhanden unter Phasenkontrast): vier Großquadrate (Volumen 0,00625 mm³) in der Diagonalen. Die Zahl der Hefen sollte <200/gezähltem Großquadrat liegen. Ist die Anzahl der Hefen pro Großquadrat größer als 200 werden 16 Kleinquadrate ausgezählt (Volumen 0,00025 mm³). Ist die Anzahl der Hefen pro Großquadrat <10, sollten 16 Großquadrate ausgezählt werden. Der Durchschnittswert der Zählungen/Großquadrat wird auf 1 g Honig umgerechnet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Zählungen sind in Tab. 1.1 und 1.2 aufgelistet.

* Reste verdeckelter Waben mit Althonig aus sporadischer Nektarsammlung von Beginn der Regenzeit (ca. Mai 98), entnommen Anfang Oktober 98, also mehrere Monate Regenzeit überstanden

**unreifer Honig = Nektar-Honigmischung neuer Ernte, entnommen Ende Oktober 98

*** verdeckelte Waben Neuernte 98/99, entnommen Ende November 98

Tab. 1.2 Zweite Serie Muster (Honig, unreifer Honig, Futterzucker) von September bis Dezember 1998

Herkunft	Hefegehalt/ g Honig Zählkammer-verfahren
China, Original Inlandsabfüllung, Fabrik	10 000 000
China, Originalglas, Inland Supermarkt	2 500 000
China, frisch eingetragener Nektar aus Wabe	5 000 000
	2 000 000
China	7 400 000
China	320 00
China	200 000
China	00 000
China	270 000
China	25 000
China Wabe, verdeckelt	13 000
China Wabe, verdeckelt	3 200 000
China Wabe, verdeckelt	5 700 000
China Wabe, verdeckelt	80 000
Vietnam	120 000
Indien Wabe	25 000
Mexiko, verdeckelte Wabe *Althonig, Inland	46 000
Mexiko, verdeckelte Wabe*Althonig, Inland	16 000
Mexiko, verdeckelte Wabe *Althonig, Küste	190 000
Mexiko, verdeckelte Wabe * Althonig, Küste	290 000
Mexiko, verdeckelte Wabe * Althonig	48 000
Mexiko, verdeckelte Wabe* Althonig	190 000
Mexiko, verdeckelte Wabe*, Brutkästen	2 200 000
Mexiko, verdeckelte Wabe*, Brutkästen	140 000
Futterhonig Mexiko 97	84 000
Futterzuckerpaste Mexiko	140 000
Futterzuckerpaste Mexiko	52 000
Mexiko Yucatan	200 000
Mecico Yucatan	100 000
Mexiko Yucatan, gärig	1 600 000
Mexiko Yucatan, gärig	340 000
Mexiko Yucatan, gärig	130 000
Mexiko Yucatan, gärig	200 000
Mexiko Yucatan, gärig	210 000
Mexiko Yucatan, gärig	170 000
Mexiko Yucatan, gärig	89 000
Mexiko Yucatan, gärig	280 000
Mexiko Yucatan, gärig	450 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	< 10 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	97 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	540 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	1 600 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	210 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	130 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	110 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	31 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	370 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	94 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	32 000
Mexiko, unreifer Honig (**)	260 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	90 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	200 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	460 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	530 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	580 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	230 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	58 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	140 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	78 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	70 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	700 000
Mexiko Neuernte 98, verdeckelte Waben (***)	650 000
Produktionsmuster ohne Filterung (***)	380 000
Produktionsmuster 1. Filterung (***)	470 000

Für einen Teil der Proben aus Tab. 1.1 ist zum Vergleich die mikroskopische Schätzung, die sich aus der Pollenanalyse ergibt und bislang Beurteilungskriterium war, mit aufgeführt. Die Abschätzung ist abhängig von der Erstellung des Präparates, z. B. Größe des Deckglases, mikroskopische Erfahrung bzw. Erkennung der Hefen im Vergleich zu anderen Partikeln im Honigsediment, wie winzigen Stärkekörner aus geplatzten Pollen, aber auch von der Größe der Hefen. Gerade letzere kann sehr variieren, abhängig von der Hefeart, Genetik (Polyploidie), aber auch deren Ernährungsbedingungen. Größere runde Hefezellen (4 – 6 µ x 2 – 4 µ), wie sie z. B. aus Chinahonig bekannt sind, täuschen bei der Schätzung oft einen höheren Gehalt vor als z. B. Hefen aus Mexikohonig, die üblicherweise kleiner bzw. schmaler sind (2 – 6 µ x 2 µ). Versuche zum Anfärben der Hefezellen im Honigsediment mit z. B. Lactophenolblau oder Fluoreszenzfarbstoffen, wie in der Literatur vorgeschlagen[20] zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, erwiesen sich als für die Routine wenig praktikabel, da sich fast alle Partikel im Honigsediment stark färbten.
Dennoch ergab sich bei erfahrenem Personal eine grobe Übereinstimmung des gezählten Gehalts an Hefen mit der bisher durchgeführten Abschätzung wie folgt:

Schätzung	Ergebnis mit Zählkammer-Verfahren
mittel	$> 1 \times 10^3$/g
erhöht	$> 1 \times 10^5$/g
stark erhöht	$> 1 \times 10^6$/g

Es wird aus den Tabellen 1.1 und 1.2 ersichtlich, daß der mikroskopisch ermittelte Hefegehalt bei aktiv gärendem Honig bei $>10^5$/g liegt. Das bestätigt die allgemeine Aussage, daß der Nachweis von Gärung über Gasbildung (also Gärung im Sinne der Honigverordnung) erst ab einer Zellzahl von mehr als 100 000/g Untersuchungsmaterial geführt werden[20].
Aus der Zusammenfassung Tab. 2 kann entnommen werden, daß Rohwaren der Hauptimportländer einen relativ hohen Gehalt an mikroskopisch feststellbaren Hefen aufweisen, was aus oben dargelegten Gründen nicht überrascht.
In den Mustern aus China entsprach der Gehalt an Hefen dem eines gärenden Honigs, wobei aktuell keine Gärung im Sinne der Honigverordnung vorlag.

Tab. 2 Zusammenfassung der Einzelergebnisse aus 1.1

Herkunft	Prozentanteile mit Hefegehalt/g (mikroskopisch, Zählkammerverfahren)				
	<1000	>1000/g	>10000/g	>100000/g	>1000000/g
China	keine	keine	10	59	31
Mexiko	keine	keine	22	72	6
Südamerika, sonstige	keine	9	29	43	19
Europa	6	31	41	6	6

Doch konnten teilweise ebenfalls in Proben aus Mexiko hohe Hefegehalte festgestellt werden.
Ein hoher Hefegehalt ist zwar Voraussetzung für eine Gärung, aber umgekehrt ist ein mikroskopisch festgestellter hoher Hefegehalt allein kein Beweis für eine Gärung.
Die Tab. 1.2 beinhaltet eine Versuchsserie, die in Zusammenarbeit mit einem Produzenten in Mexiko durchgeführt wurde. Es wurden an verschiedenen Standorten, Küstennähe und Inland, im Zeitraum von Anfang Oktober bis Ende November Proben direkt aus den Bienenstöcken entnommen. Bei der ersten Serie (*) handelt es sich Reste verdeckelter Waben mit Althonig aus sporadischer Nektarsammlung vor Beginn der Regenzeit (ca. Mai 98), entnommen Anfang Oktober 98, also nach mehreren Monaten Regenzeit. Bei der zweiten (**) Serie handelt es ich um neu in die Waben eingetragenen Nektar, der noch nicht zu reifem Honig verarbeitet ist. Die dritte (***) Serie umfaßt den neuem, reifen Honig (verdeckelte Waben) der Ernte 98/99. Aus den vergleichenden Einzelergebnissen der regionalen Muster ergaben sich erwartungsgemäß höhere Hefezahlen bei Küstenhonig als bei Inlandhonig. Ebenso zeigen sich hohe Hefegehalte in den Brutkästen, die von den Bienen intensiv bearbeitet werden, d. h. wo Bienen vermehrt anhaftende Hefen einschleppen können.
Für einen Teil der Proben wurde parallel außerdem eine mikrobiologische Untersuchung wie folgt durchgeführt: von demselben Sediment, welches für die Zählung verwendet wurde, wurde jeweils ein Ansatz in entsprechender Verdünnung auf YGC-Agar (Selektivagar für Hefen in Lebensmitteln) und Glucose-Agar (speziell für osmotolerante Hefen in Lebensmitteln) im Oberflächenverfahren angesetzt. Die Ergebnisse lagen um durchschnittlich 2 Zehnerpotenzen niedriger als bei der mikroskopischen Auszählung.
Dies läßt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: Entweder sind nicht alle mikroskopisch gezählten Partikel Hefen, was aus oben geschilderten Gründen nicht auszuschließen ist, oder ein Teil der Hefen ist tot, z. B. weil diese Arten durch die hohe Zuckerkonzentration inaktiviert werden.
Zwischen den beiden verschiedenen mikrobiologischen Ansätzen ergaben sich bezüglich der Quantität und Art der Hefekolonien keine sichtbaren Unterschiede, doch wuchsen die Kolonien auf Glucose-Agar im Vergleich zum YGC-Agar wesentlich langsamer. Eine Auswertung war in der Regel erst nach 5 bis 7 Tagen möglich, während auf normalem YGC-Agar nach max. 3 Tagen wegen starken Wachstums ausgewertet werden mußte. Dieses Resultat bestätigt, daß Osmotoleranz kein Artmerkmal ist, sondern daß die gleichen Hefe-Arten zwar unter hohem osmotischem Druck wachsen können, aber wesentlich langsamer als unter normalen Bedingungen.
Stichprobenartig wurden aus verschiedenen dieser Ansätze die dominanten Hefen identifiziert. So konnten aus sechs Honigmustern (Mexiko, China) acht verschiedene Arten von Hefen bzw. Schimmelpilzen identifiziert werden[21].

Auffällig ist die Tatsache, daß bei 90% aller Ansätze (auch gärigen Honigs!) eine Atmungshefe ganz deutlich dominierte, nämlich *Rhodotorula mucilaginosa* (rubra). Diese Art konnte in allen bislang untersuchten Herkünften nachgewiesen werden sowohl aus Rohwarenmustern als auch direkt aus der Wabe, z. B. Mexiko, China und Indien. Für diese Art wird ein minimaler a_w-Wert von 0,92 für die Vermehrung angegeben[22].

Desweiteren wurden identifiziert:

Cryptococcus albidus (Chinahonig):	Atmungshefe, nicht gärfähig
diverse Candida-Arten (Mexikohonig), z. B. C. magnoliae, globosa, parapsilosis:	gärfähig
Pichia ohmeri (Mexiko):	gärfähig

Die Gattung, die nach Literaturangaben[15] am häufigsten Schaumgärung im Honig verursacht, *Zygosaccharomyces spec.*, wurde in einer der acht Proben gefunden. Desweiteren konnten in den Mexiko-Wabenhonigen regelmäßig *Aureobasidium spec.* nachgewiesen werden.

Standards bzw. Grenzwerte für Hefegehalte

Bislang wurde bei der Analyse von Honig in der Routine keine Quantifizierung der Hefen vorgenommen, sondern lediglich eine mikroskopische Abschätzung im Vergleich zum Pollengehalt. Bei extrem erhöhtem Hefegehalt wurde der Honig als Backhonig abgelehnt. Diese Schätzung ist natürlich subjektiv und von der Erfahrung des Prüfers abhängig. Derzeit wird eine Grenzwert-Empfehlung von max 500 000 Hefen pro 10 g Honig in Deutschland diskutiert. Diese basiert auf einem mikroskopischen Verfahren (nicht dem geschilderten Zählkammerverfahren) und ist nach unserer bisheriger Einschätzung fachlich und sachlich nicht nachvollziehbar.
Gesetzliche Grenzwerte für Hefen in Honig gibt es in Deutschland nicht.
Mikrobiologische Kriterien sind abhängig vom Risiko für den Verbraucher. Daher beziehen sich mikrobiologische Grenzwerte bei Produkten wie Milch, Fleisch, Eier im wesentlichen auf pathogene Keime oder auf Schimmelpilze wegen gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte[20]. Hefen sind jedoch gesundheitlich unbedenklich und spielen als Verderborganismen im Sinne des Produktschutzes eine Rolle.
In der Diätverordnung gibt es z. B. für Säuglings- und Kindernahrung Grenzwerte für den Gesamtkeimgehalt von 10^4 bzw. 5×10^4/g[23].
In der Schweiz wird in der Hygieneverordnung ein Grenzwert für Hefen in genußfertigen Lebensmitteln von 10^7/g angegeben, in genußfertiger Säuglingsnahrung von 10^5/g[24].
Mikrobiolische Kriterien für Süßwaren in der Schweiz geben 10^3 Hefen/g als Toleranzwert an, in Deutschland gibt es für Zucker (Südzucker AG) einen Standard von max. 10 Hefen/g[20].

Im europäischen Arzneibuch wird nach verschiedenen Kategorien unterschieden, bei Zubereitungen zur oralen Anwendung mit Rohmaterialien natürlicher Herkunft ist ein Höchstwert von 500 Pilze/g angegeben, für die Kategorie „Andere pflanzliche Arzneimittel" gibt es einen Höchstwert von 50 000 Pilzen/g[25].

Diese Grenzwertangaben beruhen auf standardisierten mikrobiologischen Methoden.

Literatur

1) *Kreger-van Rij, N. J. W.*: In: The Yeasts, *A. H. Rose* und *J. S. Harrison* (eds). Academic Press, London (1989).
2) *Müller/Weber*: Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen, Behrs Verlag (1996).
3) *Schlegel, H. G.*: Allgemeine Mikrobiologie, Thieme (1992).
4) *Batra, L. R., S. W. T. Batra* und *G. E. Bohart*: Mycopathologia et Mycologia Applicata, **49**, 13 (1973).
5) *Gilliam, M., L. J. Wickerham, H. L. Morton* und *R. D. Martin*: Journal of Invertebrate Pathology, **24**, 349 (1974).
6) *Grilione, P., F. Frederici* und *M. W. Miller*: In "Current Developments in Yeast Research" (*G. G. Stewart* and *I. Russell* (eds)), pp. 599-605, Pergamon Press, Toronto (1981).
7) *Zander*: Beiträge zur Herkunftsbestimmung von Honig, I Berlin (1935).
8) *Rußmann, H.*: Lebensmittelchemie 52, 116-117 (1998).
9) *Zipfel*: Lebensmittelrecht, EL 53, Vorb. **C 350**, 1-11 (1983).
10) *Gilliam, M.*: Apidologie **10**, 43-53 (1979).
11) *Sandhu, D. K.* und *M. K. Waraich*: Microbial Ecology **11**, 51-58 (1985).
12) *G. Beckh* und *C. Lüllmann*: Jahresbericht des Instituts für Honiganalytik: unveröffentlichte Untersuchungen des IHA (1998).
13) *Dittrich, H.*: Mikrobiologie der Lebensmittel: Getränke, Behrs Verlag (1993).
14) *Walker, Gr. M.*: Yeast Physiology and Biotechnology, Wiley (1999).
15) *Müller/Holzapfel/Weber*: Mikrobiologie der Lebensmittel, Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, Behrs Verlag (1997).
16) *Lochhead*: Zentbl. Bakt. Parasit Kde II, (1933).
17) *Alcala* et al.: Aliment. Equip. Tecnol. 99-100 (1990).
18) *Horn*: Bienenpflege **11**, 325 (1991).
19) Waren-Verein der Hamburger Börse e.V., Jahresbericht 1998, S. 234 (1999).
20) *Baumgart J.*: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (1996).
21) Labor L+S AG, Prüfberichte vom November 1998.
22) *Frank*: Lexikon Lebensmittelmikrobiologie S. 226-227 (1990).
23) Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) BGBL I, S. 1713, in der Fassung vom 5.5.1999, BGBL I, S. 329.
24) Hygieneverordnung Schweiz in der Fassung vom 26. Juni 1995, Anhang 1, (Art. 3 Abs. 1).
25) Europäisches Arzneibuch, S. 384, 3. Ausgabe 1997.

Wasserbestimmung Nach Karl Fischer

GIFTFREIE KF-REAGENZIEN

– jetzt auch **ohne Methanol**
– selbstverständlich pyridinfrei
– natürlich ohne halog. Kohlenwasserstoffe

Unmöglich?
Nicht bei unseren neuen **HYDRANAL®-E-KF-Reagenzien.** (gem. EG-Richtlinien 92/32/EEC **nicht** als **giftig** einzustufen) Sowohl für Volumetrie als auch Coulometrie. Für Ihre Qualitätskontrolle; zur leichteren Handhabung und Lagerung im Labor.

Anrufen!
Kostenlose Problemlösung/Beratung für Ihre Proben.
KF-Workshops (auf Anfrage) – bei uns oder bei Ihnen.
KF-Seminar (24./25. Nov. '99) – sichere Anmeldung jetzt!
HYDRANAL®-Praktikum (KF-Arbeitsbuch 120 Seiten/DM 20,-) beim Entwickler u. Hersteller **(ISO 9001/ÖKO 14001 zertifiziert).**

Nutzen Sie unsere Erfahrung und Wissen!

Riedel-de Haën®
RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG
Postfach 10 02 62 · D-30918 Seelze
Tel. ++49 (0)5137/82 38-353
Fax ++49 (0)5137/82 38-698
http://www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH
SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Grünwalder Weg 30
D-82041 Deisenhofen
Tel. ++49 (0)89/65 13-0
Fax ++49 (0)89/65 13-11 61

FREECALL: 0800/51 55 000

The Sigma-Aldrich Family:
SIGMA ALDRICH Fluka Riedel-de Haën SUPELCO

Riedel-de Haën®: trademark under licence from Riedel-de Haën GmbH