

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie der Universität Stuttgart

Zum Phenylalaningehalt von Honigen

Von K.-G. BERGNER und H.J. HAHN

Mit 3 Tabellen

(Eingegangen am 7. April 1971)

In verschiedenen Anweisungen zur Phenylketonurie-Diät wird als Gesamt-Phenylalaningehalt von Honig 15–60 mg/100 g genannt (MONCRIEFF et al. (1), HELLBRÜGGE u. PECHSTEIN (2), BICKEL u. BREMER (3). Diese Werte wurden, soweit dies angegeben ist, nicht direkt bestimmt, sondern aus dem Eiweißgehalt durch Multiplikation mit 0,05 errechnet, „da die meisten tierischen und pflanzlichen Proteine zwischen 4 und 6 % Phenylalanin enthalten“ (MONCRIEFF et al. (1)).

Bei Untersuchungen über den Gehalt und die Herkunft der freien Aminosäuren in Honig (4, 5, 6) zeigte es sich, daß die einzelnen Aminosäuren in recht unterschiedlichen Mengen in den untersuchten Proben enthalten waren. In der Regel lag dabei der Gehalt an Prolin am höchsten, der an Phenylalanin im Mittel in Blütenhonig bei 370 n Mol/g und in Honigtauhonig bei 220 n Mol/g (Tab. 1).

Tab. 1.

Proben	Prolin n Mol/g		Phenylalanin n Mol/g	
	Grenzwerte	Mittelwert	Grenzwerte	Mittelwert
Blütenhonige*)	23	1400–7800	3700	22– 1700
Honigtauhonige	15	2800–5700	3900	44– 780
„Zuckerfütterungshonig“ ²	2	2600, 5800	—	27, 74
Honigblaseninhalt	2	1500, 2300	—	19, 34
Salbeihonige (jugoslawisch	3	2400–3400	2800	10000–14000
				12300

*) ohne Salbeihonige.

Diese Werte stammen von 15 Honigtauhonigen (Tanne, Fichte) verschiedener Herkunft (Deutschland, Jugoslawien, Österreich) und, soweit feststellbar, von verschiedenen Honigtaulieferanten, sowie von 23 Blütenhonigen verschiedener Tracht-pflanzen (Blüten-, Blatt-Honig, wilder Buchweizen, Citrus, Edelkastanie, Gallberry, Gamander, Heide, Linde, Mesquite, Raps, Robinie, Saw Palmetto, Weißklee) und verschiedener Herkunft (Californien, Deutschland, Florida, Frankreich, Georgia, Jugoslawien, Mittelamerika, Spanien, Tunis, Ungarn).

Tab. 2. n Mol/g

Sorte	Salbei 1 Jugoslawien	Salbei 2 Jugoslawien	Salbei 3 Jugoslawien	Black Sage Californien	Honigtau Ø (ohne Salbei)	Blütenhonig Ø (ohne Salbei)	Wiesensalbeinektar, berechnet auf 80% Zuckergehalt
Ala	89	62	53	49	140	120	1200
Arg	26	42	29	13	25	34	0
(CyS) ₂	0	0	30	0	—	—	0
Gln + Asn	96	220	160	75	530	195	500
His	19	20	24	30	23	32	0
Hyp	—	30	53	80	—	—	—
Ile	72	48	70	19	65	45	260
Leu	24	22	31	13	33	47	220
Lys	72	85	84	96	130	130	310
Met	0	0	10	2	—	—	0
Orn	—	—	—	—	97	18	—
Phe	14000	10000	13000	990	220	370	22000
Pro	2400	3400	2800	2400	3900	3700	0
Ser	49	43	46	32	370	87	1300
Thr	24	24	22	14	33	48	410
Trp	3	5	5	5	—	—	0
Tyr	ca. 30	—	—	200	68	94	280
Val	70	78	98	33	46	80	500
Summe der freien Aminosäure	17000	14100	16500	4100	5700	6500	0
β-Ala							0
γ-Aminobutters.							0
Asp							560
Glu							0
Gly							1600

Aus Versuchen mit „Zuckerfütterungshonig“ – „Honig“, der von den Bienen aus reiner Saccharoselösung bereitet wurde – und mit dem versuchsweise gewonnenen Honigblaseninhalt von Sammelbienen, die mit Saccharoselösung gefüttert worden waren, ging hervor, daß der größte Teil des Prolins und ein kleinerer Teil des Phenylalans aus dem Pharynxdrüsensekret der Biene stammt, das dem einzutragenden zuckerhaltigen Saft (Honigtau, Nektar) bereits während der Sammeltätigkeit zugegeben wird (6).

Dagegen fielen unter den „Sortenhonigen“ – das sind nach der Honigverordnung vom 21. 3. 1930 solche, die vorwiegend aus den Nektariensäften einer Blütenart stammen – jugoslawische Salbeihonige durch ihren hohen Phenylalaningehalt auf (Tab. 1). Zur näheren Orientierung sind in Tab. 2 die Gehalte dieser Honige auch an den einzelnen Aminosäuren zusammengestellt und mit den Mittelwerten der untersuchten 15 Honigtauhonige und 23 sonstigen Blütenhonige verglichen.

Durch die Untersuchung von Salbei-Nektar konnte bestätigt werden, daß für den sehr hohen Phenylalanin-Gehalt der jugoslawischen Salbeihonige die Tracht verantwortlich ist.

Eine Bestimmung der Salbei-Art, die als Trachtpflanze der jugoslawischen Salbeihonige anzusehen ist, war durch Pollenanalyse nicht möglich. Die Gattung *Salvia* ist im Mittelmeerraum mit vielen Arten verbreitet (HEGI, (7) zählt 10 Arten). Damit es zur Bildung von Sortenhonigen kommt, muß die Trachtpflanze jedoch größere Bestände bilden. In seinen „Vegetationsbildern“ erwähnt ADAMOWIC (8) nur vom Gartensalbei (*Salvia officinalis*), „massenhaftes Auftreten auf submontanen Felsstriften“ (bei Dubrovnik).

Der Aminosäuregehalt des von *Wiesensalbei* (*S. pratensis*) gewonnenen Nektars ist ebenfalls in Tab. 2 angegeben, berechnet auf einen Zuckergehalt von 80 %. Der Phenylalaningehalt (22000 nMol/g) ist mit dem der jugoslawischen Salbeihonige (10000–14000 nMol/g) vergleichbar, da diese sicherlich nicht ausschließlich aus Salbeitracht stammen. Die übrigen Aminosäuren – besonders Alanin, Serin und Threonin – sind jedoch im untersuchten Nektar in sehr viel größerer Menge enthalten als in den Salbeihonigen. Leider konnte der Aminosäurengehalt eines aus diesem Nektar bereiteten Honigs nicht ermittelt werden, da von Wiesensalbei keine Sortenhonige bekannt sind.

Im Honigblaseninhalt von Bienen, die Gartensalbei (*Salvia officinalis*) bzw. einen Ziersalbei (*Salvia x superba* Ostfriesland) beslogen, konnten dünnenschichtchromatographisch ebenfalls große Mengen Phenylalanin neben – vorwiegend von der Biene stammendem – Prolin nachgewiesen werden. Es ist deshalb anzunehmen, daß ein hoher Phenylalanin-Gehalt im Nektar von Salbeiarten verbreitet vorkommt.

Auch der californische Salbeihonig hat – verglichen mit den übrigen Honigen – einen hohen Phenylalanin-Gehalt (990 nMol/g). Nach Angaben des Imkers stammt dieser Honig von Black Sage (*Salvia mellifera*); ob es sich jedoch um einen Sortenhonig handelt, konnte aus dem Ergebnis der Pollenuntersuchung nicht bestätigt werden, da der Honig insgesamt sehr pollennarm war.

Die Auftrennung und Bestimmung der freien Aminosäuren in den Honigen erfolgte mittels der automatisierten Ionenaustausch-Chromatographie nach SPACKMAN, STEIN und MOORE, wofür ein besonderes Aufbereitungsverfahren zur Abtrennung der freien Aminosäuren von Kohlenhydraten, Peptiden und Proteinen des Honigs ausgearbeitet wurde (4, 5).

Die Bestimmung der Aminosäuren im Nektar von Wiesensalbei, ebenso wie im Honigblaseninhalt, von denen nur geringe Mengen zur Verfügung standen, erfolgte nach vereinfachter Aufarbeitung über den Kationenaustauscher Amberlite I R 120,

0,45–0,6 mm, wie unten bei der Gesamt-Aminosäuren-Bestimmung in Honig angegeben (vgl. 4, 5).

Gesamt-Aminosäurengehalt

Da der Gesamtgehalt an Phenylalanin für die Beurteilung eines Lebensmittels im Hinblick auf eine Phenylketonurie-Diät entscheidend ist, war es von Interesse, auch den Gesamt-Aminosäurengehalt, also die Summe von freien und gebundenen Aminosäuren eines Salbeihonigs zu ermitteln. Die Bestimmung erfolgte nach der im Anschluß gegebenen Arbeitsvorschrift. Die Ergebnisse sind aus Tab. 3 zusammen mit dem Gehalt an freien Aminosäuren zu ersehen. Zum Vergleich wurde ein Rapshonig ebenso untersucht.

Tab. 3. Freie und gesamte Aminosäuren in Salbeihonig und Rapshonig.

	jugoslawischer Salbeihonig 1 freie Aminosäuren n Mol/g	Gesamt- Aminosäuren n Mol/g	Rapshonig 1 freie Aminosäuren n Mol/g	Gesamt- Aminosäuren n Mol/g
Ala	89	890	53	490
β-Ala	—	0	—	45
γ-Aminobuttersäure	—	34	—	22
Arg	26	250	18	170
Asp	—	1400	—	960
(CyS) ₂	0	110 ¹⁾	0	50 ¹⁾
Gln + Asn	96	—	72	—
Glu	—	1200	—	800
Gly	—	1600	—	690
His	19	460	12	600
Ile	72	640	19	430
Leu	24	910	18	570
Lys	72	740	120	470
Met	0	120	1	150
Orn	—	320	6	88
Phe	14000	12000	22	300
Pro	2400	2600	2300	2300
Ser	49	930	49	460
Thr	24	530	18	380
Trp	3	0	0	0
Tyr	30	—	11	190
Val	70	850	30	500

¹⁾ Im Hydrolysat als Cysteinsäure vorliegend.

Das Verhältnis von freien zu gesamten Aminosäuren ist meist, übereinstimmend mit MICHELOTTI u. MARGHERI (9), etwa 1:10. Prolin ist in beiden Honigen, Phenylalanin im Salbeihonig ganz überwiegend in freier Form enthalten.

Der Gesamtgehalt des Rapshonigs liegt mit 300 nMol/g, entsprechend 4,7 mg/100 g, weit unter den eingangs für Honig genannten Literaturwerten von 15–60 mg/100 g. Auch die in Tab. 1 aufgeführten Grenz- und Mittelwerte für freies Phenylalanin in Honigtau- und Blütenhonigen (0,3–27 mg/100 g, im Mittel 3,4 bzw. 5,8 mg/100 g) liegen völlig in den genannten Grenzen.

Dagegen ist der Gesamtgehalt des Salbeihonigs mit 14000 nMol/g, entsprechend 230 mg Phenylalanin je 100 g, so erheblich höher, daß er innerhalb einer Phenylketonurie-Diät – nach BICKEL und BREMER (3) soll die Phenylalaninzufuhr 130–360 mg/Tag nicht übersteigen – zweckmäßigerweise nicht verwendet werden sollte.

Methodik

Gesamt-Aminosäuren-Bestimmung in Honig

Prinzip

Freie Aminosäuren, Peptide und ein Teil der Proteine werden aus saurer Lösung an einen feinkörnigen Kationenaustauscher adsorbiert. Nach Auswaschen der Zucker wird mit Triäthylamin-Lösung eluiert. Um auch die von der Austauschersäule nicht zurückgehaltenen Proteine zu erfassen, wird der Durchlauf dialysiert. Die hochmolekulare Phase und der Trockenrückstand des Eluats werden vereinigt. Nach Säurehydrolyse werden die Aminosäuren nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (10) bestimmt.

Chemikalien und Geräte

Chemikalien:

- (1) Amberlite Ionenaustausch-Harz CG – 120II (= 40–80 µm), Natrium-Form.
- (2) Salzsäure, rauchend, mind. 37% z. A.
- (3) Salzsäure 3 n
- (4) Salzsäure 1 n
- (5) Triäthylamin-Lösung 1 n
14 ml Triäthylamin und 20 ml Aceton werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt
(im Kühlschrank 2 Wochen haltbar).
- (6) Thioglycolsäure-Lösung 0,1 m
- (7) Fehlings Reagenz A und B

Geräte:

- (A) „Cellophan“-Dialysierschlauch, *Kalle*:
Ø 18 mm (Porenweite 2–8 nm; Durchlässigkeitsgrenze etwa bei
Molekulargewicht 5000)
- (B) Rotationsverdampfer, Wasserbad, Wasserstrahlpumpe
- (C) Magnetrührer
- (D) Chromatographie-Säule: Länge 150 mm, Ø 12 mm (Volumen ca. 17 ml). Unterer Säulenabschluß: zur Spitze ausgezogen, mit PVC-Schlauchstück und Quetschhahn. Oberer Säulenabschluß: NS 10/19. Dazu Tropftrichter, 100 ml, mit NS 10/19.
- (E) pH-Meßgerät

Aufarbeitung des Honigs

Vorbehandlung und Regeneration des Kationenaustauscherharzes: In die Chromatographiesäule (D) werden 15 ml Amberlite CG-120II, Natrium-Form (1), eingeschlämmt. Mit 50 ml Salzsäure 3 n (3) wird das Harz in die Hydrogen-Form übergeführt, anschließend mit etwa 50 ml Wasser neutral gewaschen.

Nach der Elution wird das Harz mit 50 ml Salzsäure 3 n regeneriert.

Kationenaustauscherbehandlung des Honigs

2 g Honig werden in 10 ml Wasser gelöst. Mit Salzsäure 1 n (4) wird der pH-Wert der Lösung auf 2,5 eingestellt (Glaselektrode). Die Lösung wird auf die mit der Hydrogen-Form

des Kationenaustauschers gefüllte Säule aufgetragen (Tropfgeschwindigkeit 10-12 Tropfen/min). Anschließend wird der Tropftrichter mit wenig Wasser ausgespült und die Säule mit insgesamt etwa 30 ml Wasser zuckerfrei gewaschen (die Prüfung auf Zucker erfolgt mit den letzten 2 ml des durchgelaufenen Waschwassers nach *Fehling*). Durchlauf und Waschwasser werden vereinigt und dialysiert.

Die Elution der am Harz absorbierten Aminosäuren, Peptide und Proteine erfolgt absteigend mit 100 ml Triäthylamin-Lösung 1 n (5). (Dazu muß das Schlauchstück am Säulenausgang entfernt werden, da PVC in Triäthylamin quillt.) Die Tropfgeschwindigkeit wird mit dem Hahn am Tropftrichter auf 10 bis 12 Tropfen/min eingestellt. Um die Bildung von Gasblasen in der Säule zu vermeiden (Reaktionswärme bei der Bildung der Salzform des Kationenaustauschers), ist es zweckmäßig, die Triäthylamin-Lösung vor der Elution mit Eis zu kühlen. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, einmal mit 5 ml Wasser aufgenommen und wieder zur Trockene gebracht.

Dialyse

Ein etwa 40 cm langes Stück Dialysier-Schlauch (A) wird 10 min lang in Wasser eingelegt. Der gequollene Schlauch wird an einem Ende in sich selbst doppelt verknotet. Durchlauf und Waschwasser der Kationenaustauschersäule werden eingefüllt und das andere Ende durch 1 cm breites Umlegen, Fälteln und Abbinden mit einem Perlonsfaden verschlossen. In einem genügend großen, mit Wasser gefüllten Becherglas schwimmend, wird der Schlauch am Faden locker aufgehängt. Die äußere Phase wird gerührt (Magnetrührer) und nach jeweils 1/2 h erneuert. Sind darin keine Zucker mehr nachweisbar (*Fehlingsche Probe*), wird noch einmal 1/2 h lang dialysiert. Während der ganzen Dialyse wird das Becherglas mit Eiswasser gekühlt.

Die innere Phase wird am Rotationsverdampfer (Heizbadtemperatur 35 °C) bis auf etwa 2 ml eingeengt.

Hydrolyse

Der Trockenrückstand des Kationenaustauschers-Eluats wird mit der inneren Phase der Dialyse aufgenommen. Die Lösung wird – unter Nachwaschen mit wenig Wasser – quantitativ in eine mit rauchender Salzsäure (2) gereinigte, getrocknete und gewogene Ampulle übergeführt. Nach Zugabe von 0,1 ml Thioglycolsäure-Lösung 0,1 m (6) wird das Gesamtvolumen durch Auswiegen der Ampulle näherungsweise bestimmt. Das gleiche Volumen rauchende Salzsäure wird zugegeben und die Ampulle in einer Eis/Kochsalz-Kältemischung gekühlt. Nach Verdrängen der überstehenden Luft durch Einleiten von Stickstoff wird die Ampulle evakuiert und unter Vakuum abgeschmolzen. Bei 110 °C wird 24 h lang hydrolysiert.

Nach der Hydrolyse wird der Ampulleninhalt in einen Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Die Säuredämpfe im Kolben werden durch Einleiten von Stickstoff ausgetrieben. Der Rückstand wird dreimal mit je 5 ml Wasser gelöst, jeweils zur Trockene gebracht und der Kolben mit Stickstoff ausgeblasen.

Bestimmung der Aminosäuren

Das Hydrolysat wird entsprechend der früher gegebenen Vorschrift für die freien Aminosäuren (4, 5) in 10,00 ml Puffer pH 2,2 gelöst. Dann wird, nach der dünnenschichtchromatographischen Ermittlung eines geeigneten Auftragvolumens, die Bestimmung nach den angegebenen Analysenprogrammen durchgeführt.

Gewinnung von Salbei-Nektar

Die Blütenkrone von Wiesensalbei (*Salvia pratensis*) wurde vorsichtig aus dem Kelch gezupft. Durch Auseinanderziehen von Ober- und Unterlippe wurde die Kronröhre geöffnet und das auf der Basis der Unterlippe liegende Nektartröpfchen mit einer Polyäthylen-Mikropipette aufgesaugt.

Zur Gewinnung der Nektarproben von Gartensalbei (*Salvia officinalis*) und Ziersalbei (*Salvia x superba* Ostfriesland) wurden Bienen beim Verlassen der Kronröhre am Hinterleib gefaßt und durch leichten Druck zur Abgabe des Honigblaseninhalts veranlaßt.

Zusammenfassung

1. Die Gehalte an Phenylalanin von 15 Honigtauhonigen und 23 Blütenhonigen werden mitgeteilt (Grenzwerte und Mittelwerte). Sie liegen völlig im Rahmen der Werte, die in der Literatur zur Berechnung einer Phenylketonurie-Diät angegeben werden.
2. Salbeihonige wiesen dagegen so erheblich höhe Phenylalaninmengen auf, daß sie in der Diät besonders berücksichtigt werden müssen. Diese Aminosäure liegt in den Salbeihonigen überwiegend in freier Form und nur zum geringen Teil gebunden vor. Im Nektar von Wiesensalbei konnten ähnliche Phenylalaningehalte festgestellt werden, so daß der auffällige Befund an den Honigen durch die Tracht bedingt ist. Wie die Untersuchung von reinem Zuckerfütterungshonig und Honigblaseninhalt der Biene zeigten, wird wohl z. B. Prolin von der Biene in großen Mengen dem Honig beigefügt, nicht aber Phenylalanin.
3. Eine Methode zur Ermittlung des diätetisch wichtigen Aminosäuren-Gesamtgehalts von Honig – durch gemeinsame Bestimmung von freien und gebundenen Aminosäuren – wird angegeben.

Summary

- 1) The phenylalanine contents of 15 honey dew honeys and 23 flower honeys are reported (limits and means) all of which are within the limits given in literature for calculating a phenylketonuria diet.
- 2) Some sage-type honeys, however, showed amounts of phenylalanine which are so high that special consideration of this fact is necessary when using them for diet. Sage-type honeys contain this aminoacid mainly as free and only to a minor extent as bound acid.
In the nectar of meadow-sage similar amounts of phenylalanine were observed so that the remarkable results, obtained with honeys, are due to the honey flow. The bee itself adds only small amounts of phenylalanine to the honey, as was shown by the examination of the honey sac and a pure sugar feeding honey.
- 3) A method is described for the determination of total amino acid content in honey by simultaneous determination of free and bound amino acids.

Résumé

- 1) On communique les teneurs en phénylalanine de 15 miels de miellat et de 23 miels de fleurs (valeurs limites et moyennes). Ces valeurs se situent pleinement dans le cadre de celles contenues dans la bibliographie indiqué pour le calcul d'un régime pour une phénylcétourie.
- 2) Les miels de sauge, par contre, présentèrent une teneur considérablement plus élevée en phénylalanine, dont on doit spécialement tenir compte dans l'établissement d'un régime. Dans les miels de sauge, cet acide aminé se trouve essentiellement sous sa forme libre et n'y existe qu'en faibles proportions à l'état combiné. On a pu constater dans le nectar de sauge des prés des teneurs analogues en phénylalanine, de sorte que ce résultat remarquable est bien dû à la miellée. Comme l'ont démontré les recherches basées sur des nourrissements au moyen de sucre pur ainsi que sur le contenu du jabot de l'abeille, la phénylalanine n'est due que pour une faible proportions à un apport par l'abeille.
- 3) On indique une méthode de détermination de la teneur totale en acides animés, diététiquement importants, par un dosage global des acides aminés libres et combinés.

Literatur

1. MONCRIEFF, A. A. et al., Brit. med. J. 1961 (1963). — 2. HELLBRÜGGE, T. und J. PECHSTEIN, Fortschr. Med. **84**, 369 (1966). — 3. BICKEL, H. und H. H. BREMER, Dtsch. med. Wschr. **92**, 700 (1967). — 4. HAHN, H., Zum Gehalt und zur Herkunft der freien Aminosäuren in Honig. Diss. Univ. (Stuttgart 1970). — 5. BERGNER, K. G. und HJ. HAHN, Dtsch. Lebens-

mittel-Rdsch. **67** (im Druck). — 6. BERGNER, K. G. und HJ. HAHN, Apidologia (im Druck 1971). — 7. HEGI, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. V, 4. Teil (München 1927). — 8. ADAMOWIĆ, L., Vegetationsbilder aus Dalmatien 1909; – aus Bosnien und der Herzegowina 1910 (Jena 1909/10). — 9. MICHELOTTI, P. und G. MARGHERI, Sci. Alimentazione **15**, 179 (1969). — 10. SPACKMAN, D. H., H. W. STEIN und S. MOORE, Analytic. Chem. **30**, 1190 (1958).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. K.-G. BERGNER und Dr. HJ. HAHN
Institut für Lebensmittelchemie
7000 Stuttgart 1, Keplerstraße 17