

Auslese, Premium oder „nur“ Honig?

Bestimmung der Saccharaseaktivität zur Einschätzung der Honigqualität

B. Weyers^{1,3}, I. Heil^{1,2}, J. Bohrmann¹

RWTH Aachen, ¹Institut für Biologie II, Zoologie und Humanbiologie, ²Didaktik der Biologie und Chemie, ³Labor Dr. Weyers, Aachen

Honig ist ein lebensmittelrechtlich stark reglementiertes Nahrungsmittel. Da das im Honig enthaltene Enzym Saccharase sehr temperaturempfindlich ist, kann seine Aktivität als Parameter zur Beurteilung seiner Frische und einer sachgemäßen Wärmebehandlung beim Abfüllen herangezogen werden. Je höher die Saccharaseaktivität eines Honigs ist, desto höher ist seine Qualität. Sie ist ein wichtiges Kriterium dafür, ob ein Honig die Bezeichnung „Auslese“ oder „Premium“ erhalten darf. In diesem Beitrag wird die quantitative Bestimmung der Saccharaseaktivität als Schulexperiment vorgestellt. Schwerpunkt des Unterrichtsmodells ist die Erarbeitung der Methodik, um diese je nach Auswahl der zu testenden Honige zur Klärung unterschiedlicher Fragestellungen nutzen zu können. Das Material eignet sich auch für asynchrones Arbeiten, z.B. im Distanzunterricht und bei Verzicht auf die praktische Durchführung der Untersuchung.

Stichwörter: Enzymaktivität, Saccharase, Siegenthalerzahl, Invertase, α -Glucosidase, Honig, Lebensmittelkontrolle, Photometer, Messen, Auswerten, asynchroner Unterricht, Distanzunterricht

1 Einleitung

Honig ist ein empfindliches Lebensmittel und unterliegt daher strengen lebensmittelrechtlichen Vorschriften. Zahlreiche Inhaltsstoffe müssen Mindestanforderungen des Gesetzgebers erfüllen [1]. Soll Honig unter dem Warenzeichen des Deutschen Imkerbundes (DIB) angeboten werden, müssen sogar noch strengere Auflagen eingehalten werden [2,3]. Die wichtigsten Anforderungen betreffen die Reife, die über den Wassergehalt bestimmt wird [4], und die Herkunfts- und Sortenkennzeichnung, die mittels Pollenanalyse geprüft wird [5], sowie die schonende Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung des Honigs, worüber zahlreiche Inhaltsstoffe und Eigenschaften wie die Saccharaseaktivität Auskunft geben.

Um Wärme- und Lagerschäden zu vermeiden und die Naturbelassenheit bzw. die Qualität des Honigs zu erhalten, muss dieser bei der Lagerung vor schädlichen Einflüssen geschützt werden.

Licht und Wärme zerstören Enzyme (z.B. Saccharase, Diastase) und fördern die Entstehung von Hydroxymethylfurfural (HMF), und Feuchtigkeit erhöht den Wassergehalt (hygroskopisch). Zu hohe Luftfeuchtigkeit und zu hohe Lagertemperaturen begünstigen einen Übergang des Honigs in Gärung. In undichten Gefäßen nimmt Honig außerdem leicht Fremdgerüche an.



Abb. 1 Auslese- und Premiumhonig. Für die Qualitätsstufen „Auslese“ und „Premium“ muss ein Honig bestimmte Eigenschaften erfüllen: Der Gesetzgeber hat jeweils Mindestwerte für die Saccharaseaktivität festgelegt. Daneben gelten Maximalwerte für den HMF- und Wassergehalt. Foto: B. Weyers.

Honig sollte daher luftdicht verschlossen, dunkel, trocken und kühl gelagert werden. Optimal sind eine Luftfeuchte von maximal 60 %, eine Temperatur zwischen 10 und 16°C (mit möglichst geringen Temperaturschwankungen) sowie – vor allem wenn vorgenannte Bedingungen gerade zu Hause kaum möglich sind – ein dichter Verschluss. Zur Wiederverflüssigung zwecks Abfüllen wird Honig kurz (12-24 Stunden) und nicht über 40°C im Wärmeschrank erwärmt. Die Mikrowelle ist ungeeignet, da unkontrolliert sehr hohe Temperaturen entstehen.

Der Wassergehalt von Honig darf im Allgemeinen nicht mehr als 20 % betragen [1] und wird über die Dichte oder die Lichtbrechung bestimmt [4]. Um Wärmeschädigungen nachzuweisen, sind neben der Bestimmung von Hydroxymethylfurfural (HMF) [6], dessen Gehalt bei zunehmender Temperatur und Lagerzeit ansteigt, temperaturempfindliche Enzyme geeignet. Der Gesetzgeber

verlangt diesbezüglich eine Mindestaktivität der Diastase (= Amylase), welche als Diastasezahl nach Schade zu bestimmen ist [vgl. 7,8]. Der DIB verlangt darüber hinaus die Aktivitätsbestimmung der temperaturempfindlichen Saccharase (= Invertase, α -Glucosidase), die aus dem Bienenspeichel stammt und die Spaltung von Saccharose des Nektars in Fruktose und Glucose katalysiert [3,9].

Gegen Erhitzen ist die Saccharase wesentlich empfindlicher als die Diastase. So beträgt die Halbwertszeit der Saccharase bei 40°C ca. zehn Tage. Der DIB gibt einen 50 %-igen Aktivitätsverlust der Saccharase bei 50°C in 1,3 Tagen an [10]. Eine Erhitzung auf 60°C führt schon nach wenigen Stunden zum vollständigen Aktivitätsverlust [11]. Ein besonders schonend behandelter Honig wird daher auch eine relativ hohe Saccharaseaktivität aufweisen, die als Saccharasezahl angegeben wird. Allerdings wird die Ausgangsaktivität von der Verarbeitungsintensität durch die Bienen und von der Honigsorte mitbestimmt. So besitzen beispielsweise Robinienhonige im Allgemeinen niedrige, Honigtauhonige dagegen hohe Aktivitäten [2,3].

Je höher die Saccharaseaktivität eines Honigs ist und je geringer sein HMF- und Wassergehalt, desto höher ist seine Qualität (Abb. 1 und Abschnitt 2). Von diesen Parametern hängt es ab, ob ein Honig die Bezeichnung „Auslese“ oder „Premium“ tragen oder nur als „normaler“ Honig verkauft werden darf.

In diesem Beitrag wird vorgestellt, wie Schülerinnen und Schüler die Aktivität dieses Enzyms auf Grundlage der von Siegenthaler [12] entwickelten Methodik (Abschnitt 2) an exemplarisch ausgewählten Honigen bestimmen können. Das Arbeitsmaterial (Abschnitt 3) ist so angelegt, dass es vor der Untersuchung selbst gewählter Honige die Klärung von Methodik, geeigneten Fragestellungen und entsprechenden Hypothesen ermöglicht und auch bei Verzicht auf die praktische Durchführung eingesetzt werden kann.

2 Methode

Die Methodik der Enzymaktivitätsbestimmung von Saccharase nach Siegenthaler [12] ist als Teil 1 in die DIN 10759 sowie in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 38 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) [13], nach dem die Lebensmitteluntersuchungsämter arbeiten, aufgenommen worden. Die Methode beruht darauf, dass die Saccharase einer Honigprobe nicht nur die Saccharosespaltung katalysiert, sondern auch mit dem Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid zu einem Farbstoff reagiert. Diese Reaktion kann mit einer Stopplösung gestoppt und die Extinktion bei 400 nm in einem Photometer gemessen werden.

Um möglichst wenig von dem relativ teuren Substrat einzusetzen, reicht vom Volumen her ein Ansatz, der im Vergleich zur Originalversuchsvorschrift (DIN 10759) um die Hälfte verringert ist (s. Abschnitt 2.1.2).

Ein Videoclip zur Vorgehensweise steht hier zur Verfügung: <https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/ca/ff/sleuo/>. Er kann im Unterricht zur Erarbeitung der Methodik in Verbindung mit dem Arbeitsmaterial genutzt werden (s. Abschnitt 3.2.2).

2.1 Arbeitsanleitung

2.1.1 Material

Die benötigten Geräte und Hilfsmittel sind in Kasten 1 aufgeführt. Als Chemikalien sind drei verschiedene Lösungen von der Lehrkraft anzusetzen (Kasten 2). Außerdem werden Honigprobenlösungen hergestellt (Abschnitt 2.1.2). Vorschläge zur Auswahl zu beprobender Honige finden sich in Abschnitt 3.2.3.

Wasserbad mit Thermostat (40 °C) und Reagenzglasalterungen
Spektralphotometer (Messung bei 400 nm) mit Messküvetten (Schichtdicke 10 mm)
Feinwaage (d = 0,01 g)
Stoppuhr
Pipetten (0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL)
Messkolben (25 mL; 60 mL; 100 mL)
Reagenzgläser aus Glas (alternativ: skalierte Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff)
Flaschen zur Aufbewahrung und Lagerung angesetzter Proben und Lösungen (25-500 mL)
Spatel oder kleiner Löffel zur Honigeinwaage
ggf. Heizplatte und Magnetrührer mit Rührfischen

Kasten 1: Geräte und Hilfsmittel für die Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig. Alle Gefäße müssen frei von Detergenzien sein.

2.1.2 Durchführung

Zur Herstellung von Honigprobenlösungen werden je 4 g Honig (Abwaage auf 0,01 g genau) in ca. 15 mL Phosphatpuffer (Kasten 2) gelöst und mit Pufferlösung auf 25 mL aufgefüllt. Die Entnahme von 4 Gramm-Aliquoten von kandierte festem Honig aus 500-Gramm-Gläsern kann von der Oberfläche erfolgen. Flüssige Honige sind vor der Beprobung homogen zu verrühren, wobei das Einrühren von Luft zu vermeiden ist. Aus größeren Gebinden sind vorab repräsentative Proben von mindestens 200 g zu entnehmen und homogen zu verrühren. Frisch geschleuderter Honig oder Wabenhonig ist zusätzlich vor der Beprobung zu sieben (Maschenweite 0,5 mm). Die hergestellten Honigprobenlösungen sind gekühlt (4 - 8°C) etwa 24 Stunden haltbar.

2,5 mL Substratlösung (Kasten 2) werden in ein Reagenzglas vorgelegt, das in einem 40°C warmen Wasserbad steht. Nach ca. 2-3 Minuten werden 0,25 mL Honigprobenlösung zugegeben und gut geschüttelt. Der Zeitpunkt der Zugabe der Probenlösung ist der Startzeitpunkt (Stoppuhr). Nach 20 Minuten (± 5 s) Reaktionszeit werden 0,25 mL Stopplösung (Kasten 2) hinzugegeben und erneut

gut geschüttelt. Anschließend wird die Extinktion der Reaktionslösung bei 400 nm im Photometer gemessen.

Zur photometrischen Messung ist für jede Honigsorte ein Blindwert anzusetzen, denn jeder Honig beeinflusst durch seine Eigenfärbung die Gesamtextinktion anders. Dazu inkubiert man für jede Honigsorte 2,5 mL Substratlösung 20 Minuten bei 40°C und fügt danach zuerst 0,25 mL Stopplösung hinzu und erst anschließend 0,25 mL der Honigprobenlösung.

Phosphatpuffer (pH 6,0; 0,1 mol/L):

5,83 g KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) und 1,28 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) werden in etwa 450 mL Wasser gelöst und nach Einstellen des pH-Werts auf 6,0 (HCl, NaOH) auf 500 mL aufgefüllt.

Substratlösung (0,02 mol/L):

Als Substrat wird p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid verwendet. Da diese Chemikalie relativ teuer ist, richtet man sich bei der Ansatzmenge nach der Menge der zu untersuchenden Proben. Beispielsweise werden 0,36 g p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (Abwaage auf 0,01 g genau) in 60 mL Phosphatpuffer gelöst. Den Puffer dazu auf 60°C erwärmen und nach dem Auflösen sofort wieder abkühlen (Wasserbad RT). Danach ist die Lösung direkt verwendbar und in einer Lichtschutzflasche bei 4°C maximal eine Woche haltbar. (Für das unverdünnte Substrat empfiehlt sich die Lagerung im Eisfach.)

Stopplösung (3 mol/L):

36,34 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Abwaage auf 0,01 g genau) werden in möglichst wenig Wasser gelöst und nach Einstellen des pH auf 9,5 - dazu 3-molare Salzsäure (HCl) verwenden - auf 100 mL aufgefüllt.

Kasten 2: Chemikalien für die Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig. Die Lösungen werden vorab von der Lehrkraft angesetzt. Das Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid ist nicht gefährlich [14], wirkt jedoch reizend [15]. Staubbildung und Einatmen des Pulvers sind zu vermeiden. Die Schülerinnen und Schüler sollen nicht mit dem Reinstoff arbeiten, sondern nur mit der fertigen Lösung, in der er stark verdünnt vorliegt, und wie üblich Schutzbrillen tragen. Reste des Stoffs sollen nicht in die Kanalisation gelangen und daher einem anerkannten Entsorgungsunternehmen zugeführt werden. RT: Raumtemperatur.

2.2 Auswertung

Nach erfolgter Extinktionsmessung errechnet sich die Enzymaktivität einer Probe, auch Siegenthalerzahl genannt, nach der in Kasten 3 angegebenen Formel. Dabei ist 1 U die Enzymaktivität, die unter den hier gegebenen Bedingungen von pH und Temperatur je Minute eine Substratmenge von 1 μmol umsetzt.

Bei Berechnung der Siegenthalerzahl unter Verwendung der in Kasten 3 angegebenen exemplarischen Werte ergibt sich $S_Z = E_{400\text{nm}} \cdot 198,68 \text{ U/kg}$.

$$S_z = \frac{E(400 \text{ nm}) \cdot V_f \cdot V \cdot t \cdot K}{m_E} \frac{\text{U}}{\text{kg}}$$

E_{400} = Extinktion bei 400 nm, V_f = Umrechnungsfaktor auf 1 kg Honig (hier 100.000), V = Volumen der Probenlösung in mL (hier 3 mL), t = Faktor zur Berechnung der Reaktionszeit auf 1 Minute (hier $t=0,05$), K = Faktor für molare Konzentration des p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid ($K=0,05289$), m_E = Honigeinwaage in g (hier 4 g).

Kasten 3: Berechnung der Siegenthalerzahl S_z [vgl. 12]. Unter Verwendung der angegebenen exemplarischen Werte kann eine Proberechnung durchgeführt werden.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die gesetzlichen Vorgaben eingeordnet [3]: Vom Gesetzgeber ist keine generelle Mindestsaccharaseaktivität (Mindest-Siegenthalerzahl) für Honig vorgeschrieben. Allerdings können besonders schonend geerntete und behandelte Honige mit den Begriffen „Auslese“ und „Premium“ versehen werden. Sie müssen hierzu Saccharaseaktivitäten von mindestens 60 U/kg (Auslese) bzw. 85 U/kg (Premium) aufweisen. Gleichzeitig darf ihr HMF-Gehalt max. 15 mg/kg (Auslese) bzw. max. 10 mg/kg (Premium) und ihr Wassergehalt max. 18 % betragen. Die Qualitätsstufen ergeben sich somit aus jeweils mehreren Parametern.

Wird der Honig unter dem Warenzeichen des Deutschen Imkerbundes (DIB) in den Verkehr gebracht, so muss er generell eine Saccharaseaktivität von mindestens 64,0 U/kg (gleichzeitig HMF max. 15 mg/kg, Wassergehalt max. 18 %) aufweisen, also auf jeden Fall die vom Gesetzgeber festgelegte Auslese-Qualität haben. Ausnahmen gelten jeweils für einige sortenbedingt enzymschwache Blütenhonige (z. B. Robinienhonig [3]).

3 Vorschläge zum Unterricht

3.1 Alltags- und Lehrplanbezug

Die Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig kann im Zusammenhang mit dem Thema Enzymatik behandelt werden (z.B. in NRW in der Einführungsphase, Inhaltsfeld 2: Energiestoffwechsel [16]). In fachinhaltlicher Hinsicht liefert die Untersuchung einen alltagsbezogenen Kontext, denn die Schülerinnen und Schüler erhalten einen Einblick in einen Aufgabenbereich der Lebensmittelprüfung. Durch die Prädikatsbezeichnungen „Auslese“ und „Premium“ sollen hiesige Imker die Möglichkeit haben, sich von der ausländischen Konkurrenz abzusetzen. Deren Honige erreichen sehr oft nicht die entsprechenden Qualitätskriterien, da die Lagerbedingungen während der Einfuhr nicht optimal sind. Mit Bestimmung der Saccharaseaktivität können die Schülerinnen und Schüler (vom HMF- und Wassergehalt abgesehen) somit einordnen, ob untersuchte Honige unter dem Warenzeichen des Deutschen Imkerbundes verkauft werden dürfen, die vom Gesetzgeber festgelegten Qualitätsstufen „Auslese“

oder „Premium“ erreichen oder vielleicht doch nur als „einfacher“ Honig in den Handel gelangen dürfen. In Bezug auf die Methodik sind gängige Labormethoden und interdisziplinäre Aspekte sowie grundlegende Prinzipien naturwissenschaftlichen Arbeitens von Bedeutung (z.B. photometrische Messung, Farbreaktion als Maß für Enzymaktivität, Rechnen / Verwenden einer Formel, Vergleich von Kontroll- und Testansatz, naturwissenschaftliche Erkenntnisschritte), so dass die Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig auch in fachmethodischer Hinsicht exemplarisch ist.

3.2 Hinweise zum Unterrichtsablauf

Der Schwerpunkt der Stunde ist die Erarbeitung der Methode anhand eines kurzen [Films](#), um anschließend geeignete Fragestellungen und passende Hypothesen zu entwickeln und die zur Klärung erforderliche Bestimmung der Saccharaseaktivität somit nicht (nur) kochrezeptartig, sondern verständnisbasiert und zielorientiert anwenden zu können. Auch ohne eigene praktische Umsetzung der Untersuchung kann dieses Unterrichtsmodell zum Einsatz kommen.

Zu den Aufgaben 1 und 2 im Arbeitsmaterial steht eine Musterlösung zur Verfügung (s. letzte Seite dieses Beitrags). Die möglichen Lösungen zu Aufgabe 3 finden sich in Abschnitt 3.2.3. Anstelle der hier durch die Aufgabenstellung intendierten Freitextantworten wäre adressatenspezifisch auch eine stärkere Steuerung durch entsprechende Methodenwerkzeuge (z.B. Worttopf, Lückentext, Wortgeländer) [17] denkbar (vgl. Aufgabe 1 und 2).

3.2.1 Fragestellung und Hinführung

Im Einstieg können zwei Honiggläser gezeigt werden – je nach weiterem Planungsverlauf (s.u.) real oder als Foto –, die als „Auslese“ und „Premium“ etikettiert sind (Abb. 1). Im Vergleich wird festgestellt, dass der Honig in den Gläsern zwar gleich aussieht, jedoch unterschiedliche Bezeichnungen trägt, was (ähnlich wie z.B. bei Wein) eine unterschiedliche Qualität vermuten lässt. Durch die Lehrkraft wird bestätigt, dass es sich bei „Auslese“ und „Premium“ um Qualitätsstufen handelt – Honig von sehr hoher Qualität wurde besonders schonend geerntet und behandelt und ist daher besonders naturbelassen. Seine Qualität wird vermindert durch zu viel Wärme, Licht und Feuchtigkeit, denn dies verändert seine natürliche Zusammensetzung. Zum Beispiel ist das Enzym Saccharase besonders temperaturempfindlich: In einem hitzgeschädigten Honig ist die Aktivität dieses Enzyms deshalb geringer als in einem naturbelassenen Honig.

Es ergibt sich somit zunächst die allgemeine Frage, wie die Naturbelassenheit eines Honigs geprüft werden kann (diverse Inhaltsstoffe bzw. deren Anteil wären zu untersuchen) und sodann die spezifische Frage, wie die Saccharaseaktivität in Honig bestimmt wird (je mehr naturbelassen der Honig, desto höher die Saccharaseaktivität).

Das Prinzip der Methode sollte erläutert werden, bevor die eigentliche Durchführung thematisiert wird: Normalerweise katalysiert das Enzym Saccharase die Spaltung von Saccharose in Fruktose

und Glukose (was den Schülerinnen und Schülern aus vorhergehendem Unterricht bekannt sein dürfte). Das Enzym reagiert jedoch auch mit einem bestimmten Substrat (p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid), und dabei entsteht ein Farbstoff, dessen Menge wiederum gemessen bzw. berechnet werden kann. Je mehr Saccharase vorhanden ist, desto mehr Farbstoff entsteht pro Zeiteinheit. Durch Einsetzen der gemessenen Werte in eine bestimmte Formel errechnet sich die sogenannte Siegenthalerzahl. Je höher diese ist, desto höher ist die Qualität des getesteten Honigs (Auslese: Saccharaseaktivität von mind. 60 U/kg, Premium: Saccharaseaktivität von mind. 85 U/kg).

3.2.2 Erarbeiten der Methode

Die Methode wird in einem etwa sechsminütigen [Film](#) dargestellt. Die Schülerinnen und Schüler können diesen – auch asynchron, z.B. im Distanzunterricht – je nach individuellem Bedarf ansehen und unter Verwendung des Arbeitsblattes erarbeiten, welche Materialien zu verwenden sind und wie man bei der Aktivitätsbestimmung nach Siegenthaler vorgeht (s. Arbeitsmaterial, Aufg. 1).

Der Film enthält durchaus „Leerstellen“ oder Ungenauigkeiten, oder es werden Geräte und Vorgänge zwar gezeigt, jedoch nicht benannt, und an manchen Stellen wirft der Film Fragen auf, die entweder die konkrete Durchführung oder die Methodik allgemein betreffen, z.B.:

Anzahl und Fassungsvermögen der erforderlichen Messzylinder (im Film: 1x 100 mL und 2x 50 mL), Begriffe Molarität und pH-Wert, Masse des für die jeweiligen Probenlösungen eingesetzten Honigs, Verwendung von Pipetten, Verwendung von Küvetten (Photometer), Prinzip der photometrischen Messung, Begriff Extinktion, Einheit U/kg bei der Siegenthalerzahl, ...

Es wird vorgeschlagen, dass die Schülerinnen und Schüler nach Protokollierung der Informationen aus dem Film diese durchsehen und offene Fragen und evtl. Klärungsbedarf zunächst selbst benennen („Habe ich nun alle Informationen, die ich brauche, um selbst die Untersuchung durchführen zu können? Verstehe ich die Begriffe, die Einheiten, das Messprinzip und welche Aussagen sich aus den Ergebnissen ableiten lassen, also was mir eine hohe oder niedrige Siegenthalerzahl über die Saccharaseaktivität sagt?“)

Die offenen Fragen können durch Informationen der Lehrkraft, durch Auszüge aus diesem Artikel oder durch eigene Recherchen der Schülerinnen und Schüler geklärt werden. Es soll erreicht werden, dass die Arbeit erst fortgesetzt wird, wenn klar ist, was wann, wie und warum gemacht wird, und was das, was dabei „herauskommt“, eigentlich bedeutet (s. Arbeitsmaterial, Aufg. 2). Wird im weiteren Verlauf des Unterrichts auf die konkrete Durchführung verzichtet, sind nicht alle Details der Methodik relevant, deren prinzipielles Verständnis ist gleichwohl auch dann das Ziel. Daher enthält das Arbeitsmaterial einige zusätzliche Erklärungen oder Hinweise, die in einem naturwissenschaftlichen Protokoll an diesen Stellen oder in dieser Form so nicht zu finden wären.

3.2.3 Anwenden der Methode

Unabhängig davon, ob das Experiment real durchgeführt wird oder ob es bei der Erarbeitung der Methodik anhand des Films bleibt - im Präsenzunterricht, weil evtl. aus Zeitgründen darauf verzichtet wird und der Schwerpunkt im Kompetenzbereich Erkenntnisgewinnung anders gesetzt wird, und im Distanzunterricht, weil die Schülerinnen und Schüler es nicht zu Hause durchführen können -, werden anschließend Überlegungen zur Auswahl der zu untersuchenden Honige angestellt (s. Arbeitsmaterial, Aufg. 3). Es zeigt sich, dass die allgemeine Fragestellung „Wie hoch ist die Saccharaseaktivität?“ und das Untersuchungsziel je nach Auswahl der zu prüfenden Honige zu präzisieren sind:

- Soll die Saccharaseaktivität bei Honigen mit bekannter Bezeichnung (s. Einstieg) bestimmt werden? Dann wäre zu überprüfen, ob die vom Gesetzgeber geforderten Mindestwerte beim Auslese- und Premiumhonig tatsächlich gemessen werden können. Man würde also erwarten, dass bei dem Auslesehonig eine Saccharaseaktivität von mindestens 60 U/kg und bei dem Premiumhonig eine Saccharaseaktivität von mindestens 85 U/kg ermittelt wird.
- Soll die Saccharaseaktivität bei Honigen bekannter Herkunft (s. Tab. 1) gemessen werden? Dann kann aufgrund der Herkunft eine eher hohe oder eher geringe Aktivität vermutet werden, was durch die Untersuchung zu überprüfen wäre. Sicherlich wäre es interessant zu ermitteln, ob z.B. der Honig eigener „Schulbienen“ (aufgrund der Saccharaseaktivität) eine Qualitätsbezeichnung erhalten dürfte. (Daneben wären der Wasser- und der HMF-Gehalt als weitere Parameter zu berücksichtigen [vgl. 4, 6].) Man sollte hier möglichst frisch geschleuderten Honig verwenden. Alternativ wäre ein Honig einer regionalen Imkerei zu testen. Zum Vergleich wird ein oder zwei Jahre alter Honig empfohlen sowie desweiteren ein aus Mittelamerika oder einem anderen Land der tropischen Zone stammender Honig, bei dem zu vermuten ist, dass er nach dem Schleudern längere Zeit höheren Temperaturen ausgesetzt war und einen langen Transportweg hatte.
- Soll die Saccharaseaktivität bei Honigen unbekannter Herkunft bestimmt werden? Die Lehrkraft kann hierzu eine Auswahl von Honigen mitbringen und die Etiketten entfernen oder überkleben, zum Beispiel zwei Honige, deren Qualitätsbezeichnung nur ihr bekannt ist (vgl. Abb. 1) oder einige Honige möglichst unterschiedlicher Herkunft (vgl. Tab. 1), welche ebenfalls nur die Lehrkraft kennt. Bei einer solchen Ausgangslage wäre es das Ziel der Untersuchung, die Naturbelassenheit der Honige zu beurteilen. Zu bedenken ist dabei, dass es je nach Honigsorte unterschiedliche Ausgangsaktivitäten der Saccharase gibt (s. Abschnitt 1).

Tab. 1: Saccharaseaktivität (nach Siegenthaler in U/kg) in Honigproben verschiedener Herkunft. HI = Honige der Hochschulimkerei der RWTH Aachen, Institut für Biologie II; BP = In der Lehrveranstaltung „Bienenpraktikum“ ermittelte Werte (SoSe 2018 und 2019, Mittelwerte von Dreifachmessungen).

Honigsorte	Herkunft	Saccharaseaktivität U/kg
Mischtracht	Südamerika	12,7
Rata (Südl. Eisenholz)	Neuseeland	25,1
Klee	Neuseeland	22,3
Mischtracht	Deutschland	75,2
Raps	Deutschland	65,2
Raps + Obst	Deutschland	113
Honigtau	Deutschland	151,5
Honigtau	EG-Länder und Nicht-EG-Länder	30 (BP)
Citrus	Ägypten	76,5
Sonnenblume	Frankreich	120
Frühjahrsblüte (HI)	HI-Ernte, 1 Jahr alt	150 (BP)
Sommerblüte (HI)	HI-Ernte, 20 Monate alt	140 (BP)
Sommerblüte (HI)	HI-Ernte, Metansatz (kurz auf 70°C erhitzt)	21 (BP)
46 verschiedene Honige	Sachsen-Anhalt	$\bar{x} = 112,3$ (21,1 - 210,2)

Danksagung und Hinweis

- Die Autoren danken den Studierenden der [Hochschulimkerei](#) der RWTH Aachen für die erhaltenen Proben und den Teilnehmenden des „Bienenpraktikums“ (Wahlpflichtpraktikum für Lehramtsstudierende der B.Sc.-Studiengänge) für die Ermittlung der Messwerte. Die Hochschulimkerei ist auch Teil des Lehr-Lern-Labors Biologie ([BioL³](#)).
- Honig kann in vielerlei Weise im experimentellen Fachunterricht genutzt werden. Neben den im Text genannten Möglichkeiten zur Untersuchung von Honig bietet sich auch der Ansatz von Met [18] an, der Nachweis seiner antimikrobiellen Eigenschaften [19] oder eine sensorische Begutachtung und Sortenbestimmung [20]. Außerdem kann auch die Honigbiene selbst zum Einsatz kommen bei der Bestimmung des Honigmagenvolumens [21] und verschiedenen Dressurversuchen [22-25].

Anschrift der Verfasser

Dr. Bruno Weyers^{1,3}, Prof.-Vertr. Dr. Ingeborg Heil, OStR' i.H.^{1,2}, Univ.-Prof. i.R. Johannes Bohrmann¹; RWTH Aachen, ¹Institut für Biologie II, Lehr- und Forschungsgebiet Zoologie und Humanbiologie, ²Lehr- und Forschungsgebiet Didaktik der Biologie und Chemie ([Biologiedidaktik](#)), ³[Labor Dr. Weyers](#), Aachen; Kontakt: weyers@bio2.rwth-aachen.de, heil@bio2.rwth-aachen.de, bohrmann@bio2.rwth-aachen.de

Literatur

- [1] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz und Bundesamt für Justiz (Hg.) Gesetze im Internet: Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), die zuletzt durch Artikel 10 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist: https://www.gesetze-im-internet.de/honigv_2004/BJNR009200004.html (14.07.2021)
- [2] Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2011) Neufassung der Leitsätze für Honig: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeHonig.pdf> (14.07.2021)
- [3] von der Ohe W (o.D.) Erläuterung zur Neufassung der Leitsätze für Honig: https://deutscherimkerbund.de/userfiles/downloads/satzung_richtlinien/Erlaeuterungen_neue_Leitsaetze_Honig.pdf (14.07.2021)
- [4] Weyers B, Höhne B, Heil I, Bohrmann J (2015) Reifer Honig oder nicht? Das ist hier die Frage! – Zwei einfache Methoden zur Bestimmung des Wassergehalts von Bienenhonig. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 2/64:4-10; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabggdctm und https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabggdcvf (13.12.2021)
- [5] Heil I, Poloczek R, Bohrmann J (2012) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 6: „Ist auch drin, was drauf steht?“ – Unterrichtsvorschlag zur Untersuchung von Sortenhonigen mittels Pollenanalyse. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 6/61:34-38; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvjri (13.12.2021)
- [6] Höhne B, Weyers B, Heil I, Bohrmann J (2019) HMF-Bestimmung und Honigqualität – Ein neues Experiment für die Schule. BU praktisch 2(1):1-16: <https://www.bu-praktisch.de/index.php/bupraktisch/article/view/1194> (14.07.2021)
- [7] Dustmann JH, van Praagh JP, Bote K (1985) Zur Bestimmung von Diastase, Invertase und HMF in Honig. Apidologie 16 (1):19-30
- [8] Zunftmeister F, Heil I, Bohrmann J (2018) "Einer für Alles" – Verwendung von Honig für Schulexperimente zur Enzymatik. BU praktisch 1(1):1: <https://www.bu-praktisch.de/index.php/bupraktisch/article/view/1100> (14.07.2021)
- [9] Heil I, Koch K, Bohrmann J (2020) Glukometer, Honig und Tee – Schulexperimente zur Bestimmung der Aktivität von Saccharase. BU praktisch 3(2):6: <https://www.bu-praktisch.de/index.php/bupraktisch/article/view/3538> (14.07.2021)
- [10] Deutscher Imkerbund (DIB) (o.D.) Echter deutscher Honig. Qualitätsrichtlinien: https://deutscherimkerbund.de/229-Echter_Deutscher_Honig_Qualitaetsrichtlinien (14.07.2021)
- [11] Bognanov S.: Lagerung, Kristallisation und Verflüssigung des Honigs. Bee Product Science, www.bee-hexagon.net: <https://docplayer.org/17760794-Lagerung-kristallisation-und-verfluessigung-des-honigs.html> (18.07.2021)


- [12] Siegenthaler U (1977) Eine einfache Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase (Saccharase) im Honig. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.) 68: 251-258
- [13] Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt (2015) Beschaffenheit und Kennzeichnung von Honigen „besonderer Qualität“ aus Imkereien: https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/lebensmittelsicherheit/schwerpunktberichte/schwerpunktberichte2014/16_2014.pdf (14.07.2021)
- [14] Sigma-Aldrich (2019). Sicherheitsdatenblatt 4-Nitrophenyl alpha-D-glucopyranosid: [Safety Data Sheet \(sigmaaldrich.com\)](https://www.sigmaaldrich.com) (14.07.2021)
- [15] Nationales Zentrum für Biotechnologie-Informationen (2021). PubChem Compound LCSS für CID 92969, 4-Nitrophenyl alpha-D-glucopyranosid: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside#datasheet=LCSS> (14.07.2021)
- [16] Ministerium für Schule und Weiterbildung des Landes Nordrhein-Westfalen (Hg.) (2014) Kernlehrplan für die Sekundarstufe II Gymnasium/Gesamtschule in Nordrhein-Westfalen. Biologie. Frechen: Ritterbach; online: https://www.schulentwicklung.nrw.de/lehrplaene/upload/klp_SII/bi/KLP_GoSt_Biologie.pdf (14.07.2021)
- [17] Leisen J (2013). Handbuch Sprachförderung im Fach. Sprachsensibler Fachunterricht in der Praxis. Stuttgart: Klett; zum Überblick empfohlen: <http://www.josefleisen.de/downloads/methodenwerkzeuge/49%20%C3%9Cbersicht%20-%20Vierzig%20Methoden-werkzeuge.pdf> (14.07.2021)
- [18] Heil I, Poot P und Bohrmann J (2012) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 7: Herstellung von Honigwein – Ein fachübergreifendes Rezept. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 7/61:38-40; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvolf (13.12.2021)
- [19] Heil I, Karzell R, Zimmermann M, Bohrmann J (2015) Honig bei Halsentzündung? - Schulversuche zur antimikrobiellen Wirkung von Honig. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 2/64:10-17; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabggdcyb und https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabggddcu (13.12.2021)
- [20] Weyers B, Ommerborn S, Heil I, Bohrmann J (2015) Linden-, Raps- oder Waldhonig – Kost mal! Sensorische Überprüfung von Honigsorten. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 7/64:12-16; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvspxp (13.12.2021)

- [21] Heil I, Poloczek R, Bohrmann J (2011) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 5: Untersuchung zum Fassungsvermögen des Honigmagens – Ein Unterrichtsvorschlag für die Sekundarstufe 1. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 2/60:43-45; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvjpt (13.12.2021)
- [22] Heil I, Bohrmann J (2010) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 1: Anleitungen und Materialien für Duft-, Muster- und Farbdressurversuche. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 4/59:45-48; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvngqn (13.12.2021)
- [23] Heil I, Gawlik S, Bohrmann J (2010) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 2: Versuch zur Duftdressur – Ein Unterrichtsvorschlag für die Sekundarstufe II. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 5/59:33-37; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvnngb (13.12.2021)
- [24] Heil I, Gawlik S, Bohrmann J (2010) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 3: Versuch zur Musterdressur – Ein Unterrichtsvorschlag für die Sekundarstufe I. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 6/59:42-46; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvnroz (13.12.2021)
- [25] Heil I, Gawlik S, Bohrmann J (2011) Die Honigbiene im Biologieunterricht – Teil 4: Versuch zur Farbdressur – Eine kompetenzorientierte Aufgabe für die Sekundarstufe I. Praxis der Naturwissenschaften – Biologie in der Schule 1/60:40-45; online: https://www.biologiedidaktik.rwth-aachen.de/global/show_document.asp?id=aaaaaaaaabgvoguw (13.12.2021)

Musterlösung zum Arbeitsmaterial

Methode zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig

Material

- Ein Wasserbad (40°C)
- Einige Probenröhrchen (zum Einbringen der Proben ins Wasserbad)
- Einige Messzylinder
- Ein Photometer
- Eine Waage
- Ein Gefäß mit Schraubverschluss (für Herstellung der Substratlösung)
- Einige Pipetten
- Pufferlösung (Phosphatpuffer) 0,1 M pH 6
- Stopplösung (Tris-Puffer) 3 M pH 9,5
- Substrat (p-Nitrophenyl- α -D-glucoopyranosid) 
- Honigproben (für Herstellung der Honiglösungen = Probenlösungen)

Durchführung

- Lösungen herstellen
 - Honiglösung (Probenlösung): Honigprobe mit Phosphatpuffer auffüllen auf 25 mL, schütteln, bis sich der Honig gelöst hat, anschließend ins Wasserbad stellen
 - Substratlösung (wird von der Lehrkraft angesetzt): 0,1 g Substrat in 16,7 mL Phosphatpuffer geben, schütteln und ins Wasserbad stellen, bis sich das Substrat gelöst hat
- Reaktion starten und stoppen
 - Testansätze (enthalten die verschiedenen Probenlösungen, also mit Honig): 2,5 mL Substratlösung vorlegen, 0,25 mL Honiglösung dazu pipettieren, schütteln und im Wasserbad für 20 min inkubieren, dann 0,25 mL Stopplösung dazugeben → diese Lösungen sind dann farbig geworden
 - Kontrollansatz (für den Blindwert, also ohne Honig): 2,5 mL Substratlösung im Wasserbad für 20 min inkubieren, dann 0,25 mL Stopplösung und danach 0,25 mL Honiglösung dazu pipettieren, schütteln → diese Lösung ist dann nicht farbig geworden
- Messung im Photometer
 - bei 400 nm zunächst den Blindwert messen und auf Null stellen, dann Probenlösung messen
 - man erhält einen Wert für die Extinktion (im Film: 0,677)
- Siegenthalerzahl (S_z) berechnen
 - Wert für die Extinktion in die Formel einsetzen
 - man erhält die Siegenthalerzahl (im Film: 134,5 U/kg)

Zusammengehörige Begriffe: Honig – Honigprobe(n) – Honiglösung(en) – Probenlösung(en) – Testansätze, Substrat – Substratlösung – Kontrollansatz, Phosphatpuffer – Pufferlösung, Stopplösung

Mögliche Begriffskombinationen (Beispiele): inkubieren – Wasserbad – 40°C – 20 min – Testansätze, berechnen – einsetzen – Siegenthalerzahl – S_z – 134,5 U/kg, messen – Extinktion – Photometer – 400 nm – 0,677, auffüllen – Probenröhrchen – 25 mL, pipettieren – Gefäß – 2,5 mL Substratlösung – 0,25 mL, Waage – 0,1 g – Substrat


Arbeitsmaterial

Methode zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig

- Vervollständigen Sie die Anleitung zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Honig mit Hilfe des [Films](#). Natürlich können Sie diesen so oft anschauen und unterbrechen wie nötig. Nutzen Sie bei Bedarf die Worttöpfe. (Wenn Sie es zunächst ohne diese Hilfen versuchen möchten, klappen Sie die obere Hälfte dieses Blattes nach hinten.)
- Markieren Sie in Worttopf 1 zusammengehörige Begriffe in gleicher Farbe. Kombinieren Sie zusammenpassende Begriffe aus den Worttöpfen und bilden Sie Beispielsätze (Sie können hierbei noch weitere Begriffe verwenden).
 - Prüfen Sie die Anleitung im Hinblick auf fehlende Angaben, die Sie für die Durchführung der Methode noch benötigen, sowie auf Begriffe und Aspekte, die für Sie noch unverständlich sind. Klären Sie diese.
- Formulieren Sie die jeweiligen Fragestellungen, die Sie mit der Methode beantworten können, wenn a) die Qualitätsbezeichnung der zu untersuchenden Honige bekannt ist, b) die Qualitätsbezeichnung der Honige nicht bekannt, jedoch deren Herkunft bekannt ist und c) beides unbekannt ist. Geben Sie jeweils an, welche Vermutungen durch die Untersuchung zu überprüfen wären.

1	2	3	4
Wasserbad Messzylinder Blindwert S_z Probenröhrchen Waage Gefäß Siegenthalerzahl Extinktion Photometer farbig	Honig Substratlösung Testansätze Phosphatpuffer Honiglösung(en) Stopplösung Probenlösung(en) Pufferlösung Honigprobe(n) Kontrollansatz Substrat	40°C 20 min 0,25 mL 3 M 25 mL pH 6 0,677 134,5 U/kg 2,5 mL 0,1 g 400 nm	stoppen inkubieren auffüllen schütteln vorlegen pipettieren messen einsetzen stellen sich lösen berechnen

Material

- Ein _____ (_____)
- Einige _____ (zum Einbringen der Proben ins Wasserbad)
- _____
- Ein _____
- _____
- Ein _____ mit Schraubverschluss (für Herstellung der Substratlösung)
- _____ Pipetten
- _____ (Phosphatpuffer) 0,1 M _____
- _____ (Tris-Puffer) _____ pH 9,5
- _____ (p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid) 
- Honigproben (für Herstellung der _____ = Probenlösungen)

Durchführung

Bitte beachten Sie, dass im Schülerversuch Schutzbrillen zu tragen sind!

- Lösungen herstellen
 - Honiglösung (= _____):
 _____ mit _____
 auf _____, schütteln, bis sich _____ gelöst hat,
 anschließend ins _____ stellen
 - _____ (wird von der Lehrkraft angesetzt):
 _____ Substrat in 16,7 mL _____ geben,
 schütteln und ins Wasserbad _____, bis _____ das Substrat
 _____ hat

- Reaktion starten und _____
 - _____ (enthalten die verschiedenen _____,
 also _____ Honig):
 2,5 mL Substratlösung _____, 0,25 mL _____
 dazu pipettieren, _____ und im Wasserbad für _____
 inkubieren, dann 0,25 mL _____ dazugeben
 → diese Lösungen sind dann _____ geworden
 - _____ (für den _____, also _____ Honig):
 _____ Substratlösung im _____ für
 _____, dann _____ Stopplösung und
 danach _____ Honiglösung dazu _____, schütteln
 → diese Lösung ist dann nicht _____ geworden

- Messung im _____:
 - bei _____ zunächst den _____ messen und auf Null stellen,
 dann die _____
 - man erhält einen Wert für die _____ (im Film: _____)

- Siegenthalerzahl (_____) _____:
 - Wert für die _____ in die Formel _____
 - man erhält die _____ (im Film: _____)