

**Methylglyoxal in Manuka-Honig (*Leptospermum scoparium*):
Bildung, Wirkung, Konsequenzen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Julia Atrott
geboren am 07.05.1984 in Berlin

Eingereicht am 24.10.2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2007 bis September 2012 an der
Professur für Lebensmittelchemie angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Henle

Prof. Dr. Gerold Barth

Tag der Disputation: 03.04.2014

*Versuch nicht den perfekten Satz zu finden.
Den gibt es nicht.*

Schreiben ist Vermutung.

*Jeder Satz ist eine begründete Vermutung,
von deiner Seite wie von der des Lesers.*

(J. R. Moeringer)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1 Einleitung und Zielstellung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Honig.....	3
2.1.1 Definition und allgemeine Aspekte.....	3
2.1.2 Gewinnung und Klassifizierung von Honig.....	4
2.1.3 Manuka-Honig.....	5
2.2 Zusammensetzung von Honig.....	8
2.2.1 Wasser.....	8
2.2.2 Kohlenhydrate.....	9
2.2.3 Proteine.....	11
2.2.4 Aminosäuren.....	12
2.2.5 Phenolische Verbindungen.....	13
2.2.6 Weitere Inhaltsstoffe.....	14
2.2.7 Qualitätsanforderungen an Honig.....	17
2.3 Carbonylverbindungen in Honig.....	18
2.3.1 Grundzüge der Zuckerabbauwege in Lebensmitteln.....	18
2.3.2 1,2-Dicarbonylverbindungen.....	21
2.3.2.1 Vorkommen von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln.....	21
2.3.2.2 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig.....	22
2.3.2.3 Bildungswege von MGO.....	23
2.3.2.4 Abbau und Folgeprodukte von MGO.....	24
2.3.3 Dihydroxyaceton.....	25
2.3.4 5-Hydroxymethylfurfural.....	26
2.3.5 Weitere Produkte der Maillard-Reaktion.....	28
2.4 Biofunktionelle Eigenschaften von Honig.....	29
2.4.1 Antibakterielle Wirkung von Honig.....	29
2.4.2 Antioxidative Eigenschaften von Honig.....	31
2.5 Zytotoxische Eigenschaften von Honig.....	33
2.5.1 Testsysteme zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	33
2.5.2 Zyotoxische Eigenschaften von MGO.....	35
3 Material und Methoden.....	37
3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte.....	37
3.1.1 Chemikalien.....	37

3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	38
3.1.3	Materialien für Zellkulturarbeiten	40
3.1.4	Materialien für mikrobiologische Arbeiten	42
3.2	Probenmaterial	43
3.3	Bestimmung von Carbonylverbindungen	46
3.3.1	1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig und Pflanzen	46
3.3.2	Dihydroxyaceton in Honig	48
3.3.3	5-Hydroxymethylfurfural in Honig	49
3.3.4	3,4-Didesoxyglucoson-3-en	50
3.4	Isolierung von 2-Hydroxymethylchinoxalin	51
3.4.1	Semipräparative HPLC	51
3.4.2	Methoden zur Identifizierung	51
3.5	Analytische Charakterisierung von Honig	52
3.5.1	Bestimmung von pH-Wert und Wassergehalt	52
3.5.2	Bestimmung von Glucose und Fructose	52
3.5.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	53
3.5.4	Aminosäureanalyse	54
3.5.5	Gesamtphenolgehalt nach Folin	56
3.5.6	Honigfarbe	56
3.6	Enzymatische Untersuchungen	57
3.6.1	Bestimmung der Diastase-Aktivität nach Phadebas	57
3.6.2	Bestimmung der Invertase-Aktivität	58
3.7	Mikrobiologische Untersuchungen	59
3.7.1	Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration	59
3.7.2	Stabilitätsprüfung von Methylglyoxal in Bouillon	61
3.7.3	Mikrobiologische Untersuchungen an Manuka-Honig	61
3.8	Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit TEAC-II-Test	63
3.9	Untersuchungen zur Zytotoxizität	64
3.9.1	Kultivierung der HT-29 Zellen	64
3.9.2	Stabilitätsprüfung der Testsubstanzen in Medium	66
3.9.3	Koloniebildungstest	66
3.10	Statistische Auswertung	68
4	Ergebnisse und Diskussion	69
4.1	Methylglyoxal (MGO) und Dihydroxyaceton (DHA)	70
4.1.1	Bildung von MGO während der Lagerung von Manuka-Honig	70
4.1.2	Untersuchungen zu Manuka-Pflanzen und Nektar	73
4.1.2.1	MGO in Manuka-Pflanzenmaterial	73
4.1.3	Analytik von DHA in Honig	76
4.1.3.1	Reaktion von DHA zu 2-Hydroxymethylchinoxalin	76

4.1.3.2	Methodische Aspekte der DHA-Analytik unter OPD-Derivatisierung	78
4.1.3.3	Konzentrationen von DHA und MGO in Manuka-Honig	80
4.1.3.4	Einordnung der Daten im Vergleich zu anderen Lebensmitteln.....	83
4.1.4	Diskussion zum Vorkommen von DHA in Manuka-Nektar	85
4.2	Analyse weiterer Inhaltsstoffe in Manuka-Honigen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die MGO-Bildung	88
4.2.1	Analytische Charakterisierung von Manuka-Honigen	88
4.2.1.1	Wassergehalt und pH-Wert.....	88
4.2.1.2	Gehalt an Fructose und Glucose	89
4.2.1.3	Proteingehalt nach Bradford	90
4.2.1.4	Gehalt und Zusammensetzung der freien Aminosäuren	91
4.2.1.5	Gesamtphenolgehalt	93
4.2.1.6	Honigfarbe	94
4.2.1.7	Zusammenfassung und Korrelation zum MGO-Gehalt.....	95
4.2.1.8	Korrelation der Farbe mit weiteren analytischen Parametern.....	98
4.2.2	Einflussfaktoren auf die Umsetzung von DHA zu MGO in Honig	99
4.2.2.1	Modelluntersuchungen zur Umsetzung von DHA in Honigmatrix	99
4.2.2.2	Prüfung mittels ausgewählter multivariater Analyseverfahren.....	102
4.3	Charakterisierung von Lagerparametern in Manuka-Honig.....	107
4.3.1	Bildung an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)	107
4.3.1.1	Vorkommen und Bildung von HMF in Manuka-Honigen	107
4.3.1.2	Einfluss von DHA auf die Bildung von HMF	109
4.3.1.3	Einfluss von Aminosäuren auf die Bildung von HMF	111
4.3.1.4	Zusammenwirken der Parameter während der Lagerung	114
4.3.2	Beeinflussung von Diastase und Invertase.....	116
4.3.2.1	Enzymaktivitäten in Manuka-Honig.....	116
4.3.2.2	Einfluss von DHA auf die Enzymaktivitäten	120
4.3.2.3	DHA als Erklärung einer niedrigen Enzymaktivität in Manuka-Honig?.....	121
4.3.3	Einfluss einer Erhitzung auf ausgewählte Parameter	122
4.3.3.1	Einfluss einer Erhitzung auf den MGO-Gehalt	122
4.3.3.2	Einfluss auf weitere Parameter	124
4.3.4	Konsequenzen für die rechtliche Beurteilung von Manuka-Honig.....	126
4.4	Mikrobiologische Untersuchungen von Manuka-Honig	128
4.4.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	128
4.4.1.1	Stabilität von MGO im Testmedium	128
4.4.1.2	MHK von MGO und Vergleichsantibiotika	130
4.4.1.3	Medizinische Anwendbarkeit von MGO	133
4.4.2	Untersuchungen an Honigproben.....	135
4.4.2.1	Mikroorganismen in Manuka-Honig	135
4.4.2.2	Einsatz von Honigproben zum Mikrodilutionstest	138

4.4.2.3	Korrelation zwischen MGO-Gehalt und antibakterieller Aktivität.....	140
4.5	Antioxidative Eigenschaften von Manuka-Honig	142
4.5.1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität	142
4.5.1.1	Auswahl des TEAC-II-Tests als geeignetes Testverfahren	142
4.5.1.2	Antioxidative Kapazität von Honig	143
4.5.1.3	Einordnung der antioxidativen Kapazität von Honig im Vergleich zu anderen Lebensmitteln.....	144
4.5.2	Erklärungsansätze für die antioxidative Kapazität von Honig	147
4.5.2.1	Zusammenhang zum Gesamtphenolgehalt nach Folin	147
4.5.2.2	Möglicher Beitrag von MGO und weiteren Inhaltsstoffe	148
4.6	Zytotoxische Wirkung von Manuka-Honig	150
4.6.1	Anwendung von Zelltests für Dicarbonylverbindungen und Honig	150
4.6.1.1	Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Testsystems.....	150
4.6.1.2	Stabilität von MGO im Inkubationsmedium.....	151
4.6.2	Bestimmung des IC ₅₀ von MGO und Vergleichsproben	153
4.6.3	Zytotoxische Wirkung von Manuka-Honig.....	156
4.6.3.1	Untersuchung von Honigproben mittels Koloniebildungstest	156
4.6.3.2	Erklärungsansätze für die zytotoxische Wirkung von Honig	158
4.6.3.3	Beurteilung der Zytotoxizität von Honig.....	161
4.7	Konsequenzen der chemischen und biofunktionellen Eigenschaften von Manuka-Honig für dieses Lebensmittel.....	163
4.7.1	Charakterisierung, Deklaration und Nachweis von Manuka-Honig	163
4.7.2	Gesundheitlicher Nutzen durch Manuka-Honig?	164
5	Zusammenfassung.....	167
6	Literatur.....	170
	Wissenschaftliche Publikationen.....	191
	Danksagung.....	193
	Erklärung.....	195

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1	A) Manuka-Pflanze mit Blüten, B) Manuka-Honig	6
Abb. 2-2	Strukturformeln von Flaveson, Leptospermum und Isoleptospermum	7
Abb. 2-3	Strukturformeln der Monosaccharide Glucose, Fructose und Galactose.....	9
Abb. 2-4	Ausgewählte Flavonoide und Phenolcarbonsäuren in Manuka-Honig.....	14
Abb. 2-5	A) Reaktionsschema zur Umsetzung von Glucose zu den Desoxyosonen 1-, 3 und 4-DG im Rahmen der Karamellisierung; B) Reaktionsschema der frühen und fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion, Bildung von Amadori-Produkten am Beispiel der 1-Amino-1-desoxyfructose mit nachfolgender Bildung der Desoxyosone 1-DG, 3-DG und 4-DG	19
Abb. 2-6	Schema zur Retroaldolreaktion von 3-DG zu MGO	23
Abb. 2-7	Enzymatische Bildung von MGO aus Dihydroxyacetonphosphat durch die MGO-Synthase sowie aus Aminoaceton mittels Aminooxidase.....	24
Abb. 2-8	Ausgewählte Proteinmodifikationen durch MGO	25
Abb. 3-1	Reaktionsschema zur Bildung der Chinoxaline aus 1,2-Dicarbonylverbindungen und OPD	46
Abb. 3-2	Schematische Darstellung der Probenauftragung im Mikrodilutionstest	61
Abb. 3-3	Reaktionsgleichgewicht zwischen $ABTS^+$ -Kation und $ABTS^{+\cdot}$ -Radikalkation	63
Abb. 4-1	Fragestellungen zum Vorkommen von MGO in Manuka-Honig	69
Abb. 4-2	MGO-Gehalt in frischem Manuka-Honig vor und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 0 bis 24 Wochen.....	71
Abb. 4-3	Verlauf des MGO-Gehaltes in frischem Manuka-Honig (vier Proben) nach Lagerung bei 37 °C über einen Zeitraum von 0 bis 24 Wochen.....	71
Abb. 4-4	RP-HPLC nach Derivatisierung mit OPD der Pflanzenprobe 10-2 (Gegend Nr. 10, Probe 2) unter Einsatz A) des gesamten Pflanzenmaterials (Blätter und Blüten) sowie B) den separat aufgearbeiteten Blüten und Blättern (Detailansicht)	73
Abb. 4-5	RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung einer A) wässrigen DHA-Standardlösung, B) Fructose-Glucose-Lösung als simulierte Honigmatrix, C) Rapshonig-Probe, D) Manuka-Honig-Probe Peakzuordnung von (1) OPD und der jeweiligen Chinoxaline ausgehend von (2) DHA, (3) Glucoson, (4) 3-DG, (5) GO und (6) MGO	77
Abb. 4-6	Postulierter Reaktionsmechanismus von OPD (I) und DHA (II) zu 2-Hydroxymethylchinoxalin (VII, <i>Atrott et al., 2012</i>).....	77
Abb. 4-7	Kinetische Untersuchungen der DHA-Umsetzung mit OPD (pH 4,0 und 37 °C) anhand der Chinoxalin-Peakfläche im Vergleich zu MGO (pH 6,5 und Raumtemperatur)	78
Abb. 4-8	Konzentrationen von DHA und MGO in 12 frischen und 19 kommerziellen Manuka-Honigen	80
Abb. 4-9	Zusammenhang zwischen DHA und MGO in 19 Manuka-Handelsproben und 6 frischen Manuka-Honigen vor und nach Lagerung	81
Abb. 4-10	Verhältnis von DHA zu MGO in 19 Manuka-Handelsproben und 6 frischen Manuka-Honigen	81
Abb. 4-11	Wassergehalt in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen.....	88

Abb. 4-12	pH-Wert in Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Nektar- und Honigtau-Honigen	89
Abb. 4-13	Fructose- und Glucosegehalt in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen.....	90
Abb. 4-14	Proteingehalt in Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Nektar- und Honigtau-Honigen.....	91
Abb. 4-15	Gehalt an freien Aminosäuren in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen.....	92
Abb. 4-16	Gesamtphenolgehalt nach Folin in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen.....	94
Abb. 4-17	Honigfarbe von Manuka-Honigen und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen	95
Abb. 4-18	Reaktionsmechanismus zur Umsetzung von DHA zu MGO	99
Abb. 4-19	MGO-Konzentrationen in Raps- und Waldhonig nach DHA-Dotierung und Lagerung	100
Abb. 4-20	MGO-Konzentration in Nektar- und Honigtau-Honigen sowie Kunsthonig nach DHA-Zusatz und Lagerung	101
Abb. 4-21	Mechanismus zur Reaktion von DHA mit Glycin (R-NH ₂) zum MGO nach <i>Shipar (2006a, b)</i>	105
Abb. 4-22	HMF-Bildung in frischen Manuka-Honigen nach Lagerung bei 37°C.....	108
Abb. 4-23	Bildung an HMF in Raps- und Waldhonig nach DHA-Dotierung und Lagerung	110
Abb. 4-24	HMF-Gehalt in ausgewählten Nektar- und Honigtau-Honigen mit und ohne DHA-Zusatz.....	111
Abb. 4-25	HMF- und 3-DG-Gehalte in Kunsthonig nach Dotierung mit einzelnen Aminosäuren (20 mg/100g) und Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen (t = 1)	112
Abb. 4-26	Ausgewählte Folgeprodukte von 3-DG	113
Abb. 4-27	Übersichtsschema zu postulierten Einfluss- und Reaktionswegen der HMF-Bildung in Honig	114
Abb. 4-28	Diastasezahl und Invertase-Aktivität (U/kg) in Manuka-Honige	116
Abb. 4-29	Diastase-Aktivität in italienischen Honigen (<i>Oddo et al., 1990</i>) und Manuka-Honig	117
Abb. 4-30	Zusammenhang zwischen MGO-Gehalt und Diastasezahl bzw. Invertase-Aktivität in Manuka-Honig (n = 10)	118
Abb. 4-31	Diastasezahl in frischem Manuka-Honig aus 6 Regionen Neuseelands vor und nach Lagerung	119
Abb. 4-32	Zusammenhang zwischen der Abnahme der Diastasezahl in frischen Manuka-Honigen (n = 6) durch Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen (t = 1) und dem DHA-Gehalt im Honig (t = 0)	119
Abb. 4-33	Diastasezahl und Invertase-Aktivität in Waldhonig unter DHA-Zusatz und Lagerung	120
Abb. 4-34	Optischer Vergleich einer Manuka-Honig-Probe vor (A) und nach Erhitzung bei 60 °C (B), 80 °C (C) und 100 °C (D) für 15 min.....	124
Abb. 4-35	Stabilität von MGO in Wasser und Müller-Hinton-Bouillon (mit und ohne Honigzusatz)	129

Abb. 4-36	Mikrodilutionstest von MGO gegen <i>E. coli</i> , MGO-Konzentrationsreihe (512 bis 0,25 mg/l) in A) MH-Bouillon, B) MH-Bouillon mit Zusatz von 25,0 % Kunsthonig, C) MH-Bouillon mit Zusatz von 12,5 % MGO-armen Manuka-Honig	132
Abb. 4-37	Prüfung auf Mikroorganismen von Manuka-Honig Nr. 9 auf Galle-Chrysoidin-Glycerin-Agar (grün) und Sabouraud-Agar (weiß) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO ₂	137
Abb. 4-38	Prüfung auf Mikroorganismen von A) Manuka-Honig Nr. 9 auf Blutagar, B) Manuka-Honig Nr. 5 auf Blutagar und C) Manuka-Honig Nr. 4 auf Kochblutagar nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO ₂	137
Abb. 4-39	Zusammenhang zwischen antibakterieller Aktivität und MGO-Gehalt in Manuka-Honig (<i>Atrott & Henle, 2009</i>).....	140
Abb. 4-40	Antioxidative Kapazität von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen.....	143
Abb. 4-41	Zusammenhang zwischen antioxidativer Kapazität und in Honig	147
Abb. 4-42	A) HT-29-Zellen in DMEM-Medium, Lichtmikroskop 20fach vergrößert, B) Koloniebildungstest unter optimierten Bedingungen (Negativkontrolle).....	151
Abb. 4-43	Stabilität von MGO-Standard und MGO in Manuka-Honig in Nährmedium und PBS-Puffer	153
Abb. 4-44	Koloniebildungsfähigkeit (rel. PE) von Manuka, Nektar- und Honigtau-Honigen...	156
Abb. 4-45	Übersicht der Koloniebildungsfähigkeit (rel. PE) von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honige	157
Abb. 4-46	Vergleich der bestimmten rel. PE von Manuka-Honig mit dem MGO-Gehalt	158
Abb. 4-47	Vergleich der rel. PE von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen mit dem Gehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen	159
Abb. 4-48	Vergleich der rel. PE von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen mit dem Gesamtphenolgehalt	159
Abb. 4-49	RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung einer erhitzten Glucose-Lösung zur Synthese von 3,4-DGE nach <i>Frischmann et al. (2008)</i>	160
Abb. 4-50	RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung von Wald-, Manuka- und Raps-Honig.....	161

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Neuseeländische Sortenhonige nach <i>Stephens (2006)</i>	4
Tab. 2-2	Durchschnittliche Zusammensetzung von Honig nach <i>Belitz (2001)</i>	8
Tab. 2-3	Ausgewählte in neuseeländischem Honig nachgewiesene Di- und Trisaccharide (<i>Astwood et al., 1998; Weston & Brocklebank, 1999</i>).....	10
Tab. 2-4	Enzyme in Honig	11
Tab. 2-5	MGO-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln.....	21
Tab. 2-6	HMF-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln	27
Tab. 2-7	Tests zur Messung der antioxidativen Kapazität	32
Tab. 2-8	Testverfahren zur Beurteilung einer zytotoxischen Wirkung	34
Tab. 3-1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	37
Tab. 3-2	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	38
Tab. 3-3	Verwendete Geräte	39
Tab. 3-4	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte für Zellkulturarbeiten.....	40
Tab. 3-5	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte für mikrobiologische Arbeiten	42
Tab. 3-6	Manuka-Honige	43
Tab. 3-7	Vergleichshonige anderer botanischer Herkunft.....	44
Tab. 3-8	Manuka-Pflanzen aus verschiedenen Gegenden Neuseelands.....	45
Tab. 3-9	Bienenprodukte neben Honig	46
Tab. 3-10	Analysenparameter für RP-HPLC zur Untersuchung der Chinoxaline	47
Tab. 3-11	Kalibrierung für MGO und 3-DG	48
Tab. 3-12	Pipettierschema zur Quantifizierung von DHA in Honig.....	49
Tab. 3-13	Analysenparameter für RP-HPLC zur Untersuchung von HMF	50
Tab. 3-14	Analysenparameter zur Isolierung von Chinoxalinen mittels semipräparative HPLC	51
Tab. 3-15	Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung von Glucose und Fructose in Honig	53
Tab. 3-16	Geräteparameter Ionenaustausch-Chromatographie zur Aminosäureanalyse	55
Tab. 3-17	Gradientenprogramm Trennung mittels Lithiumsystem.....	55
Tab. 3-18	Verwendete Bakterienkulturen im Mikrodilutionstest.....	59
Tab. 3-19	Schema zur Erstellung der geometrischen Verdünnungsreihe für den Mikrodilutionstest.....	60
Tab. 3-20	Agarplatten zur Prüfung auf Mikroorganismen in Honig.....	62
Tab. 3-21	Aufarbeitung der Bienenprodukte neben Honig.....	64
Tab. 4-1	Nachweis von MGO in Manuka-Pflanzen aus 18 verschiedenen Gebieten Neuseelands	74
Tab. 4-2	Gegenüberstellung der MGO-Gehalte in frischem Manuka-Honig und dem Nachweis von MGO in Manuka-Pflanzen von 16 Gebieten Neuseelands	75
Tab. 4-3	Validierungsparameter der optimierten DHA-Methode	79

Tab. 4-4	DHA- und MGO-Gehalte sowie DHA-MGO-Verhältnis ausgewählter Jellybush-Honige	82
Tab. 4-5	Summe und Quotient aus Fructose und Glucose von Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen	90
Tab. 4-6	Gehalte einzelner freier Aminosäuren in Manuka- und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen	93
Tab. 4-7	Übersicht Analysenparameter für Manuka-Honig (Handelsproben).....	96
Tab. 4-8	Zusammenhang einzelner analytischer Honigparameter zum MGO-Gehalt in Manuka-Honig	97
Tab. 4-9	Korrelationsanalyse der Honigfarbe zu ausgewählten Faktoren in 14 Honigproben ..	98
Tab. 4-10	MGO- und DHA-Gehalt sowie DHA-Abnahme und DHA-MGO-Verhältnis in ausgewählten Honigmatrizes nach Lagerung und DHA-Zusatz.....	101
Tab. 4-11	Analysenparameter für Bildungsstudien in 14 Nicht-Manuka-Honigen	102
Tab. 4-12	Korrelationsanalyse der ausgewählten Faktoren in 14 Honigproben	103
Tab. 4-13	Multivariate Regressionsanalyse der MGO-Bildung zu ausgewählten Parametern ..	104
Tab. 4-14	Konzentrationen an 3-DG und HMF in Handelshonigen	108
Tab. 4-15	MGO-Gehalt in ausgewählten Honigen nach Erhitzung bei 70 °C	123
Tab. 4-16	Gehalt an HMF und 3-DG in ausgewählten Honigen nach Erhitzung bei 70 °C	125
Tab. 4-17	MHK-Werte für ausgewählte Antibiotika und MGO gegen Standard-Referenzbakterienstämme (<i>E. coli</i> , <i>St. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>)	131
Tab. 4-18	MHK-Werte für ausgewählte Antibiotika und MGO gegen vier multiresistente Bakterien (<i>E. coli</i> ESBL, <i>St aureus</i> MRSA „Barnimer“, <i>St. aureus</i> MRSA „USA 300“, <i>P. aeruginosa</i> res.).....	131
Tab. 4-19	Wachstumsversuche ausgewählter Honige auf verschiedenen Nährmedien, Inkubation für 24 h (bzw. 48 h für anaerobe Platten) bei 37 °C	136
Tab. 4-20	Wachstum (+) bzw. Hemmung (-) von <i>E. coli</i> bzw. <i>St. aureus</i> durch fünf Manuka-Honige mit unterschiedlichem MGO-Gehalt im Mikrodilutionstest	139
Tab. 4-21	Antioxidative Kapazität von Honig	144
Tab. 4-22	Antioxidative Kapazität von Propolis, Gelée Royal und Pollen.....	145
Tab. 4-23	Antioxidative Kapazität ausgewählter Lebensmittel	146
Tab. 4-24	UMF-Wert und antioxidative Kapazität für ausgewählte Manuka-Honige.....	148
Tab. 4-25	Koloniebildungsfähigkeit von MGO (rel. PE) als Standardlösung und in Kunsthonig (KH).....	154
Tab. 4-26	Koloniebildungsfähigkeit von 3-DG und Bisphenol A (rel. PE).....	155

Abkürzungsverzeichnis

3,4-DGE	3,4-Didesoxyglucoson-3-en
3-DG	3-Desoxyglucoson
3-DG-H1	Imidazolon A
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-ammoniumsalz
AGE	Advanced glycation endproduct
äqu. Phenol	Äquivalente Phenolkonzentration
ATCC	American Type Culture Collection
bidest.	Bidestilliert
BPA	Bisphenol A
CAP	Colistin Aztreonam Blut (Agar)
CEL	N ^ε -Carboxyethyllysin
CML	N ^ε -Carboxymethyllysin
dest.	Destilliert
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Diastasezahl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ESBL</i>	Extended-spectrum beta-lactamase producing <i>Escherichia coli</i>
ESI-TOF-MS	Electrospray-ionisation time-of-flight mass spectrometry
FKS	Fötale Kälberserum
G6P	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GE	Gallussäure-Äquivalente
GO	Glyoxal
GSH	Glutathion
HK	Hexokinase
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High pressure liquid chromatography
IA	Invertase-Aktivität
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz mit 50%iger Inhibierung des Zellwachstums
kbE	koloniebildende Einheiten
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry

MG-H1	N ^δ -(5-Methyl-4-oxo-5-hydroimidazol-2-yl)-ornithin
MGO	Methylglyoxal
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOLD	2-Ammonio-6-(1-(5-ammonio-6-oxido-6-oxohexyl)-5-methylimidazolium-3-yl)hexanoat
<i>MRSA</i>	Methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
n. d.	nicht detektierbar
NMR	Nuclear magnetic resonance
OPD	o-Phenylendiamin
p. A.	zur Analyse
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PGI	Phosphoglucose-Isomerase
pNPG	p-Nitrophenyl- α -D-glycopyranosid
rel. PE	relative plating efficiency
RP	Reversed phase
<i>S.pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>St. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TE	Trolox-Äquivalente
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
ULF	Unique leptospermum factor
UMF	Unique manuka factor
UV	Ultraviolett
ΔE_{Farbe}	Extinktionsdifferenz als Maß für die Honigfarbe

1 Einleitung und Zielstellung

Honig hat seit jeher eine große Bedeutung für den Menschen. Er diente bereits in der Steinzeit als Nahrungsmittel, wie aus Höhlenmalereien ersichtlich ist. Die älteste bekannte Zeichnung, welche eine Frau beim Honigsammeln zeigt, befindet sich in einer Höhle in La Aranas in Spanien und kann auf etwa 7000 v.Chr. datiert werden. Honig war zudem das erste Süßungsmittel in der menschlichen Ernährung und wurde als solches sehr geschätzt. Daneben spielte auch immer die Verwendung als Heilmittel eine entscheidende Rolle. In alten Kulturen wurden dem Honig sogar magisch-religiöse bis göttliche Eigenschaften zugesprochen. Obwohl die Bedeutung als Süßungsmittel im Laufe des 19. Jh. durch den vermehrten Anbau von Zuckerrüben geringer wurde, wird dem Honig immer noch ein besonderer Charakter nachgesagt.

In den letzten Jahren erlangte neuseeländischer Manuka-Honig eine zunehmende Bekanntheit und Bedeutung. Diese sind auf die antibakteriellen Eigenschaften zurückzuführen, welche in einer Reihe von Studien nachgewiesen wurden. Insbesondere ein medizinischer Einsatz bei der Behandlung von Wunden erscheint vielversprechend. Die Ursache für die hohen antibakteriellen Eigenschaften von Manuka-Honig kann auf eine Besonderheit in der Zusammensetzung zurückgeführt werden. So wurden von *Mavric et al. (2008)* bis zu 100-fach höhere Gehalte an Methylglyoxal (MGO) gegenüber anderen Honigsorten ermittelt, welche für die inhibierende Wirkung auf eine Vielzahl an Bakterien verantwortlich sind.

Die Ursache für diese ungewöhnlich hohen Konzentrationen an MGO ist bislang nicht eindeutig geklärt und wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher betrachtet. Parallel zu den hierbei durchgeführten Untersuchungen gelang *Adams et al. (2009)* der Nachweis von Dihydroxyaceton (DHA) in Manuka-Nektar und frischem Honig als direkte Vorstufe für die anschließende MGO-Bildung in Manuka-Honig. Aufbauend auf der Analyse verschiedener Honigproben in Hinblick auf die Konzentrationen von DHA und MGO, sollte zudem die Bildung von MGO näher charakterisiert werden. Daraus resultierte die Frage, inwieweit die Umsetzung von DHA zu MGO durch weitere Honigparameter, wie z.B. freie Aminosäuren oder phenolische Verbindungen, beeinflusst werden kann.

Ergänzend zu den spezifischen Komponenten MGO und DHA sollte daher eine Bestimmung von weiteren Inhaltsstoffen und Parametern von Manuka-Honig vorgenommen werden. Diese Analysen hatten zum Ziel, eine umfassende chemische Charakterisierung dieser Honigsorte zu ermöglichen und etwaige Auffälligkeiten in der Zusammensetzung von Manuka-Honig aufzuzeigen. Darüber hinaus wurden zusätzlich die Konzentration an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und die Diastasezahl (DZ) als allgemeine, rechtlich geregelte Qualitätsparameter von Honig in die Untersuchungen einbezogen. Es sollte geprüft

werden, ob eine uneingeschränkte Anwendung dieser beiden Faktoren zur Beurteilung von Lagereinflüssen in Manuka-Honig möglich ist oder eventuell von einer spezifischen Beeinträchtigung der Aussagekraft durch die charakteristische Zusammensetzung ausgegangen werden muss. In diesem Zusammenhang sollten auch die Folgen einer thermischen Behandlung von Honig aufgezeigt und daraus resultierende Konsequenzen in der Diskussion berücksichtigt werden.

Honig wird neben der antibakteriellen Wirkung mit weiteren biofunktionellen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Darunter fallen z.B. ein antioxidatives und entzündungshemmendes Potential. Weiterhin gilt Honig als „bewährtes Hausmittel“ zur Anwendung bei Erkältungen oder bei Entzündungen sowie zur „allgemeinen Stärkung“. Für Manuka-Honig kann eine potentielle Biofunktionalität unter anderem auf die außergewöhnliche Präsenz von MGO zurückgeführt werden. Diese 1,2-Dicarbonylverbindung wird in der Literatur allerdings auch mit einer zytotoxischen Wirkung in Verbindung gebracht. Es resultierte hieraus die Frage, welche Relevanz sich durch diesen Aspekt für Manuka-Honige mit hohen MGO-Konzentrationen ergibt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte daher eine Bewertung der antimikrobiellen und antioxidativen sowie der potentiell zytotoxischen Eigenschaften von Manuka-Honig unter Anwendung hierfür etablierter Testverfahren. Die so gewonnenen Daten sollen eine biofunktionelle Charakterisierung dieses Honigs im Vergleich zu anderen Sorten ermöglichen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Honig

2.1.1 Definition und allgemeine Aspekte

Laut Honig-Verordnung (*Honig-V, 2004*) ist Honig definiert als „natursüßer Stoff, der von Honigbienen erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Sekrete lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindende Exkrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen Stoffen umwandeln, einlagern und reifen lassen“. Der Begriff Honig stammt dabei aus dem Indogermanischen und bedeutet soviel wie „goldfarben“ (*Eisenbrand & Schreier, 2006*).

Honig wird seit jeher als Nahrungsmittel geschätzt, wobei heutzutage die Verwendung als Brotaufstrich oder Alternative zu handelsüblichem Haushaltszucker vorherrscht. Aufgrund der Nutzung von Zuckerrüben und -rohr zur Herstellung von Saccharose als allgemeines Süßungsmittel ist die Bedeutung von Honig in der verarbeitenden Nahrungsmittelindustrie eher gering.

Der Verbrauch an Honig betrug im Jahr 2010 in Deutschland etwa 92.000 t, wobei etwa 23.000 t selbst produziert wurden (*BMELV, 2011*). Daraus ergab sich ein Pro-Kopf-Verbrauch von etwa 1 kg Honig. Der überwiegende Teil des hierzulande konsumierten Honigs wird aus insgesamt 35 Ländern importiert, wobei Argentinien seit Jahren Hauptlieferant ist. Der Anteil importierter neuseeländischer Honige beträgt mit 742 t unter 1% (*Waren-Verein Hamburger Börse, 2010*). Im Vergleich dazu werden in Neuseeland etwa 8.000 t Honig pro Jahr produziert (*Stephens, 2006*). Neben einer Vielzahl an Mischhonigen stammen die hergestellten Sortenhonige im Wesentlichen von neun Pflanzenfamilien ab, welche in Tab. 2-1 aufgeführt sind. Die Manuka-Pflanze stellt dabei aufgrund der weiten Verbreitung und der guten Nektarproduktion eine entscheidende Quelle dar. Jährlich werden etwa 1.500 bis 2.000 t Manuka-Honig (Vgl. Kapitel 2.1.3) in Neuseeland hergestellt (*Stephens, 2006*).

Tab. 2-1 Neuseeländische Sortenhonige nach *Stephens (2006)*

Pflanzenfamilie	Honig bzw. pflanzlicher Ursprung	
Myrtaceae	Manuka, Kanuka, Rata, Pohutakawa	} Einheimische Arten
Protaceae	Rewarewa	
Cunoniaceae	Kamaha	
Escalloniaceae	Tawari	
Nothofagaceae	Wald (Honigtau)	
Fabaceae	Klee	} Eingeführte Arten
Asteraceae	Nickende Distel	
Lamiaceae	Thymian	
Boraginaceae	Gewöhnlicher Natternkopf, Borretsch	

2.1.2 Gewinnung und Klassifizierung von Honig

Die Grundlage von Honig bilden Nektar oder Honigtau, welche von der Biene zusammen mit Blütenpollen von den Pflanzen gesammelt und in der Honigblase zum Bienenstock transportiert wird. Dabei stellt der Siebröhrensaft der Pflanzen, welcher zu etwa 20% aus Zucker besteht, die Grundlage für beide Rohstoffe dar (*Deifel, 1989*). Im Detail wird Nektar über die Nektarien, ein pflanzliches Drüsengewebe, abgegeben und dient zur Anlockung von Insekten an die Blüten. Die Absonderung kann von Pflanzenart, Tageszeit und klimatischen Verhältnissen abhängig sein. Im Gegenzug wird Honigtau durch an Pflanzen saugende Insekten, den Lachniden, hergestellt, indem diese den Pflanzensaft von Bäumen aufnehmen und wieder auf die Nadeln abgeben (*Deifel, 1989*).

Die Honigbereitung beginnt bereits in der Biene und setzt sich im Stock fort. Im Wesentlichen kommt es im Laufe der verschiedenen Stufen zu einer Eindickung der gesammelten Flüssigkeit, einer Zunahme des Invertzuckers durch zugegebene Enzyme sowie zur Aufnahme bzw. Bildung von Säuren, Vitaminen, Eiweiß-, Mineral- und Aromastoffen. Bei entsprechend niedrigem Wassergehalt werden die Honigzellen mit Wachs verschlossen und der Honig erfährt eine Reifung, in deren Verlauf weitere Umwandlungen, insbesondere die Inversion des Zuckers, stattfinden (*Belitz, 2001*).

Die Gewinnung des Honigs aus dem Bienenstock kann durch unterschiedliche Vorgehensweisen erfolgen. Eine allgemein gängige Methode, welche auch die Hauptmenge an Honig liefert, stellt das Schleudern der Honigwaben dar. Dabei wird der Honig nach Entdeckung der Waben mittels geeigneter Schleudermaschine aus diesen heraus zentrifugiert (*Oberrisser, 2001*). Während der Verarbeitung darf keine Veränderung des Honigs, z.B. durch Zusatz oder Entzug von Stoffen, oder eine Erhitzung erfolgen. (*Honig-V, 2004*).

Eine gängige Klassifizierung stellt die Unterscheidung nach der pflanzlichen Herkunft in Nektar- und Honigtau-Honige sowie im Einzelnen nach der Tracht in Sorten- und Mischhonige dar. Dabei sind Nektar-Honige oftmals süß und aromatisch, haben einen für die jeweilige Tracht typischen Geschmack und können Farben von nahezu weiß oder hellgelb bis dunkelgelb und bräunlich annehmen. Die in frischem Zustand meist zähflüssigen Honige können im Laufe der Lagerung zunehmend kristallisieren. Typische Vertreter sind hierbei z.B. Raps-, Klee- oder Sonnenblumenhonig als reine Sorte bzw. Blütenhonig als Mischung verschiedener Trachten. Honigtau-Honige weisen im Gegensatz dazu meist eine dunklere Farbe auf, sind oftmals etwas weniger süß und mitunter von nahezu harzigem, gewürzartigem Aroma (Belitz, 2001). Als Beispiele können hierbei Tannen- oder Fichtenhonig genannt werden. Stammt Honigtau-Honig von mehreren Pflanzenquellen, wird im Allgemeinen die Bezeichnung Waldhonig verwendet. Darüber hinaus kann eine Einteilung zudem nach der Gewinnungsart, z.B. in Schleuder-, Press- oder Scheibenhonig, sowie nach dem Verwendungszweck, z.B. in Speise- und Backhonig, erfolgen (Belitz, 2001; Honig-V, 2004).

2.1.3 Manuka-Honig

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bildet Manuka-Honig den Schwerpunkt. Dieser Honig stammt vom Manukabaum bzw. –strauch *Leptospermum scoparium*, einer in Neuseeland heimischen, immergrünen Pflanze aus der Familie der Myrtengewächse (*Myrtaceae*). Einige Arten dieser Familie wie z.B. Manuka sind darüber hinaus unter dem Namen „Teebaum“ bekannt, seit die Blätter durch Kapitän James Cook auf einer Entdeckungsreise nach Neuseeland zur Bereitung eines Teegetränkes genutzt wurden (Carr, 1998).

Die Familie der *Myrtaceae* umfasst 133 Gattungen und über 3800 Arten, welche sich in erster Linie in Australien, Südostasien sowie Zentral- und Südamerika entwickelt haben. Dabei kann zusätzlich eine Unterteilung in die zwei Unterfamilien *Leptospermoideae*, zu der auch die *Leptospermum*-Arten gehören, und *Myrtoideae* erfolgen (Stephens, 2006).

Manuka wächst als Strauch oder kleiner Baum bis zu 4 m, meist jedoch um die 2 m hoch, besitzt eine feste Rinde und elliptische Blätter variabler Größe. Die Pflanzen blühen in der Zeit von Oktober bis Februar mit weißen oder rosafarbenen, meist vereinzelt Blüten von 8 bis 12 mm Durchmesser (Vgl. Abb. 2-1 A, Stephens, 2006). Der resultierende Manuka-Honig weist eine hell- bis dunkelbraune Färbung auf (Abb. 2-1 B). Sein Geschmack kann im Allgemeinen als weniger süß, aromatisch herb bis würzig beschrieben werden.

Bereits seit Jahrhunderten wird Manuka von den Maori, den neuseeländischen Ureinwohnern, aufgrund seiner heilenden Wirkung z.B. bei Verbrennungen, Entzündungen oder Verletzungen eingesetzt. Verschiedene Zubereitungen aus Pflanzensaft, Samen, Rinde, Harz, Blätter oder Blüten des Teebaums zur äußeren und inneren Behandlung sind be-

schrieben (Carr, 1998). Aus ökonomischer Sicht spielen heutzutage neben der Nutzung als Zierstrauch insbesondere Imkereiprodukte wie Honig oder Propolis sowie das Manuka-Öl eine Rolle, welche durch das Vorhandensein pharmakologisch aktiver Substanzen auch Gegenstand aktueller Forschungen sind (Stephens et al., 2005).



Abb. 2-1 A) Manuka-Pflanze mit Blüten, B) Manuka-Honig

Das traditionelle Wissen um die Nutzung als Heilmittel lässt sich mit wissenschaftlichen Studien belegen. So wurde für Manuka-Honig eine hohe antibakterielle Aktivität nachgewiesen (Vgl. Kapitel 2.4.1). Als Maß für das antibakterielle Potential wurde ein „unique manuka factor“ (UMF) zur Klassifizierung des Honigs hinsichtlich der Biofunktionalität eingeführt und dient seither als Kennzeichnung von „aktivem“ Manuka-Honig. Dabei besitzt ein Honig mit einem UMF 10+ mindestens die gleiche antibakterielle Wirkung wie eine 10%ige Phenollösung (Allen et al., 1991). Im Handel sind üblicherweise Auslobungen im Bereich von 5 bis 25 für den UMF aufzufinden.

Auch für das aus den Blättern und Samen hergestellte Manuka-Öl, bei dem es sich um ein relativ dickflüssiges, klares gelbes bis braunes Öl handelt, wurden antibakterielle Eigenschaften beschrieben. Beispielsweise dokumentierten Jeong et al. (2005) eine hemmende Wirkung auf Clostridien, wobei ein als Leptospermum benanntes Triketon und dessen Derivate als aktive Verbindungen identifiziert wurden. Bereits zuvor wurden entsprechende Effekte den in Manuka-Öl enthaltenen Triketonen zugeschrieben (Porter & Wilkins, 1998). Im Folgenden wurde die im Vergleich zu anderen „Teebaumölen“ starke Wirkung des Manuka-Öls mit einem Komplex der in Abb. 2-2 dargestellten Verbindungen Flaveson, Isoleptospermum und Leptospermum erklärt (Sojka, 2005). Eine topische Anwendung des Öls spielt bei Entzündungen der Haut oder Atemwege eine Rolle (Carr, 1998). Es scheint des Weiteren eine positive Beeinflussung der Mundschleimhäute vorzuliegen (Maddocks-Jennings et al., 2009).

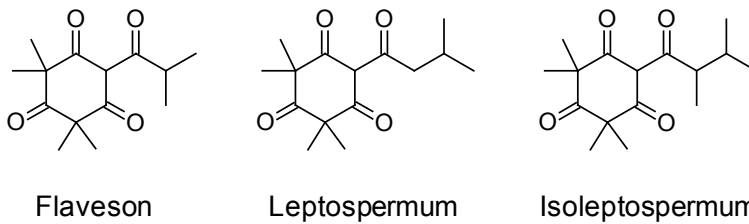


Abb. 2-2 Strukturformeln von Flaveson, Leptospermum und Isoleptospermum

Manuka wird im Allgemeinen zu den Nektarhonigen gezählt (*Weston & Brocklebank, 1999*). Allerdings wird auch ein Beitrag von Honigtau zu diesem Honig diskutiert (*Tan et al., 1988*). Dies steht in Verbindung mit einem Befall von Insekten wie *Eriococcus leptospermi* Maskell, welche die Bildung von charakteristischen Schwärzepilzen, sog. „sooty moulds“, nach sich ziehen. Diese wachsen auf Grundlage des gebildeten Honigtaus in Symbiose mit der Pflanze und verleihen Ästen und Blättern mitunter ein schwarzes Erscheinungsbild. (*Hughes, 1976; van Epenhuijsen et al., 2000*). Ein dominanter Endophyt ist beispielsweise eine *Phyllostica* Spezies, die wirtsspezifisch auf natürlich gewachsenen Manuka-Pflanzen isoliert wurde (*Johnston 1998*).

Hinsichtlich der melissopalynologischen Identifizierung neuseeländischer Honige wird der Pollenanteil in Manuka-Honig als überrepräsentiert beschrieben (*Moar, 1985*). So wurde Manuka-Pollen stets als dominanter Pollen identifiziert während andere nur als Minor-komponenten auftraten. Damit ein Honig als reiner Manuka-Sortenhonig klassifiziert wird, benötigt es einen Anteil von 70% Manuka-Pollen.

Neben Manuka-Honig gibt es auch noch andere Sorten, welche aus botanischer Sicht von der *Leptospermum*-Spezies abstammen. Insgesamt sind 86 *Leptospermum* Arten bekannt, wovon 81 in Australien beheimatet sind (*Sojka, 2005*). Einen bekannten weiteren Vertreter stellt der australische Jellybush-Honig (*Leptospermum polygalifolium*) dar, der ebenfalls antibakterielle Eigenschaften aufweist (*Irish et al., 2011*) und mitunter als „australischer Manuka“ bezeichnet wird. Eine analoge Kennzeichnung erfolgt hierbei mit dem „unique leptospermum factor“ (ULF). Zudem sind Honige der Pflanzengattungen *Leptospermum semibaccatum*, *Leptospermum liversidgei* und *Leptospermum leavigatum* benannt (*Windsor et al., 2012*). Im Gegensatz dazu weist Honig der Kanuka-Pflanze (*Kunzea ericoides*), welche oftmals zusammen mit Manuka auftritt und in äußeren Merkmalen eine große Ähnlichkeit besitzt, botanisch aber davon unterschieden werden muss, keine erhöhte antibakterielle Aktivität bzw. MGO-Konzentrationen auf (*Stephens et al., 2010*).

2.2 Zusammensetzung von Honig

Im Wesentlichen kann Honig als wässrige, konzentrierte Zuckerlösung angesehen werden, welche jedoch im Detail betrachtet eine Vielzahl weiterer Verbindungen enthält. Die Zusammensetzung gestaltet sich daher insbesondere in den Minorkomponenten komplex und kann bis zu 200 verschiedene Substanzen umfassen, deren Anteile in Abhängigkeit vom botanischen Ursprung, Klima- und Umwelteinflüssen sowie möglichen Einflüssen durch den Imker variieren können (*Anklam, 1998; Azeredo et al., 2003; White, 1978*). Eine allgemeine Übersicht nach den Angaben von *Belitz (2001)* ist in Tab. 2-2 dargestellt.

Honig ist ernährungsphysiologisch als Zucker zu betrachten. Den weiteren enthaltenen Substanzen wie Aminosäuren, Mineralstoffe oder Vitaminen kann aus quantitativer Sicht kein besonderer Beitrag zur Ernährung zugeschrieben werden (*Deifel, 1989*). Darüber hinaus werden Honig in der Natur- und Volksheilkunde verschiedene Wirkungen attestiert (Vgl. Kapitel 2-4).

Tab. 2-2 Durchschnittliche Zusammensetzung von Honig nach *Belitz (2001)*

Bestandteil	Mittelwert	Schwankungsbreite
Wasser	17,2%	13,4 – 22,9%
Fructose	38,2%	27,3 – 44,3%
Glucose	31,3%	22,0 – 40,8%
Saccharose	2,4%	1,7 – 3,0%
Maltose	7,3%	2,7 – 16,0%
Höhere Zucker	1,5%	0,1 – 8,5%
Stickstoff	0,06%	0,05 – 0,08%
Mineralstoffe	0,22%	0,20 – 0,24%
Sonstiges	3,1%	0,0 – 13,2%

2.2.1 Wasser

Während der Reifung im Bienenstock erfährt Honig eine stetige Abnahme des Wassergehalts. Ein reifer Honig weist üblicherweise Werte unterhalb 18,6% auf (*White 1978*). Aus rechtlicher Sicht ist ein Wassergehalt von 20,0% in Blüten- und Honigtau-Honigen sowie von 23,0% in Heidehonig zulässig (*Honig-V, 2004*). Der Wassergehalt von Honig, bzw. die Wasseraktivität als Maß für das verfügbare Wasser, steht dabei in einem direkten Zusammenhang mit dem Wachstum von Mikroorganismen (*Beckh et al., 2004*). Dabei können insbesondere osmotolerante Hefen natürlicherweise in Honig auftreten (*Beckh et al., 1999*), deren Wachstum durch erhöhtes Vorkommen von Wasser begünstigt wird.

Unterhalb eines Gehaltes von 17% Wasser wird dagegen davon ausgegangen, dass keine Anfälligkeit bzw. Gärfähigkeit vorliegt (*Belitz, 2001; Beckh et al., 2004*).

Die meisten Honige sind Newton'sche Flüssigkeiten. Für einige, wie Heide- oder Manuka-Honig, werden dagegen thixotrope Eigenschaften beschrieben, welche im Allgemeinen mit einem hohen Gehalt bestimmter Proteine in Verbindung gebracht werden (*Eisenbrand & Schreier, 2006*).

Für Manuka-Honig im Speziellen sind einige ausgewählte Daten in der Literatur verfügbar. *Vanhanen et al. (2011)* ermittelten mittels Refraktometer einen Wassergehalt von 17,8%. Andere neuseeländische Sortenhonige dieser Studie wiesen Werte von 16,4 bis 18,0% auf. Des Weiteren geben *Agbagwa et al. (2011)* einen Wassergehalt von 16,1% an.

2.2.2 Kohlenhydrate

Die vorherrschenden Kohlenhydrate und auch Hauptinhaltsstoffe von Honig sind Fructose zu etwa 38% und Glucose zu etwa 31% (*Doner, 1977, Abb. 2-3*). Weitere Monosaccharide sind im Allgemeinen nicht nachweisbar, wobei *Val et al. (1998)* das Vorhandensein geringer Mengen an Galactose (0,005 bis 0,015%) diskutieren. Glucose und Fructose stammen dabei wie auch die Saccharose direkt vom Nektar bzw. Honigtau, wobei das Verhältnis der Zucker zueinander von der Ursprungspflanze bestimmt wird (*Deifel, 1989*).

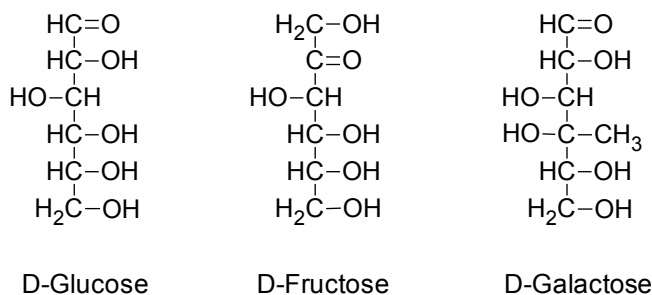


Abb. 2-3 Strukturformeln der Monosaccharide Glucose, Fructose und Galactose

Es wurden bereits eine Reihe Di- und Trisaccharide wie z.B. Saccharose, Maltose und Kojibiose, sowie Melizitose und Erlöse in Honigproben identifiziert (*White & Hoban, 1959, Deifel, 1989*). So konnten *Sanz et al. (2004)* beispielsweise in spanischen Honigen 25 verschiedene Zucker nachweisen, darunter neben Fructose und Glucose 16 Di- und sieben Trisaccharide. Hierbei handelt es sich vor allem um Kombinationen von Fructose- und Glucose-Einheiten (*Gómez Pérez et al., 1999*), wie auch aus Tab. 2-3 hervorgeht. Des Weiteren sind noch höhere Zucker wie Tetra-, Penta- und Hexasaccharide nachweisbar (*Morales et al., 2006*).

Die Zusammensetzung der Zuckerfraktion hängt vom Nektar und damit vom botanischen Ursprung ab (*Belitz, 2001, Deifel, 1989*). So ist es möglich, anhand der Gehalte von Mono- und Trisacchariden eine Unterscheidung zwischen Nektar- und Honigtau-Honig zu treffen, jedoch kann nicht ausschließlich aufgrund der Zusammenstellung der Kohlenhydrate auf die pflanzliche Herkunft des Honigs geschlossen werden (*Sanz et al., 2004*). Dennoch können die Zucker als zusätzliches Hilfsmittel bei der Identifizierung unbekannter kommerzieller Honige dienen (*Cotte et al., 2004*). Der Anteil an Glucose im Verhältnis zum Wassergehalt sowie die Anwesenheit der Melzitose bestimmen eine mögliche Kristallbildung in Honig. Dabei führt ein abnehmendes Verhältnis von Fructose zu Glucose zu einer zunehmenden Kristallbildung (*Deifel, 1989*).

Tab. 2-3 Ausgewählte in neuseeländischem Honig nachgewiesene Di- und Trisaccharide (*Astwood et al., 1998; Weston & Brocklebank, 1999*)

Saccharid	Systematischer Name in Kurzschreibweise
Saccharose	O-β-D-Frcf-(2→1)-α-D-Glcp
Maltose	O-α-D-Glcp-(1→4)- β-D-Glcp
Isomaltose	O-α-D-Glcp-(1→6)-D-Glcp
Kojibiose	2-O-α-D-Glcp-D-Glc
Turanose	α-D-Glcp-(1→3)-α-D-Frcp
Nigerose	O-α-D-Glcp-(1→3)-D-Glcp
Palatinose	O-α-D-Glcp-(1→6)-α-D-Frcf
Melzitiose	O-α-D-Glcp-(1→3)-O-β -D-Frcf-(2→1)-D-Glcp
Erlöse	O-β-D-Frcf-(1→2)-O-α -D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp
Panose	O-α-D-Glcp-(1→6)-O-α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

(Frc = Fructose, Glc = Glucose, Suffix f = Furanose, Suffix p = Pyranose)

Für Manuka-Honig geben *Agbagwa et al. (2011)* Werte von 36,0% Glucose, 37,3% Fructose und 1,6% Saccharose an. Des Weiteren untersuchten *Weston & Brocklebank, (1999)* die Zusammensetzung der Oligosaccharide in Manuka-Honig, wobei Maltose als wichtigste Verbindung beschrieben wird. Daneben konnten die Zucker Isomaltose, Kojibiose, Turanose und Nigerose nachgewiesen werden, während Saccharose, Erlöse und Panose nur Minorkomponenten darstellten. Innerhalb der Manuka-Honige ließ sich hinsichtlich der Oligosaccharide kein Unterschied zwischen „aktivem“ und „nicht-aktivem“ Honig feststellen (*Weston & Brocklebank, 1999*). Ergänzend hierzu identifizierten *Astwood et al. (1998)* in neuseeländischen Honigtau-Honigen 19 Oligosaccharide, darunter Maltose, Erlöse, Turanose, Nigerose und Palatinose, wobei der Anteil höherer Zucker mit im Mittel 17,1% über den durchschnittlichen Angaben von *Belitz (2001)* liegt (Vgl. Tab. 2-2).

2.2.3 Proteine

Proteine sind in Honig nur zu einem geringen Anteil enthalten. *Bogdanov (1981)* konnte mittlere Proteingehalte von 129 mg/100g Honig mit Schwankungen von etwa 30 mg/100g in Orangenblütenhonig bis zu über 400 mg/100g in Heidehonig bestimmen. Ähnliche Werte von 58 bis 786 mg/100g Honig wurden bereits von *White & Rudje (1978)* beschrieben. Im Allgemeinen weisen Honigtau-Honige einen etwas höheren Proteingehalt auf, wenngleich *Iglesias et al. (2004)* keine signifikanten Unterschiede zwischen Nektar- und Honigtau-Honigen feststellten.

In australischen Honigen konnten *Marshall & Williams (1987)* insgesamt 19 Proteine per Elektrophorese detektieren. Diese gelangen z.T. durch das pflanzliche Material, insbesondere durch den Pollen, in den Honig, sodass ein Einfluss der Tracht demnach auch bei den Proteinen von Bedeutung ist (*Baroni et al., 2002*). Der größere Anteil an Proteinen wird jedoch durch die Biene eingebracht (*Anklam 1998*). Dabei kann auch die Bienenart einen Einfluss auf das Spektrum nehmen, sichtbar durch Variationen in der Molmasse der zuge-mischten Proteine (*Won et al., 2008*). Den Großteil der Proteinfraction in Honig machen die Enzyme aus, welche in Tab. 2-4 aufgeführt sind. Darüber hinaus wurden Proteine der sog. „major royal jelly proteins“ (MRJP; *Won et al., 2008; Girolamo et al., 2012*) sowie das antibakterielle Peptid bee-defensin-1 (*Kwakman et al., 2010*) in Honig nachgewiesen.

Tab. 2-4 Enzyme in Honig

Enzym	Herkunft	Molekular- gewicht	pH-Optimum	Temperatur- Optimum
Diastase	Biene ¹⁾	25 kDa ¹⁾	4,6 – 5,4 ^{1,2)}	40 – 55 °C ^{1,2)}
Invertase	Biene ³⁾	57 kDa ³⁾	5,5 – 6,3 ⁴⁾	35 – 40 °C ³⁾
β-Glucosidase	Biene ⁵⁾	72 kDa ⁵⁾	5,0 ⁵⁾	
Glucoseoxidase	Biene ⁶⁾		6,1 ⁷⁾	40 °C ⁷⁾
Katalase	Pflanze ⁸⁾		7,0 – 8,5 ⁹⁾	
Saure Phosphatase	Biene und Pflanze ¹⁰⁾	45 kDa und 96 kDa ¹¹⁾	4,9 – 5,3 ¹²⁾	37 °C ¹²⁾

¹⁾ *Stadelmeier & Bergner (1986)*, ²⁾ *Babacan & Rand (2007)*, ³⁾ *Edelhäuser & Bergner (1987)*, ⁴⁾ *Nelson & Cohn (1924)*, ⁵⁾ *Pontoh & Low (2002)*, ⁶⁾ *Bergner & Diemair (1975)*, ⁷⁾ *Schepartz & Subers (1964)*, ⁸⁾ *Dustmann (1971)*, ⁹⁾ *Schepartz (1966)*, ¹⁰⁾ *Deifel (1989)*, ¹¹⁾ *Barboni et al. (1987)*, ¹²⁾ *Günther & Burckhart (1967)*

Innerhalb der Enzyme sind dabei häufig die Diastase und Invertase Gegenstand von Untersuchungen, da beide zur Beurteilung einer eventuellen thermischen Behandlung herangezogen werden können. Bei der Diastase handelt es sich um ein α -Amylase (E.C. 3.2.1.1), welche aus den Pharynxdrüsen der Bienen stammt (*Stadelmeier & Bergner, 1986*). Die Invertase, auch Saccharase, ist eine ebenfalls von der Biene stammende α -Glucosidase (E.C. 3.2.1.20, *Edelhäuser & Bergner, 1987*), wobei bis zu 18 Isoenzyme bekannt sind

(Belitz, 2001). Neben einer hydrolytischen Wirkung auf α -Glucoside weist die Invertase auch eine Transglucosylase-Aktivität auf (White & Maher, 1953), wodurch die Vielfalt der in Honig nachweisbaren Oligosaccharide erklärbar ist. Zudem wurde ein β -Glucosidase (E.C. 3.2.1.21) in Honig nachgewiesen (Low et al., 1986), welche jedoch innerhalb der verschiedenen Honigsorten nur geringen Schwankungen unterliegt (Sporns et al., 1992).

Die Glucoseoxidase (E.C. 1.1.3.4) ist für die Oxidation der Glucose unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Gluconsäure verantwortlich. Es liegt eine hohe Substratspezifität vor. Darüber hinaus nimmt die Aktivität mit Verdünnen des Honigs zu (White et al., 1963; Schepartz & Subers, 1964). Die Katalase (E.C. 1.11.1.6) hingegen vermag in Honig enthaltenes Wasserstoffperoxid abzubauen (Schepartz, 1966). Das Enzym gelangt über Nektar und Pollen in den Honig und unterliegt Aktivitätsschwankungen in Abhängigkeit von der Tracht (Dustmann, 1971). Dabei weisen Honigtau-Honige höhere Katalase-Aktivitäten auf (Ivanov, 1981).

Im Gegensatz zu den genannten Enzymen wird der sauren Phosphatase (Typ Phosphomonoesterase, E.C. 3.1.3.2), die erstmals durch Giri (1938) in Honig nachgewiesen wurde, nur eine geringe Bedeutung für Honig und dessen Reifung zugeschrieben (Deifel, 1989). Eine Abnahme der Aktivität mit steigendem pH-Wert des Honigs ist beschrieben (Alonso-Torre et al., 2006). Darüber hinaus finden sich in der Literatur noch Anzeichen auf weitere Enzyme. So bestimmt Ivanov neben Invertase und saurer Phosphatase die Aktivität einer Esterase (Ivanov, 1978) sowie von proteolytischen Enzymen (Ivanov, 1981). Zudem wird die Anwesenheit von Lysozym in Honig diskutiert (Weston et al., 2000).

2.2.4 Aminosäuren

Ein Einfluss des botanischen Ursprungs lässt sich auch an den in Honig enthaltenen Aminosäuren verzeichnen. Dabei ist das durch die Biene eingetragene Prolin mit durchschnittlich 50 bis 85% in allen Sorten vorherrschend (White, 1978). Innerhalb der anderen Aminosäuren, die weitgehend aus Nektar bzw. Honigtau stammen, sind jedoch Variationen in der Zusammensetzung festzustellen, welche mitunter eine Zuordnung der Honigsorte ermöglichen (Deifel, 1989). Beispielhaft gelang Hermosin et al. (2003) die Unterscheidung von Lavendel- und Eukalyptushonig zu anderen Sorten anhand acht Aminosäuren. Zudem kann das Aminosäurespektrum zum Nachweis einer eventuellen Verfälschung von Honig dienen (Cotte et al., 2004). Dabei wird ein zu geringer Prolingehalt als Kriterium für eine unvollständige Reifung oder Verfälschung des Honigs diskutiert (von der Ohe et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass in Zufütterungshonigen, d.h. Honigen auf Grundlage von Zucker anstelle Nektar oder Honigtau, ein gleich bleibendes Verhältnis von Prolin zu anderen Aminosäuren besteht. Schwankungen gehen mit Unterschieden in der von der Biene abgegebenen Sekretmenge der Pharynxdrüse einher (Bergner & Hahn, 1972).

Im Allgemeinen werden in der Literatur lediglich die freien Aminosäuren betrachtet. Das Verhältnis der freien zu den Proteinaminosäuren beträgt in Nektar-Honigen 1,4:1 und in Honigtau-Honigen 2:1 (*Bosi & Battaglini, 1978*). Bei vergleichbaren Werten im Gesamtgehalt, resultieren im Schnitt höhere Konzentrationen an freien Aminosäuren in Honigtau-Honigen, welche *Iglesias et al. (2004)* mit 161,1 mg/100g bestimmten. Dahingegen sind in Raps- und Akazienhonig nur geringe (34,2 bzw. 40,0 mg/100g), in Heidehonig hohe Aminosäuregehalte (171,8 mg/100g) ermittelt worden (*Cotte et al., 2004; Bernal et al., 2005*). Neben Prolin konnten insbesondere Phenylalanin, Glutamin- und Asparaginsäure als weitere in höheren Mengen vorkommende Aminosäuren nachgewiesen werden (*Bosi & Battaglini, 1978*).

Während der Lagerung von Honig kann eine signifikante Abnahme des Gesamtgehaltes an Aminosäuren verzeichnet werden, wobei insbesondere Arginin, Glutamin, Lysin und Ornithin einem Abbau unterliegen (*Iglesias et al., 2006; Bergner & Hahn, 1972*). Des Weiteren stellen Aminosäuren Vorstufen für einige im Honig enthaltene flüchtige Verbindungen dar (*Bousseta et al., 1996*).

2.2.5 Phenolische Verbindungen

Als Minorbestandteile sind in Honig auch eine Reihe Polyphenolverbindungen, insbesondere Flavonoide und Phenolcarbonsäuren, enthalten. Der Großteil der Substanzen stammt dabei von der Pflanzenquelle (*Kaškonienė & Venskutonis, 2010*) und wird durch den Propolis in den Honig eingebracht (*Ferreres et al., 1992*). Generell weist das in der Literatur beschriebene Spektrum an polyphenolischen Verbindungen in Honig eine große Vielfalt auf. *Gheldorf et al., 2002* konnten zeigen, dass Honige dabei meist ähnliche aber quantitativ unterschiedliche Profile aufweisen, wobei die Flavanone Pinobanksin und Pinacembrin sowie die Flavone Chrysin und Galangin als Hauptverbindungen nachweisbar waren. Weiterhin identifizierten *Baltrušaitytė et al. (2007)* p-Coumarinsäure, Kampherol, Chrysin und Apigenin, wobei die Konzentrationen in den einzelnen Sorten variierten. Die Unterschiede in Profil und Quantität der phenolischen Verbindungen in Abhängigkeit von der botanischen Herkunft ermöglicht eine Differenzierung der Sorten unter Anwendung von charakteristischen Markersubstanzen (*Trautvetter et al., 2009*).

Neben Unterschieden innerhalb der Verbindungen wird die botanisch begründete Variation auch anhand des Gesamtphenolgehaltes deutlich. So ermittelten *Bertoncelj et al. (2007)* Gesamtphenolgehalte als Gallussäureäquivalente (GE) von 44,8 mg GE/100g in Akazien- bis 241,4 mg GE/100g in Tannenhonig. Für Manuka-Honig bestimmten *Venugopal & Devarajan (2011)* einen Gesamtphenolgehalt nach Folin von 161 mg GE/100g sowie *Stephens et al. (2010)* Gehalte von 43,0 bis 270,6 mg GE/100g.

Bezüglich der Zusammensetzung konnten *Weston et al. (2000)* in Manuka-Honigen die Verbindungen Methylsyngat, Cinnamatsäure, Pinobanksin, Pinocembrin, Chrysin und Galangin identifizieren, dargestellt in Abb. 2-4. Neben diesen wurden auch Quercetin, Isorhamnetin und Luteolin (*Yao et al., 2003*), Phenylmilchsäure, o-Methoxyacetophenon sowie eine Gruppe methoxylierter Benzoesäuren wie z.B. 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure als vorkommende Verbindungen beschrieben (*Daher & Gülaçar, 2010; Stephens et al., 2010; Russel et al., 1990*). Gallussäure wurde als Hauptphenolsäure benannt (*Weston et al., 2000; Yao et al., 2003*). Als mögliche Markerverbindung wird dabei für Manuka-Honig insbesondere Methylsyngat diskutiert (*Weston et al., 2000*). Zudem bestimmten *Yao et al. (2003)* Abscisinsäure in vergleichsweise hohen Konzentrationen, was zur Differenzierung des Honigs von anderen Sorten beitragen könnte. Darüber hinaus werden auch Leptasin (Methylsyngat-4-O- β -Gentiobiose; *Kato et al., 2012*), Kojisäure und 2-Methoxybenzoesäure (*Oelschlaegel et al., 2012*) als potentielle Markerverbindungen benannt.

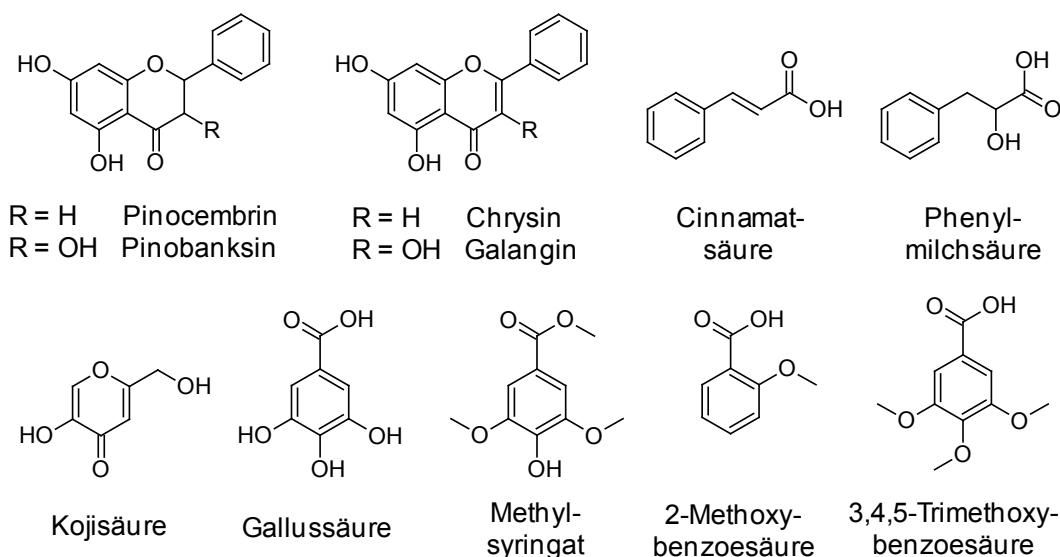


Abb. 2-4 Ausgewählte Flavonoide und Phenolcarbonsäuren in Manuka-Honig

2.2.6 Weitere Inhaltsstoffe

Honig ist ein schwach saures Lebensmittel und weist im Mittel einen pH-Wert von 3,9 auf, wobei allgemein Werte im Bereich von 3,4 bis 6,1 beschrieben werden (*Belitz, 2001*). Die durch die Glucoseoxidase gebildete Gluconsäure stellt die Hauptsäure in Honig dar. Es liegen jedoch noch weitere organische Säuren, wie z.B. Zitronen-, Äpfel-, Milch-, Essig-, Butter- oder Ameisensäure, in geringen Mengen vor (*Stinson et al., 1963*). Insgesamt machen organische Säuren einen Anteil von weniger als 0,5% in Honig aus, wobei bislang etwa 30 Verbindungen identifiziert wurden (*Mato et al., 2003*). Für den pH-Wert von Manuka-Honig sind in der Literatur lediglich Einzelwerte von 4,21 (*Vanhanen et al., 2011*)

und 3,57 (*Agbagwa et al., 2011*) angegeben. Andere neuseeländische Honige weisen pH-Werte im Bereich 3,57 bis 5,04 auf (*Vanhanen et al., 2011*).

Honigtau-Honige weisen im Allgemeinen einen höheren Anteil an Mineralstoffen als Blütenhonige auf, da der Honigtau als der zugrunde liegende Rohstoff im Gegensatz zu Nektar die Mineralstoffe des Siebröhrensaftes nahezu vollständig enthält (*Deifel, 1989; Madejczyk & Baralkiewicz, 2008*). Eine Einteilung in Nektar- und Honigtau-Honige kann anhand dieser Parameter vorgenommen werden (*Lachman et al., 2007*). Bei der Untersuchung neuseeländischer Sortenhonige konnten *Vanhanen et al. (2011)* in Manuka-Honig 16 Mineralstoffe nachweisen, wobei Kalium mit 1290 mg/kg bzw. 87% den mengenmäßig bedeutendsten Anteil bildet. Generell stellt Kalium mit im Mittel 73% das am reichlichsten vorkommende Mineral in Honig dar. Weiterhin wurden Calcium, Magnesium, Phosphor und Schwefel im Bereich 27 bis 74 mg/kg nachgewiesen. Im Vergleich mit neun weiteren neuseeländischen Honigen wurde Manuka-Honig als mineralstoffreich beschrieben, wobei die Unterschiede jedoch relativ gering sind (*Vanhanen et al., 2011*).

Lipide spielen in Honig aus quantitativer Sicht nur eine untergeordnete Rolle. Neben Fettsäuren und deren Estern dokumentierten *Kapoulas et al. (1977)* in griechischem Honig das Vorkommen von Kohlenwasserstoffen, Wachsen und Sterolen als weitere Lipide. *Tan et al. (1988)* bestimmten in Etherextrakten von Manuka-, Kanuka- und KleeHonig insgesamt 61 Verbindungen, darunter verschiedene Kohlenwasserstoffe und Carbonsäuren, wobei ein deutlich höherer Gehalt aromatischer Carbonsäuren aber ähnliche Mengen an Fettsäuren in Manuka- und Kanuka-Honig im Vergleich zu KleeHonig ermittelt wurden. Des Weiteren können charakteristische Hydroxyfettsäuren des Gelée Royals wie z.B. 10-Hydroxy-2-decensäure im Honig enthalten sein (*Isidorov et al., 2011*).

Die Vielzahl an flüchtigen Verbindungen, wobei bereits über 600 Substanzen in Proben unterschiedlichen Ursprungs nachgewiesen werden konnten (*Kaskoniene & Venskutonis, 2010*), trägt entscheidend zum Aromaprofil der einzelnen Sorten bei. Wesentlichen Anteil bilden Ester aliphatischer und aromatischer Säuren, Aldehyde, Ketone und Alkohole. Besondere Bedeutung besitzen die Substanzen β -Damascenon und Phenylacetaldehyd, die honigähnlichen Geruch und Geschmack aufweisen (*Belitz, 2001*). Generell kommt Phenyl-essigsäure und ihren Estern sowie der Zimtsäure und deren Derivaten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung aromarelevanter Verbindungen zu (*Deifel, 1989*). Aufgrund der Anwesenheit charakteristischer flüchtiger Substanzen weisen sortenreine Honige meist ein spezifisches Aromaprofil auf, welches zur Differenzierung herangezogen werden kann (*Kaškonienė & Venskutonis, 2010*). Neben dem markanten Einfluss des pflanzlichen Ursprungs können noch weitere Faktoren, wie z.B. Umwandlung von Substanzen durch die Biene, thermische Behandlung oder Verunreinigungen, zum Aroma des Honigs beitragen (*Bonvehí & Coll, 2003*).

Nur wenige Studien thematisieren relevante Verbindungen für das Aroma von Honigen aus Neuseeland. (*Langford et al., 2012*) geben eine Übersicht über die bisher in Manuka-Honig identifizierten Substanzen, darunter befinden sich verschiedene Alkohole, Aldehyde und Benzoate. Darüber hinaus bestimmten die Autoren im Vergleich zu anderen neuseeländischen Honigen höhere Gehalte z.B. an 2-Methylfuran, Nonanal, Acetophenon oder Dimethylsulfid, wobei eine mögliche Abgrenzung von Manuka-Honig mittels statistischer Auswertung diskutiert wird.

In Honig lassen sich stets Pollen in Abhängigkeit von der pflanzlichen Herkunft finden, die zur Identifizierung mittels Melissopalynologie herangezogen werden. Zur Deklaration eines Sortenhonigs bedarf es dabei 45% des Leitpollens mit Ausnahme von pollenarmen bzw. -reichen Honigen (*Deifel, 1989*). Wie bereits in Kapitel 2.1.2 erwähnt, wird das Pollenvorkommen in Manuka als überrepräsentiert beschrieben (*Moar, 1985*), wodurch ein Anteil von 70% zur Klassifizierung als reiner Manuka-Honig erforderlich ist. An Manuka-Honig lassen sich auch die Grenzen dieser traditionellen Methode aufzeigen, da die Pollen von Kanuka-Pollen aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit nicht unterschieden werden können (*Stephens et al., 2010*).

Als Naturprodukt kann Honig immer auch Mikroorganismen, insbesondere osmotolerante Hefen, als Sedimentbestandteile enthalten (*Beckh et al., 1999*). Zudem können Pilzsporen, Algen oder auch tierische Bestandteile vorliegen. Des Weiteren sind toxische Inhaltsstoffe bekannt, welche beispielsweise von Rhododendren-Arten oder der Tollkirsche stammen. Daneben können die Toxine Tutin und Hyenanchin aus dem Tutu-Strauch für eine toxische Wirkung neuseeländischer Honige verantwortlich sein (*Belitz, 2001*).

Honige weisen je nach botanischer Herkunft verschiedene Farbabstufungen von nahezu weiß bis dunkelbraun auf, jedoch ist wenig über deren Zustandekommen und die verantwortlichen Verbindungen bekannt. Im Allgemeinen wird die Honigfarbe auf phenolische Verbindungen und Bräunungsreaktionen zurückgeführt (*Belitz, 2001; Arena et al., 2011*). So zeigten *Beretta et al. (2005)* sowie *Blasa et al. (2006)* eine Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalt und Honigfarbe auf, während *Brudzynski & Kim (2011)* einen Anstieg der Farbintensität im Zuge der Lagerung von Honig dokumentierten, der mit der Bildung von Melanoidinen einhergeht. Zudem wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Farbe und dem Gehalt an HMF (*Boonchiangma et al. (2009)*) sowie an Dicarbonylverbindungen (*Marceau & Yaylayan, 2009*) benannt. Von *Lacerda et al. (2010)* wird die Farbe als Folge der physikochemischen Zusammensetzung von Honig und der enthaltenen Mineralstoffe diskutiert. Demnach können dunkle Honige durch einen vergleichsweise hohen pH-Wert und Calcium- bzw. Eisengehalt charakterisiert werden. Manuka-Honig wurde innerhalb neuseeländischer Sorten von *Vanhanen et al. (2011)* als dunkelster Honig eingestuft.

2.2.7 Qualitätsanforderungen an Honig

Honig unterliegt gewissen Qualitätsansprüchen. So existieren z.B. gesetzliche Regelungen für Zucker- und Wassergehalt, den Gehalt an wasserunlöslichen Stoffen und freien Säuren sowie die elektrische Leitfähigkeit (*Codex Standard 1981; Honig-V, 2004*). Darüber hinaus dürfen Honig keine Stoffe entzogen oder zugefügt werden. Die Naturbelassenheit dieses Lebensmittels stellt ein wichtiges Kriterium dar, was sich auch im Verbot einer Erhitzung oder unsachgemäßen Lagerung widerspiegelt. Als Kontrollparameter dienen der Gehalt an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) von Honig sowie dessen Enzymaktivität in Form von rechtlich festgelegten Grenzwerten (*Honig-V, 2004*).

HMF gilt generell als typischer Parameter zum Anzeigen von Lagereinflüssen in Lebensmitteln. Die Verbindung kann als Folgeprodukt von 3-Desoxyglucoson (3-DG) aus der Maillard-Reaktion oder Karamellisierung hervorgehen (Vgl. Kapitel 2.3.4). HMF-Gehalte über dem Grenzwert von 40 mg/kg bzw. 80 mg/kg für tropische Honige (*Honig-V, 2004*) werden als qualitätsmindernd angesehen und mit einer unsachgemäßen thermischen Behandlung oder nicht konformen Lagerung in Verbindung gebracht. Als weiterer Faktor wird üblicherweise die Aktivität ausgewählter Enzyme, insbesondere der Diastase (Vgl. Kapitel 2.2.3), herangezogen. Die Diastasezahl (DZ) stellt dabei das Maß für die Aktivität dieses Enzyms dar und gibt an, welche Menge Stärke in 100 g Honig innerhalb einer Stunde unter den Versuchsbedingungen abgebaut wird (*SLMB, 2004*). Honige müssen eine DZ von mind. 8 aufweisen, enzymschwache Honige eine DZ von 3 (*Honig-V, 2004*). Des Weiteren kann auch die Invertase zum Anzeigen einer Wärmeschädigung dienen. Sie ist lagerungs- und hitzeempfindlicher als die Diastase, sodass eine eventuelle Schädigung bereits nach kurzer Einwirkung hoher Temperaturen deutlich werden kann (*SLMB, 2004*). Allerdings existieren für die Invertase-Aktivität (IA) keine rechtlichen Normen. Für frisch gewonnenen Honig gibt der *Deutsche Imkerbund e.V. (2006)* eine IA von mind. 64,0 U/kg bzw. 45,0 U/kg für enzymschwachen Honig an.

Darüber hinaus spielt die Analyse der botanischen Quelle von Honig eine entscheidende Rolle. Klassischerweise wird hierzu die Melissopalynologie angewendet, wobei eine Zuordnung der Sorte auf Basis der nachzuweisenden Pollen erfolgt. Daneben werden weitere Substanzklassen als florale Marker diskutiert (*Kaškonienė & Venskutonis, 2010*). Geeignet scheinen dabei z.B. die Profile an Aminosäuren, phenolischen sowie flüchtigen Verbindungen. Damit einher geht die Bedeutung eines Nachweises von Honigverfälschung z.B. in Form eines Zufütterungshonigs oder durch den Verschnitt mit anderen Sorten. Eine weitere Problematik ergibt sich durch die mittlerweile zulässige Filtration von Honig, wodurch es auch zum Entfernen der Pollen kommt. Des Weiteren ist der Zusatz von gefiltertem zu ungefiltertem Honig nicht erlaubt. Dies ist z.B. über die elektrophoretische Betrachtung des Enzyms Saccharase ab 15% Zumischung nachweisbar (*Beckmann, 2008*).

In Honig können auch Rückstände vorhanden sein. Hierbei sind vor allem die Gruppen der Pflanzenschutzmittel nach dem Einsatz bei Pflanzen, die zum Nektarsammeln beitragen, Tierarzneimittel zur Behandlung von Bienenkrankheiten z.B. verursacht durch die Varroa-Milbe, sowie Bienenvertreibungsmittel, sog. „bee repellents“, von Bedeutung. Beispielhaft soll an der Stelle der problematische Nachweis von Phenylacetaldehyd erwähnt werden, welches als Bienenvertreibungsmittel eingesetzt und so als Rückstand interpretiert werden kann, aber auch ein natürlicher Bestandteil von Honig ist (*Beckmann, 2008*).

2.3 Carbonylverbindungen in Honig

Wie zuvor dargelegt, enthält Honig neben den dominierenden Monosacchariden Fructose und Glucose eine Vielzahl von Minorkomponenten (Vgl. Kapitel 2.2). Hierzu können auch Carbonylverbindungen wie der bereits angesprochene Lagerungsparameter HMF sowie das für die antibakterielle Aktivität des Manuka-Honigs verantwortliche MGO gezählt werden. Da diese Verbindungen, insbesondere MGO, der Schwerpunkt dieser Arbeit sind, soll gesondert darauf eingegangen werden.

Prinzipiell handelt es sich bei den in Honig vorkommenden Carbonylverbindungen um Zuckerabbauprodukte. Die relevanten Reaktionswege sind dabei die Karamellisierung und die Maillard-Reaktion (*Ledl & Schleicher, 1990; Kroh, 1994; Thornalley et al., 1999*). Der Ablauf dieser Reaktionen und die damit verbundene Bildung der Carbonylverbindungen werden zunächst allgemein und im Folgenden konkret an einzelnen Produkten behandelt.

2.3.1 Grundzüge der Zuckerabbauwege in Lebensmitteln

Unter Karamellisierung wird im Allgemeinen der thermische Abbau von Kohlenhydraten ohne die Beteiligung von Aminokomponenten verstanden. Durch die fehlende katalytische Wirkung der Amine werden hierbei für die Umsetzung höhere Temperaturen sowie ein saures oder basisches Milieu benötigt. Im Laufe einer Erhitzung über 130 °C führen die Reaktionen zu typischen Bräunungsprodukten und Aromastoffen.

Wie in Abb. 2-5 A am Beispiel der Glucose dargestellt, kommt es durch die de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung der reduzierenden Zucker zur Bildung der entsprechenden Endiole. Diese können durch Wasserabspaltung in die Desoxydicarbonylverbindungen 1-, 3- und 4-Desoxyglucoson (1-, 3- und 4-DG, Abb. 2-4) überführt werden. Im weiteren Verlauf sind eine Vielzahl an Folgereaktionen möglich. So kann es z.B. durch Wasserabspaltung und eine Zyklisierung zur Bildung von HMF kommen. Zudem können die Verbindungen einer Retroaldolspaltung unterliegen, was kurzkettenige Dicarbonylverbindungen und Aldehyde, wie z.B. Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO) und Glycerinaldehyd, entstehen lässt. Diese können aufgrund ihrer Reaktivität in der Folge zur Bildung zusätzlicher Reaktionsprodukte

beitragen. Carboxymethyllysin (CML) als bekannter Vertreter entsteht beispielsweise aus der Umsetzung von GO mit Lysin. Die Schritte Enolisierung, Wasserabspaltung und startende Fragmentierung können dabei als Anfangsphase der Karamellisierung betrachtet werden. Im Anschluss erfolgt die Bildung von häufig gelb bis braun gefärbten Produkten unter Ausbildung eines Karamellaromas.

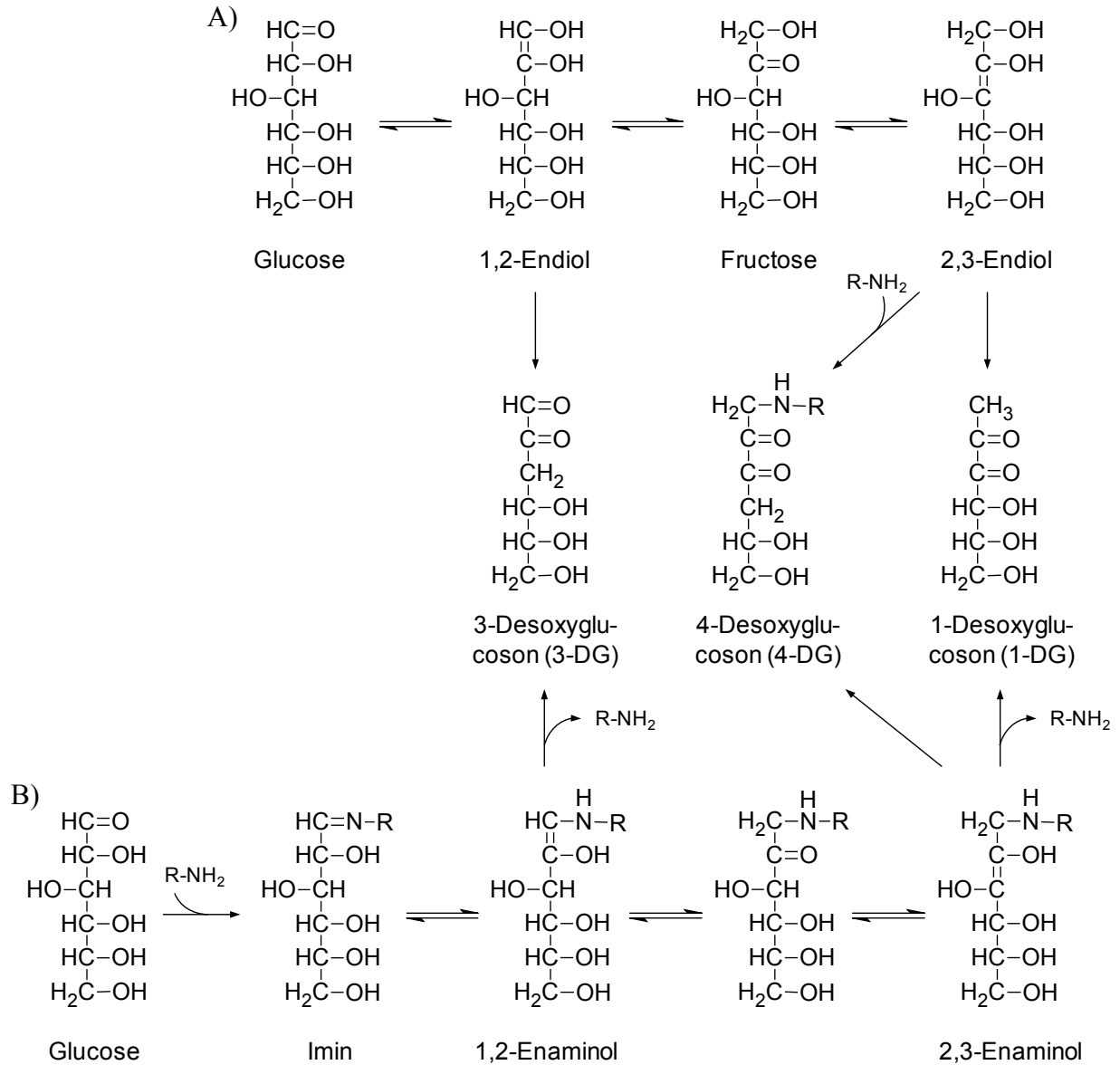


Abb. 2-5 A) Reaktionsschema zur Umsetzung von Glucose zu den Desoxyosonen 1-, 3 und 4-DG im Rahmen der Karamellisierung; B) Reaktionsschema der frühen und fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion, Bildung von Amadori-Produkten am Beispiel der 1-Amino-1-desoxyfructose mit nachfolgender Bildung der Desoxyosone 1-DG, 3-DG und 4-DG

Die Reaktion von reduzierenden Zuckern und anderer Carbonylverbindungen mit Aminen, erstmals beschrieben durch *Maillard (1912)*, kann sowohl in Lebensmitteln als auch *in vivo* ablaufen und ist nach ihrem Entdecker als Maillard-Reaktion benannt. Durch das Einhergehen mit einer charakteristischen Färbung der Lebensmittel wird sie auch als nicht-

enzymatische Bräunung bezeichnet. Es erfolgt im Allgemeinen eine Einteilung in die drei Stufen Frühphase, fortgeschrittene Phase und Endphase (*Hodge, 1953*).

In der Frühphase der Maillard-Reaktion erfolgt eine nukleophile Addition der freien Aminogruppe von Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen an den Carbonylkohlenstoff reduzierender Zucker. Durch Wasserabspaltung werden die Imine, auch Schiff'sche Basen genannt, gebildet. Nach anschließender Umlagerung dieser instabilen Verbindungen zu Enaminolen kommt es über Keto-Enol-Tautomerie im Fall von Aldosen zur Bildung von Amadori-Produkten, beispielhaft dargestellt in Abb. 2-5 B, bzw. Heyns-Produkten bei Ketosen. Die Verbindungen gelten dabei als erste stabile Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion. Ausgewählte Substanzen wie z.B. Fructoselysin aus der Reaktion von Glucose und Lysin eignen sich in der Folge als Indikator für ein Ablaufen der Reaktion.

Im Laufe der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion reagieren die gebildeten Amadori-Produkte unter Enolisierung zum 1,2- bzw. 2,3-Enaminol weiter zu den 1-, 3- und 4-Desoxydicarbonylverbindungen. Bei leicht saurem bis neutralem pH-Wert dominiert hierbei das 1,2-Enaminol, woraus sich im Folgenden 3-DG bildet. Bei höheren pH-Werten liegt das Gleichgewicht jedoch auf Seiten des 2,3-Enaminol, was in der Bildung von 1-DG unter Abspaltung bzw. 4-DG unter Erhalt der Aminofunktion resultiert. Dabei finden die wesentlichen Umsetzungen, die während der Karamellisierung zu beobachten sind, auch im Zuge der Maillard-Reaktion statt, wodurch ein vergleichbares Produktspektrum resultiert. So kann es beispielsweise wiederum durch Retroaldolreaktion zur Bildung von kurzkettigen Dicarbonylverbindungen kommen.

Die Endphase der Maillard-Reaktion ist geprägt von einer Reihe von Folge-, Abbau- und Polymerisierungsreaktionen, aus denen eine Vielzahl an Produkten resultiert, die auch als „advanced glycation endproducts“ (AGEs) bezeichnet werden. Neben den für das Aroma relevanten Aldehyden können dabei verschiedene stickstoffhaltige Heterozyklen und Proteinmodifikationen entstehen. Zudem kann es zur Bildung hochmolekularer, farbiger Verbindungen kommen, die unter dem Begriff Melanoidine zusammengefasst werden.

Abschließend beispielhaft erwähnt als bekanntes Folgeprodukt des 3-DG sei nochmals das HMF, entstehend nach Wasserabspaltung und Ringbildung (Vgl. Kapitel 2.3.4). Unter der Anwesenheit einer Aminofunktion kommt es hingegen zur Bildung von N-alkylierten Pyrrolderivaten. Aus der Reaktion von 3-DG mit Lysin entsteht auf diese Weise 6-(2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrolyl)-norleucin (Pyrralin, *Nakayama et al., 1980*).

2.3.2 1,2-Dicarbonylverbindungen

2.3.2.1 Vorkommen von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln

Besondere Aufmerksamkeit erhielten 1,2-Dicarbonylverbindungen durch ihre Anwesenheit in Peritonealdialyse-Flüssigkeiten, wobei eventuelle toxische Effekte *in vivo* als Folge diskutiert wurden (Wieslander *et al.*, 2005a). Doch auch im Lebensmittelbereich erlangten diese Substanzen ein zunehmendes Interesse. Hierfür ist ihre Rolle als Zwischenprodukt für die Aroma- und Farbbildung sowie als modifizierendes Agens für Proteine und deren Seitenketten ausschlaggebend (Ledl & Schleicher, 1990; Henle, 2005). Insbesondere für die daraus resultierenden AGEs werden sowohl positive als auch negative Konsequenzen diskutiert (Singh *et al.*, 2001; Henle 2007).

Im Verlauf der durchgeführten Studien wurden vor allem die kurzkettigen 1,2-Dicarbonylverbindungen MGO und GO in Lebensmitteln bestimmt (Hayashi *et al.*, 1985; Yamaguchi *et al.*, 1994; Da Silva Ferreira *et al.*, 2007; Degen *et al.*, 2012; Vgl. Tab. 2-5). Aus quantitativer Sicht ist aber 3DG dominant. Dabei wurden z.B. bis zu 410 mg/l in Fruchtsäften, 385 mg/kg in Keksen oder 2622 mg/l in Balsamico-Essig ermittelt (Degen *et al.*, 2012). Darüber hinaus sind noch Glucoson (Weigel *et al.*, 2004), 3-Deoxygalactoson und Galactoson als analoge Abbauprodukte der Galactose (Hellwig *et al.*, 2010) oder das aus Di- und Oligosacchariden hervorgehende 3-Deoxypentose (Hollnagel & Kroh, 2002) relevante Verbindungen.

Tab. 2-5 MGO-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln

Lebensmittel	MGO [mg/kg bzw. mg/l]	Literatur
Ahornsirup	2,5	Hayashi <i>et al.</i> (1985)
Essig	1,7 – 53	Degen <i>et al.</i> (2012)
Bier	0,08 0,09 – 0,24	Hayashi <i>et al.</i> (1985) Yamaguchi <i>et al.</i> (1994)
Brot	n.d. – 28	Degen <i>et al.</i> (2012)
Joghurt	0,6 – 1,3	Yamaguchi <i>et al.</i> (1994)
Käse	2 – 11	Bednarski <i>et al.</i> (1989)
Kekse	3,7 – 81,4	Lorenzo & Morales (2010)
Softdrinks	0,02 – 1,40	Lo <i>et al.</i> (2008)
Sojasauce	3,0 – 7,6 n.d. – 12	Hayashi <i>et al.</i> (1985) Degen <i>et al.</i> (2012)
Wein (weiß + rot)	0,1 – 1,0 0,46 – 12,07	De Revel <i>et al.</i> (2000) Da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2007)
(Portwein)	15,67 – 25,40	Da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2007)

(n.d. = nicht detektierbar)

2.3.2.2 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig

Weigel et al. (2004) gelang erstmals der Nachweis der 1,2-Dicarbonylverbindungen 3-DG, GO und MGO in Honig. Dabei wurden Konzentrationen von 79 bis 1266 mg/kg für 3-DG sowie zwischen 0,2 bis 2,7 mg/kg bzw. 0,4 bis 5,4 mg/kg für GO und MGO quantifiziert. Vergleichbare Daten dokumentierten *Arena et al. (2011)*, welche für diverse Nektarhonige 3-DG im Bereich 76 bis 809 mg/kg bestimmten, wohingegen die Gehalte an GO bis zu 11 mg/kg und MGO bis zu 3 mg/kg betragen. Weitere Dicarbonylverbindungen, die bereits in Honig nachgewiesen werden konnten, sind Glucoson (*Weigel et al., 2004*), 2,3-Butandion und 3,4-Dideoxyglucoson-3-en (3,4-DGE, *Marceau & Yaylayan, 2009*). Insgesamt wird von 9 Dicarbonylverbindungen berichtet, die ähnlich den Phenolen für die einzelnen Honigsorten ein spezifisches Profil bilden und somit möglicherweise einen Beitrag zur Authentifizierung der Honige liefern können (*Marceau & Yaylayan, 2009*).

Im Laufe der Honiglagerung finden Änderungen im Gehalt von Dicarbonylverbindungen statt, wobei die Verbindungen in unterschiedlichem Maße davon betroffen sein können (*Marceau & Yaylayan, 2009*). So unterliegt 3-DG während einer Inkubation bei 35 °C bzw. 45 °C einem linearen Anstieg, während die Gehalte von GO und MGO unverändert blieben (*Weigel et al., 2004*). Dementgegen lässt sich in frischen Manuka-Honigen eine deutliche Zunahme an MGO während der Lagerung beobachten (*Adams et al., 2009*).

Zwischen den Hauptinhaltsstoffen der analysierten Honige sowie den gemessenen Zuckerabbauprodukten lässt sich dabei kein Zusammenhang herstellen (*Weigel et al., 2004*). Auch innerhalb der einzelnen Verbindungen, beispielsweise zwischen 3-DG und MGO, besteht keine Korrelation (*Arena et al., 2011*). Allerdings scheinen hohe 3-DG-Gehalte mit einem höheren pH-Wert einherzugehen. Zudem zeigten diese Autoren eine Korrelation der Konzentration an 3-DG bzw. Dicarbonylverbindungen mit dem Anteil an Phenolen in den untersuchten Nektarhonigen (*Arena et al., 2011*).

Im Folgenden konnten durch *Mavric et al. (2008)* ungewöhnlich hohe Gehalte an MGO in Manuka-Honigen ermittelt werden, welche nicht allein durch den Zuckerabbau erklärbar sind. Während für einen Großteil der in dieser Studie untersuchten Proben zu *Weigel et al. (2004)* vergleichbare Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen gemessen wurden, variierten die MGO-Konzentrationen in Manuka-Honig zwischen 38 bis 761 mg/kg und lagen damit um bis zu Faktor 100 über den Werten in anderen Honigen. Diese Daten wurden durch Untersuchungen von *Adams et al. (2008)* bestätigt, welche MGO-Gehalte im Bereich von 38 bis 828 mg/kg ermittelten. Neben Manuka-Honig weisen auch andere *Leptospermum*-Honige hohe MGO-Konzentrationen auf. Insbesondere für australische Jellybush-Honige sind Gehalte bis zu 2400 mg/kg beschrieben (*Windsor et al., 2010*).

2.3.2.3 Bildungswege von MGO

MGO kann sowohl auf enzymatischem als auch auf nicht-enzymatischem Wege gebildet werden. Dies äußert sich in Lebensmitteln vorwiegend über Abbaureaktionen der Kohlenhydrate und Lipide sowie Umsetzungen durch Mikroorganismen, welche zur Entstehung dieser 1,2-Dicarbonylverbindung beitragen. Im Fall Honig ist dabei eine Bildung aus der Lipidperoxidation in Folge einer UV-Einwirkung nicht relevant.

Die bereits in Kapitel 2.3.1 angesprochenen Wege des Zuckerabbaus sind aufgrund der Zusammensetzung von Honig indes naheliegend. In dem leicht sauren Medium kann die MGO-Bildung über eine Retroaldolspaltung des 3-DG wie in Abb. 2-6 dargestellt beschrieben werden. Eine analoge C₃-C₄-Spaltung kann auch am 1-DG erfolgen (*Martins et al, 2003*). Der parallel entstehende Glycerinaldehyd, welcher zudem aus dem Abbau der Amadori-Produkte hervorgeht, kann ebenfalls zu MGO umgesetzt werden. Aus einem Vergleich der Zucker geht hervor, dass aus Monosacchariden höhere Mengen an Dicarbonylverbindungen entstehen als aus Disacchariden sowie aus Glucose mehr als aus Fructose (*Hollnagel & Kroh, 1998*). Des Weiteren erfolgt durch Anwesenheit von Aminosäuren, also über den Weg der Maillard-Reaktion, eine stärkere Bildung dieser Verbindungen als über die Karamellisierung (*Hollnagel, 2000*).

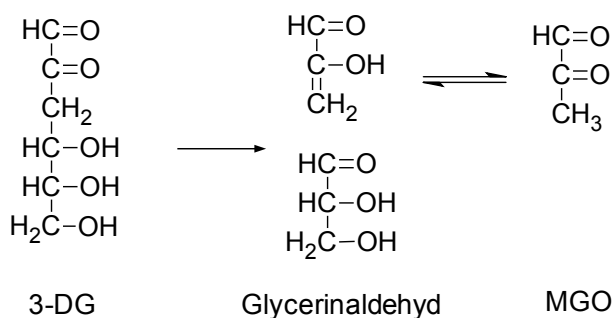


Abb. 2-6 Schema zur Retroaldolreaktion von 3-DG zu MGO

Eine weitere maßgebliche Quelle bilden andere Triosen bzw. deren Phosphate. Aus Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehydphosphat (GAP) kann MGO demnach auf nicht-enzymatischem Weg unter Säurekatalyse entstehen (*Meyerhof & Lohmann, 1934*). Darüber hinaus benennt *Shipar (2006a)* MGO als wesentliches Zwischenprodukt, das aus der Maillard-Reaktion von Dihydroxyaceton (DHA) und Glycin hervorgeht.

Enzymatisch kann eine Umsetzung von DHAP zu MGO über die MGO-Synthase erfolgen (Vgl. Abb. 2-7), die durch *Hopper & Cooper (1972)* nachgewiesen werden konnte. Eine Aktivität dieses Enzyms konnte bislang in Prokaryonten wie *Escherichia coli* (*Hopper & Cooper, 1972*), in bestimmten Hefearten (*Babel & Hofmann, 1981*) sowie in Säugetiergewebe (*Ray & Ray, 1981*) beobachtet werden.

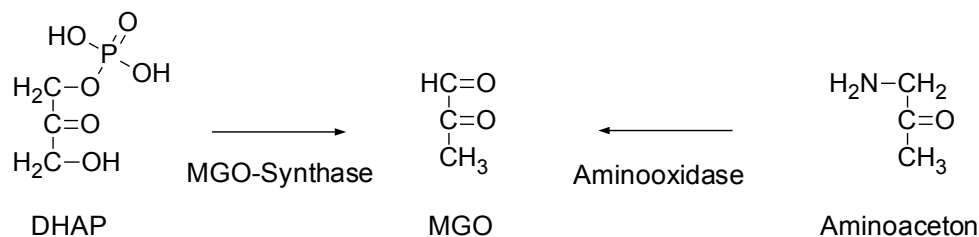


Abb. 2-7 Enzymatische Bildung von MGO aus Dihydroxyacetonephosphat durch die MGO-Synthase sowie aus Aminoacetone mittels Aminooxidase

Eine enzymatische Bildung von MGO ist laut *Pompliano et al. (1990)* ebenfalls durch die Triosephosphatisomerase gegeben, die das Phosphat des Endiols freisetzen kann, welches zu MGO weiterreagiert. Zudem kann eine Umsetzung von Aminoacetone zu MGO über die Aminooxidase unter Sauerstoffverbrauch erfolgen (*Green & Lewis, 1968*, Vgl. Abb. 2-7). Darüber hinaus kann MGO aus Aceton hervorgehen, das spontan oder unter Einwirken der Acetonmonooxygenase zu Hydroxyacetone und im Weiteren durch die Hydroxyacetone-monooxygenase zur Dicarbonylverbindung umgewandelt wird (*Casazza et al., 1984*).

Generell kommt MGO nicht nur als Bestandteil in Lebensmitteln vor, sondern wird auch *in vivo* gebildet. Es ist als Nebenprodukt des Zellmetabolismus und von Abbaureaktionen, wie der Glucoseautoxidation oder Lipidperoxidation, in allen Geweben nachweisbar, wobei MGO hauptsächlich in gebundener Form vorliegt (*Chaplen et al., 1998*). Hauptquelle des endogenen MGO ist die nicht-enzymatische Dephosphorylierung von Intermediaten der Glykolyse, insbesondere von DHAP und GAP (*Thornalley, 1993*). Die *in vivo* gebildeten Dicarbonylverbindungen werden mit einer Reihe von weiteren Prozessen, wie der Bildung von AGEs sowie der Modifizierung von Proteinen oder DNA, und in der Folge mit Alterungserscheinungen und Krankheiten, z.B. Diabetes mellitus, in Verbindung gebracht (*Thornalley, 1996*). So wurden höhere MGO-Gehalte im Blut von Patienten mit Diabetes mellitus (158 ± 46 ng/ml) oder eingeschränkter Nierenfunktion (110 ± 18 ng/ml) als bei gesunden Probanden (47 ± 12 ng/ml) bestimmt (*Odani et al., 1999*).

2.3.2.4 Abbau und Folgeprodukte von MGO

Ein Abbau von MGO erfolgt weitgehend auf enzymatischem Weg, wobei dem Glyoxalase-System eine entscheidende Rolle zukommt. Es besteht aus den Enzyme Glyoxalase I und II sowie katalytischen Mengen an reduziertem Glutathion und kommt im Cytosol pro- und eukaryotischer Zellen vor (*Thornalley 1993*). Das aus MGO und Glutathion gebildete Hemithioacetal wird dabei durch die Glyoxalase I zu Lactoylglutathion umgesetzt, welches katalysiert durch die Glyoxalase II zum Lactat reagiert. Zudem kann eine Metabolisierung von MGO durch Aldosereduktase zum Hydroxyacetone (95%) und zum Lactaldehyd (5%) erfolgen (*Vander Jagt et al., 1992*). Darüber hinaus sind weitere Abbauwege des MGO zum Pyruvat bekannt, z.B. mittels α -Ketoaldehyd-Dehydrogenase (*Bender et al., 1994*).

Neben dieser enzymatischen „Entgiftung“ können auch vielfältige Folgereaktionen des MGO stattfinden, wobei insbesondere Guanidino-, Thiol- und Aminogruppen mögliche Reaktionspartner darstellen. Als Strecker-Abbau wird die Reaktion von 1,2-Dicarbonylverbindungen wie MGO mit Aminosäuren bezeichnet. Es resultieren Aldehyde, die in der Folge zudem zu Pyrazinen oder Thiazolen reagieren können. Im Rahmen einer Proteinmodifizierung durch MGO sind insbesondere Reaktionen mit den Seitenketten Lysin und Arginin von Bedeutung. Bekannte Verbindungen, strukturell in Abb. 2-5 dargestellt, sind z.B. N₈-(5-Methyl-4-oxo-5-hydroimidazol-2-yl)-ornithin (MG-H1, *Henle et al., 1994*) oder N_ε-(1-carboxyethyl)-lysin (CEL, *Ahmed et al., 1997*). Zudem kann es zur Quervernetzung kommen, z.B. 2-Ammonio-6-(1-(5-ammonio-6-oxido-6-oxohexyl)-5-methylimidazolium-3-yl)hexanoat (MOLD, *Nagaraj et al., 1996*) unter Vernetzung zweier Lysinreste. Aus der MGO-Modifizierung von Cysteinresten geht ein Hemithioacetal hervor (*Lo et al., 1994*).

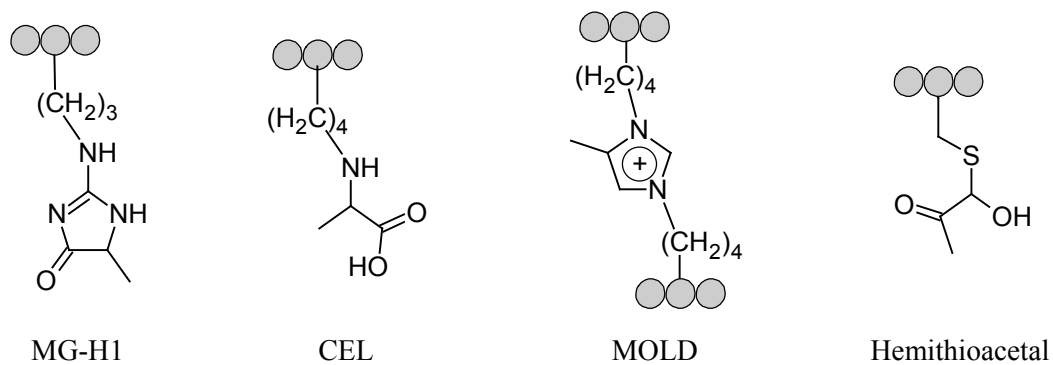


Abb. 2-8 Ausgewählte Proteinmodifikationen durch MGO

2.3.3 Dihydroxyaceton

Die Triose Dihydroxyaceton (DHA) ist ebenfalls als Zuckerabbauprodukt bekannt und kann zum Beispiel aus der Fructose neben Glycerinaldehyd gebildet werden (*Belitz et al., 2000*). Als Produkt der Maillard-Reaktion gelang *Severin et al. (1984)* der Nachweis von DHA in karamellisierten Mischungen. Folglich ist die Anwesenheit allgemein in zuckerhaltigen und prozessierten Lebensmitteln zu vermuten, jedoch lassen sich diesbezüglich nur wenige Daten aus der Literatur heranziehen. So benennen *Severin et al. (1984)* das Vorkommen von DHA in der Kruste von Brezeln, ohne jedoch konkrete Gehalte anzugeben. Des Weiteren ist durch *Laurie & Waterhouse (2006)* der Nachweis von DHA in natürlich gealterten Weinproben beschrieben.

DHA spielt in Stoffwechselprozessen eine Rolle. Im Rahmen der Glykolyse wird Glucose enzymatisch zum DHAP abgebaut, das im Folgenden weiter zu Pyruvat reagiert. Im Detail erfolgt dabei eine Spaltung von Fructose-1,6-Biphosphat durch die Aldolase in die Triosen DHAP und GAP. Durch die Triosephosphat-Isomerase kann die Ketose DHAP ebenfalls zur Aldose GAP umgewandelt werden, die den weiteren Abbau durchläuft (*Horn, 2012*).

Darüber hinaus ist eine Bildung von DHA im Zuge von Fermentationsprozessen bestimmter Mikroorganismen bekannt. Auf diesem Wege kann DHA z.B. aus Glycerol durch Fermentation von *Acetobacter suboxydans* gewonnen werden (*Green & Westfield, 1960*).

In der Literatur finden sich auch Anhaltspunkte auf eine mögliche technologisch relevante Wirkung von DHA. So diskutiert *Kirk (1965)* einen Einsatz von DHA zur Verstärkung der Bräunung in Backwaren. Zudem soll es zur Konservierung von Lebensmitteln beitragen können (*Oborsh et al., 1979*). Die wohl bekannteste Anwendung findet DHA als funktionaler Inhaltsstoff in Kosmetikprodukten (*Monfrecola & Prizio, 2001*). Hierbei wird die Reaktion von im kosmetischen Mittel enthaltenem DHA mit Proteinseitenketten bzw. mit den Proteinen und Aminosäuren der Hornschicht (Stratum corneum) für eine Braunfärbung der Haut ohne UV-Einwirkung genutzt. Diese setzt nach wenigen Stunden ein und verschwindet wieder bei Erneuerung der Hornschicht (*Burkhart & Burkhart, 2009*).

Parallel zu den Untersuchungen dieser Arbeit gelang *Adams et al. (2009)* der Nachweis von DHA in Manuka-Nektar und frischen Honigen, wobei diese Verbindung als direkte Vorstufe für die während der Honiglagerung stattfindende Bildung von MGO identifiziert werden konnte. Des Weiteren bestimmten *Windsor et al. (2012)* die Anwesenheit von DHA und MGO in weiteren Leptospermum Honigen aus Australien, wobei Proben an Jellybush-Honig die höchsten DHA-Gehalte aufweisen.

2.3.4 5-Hydroxymethylfurfural

Die Carbonylverbindung 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) gilt als typischer Parameter für Lagereinflüsse in Lebensmitteln. HMF entsteht im Rahmen des Zuckerabbaus als direktes Folgeprodukt von 3-DG. Aus dem durch 2,3-Enolisierung und β -Eliminierung von Wasser aus Glucose gebildeten 3-DG wird durch Zyklisierung unter erneuter Wasserabspaltung HMF gebildet (*Kroh, 1994*). Die Umsetzung erfolgt dabei zudem über das Intermediat 3,4-DGE (*Linden et al., 2002*). HMF stellt eines der bekanntesten Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion dar und wird mitunter auch als Marker für den beginnenden Ablauf angesehen. HMF kann auch durch thermisch- bzw. säure-katalysierte Karamellisierung von Glucose oder Fructose hervorgehen (*Kroh, 1994*). Außerdem ist HMF als Produkt aus dem Abbau von Ascorbinsäure beschrieben (*Burdurlu et al., 2006*).

Folglich ist die Verbindung in vielen zuckerreichen und leicht sauren Lebensmitteln zu finden (*Teixidó et al., 2011*), insbesondere unter Einwirkung höherer Temperaturen. In der Literatur dokumentierte HMF-Konzentrationen sind beispielhaft in Tab. 2-6 aufgeführt und unterliegen einer großen Schwankungsbreite. So konnten z.B. für Backwaren Werte bis zu 163 (Brot) bzw. 448 mg/kg HMF (Kekse) ermittelt werden, in ausgewählten Essig-Proben dagegen bis zu 3760 mg/l (*Degen et al., 2012*). Kommerzielle Honigproben verschiedener

Herkunft wurden beispielsweise von *Mavric et al. (2008)* untersucht, wobei eine natürliche Spanne von 1 bis 75 mg/kg HMF festgestellt werden konnte.

Im Fall Honig ist der Gehalt an HMF zudem durch die Honig-Verordnung (*Honig-V, 2004*) als Qualitätsparameter geregelt (Vgl. Kapitel 2.2.7). HMF-Konzentrationen über 40 mg/kg hinaus werden im Allgemeinen mit einer unsachgemäßen oder zu langen Lagerung sowie einer möglichen Erhitzung von Honig in Verbindung gebracht. Frische Honige weisen in der Regel HMF-Gehalte von nahezu Null auf (*Deifel, 1989*). Der Anstieg dieser erfolgt mit zunehmender Alterung des Honigs in Abhängigkeit von der Lagertemperatur (*White et al., 1964; Deifel, 1989; Weigel et al., 2004*). Dabei kann 3-DG als direkter Precursor für die HMF-Bildung in Honig angesehen werden. Die vorliegenden Mengen sind jedoch signifikant größer als die HMF-Gehalte. Des Weiteren konnte keine Korrelation beider Größen aufgezeigt werden (*Weigel et al., 2004*). Eine Inkubation bei höheren Temperaturen von z.B. 80 °C führte zum deutlichen Anstieg an HMF (*Ajlouni & Sujirapinyokul, 2010; Rotarescu & Vidican, 2010*). Eine prinzipielle Eignung von HMF als Indikator für Lager- und Wärmeeinflüsse ist daher gegeben, dessen Aussagekraft wird in der Literatur jedoch auch diskutiert (*Ajlouni & Sujirapinyokul, 2010*).

Tab. 2-6 HMF-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln

Lebensmittel	HMF [mg/kg bzw. mg/l]	Literatur
Brot	1,9 – 163	<i>Degen et al. (2012)</i>
Essig	0,6 – 3760	<i>Degen et al. (2012)</i>
Fruchtsaft	n.d. – 714 n.d. – 10,6	<i>Degen et al. (2012)</i> <i>Teixidó et al. (2011)</i>
Honig	1,0 – 75 0,6 – 44	<i>Mavric et al. (2008)</i> <i>Weigel et al. (2004)</i>
Kaffee	113 – 1093	<i>Teixidó et al. (2011)</i>
Kekse	0,3 – 448	<i>Degen et al. (2012)</i>
Ketchup	0,8 – 189,9	<i>Vorlová et al. (2006)</i>
Schokolade	42,1 – 164,7	<i>Teixidó et al. (2011)</i>
Wein	n.d. – 133	<i>Degen et al. (2012)</i>

(n.d. = nicht detektierbar)

Hinsichtlich der HMF-Gehalte von Manuka-Honig bestehen in der Literatur bislang nur wenige Angaben. *Mavric et al. (2008)* ermittelten in ausgewählten kommerziellen Proben Konzentrationen zwischen 3 und 43 mg/kg HMF. Unterstützt durch Berichte aus der Praxis ergibt sich daraus die Fragestellung, inwieweit in Manuka-Honig generell höhere Gehalte vorliegen und ob diese auf eine unsachgemäße Behandlung zurückzuführen sind oder aber ob ein spezifisches Phänomen vorliegt, welches ggf. mit ausgewählten, für Manuka-Honig typischen Faktoren in Zusammenhang gebracht werden kann.

2.3.5 Weitere Produkte der Maillard-Reaktion

Als weiterer typischer Lagerungsparameter neben HMF sowie allgemeiner Indikator der Frühphase der Maillard-Reaktion gilt Furosin (N^{ϵ} -(2-Furoylmethyl)-lysin), welches nach Säurehydrolyse aus den Amadori-Produkten gebildet wird und den indirekten Rückschluss auf deren Gehalt erlaubt (*Krause, 2005*). Auch bei der Honigverarbeitung wird Furosin als relevanter Faktor in Kombination mit HMF zur Detektion einer unsachgemäßen Lagerung oder möglichen thermischen Behandlung diskutiert (*Villamiel et al., 2001; Morales et al., 2008*). In spanischen Honigen konnten *Villamiel et al. (2001)* Furosingehalte zwischen 439 und 1362 mg/100g Protein ermitteln, wobei ein Anstieg durch Erhitzung des Honigs beobachtet wurde. Des Weiteren sind Werte im Bereich 306 bis 1206 mg/100g Protein für frische Honige aus Spanien (*Morales et al., 2008*) dokumentiert. In kommerziellen Proben des Bienenprodukts Gelée Royal wurde Furosin im Bereich von 37,1 bis 113,3 mg/100g Protein bestimmt und unterlag einer signifikanten Zunahme während der Lagerung bei Raumtemperatur (*Marconi et al., 2002*).

Wie bereits in Kapitel 2.2.6 erwähnt, kann es in Honig zur Bildung von Melanoidinen kommen (*Brudzynski & Kim, 2010*), welche zur Farbe des Honigs beitragen. Im Folgenden beschrieben *Brudzynski & Miotto (2011)* diese als Mehrkomponenten-Polymere, bestehend aus Komplexen von Proteinen, Polyphenolen und Oligosacchariden. Für Manuka-Honig geben *Fearnley et al. (2012)* die Anwesenheit spezifischer Verbindungen im höher-molekularen Bereich im Vergleich zu anderen Sorten an. Zudem konnten sie Maltose verestert mit Trimethoxybenzoesäure nachweisen. Des Weiteren beschreiben *Pätzold & Brückner (2006)* die Bildung von D-Aminosäuren in den von ihnen untersuchten Honigen, was sie auf die Maillard-Reaktion zurückführten. Darüber hinaus gibt die Literatur bislang keine Hinweise auf weitere typische Verbindungen.

2.4 Biofunktionelle Eigenschaften von Honig

2.4.1 Antibakterielle Wirkung von Honig

Neben dem Nutzen als Süßungsmittel gilt Honig seit jeher als traditionelles Heilmittel. Es wird berichtet, dass bereits im Altertum durch die Ägypter und ostafrikanische Stämme heilende Eigenschaften von Honig bekannt waren (*Bodeker et al. 1999*). In der Volksheilkunde werden Bienenprodukte seit vielen Jahren bei Erkältungen eingesetzt (*Molan, 1998*). Der Einzug des Heilmittels Honig in die wissenschaftliche Forschung wird einem Bericht von van Ketel im Jahr 1892 zugeschrieben (*Dustmann, 1979*). Im Folgenden wurden durch *Dold et al. (1937)* der Begriff „Inhibine“ für die verantwortlichen Substanzen der beobachteten antibakteriellen Effekte geprägt, die sich als licht- und temperaturempfindlich erwiesen (*Dustmann, 1972*). Das durch die Glucoseoxidase gebildete Wasserstoffperoxid konnte als antibakterielle Komponente in Honig nachgewiesen werden (*White et al. 1963*). Für eine Vielzahl an Honigen stellt dies das Inhibin mit der höchsten Relevanz dar.

Als weitere Ursachen für eine keimhemmende Wirkung von Honig können seine Acidität und hohe Osmolarität angeführt werden. So konnte *Bogdanov (1997)* eine Korrelation der antibakteriellen Wirkung mit dem Anteil an freier Säure und Gesamtsäure im Honig beobachten, die jedoch nicht mit dem pH-Wert des Honigs einherging. Ein Vergleich mit einer Honig-analogen Zuckerlösung zeigt neben Wasserstoffperoxid die Anwesenheit verschiedener Inhibine in Honig auf, z.B. Flavonoide und Phenolsäuren (*Wahdan 1998*). Diese antibakterielle Wirkung wird im Allgemeinen als nicht-peroxidische Aktivität des Honigs bezeichnet.

Im Laufe der nachfolgenden Untersuchungen zu antibakteriellen Eigenschaften von Honig erlangte der neuseeländische Manuka-Honig besonderes Interesse aufgrund seiner außergewöhnlich hohen nicht-peroxidischen Aktivität (*Allen et al., 1991; Snow & Manley-Harris, 2004*). So konnte gezeigt werden, dass auch nach Katalase-Behandlung ein Großteil der antibakteriellen Wirkung erhalten blieb (*Molan & Russel, 1988*). Ausgehend von einem pflanzlichen Ursprung dieses Phänomens wurden sowohl pflanzenspezifische Substanzen als auch die Abwesenheit an Katalase diskutiert (*Weston 2000*). Die antibakterielle Aktivität wurde jedoch unabhängig von phenolischen Verbindungen beobachtet (*Weston et al., 2000*). *Mavric et al. (2008)* gelang es schließlich, MGO, welches in Manuka-Honig in bis zu 100fach höheren Konzentrationen als in anderen Sortenhonigen vorkommt, direkt für die antibakterielle Wirkung verantwortlich zu machen.

In anderen Honigen mit vergleichsweise höherer antibakterieller Aktivität konnte hingegen kein MGO nachgewiesen werden. Für ausgewählte medizinische Honige, standardisiert hergestellt im Gewächshaus, wird dem Peptid bee-defensin-1 ein Beitrag zur Wirkung zu-

geschrieben (*Kwakman et al., 2010*). Die markanten antibakteriellen Eigenschaften von Ulmo-Honig, einem chilenischen Blütenhonig, können ebenfalls nicht mit der Präsenz von MGO sondern zu weiten Teilen durch Wasserstoffperoxid begründet werden (*Sherlock et al., 2010*). Trotz der eindeutigen Zuordnung von MGO als Ursache für die hohe nicht-peroxidische, antibakterielle Wirkung von Manuka-Honig, werden trotzdem auch weitere bislang unbekannte Parameter mit der Aktivität in Verbindung gebracht (*Kwakman et al., 2011*). Dabei werden insbesondere mögliche synergistische Wirkungen sowie zusätzliche Manuka-spezifische Komponenten wie z.B. saure oder phenolische Substanzen diskutiert (*Russel et al., 1990; Bogdanov, 1997; Kwakman et al., 2011*).

In einer Vielzahl von Studien zur Charakterisierung der antibakteriellen Eigenschaften von Manuka-Honig konnte eine erstaunliche Effektivität gegen ein umfassendes Spektrum an Mikroorganismen herausgestellt werden, darunter auch verschiedene Antibiotika-resistente Keime wie beispielsweise Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme. (*Cooper et al., 2002; Molan, 2009; George & Cutting, 2010*). Eine mögliche Resistenz der Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika hatte dabei keinen Einfluss auf die inhibierende Wirkung des Honigs (*Molan, 2009*). Zudem scheint die Behandlung mit Honig keine Resistenzbildung hervorzurufen (*Blair et al., 2009; Cooper et al., 2010*). Dies wird mit einem mechanistischen Zusammenspiel verschiedener Faktoren in der antibakteriellen Wirkung begründet (*Blair et al., 2009*). Zum Wirkmechanismus selbst finden sich verschiedene Ansätze in der Literatur, jedoch erscheint die Aufklärung noch unvollständig. So konnte ein Eingriff in die Regulation der Proteinexpression beobachtet werden (*Jenkins et al., 2011*). Des Weiteren sind strukturelle Veränderungen bis zur Lyse der Bakterienzellen in Folge einer Behandlung mit Honig dokumentiert (*Henriques et al., 2011*).

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen *in vitro* scheint medizinischer Honig, der unter Gammasterilisation aus *Leptospermum*-Honig gewonnen wird, ein probates Mittel in der Wundbehandlung darzustellen (*Lusby, 2002; Molan, 2006*). Durch die Applikation von Honig ließ sich bereits zuvor eine verbesserte Wundheilung aufzeigen (*Efem 1988*). Bisherige klinische Studien lassen außerdem die Anwendbarkeit auf diverse Wundtypen erkennen (*Molan, 2006*). Darüber hinaus beobachteten *Tonks et al. (2001)* eine Stimulation der Zytokinproduktion in Immunzellen bei Inkubation mit Manuka-Honig, was ergänzend zu den antibakteriellen Eigenschaften mit einer verbesserten Wundheilung in Verbindung gebracht werden könnte.

Neben diesen positiven Effekten in der Wundheilung werden auch andere Einsatzmöglichkeiten aufgrund der antibakteriellen Eigenschaften diskutiert. So vermag Manuka-Honig die orale Anwesenheit pathogener Keime bei dentaler Plaque-Bildung zu reduzieren (*Badet & Quero, 2011*). Zudem wird durch oberflächliche Applikation von Honig das Auftreten oraler Mukositis in Folge einer Strahlentherapie verringert (*Khanal et al., 2010*). Bezüglich

einer Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt wird von einer Beeinflussung der Darmbakterien berichtet (Rosendale, 2008), wobei ein dosisabhängiger Anstieg an Probiotika sowie eine Abnahme an pathogenen Mikroorganismen verzeichnet wurden. Hinsichtlich gastrointestinaler pathogener Bakterien konnte eine Hemmung gegenüber *Camphylobacter* spp. (Lin et al., 2011), aber auch weiterer Organismen durch Manuka-Honig beobachtet werden (Lin et al., 2011). In Bezug auf eine hemmende Wirkung auf *Helicobacter pylori*, welcher für eine Reihe von Magenerkrankungen verantwortlich gemacht wird, finden sich jedoch widersprüchliche Aussagen in der Literatur (Al Somal et al., 1994; McGovern et al., 1999).

2.4.2 Antioxidative Eigenschaften von Honig

Hinsichtlich der antioxidativen Eigenschaften von Honig finden sich variierende Angaben in der Literatur, wobei generell eine starke Abhängigkeit von der pflanzlichen Herkunft des Honigs besteht. Bertoncej et al. (2006) beschreiben einen Anstieg der antioxidativen Kapazität mit der Farbe des Honigs, wobei Honigtau-honige als antioxidativer als hellere Blütenhonige beurteilt wurden. Als zusätzliche externe Einflüsse können saisonale und Umweltfaktoren sowie die Lagerung des Honigs eine Rolle spielen.

Die antioxidative Wirkung resultiert aus dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren, aber in Honig enthaltene polyphenolische Verbindungen liefern einen wesentlichen Beitrag. Insbesondere Flavonoide besitzen in Abhängigkeit von ihrer Struktur starke antioxidative und chelatbildende Eigenschaften (Heim et al., 2007), aber auch für eine Reihe von Phenolcarbonsäuren und ihren Estern wurde eine hohe Aktivität ermittelt (Chen & Ho, 1997). Viele von Gheldorf et al. (2002) in Honig identifizierte Phenolcarbonsäuren und Flavonoide sind bereits als potentielle Antioxidantien beschrieben. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität und dem Gesamtphenolgehalt von Honig aufgezeigt (Bertoncej et al., 2006; Buratti et al., 2007). Neben Polyphenolen können in Honig weitere Substanzen mit potentiell antioxidativen Eigenschaften enthalten sein, z.B. Vitamine (α -Tocopherol, Ascorbinsäure) und Carotenoide, Peptide, Enzyme (Katalase, Peroxidase), organische Säuren und Produkte der Maillard-Reaktion (Bertoncej et al., 2006). Von einem Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Sauerstoffradikal-Absorptionskapazität als ein Maß für antioxidative Eigenschaften berichten Gheldorf et al. (2002). Eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Aminosäuren und der Fähigkeit, Radikale abzufangen, beschreiben Perez et al. (2007). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Einwirkung von Hitze die antioxidative Kapazität absinken ließ (Nagai et al., 2001).

Bisherige Untersuchungen schreiben Manuka-Honig gute Radikalfänger-Eigenschaften zu (Henriques et al., 2006; Venugopal & Devarajan, 2011). Als eine für diese antioxidative Wirkung verantwortliche Verbindung konnte Methylsyringat von Inoue et al. (2005) identifiziert werden.

Für die Bienenprodukte Propolis, Gelée Royal und Pollen werden ebenfalls antioxidative Wirkungen in der Literatur beschrieben (*Nagai et al., 2001; Campos et al., 2003; Buratti et al., 2007*). Insbesondere für Propolis kann eine hohe antioxidative Kapazität verzeichnet werden (*Marquele et al., 2005*), welche wiederum auf phenolische Verbindungen zurückgeführt werden kann (*Ahn et al., 2007; Mohammadzadeh et al., 2007*). Zudem wurden charakteristische, antioxidativ wirksame Verbindungen wie Kaffesäurephenylester (*Russo et al., 2002*) oder Propol (*Basnet et al., 1997*) isoliert. Zudem wurde α -Tocopherol als antioxidativer Bestandteil von Propolis identifiziert (*Bansketa et al., 2001*), was ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren vermuten lässt.

Die antioxidative Kapazität einer Testsubstanz bzw. eines Lebensmittels kann durch eine Reihe von Messverfahren ermittelt werden. Im Allgemeinen bildet dabei das Abfangen von Radikalen die Grundlage dieser Bestimmungen. Einige typische Testverfahren sind in Tab. 2-7 aufgeführt. Die fehlende Standardisierung erschwert einen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse. Durch den Einsatz verschiedener Untersuchungssysteme können die darüber ermittelten Absolutwerte für die antioxidative Kapazität nur unzureichend zueinander in Bezug gesetzt werden (*Küçük et al., 2007*). Eine genaue Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften, so folgern *Beretta et al. (2005)*, ist nur durch eine Kombination verschiedener Testsysteme und vergleichender Analyse möglich.

Tab. 2-7 Tests zur Messung der antioxidativen Kapazität

Test	Name	Wesentliches Messprinzip
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin	Abnahme Farbintensität
FRAP	Ferric reducing antioxidant power	Blaufärbung durch Reduktion von Eisenkomplex
LDL	Low density lipoprotein	Erfassen von Oxidationsprodukten
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity	Abnahme Fluoreszenz
PCL	Photochemilumineszenz	Chemoluminometrische Detektion der freien Radikale
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity	Abnahme Farbintensität
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter	Abnahme Fluoreszenz

Im Vergleich der Verfahren erlaubt der Trolox-equivalent-antioxidant-capacity (TEAC)-Test eine zuverlässige und praktikable Messung der antioxidativen Kapazität von hydrophilen Extrakten (*Raddatz et al., 2007*). Der ursprüngliche TEAC-Test basiert dabei auf einer Aktivierung von Metmyoglobin mit Wasserstoffperoxid in der Anwesenheit von 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-ammoniumsalz (ABTS) zur Erzeugung eines Radikalkations (*Re et al., 1998*), heute bekannt als TEAC-I. Darauf aufbauend wurden zwei Varianten entwickelt, die auf einer direkten Bildung des farbigen Radikals

durch Mangan(IV)-oxid (TEAC-II) bzw. Kaliumpersulfat (TEAC-III) beruhen (Re et al., 1998). In der Folge wird die Entfärbung, die durch Zugabe des potentiellen Antioxidans hervorgerufen wird, photometrisch erfasst.

2.5 Zytotoxische Eigenschaften von Honig

Der Begriff Zytotoxizität bezeichnet in der Regel die Eigenschaft von Substanzen, Zellen in ihren zellulären Funktionen über die physiologische Schwankungsbreite hinaus zu stören und in der Folge zu inaktivieren oder abzutöten (Greim & Deml, 1996; Falbe & Regitz, 1997). Dabei kann es sich sowohl um eine vorübergehende Beeinträchtigung, als auch irreversible Schädigung, die zum Zelltod führt, handeln, wobei alle Funktionen und Strukturen einen möglichen Angriffspunkt darstellen können. Eine toxische Wirkung kann sich auch durch Änderungen der Zellgröße oder des Proliferationsverhaltens sowie durch eine erhöhte Akkumulation ausgewählter Substanzen bemerkbar machen (Greim & Deml, 1996).

2.5.1 Testsysteme zur Bestimmung der Zytotoxizität

Toxizitätstests dienen zur Beurteilung einer möglichen Giftwirkung einer Testsubstanz auf den gewählten Organismus unter standardisierten Bedingungen (Eisenbrand & Metzler, 2001). Darunter fallen eine Reihe biologischer Testverfahren, die *in vivo* an Säugetieren oder Mikroorganismen durchgeführt werden. Als Ersatz für Tierversuche wurden *in vitro* Testsysteme zur Untersuchung des toxischen Potentials von Substanzen eingeführt.

Zur Bestimmung dieser *in-vitro*-Toxizität können verschiedene Zellkulturmethoden Anwendung finden. In der Organ- und Gewebekultur lassen sich über den Parameter der Enzymfreisetzung Aussagen über eine schädigende Wirkung gewinnen, wobei noch eine gewisse Analogie zur *in vivo* Situation erhalten bleibt, beispielsweise in Form von Interaktionen zwischen den Zellen. Allerdings ist die Handhabung des Systems und die Reproduzierbarkeit vermindert (Lindl, 2002). Ein bekanntes Beispiel einer solchen Kultur ist der Hühnerei-Test, auch HET- (hen egg test) oder CAM- (Chorionallantoismembran) Test genannt. Hierbei erfolgt eine Prüfung der zu untersuchenden Substanz an der den Embryo umgebenden Membran eines vorbebrüteten Hühnereis (Lindl, 2002). An Bedeutung gewonnen haben zudem Zellkulturen, die in vielfältiger Ausführung zur Beurteilung von Substanzen herangezogen werden können. Dabei wird zwischen dem Einsatz von primären und permanenten Kulturen unterschieden. Primäre Zellen werden direkt aus dem Organ gewonnen und sind nur über einen begrenzten Zeitraum hinweg kultivierbar. In permanenten Kulturen kommen in der Regel Tumorzellen zum Einsatz, welche eine hohe Wachstums- und Teilungsrate aufweisen und sich somit durch eine genetische Gleichheit und hohe Stabilität auszeichnen.

Für eine erfolgreiche Kultivierung benötigen die isolierten Zellen ein Milieu, das den natürlichen Bedingungen im intakten Organismus entspricht. Dies wird durch geeignete Umgebungsbedingungen wie Temperatur, Luftfeuchte und Gasatmosphäre sowie durch die Zugabe von Zellkulturmedien als externe Energiequelle und Nährstofflieferant realisiert (Boxberger, 2007). Entsprechende Nährmedien enthalten stets eine Reihe anorganischer Salze, die z.B. für die Signaltransduktion oder Regelung des Membranpotentials benötigt werden, Kohlenhydrate als Hauptenergiequelle, verschiedene essentielle Aminosäuren zur Biosynthese sowie Vitamine für das Wachstum und die Vermehrung der Zellen. Ein häufiges Additiv stellt Blutserum wie z.B. fötales Kälberserum (FKS) dar, welches Zellwachstum und Proliferation entscheidend fördert, zusätzliche Anheftungsfaktoren enthält und die Bioverfügbarkeit steigert. Je nach Anforderung können weitere Substanzen wie Hormone, Proteine, Lipide oder Spurenelemente zum Einsatz kommen (Boxberger, 2007).

Zur Detektion einer zytotoxischen Wirkung muss ein Endpunkt festgelegt und ermittelt werden. Hierfür kann die Bestimmung der Zellvitalität Anwendung finden. Ein darauf basierendes, gängiges Verfahren stellt der Neutralrottest dar, wobei Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) als wasserlöslicher Vitalfarbstoff Anwendung findet. Der Test dient zur Beurteilung der unmittelbaren zytotoxischen Wirkung einer Substanz auf die verwendeten Zellen (Borenfreund & Puerner, 1985). Daneben gibt es noch eine Vielzahl weiterer Testsysteme, einige sind beispielhaft in Tab. 2-8 aufgeführt. Mithilfe des Koloniebildungs- bzw. Plating-Efficiency-Tests, der für die Durchführung im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, lassen sich Aussagen über den Langzeiteffekt einer Substanz auf das Zellsystem treffen (Tab. 2-8.). Auf diese Weise lassen sich sowohl die Toxizität, als auch die wachstumsfördernden Eigenschaften einer Substanz prüfen (Lindl, 2002).

Tab. 2-8 Testverfahren zur Beurteilung einer zytotoxischen Wirkung

Testverfahren	Detektion bzw. Prinzip (Endpunkt)	Literatur
Alamar-Blue	Diffusion des Farbstoffs ins Cytosol der Zellen, Umsetzung durch Enzyme führt zu Farbumschlag und Fluoreszenz	<i>O'Brien et al. (2000)</i>
Gesamtprotein	Messen von Änderungen im Proteingehalt	<i>Clynes (1998), Lindl (2002)</i>
Koloniebildung	Anfärben gebildeter Kolonien nach Inkubation und weiterer Kultivierung	<i>Lindl (2002)</i>
Lactatdehydrogenase	Messen der Enzymfreisetzung nach Schädigung der Zellen	<i>Clynes (1998)</i>
Tetrazoliumsalze z.B. MTT	Reduktion des Farbstoffs durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums	<i>Berridge et al. (1996), Clynes (1998)</i>
Neutralrot	Aufnahme des Farbstoffs in Lysosomen, Protonierung und Anreicherung	<i>Borenfreund & Puerner (1985), Clynes (1998)</i>
Trypanblau	Bestimmung der Zellviabilität	<i>Lindl (2002)</i>

(MTT = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)

2.5.2 Zytoxische Eigenschaften von MGO

Im Allgemeinen kann MGO als zytotoxische Substanz eingestuft werden, was sich durch eine wachstumshemmende bzw. toxische Wirkung auf Zellen in einer Reihe von Studien ableiten lässt. Davon ausgehend wird in der Literatur sowohl eine kanzerogene als auch eine Antitumor-Wirkung diskutiert.

Eine zytotoxische Wirkung von MGO auf tumorigene Zellen wurde erstmals durch *French & Frelander (1958)* dokumentiert und durch *Apple & Greenberg (1967)* bestätigt. In den darauf folgenden Untersuchungen stellten *Ayoub et al. (1993)* an humanen Leukämiezellen (HL-60) *in vitro* eine durch MGO induzierte Inhibierung der Zellen fest, welche in vergleichbaren Granulozyten bei der eingesetzten Konzentration noch nicht sichtbar wurde. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von *Kang et al. (1996)* beschrieben. Die Autoren folgerten, dass tumorigene Zellen möglicherweise empfindlicher auf die Einwirkung von MGO reagierten, wobei die erhöhte Wachstumsrate sowie die Abwesenheit von DNA-Reparatursystemen als Erklärung herangezogen wurden.

Eine Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung kann üblicherweise über den IC₅₀-Wert erfolgen, welcher die Konzentration des zu testenden Agens darstellt, bei der 50 % der Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Für MGO wird hierfür z.B. ein IC₅₀-Wert von 11,82 mg/l, getestet an Mäusefibroblasten, angegeben (*Wieslander et al., 1995b*). Andere Studien verzeichnen eine Wachstumshemmung bei 17,2 mg/l MGO für Leukämiezellen HL-60 (*Ayoub et al., 1993*) oder 216 mg/l an Prostatakrebszellen PC-3 (*Milanesa et al., 2000*). Auch ohne Angabe eines IC₅₀ macht dies die Variation der zu beobachtenden Wirkung in Abhängigkeit von Zellen und Testsystem deutlich.

MGO ist befähigt, mit Proteinen sowie DNA und RNA zu reagieren, wodurch eine Beeinträchtigung der Struktur und Funktion dieser Makromoleküle resultiert (*Thornalley, 1998*). So führt eine Hemmung bestimmter antioxidativ wirkender Enzyme zum Ausbleiben von entsprechenden Prozessen und damit zu Schädigungen in der Zelle (*Choudhary et al., 1997*). Des Weiteren kann eine Inhibierung der Zellatmung auftreten (*Ray et al., 1991*), was auf eine Hemmung des Elektronenflusses an der Mitochondrienmembran zurückgeführt wurde (*Biswas et al., 1997*). Auch durch die Anwesenheit von MGO nicht abgebaute Fremdstoffe können zellschädigend wirken (*Kalapos, 1999*). Zudem ist ein Hervorrufen der Apoptose durch eine parallel auftretende Bildung von Radikalen möglich (*Chang et al., 2005; Kalapos, 2008*). In diesem Zusammenhang wird MGO auch als Mutagen eingestuft (*Nagao et al., 1986*). Neben der Bildung von MGO-DNA-Addukten (*Thornalley, 2010*) kann es zu DNA-Brüchen und der Ausbildung von Crosslinks kommen (*Brambilla et al., 1985*).

Neben MGO werden auch andere 1,2-Dicarbonylverbindungen mit zytotoxischen Eigenschaften in Verbindung gebracht. So beschreiben *Okado et al. (1996)* eine apoptotische Wirkung von 3-DG auf die Leukämiezellen U937. Die Zytotoxizität beruht dabei analog zum MGO auf Veränderungen der DNA und der Entstehung von intrazellulärem Stress (*Niwa, 1999*). Unter den 1,2-Dicarbonylverbindungen wird 3,4-DGE in Untersuchungen an Peritonealdialyse-Lösungen als Verbindung mit dem größten zytotoxischen Potentials betrachtet (*Erixon et al., 2004*).

Aufgrund der außergewöhnlich hohen Gehalte an MGO in Manuka-Honig stellt sich vor dem Hintergrund der dargelegten zytotoxischen Eigenschaften dieser 1,2-Dicarbonylverbindung die Frage, ob der Honig selbst eine inhibierende Wirkung auf Zellen hervorruft. Die Vermutung liegt nahe, dass eine höhere Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zu anderen Honigen aus der spezifischen Zusammensetzung resultiert. Im Zuge der vorliegenden Arbeit gilt es daher neben der weiterführenden Charakterisierung der Zytotoxizität von MGO durch die Bestimmung eines IC_{50} -Wertes zu klären, ob eine analoge Wirkung von Manuka-Honig aufgrund des enthaltenen MGO zu verzeichnen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Tab. 3-1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name	Spezifikation	Hersteller
γ -Globulin	$\geq 99\%$, aus Rindblut	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Tocopherol		Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz, ABTS	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Desoxyglucoson	Methode nach <i>Henle & Bachmann (1996)</i>	Syntheseprodukt, TU Dresden, Michael Hellwig
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, Trolox		Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Ammoniak	25%	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumformiat	99%	Grüssing, Filsum
Ascorbylpalmitat		Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Coomassie [®] Brilliantblau G 250		Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Deuteriumoxid	99,9 atom% D, 151882	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Fructose	p.A.	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
D-Glucose	Wasserfrei, $> 99\%$	Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe
Dihydroxyaceton-Dimer	97%; D107204	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Dihydrat	Ferak, Berlin
Enzymkit D-Glucose/D-Fructose	Enzytec [®] 1245	r-Biopharm, Darmstadt
Essigsäure	100% analytical reagent	VWR Prolabo, B Leuven
Ethanol	96% vergällt	Berkel, Berlin
Folin-Ciocalteu-Reagenz		Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Gallussäure		Riedel-de-Haën AG, Seelze
Hydroxymethylfurfural	H40807	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ionenaustauscherharz Dowex [®] 50WX8	100-200 mesh, 335345000	Acros Organics, Geel, Belgien
Isopropanol	HPLC grade, P/7507/17	Fisher Scientific, Schwerte
Kaliumcarbonat	99,5%	Grüssing, Filsum
Kaliumdihydrogenphosphat	99,5%, 12017	Grüssing, Filsum
Lithiumcitrat-Puffer, ASA		Sykam, Fürstfeldbruck

Methanol	HPLC grade, 20864.320	VWR Prolabo, B Leuven
Methanol	p.A.	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Methylglyoxal	40% in water (w/v); M0252	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat-Trihydrat	99,5%, 12113	Grüssing, Filsum
Natriumcarbonat	1.06395	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	100%, 27810.295	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	99,5%, 12298	Grüssing, Filsum
Natriumhydroxid		Grüssing, Filsum
Natronlauge	32%, 12192	Grüssing, Filsum
Ninhydrin	≥ 99%, 30410	Serva, Heidelberg
o-Phenylendiamin		Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Perchlorsäure	20%	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Phadebas Honey Diastase Test	1321	Magle AB, Lund, Sweden
Phosphorsäure	85%	Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reinstwasser	Purelab plus hauseigene Anlage, Leitfähigkeit 0,055 μ S/cm	USFilter, Ransbach-Baumbach
Saccharose	p.A.	Altbestände (ohne Angabe)
Salzsäure	37%, 1.00317	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (TRIS)	buffer grade, A1379	Applichem GmbH, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 3-2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Spezifikation (Artikel-Nr.)	Hersteller
Aminosäurenanalysen-Säule	Kationenaustauscher LCA K07/Li	Sykam, Fürstenfeldbruck
Chromatographiesäule	Econo® Column, 25 cm, Durchmesser 1,5 cm	BioRad Lab., München
Einmalküvetten	1 cm Schichtdicke, PMMA, 4,5 ml und 2,5 ml	Brand GmbH, Wertheim
Einwegspritzen	1 ml	Henke Sass Wolf
Eppendorf-Tubes	1,5 ml, 2,0 ml, safe lock	Eppendorf AG, Hamburg
Faltenfilter		Muktell & Filtrak GmbH, Bärenstein
HPLC Vials	1,5 ml Glas, ggf. mit Inserts (200 μ l)	VWR, Darmstadt

HPLC-Säule analytisch	Europer 100 C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Vorsäule; 25VE181ESJ	Knauer GmbH, Berlin
HPLC-Säule präparativ	Europer 100 C-18, 250 x 16mm, 10 µm, Vorsäule	Knauer GmbH, Berlin
Küvetten für UV	Quarz, 1 cm Schichtdicke	Hellma
Membranfilter Lösungsmittel-filtration	0,45 µm, d = 47 mm, PP-Membran	Pall, Crailsheim
NMR-Röhrchen	506-P-7, 178 mm	Norell, Landisville USA
Parafilm		Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Glas, 225 mm	VWR, Darmstadt
Pipetten-Spitzen	5-200 µl, 100-1000 µl	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße	Glas, versch. Größen (10-50 ml)	VWR, Darmstadt
Rührspatel		r-Biopharm, Darmstadt
Rundfilter (quantitativ)	389 Filter, 55 mm, Weißpunkt; 3.102.055	Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein
Schraubdeckel für Vials		
Septen HPLC-Vials	d = 8 mm, PTFE-beschichtet	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm, d = 13 mm, PP-Membran	Pall, Crailsheim
Universalindikatorpapier		Feinchemie K.-H. Kallies, Sebnitz
Zentrifugenröhrchen	50 ml, 15 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht

Tab. 3-3 Verwendete Geräte

Name	Spezifikation (Artikel-Nr.)	Hersteller
Aminosäureanalysator	S4300	SYKAM, Fürstfeldbruck
Analysenwaage	BP 3100 S, Genauigkeit 0,01 g	Sartorius, Göttingen
Dispenser	1-5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
ESI-MS	Mariner Elektrosprayionisation und Flugzeitmassenspektrometer	PerSeptive Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Evaporator	Turbo Vap LV	Zymark, Ctr., Hopkinton, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2	Martin Christ, Osterode
Heizrührwerk		IKA Labortechnik, Staufen
Inkubationsschrank	BE 400	Memmert, Schwabach
Kolbenhubpipetten	Reference und Research, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten-Reader	Multiscan Ascent V1.2	Thermo Sci, Langenselbold
NMR-Spektrometer	DRX-500	Bruker, Reinstetten
pH-Meter	InoLab Level 1, Messkette: InLab Semi-Micro	Mettler-Toledo, Weilheim
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg

Material und Methoden

Präzisionswaage	BP 121 S, Genauigkeit 0,0001 g	Sartorius, Göttingen
Trockenschrank	Modell 200	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 Super	Bandelin, Berlin
UV/Visible Spektrophotometer,	Specord S100	Analytik Jena
Vakuumrotationsverdampfer	Laborota 4000 mit Membranpumpe MZ2C und Controller CVC2	Heidolph, Schwabach und Vaccubrand, Schwabach
Vakuumrotationsverdampfer	Heidolph VV 2000 mit WB 2000 und Wasserstrahlpumpe	Heidolph, Schwabach
Vortexer	Minishaker MS-1	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge	Eppendorf 580-4R	Eppendorf AG, Hamburg

HPLC analytisch: Äkta 10 XT mit Autosampler A-900, binärer Hochdruckpumpe P-900, UV-Detektor UV-900 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Degasser K-5004 (Knauer, Berlin), Säulenthermostat IWN CH 100 (Junedis-IWN Elektronik GmbH, Gröbenzell); Datenaufnahme mittels Unicorn 4.1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

HPLC semipräparativ: Knauer WellChrom HPLC-System, Solvent Organizer K-1500, zwei Pumpen K-1001, UV-Detektor K-2501, Fraktionierungsventil K-16, Degasser K-5004, Säulenthermostat; Datenaufnahme mittels Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)

2.1.3 Materialien für Zellkulturarbeiten

Tab. 3-4 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte für Zellkulturarbeiten

Name	Spezifikation (Artikel-Nr.)	Hersteller
AKASOLV Aqua Care	AN93.1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Absaugvorrichtung	Vaccu Hand Control	Vaccubrand, Wertheim
Autoklav	DB 23	Systec Labor-Systemtechnik GmbH, Wettenberg
CO ₂ -Inkubationsschrank	CB 150	Binder, Tuttlingen
Desinfektionsmittel (Hände)		Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM	high glucose 4,5 g/l, with L-Glutamin; E15-810	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Elektronische Pipettierhilfe	Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Elektrophoresekammer	B1	Owl Separation Systems Inc., Porthmouth

Fötales Kälberserum FKS	tested for mycoplasma and for endotoxin	Biochrom AG, Berlin
Fötales Kälberserum FKS	FKS Gold EU approved; A15-151	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Giemsa-Lösung	für Mikroskopie; T862.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Handdispenser (Stepper)	Handy Step	Brand GmbH&CoKG, Wertheim
Kryoröhrchen	3,8 /4,5 ml, Außengewinde, gammasteril; 8904-00, 8905-00	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Kryoröhrchen	2,0 ml, steril; PAA535002	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Latexhandschuhe		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mikroskop	Eclipse TS 100	Nikon, Düsseldorf
MultiGuard Barrier Tips	0,1-20,0 µl, 100-1000µl	Sorenson BioScience, Inc.
Mycoplasma PCR Detection Kit	Venor [®] GeM	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Mycoplasma-Off, Flächendesinfektionsspray	15-5000	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Neubauer-Zählkammer	REF 0640010, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²	Marienfeld GmbH&CoKG, Lauda-Königshofen
Penicillin / Streptomycin	10 x konzentriert, P11-010	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pipettenspitzen	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Plastibrand PD Tips	500-5000 µl	Brand, Wertheim
Schüttler	Polymax 1046	Heidolph Polymax
Sekuroka Entsorgungsbeutel	305 x 660 mm; A195.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, einzeln steril, pyrogenfrei; 86.1685.001, 86.1254.001, 86.1253.001	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Spritzen (ohne Kanüle)	10 ml, steril	Norm-Ject, Henke Sass Wolf
Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm, PES-Membran, einzeln steril; 9972-21	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm, PES-Membran, einzeln steril; PA59.1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sterilbank	Herasafe	Heraeus GmbH, Hanau
Sterilklebeband	Heißluft-Indikator, 50 m x 19 mm; 072-040	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl, 500 U	Promega, USA
Thermocycler	Personal Cycler	Biometra GmbH, Göttingen
Trypanblau	0,40 %	PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA	1x konzentriert, L11-004	PAA Laboratories GmbH
Tubes	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	FT-20/312 Fisherbrand	Herolab GmbH Laborgeräte
Vakuumpumpe	VCZ 224	ILMVAC, Ilmenau
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , gammasteril; 9076-00	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig

Zellkulturschalen	60 x 15 mm, gammasteril; 9360-00	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zellkulturtestplatten 24well	4er Pack steril; 9224-40/TPP92424	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zentrifugenröhrchen	50 ml, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	14 ml, steril; 9116-00/TPP91016	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig

2.1.4 Materialien für mikrobiologische Arbeiten

Tab. 3-5 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte für mikrobiologische Arbeiten

Name	Spezifikation (Artikel-Nr.)	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	A0839	Applichem GmbH, Darmstadt
CO ₂ -Inkubationsschrank		Binder, Tuttlingen
Cryoröhrchen	2 ml	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Desinfektionsmittel		Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Gentamycin-Sulfat	A01492	Applichem GmbH, Darmstadt
Kolbenhubpipetten	10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatte	96well, Flachboden, einzeln steril verpackt; 9296-00/TPP92096	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Müller-Hinton-Bouillon	11 ml Röhrchen, 3655r	heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
Natriumchlorid		Grüssing, Filsum
Pipettenspitzen	5 – 200 µl, 100 – 1000 µl	VWR, Darmstadt
Sekuroka Entsorgungsbeutel	305 x 660 mm; A195.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spritzen, steril	2 ml, steril	Norm-Ject, Henke Sass Wolf
Spritzenvorsatzfilter, steril	0,2 µm, PES-Membran, steril	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus GmbH, Hanau
Vancomycin-Hydrochlorid	A1839	Applichem GmbH, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen	50 ml, steril, pyrogenfrei; 62.559.001	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht

2.2 Probenmaterial

Die in Tab. 3-6 und Tab. 3-7 aufgeführten Honige fanden Eingang in die Untersuchungen.

Tab. 3-6 Manuka-Honige

Honig, Probencharakterisierung	Anzahl	Firma	
Frischer Honig, Blends (ohne Angaben)	14	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	A), F)
Frischer Honig, Blends aus 16 verschiedenen Gegenden NZ (verschlüsselt, ohne Angaben)	34	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	B)
Frischer Rohhonig aus Coromandel, East Coast, Kawhia, Northland, Taranaki, Taupo	12	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	C), G)
Manuka Honey, MGO™ 100+ / 250+ / 400+ / 550+	4	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	D), F), G), H), L)
Manuka Honey, Blends (130211, 140711, 290611, ohne Angabe)	4	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	C), D), F), H), L)
Manuka Honey, Active 10+	1	Airborne Honey Ltd., Leeston, Neuseeland	L)
Active Manuka Honey, UMF® 10+ / 10+ / 25+	3	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	C), D), F), L)
Manuka Honey, UMF® Active 5+ / 10+ / 20+	3	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen	D), F)
Manuka Honey, ohne Angabe und UMF® Active 5+ / 10+ / 20+ / 25+	5	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen	K)
Organic Manuka Honey, UMF 10+	2	Manuka Health New Zealand Ltd., Te Awamutu, Neuseeland	C), D), F), G), H)
Bio-Manuka-Honig	2	Hoyer GmbH, Polling	C), D), F), G), I)
Honey Mart, Manuka Honey, MGO™ 100+ / 250+	2	Vistern Health Sdn Bhd, Kuala Lumpur, Malaysia	G)
Jellybush Honey, Blends, ULF 16+ / 20+	2	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen	C)
Manuka Honey, Blends (ohne Angabe)	4	Comvita New Zealand Ltd., Te Puke, Neuseeland	K)
Bee Vital, Active Manuka Honey, Active 10+ / 15+	2	Capilano Honey Ltd., Richlands, Australien	C)
Manuka Choice, Active Manuka Honey, AMF 7+ / 12+ / 15+ / 15+	4	Manuka Coice, Wedderspoon Organic Inc., Duncan, Kanada	C), I)
Manuka Honey, Active 15+	1	Boyne Valley Group, Drogheda, Co. Louth, Irland	C)

A) MGO-Bildung (Kapitel 4.1.1), B) Pflanzenanalytik (Kapitel 4.1.2), C) DHA und MGO in Honig (Kapitel 4.1.4), D) Honiginhaltsstoffe (Kapitel 4.2.1), E) Einfluss DHA-Umsetzung (Kapitel 4.2.2), F) HMF-Analytik (Kapitel 4.3.1), G) Enzymaktivität (Kapitel 4.3.2), H) Erhitzung (Kapitel 4.3.3), I) Mikrobiologische Untersuchung (Kapitel 4.4), K) Antioxidative Kapazität (Kapitel 4.5), L) Zytotoxizität (Kapitel 4.6)

Tab. 3-7 Vergleichshonige anderer botanischer Herkunft

Honig, Herkunft	Firma	
Akazie (Deutschland)	Privatimkerei Förtsch	C), D), E), F)
Akazie (EG- und Nicht-EG-Länder)	Bienenwirtschaft Meißen GmbH, Meißen	C), D), E), F)
Australische Buschblüte (Australien, Südamerika)	Bihophar Honig, Fürsten-Reform Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, Braunschweig	C), D), E), F), I), L)
Blüte (Deutschland, 3 Proben)	Imkerei Hohmann GbR, Nidda	K)
Blüte (EG- und Nicht-EG-Länder)	Langnese Honig GmbH & Co. KG, Bargteheide	D), F), K)
Blüte (Thailand, 2 Proben)	Lamphun / Chiangmai, Thailand	D), F), K)
Feldblüte (Deutschland)	Privatimkerei Hugh, Weinböhla	L)
Heide (EG-Länder)	Bihophar Honig, Fürsten-Reform Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, Braunschweig	C), D), E), F), L)
Kastanie (Frankreich, Italien)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	C), D), E), F)
Leatherwood (Australien)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	C), D), E), L)
Raps (Deutschland)	Privatimkerei Förtsch, Nürnberg	C), D), E), F)
Raps (Deutschland)	Privatimkerei Hugk, Weinböhla	L)
Raps (EG- und Nicht-EG-Länder)	Bienenwirtschaft Meißen GmbH, Meißen	C), D), E), F), G), H), I), L)
Rewarewa (Active 10+, Neuseeland)	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen	D), F)
Sonnenblume (EG- und Nicht-EG-Ländern)	Bienenwirtschaft Meißen GmbH, Meißen	C), D), E), F)
Vipers Buglos (Neuseeland)	Airborne Honey Ltd., Leeston, Neuseeland	L)
Beech Forest (Neuseeland)	Airborne Honey Ltd., Leeston, Neuseeland	D), F)
Dunkle Waldtracht (EG- und Nicht-EG-Länder)	Bienenwirtschaft Meißen GmbH, Meißen	C), D), E), F), G), L)
Eukalyptus (Australien, Südamerika)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	L)
Pinie und Wald (Frankreich)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	C), D), E), F), L)
Tanne (EG-Länder)	Bihophar Honig, Fürsten-Reform Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, Braunschweig	C), D), E), F), L)
Thymian (Italien, Neuseeland)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	C), D), E), F)
Wald („Blattlaus“, Deutschland)	Privatimkerei Förtsch, Nürnberg	C), D), E), F)
Wald (EG- und Nicht-EG-Länder)	DE-VAU-GE Gesundheitswerk GmbH, Lüneburg	D), F), L)
Wald (Südamerika, Spanien)	L.W.C. Michelsen GmbH, Hamburg	L)
Wild Flora (Active 10+, Neuseeland)	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen	D), F)

^{A)} MGO-Bildung (Kapitel 4.1.1), ^{B)} Pflanzenanalytik (Kapitel 4.1.2), ^{C)} DHA und MGO in Honig (Kapitel 4.1.4), ^{D)} Honiginhaltsstoffe (Kapitel 4.2.1), ^{E)} Einfluss DHA-Umsetzung (Kapitel 4.2.2), ^{F)} HMF-Analytik (Kapitel 4.3.1), ^{G)} Enzymaktivität (Kapitel 4.3.2), ^{H)} Erhitzung (Kapitel 4.3.3), ^{I)} Mikrobiologische Untersuchung (Kapitel 4.4), ^{K)} Antioxidative Kapazität (Kapitel 4.5), ^{L)} Zytotoxizität (Kapitel 4.6)

Modell- bzw. Kunsthonig: Für Modellumsetzungen wurde eine im Folgenden als Kunsthonig bezeichnete, honiganaloge Zuckermatrix nach den Angaben von *Wahdan (1998)* hergestellt. Hierfür wurden 46,5 g D-Fructose mit 34,0 g D-Glucose und 1,5 g Saccharose in einem Becherglas mit 18,0 g dest. Wasser versetzt und unter Rühren homogenisiert.

Dotierung von Honig

Für Bildungsstudien wurden ausgewählte Honigproben sowie Kunsthonig mit weiteren Substanzen wie DHA oder Aminosäuren versetzt. Diese Zusätze wurden dabei als Feststoff in ein Reaktionsgefäß eingewogen, mit einer definierten Menge an Honig versetzt und mittels Rührspatel homogenisiert.

Lagerung und Erhitzung von Honig

An ausgewählten Honigproben wurden Lagerungsvorgänge simuliert, indem sie in verschlossenen Reaktionsgefäßen für 6 Wochen bei 37 °C im Inkubationsschrank belassen wurden. Darüber hinaus wurden frische Manuka-Honige auch bis zu 24 Wochen bei 37 °C inkubiert. Um Erhitzungsvorgänge zu simulieren, wurden einige Honige in verschlossenen Reaktionsgefäßen bei 70 °C für 10 min (Kurzzeiterhitzung) bis zu 24 h (Langzeiterhitzung) inkubiert.

Pflanzenproben

An Manuka-Pflanzen standen insgesamt 136 Proben aus 18 Gegenden Neuseelands, die durch verschlüsselte Kennzeichnung nicht näher bekannt waren, zur Verfügung (Tab. 3-8). Diese Proben bestanden aus Manuka-Zweigen mit Blättern und Blüten. Zudem wurden die Blüten einheimischer Rapspflanzen gesammelt.

Tab. 3-8 Manuka-Pflanzen aus verschiedenen Gegenden Neuseelands

Gebiet Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anzahl	5	14	8	11	9	3	6	8	5
Gebiet Nr.	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Anzahl	8	7	6	6	5	9	10	9	7

Weitere Bienenprodukte

Bei der Beurteilung der antioxidativen Kapazität kamen neben Honig die Bienenprodukte Propolis, Gelée Royal und Pollen zur Anwendung (Tab. 3-9).

Tab. 3-9 Bienenprodukte neben Honig

Produkt, Herkunft	Firma
Propolis-Granulat (Deutschland)	Imkerei Hohmann GbR, Nidda
Kittharz; fein gemahlen (Südamerika)	Imkerprodukt, nicht näher gekennzeichnet
Propolis-Tinktur (Neuseeland)	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen
Gelée Royal (Deutschland, 2 Proben)	Imkerei Hohmann GbR, Nidda
Gelée Royal (Deutschland)	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen
Gelée Royal (Deutschland)	Apopharm G. Müller
Blütenpollen (Deutschland, 2 Proben)	Imkerei Hohmann GbR, Nidda
Blütenpollen (Neuseeland)	Honey New Zealand, Das Neuseelandhaus, Berkamen

2.3 Bestimmung von Carbonylverbindungen

2.3.1 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig und Pflanzen

Die Honige wurden auf den Gehalt an 3-Desoxyglucoson (3-DG) und Methylglyoxal (MGO) untersucht, indem sie einer Derivatisierung mit o-Phenylendiamin (OPD) zur Bildung UV-aktiver Chinoxaline unterzogen wurden (*Weigel et al., 2004; Mavric et al., 2008*, Abb. 3-1).

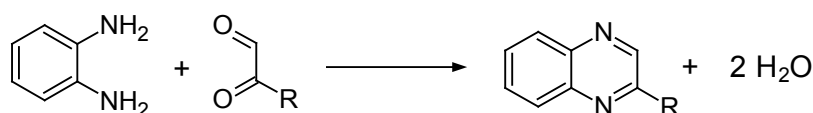


Abb. 3-1 Reaktionsschema zur Bildung der Chinoxaline aus 1,2-Dicarbonylverbindungen und OPD
 $R = \text{CH}_3$ für MGO und $R = \text{CH}_2(\text{CHOH})_2\text{CH}_2\text{OH}$ für 3-DG

Reagenz- und Standardlösungen

Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5): Durch Mischen von jeweils 0,5 M wässrigen Lösungen an Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat war mittels pH-Elektrode ein pH von 6,5 einzustellen.

Perchlorsäure-Lösung (0,5 M): Eine zur Verfügung stehende 20%ige Perchlorsäure-Lösung wurde mit dest. Wasser 1:4 verdünnt.

Kaliumcarbonat-Lösung: Es wurde eine gesättigte Lösung durch Einwaage von 56 g Kaliumcarbonat auf 50 ml dest. Wasser hergestellt.

OPD-Lösung (1%): Zur Derivatisierung wurde eine 1%ige Lösung von o-Phenylendiamin (OPD) in Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5) hergestellt.

MGO-Stammlösung: Es wurden 100 µl MGO-Standard (40% in Wasser, w/v) im Maßkolben zu 10 ml mit dest. Wasser gelöst. Hiervon wurden 900 µl auf 10 ml mit dest. Wasser verdünnt. Es resultiert eine Stammlösung von 5,8 M (421,5 mg/l).

3-DG-Stammlösung: Es wurden 26,8 mg 3-DG-Synthesestandard in dest. Wasser gelöst und auf 25 ml aufgefüllt. Daraus resultiert eine Stammlösung von 6,5 M (1056 mg/l).

Aufbereitung der Honigproben

Es wurden 10%ige Honiglösungen in Phosphatpuffer (0,5 M) hergestellt. Zur Derivatisierung war 1 ml Probelösung mit 0,3 ml OPD (1%) sowie 0,3 ml Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5) zu versetzen und bei Raumtemperatur über Nacht zu inkubieren. Nach Membranfiltration (0,45 µm) in Vials wurden die Proben zur HPLC eingesetzt.

Aufbereitung der Pflanzenproben

Die Behandlung der Manuka-Pflanzen erfolgte auf Basis von *Yadav et al. (2005)*. Hierzu wurde 1 g von Manuka-Zweigen abgelesenem Pflanzenmaterial, bestehend aus Blüten und Blättern, mit 5 ml Perchlorsäure (0,5 M) versetzt und für 30 min auf Eis extrahiert. Anschließend wurde der Überstand mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert und auf 10 ml mit Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5) aufgefüllt. Zur Analyse auf MGO wurde analog zu den Honigen 1 ml Probelösung mit OPD derivatisiert.

HPLC-Messung

Die Messung der Chinoxaline erfolgte mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei 312 nm. Die dazugehörigen Analysenparameter sind in Tab. 3-10 aufgeführt.

Tab. 3-10 Analysenparameter für RP-HPLC zur Untersuchung der Chinoxaline

Säule	Eurosper 100 RP-18, 5µm, 250 x 4,6 mm, mit integrierter 10 mm - Vorsäule, Knauer, Berlin				
Säulentemperatur	30 °C				
Injektionsvolumen	20 µl (Honig) bzw. 50 µl (Pflanzenproben)				
Flussrate	0,8 ml/ min				
Elutionszeit	31 min				
Wellenlänge	312 nm				
Eluenten	FM A: 0,075% Essigsäure in Reinstwasser FM B: 20% FM A und 80% Methanol (HPLC-grade)				
Gradient	Zeit [min]	0	1	21	31
	FM B [%]	40	40	100	40

Zur Quantifizierung von MGO und 3-DG diente eine externe Kalibrierung nach *Mavric et al. (2006)*. Die Stammlösungen wurden entsprechend Tab. 3-11 mit dest. Wasser verdünnt und in gleicher Weise wie die Probelösungen mit OPD derivatisiert.

Tab. 3-11 Kalibrierung für MGO und 3-DG

Nr.	Volumen [ml]			Konzentration [mM]		Konzentration [mg/kg]	
	MGO	3-DG	Wasser	MGO	3-DG	MGO	3-DG
1	2,00	1,00	2,00	2,32	1,30	168,6	211,2
2	1,50	0,80	2,70	1,74	1,04	126,5	169,0
3	1,00	0,60	3,40	1,16	0,78	84,3	126,7
4	0,50	0,40	4,10	0,58	0,52	42,2	84,5
5	0,10	0,20	4,70	0,12	0,26	8,4	42,2
6	0,01	0,10	4,89	0,01	0,13	0,8	21,1

2.3.2 Dihydroxyaceton in Honig

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Dihydroxyaceton (DHA) in Honigproben etabliert. Die Bedingungen, welche aus der Optimierung hierfür resultierten, sind im Folgenden aufgeführt.

Reagenz- und Standardlösungen

Acetatpuffer (0,5 M, pH 4,0): Mittels pH-Elektrode wurde eine 0,5 M Essigsäure-Lösung mit 0,5 M Natriumacetat-Lösung auf pH 4,0 eingestellt.

OPD-Lösung: Zur Derivatisierung wurde eine 1%ige OPD-Lösung in Acetatpuffer (0,5 M, pH 4,0) hergestellt.

DHA-Stammlösung: Es wurden 16,5 mg DHA mit Acetatpuffer (0,5 M, pH 4,0) gelöst und im Maßkolben auf 5 ml aufgefüllt. Die Lösung ist stets frisch herzustellen.

Aufbereitung der Honig- und Blütenproben

Zur Probenvorbereitung wurden die zu untersuchenden Honige in 0,5 M Acetatpuffer gelöst, sodass 10%ige Lösungen resultierten. Die Aufarbeitung der Blüten erfolgte nach *Adams et al. (2009)* durch Extraktion von 20 g Blüten mit 20 ml dest. Wasser über 4 h. Nach Filtration wurde unter einmaligem Nachspülen auf 25 ml im Maßkolben mit dest. Wasser aufgefüllt.

HPLC-Messung

Die Proben wurden mit OPD (1%) für 16 h bei 37 °C im Inkubationsschrank derivatisiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Standardaddition nach dem in Tab. 3-12 angegebenen Schema. Hierfür wurde die DHA-Stammlösung 1:10 (D1) und 1:5 (D2) mit Acetatpuffer verdünnt. Die Messung des Chinoxalins von DHA erfolgte analog zu den 1,2-Dicarbonylverbindungen mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei 312 nm (Vgl. Kapitel 3.3.1).

Tab. 3-12 Pipettierschema zur Quantifizierung von DHA in Honig

Ansatz	Probe	OPD	Acetatpuffer	D1	D2
A	700 µl	210 µl	210 µl		
B	700 µl	210 µl		210 µl	
C	700 µl	210 µl			210 µl

Bestimmung von Validierungsparametern

Linearität und Wiederfindung wurden mittels 10%iger Kunsthoniglösung nach *Wahdan (1998)* unter Zusatz von DHA vor der Aufarbeitung bestimmt. Dabei wurden DHA-Konzentrationen im Bereich 0,18 bis 2,20 mM geprüft, was Gehalten von 165 bis 1980 mg/kg in Honigproben entspricht. Die Wiederholbarkeit der Methode wurde durch zehnmalige Bestimmung des DHA-Gehaltes eines Manuka-Honigs an verschiedenen Tagen ermittelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mittels Blindwertmethode berechnet. Hierzu wurde der Blindwert (10%ige Kunsthoniglösung) in zehn unabhängigen Bestimmungen ermittelt. Der daraus resultierende Mittelwert mit drei- bzw. neunfacher Standardabweichung ergibt die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze (*Funk, 2005*).

2.3.3 5-Hydroxymethylfurfural in Honig

Die Bestimmung von Hydroxymethylfurfural (HMF) erfolgte nach *Weigel et al. (2004)*.

Reagenz- und Standardlösungen

Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5): Durch Mischen von jeweils 0,5 M wässrigen Lösungen an Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat war mittels pH-Elektrode ein pH von 6,5 einzustellen.

HMF-Stammlösung: Es wurden 40,4 mg HMF-Standard in dest. Wasser gelöst und im Maßkolben auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 1:10 mit dest. Wasser verdünnt, sodass eine Stammlösung von 0,32 mM (40,4 mg/l) resultiert.

Aufbereitung der Honigproben und HPLC-Messung

Zur Analyse wurden 10%ige Honiglösungen analog den Angaben aus Kapitel 3.3.1 nach Membranfiltration (0,45 µm) eingesetzt. Die Messung von HMF erfolgte per RP-HPLC mit UV-Detektion bei 283 nm nach den in Tab. 3-13 aufgeführten Parameter. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung, wozu eine HMF-Stammlösung mit dest. Wasser auf 0,8 bis 40,0 µM, entsprechend 0,10 bis 5,05 mg/kg, verdünnt wurde.

Tab. 3-13 Analysenparameter für RP-HPLC zur Untersuchung von HMF

Säule	Eurospers 100 RP-18, 5µm, 250 x 4,6 mm, mit integrierter 10 mm - Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	30 °C
Injektionsvolumen	50 µl
Flussrate	0,8 ml/ min
Elutionszeit	30 min
Wellenlänge	283 nm
Eluenten	FM A: 0,05 M Phosphatpuffer pH 5,5 in Wasser (HPLC-grade) FM B: 20% FM A und 80% Methanol (HPLC-grade)
Isokratische Elution	20% FM B

2.3.4 3,4-Didesoxyglucoson-3-en

Reagenzlösungen

Ammoniumformiat-Puffer (0,1 M, pH 4,5): Es wurden 0,158 g Ammoniumformiat in etwa 20 ml dest. Wasser gelöst und nach Einstellung des pH-Wertes von 4,5 mit dest. Wasser auf 25 ml aufgefüllt.

Glucose-Lösung (20%): 5 g Glucose wurden mit Ammoniumformiat-Puffer (0,1 M, pH 4,5) wird unter leichtem Erwärmen gelöst und auf 25 ml aufgefüllt.

Synthese und Messung von 3,4-Didesoxyglucoson-3-en (3,4-DGE)

Das Vorgehen zur Synthese von 3,4-DGE orientierte sich an den Angaben von *Frischmann et al. (2009)*. Hierzu wurde eine 20%ige Glucose-Lösung in einem Hydrolyseröhrchen im Sandbad bei 120 °C für 4 h erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Zur Prüfung auf eine Anwesenheit von 3,4-DGE wurde 1 ml der synthetisierten Lösung mit 0,3 ml OPD (1%) und 0,3 ml Phosphatpuffer (0,5 M, pH 6,5) versetzt (Vgl. Kapitel 3.3.1), jedoch nur für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Eine Messung per RP-HPLC nach Membranfiltration (0,45 µm) wurde nach Tab. 3-10 unter Berücksichtigung von 334 nm als zusätzlicher Wellenlänge durchgeführt.

2.4 Isolierung von 2-Hydroxymethylchinoxalin

2.4.1 Semipräparative HPLC

Zur Isolierung des aus DHA und OPD gebildeten Produkts diente eine DHA-Standardlösung in Wasser (2500 mg/l), welche mit OPD (1% in 0,5 M Acetatpuffer pH 4,0) für 16 h bei 37 °C im Inkubationsschrank derivatisiert wurde. Die Bedingungen zur Separation des gebildeten Produkts mittels semipräparativer HPLC sind in Tab. 3-14 dargestellt. Dabei wurde das Eluat von 16,4 bis 19,4 min gesammelt, bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend in 2 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Tab. 3-14 Analysenparameter zur Isolierung von Chinoxalinen mittels semipräparative HPLC

Säule	Eurospcr 100-8 C18, 33 x 8 mm, mit integrierter Vorsäule, Knauer, Berlin							
Säulentemperatur	30 °C							
Injektionsvolumen	2 ml							
Flussrate	1,6 ml/ min							
Wellenlänge	312 nm							
Eluenten	FM A: 0,075% Essigsäure in Wasser (HPLC-grade) FM B: 20% FM A und 80% Methanol (HPLC-grade)							
Gradient	Zeit [min]	0	1,2	15,2	18,2	20	23	31
	FM B [%]	40	40	86	95	100	40	40

2.4.2 Methoden zur Identifizierung

LC-MS: Mittels LC-MS wurde die Molmasse des isolierten Derivats bestimmt. Die chromatographische Trennung erfolgte dabei analog den Angaben aus Kapitel 3.3.1 nach Injektion von 50 µl Lösung des erhaltenen Eluats nach semipräparativer HPLC. Die Detektion wurde neben Bestimmung der UV-Absorption bei 312 nm mit electrospray-ionisation time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) im Positivmodus realisiert.

NMR: Die Aufnahme des ¹H-NMR-Spektrums wurde durch Frau Dr. Gruner und Frau Rudolph am Institut für Organische Chemie durchgeführt. Hierzu wurde die gefriergetrocknete Fraktion in 750 µl Deuteriumoxid gelöst. Die Messung des Spektrums erfolgte bei 500 MHz.

UV: Mittels Spektrophotometer wurde ein Absorptionsspektrum von 200 bis 400 nm des Isolats, welches zuvor in Reinstwasser gelöst wurde, aufgenommen.

2.5 Analytische Charakterisierung von Honig

2.5.1 Bestimmung von pH-Wert und Wassergehalt

Der pH Wert von Honig wurde nach *Weigel (2004)* mittels Glaselektrode bei Raumtemperatur in 30%igen wässrigen Honiglösungen ermittelt.

Der Wassergehalt wurde refraktometrisch bestimmt (*Weigel, 2004; SLMB, 2004*). Hierzu wurden je ca. 4 g Honig in einem verschlossenen Glasgefäß bei 50 °C im Trockenschrank verflüssigt und nach Abkühlen sowie Mischen der Brechungsindex bestimmt. Die Berechnung des Wassergehaltes ergibt sich nach *SLMB (2004)*.

2.5.2 Bestimmung von Glucose und Fructose

Der Gehalt an Glucose und Fructose wurde enzymatisch ermittelt (*SLMB, 2004*). Dabei wurde ein Enzymkit von R-Biopharm verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Reagenz- und Standardlösungen

Triethanolamin-Puffer (pH 7,6 mit NADP und ATP): Eine Mischung aus ca. 80 mg NADP und ca. 190 mg ATP wurden in 31 ml bidest. Wasser gelöst.

HK-G6P-Enzymsuspension: Die im Testkit enthaltene Suspension aus Hexokinase (HK) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6P) in Ammoniumsulfat kann nach vorsichtigem Mischen direkt eingesetzt werden.

PGI-Enzymsuspension: Die im Kit enthaltene Suspension an Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in Ammoniumsulfat kann nach vorsichtigem Mischen direkt zum Test eingesetzt werden.

Standard-Lösungen: D-Glucose und D-Fructose wurden jeweils zu 0,2 g auf 10 ml mit dest. Wasser gelöst und nochmals 1:100 mit dest. Wasser verdünnt. Es resultierte eine Standard-Lösung der Konzentration 1,1 mM Glucose bzw. Fructose.

Probenaufarbeitung und Messung

Von den zur Bestimmung einzusetzenden Honigproben wurden 2%ige wässrige Lösungen hergestellt, die nochmals 1:50 mit dest. Wasser verdünnt wurden. In Einwegküvetten wurden die Reagenz- und Probelösungen nach dem in Tab. 3-15 angegebenen Schema pipettiert und photometrisch bei 340 nm vermessen.

Tab. 3-15 Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung von Glucose und Fructose in Honig

	Honig	Blindwert	Standard
Triethanolamin-Puffer	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Honig-Lösung	100 µl	-	-
Standard-Lösung	-	-	100 µl
Bidest. Wasser	1900 µl	2000 µl	1900 µl
Mischen mittels Rührspatel, nach 3 min Messung der Extinktion (E ₁)			
HK-G6P-Enzymsuspension	20 µl	20 µl	20 µl
Mischen, nach 10 bis 15 min Messung der Extinktion (E ₂), nach 2 min wiederholen			
PGI-Enzymsuspension	20 µl	20 µl	20 µl
Mischen, nach 10 bis 15 min Messung der Extinktion (E ₃)			

Die Berechnung der Gehalte an Glucose und Fructose ergibt sich nach den Formeln:

$$\Delta E_{\text{Glucose}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe / Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blindwert}}$$

$$\Delta E_{\text{Fructose}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe / Standard}} - (E_3 - E_2)_{\text{Blindwert}}$$

$$c[\text{g/l}] = \frac{V \cdot M \cdot \Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \quad \text{wodurch sich ergibt:} \quad \begin{aligned} c_{\text{Glucose}} &= 0,8636 \cdot \Delta E_{\text{Glucose}} \\ c_{\text{Fructose}} &= 0,8693 \cdot \Delta E_{\text{Fructose}} \end{aligned}$$

$$c[\text{g}/100\text{g}] = \frac{c[\text{g/l}] \cdot 100 \cdot F}{EW}$$

c	Konzentration	ΔE	Extinktionsdifferenz
V	Gesamtvolumen	ε	Extinktionskoeffizient
M	Molmasse	d	Schichtdicke
v	Probenvolumen	F	Verdünnungsfaktor
EW	Probeneinwaage		

2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach der Methode nach Bradford bestimmt, wobei sich die Durchführung an den Angaben von *Bradford (1976)* und *Bogdanov (1981)* orientierte. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung mit γ -Globulin.

Reagenzlösungen

Farbreagenz: Es wurden 20 mg Coomassie Brilliantblau G-250 in 10 ml 95%igem Ethanol gelöst und mit 20 ml 85%iger Phosphorsäure versetzt. Mit dest. Wasser wurde auf ein Volumen von 200 ml aufgefüllt.

γ -Globulin-Stammlösung: Es wurden 10 mg γ -Globulin in dest. Wasser gelöst und unter Vermeidung einer Schaumbildung auf 50 ml im Maßkolben aufgefüllt. Unter nachfolgender Verdünnung von 1:5 mit dest. Wasser resultierte eine Stammlösung von 0,04 mg/ml.

Probenaufarbeitung und Messung

Zur Analyse wurden 1,6 ml einer 1%igen wässrigen Honiglösung in eine Einwegküvette gegeben und mit 0,4 ml Farbreagenz versetzt. Nach Mischen der Messlösung mittels Plümper wurde die Extinktion bei 595 nm nach etwa 10 min gemessen. Zur Korrektur der Extinktion wurde ein Blindwert von 1,6 ml dest. Wasser mitgeführt.

Zur Kalibrierung wurde die γ -Globulin-Stammlösung mit dest. Wasser verdünnt und die Kalibrierlösungen von 3,2 bis 16,0 $\mu\text{g/ml}$ analog den Proben behandelt und vermessen.

2.5.4 Aminosäureanalyse

Der Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in ausgewählten Honigproben wurde mittels Ionenaustausch-Chromatographie unter Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin nach *Henle et al. (1991)* ermittelt. Dazu wurde eine Anreicherung der Aminosäuren durch Isolieren aus der Honigmatrix mittels Kationenaustausch-Chromatographie gemäß den Angaben von *Bouseta et al. (1996)* und *González-Paramas et al. (2006)* durchgeführt.

Probenaufarbeitung durch Kationenaustausch-Chromatographie

Eine Chromatographiesäule (Durchmesser 1,5 cm) wurde mit 10 g Austauscherharz (Dowex[®] 50WX8) in Reinstwasser befüllt. Nach Überführung des Harzes in die aktive Form durch 50 ml 2 M HCl wurde mit Reinstwasser neutral gewaschen und die Probe wurde auf die Säule aufgegeben. Dazu wurde 1 g Honig in etwa 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 2,12) gelöst. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 50 ml Reinstwasser zum Entfernen der Probenmatrix. Die Aminosäuren wurden durch das Aufgeben von dreimal 50 ml 7 M Ammoniak eluiert. Nachfolgend konnte eine Regeneration des Säulenmaterials durch 50 ml 2 M NaOH, Waschen mit Reinstwasser, 50 ml 2 M HCl und erneutem Waschen mit Reinstwasser realisiert werden.

Das erhaltene Eluat wurde am Rotationsverdampfer mit Wasserstrahlpumpe bei ca. 40 °C zur Trockne eingengt und in 10 ml Reinstwasser aufgenommen. Nach Lyophilisation wurde der Rückstand in 1 ml 0,12 M Lithiumcitrat-Puffer (pH 2,2) gelöst. Zur Quantifizierung von Prolin war eine zusätzliche 1:2-Verdünnung mit Lithiumcitrat-Puffer (0,12 M, pH 2,2) nötig. Nach Membranfiltration (0,45 μm) wurden die Lösungen zur Messung eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte mit Standardgemischen (2,5 – 25 nmol pro Injektion).

Messparameter Chromatographie

Alle Aminosäureanalysen wurden durch Frau Karla Schlosser nach den in Tab. 3-16 sowie Tab. 3-17 angegebenen Parametern durchgeführt.

Tab. 3-16 Geräteparameter Ionenaustausch-Chromatographie zur Aminosäureanalyse

Säule	Kationenaustauscher LCA, K07/Li			
Flussrate	0,45 ml/min			
Injektionsvolumen	10 – 100 µl			
Eluenten	Puffer A-1:	Lithiumcitrat	pH 2,9	0,12 M
	Puffer B-1:	Lithiumcitrat	pH 4,2	0,30 M
	Puffer C-4:	Lithiumcitrat-Borat	pH 8,0	0,30 M
	Eluent D:	Regenerierlsg. Lithiumhydroxid		0,50 M
Gradientenelution				
Detektion	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin UV-VIS bei $\lambda = 570$ nm und $\lambda = 440$ nm Reaktortemperatur 130 °C			

Tab. 3-17 Gradientenprogramm Trennung mittels Lithiumsystem

Zeit [min]	A-1 [%]	B-1 [%]	C-4 [%]	D [%]	Säulentemperatur [°C]
0,0	85	15	0	0	
3,0	85	15	0	0	
4,0	79	21	0	0	42
21,0	43	57	0	0	
25,0	43	57	0	0	
25,0					
33,0	0	100	0	0	42 → 60
39,0	0	0	100	0	
40,0					
40,0					
43,0	0	0	68	32	60 → 74
46,0					
63,0	0	0	68	32	74
63,0					
63,1	0	0	0	100	
66,1	0	0	0	100	74 → 42
66,2	85	15	0	0	
71,0					
78,2	85	15	0	0	42

2.5.5 Gesamtphenolgehalt nach Folin

Der Gesamtphenolgehalt in Honig wurde photometrisch nach Folin-Ciocalteu ermittelt. Das eingesetzte Folin-Reagenz, das ein Gemisch aus Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure darstellt, wird dabei reduziert und der so entstehende Molybdänblau-Komplex kann bei 750 nm vermessen werden (*Singleton et al., 1999*).

Reagenzlösungen

Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung: Das Folinreagenz war 1:10 mit dest. Wasser zu verdünnen.

Natriumcarbonatlösung (0,7 M): Es wurden 3,71 g Natriumcarbonat in dest. Wasser gelöst und auf 50 ml aufgefüllt.

Gallussäure-Stammlösung: Es wurden 29,1 mg Gallussäure gelöst und auf 100 ml aufgefüllt, sodass eine 1,6 mM Stammlösung resultierte. Als Lösungsmittel diente hierfür eine 2%ige Lösung von Kunsthonig nach *Wahdan (1998)* in dest. Wasser.

Aufbereitung der Proben und Messung

Zur Analyse kamen 2%ige Honiglösungen in dest. Wasser zum Einsatz. In Einwegküvetten wurden 1000 µl Folin-Arbeitslösung sowie 800 µl Natriumcarbonatlösung zu 200 µl Probelösung pipettiert und mittels Rührspatel gemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h wurde die Extinktion bei 750 nm bestimmt. Zudem wurde ein Blindwert mit 200 µl dest. Wasser in analoger Weise aufgenommen.

Die Kalibrierung erfolgte mit Gallussäure in 2%iger Kunsthoniglösung im Bereich von 0,09 bis 0,43 mM (14,6 bis 72,8 mg/l). Die Standardlösungen wurden dabei analog den Proben behandelt und vermessen. Die Ergebnisse sind als Gallussäure-Äquivalente (GE) anzugeben.

2.5.6 Honigfarbe

Die Farbe von Honig wurde in ausgewählten Proben durch eine photometrische Messung nach *Brudzynski & Miotto (2011)* ermittelt. Dazu wurden die Extinktionen von 50%igen wässrigen Honiglösungen bei 560 und 720 nm am UV-Vis-Spektrometer gegen dest. Wasser als Referenz bestimmt. Die Differenz ΔE_{Farbe} dient dabei als Maß für die Honigfarbe.

$$\Delta E_{Farbe} = E_{720} - E_{560}$$

2.6 Enzymatische Untersuchungen

2.6.1 Bestimmung der Diastase-Aktivität nach Phadebas

Als Maß für die Aktivität der Diastase wurde die Diastasezahl (DZ) nach der Phadebas-Methode ermittelt (*Siegenthaler, 1975; SLMB 2004*). Hierbei hydrolysiert das Enzym ein unlösliches Stärkopolymer zu wasserlöslichen blauen Fragmenten, deren Intensität in direktem Zusammenhang mit der Aktivität der Diastase steht.

Reagenzlösungen

Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,2): Es wurden 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat in dest. Wasser gelöst, mit 100%iger Essigsäure auf den pH-Wert 5,2 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Probenaufarbeitung und Messung

Es wurden 5 ml einer 1%igen Honiglösung in 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) in ein Reagenzglas pipettiert und 5 min bei 40 °C im Wasserbad temperiert. Nach der Zugabe einer Phadebas-Tablette mittels Pinzette wurde die Lösung mit Hilfe des Vortexers 10 s intensiv gemischt und die Inkubation im Wasserbad bei 40 °C um genau 30 min fortgesetzt. Es folgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml 0,5 M NaOH-Lösung und Mischen am Vortexer (5 s). Nach sofortigem Filtrieren durch einen Faltenfilter wurde die Extinktion (E_{620} Probe) des Filtrates in 1 cm Küvetten bei 620 nm gemessen. In analoger Weise waren 5 ml Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,2) parallel als Blindwert mitzuführen (E_{620} Blindwert). Die Behandlung einer Probe war innerhalb einer Stunde durchzuführen.

Berechnung der Diastasezahl (DZ)

Um die erhaltenen Werte nach Phadebas als Diastasezahl in Schade-Einheiten anzugeben, ist die in der Kit-Anleitung aufgeführte Berechnung anzuwenden (*SLMB, 2004*).

$$DZ = 28,2 \cdot \Delta E_{620} + 2,64 \quad \text{mit} \quad \Delta E_{620} = E_{620} (\text{Probe}) - E_{620} (\text{Blindwert})$$

Für Diastasezahlen unter 6 ist die Berechnung nach *Oddo & Pulcini (1999)* zu modifizieren.

$$DZ = 35,2 \cdot \Delta E_{620} - 0,46$$

2.6.2 Bestimmung der Invertase-Aktivität

Zur Ermittlung der Invertase-Aktivität wurde p-Nitrophenyl- α -D-glycopyranosid (pNPG) als Substrat eingesetzt, dessen Umsatz durch das Enzym photometrisch bestimmt wurde (Siegenthaler, 1977; SLMB, 2004).

Reagenzlösungen

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0): Es wurden 11,66 g Kaliumdihydrogenphosphat und 2,56 g Dinatriumhydrogenphosphat in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

Substratlösung (pNPG): Es wurden 6,0252 g p-Nitrophenyl- α -D-glycopyranosid (pNPG) in Phosphatpuffer gelöst, wobei leicht erwärmt werden konnte, und nach Auffüllen auf 1 l wurde die Lösung in einer Braunglasflasche im Kühlschrank gelagert.

Sistierlösung (3 M, pH 9,5): Es wurden 363,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in dest. Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Mit 3 M HCl ist auf den pH 9,5 einzustellen.

Probenaufarbeitung und Messung

Zur Analyse wurde eine 20%ige Honiglösung in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) eingesetzt. Es wurden 0,50 ml dieser Lösung zu 5,0 ml Substratlösung, die zuvor im Wasserbad bei 40 °C für 5 min temperiert wurde, zugegeben und kurz mittels Vortexer durchmischt. Nach Inkubation bei 40 °C für exakt 20 min erfolgte die Zugabe von 0,50 ml Sistierlösung. Die Ansätze wurden erneut gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend war innerhalb 1 h die Extinktion in 1 cm Küvetten bei 400 nm zu messen (E_{400} Probe).

Von jeder Honigprobe war ein Blindwert mitzuführen. Hierfür wurden 5,0 ml Substratlösung analog bei 40 °C inkubiert, allerdings erfolgte die Zugabe der 0,05 ml Honiglösung erst nach Zugabe von 0,05 ml Sistierlösung. Im Anschluss wurde die Extinktion vermessen (E_{400} Blindwert).

Berechnung der Invertase-Aktivität (IA)

Die Invertase-Aktivität ergibt sich aus der Konzentration an umgesetztem Substrat, welche der Menge an gebildetem p-Nitrophenol im Versuch entspricht.

$$\Delta E_{400} = E_{400} (\text{Probe}) - E_{400} (\text{Blindwert})$$

$$\text{IA [U/kg]} = 158,94 \cdot \Delta E_{400}$$

wobei: 158,94 = Umrechnungsfaktor nach SLMB (2004)

2.7 Mikrobiologische Untersuchungen

2.7.1 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde der Mikrodilutionstest nach Standardvorgaben herangezogen (*Burkhart, 1992*). Die Durchführung der Tests erfolgte dabei am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene / Institut für Virologie der Technischen Universität Dresden. Die Arbeiten wurden dabei unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Hierfür waren die notwendigen Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte mit 70%igem Ethanol zu desinfizieren bzw. steril zu filtrieren (0,2 µm Membranfilter).

Kultivierung der Mikroorganismen

Für die Bestimmung der MHK wurden acht klinisch relevante Bakterienstämme gewählt, die in Tab. 3-18 aufgeführt sind. Diese wurden bis zur Verwendung auf Columbia Blutagar bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank kultiviert.

Tab. 3-18 Verwendete Bakterienkulturen im Mikrodilutionstest

„Wildtyp“-Stämme		
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>St.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>S.pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 29212
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 29922
Multiresistente Stämme		
<i>E.coli (ESBL)</i>	extended-spectrum beta-lactamase producing <i>E.coli</i>	
<i>St.aureus (MRSA)</i>	methicillin-resistent <i>St.aureus</i>	Mutation “Barnimer” Mutation “USA 300”
<i>P.aeruginosa res.</i>	multiresistant <i>P.aeruginosa</i>	

(ATCC = American Type Culture Collection)

Reagenzlösungen

Physiologische Kochsalzlösung (0,9%, pH 7): Es wurden 9 g Natriumchlorid auf 1 l dest. Wasser gelöst und zum Erhalt einer sterilen Lösung autoklaviert.

Zuckerbouillon: Kunsthonig nach *Wahdan (1998)* wurde zu 25,0% in Müller-Hinton-Bouillon gelöst und steril filtriert (0,2 µm).

Honigbouillon: MGO-armer Manuka-Honig (Gehalt 33 mg/kg) wurde zu 12,5% in Müller-Hinton-Bouillon gelöst und steril filtriert (0,2 µm).

Vorbereitung der Testsubstanzen

MGO-Stammlösung: Es wurden 109,4 µl Standardlösung (40% in Wasser, w/v) auf 5 ml im Maßkolben mit Reinstwasser verdünnt. Es ergibt sich ein Gehalt von 10240 mg/l.

Antibiotika-Stammlösungen: Als Antibiotika wurden die Substanzen Ampicillin, Gentamycin und Vancomycin verwendet, wobei jeweils 51,2 mg auf 5 ml Reinstwasser einzuwiegen waren. Es resultierten Stammlösungen von jeweils 10240 mg/l.

Durchführung des Mikrodilutionstests

Für den Einsatz im Mikrodilutionstest war von jeder Bakterienkultur ein Inokulum frisch am Untersuchungstag herzustellen. Hierzu wurde mittels Impföse etwas auf Columbia Blutagar gewachsene Bakterienkultur in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und am Densi-Check durch weiteres Verdünnen mit Kochsalzlösung auf einen McFarland-Standard von 0,5 eingestellt. Die so erstellte Bakteriensuspension wurde nachfolgend 1:50 mit Müller-Hinton-Bouillon verdünnt und dann als Inokulum zum Test eingesetzt.

Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden zur Erstellung von geometrischen Verdünnungsreihen nach Tab. 3-19 mit Müller-Hinton-Bouillon verdünnt. Zur Ermittlung der MHK von MGO wurde neben Müller-Hinton-Bouillon als Lösungsmittel zusätzlich eine Zucker- und Honigbouillon zum Erstellen der Verdünnungsreihe genutzt.

Tab. 3-19 Schema zur Erstellung der geometrischen Verdünnungsreihe für den Mikrodilutionstest

Konz. Stamm- lösung [mg/l]	Verdünnung	Konz. verdünnte Lösung [mg/l]	Konz. im Well [mg/l]	Well Nr.
10240	1:10	1024	512	1
1024	1:2	512	256	2
512	1:2	256	128	3
512	1:4	128	64	4
512	1:8	64	32	5
64	1:2	32	16	6
64	1:4	16	8	7
64	1:8	8	4	8
8	1:2	4	2	9
8	1:4	2	1	10
8	1:8	1	0,5	11
1	1:2	0,5	0,25	12

Der Mikrodilutionstest wurde auf 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden pro Vertiefung je 50 µl Testlösung vorgelegt (Vgl. Abb. 3-2) und mit 50 µl Inokulum versetzt. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von $5 \cdot 10^5$ koloniebildenden Einheiten (kBE) pro Well. Auf jeder Testplatte wurden sowohl eine Negativ- (100 µl Müller-Hinton-

Bouillon) als auch eine Positivkontrolle (50 µl Müller-Hinton-Bouillon versetzt mit 50 µl Inokulum) mitgeführt. Nach Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank für 18 h wurde visuell auf das Vorhandensein einer Trübung geprüft. Das letzte Well ohne Trübung einer Verdünnungsreihe stellt die MHK dar.

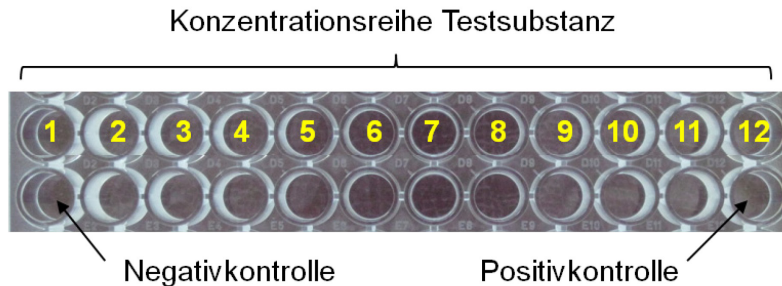


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Probenauftragung im Mikrodilutionstest

2.7.2 Stabilitätsprüfung von Methylglyoxal in Bouillon

Die Stabilität von MGO wurde in den Lösungsmitteln Wasser, Müller-Hinton-Bouillon und Honigbouillon (12,5% und 25,0% Honiganteil) untersucht indem die Lösungen analog den Testbedingungen bei 37 °C inkubiert wurden. Zur Herstellung der Honigbouillon diente ein MGO-armer Manuka-Honig (Vgl. Kapitel 3.7.1). Der Gehalt an MGO wurde mit RP-HPLC, wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, nach 0 h, 2 h und 18 h ermittelt.

Eine wässrige MGO-Stammlösung nach Kapitel 3.7.1 wurde jeweils 1:80 mit den genannten Lösungsmitteln verdünnt. Es resultierte eine MGO-Konzentration von 128 mg/l im Ansatz, was Well Nr. 3 der MGO-Verdünnungsreihe im Mikrodilutionstest entspricht. Parallel dazu wurden die einzelnen Lösungsmittel ohne MGO als Blindwerte mitgeführt.

2.7.3 Mikrobiologische Untersuchungen an Manuka-Honig

Prüfung auf Mikroorganismen in Manuka-Honig

Ausgewählte Manuka-Honige sowie zwei Blütenhonige anderer botanischer Herkunft (Raps- und Buschblüte) wurden auf die Anwesenheit von Mikroorganismen mittels Wachstumsversuche geprüft. Hierfür wurden 10%ige Honiglösungen in physiologischer Kochsalzlösung auf ausgewählten Agarplatten unter sterilen Bedingungen fraktioniert ausgestrichen. Eine Übersicht über die verwendeten Nähragar und ihre selektiven Wachstumseigenschaften gibt Tab. 3-20. Zusätzlich wurde je ein Ansatz Schädler-Bouillon (flüssig) mit den Proben beimpft. Nach Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 h bzw. 48 h erfolgte eine visuelle Prüfung auf vorhandenes Wachstum.

Tab. 3-20 Agarplatten zur Prüfung auf Mikroorganismen in Honig

Agarplatte	Farbe	Anwendung / Selektivität
Columbia Blutagar	rot	anspruchsvolle Bakterien (allgemein), Nachweis Hämolyse
Kochblutagar (Schokoladenagar)	dunkelrot-bräunlich	anspruchsvolle Bakterien (allgemein)
Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar	grün	gramnegative Bakterien, insbesondere <i>Enterobacteriaceae</i>
Columbia CAP Agar (Colistin Aztreonam Blut)	rot	grampositive Bakterien
Sabouraud-Agar	weiß	Hefen und Pilze
Hemin Cystein Blutagar	rötlich	Anaerobier

Für ausgewählte Ansätze wurden die gewachsenen Keime durch Dr. med. Percy Schröttner unter Verwendung von automatischen Systemen (VITEK II, MALDI-TOF) identifiziert.

Einsatz von Manuka-Honig zum Mikrodilutionstest

Fünf Manuka-Honige mit bekanntem MGO-Gehalt, welche kein Bakterienwachstum zeigten, wurden nachfolgend auf ein inhibierendes Potential gegen die Wildtyp-Bakterienstämme *E. coli* und *St. aureus* im Mikrodilutionstest geprüft. Hierzu wurden 50%ige Honiglösungen in dest. Wasser hergestellt und auf 25,0% bzw. 12,5% mit Müller-Hinton-Bouillon verdünnt. Nach Sterilfiltration (0,2 µm) wurden die Proben in analoger Weise zum Test eingesetzt (Vgl. Kapitel 3.7.1).

Zusammenhang antibakterielle Aktivität und MGO-Gehalt

Zudem wurde für 61 Manuka-Honige die antibakterielle Aktivität mittels Agardiffusionstest bestimmt, um einen Bezug zum ermittelten MGO-Gehalt herzustellen. Die Daten zur antibakteriellen Aktivität dieser Honigproben wurden hierbei von Manuka Health Ltd., Te Awamutu, Neuseeland, zur Verfügung gestellt. Die Analyse erfolgte durch ein externes Labor nach den Kriterien der „Honey Research Unit“ der Waikato University, Neuseeland, und nach der Methode von *Adams et al. (2008)*. Die antibakterielle Aktivität der eingesetzten Manuka-Honige wurde dabei als äquivalente Phenolkonzentration (% äqu. Phenol, w/v) angegeben.

2.8 Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit TEAC-II-Test

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Honig wurde der Trolox-äquivalent-antioxidant-capacity-Test (TEAC-Test) genutzt. Die verwendete Variante der Methode (TEAC-II) basiert auf dem Einsatz von 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-ammoniumsalz (ABTS). Dabei fungiert das ABTS^+ -Kation als Radikalstarter und bildet nach Aktivierung das blau-grün gefärbte $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikalkation, welches durch Zugabe eines Antioxidans zum farblosen Kation zurückreagiert (Abb. 3-3) Die Entfärbung kann photometrisch bei 734 nm vermessen werden.

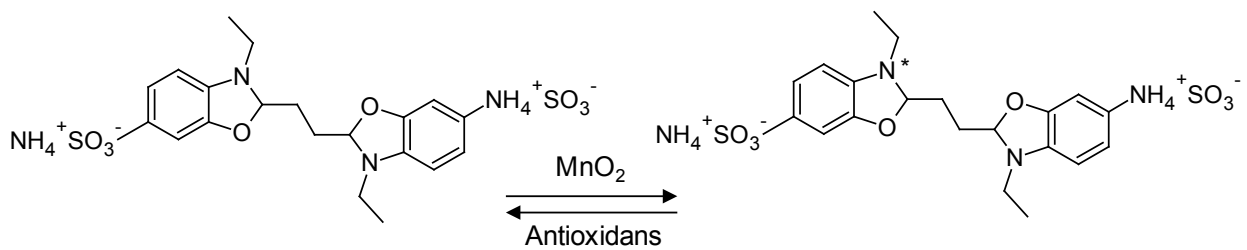


Abb. 3-3 Reaktionsgleichgewicht zwischen ABTS^+ -Kation und $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikalkation

Reagenzlösungen

Phosphatpuffer (pH 7,4): Es wurden 0,22 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,49 g Dinatriumhydrogenphosphat und 8,71 g Natriumchlorid in dest. Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

$\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Stammlösung: Zur Herstellung einer ABTS-Stammlösung wurden 0,3 g ABTS in ca. 15 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und zur Bildung des dunkelgrünen Radikalkations über einen mit Mangandioxid gefüllten Papierfilter filtriert, wobei die ersten Milliliter zu verwerfen waren. Es wurde mit wenig Phosphatpuffer (pH 7,4) nachgespült. Nach Membranfiltration (0,2 μm) konnte die erhaltene $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Stammlösung in einer dunklen Flasche über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

$\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Arbeitslösung: Die zur Messung eingesetzte $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Arbeitslösung war frisch herzustellen. Dazu wurde $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Stammlösung mit Phosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt und auf eine Extinktion von $0,700 \pm 0,020$ bei 734 nm eingestellt. Danach war die Lösung für zwei Stunden in einer dunklen Flasche zur Gleichgewichtseinstellung zu lagern. Die Extinktion wurde nochmals überprüft und als Ausgangswert notiert.

Trolox-Stammlösung: Es wurden 12,9 mg Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) in Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und auf 20 ml im Maßkolben aufgefüllt. Eine vollständige Lösung wurde im Ultraschallbad erreicht. Die resultierende Stammlösung von 2,5 mM wurde in Tubes portioniert bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt, wobei einmal aufgetaute Lösungen nicht wieder verwendet werden konnten.

Probenaufarbeitung und Messung

Die Honige wurden in Methanol-Wasser (1:1) gelöst, sodass 5%ige Lösungen resultierten. Für die weiteren Bienenprodukte wurde eine Extraktion mit anschließender Zentrifugation genutzt (Tab. 3-21). Der Überstand wurde in einen 100-ml-Maßkolben überführt und nach zweimaligem Waschen des Rückstandes mit Lösungsmittel aufgefüllt.

Tab. 3-21 Aufarbeitung der Bienenprodukte neben Honig

	Propolis	Gelée Royal	Pollen
Einwaage	1,0 g	5,0 g	2,5 g
Extraktionsmittel	Methanol	Wasser	Methanol-Wasser (1:1, v/v)

Vor dem Einsatz zum Test wurden die Probelösungen durch einen harten Rundfilter filtriert. In ein 5-ml-Reaktionsgefäß wurden 3 ml ABTS⁺-Arbeitslösung vorgelegt und mit 300 µl Probelösung versetzt. Nach Schütteln der Lösung für 30 s wurde nach einer Inkubationszeit von 15 min nach Zugabe der Probe die Extinktion bei 734 nm gemessen. Als Blindwert wurde das jeweilige Lösungsmittel mitgeführt. Die Kalibrierung erfolgte durch Verdünnen der Trolox-Stammlösung mit Phosphatpuffer (pH 7,4) auf 0,0125 bis 0,1250 mM, die analog den Proben mit ABTS⁺-Arbeitslösung versetzt und vermessen wurden. Die Ergebnisse wurden als Trolox-Äquivalente (TE) angegeben.

2.9 Untersuchungen zur Zytotoxizität

Die Versuche zu zytotoxischen Wirkungen von Honig und MGO wurden an HT-29-Zellen durchgeführt, welche von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, ACC 299) bezogen wurden. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Notwendige Verbrauchsmaterialien, Geräte und Chemikalien waren hierfür mit 70%igem Ethanol zu desinfizieren bzw. steril zu filtrieren (0,2 µm Membranfilter).

2.9.1 Kultivierung der HT-29 Zellen

Reagenzlösungen:

Komplettmedium: Zum DMEM-Grundmedium mit 4500 mg/l Glucose und Zusatz an L-Glutamin wurden fötales Kälberserum (FKS) auf einen Anteil von 10% und als Antibiotika eine Mischung an Penicillin / Streptomycin auf einen Anteil von 1% zugegeben.

Einfriermedium: Zu 11 ml Komplettmedium wurden 5 ml FKS und 4 ml DMSO gegeben.

PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline): Es wurden 100 g Natriumchlorid, 14 g Dinatriumhydrogenphosphat, 2,5 g Kaliumchlorid und 2,5 g Kaliumhydrogenphosphat in etwa 900 ml bidest. Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 wurde auf 1 l im Maßkolben aufgefüllt. Vor der Verwendung war der Puffer 1:10 mit bidest. Wasser zu verdünnen und zu autoklavieren.

Auftauen und Inkulturnahme:

Nach zügigem Auftauen der tiefgekühlten Zellen wurden diese in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen zu 10 ml temperiertem Kompletmedium gegeben. Die Suspension wurde durch kurzes Schwenken gemischt und bei 4 °C und 800 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellet in 8 ml Kompletmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte, wobei sie als adhärente Monolayer wuchsen. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die HT-29-Zellen im Folgenden in 75-cm²-Zellkulturflaschen subkultiviert. Ein Wechsel des Mediums war alle 2-3 Tage vorzunehmen. Eine Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte durch ein Betrachten am Mikroskop.

Subkultivierung:

Bei ausreichender Verdichtung des Zellrasens war nach vier bis fünf Tagen zu passagieren. Dazu wurde der Zellrasen mit etwa 10 ml PBS-Puffer gewaschen und für 1 min mit 2,5 ml Trypsinlösung behandelt. Nach Absaugen wurde für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein Ablösen der Zellen mittels Klopfen gegen den Flaschenboden überprüft. Durch Abspülen der Wachstumsfläche mit Kompletmedium unter mehrmaligem Aufziehen wurden die Zellen resuspendiert und vereinzelt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Nutzung einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 40 µl Zellsuspension mit 200 µl Trypanblau gemischt, ein oder zwei Tropfen in die Zählkammer gefüllt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Das aufgrund der Zelldichte ermittelte Volumen an Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit etwa 20 ml Kompletmedium versetzt, sodass 0,1 – 0,2·10⁵ Zellen/cm resultierten. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte weiterkultiviert.

Kryokonservierung:

Eine Lagerung der Zellen erfolgte bei –80 °C. Nach Trypsinieren wurde die erhaltene Zellsuspension mit Medium verdünnt, sodass eine Zellzahl von 1·10⁷ Zellen/cm resultierte.

Die Zelllösung wurde mit Einfriermedium 1:1 verdünnt und in 2 ml Kryoröhrchen gefüllt, die sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 bis 3 h eingefroren und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

2.9.2 Stabilitätsprüfung der Testsubstanzen in Medium

Zur Beurteilung eines möglichen Abbaus an MGO im Kulturmedium wurden Stabilitätstests mit ausgewählten Honigen und Standardsubstanz durchgeführt. Hierzu wurde Honig bzw. MGO sowie Kunsthonig nach *Wahdan (1998)* in DMEM-Medium und PBS-Puffer gelöst. Der MGO-Gehalt wurde direkt nach dem Lösen überprüft ($t = 0\text{ h}$) indem ein Aliquot von 1 ml abgenommen und mit OPD wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben derivatisiert wurde. Die verbliebenen Lösungen wurden auf 24-Well-Mikrotiterplatten verteilt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte im CO_2 -Inkubator für definierte Zeit inkubiert. Nach Entnahme wurden die Ansätze ebenfalls derivatisiert und per RP-HPLC analysiert.

2.9.3 Koloniebildungstest

Reagenz- und Standardlösung

Giemsa-Lösung: Die Giemsa-Stammlösung wurde 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt.

MGO-Stammlösung: Zur Herstellung wurden $21,4\text{ }\mu\text{l}$ der 40%igen Standard-Lösung in 50 ml PBS-Puffer gelöst, woraus durch weiteres Verdünnen eine Konzentrationsreihe von 12,5 bis 200 mg/l erstellt wurde. Neben PBS-Puffer wurde für MGO auch eine 2%ige Kunsthoniglösung in PBS-Puffer als Lösungsmittel genutzt.

3-DG-Stammlösung: Es wurden 2 mg 3-DG in 15 ml PBS-Puffer gelöst. Ein Einsatz im Test erfolgte nach Verdünnung im Bereich 17,8 bis 145,9 mg/l.

Bisphenol A: Zum Vergleich wurden Bisphenol A in DMSO gelöst und im Bereich von 20 bis 80 mg/l untersucht.

Positivkontrolle: Eine MGO-Lösung in PBS-Puffer der Konzentration 93,5 mg/l wurde bei jedem Test zur Kontrolle der Testbedingungen mitgeführt.

Negativkontrolle: Das ungehemmte Wachstum der Zellen wurde mit einer Behandlung der Zellen durch PBS-Puffer beurteilt. Diese war ebenfalls bei jedem Test mitzuführen.

Probenvorbereitung

Honigproben wurden in PBS-Puffer gelöst und als 2%ige Lösungen eingesetzt. Zudem wurde ein Kunsthonig nach *Wahdan (1998)* hergestellt, welcher ebenfalls als 2%ige Lösung in PBS-Puffer zur Behandlung der Zellen herangezogen wurde.

Aussäen der Zellen

Zur Durchführung des Koloniebildungstests wurden die Zellen trypsiniert und in frischem Kompletmedium aufgenommen (Vgl. Kapitel 3.9.1). Die Zellsuspension wurde zum Aussäen auf 250 Zellen/ml mit Kompletmedium verdünnt. In Zellkulturschalen (6 cm Durchmesser) wurde 1 ml verdünnte Zellsuspension (250 Zellen/ml) zu vorgelegten 4 ml Kompletmedium gegeben und durch kreisförmiges Schwenken verteilt. Zum Anwachsen der Zellen folgte eine Inkubation von 24 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator.

Behandlung mit Testsubstanz

Anschließend wurde das Medium verworfen und 5 ml Testlösung, welche zuvor einer Sterilfiltration (0,2 µm Membranfilter) unterzogen wurde, auf die Zellen gegeben und für 1 h im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Dabei diente PBS-Puffer als Lösungsmittel für die zu untersuchenden Substanzen. Nach Inkubation wurde abgesaugt, mit PBS-Puffer gewaschen und nach Zugabe von 4 ml Kompletmedium die Kultivierung für sieben Tage fortgesetzt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach Anfärben mit Giemsa-Lösung. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3 ml eiskaltem Ethanol (96%) für 5 min behandelt. Nach Absaugen erfolgte die Zugabe von 3 ml Giemsa-Lösung. Zum Einwirken des Farbstoffes wurden die Kulturschalen 1 h im Inkubator belassen. Nach Verwerfen der Lösung wurden die Schalen mit dest. Wasser gespült, auf Papiertüchern ausgeklopft und getrocknet. Die dunkelblau gefärbten Kolonien waren visuell auszuzählen. Zur Berechnung der Koloniebildungsfähigkeit bzw. relativen Anheftungseffizienz (relative plating efficiency, rel. PE) wurde die Anzahl gebildeter Kolonien der mit Testsubstanz behandelten (Probe) mit der Kolonienanzahl der unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) ins Verhältnis gesetzt.

$$rel.PE[\%] = \frac{Kolonienanzahl_{Testlösung}}{Kolonienanzahl_{Negativkontrolle}} \cdot 100$$

2.10 Statistische Auswertung

Univariate Statistik

Arithmetisches Mittel $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$

\bar{x} = arithmetisches Mittel; x_i = Einzelwert, n = Stichprobenumfang

Medianwert $n = \text{gerade}$ $x_{med} = \frac{x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1}}{2}$

$n = \text{ungerade}$ $x_{med} = \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right)$

x_{med} = Median, x_n = Einzelwert, n = Stichprobenumfang

Standardabweichung $s_x = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

s_x = Standardabweichung, \bar{x} = arithmetisches Mittel;
 x_i = Einzelwert, n = Stichprobenumfang

Vergleich von Mittelwerten mit t-Test

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten erfolgte mit Hilfe des ungepaarten t-Tests. Zur Definition eines signifikanten Unterschieds wurden die Signifikanzniveaus $P < 0,05$ und $P < 0,01$ zugrunde gelegt.

Korrelationsanalyse

Im Zuge der Untersuchungen wurden Datensätze auf lineare Korrelationen unter Nutzung der Analysefunktionen von Microsoft Excel geprüft.

Multivariate Statistik

Es wurde eine multivariate lineare Regressionsanalyse unter Anwendung der erweiterten Analysefunktionen von Microsoft Excel durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Präsenz von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig wurde erstmals durch *Weigel et al. (2004)* beschrieben. Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass Methylglyoxal (MGO) in Manuka-Honig in außergewöhnlich hohen Konzentrationen im Vergleich zu anderen Sorten enthalten ist (*Mavric et al., 2008*). Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war darauf aufbauend die weitere Aufklärung und Charakterisierung der „Herkunft“ des in Manuka-Honig enthaltenen MGO. Es stellte sich hierbei die Frage, warum MGO einen natürlichen Bestandteil dieses Honigs darstellt, inwieweit die MGO-Bildung auf einer enzymatischen oder mikrobiellen Grundlage basiert und ob sie durch äußere Faktoren beeinflusst wird. Darüber hinaus sollte beurteilt werden, ob ein Zusammenhang hoher MGO-Gehalte zu typischen Lagerungsparametern wie z.B. dem Anteil an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) besteht.

Auf Grundlage dieser molekularen Betrachtungen sollte der Bezug zu möglichen biofunktionellen Eigenschaften von Manuka-Honig erfolgen. Es galt zu klären, welche antimikrobielle, antioxidative und zytotoxische Wirkung im Vergleich zu anderen Honigen *in vitro* bestimmbar ist und in welchem Maße dies mit der Zusammensetzung, insbesondere der MGO-Konzentration, von Manuka-Honig in Verbindung gebracht werden kann. Daraus ergeben sich zusammenfassend die in Abb. 4-1 aufgeführten Fragestellungen.

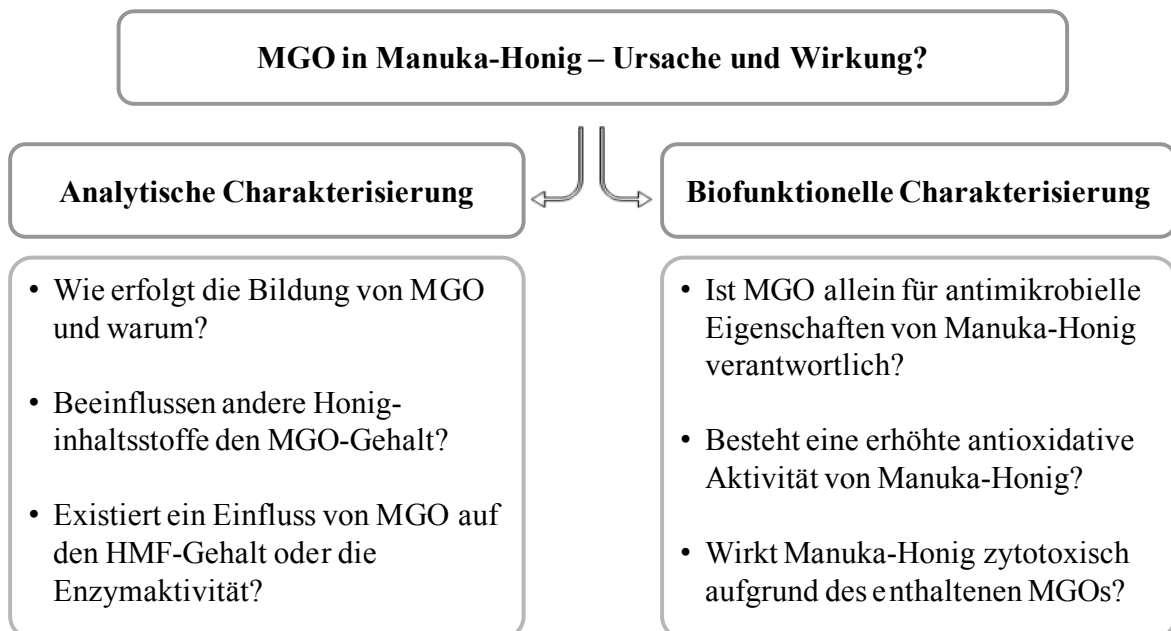


Abb. 4-1 Fragestellungen zum Vorkommen von MGO in Manuka-Honig

3.1 Methylglyoxal (MGO) und Dihydroxyaceton (DHA)

3.1.1 Bildung von MGO während der Lagerung von Manuka-Honig

Eine Bildung der 1,2-Dicarbonylverbindung MGO kann prinzipiell auf unterschiedlichen Reaktionswegen erfolgen (Vgl. Kapitel 2.3.2.3). Um die Bildung in Manuka-Honig näher charakterisieren zu können, wurden 14 frische Proben auf ihren Gehalt untersucht und im Anschluss einer definierten Lagerung für insgesamt 24 Wochen unterzogen. Dies erfolgte bei drei verschiedenen Temperaturen (6 °C, 20 °C und 37 °C), um eine Lagerung unter Kühlung und bei Raumtemperatur sowie bei leicht erhöhten Temperaturen zu simulieren. Letztere entspricht zudem den Bedingungen im Bienenstock, sodass es sich dabei nicht um eine Erhitzung des Honigs handelt, jedoch auf diese Weise eine Stress- bzw. Langzeitlagerung verdeutlicht werden kann. Um den Verlauf zu erfassen, wurden die Honigproben im Rhythmus von 6 Wochen nach Kapitel 3.3.1 analysiert.

Die zur Verfügung stehenden Honige werden als frische Proben bezeichnet, da sie nach der Entnahme aus dem Bienenstock keine weitere Behandlung erfahren haben. Im Gegensatz hierzu stehen die im Folgenden als kommerzielle oder Handelsproben benannten Honige, die durch ein industriell übliches Aufbereiten und Mischen der einzelnen Imker-Chargen im Allgemeinen eine längere Standzeit nach ihrer Gewinnung aufweisen und bereits in verkehrsübliche Gläser abgefüllt waren.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die 14 frischen Manuka-Honige vergleichbare Mengen MGO im Bereich von 60 bis 150 mg/kg enthalten. Daraus wird ersichtlich, dass bereits nach der Gewinnung aus dem Bienenstock MGO in höheren Mengen zu detektieren ist als in Honigen anderer botanischer Quellen. Die Gehalte sind allerdings geringer als in Handelsproben, wie sie zuvor z.B. von *Mavric et al. (2008)* bestimmt wurden. Durch die simulierte Lagerung der Honige kommt es zu einem signifikanten Anstieg der MGO-Konzentrationen. Dabei lassen sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Lager-temperatur ablesen (Vgl. Abb. 4-2). Während unter Kühlung eine gewisse Konstanz in den MGO-Gehalten besteht, kommt es bei 20 °C und 37 °C zu einer deutlichen Zunahme. Diese Beobachtung kann durch eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur erklärt werden.

Der sich aus den Werten bei 37 °C ergebende Kurvenverlauf weist neben dem markanten Anstieg zu Beginn der Lagerung ein Plateau in der MGO-Konzentration auf. Folglich gibt es eine Limitierung der MGO-Bildung im Honig, sodass der letztlich resultierende Gehalt z.B. durch die Gesamtkonstitution des Honigs oder das Vorkommen eventueller Vorläuferverbindungen bestimmt wird. Falls es sich um einen enzymatischen Prozess handelt, kann des Weiteren eine Produkthemmung für den beobachteten Verlauf verantwortlich sein.

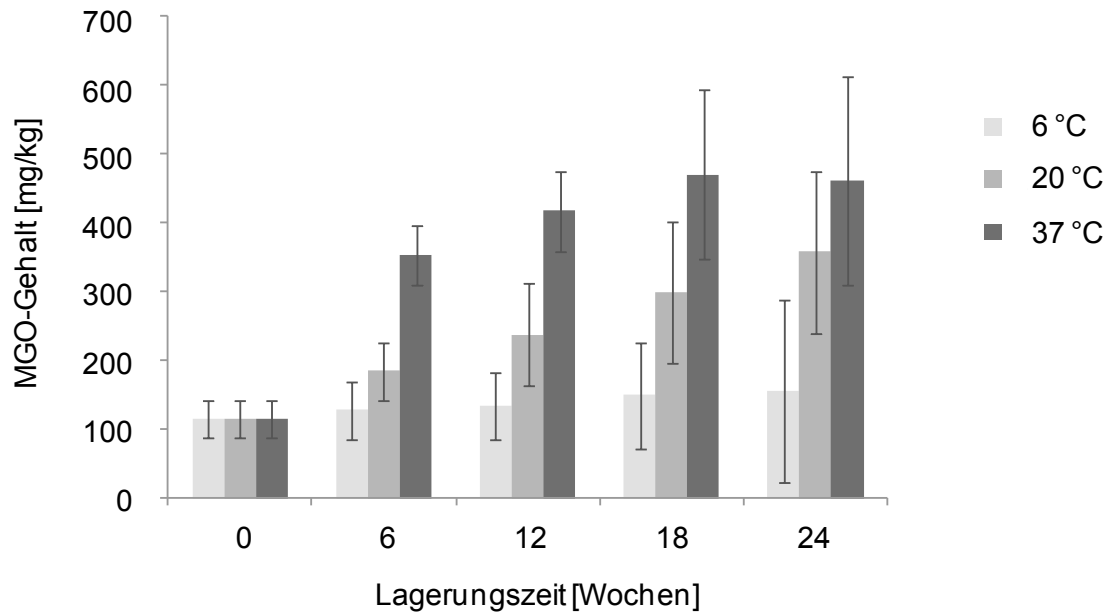


Abb. 4-2 MGO-Gehalt in frischem Manuka-Honig vor und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 0 bis 24 Wochen (Medianwert aus 14 Honigproben mit Standardabweichung)

Trotz ähnlicher Konzentrationen in den frischen Manuka-Honigen bestehen in den Proben nach Lagerung deutliche Unterschiede in der gebildeten Menge an MGO, wie durch Abb. 4-3 noch einmal im Detail verdeutlicht werden soll. Am Beispiel der vier dargestellten Honige lässt sich die große Variation möglicher MGO-Gehalte in „gereiftem“ Manuka-Honig aufzeigen. Der grundsätzliche Verlauf der Bildung ist jedoch stets vergleichbar.

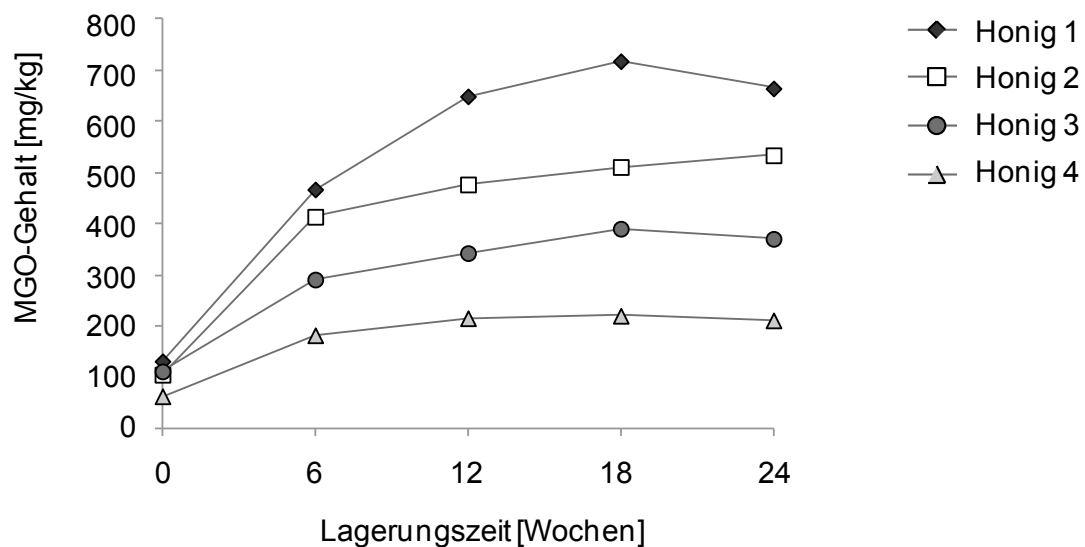


Abb. 4-3 Verlauf des MGO-Gehaltes in frischem Manuka-Honig (vier Proben) nach Lagerung bei 37 °C über einen Zeitraum von 0 bis 24 Wochen

Werden kommerzielle Manuka-Honige mit MGO-Konzentrationen im Bereich von 55 bis 520 mg/kg einer analogen Lagerung unterzogen, sind entweder keine Änderungen oder sogar eine Abnahme im Gehalt der 1,2-Dicarbonylverbindung zu beobachten. Diese Feststellung lässt den Rückschluss zu, dass der MGO-Gehalt in den Proben bereits ein Plateau erreicht hat (Vgl. Abb. 4-2). Diese Honige können demnach als „ausgereift“ betrachtet werden. Daraus wird ebenfalls ersichtlich, dass eine Honiglagerung bei leicht erhöhten Temperaturen nicht allein ausschlaggebend für hohe MGO-Gehalte ist. Folglich ist eine Bildung der Verbindung in dem Maße durch Maillard- oder Karamellisierungsreaktionen nicht zu erklären, worauf in Kapitel 4.3.3 noch einmal gesondert eingegangen werden soll.

In Manuka-Honig kommt es im Vergleich zu anderen Honigsorten zu einer verstärkten Bildung von MGO. Generell kann diese Verbindung dabei auf enzymatischem und nicht-enzymatischem Weg entstehen (Vgl. Kapitel 2.3.2.3). Ein Einfluss der Bienenart auf Honiginhaltsstoffe ist z.B. für Proteine bekannt (*Won et al., 2008*). Da allerdings andere neuseeländische Honige keine erhöhten MGO-Werte aufweisen, ist ein Eintrag von MGO durch die Biene aufgrund einer fehlenden Spezifität auf ausgewählte Pflanzenarten nicht wahrscheinlich. Es ist vielmehr von einem botanischen Ursprung für das in Manuka-Honig vorhandene MGO auszugehen. Der Nachweis entsprechender Mengen an MGO in frischen Honigen lässt den Rückschluss zu, dass bereits Manuka-Pflanzen die Verbindung in ihrem Metabolismus anreichern und diese über den Nektar abgeben. Dies kann als Entgiftungsweg der Manuka-Pflanze für diesen Metaboliten verstanden werden. Ursache für das erhöhte Vorkommen kann zum Einen eine „Kontamination“ von außen sein, wobei das MGO z.B. durch Mikroorganismen gebildet und dann an die Pflanze weitergegeben wird. Zum Anderen können Mechanismen wie das Glyoxalase-System, über das MGO zu weiten Teilen enzymatisch abgebaut wird, nicht voll funktionsfähig sein, wodurch im Folgenden eine Akkumulation der Verbindung in den Pflanzenkompartimenten resultiert.

Die Lagerungsversuche lassen darüber hinaus darauf schließen, dass die MGO-Bildung nur während der Reifung bzw. Lagerung von frischen Proben stattfindet. Ist ein Manuka-Honig „ausgereift“, ist eine weitere MGO-Nachbildung durch eine fortgesetzte Lagerung nicht induzierbar. Diese Feststellung kann dadurch begründet sein, dass eventuelle Precursor-Verbindungen im frischen Honig noch vorhanden sind, im Laufe der Reifung jedoch zu MGO umgewandelt werden. Sobald die Precursoren verbraucht sind, kann keine weitere Bildung mehr ablaufen, wie es bei den kommerziellen Proben beobachtet wurde. Handelt es sich bei der Umsetzung um einen enzymatischen Prozess, kann neben der Limitierung durch die Substratmenge auch eine Inaktivierung oder Aktivitätsabnahme des entsprechenden Enzyms aufgrund einer Zunahme der Produktmenge oder anderer Einflüsse für den beobachteten Kurvenverlauf der MGO-Bildung verantwortlich sein.

3.1.2 Untersuchungen zu Manuka-Pflanzen und Nektar

3.1.2.1 MGO in Manuka-Pflanzenmaterial

In der Literatur existieren einige wenige Informationen zu Vorkommen und Metabolismus von MGO in Pflanzen. So konnten *Smits & Johnson (1981)* die Verbindung in Nadeln der Douglas-Tanne nachweisen. Des Weiteren beschrieben *Yadav et al. (2005)* die Anwesenheit von MGO in den untersuchten Pflanzenspezies, wie z.B. Reis oder Tabakpflanzen. Dabei wurde eine MGO-Bildung als Reaktion der Pflanze auf äußere Stressbedingungen betrachtet. Um die Frage zu klären, inwieweit derartige Voraussetzungen auch für Manuka-Pflanzen relevant sind, wurden Pflanzenproben aus 18 Gegenden Neuseelands auf die Anwesenheit von MGO untersucht. Die Probenaufarbeitung orientierte sich an den Angaben von *Yadav et al. (2005)*, der sich eine RP-HPLC nach *Mavric et al. (2008)* analog der Messung von Honigproben anschloss.

Ein Nachweis von MGO in Manuka-Pflanzen ist mit der angewandten Methode prinzipiell möglich, wie aus Abb. 4-4 A hervorgeht. Die Zuordnung des MGO-Peaks erfolgte dabei über einen Vergleich der Retentionszeit mit einer MGO-Standardlösung sowie mittels Standardaddition. In Voruntersuchungen wurde zunächst eine Trennung des pflanzlichen Materials in Blüten und Blätter vorgenommen. Hierbei lag die Annahme zugrunde, dass Blüten mehr MGO enthalten, falls die Verbindung über den Nektar in den Honig eingetragen wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nur geringe Unterschiede zwischen den Pflanzenteilen bestanden (Abb. 4-4 B). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten von *Yadav et al. (2005)*, die in den von ihnen betrachteten Pflanzen meist keinen Unterschied zwischen den untersuchten Blättern und Wurzeln feststellen konnten.

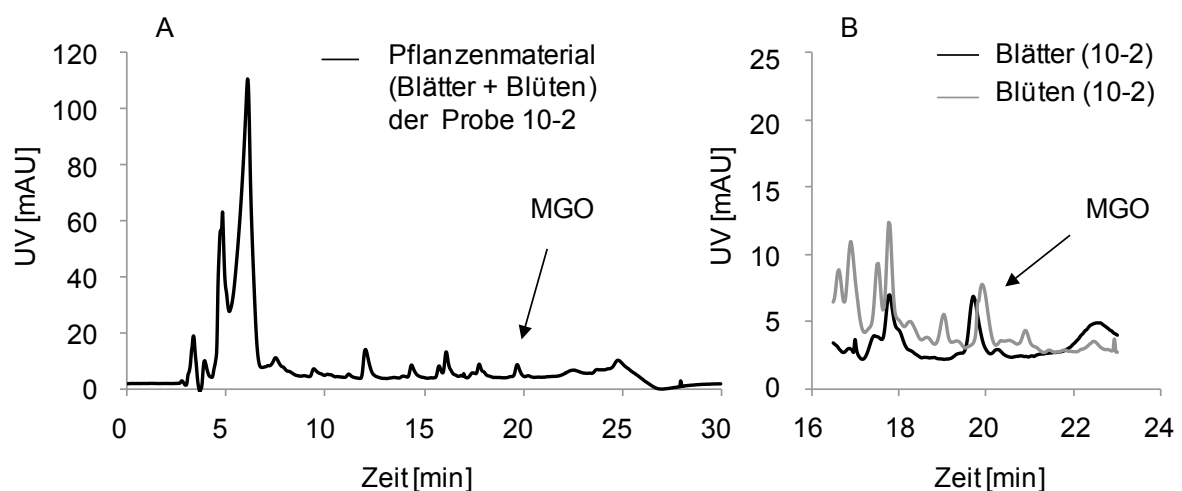


Abb. 4-4 RP-HPLC nach Derivatisierung mit OPD der Pflanzenprobe 10-2 (Gegend Nr. 10, Probe 2) unter Einsatz A) des gesamten Pflanzenmaterials (Blätter und Blüten) sowie B) den separat aufgearbeiteten Blüten und Blättern (Detailansicht)

Im Folgenden wurde auf eine Auftrennung verzichtet und die gesamte Pflanzenprobe zur Analyse eingesetzt. Anhand der so gewonnenen Daten (Tab. 4-1) wird ersichtlich, dass Manuka-Pflanzen nicht generell MGO enthalten. In den zur Verfügung stehenden Proben wurden deutlich niedrigere Konzentrationen als in Manuka-Honig bestimmt. Dabei ist in Manuka-Pflanzen bestimmter Gegenden tendenziell MGO enthalten, obwohl auch innerhalb eines Gebietes Variationen in den Werten festzustellen waren. Diese Tatsache wurde in einer Klassifizierung der Probengruppen zum Ausdruck gebracht (Tab. 4-1). Aufgrund der geringen Konzentrationen können die Manuka-Pflanzen, welche MGO enthalten, als vergleichbar betrachtet werden. Analoge Folgerungen haben auch *Yadav et al. (2005)* bei der Untersuchung von vier verschiedenen Pflanzenspezies gezogen, in denen sich die MGO-Gehalte ebenfalls nur gering unterschieden und zu den Werten der Manuka-Pflanzen vergleichbar waren.

Darüber hinaus war es im Rahmen der Untersuchungen möglich, zu 16 Gegenden je zwei frische Honige passend zu den vorliegenden Pflanzen zu erhalten. Diese Honige wiesen MGO-Konzentrationen zwischen 64 und 162 mg/kg auf, analog zu den bereits in Kapitel 4.1.1 ermittelten Daten. In Tab. 4-2 sind die Manuka-Honige in Abhängigkeit von ihrem MGO-Gehalt den Ergebnissen der Pflanzenanalyse gegenübergestellt. Aus der Darstellung wird ersichtlich, dass die frischen Manuka-Honige mit einem etwas höheren MGO-Gehalt tendenziell aus Gebieten stammen, in denen MGO in den Pflanzenproben nachgewiesen wurde.

Tab. 4-1 Nachweis von MGO in Manuka-Pflanzen aus 18 verschiedenen Gebieten Neuseelands

Gebiet Nr.	n	MGO [mg/kg]	Klassifizierung	Gebiet Nr.	n	MGO [mg/kg]	Klassifizierung
1	5	0 – 2	●	10	8	0 – 5,6	●
2	14	0 – 3,3	○	11	7	0 – 8,4	●
3	8	0 – 1,2	○	12	6	0 – 4,5	◐
4	11	0 – 3,5	◐	13	6	0 – 9,2	●
5	9	0 – 11,0	●	14	5	0 – 10,8	●
6	3	0 – 4,9	○	15	9	0 – 5,0	●
7	6	0 – 2,8	○	16	10	0 – 2,7	○
8	8	0 – 4,1	●	17	9	0 – 3,4	○
9	5	0 – 1,1	○	18	7	0 – 2,9	◐

(n = Anzahl der Proben eines Gebiets)

Klassifizierung: ● = im Großteil der Proben ist MGO nachweisbar,
 ○ = im Großteil der Proben ist MGO nicht nachweisbar,
 ◐ = Proben sind teilweise positiv und teilweise negativ

Bisherige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass sich diese Unterschiede im Rahmen einer Lagerung der Honige noch deutlicher ausprägen (Vgl. Kapitel 4.1.1). Die geringen Werte und Differenzen innerhalb der einzelnen Proben lassen lediglich eine Tendenz und keinen starken Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von MGO in der Manuka-Pflanze und einem hohen Gehalt im resultierenden Honig erkennen.

Tab. 4-2 Gegenüberstellung der MGO-Gehalte in frischem Manuka-Honig und dem Nachweis von MGO in Manuka-Pflanzen von 16 Gebieten Neuseelands

MGO-Gehalt in frischem Honig	< 120 mg/kg	120 – 140 mg/kg	> 140 mg/kg
Gebiete: Anzahl (Nr.)	7 (2, 3, 4, 5, 6, 14, 17)	5 (7, 10, 15, 16, 18)	4 (1, 11, 12, 13)
MGO-Nachweis in Pflanzen	2 x ●, 1 x ◐, 4 x ○	2 x ●, 1 x ◐, 2 x ○	3 x ●, 1 x ◐, 0 x ○

Die Ergebnisse zeigen somit, dass MGO kein genereller Bestandteil von Manuka-Pflanzen ist. Sofern es in den Pflanzen vorkommt, wird es nicht in den Blüten angereichert, sondern kann auch in anderen Pflanzenkompartimenten wie den Blättern gleichermaßen vorliegen. Um das Phänomen der ungewöhnlich hohen MGO-Konzentrationen in Manuka-Honigen zu klären, können die ermittelten Daten der untersuchten Pflanzenproben demnach nicht dienen. In der Pflanze enthaltenes MGO kann zwar einen zusätzlichen Einfluss auf den resultierenden Honig ausüben, allerdings ist es nicht als direkt verantwortlicher Faktor für die vorliegenden Gehalte zu deklarieren.

Die Anwesenheit von MGO in Pflanzen bestimmter Gegenden von Neuseeland kann auf eine stressbedingte Reaktion der Pflanze zurückgeführt werden. Manuka kommt nahezu überall in Neuseeland vor (*Stephens et al., 2005; Moar, 1985*). Die dabei vorherrschenden Wachstumsbedingungen sind in den einzelnen Gebieten aufgrund von natürlicherweise in Neuseeland bestehenden Klima- und Bodenvariationen sowie weiteren Umwelteinflüssen unterschiedlich. *Yadav et al. (2005)* beschreiben z.B. einen Anstieg des MGO-Gehaltes als Folge auf die Stressbedingungen Salzgehalt, Trockenheit und Kälte. Die Zunahme an MGO ist dabei als universelle Antwort der Pflanzen auf abiotischen Stress zu verstehen. Im Vergleich untereinander erzielt ein Einfluss von Trockenheit den größten Effekt (*Yadav et al., 2005*). Darüber hinaus gelten Schwermetalle ebenfalls als abiotische Stressfaktoren, die wesentliche Effekte wie z.B. eine MGO-Akkumulation in Pflanzen hervorrufen können (*Hossain et al., 2012*).

3.1.3 Analytik von DHA in Honig

Eine isolierte Betrachtung von MGO ist unzureichend, um die Charakteristik des Manuka-Honigs zu beschreiben. Die Substanz DHA sollte daher als direkte Vorstufe in die Untersuchungen einbezogen werden. Hierzu ist eine verlässliche Analytik notwendig, die im Rahmen der Untersuchungen etabliert und angewendet wurde.

3.1.3.1 Reaktion von DHA zu 2-Hydroxymethylchinoxalin

Die Analyse von 1,2-Dicarbonylverbindungen wie 3-Desoxyglucoson (3-DG) oder auch MGO erfolgt üblicherweise per RP-HPLC der entsprechenden UV-aktiven Chinoxaline, die durch Derivatisierung mit o-Phenylendiamin (OPD) gebildet werden. Unter optimalen Bedingungen für eine vollständige Derivatisierung der Substanzen (0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,5 und Inkubation über Nacht) nach den Angaben von *Weigel et al. (2004)* sowie *Mavric et al. (2008)* lässt sich ein weiterer Peak im Chromatogramm bei etwa 13 min als markantes Signal für Manuka-Honige ausmachen. In nachfolgenden Analysen konnte dem Peak ein Derivat des Derivatisierungsreagenz OPD mit DHA zugeordnet werden.

Mittels semipräparativer RP-HPLC wurde dieses Reaktionsprodukt erfolgreich isoliert. Per LC-MS wurde das m/z zu 161,1 für $[MH^+]$ bestimmt, woraus sich eine molare Masse von 160 g/mol ergibt. Es wurde ein UV-Maximum von 319 nm ermittelt, das nur geringfügig von dem typischen Absorptionsmaximum der Chinoxaline von 312 nm abweicht. Durch Aufnahme eines 1H -NMR-Spektrums konnte das Isolat eindeutig als 2-Hydroxymethylchinoxalin (2-Chinoxalinmethanol, CAS 41242-94-8, Abb. 4-6 Struktur VII) identifiziert werden. Die einzelnen Signale des Spektrums wurden dabei wie folgendermaßen zugeordnet: 1H NMR (500 MHz, D_2O), δ [ppm]: 8,74 (s, H-3), 7,81–7,87 (m, H-5, H-8), 7,68–7,73 (m, H-6, H-7), 4,82 (s, H-10A, H-10B).

Diese Verbindung ist bereits aus Modelluntersuchungen zum Zuckerabbau in Karamellisierungsreaktionen bekannt. So konnte die Anwesenheit von 2-Hydroxymethylchinoxalin nach Inkubation von Glucose bzw. Ribose mit OPD neben einer Vielzahl weiterer Verbindungen beschrieben werden *Tagaki et al., 1972; Rizzi, 2004*). Die auf diesem Wege in der Reaktionslösung nachgewiesenen Chinoxaline wurden dem Abbau des jeweiligen Zuckers zu 1,2-Dicarbonylfragmenten zugeschrieben, welcher unter Einsatz von Pufferlösungen induziert bzw. in verstärktem Maße ablaufen soll (*Rizzi, 2004*). DHA als dabei beteiligte Komponente bzw. als direkte Ausgangssubstanz für die Bildung von 2-Hydroxymethylchinoxalin fand bei den genannten Autoren jedoch keine Erwähnung. Darüber hinaus wurde der analytische Nachweis von Monocarbonylverbindungen wie DHA mittels RP-HPLC unter Derivatisierung mit OPD bislang als nicht realisierbar betrachtet (*Windsor et al., 2010*), unter der Annahme, dass OPD mit DHA kein stabiles Reaktionsprodukt bildet.

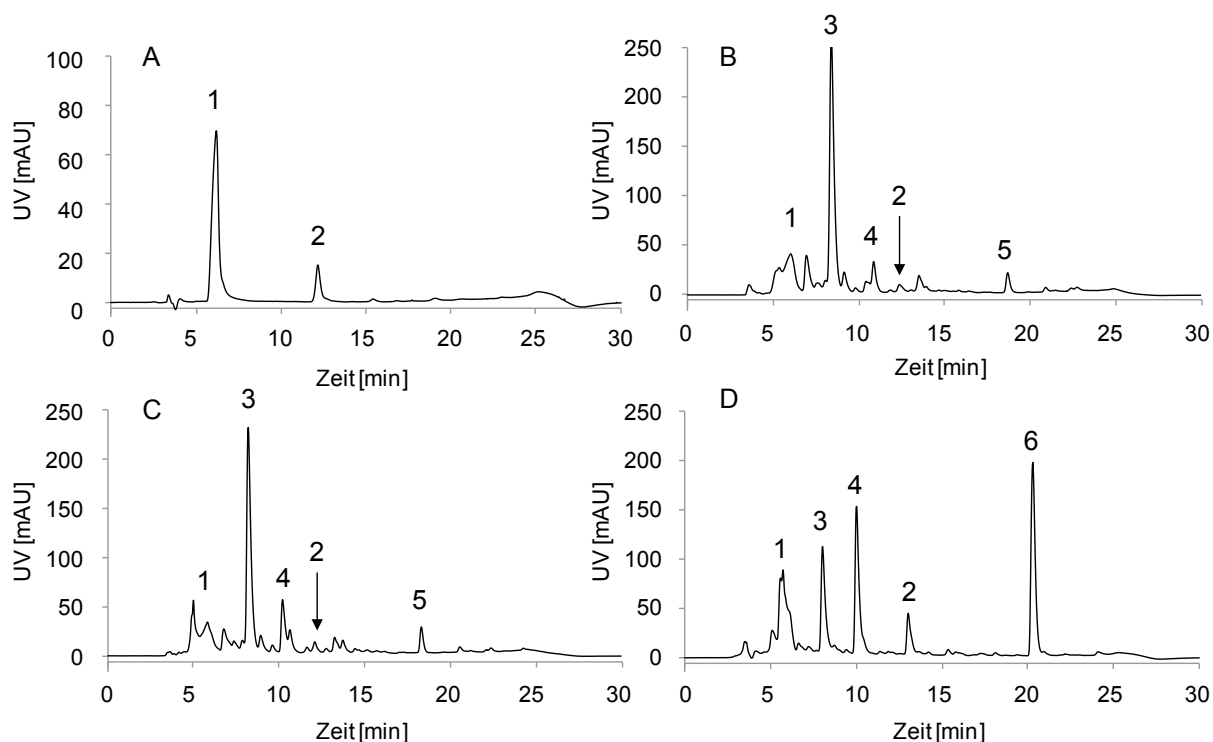


Abb. 4-5 RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung einer A) wässrigen DHA-Standardlösung, B) Fructose-Glucose-Lösung als simulierte Honigmatrix, C) Rapshonig-Probe, D) Manuka-Honig-Probe
 Peakzuordnung von (1) OPD und der jeweiligen Chinoxaline ausgehend von (2) DHA, (3) Glucoson, (4) 3-DG, (5) GO und (6) MGO

Ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Bildung von 2-Hydroxymethylchinoxalin aus DHA und OPD ist in Abb. 4-6 dargestellt. Hierbei findet zunächst eine nukleophile Addition einer Aminogruppe des OPD (I) an das Carbonyl-C-Atom von DHA (II) statt. Durch Dehydratation kommt es zur Bildung des Iminol (III), welches analog der Heyns-Umlagerung über das Enaminol (IV) in das Ketoamin (V) konvertieren kann. Eine weitere Dehydratation resultiert in der Bildung eines Intermediates (VI), welches durch Oxidation in das Chinoxalin (VII) überführt wird.

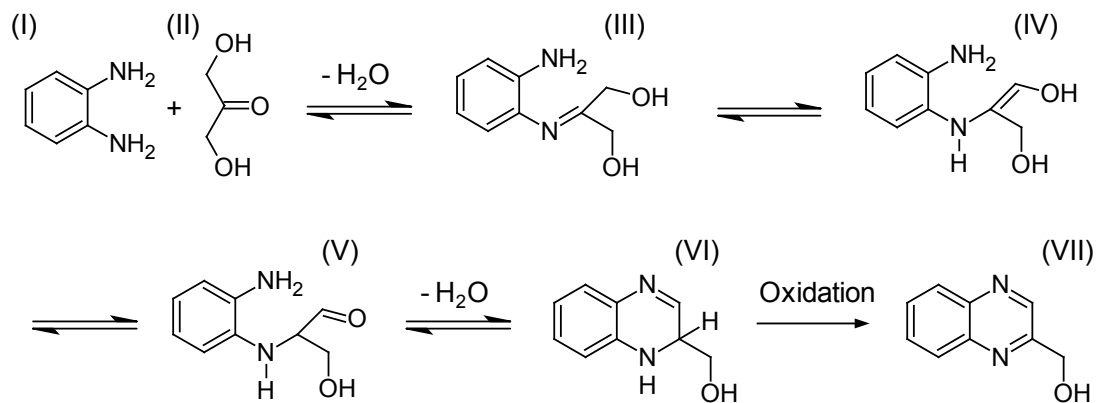


Abb. 4-6 Postulierter Reaktionsmechanismus von OPD (I) und DHA (II) zu 2-Hydroxymethylchinoxalin (VII, *Atrott et al., 2012*)

Im Vergleich mit den 1,2-Dicarbonylverbindungen MGO und 3-DG benötigt DHA eine längere Derivatisierungszeit für eine vollständige Umsetzung zum Chinoxalin. Dies lässt darauf schließen, dass die Ausbildung der Ketogruppe in Struktur (V) über das Enaminol einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt. Die anschließende Oxidation des entstehenden Intermediates kann durch die oxidativen Eigenschaften des Reaktionsansatzes selbst verursacht werden. Dieser Oxidationsschritt kann noch nicht eindeutig belegt werden, bisherige Versuche deuten jedoch auf einen oxidativen Einfluss von Sauerstoff hin. Unter Verringerung des einwirkenden Gasraums über der Reaktionslösung und der Realisierung eines zeitweise nahezu anaeroben Ansatzes lässt sich eine Verkleinerung des DHA-Peaks im Chromatogramm feststellen, was auf ein Ausbleiben der Oxidation hinweist. Darüber hinaus können Disproportionierungsreaktionen stattfinden und die oxidative Umwandlung zum Chinoxalin auf diese Weise ermöglichen.

3.1.3.2 Methodische Aspekte der DHA-Analytik unter OPD-Derivatisierung

Die Derivatisierung von DHA zum 2-Hydroxymethylchinoxalin wurde optimiert, indem Standardlösungen unter Variation von pH-Wert, Inkubationstemperatur und -zeit mit OPD umgesetzt und analysiert wurden. Die Reaktion ist dabei unter neutralen Bedingungen nach 24 h noch nicht abgeschlossen (*Haberlau, 2010*). Durch ein leichtes Absenken des pH-Wertes der Probelösung sowie eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C wurde eine stärkere Chinoxalinbildung bis zur vollständigen Umsetzung erreicht (Abb. 4-7). Dies liegt zum Einen im säurekatalysierten Ablauf der Reaktion und zum Anderen in einer temperaturbedingten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit begründet. Letztlich wurde eine Aufarbeitung mit Acetatpuffer bei pH 4,0 mit anschließender Derivatisierung mit OPD für 16 h bei 37 °C als geeignete Parameter zur Probenvorbereitung für eine DHA-Analyse in Honig als optimal erkannt.

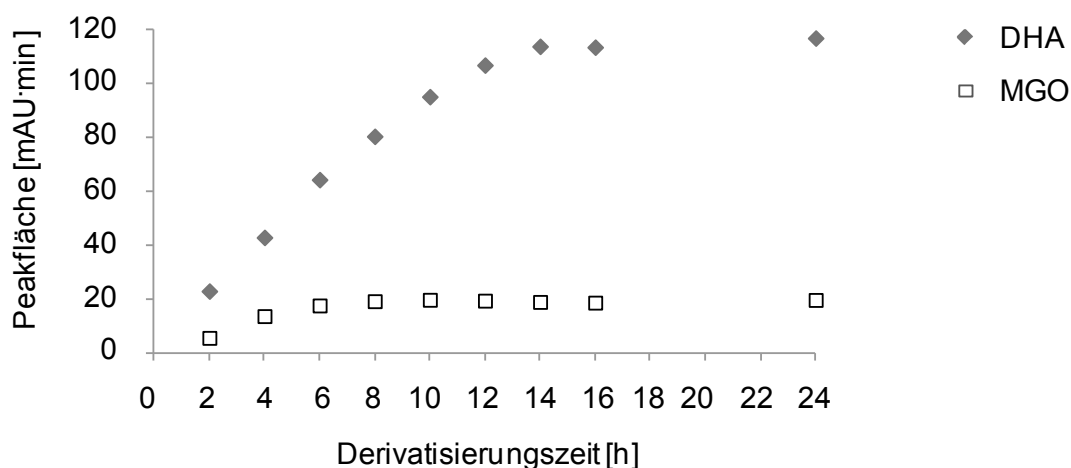


Abb. 4-7 Kinetische Untersuchungen der DHA-Umsetzung mit OPD (pH 4,0 und 37 °C) anhand der Chinoxalin-Peakfläche im Vergleich zu MGO (pH 6,5 und Raumtemperatur)

Aufgrund der methodischen Unterschiede ist eine dabei ursprünglich angestrebte simultane Quantifizierung von DHA und MGO per RP-HPLC unter Derivatisierung mit OPD nicht möglich. Einerseits werden unter Anwendung eines Puffers mit einem pH-Wert von 4,0 zur generellen Probenaufarbeitung zu hohe Werte für MGO bestimmt, da eine säure-induzierte Bildung des MGO-Chinoxalins in der Honigmatix beobachtet werden konnte. Andererseits verläuft die Reaktion zwischen DHA und OPD unter neutralen Bedingungen zu langsam, sodass eine unvollständige Derivatisierung in den Proben resultiert. In der Konsequenz sind zwei unabhängige Aufarbeitungen sowie zwei chromatographische Läufe pro Probe notwendig, um für beide Analyten eine optimale Chinoxalinbildung bei guter Sensitivität zu gewährleisten. Dennoch weist die etablierte Methode den Vorteil auf, dass kein separates Analysesystem für die DHA-Bestimmung notwendig ist.

Bei Anwendung der optimierten Methodik zur Bestimmung von DHA in Honigproben wird deutlich, dass unter den gewählten Bedingungen auch nennenswerte Mengen an DHA aus der Honigmatix selbst gebildet werden (Vgl. Abb. 4-5 B). Diese können dem Abbau von Glucose und Fructose unter den gewählten Bedingungen zugeschrieben werden. Die Beobachtung lässt sich des Weiteren mit den Ergebnissen von *Rizzi (2004)* in Verbindung bringen, die 2-Hydroxymethylchinoxalin neben anderen Chinoxalinen nach der Inkubation von Ribose mit OPD nachweisen konnten. Bei der Quantifizierung von DHA ist dieser reproduzierbare Grundgehalt, welcher sich durch die Derivatisierungsbedingungen ergibt, durch einen Blindwert zu berücksichtigen. Hierzu dient ein Kunsthonig bestehend aus 46,5 % Fructose und 34,0 % Glucose (*Wahdan, 1998*, Vgl. Kapitel 3.2)

Die bestimmten Parameter zur Validierung der Methode sind in Tab. 4-3 aufgeführt. In honiganaloger Zuckermatrix (*Wahdan, 1998*) korreliert die Peakfläche des Chinoxalins mit der DHA-Konzentration ($R^2 = 0,9944$). Dennoch wurde die Quantifizierung im Folgenden mittels Standardaddition realisiert, da die so erhaltenen Ergebnisse eine höhere Richtigkeit im Vergleich zur externen Matrixkalibrierung aufwiesen. Potentielle Einflüsse der Honigmatix, die für diese Abweichungen verantwortlich gemacht werden können, werden durch Anwendung der Standardaddition minimiert.

Tab. 4-3 Validierungsparameter der optimierten DHA-Methode

Linearität	0,18 – 2,20 mM	entspricht 165 – 1980 mg/kg Honig ¹⁾
Nachweisgrenze	0,01 mM	entspricht 10 mg/kg Honig ¹⁾
Bestimmungsgrenze	0,12 mM	entspricht 110 mg/kg Honig ¹⁾
Wiederfindung	95,3%	in Honigmatix (Kunsthonig)
Wiederholbarkeit	7,8%	in Manuka-Honig

(¹⁾ unter Nutzung einer 10%igen Probenlösung)

3.1.3.3 Konzentrationen von DHA und MGO in Manuka-Honig

Im Rahmen der Untersuchungen wurden 19 kommerzielle sowie 12 frische, unbehandelte Manuka-Honige auf ihren Gehalt an DHA und MGO analysiert. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in Abb. 4-8 aufgeführt. Die ermittelten MGO-Konzentrationen von 40 bis 700 mg/kg bestätigen dabei bereits dargelegte Daten (Vgl. Kapitel 4.1.1) sowie bestehende Werte der Literatur (*Mavric et al., 2008; Adams et al., 2008*). In den frischen Honigen konnten zudem sehr hohe Gehalte zwischen 600 und 2200 mg/kg DHA bestimmt werden, wie sie auch zuvor von *Adams et al. (2009)* beschrieben wurden. Allerdings wurde DHA in den einbezogenen Handelsproben ebenfalls in Konzentrationen bis zu 1600 mg/kg quantifiziert, auch wenn diese dabei im Mittel geringer als in frischem Honig sind.

Neben Manuka-Honigen wurden in die Untersuchungen noch weitere Sorten einbezogen. Allerdings war in den analysierten Nektar- ($n = 8$) und Honigtau-Honigen ($n = 6$) kein DHA oberhalb der Bestimmungsgrenze nachweisbar. Der Peak bei 13 min im Chromatogramm eines Rapshonigs (Abb. 4-5 C) entspricht dabei dem Anteil im mitgeführten Blindwert und beruht folglich auf der geringen Grundmenge an DHA, die sich aus der Honigmatrix im Zuge der Derivatisierung bildet. MGO war in diesen Honigen im Bereich von 2 bis 28 mg/kg zu detektieren, was die Ergebnisse von *Weigel et al. (2004)* bestätigt.

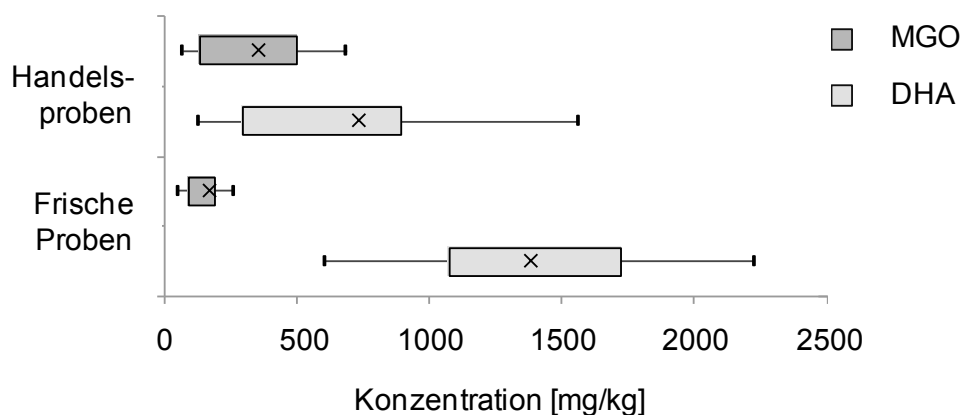


Abb. 4-8 Konzentrationen von DHA und MGO in 12 frischen und 19 kommerziellen Manuka-Honigen (Whiskers min/max, x = Median)

Darüber hinaus ergibt sich für Manuka-Honig ein linearer Zusammenhang zwischen der DHA- und MGO-Konzentration der untersuchten Handelsproben ($R^2 = 0,9078$, Abb. 4-9). Dieser lässt sich durch ein mittleres Verhältnis von DHA zu MGO von 2:1 beschreiben. Im Vergleich übersteigen die DHA-Gehalte in frischen Manuka-Honigen die MGO-Gehalte um das 7 bis 16fache. Im Laufe einer Lagerung bei 37 °C sinkt die DHA-Konzentration ab und es kommt zur MGO-Bildung bis zum Erreichen eines Plateaus (Vgl. Kapitel 4.1.1, *Adams et al., 2009*). Diese Umsetzung lässt sich in einer Annäherung des DHA-zu-MGO-Verhältnisses an 2:1 verdeutlichen, wie auch aus Abb. 4-10 hervorgeht.

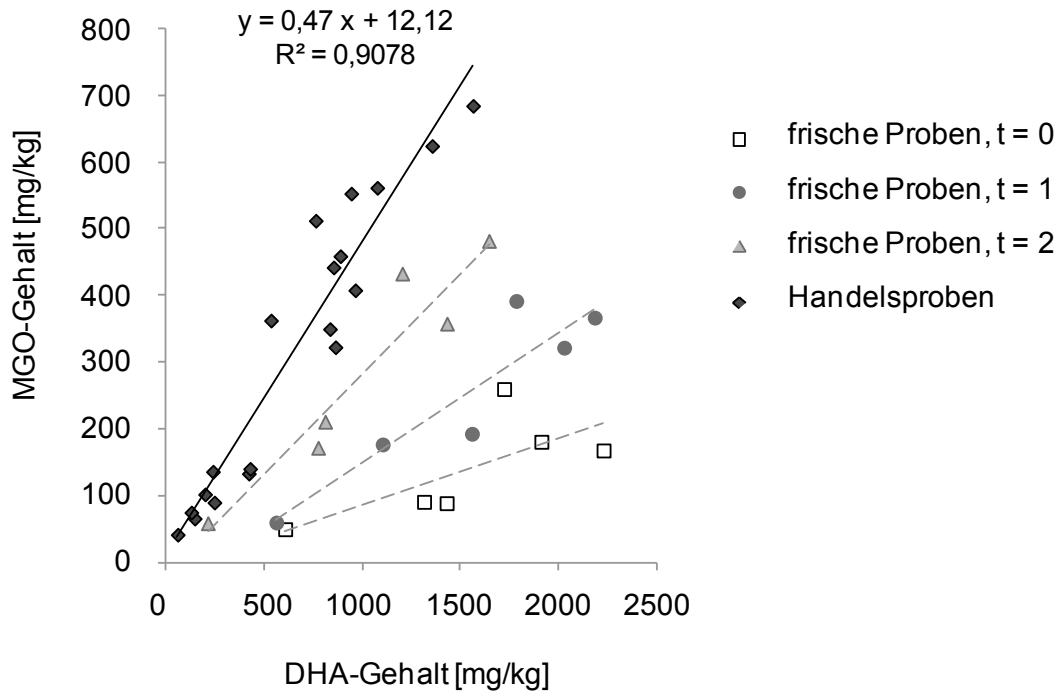


Abb. 4-9 Zusammenhang zwischen DHA und MGO in 19 Manuka-Handelsproben und 6 frischen Manuka-Honigen vor und nach Lagerung (Lagerung bei 37 °C, nach 0 Wochen: t = 0, nach 6 Wochen: t = 1, nach 12 Wochen: t = 2)

Eine Unterscheidung von frischen und „ausgereiften“ Manuka-Honigen anhand der DHA- und MGO-Gehalte ist aufgrund der vorhandenen Variabilität nicht immer möglich. Jedoch kann das berechnete Verhältnis beider Verbindungen zueinander als geeignetes Mittel zur Einteilung hinsichtlich des Reifegrades dieser Honige dienen (Abb. 4-10). Im Gegensatz zu den gemessenen Konzentrationen bestehen signifikante Unterschiede zwischen den berechneten DHA-MGO-Verhältnissen der „ausgereiften“ Handelsproben und der frischen Honige. Im Zuge einer simulierten Lagerung dieser frischen Proben nähert sich deren Verhältnis dem von kommerziellen Proben an.

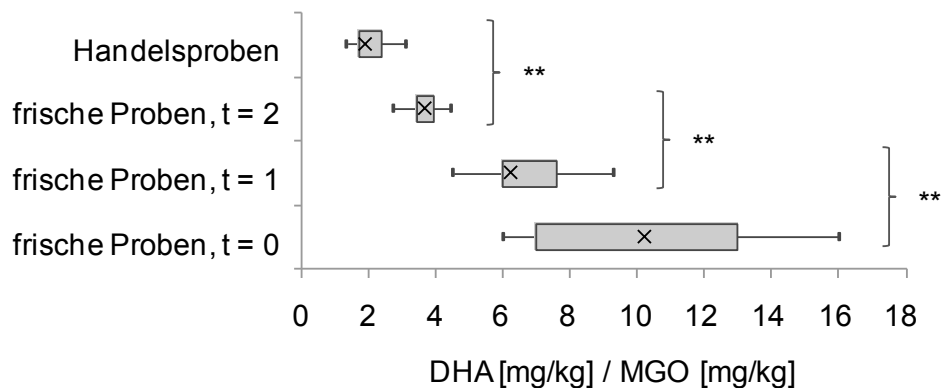


Abb. 4-10 Verhältnis von DHA zu MGO in 19 Manuka-Handelsproben und 6 frischen Manuka-Honigen (Lagerung bei 37 °C, nach 0 Wochen: t = 0, nach 6 Wochen: t = 1, nach 12 Wochen: t = 2; Mittelwert-Vergleich mit t-Test, ** P < 0,01)

Die Ergebnisse stehen zudem in Einklang mit den Daten von *Adams et al. (2009)*. Unter Abschätzung der Gehalte aus den von ihnen dargestellten Kurven für DHA-Abnahme und MGO-Zunahme lässt sich ein analoges Verhältnis beider Verbindungen nach Honiginkubation ablesen. Die Autoren beschreiben allerdings höhere Werte von bis zu 5000 mg/kg DHA bzw. 450 mg/kg MGO in frischen Manuka-Honigen (*Adams et al., 2009*). Dies kann einerseits in einer hohen natürlichen Schwankungsbreite der Honiginhaltsstoffe begründet liegen oder andererseits auch auf Unterschiede in der genutzten Methodik, beispielsweise die Detektion über den Brechungsindex, zurückgeführt werden.

Honig, welcher von anderen *Leptospermum*-Arten stammt, kann ebenfalls MGO und DHA in hohen Anteilen enthalten. So wurden zwei Proben des australischen Jellybush-Honigs (*Leptospermum polygalifolium*) untersucht, welche ebenfalls durch ein DHA-zu-MGO-Verhältnis von 2:1 gekennzeichnet waren. Es standen des Weiteren drei frische Proben zur Verfügung, die eine dem Manuka-Honig analoge MGO-Bildung im Zuge einer simulierten Honiglagerung aufwiesen. Die Ergebnisse (Vgl. Tab. 4-4) lassen den Rückschluss zu, dass auch im Nektar dieser Pflanzen DHA aufzufinden ist, welches in der Folge eine starke MGO-Bildung in diesen Honigen hervorruft. Unter Einbeziehen der Daten von *Windsor et al. (2010)* können DHA-MGO-Quotienten von 18,5 bis 0,7 für Jellybush-Honige berechnet werden, was im Wesentlichen den Relationen in Manuka-Honigen während der Reifung entspricht. Abweichungen können mit den mitunter sehr hohen MGO-Gehalten bis zu 1723 mg/kg in Zusammenhang gebracht werden, welche in dieser Studie ermittelt wurden. Die hierfür eingesetzte simultane Bestimmung von DHA und MGO mittels RP-HPLC unter Derivatisierung mit O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamin lässt Zweifel an der Richtigkeit der Werte aufkommen, da die MGO-Gehalte in Folge einer „Neubildung“ während der Probenaufbereitung überschätzt werden können. Aufgrund der Erkenntnisse im Zuge der Methodenoptimierung für die DHA-Analytik (Vgl. Kapitel 4.1.3.2) ist eine simultane Bestimmung beider Verbindungen problematisch und nur schwer durchführbar.

Tab. 4-4 DHA- und MGO-Gehalte sowie DHA-MGO-Verhältnis ausgewählter Jellybush-Honige

Jellybush-Honig	DHA [mg/kg]	MGO [mg/kg]	DHA / MGO
Handelsprobe 1	1029 ± 38	432 ± 7	2,4
Handelsprobe 2	1316 ± 75	615 ± 6	2,1
Frische Honigprobe 1	1019 ± 51	194 ± 1	5,3
Frische Honigprobe 2	1324 ± 66	301 ± 2	4,4
Frische Honigprobe 3	570 ± 28	146 ± 4	3,9

Als Konsequenz lassen sich DHA und MGO als für Manuka- bzw. *Leptospermum*-Honig typische Zuckerabbauprodukte charakterisieren. Die Anwesenheit beider Verbindungen in einem bestimmten Verhältnis zueinander stellt dabei einen Qualitätsparameter dar. Darüber

hinaus wird jedoch auch deutlich, dass die im Honig stattfindende Umsetzung von DHA zu MGO unvollständig ist. Auch in „ausgereiften“ Honigen, welche im Zuge einer simulierten Lagerung kein weiteres MGO mehr bilden, sind noch hohe Gehalte an DHA vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass sich DHA und MGO in diesen Honigen in einer Art Gleichgewicht befinden, wodurch eine weitere DHA-Umsetzung verhindert wird. In der Literatur ist die Reaktion von Triosen wie DHA zu MGO als irreversible Dehydratation benannt (*Fedoronko & Koenigstein, 1969*). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ebenfalls keine Rückreaktion von MGO zu DHA beobachtet werden.

3.1.3.4 Einordnung der Daten im Vergleich zu anderen Lebensmitteln

MGO kann in verschiedenen Lebensmitteln detektiert werden (Vgl. Kapitel 2.3.2.1). Bei Betrachtung der in Tab. 2.3 aufgeführten Werte wird deutlich, dass Manuka-Honig nicht nur innerhalb der verschiedenen Honigsorten, sondern auch im Vergleich zu anderen Lebensmitteln hinsichtlich des MGO-Gehaltes eine Sonderstellung einnimmt. In Gehalten bis zu 80 mg/kg wurde die Verbindung lediglich in ausgewählten Käsesorten (*Bednarski et al., 1989*), Balsamico-Essig (*Degen et al., 2012*), Portwein (*Da Silva Ferreira et al., 2007*) oder Keksen (*Lorenzo & Morales, 2010*) nachgewiesen (Vgl. Kapitel 2.3.2.1). Allerdings entsprechen die gemessenen Konzentrationen dabei Manuka-Honigen mit niedrigen MGO-Werten. Hohe Gehalte bis zu 800 mg/kg, welche mehrfach für Proben dieser Honigsorte ermittelt werden konnten (*Mavric et al., 2008; Adams et al., 2008*), wurden für andere Lebensmittel bislang nicht dokumentiert. Im Allgemeinen kann 3-DG als die dominante 1,2-Dicarbonylverbindung benannt werden, während MGO mit Ausnahme des Manuka-Honigs aus quantitativer Sicht nur von geringer Relevanz ist (*Degen et al., 2012*). Dies weist wiederum darauf hin, dass es sich hierbei um keine technologisch begründete MGO-Bildung handelt, sondern eine spezielle botanische Variation vorliegt.

Darüber hinaus lassen sich der Literatur auch einige wenige Daten zum Vorkommen von DHA in Lebensmitteln entnehmen. So ist ein Nachweis der Verbindung in karamellisierten Mischungen und Krusten von Brezeln (*Severin et al., 1984*) sowie in gealterten Weinproben (*Laurie & Waterhouse, 2006*) beschrieben, wobei jedoch keine konkreten Gehalte aufgeführt sind. Zudem ist DHA als Stoffwechselprodukt bestimmter Mikroorganismen im Zuge von Fermentationsprozessen bekannt (*Green, 1960*), wodurch sich eine Detektion der Substanz in fermentierten Lebensmitteln ergeben kann.

DHA stellt zwar ein typisches Zuckerabbauprodukt dar, doch weist es entweder nur eine geringe Relevanz in komplexen Lebensmittelmatrixen auf, z.B. aufgrund eines zu geringen Vorkommens oder einer schnellen Weiterreaktion, oder es wurde bislang noch nicht näher als solches betrachtet. Letzteres lässt einerseits den Rückschluss zu, dass DHA in ausgewählten Lebensmitteln, welche z.B. durch einen hohen Zuckergehalt und leicht sauren pH-

Wert gekennzeichnet sind oder einer Erhitzung unterzogen wurden, durchaus vorhanden sein kann. Andererseits nimmt Manuka-Honig bezüglich des MGO-Gehaltes auch eine gewisse Sonderstellung ein, sodass DHA-Konzentrationen in diesen Größenordnungen auf dieses Lebensmittel beschränkt sein können. So konnte in anderen Sortenhonigen, welche Eingang in die vorliegenden Untersuchungen fanden, kein DHA oder nur in geringen Mengen unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode ermittelt werden. Dies lässt darauf schließen, dass DHA ähnlich dem MGO in Honig zwar enthalten sein kann, jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegt.

Bekannter ist dagegen die Nutzung von DHA in der Kosmetik. Hierbei wird es als funktioneller Inhaltsstoff insbesondere in Selbstbräunern verwendet (*Monfrecola & Prizio, 2001*), wobei die resultierende Braunfärbung durch Reaktion des DHA mit Proteinen der Haut zustande kommt. DHA wird den kosmetischen Produkten in Gehalten zwischen 1% und 10% zugesetzt, übliche Einsatzkonzentrationen belaufen sich dabei auf 3% bis 5% (*Burkhart & Burkhart, 2009*). Im Vergleich zu den analysierten frischen Manuka-Honigen, welche Gehalte bis über 2000 mg/kg DHA aufweisen können, wird deutlich, dass auch in Honig eine ähnliche Funktionalität dieses natürlichen Inhaltsstoffs diskutiert werden kann. *Kirk (1965)* benennt einen möglichen Einsatz von DHA zur Verbesserung der Bräunung von Backwaren. Hierbei ist von einem der kosmetischen Anwendung analogen Mechanismus auszugehen. Gegen eine derartige Nutzung in der Lebensmittelverarbeitung spricht jedoch, dass DHA nach bestehendem Lebensmittelrecht kein zugelassener Zusatzstoff ist (*ZZulV, 1998*). Wird hingegen der Honig selbst in diesem Sinne angewendet, ist das resultierende Produkt rechtlich nicht zu beanstanden und eine eventuelle verstärkte Bräunung lässt sich auf das darin enthaltene DHA zurückführen.

Zusammenfassend sind sowohl MGO als auch DHA als charakteristische Komponenten für Manuka-Honig zu bezeichnen, wobei die vorliegenden Konzentrationen einzigartig sind. In der Folge können die Verbindungen als Identifizierungsmerkmal für Manuka-Honig oder zur Klassifizierung innerhalb der Honigsorte dienen.

3.1.4 Diskussion zum Vorkommen von DHA in Manuka-Nektar

Wie in Kapitel 4.1.1 bereits erwähnt, kann die Anwesenheit einer Precursor-Verbindung für die MGO-Bildung im Zuge der Honigreifung verantwortlich sein. Aufgrund der allgemeinen Zusammensetzung von Honig ist hierbei eine Substanz aus dem Zuckerabbau wahrscheinlich. Parallel zu den Untersuchungen dieser Arbeit gelang es *Adams et al. (2009)*, die Verbindung Dihydroxyaceton (DHA) in Manuka-Nektar nachzuweisen und als verantwortliche Komponente für die MGO-Bildung im Honig zu identifizieren.

Im Detail analysierten diese Autoren sowohl frische Manuka-Honige als auch –Nektar. Dabei konnten sie eine zu den Ausführungen in Kapitel 4.1.1 analoge MGO-Bildung in den Honigproben während der Lagerung feststellen. In Nektar war hingegen kein MGO detektierbar, was mit den Ergebnissen der Pflanzenproben dieser Arbeit in Einklang steht (Vgl. Kapitel 4.1.2.1). Es wurde gezeigt, dass MGO in Form einer Vorstufe in den Nektar eingebracht wird. Diesen Precursor stellt die Triose DHA dar, die in den untersuchten Proben in hohen Konzentrationen bis zu 5100 mg/kg nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde eine parallel zur MGO-Bildung ablaufende Abnahme des DHA-Gehalts in frischem Manuka-Honig beobachtet, sodass sich auf eine direkte Umsetzung schließen lässt.

Für andere Pflanzen bzw. deren Nektare liegen bislang keine Daten zu eventuellen DHA-Gehalten vor. Diese Tatsache ermöglicht den Rückschluss, dass es sich hierbei um eine Besonderheit der Manuka-Pflanze handelt. Darauf weisen orientierende Untersuchungen an Blüten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls hin. Unter Anwendung der Methode von *Adams et al. (2009)* konnte in Rapsblüten, die zur hiesigen Honiggewinnung dienen, kein DHA nachgewiesen werden.

Die Ursache dieses Phänomens ist trotz der nun bekannten Precursor-Verbindung nach wie vor ungeklärt. Da dies offensichtlich auf die Manuka-Pflanze begrenzt ist, lassen sich die gemessenen Gehalte an DHA im Nektar auf einen botanischen Ursprung zurückführen. Wie bereits erwähnt, weist Neuseeland eine große vegetative und klimatische Vielfalt auf, welche einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten einzelner Pflanzen nimmt. Laut *Wardle (1991)* zeigten Manuka-Pflanzen innerhalb einheimischer Holzgewächse die deutlichsten Anpassungserscheinungen, beispielsweise in Bezug auf ihre Wüchsigkeit. Von daher kann die Anwesenheit hoher Konzentrationen an DHA im Nektar als Antwort der Pflanze auf äußere Bedingungen verstanden werden. Manuka-Pflanzen sind zwar relativ tolerant in Bezug auf die vorherrschenden Bodenverhältnisse und in der Folge über ganz Neuseeland verbreitet (*Wardle, 1991*), allerdings beeinflussen im Detail die Nährstoffsituation sowie weitere Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit das Wachstum. So beschreiben z.B. *Ross et al. (2009)* Unterschiede im Stickstoffgehalt von Manuka-Pflanzen, welche auf bimshaltigem Boden in Turangi wuchsen, im Vergleich zu anderen Gegenden. In dem Fall ist DHA demnach als Stressindikator zu betrachten, wobei die Frage resultiert, welcher

abiotische Faktor für die Reaktion verantwortlich ist. In Analogie zu einer stressbedingten MGO-Akkumulation können Salzgehalt, Trockenheit, Kälte oder Anwesenheit von Schwermetallen eine Rolle spielen (*Yadav et al., 2005; Hossain et al., 2012*). Folglich ist eine gewisse Abhängigkeit der vorkommenden DHA-Gehalte im Nektar und nachfolgend im Honig von klimatischen oder geologischen Bedingungen zu erwarten, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher geprüft werden konnte.

Des Weiteren können die hohen DHA-Konzentrationen auch durch eine grundlegende Mutation im Pflanzenmetabolismus, wodurch eine erhöhte Bildung der Triose resultiert, hervorgegangen sein. Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) stellt ein Zwischenprodukt der in Pflanzen ablaufenden Glykolyse dar. DHAP wird dabei durch die Aldolase aus Fructose-1,6-Diphosphat gebildet und mittels Triosephosphat-Isomerase zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) umgesetzt, welches wiederum durch die Glycerol-3-phosphatdehydrogenase abgebaut wird (*Horn, 2012*). Eine Akkumulation durch eine Über- oder Unterexpression der zuständigen Enzyme ist demnach möglich. Darüber hinaus ist eine DHAP-Reduktase für Pflanzenkompartimente beschrieben, die vorliegendes DHAP zu Glycerol-3-Phosphat umsetzt, welches dann als Regulator in Signalwegen zur Abwehr der Pflanze gegenüber bestimmten Parasiten dient (*Venugopal et al., 2009*).

Generell dient Nektar der Pflanze zum Anlocken von Bestäubern. Die dabei abgeschiedene Menge sowie die Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von der Umgebung und der Art des Bestäubers (*De la Barrera & Nobel, 2004*). Allerdings diskutieren die Autoren die Nektarproduktion auch als Mechanismus der Pflanze, um überschüssigen Zucker des Phloems zu entfernen. Der Zucker wird dabei aktiv aus dem Phloem über das Parenchym und die sekretorischen Zellen der Nektarien in den Nektar transportiert (*Lüttge, 1977*). Dies lässt den Rückschluss zu, dass DHA ebenfalls aktiv in den Nektar gelangt, z.B. um die Pflanze vor einer Akkumulation mit Carbonylverbindungen zu schützen. Gleichzeitig wird der Nektar als komplexe Mischung beschrieben, die wesentlich zur Hemmung von mikrobiellem Wachstum beiträgt (*Carter & Thornburg, 2004*). Ausgehend von *Molin et al. (2003)*, die eine toxische Wirkung der Verbindung auf Hefezellen bestimmten, kann eine solche Funktionalität für DHA ebenfalls gefolgert werden.

Unter der Annahme, dass das DHA nicht aus der Pflanze selbst stammt, lässt sich auch ein Eintrag durch Mikroorganismen diskutieren. Methylo trope Hefen wie *Candida boidinii* sind in der Lage, DHA durch die DHA-Synthase aus Xylose-5-phosphat und Formaldehyd zu bilden (*Waites & Quayle, 1980; Bystryk et al., 1981*). Hefen können in Nektar weitverbreitet vorliegen, wie *de Vega et al. (2009)* an südafrikanischen Pflanzen zeigten, wobei sie Einfluss auf den Zuckergehalt nehmen. Auch für Honig ist ein natürlicher Gehalt an Hefen beschrieben, wobei vorrangig osmotolerante Organismen relevant sind (*Beckh et al., 1999*). Zudem kann DHA als Substrat für die DHA-Kinase dienen, die als Stressantwort

auf einen hohen Salzgehalt in *Saccharomyces cerevisiae* erstmals nachgewiesen wurde und zum Abbau des für die Hefe toxischen DHA genutzt wird (Molin et al., 2003).

Im Fall von Manuka-Pflanzen kann das erhöhte Vorkommen von DHA neben einem Einfluss gängiger Mikroorganismen auch in einem Befall mit „sooty moulds“ begründet liegen. Diese Organismen leben in Symbiose mit den Pflanzen, was sich äußerlich durch ein schwarzes Erscheinungsbild der Sträucher bzw. Bäume bemerkbar macht (Hughes, 1976). Auf Manuka-Pflanzen isolierte Endophyten sind hierbei als wirtsspezifisch beschrieben (Johnston, 1998) und stellen demnach ebenfalls ein Charakteristikum für Manuka dar. Das symbiotische Zusammenleben kann eine Ursache für eventuelle Mutationen oder Abwehrmechanismen im Pflanzenstoffwechsel darstellen. Für andere Spezies konnte z.B. durch einen Befall mit „sooty moulds“ eine Akkumulation polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und Schwermetalle festgestellt werden, was auf eine Beeinflussung der Speicher- oder Abbauege der Pflanze zurückgeführt wurde (Joueva et al., 2006). In der Folge sind wiederum Stressreaktionen der Pflanze möglich (Hossain et al., 2012). Inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem DHA-Gehalt und einem parasitären Befall besteht, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund der Spezifität dieser Organismen kommt dem Erklärungsansatz in Kombination mit stressbedingten Reaktionen oder dauerhaften Mutationen der Pflanzen die größte Relevanz zu.

3.2 Analyse weiterer Inhaltsstoffe in Manuka-Honigen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die MGO-Bildung

3.2.1 Analytische Charakterisierung von Manuka-Honigen

Eine Charakterisierung von Honig erfolgt üblicherweise über Parameter wie den Zucker- und Wassergehalt oder das Spektrum der freien Aminosäuren. Hierbei lassen sich aus der Literatur für Manuka-Honig nur wenige Daten heranziehen. Da diese Honigsorte in Bezug auf MGO eine besondere Stellung einnimmt, ergibt sich die Fragestellung, inwieweit Abweichungen in weiteren Analysenparametern in handelsüblichen Proben festzustellen sind. Aufgrund der Reaktivität von MGO ist z.B. ein Einfluss auf den Gehalt von Proteinen oder Aminosäuren möglich. Daher soll eine analytische Charakterisierung von Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Honigsorten erfolgen. Hierzu wurden der pH-Wert, der Gehalt an Wasser, Fructose, Glucose, Proteinen und Aminosäuren sowie der Gesamtphenolgehalt und die Honigfarbe in die Untersuchungen einbezogen.

3.2.1.1 Wassergehalt und pH-Wert

Der Wassergehalt von ausgereiftem Honig darf aus rechtlicher Sicht 20% nicht übersteigen (*Honig-V, 2004*), im Mittel beträgt er etwa 17% (*Belitz, 2001*). Die mittels Refraktometer bestimmten Werte der zur Verfügung stehenden Honige entsprechen in jeder untersuchten Probe der gesetzlichen Norm (Abb. 4-11). Aus den Ergebnissen wird weiterhin ersichtlich, dass Manuka-Honig einen vergleichsweise hohen Wassergehalt aufweist. Signifikante Unterschiede sind hierbei sowohl zu den untersuchten Nektar- als auch Honigtau-Honigen festzustellen. Aus der Literatur lassen sich zusätzliche Werte von 17,8% (*Vanhanen et al., 2011*) und 16,1% (*Agbagwa et al., 2011*) für den Wassergehalt in Manuka-Honig heranziehen, wobei jedoch nur eine Probe von den Autoren untersucht wurde.

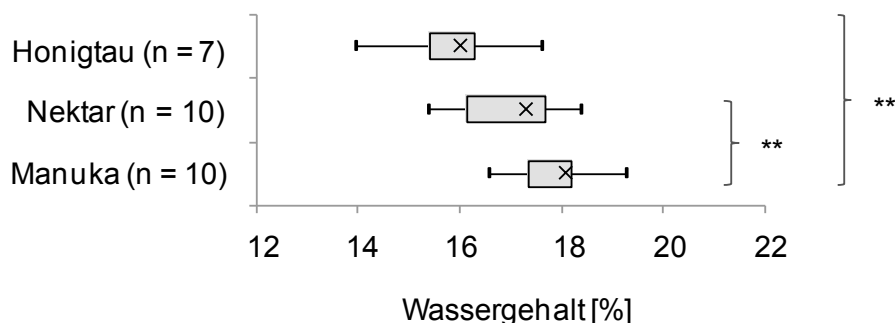


Abb. 4-11 Wassergehalt in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median; Mittelwert-Vergleich mit t-Test, ** P < 0,01)

Eine Erklärung für die relativ hohen Wassergehalte liefert die in Manuka-Honigen stattfindende MGO-Bildung. Während der Honigreifung kommt es im Allgemeinen zu einer stetigen Abnahme des Wassergehaltes (Vgl. Kapitel 2.2.1). Die Wasserabspaltung im Zuge der DHA-Umsetzung tritt in Manuka-Honig daher als zusätzlicher und entgegenwirkender Effekt auf. In der Folge können Manuka-Honige somit eine erhöhte Anfälligkeit gegen Mikroorganismen bzw. eine höhere Gärfähigkeit aufweisen (*Beckh et al., 2004*).

Die pH-Werte der Honige wurden ebenfalls ermittelt. Aus Abb. 4-12 geht hierbei zwar eine Variation in den gemessenen Werten hervor, jedoch ist keine Differenzierung von Manuka-Honig zu anderen Honigsorten aufgrund dieser Größe möglich. Darüber hinaus entsprechen die Daten den durchschnittlichen Angaben (*Belitz, 2001*), sodass sich keine Auffälligkeiten deklarieren lassen. Die in der Literatur bereits benannten pH-Werte von 4,21 (*Vanhanen et al., 2011*) bzw. 3,57 (*Agbagwa et al., 2011*) für Einzelproben verdeutlichen ebenfalls die natürlich vorkommende Spannweite und stehen in Einklang mit den gemessenen Daten.

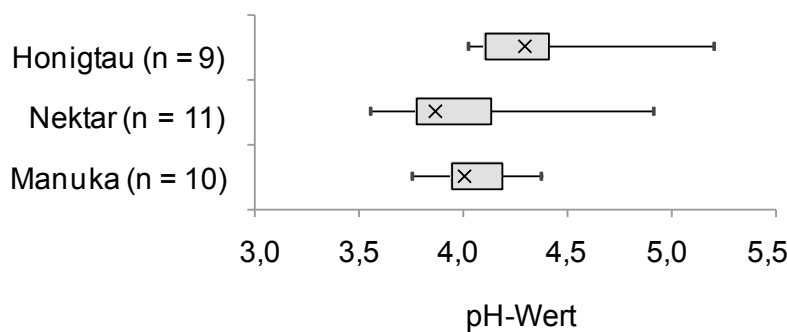


Abb. 4-12 pH-Wert in Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median)

3.2.1.2 Gehalt an Fructose und Glucose

Honig besteht bekanntermaßen zu wesentlichen Teilen aus den Monosacchariden Fructose und Glucose. Der Gehalt der Zucker wurde hierbei enzymatisch bestimmt (*SLMB, 2004*). Die Konzentrationen sowie das Verhältnis der beiden Zucker zueinander können in Abhängigkeit von der Honigsorte Schwankungen unterworfen sein (*Deifel, 1989*).

Die Konzentrationen an Fructose bzw. Glucose in Manuka-Honig (Abb. 4-13) entsprechen den allgemeinen Angaben hinsichtlich des Zuckergehaltes in Honig, wie sie beispielsweise durch *Doner (1977)* beschrieben wurden. Dabei ist der Fructose-Gehalt vergleichbar zu den Werten von Nektar-Honigen anderer botanischer Herkunft. Dementgegen liegt der Anteil an Glucose in Manuka-Honig ein wenig höher als in anderen Sorten.

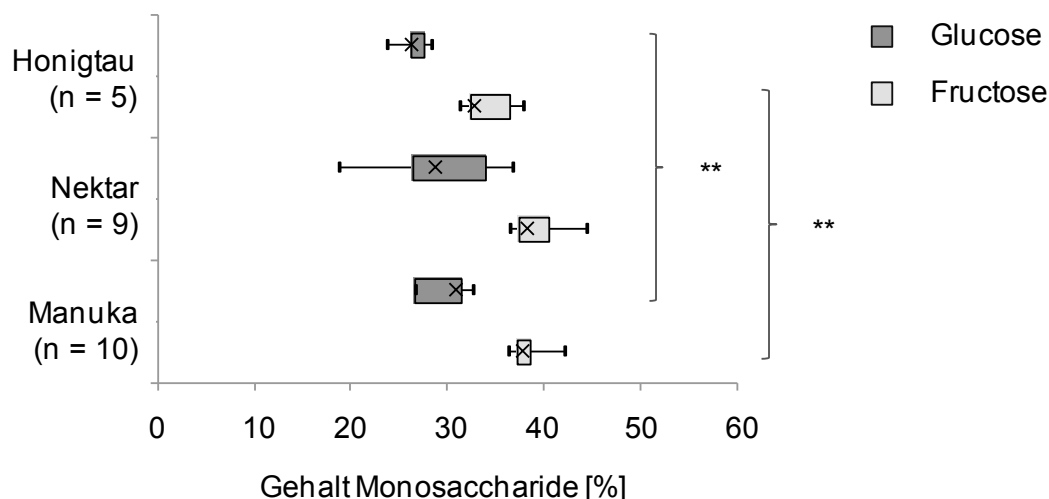


Abb. 4-13 Fructose- und Glucosegehalt in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median; Mittelwert-Vergleich mit t-Test, ** P < 0,01)

Die Summe an Fructose und Glucose kann ebenfalls mit den mitgeführten Nektar-Honigen verglichen werden (Tab. 4-5). Dementgegen besteht zu den analysierten Honigtau-Honigen ein signifikanter Unterschied im Gesamtgehalt, wodurch sich anhand dieses Parameters eine Zuordnung von Manuka-Honig zu den Nektarhonigen ergibt. Das Verhältnis von Fructose zu Glucose in Manuka-Honig ist im Mittel als durchschnittlich anzusehen.

Tab. 4-5 Summe und Quotient aus Fructose und Glucose von Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen

Honigquelle	Summe Frc und Glc [%]		Verhältnis von Frc zu Glc	
	Min – Max	Median	Min – Max	Median
Manuka (n = 10)	66,3 – 72,3	68,6	1,2 – 1,6	1,2
Nektar (n = 9)	55,6 – 74,4	70,5	1,0 – 1,9	1,3
Honigtau (n = 5)	55,3 – 65,0	60,1	1,2 – 1,4	1,3

3.2.1.3 Proteingehalt nach Bradford

Honig enthält im Allgemeinen nur wenig Protein. Hierbei kann ein Einfluss der Tracht verzeichnet werden, sodass innerhalb der einzelnen Honigsorten Schwankungen im Proteingehalt um einen Faktor bis zu 10 vorhanden sind (Bogdanov, 1981). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinbestimmung nach Bradford angewandt, wobei zur Quantifizierung eine externe Kalibrierung mit γ -Globulin durchgeführt wurde (Bradford, 1976; Bogdanov, 1981). Die Ergebnisse in Abb. 4-14 sind als entsprechende Äquivalente angegeben.

Bereits innerhalb der untersuchten Manuka-Honige wurden erhebliche Schwankungen im Proteingehalt von 133 bis 211 mg/100g ermittelt. Im Allgemeinen sind in Honigtau-Honigen ähnliche oder noch höhere Werte festzustellen. Typische Nektar-Honige, wie z.B. Rapshonig, weisen hingegen deutlich geringe Proteingehalte von 108,1 mg/100g auf. Als sehr proteinreicher Honig gilt der Heidehonig, wobei für die hier untersuchte Probe ein Gehalt von 359,5 mg/100g bestimmt wurde, der bereits bestehende Daten in der Literatur bestätigt (400 mg/100g, *Bogdanov, 1981*).

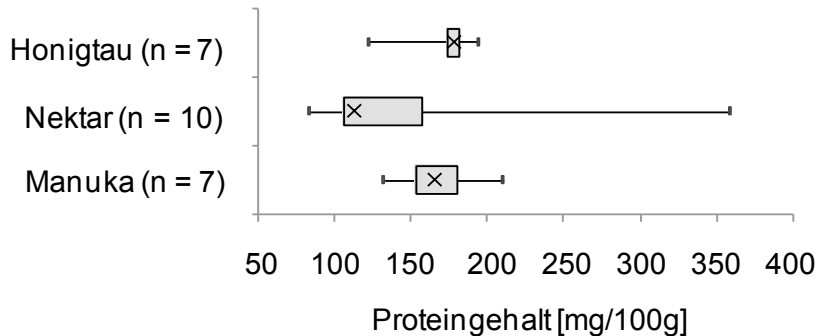


Abb. 4-14 Proteingehalt in Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Boxplot Whiskers min/max, x = Median)

Zum Proteingehalt von Manuka-Honig bestehen in der Literatur bislang keine Vergleichswerte. Aufgrund der ermittelten Daten kann diese Sorte aber als proteinreicher Honig beschrieben werden. Trotz der Variationen zwischen den Probengruppen lassen sich dabei keine signifikanten Unterschiede deklarieren, sodass eine mögliche Differenzierung über diesen Parameter nicht möglich ist. Dies bedeutet ebenfalls, dass für Manuka-Honig keine Auffälligkeiten in Bezug auf den Proteingehalt festzustellen sind.

3.2.1.4 Gehalt und Zusammensetzung der freien Aminosäuren

Die Bestimmung der freien Aminosäuren erfolgte mit Ionenaustausch-Chromatographie unter Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin (*Henle et al., 1991*), wobei zuvor eine Anreicherung der Aminosäuren durch eine Isolierung aus der Honigmatrix mit Kationenaustausch-Chromatographie basierend auf den Angaben von *Bouseta et al. (1996)* und *González-Paramas et al. (2006)* durchgeführt wurde. Es wurde eine Wiederfindung von 103,5% für diese Methode bestimmt (*Kunze, 2009*). Die auf diese Weise erhaltenen Gesamtgehalte der freien Aminosäuren sind in Abb. 4-15 aufgeführt.

Erwartungsgemäß wurden für Honigtau-Honige höhere Gesamtgehalte ermittelt als für Nektar-Honige. Während die ermittelten Werte z.B. für Rapshonig die bereits bestehenden Daten bestätigen (*Cotte et al., 2004; Bernal et al., 2005*), sind für Honigtau-Honige in der Literatur auch noch höhere Werte benannt (*Iglesias et al., 2004*). Manuka-Honig kann in Bezug auf die Nektar-Honige als Sorte mit einem tendenziell hohen Anteil freier Amino-

säuren charakterisiert werden. Die Daten zeigen wiederum eine relativ große Varianz in der Gesamtkonzentration innerhalb der untersuchten Proben. Darüber hinaus wird unter Einbeziehen der Werte aus Kapitel 3.2.1.3 ersichtlich, dass ein hoher Proteingehalt in Honig tendenziell auch mit einem hohen Anteil freier Aminosäuren einhergeht. Dabei sind in Analogie zu den Proteingehalten keine auffällig erniedrigten Gesamtgehalte der freien Aminosäuren in Verbindung mit MGO in Manuka-Honigen zu beobachten.

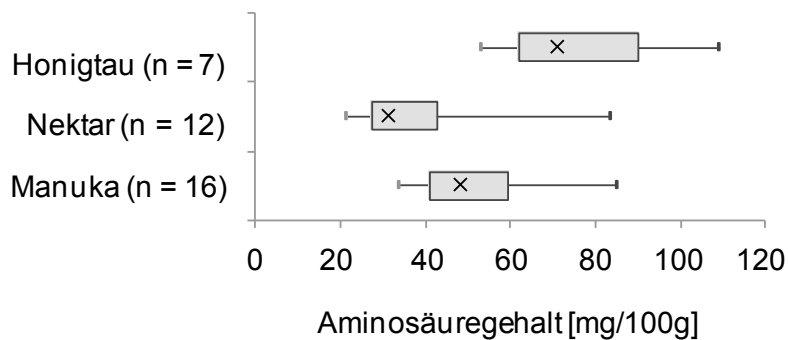


Abb. 4-15 Gehalt an freien Aminosäuren in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median)

In Bezug auf das ermittelte Aminosäure-Spektrum von Manuka-Honig, das in Tab. 4-6 als Übersicht angegeben ist, sind bei Betrachtung der vorgenommenen Einteilung in Manuka-, Nektar-, und Honigtau-Honige keine signifikanten Unterschiede, jedoch kleinere Auffälligkeiten festzustellen. So zeichnen sich die analysierten Manuka-Honige durch einen relativ hohen prozentualen Anteil an Prolin von 71% am Gesamtgehalt aus (Vgl. Tab. 4-6). Der Hauptteil des Prolins wird durch die Bienen in den Honig eingebracht (*Bergner & Hahn, 1972*), wodurch diese Aminosäure prinzipiell in allen Sorten vorherrschend ist (*White, 1978*). Doch während der mittlere Gehalt dieser Aminosäure zu weiteren Nektar- und Honigtau-Honigen vergleichbar ist, stellt Prolin unter prozentualer Betrachtung einen um 7% bis 16% höheren Anteil im Manuka-Honig dar. Dies kann jedoch ebenso darauf hinweisen, dass die übrigen Aminosäuren in der Relation in geringerem Maße vorliegen als in anderen Honigen, z.B. in Folge von Abbaureaktionen.

Des Weiteren konnten vergleichsweise geringe Gehalte an Asparagin und Asparaginsäure bzw. an Glutamin und Glutaminsäure sowie höhere Anteile an Phenylalanin als in den mitgeführten Vergleichsproben ermittelt werden. Die Konzentration an Lysin und Arginin, welche beide typische Reaktionspartner von MGO im Zuge der Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten darstellen, können hingegen nicht als auffällig erniedrigt beschrieben werden. So weist Arginin in Manuka-Honig im Mittel zwar einen geringeren prozentualen Anteil als in den betrachteten Nektar- und Honigtau-Honigen, aber diese Unterschiede sind nicht signifikant. Dennoch kann der etwas geringere Anteil der Aminosäure auf eventuelle

Modifizierungsreaktionen des MGO in Manuka-Honig hinweisen. Dabei ist jedoch in den untersuchten Proben kein direkter Bezug zum MGO-Gehalt auszumachen.

Tab. 4-6 Gehalte einzelner freier Aminosäuren in Manuka- und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen

AS	Manuka-Honig (n = 16)			Nektar-Honig (n = 12)			Honigtau-Honig (n = 7)		
	Spanne mg/100g	Med. mg/100g	Med. %	Spanne mg/100g	Med. mg/100g	Med. %	Spanne mg/100g	Med. mg/100g	Med. %
Asx	0,6 – 2,9	1,1	2,4	0,6 – 3,0	1,7	4,0	1,0 – 11,5	2,2	4,1
Thr	0,1 – 0,6	0,4	0,9	0,2 – 1,2	0,5	1,2	0,5 – 1,0	0,7	0,9
Ser	0,5 – 1,2	0,8	1,6	0,4 – 1,6	0,8	1,8	0,7 – 2,1	1,1	1,8
Glx	0,1 – 4,2	0,6	1,5	0,3 – 4,4	2,2	5,2	0,8 – 9,7	4,3	6,1
Gly	0,1 – 0,7	0,3	0,6	0,2 – 1,2	0,4	1,0	0,3 – 1,0	0,5	0,6
Ala	0,7 – 2,5	1,3	2,7	0,5 – 1,7	1,0	2,5	1,1 – 13,1	1,7	2,9
Cys	nd – 0,2	0,1	0,1	nd – 0,4	0,1	0,3	nd – 0,5	0,2	0,3
Val	0,4 – 1,0	0,7	1,4	0,4 – 1,7	0,8	2,0	0,8 – 1,3	1,1	1,3
Met	0,1 – 0,2	0,2	0,4	0,1 – 0,5	0,2	0,5	0,1 – 0,6	0,3	0,4
Ile	0,2 – 0,7	0,5	0,9	0,2 – 1,0	0,5	1,3	0,5 – 1,1	0,7	1,0
Leu	0,1 – 0,7	0,4	0,8	0,1 – 1,0	0,5	1,1	0,4 – 1,0	0,5	0,8
Tyr	0,3 – 3,6	1,2	2,1	0,2 – 16,4	1,9	1,7	0,8 – 7,3	1,7	2,5
Phe	1,0 – 15,0	4,1	8,2	0,9 – 12,5	2,8	5,4	2,2 – 23,1	7,7	10,2
His	0,1 – 3,3	0,5	1,0	0,1 – 1,2	0,5	1,4	0,4 – 22,1	0,7	0,9
Lys	0,3 – 2,0	1,3	2,4	0,2 – 2,0	1,1	3,2	0,9 – 4,2	1,2	2,3
Arg	nd – 5,2	0,4	0,8	0,1 – 1,4	0,5	1,2	0,1 – 9,6	0,8	1,5
Pro	23,5 – 65,8	33,5	70,9	13,4 – 42,0	23,0	63,6	30,1 – 56,9	36,7	54,5
Σ	33,9 – 85,2	48,4	100	21,5 – 83,7	38,2	100	53,3 – 109,2	71,2	100

(Angabe der einzelnen Aminosäuregehalte als ermittelte Spanne (Min – Max, mg/100g) und Medianwert (Med., mg/100g) sowie als prozentualer Anteil am Gesamtgehalt freier Aminosäuren, n.d. = nicht detektierbar; AS = Aminosäure, Asx = Asp + Asn, Glx = Glu + Gln, Σ = Summe der Einzel-Aminosäuren)

3.2.1.5 Gesamtphenolgehalt

Phenolische Verbindungen sind typische Minorbestandteile von Honig, welche zudem in Quantität und Profil direkt mit der botanischen Quelle in Bezug gebracht werden können. Der Gesamtphenolgehalt wurde photometrisch nach der Methode von Folin ermittelt. Es erfolgte eine externe Kalibrierung mit Gallussäure als Standardsubstanz, da diese als Hauptphenolsäure in Manuka-Honigen nachgewiesen wurde (*Weston et al., 2000; Yao et al., 2003*). Die Werte werden als Gallussäure-Äquivalente (GE) angegeben (Abb. 4-16).

Basierend auf dieser Methodik enthält Manuka-Honig im Vergleich zu anderen ausgewählten Nektarhonigen einen hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen. Bezüglich der

Gesamtkonzentration kann er folglich eher mit Honigtau-Honigen gleichgesetzt werden. Andere Studien, die Gesamtphenolgehalte von 43,0 bis 270,6 mg GE/100g für Manuka-Honig dokumentieren, deuten eine noch höhere Variation an (*Stephens et al., 2010*).

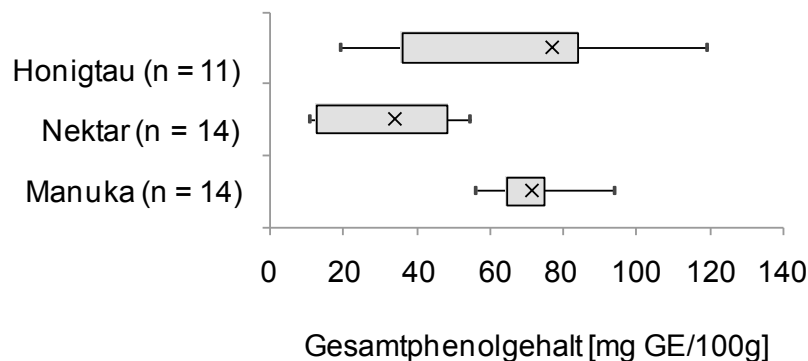


Abb. 4-16 Gesamtphenolgehalt nach Folin in Manuka-Honig und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median)

Bei der Diskussion der erhaltenen Werte ist jedoch zu beachten, dass die genutzte Methode nach Folin auf der photometrischen Bestimmung reduzierender Substanzen beruht. Honig enthält zu einem Anteil von etwa 70% Fructose und Glucose als reduzierend wirkende Monosaccharide. Im Zuge der Untersuchung konnte folglich auch ein Einfluss der Zuckerkomponente nachgewiesen werden (*Block, 2010*), was durch die Anwendung einer Matrixkalibrierung mit Gallussäure in Kunsthoniglösung kompensiert wurde. Demnach können die nach Folin ermittelten Gesamtphenolgehalte durch natürliche Schwankungen im Zuckerspektrum fehlerbehaftet sein. Ein Vergleich der Honigproben ist relativ zueinander dennoch sinnvoll, da trotz der Einflüsse auf die Bestimmung des Gesamtphenolgehalts die Relation untereinander bestehen bleibt. Die gewonnenen Resultate sind daher hinreichend valide, um als quantitative Abschätzung in die Beurteilung einbezogen zu werden.

3.2.1.6 Honigfarbe

Der Begriff Honig weist auf eine goldfarbene Substanz hin. Innerhalb der vielfältigen Sorten- und Mischhonige ist dabei eine große Variation an möglichen Farben von nahezu weiß bis tief dunkelbraun zu beobachten, deren Zustandekommen noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Um den Parameter der Honigfarbe in die Untersuchungen einzubeziehen, wurde eine photometrische Messung der Honigproben nach *Brudzynski & Miotto (2011)* angewandt. Hierbei wurden die Extinktionen bei 560 nm und 720 nm bestimmt. Die resultierende Extinktionsdifferenz (ΔE_{Farbe}) dient als Maß für die Honigfarbe.

Die Schwankungen der Ergebnisse der ausgewählten Nektar- und Honigtau-Honige geben die natürliche Diversität der Honigsorten wieder (Abb. 4-17). Dunkle Honigtau-Honige lassen sich durch eine hohe ΔE_{Farbe} kennzeichnen, während die helleren Nektar-Honige im

Mittel geringere Werte aufweisen. Manuka-Honige ordnen sich im mittleren Segment der analysierten Proben ein, was mit der visuellen Beurteilung der Honige in Einklang steht.

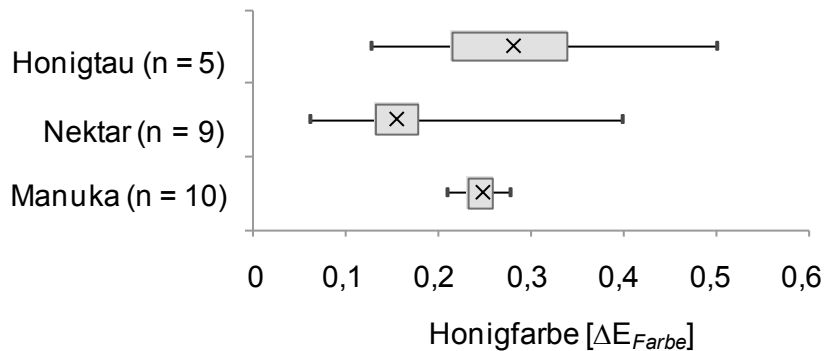


Abb. 4-17 Honigfarbe von Manuka-Honigen und anderen Nektar- und Honigtau-Honigen (Whiskers min/max, x = Median)

Demnach lässt sich Manuka-Honig als hell- bis dunkelbrauner Honig beschreiben, wohingegen z.B. Raps- oder Akazienhonig als auffallend helle und Pinien- oder Heidehonig als sehr dunkle Honige zu benennen sind.

3.2.1.7 Zusammenfassung und Korrelation zum MGO-Gehalt

Anhand der Analysendaten, zusammengefasst in Tab. 4-7, ist eine Charakterisierung von Manuka-Honig möglich. Der Wassergehalt ist hierbei signifikant höher als in mitgeführten anderen Honigsorten. Dementgegen liegt der pH-Wert in den für Honig üblichen Größenordnungen und unterscheidet sich nicht von anderen Honigen. Auch die bestimmten Gehalte an Fructose und Glucose stellen übliche Werte dar, wie sie bereits für andere Honige dokumentiert wurden. Für die Summe beider Monosaccharide ist für Manuka-Honig ein signifikant höherer Gehalt im Vergleich zu ausgewählten Honigtau-Honigen festzustellen. Der Proteingehalt nach Bradford repräsentiert einen vergleichsweise hohen Wert. Auch der Anteil der freien Aminosäuren ist in Bezug auf andere Nektar-Honige vergleichsweise hoch, jedoch deutlich geringer als in Honigtau-Honigen. Hinsichtlich des Gesamtphenolgehalts sind in Manuka-Honigen ähnliche Werte wie in Honigtau-Honigen bestimmbar. Farblich können sie im mittleren Bereich eingeordnet werden.

In der Konsequenz kann Manuka-Honig demnach als hell- bis dunkelbraune Honigsorte beschrieben werden, welche einen hohen Wassergehalt aufweist und vergleichsweise reich an Proteinen und phenolischen Verbindungen ist. Eine Zuordnung dieser Sorte zu Nektar- oder Honigtau-Honigen lässt sich anhand dieser Parameter nicht eindeutig vornehmen. Generell stammt Manuka-Honig vom Nektar der Manuka-Blüten ab (*Weston et al., 2000*), allerdings wird auch ein Beitrag von Honigtau diskutiert (*Tan et al., 1988*). Faktoren wie Wasser- und Zuckergehalt spiegeln tendenziell typische Werte für einen Nektar-Honig

wider. Dementgegen sind der hohe Anteil an phenolischen Verbindungen und Proteinen eher mit Honigtau-Honigen zu vergleichen. Folglich stellt die beobachtete Varianz ein Indiz für das Vorliegen einer Mischung aus Nektar und Honigtau als Quelle dar.

Tab. 4-7 Übersicht Analysenparameter für Manuka-Honig (Handelsproben)

Parameter	Medianwert	Min – Max	n
Wasser	18,1%	16,6 – 19,3%	10
pH-Wert	4,01	3,76 – 4,38	10
Fructose	37,9%	36,5 – 42,3%	10
Glucose	31,0%	26,8 – 32,8%	10
Protein (Bradford)	166,1 mg/100g	132,5 – 210,7 mg/100g	7
freie Aminosäuren	48,4 mg/100g	33,9 – 85,2 mg/100g	16
Gesamtphenol (Folin)	71,7 mg GE/100g	56,4 – 94,3 mg GE/100g	14
ΔE_{Farbe}	0,249	0,211 – 0,279	10
DHA	797 mg/kg	127 – 1563 mg/kg	18
MGO	356 mg/kg	66 – 684 mg/kg	18

Aufgrund der außergewöhnlich hohen MGO-Konzentrationen in Manuka-Honigen stellte sich im Vorfeld der Analysen die Frage, inwieweit Auffälligkeiten in anderen Parametern wiederzufinden sind. Diese können zum Einen als mögliche Ursache für die MGO-Bildung relevant sein, zum Anderen aber auch als Folge der hohen Gehalte beeinflusst werden. Wie jedoch dargestellt wurde, bestehen in Manuka-Honig hierbei keine generellen Anomalien in Bezug auf die betrachteten Faktoren.

Es wurde weiterhin eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge zwischen der MGO-Konzentration und den betrachteten Analysenparametern herauszustellen. Die ermittelten Koeffizienten (r) der einzelnen Faktoren zum MGO-Gehalt sind in Tab. 4-8 aufgeführt und ermöglichen Angaben über die Stärke (Zahl) sowie Art und Weise (Vorzeichen) einer eventuellen Korrelation. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass ein hoher Zusammenhang der Farbe von Manuka-Honig zur MGO-Konzentration besteht. Zudem lassen sich mittlere bis geringe Korrelationen zwischen dem MGO-Gehalt und den Parametern pH-Wert, Gehalt an freien Aminosäuren und Fructose feststellen. Dagegen bestehen nur sehr geringe Abhängigkeiten zu Wasser- und Gesamtphenolgehalt, zum Gehalt an Glucose bzw. Proteinen ist anhand der Daten kein Zusammenhang aufzuzeigen.

Die Ergebnisse lassen demnach die Schlussfolgerung zu, dass hohe MGO-Konzentrationen in Manuka-Honigen mit einer dunklen Farbe sowie einem niedrigen pH-Wert, geringen Gehalt freier Aminosäuren und hohen Anteil an Fructose einhergehen. Als Erklärung hierfür kann ein Beitrag von MGO zur Honigfarbe diskutiert werden, wie es bereits für

1,2-Dicarbonylverbindungen im Allgemeinen von *Marceau & Yaylayan (2009)* postuliert wurde. Dabei können potentielle Folgeprodukte von MGO eine Rolle spielen, wenngleich ein solcher Zusammenhang lediglich auf geringen Unterschieden in der Farbe basiert. Ein Einhergehen von hohen MGO-Gehalten mit eher niedrigen Aminosäurekonzentrationen kann der Reaktivität der Dicarbonylverbindung geschuldet sein, wodurch es zur Bildung von Folgeprodukten kommt. Darüber hinaus ist ebenfalls möglich, dass die Aminosäuren an der Bildung von MGO beteiligt sind und somit eine indirekte Korrelation in ausgereiften Honigen resultiert. Beispielhaft sollen hierfür Threonin und Glycin angegeben werden, für die Mechanismen zur Bildung von MGO bekannt sind (*Green & Elliot, 1964; Elliot, 1959*). Dabei gingen in ausgewählten Manuka-Proben ein niedriger Anteil dieser Aminosäuren tendenziell mit einem hohen MGO-Gehalt einher (*Kunze, 2009*). Das lässt darauf schließen, dass ein Beitrag zur MGO-Bildung erfolgt, wenngleich die vorliegenden Mengen an Threonin und Glycin in Honig nur gering sind.

Tab. 4-8 Zusammenhang einzelner analytischer Honigparameter zum MGO-Gehalt in Manuka-Honig

	Frc	Glc	pH	H ₂ O	Prot.	AS	GP	ΔE_{Farbe}
r zu MGO	0,5588	0,0203	-0,6027	0,3561	0,1741	-0,5419	0,4615	0,7030
Anzahl Proben	10	10	10	10	14	14	14	10

(Frc = % Fructose, Glc = % Glucose, pH = pH-Wert, H₂O = % Wasser, Prot. = mg/ 100g Protein nach Bradford, AS = mg/ 100g freie Aminosäuren, GP = mg GE/ 100g Gesamtphenol Folin, Farbe)

Ein niedriger pH-Wert kann ebenfalls mit einer verstärkten Umsetzung zu MGO in Verbindung gebracht werden. Die dabei vorkommenden Variationen im pH-Wert der Honige sind jedoch relativ gering, sodass ein Einfluss eher von geringer Bedeutung ist. In Bezug auf eine mögliche Korrelation zwischen MGO- und Fructose-Gehalt kann ein Einfluss der Monosaccharide oder deren Verhältnis zueinander auf die MGO-Bildung vermutet werden. Hierbei kann einerseits eine MGO-Bildung aus der Umsetzung der Fructose relevant sein, andererseits ebenso ein zufälliger und kein kausaler Zusammenhang vorliegen.

Die Daten lassen damit potentielle Relationen zwischen einzelnen Faktoren in den betrachteten Manuka-Proben erkennen. Da es sich um kommerzielle Honige handelte, welche im Wesentlichen als „ausgereift“ anzusehen sind, bilden die erhaltenen Resultate damit eine Art „Ist“-Zustand nach Umsetzung des Precursors DHA ab. Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der MGO-Bildung aus DHA im Zuge der Honigreifung sind anhand der Daten nicht sicher möglich. Da gleich hohe DHA-Ausgangsmengen nicht zwingend in analogen MGO-Gehalten resultieren (Vgl. Kapitel 4.1.1), ist ein Einfluss der Matrix und folglich einzelner Inhaltsstoffe auf diese Umsetzung wahrscheinlich. Im Folgenden wurden daher Modelluntersuchungen zur DHA-Umsetzung in Abhängigkeit von den gewählten Honigparametern durchgeführt.

3.2.1.8 Korrelation der Farbe mit weiteren analytischen Parametern

In der Literatur finden sich bereits verschiedene Diskussionsansätze zur Aufklärung der variierenden Honigfarbe. Als verantwortliche Inhaltsstoffe werden hierbei insbesondere phenolische Verbindungen (*Beretta et al., 2005; Blasa et al. (2006)*) und Produkte in Folge von Bräunungsreaktionen wie z.B. HMF (*Boonchiangma et al., 2009*) oder Melanoidine (*Brudzynski & Kim, 2011*), aber auch der Gehalt an Dicarbonylverbindungen (*Marceau & Yaylayan, 2009*) oder Mineralstoffen (*Lacerda et al., 2010*) einbezogen. Unabhängig von der analytischen Charakterisierung von Manuka-Honig wurden die ermittelten Daten daher auch für die Honigfarbe auf mögliche Zusammenhänge zu anderen Parametern geprüft.

Hierzu wurden 14 Sortenhonige einbezogen, für die neben der Farbe gemessen als ΔE_{Farbe} nach *Brudzynski & Miotto (2011)* auch der Gehalt an Wasser, Fructose, Glucose, HMF, Proteinen, Aminosäuren und phenolischen Verbindungen sowie der pH-Wert bekannt war. Es wurde eine Korrelationsanalyse der aufgeführten Faktoren zur Honigfarbe durchgeführt, deren Koeffizienten (r) in Tab. 4-9 aufgeführt sind. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass mit Ausnahme des Wassergehaltes zu allen Parametern ein gewisser Bezug hergestellt werden kann. Hierbei kann es sich zum Einen lediglich um „zufällige“ und keine kausalen Zusammenhänge handeln. Zum Anderen kann dies darauf hinweisen, dass sich die Honigfarbe aus mehreren Einflussfaktoren ergibt. In Analogie zum Aroma, welches durch eine Vielzahl von Substanzen bestimmt wird, ist auch für die Honigfarbe zu erwarten, dass es sich um das Zusammenwirken verschiedener Minorkomponenten handelt.

Tab. 4-9 Korrelationsanalyse der Honigfarbe zu ausgewählten Faktoren in 14 Honigproben

	Frc	Glc	pH	H ₂ O	HMF	Prot.	AS	GP
r zu Farbe	-0,6643	-0,5645	0,6911	0,1374	0,8093	0,6898	0,6003	0,8752

(Korrelationskoeffizient r der Honigfarbe gegenüber den Faktoren Fructose- (Frc), Glucosegehalt (Glc), pH, Wasser- (H₂O), HMF-, Protein- (Prot.), Aminosäure- (AS) und Gesamtphenolgehalt (GP))

Im Detail liefern insbesondere der Gehalt an HMF und phenolischen Verbindungen einen entscheidenden Beitrag zur Honigfarbe, da für die untersuchten Honige für beide Faktoren hohe Korrelationen ermittelt wurden. Dies bestätigt bereits bestehende Angaben in der Literatur. Des Weiteren sind zur Erklärung der Farbe auch die Gruppe der Melanoidine in die Überlegung einzubeziehen. In Bezug auf Manuka-Honig kann zudem ein Beitrag der 1,2-Dicarbonylverbindungen, insbesondere des MGO, zur charakteristischen Färbung der Honige diskutiert werden. Darüber hinaus kann DHA durch eine zum Bräunungseffekt auf der Haut vergleichbare Reaktion mit honigeigenen Aminosäuren oder Proteinen ebenfalls einen Beitrag zur Honigfarbe liefern.

3.2.2 Einflussfaktoren auf die Umsetzung von DHA zu MGO in Honig

Im Wesentlichen stellt die Umsetzung von DHA zu MGO eine Abspaltung von Wasser dar. Wie aus Abb. 4-18 hervorgeht, steht DHA durch Keto-Enol-Tautomerie mit Glycerinaldehyd im Gleichgewicht. Nach Abspaltung von Wasser entsteht 2-Hydroxypropenal, das über Keto-Enol-Tautomerie in MGO umgewandelt wird. Das Gleichgewicht liegt hierbei auf Seiten von MGO, jedoch konnten *Rose & Nowick (2002)* 2-Hydroxypropenal als kurzlebige Intermediat nach Dephosphorylierung bei enzymatischer Umsetzung von DHAP mittels MGO-Synthase bestimmen.

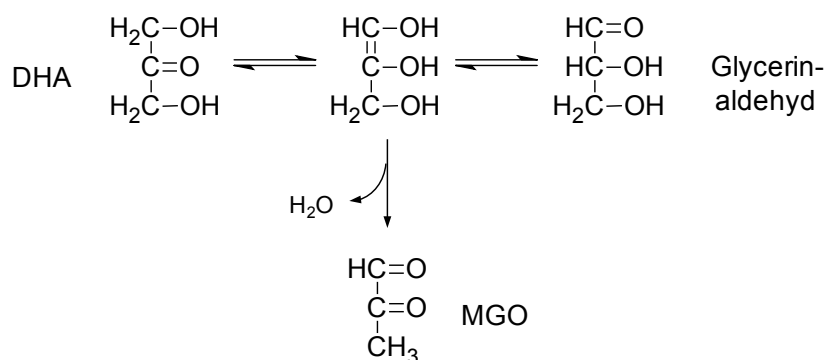


Abb. 4-18 Reaktionsmechanismus zur Umsetzung von DHA zu MGO

In „ausgereiften“ Manuka-Honigen konnte ein Gleichgewicht von DHA zu MGO von 2:1 ermittelt werden (Vgl. Kapitel 4.1.3.3). Dennoch finden sich innerhalb der Manuka-Honige Unterschiede im Umsetzungsgrad, was die Folgerung zulässt, dass weitere Parameter in die Bildung von MGO im Laufe der Honigreifung eingreifen. Auf diese Weise lassen sich Variationen innerhalb der resultierenden MGO-Konzentrationen trotz vergleichbarer Ausgangsgehalte an DHA erklären.

3.2.2.1 Modelluntersuchungen zur Umsetzung von DHA in Honigmatrix

Es wurden ausgewählte Honige anderer botanischer Herkunft, die nachgewiesenermaßen kein DHA enthielten, zu Dotierungsexperimenten eingesetzt. Dabei wurden die Proben mit analogen Mengen an DHA versetzt, wie sie für frische Manuka-Honige detektiert wurden (Vgl. Kapitel 4.1.3.3). Im Anschluss wurde eine Lagerung dieser Proben bei 37 °C über 6 Wochen durchgeführt. Die Modelluntersuchungen sollten Aussagen über die Umsetzung von DHA in Honigmatrix im Zuge der Reifung ermöglichen.

In Abb. 4-19 sind die Ergebnisse der MGO-Bildung, welche in Raps- und Waldhonig nach Dotierung mit aufsteigenden Mengen an DHA und anschließender Lagerung beobachtet wurde, dargestellt. Erwartungsgemäß besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der DHA-Zugabe und der Menge an daraus gebildetem MGO. Bei fortdauernder Lagerung wird eine weitere Umsetzung in Analogie zur MGO-Bildung in frischen Manuka-Honigen

stattfinden, wenngleich die stärkste Umsetzung innerhalb der ersten sechs Wochen erfolgte (Vgl. Kapitel 4.1.1). Aus den Daten wird ebenfalls ersichtlich, dass die Umsetzung von DHA im Honig nur anteilig verläuft. Die Werte nach Lagerung entsprechen dabei einer Umsatzrate von etwa 9% (Raps) bzw. 14% (Wald).

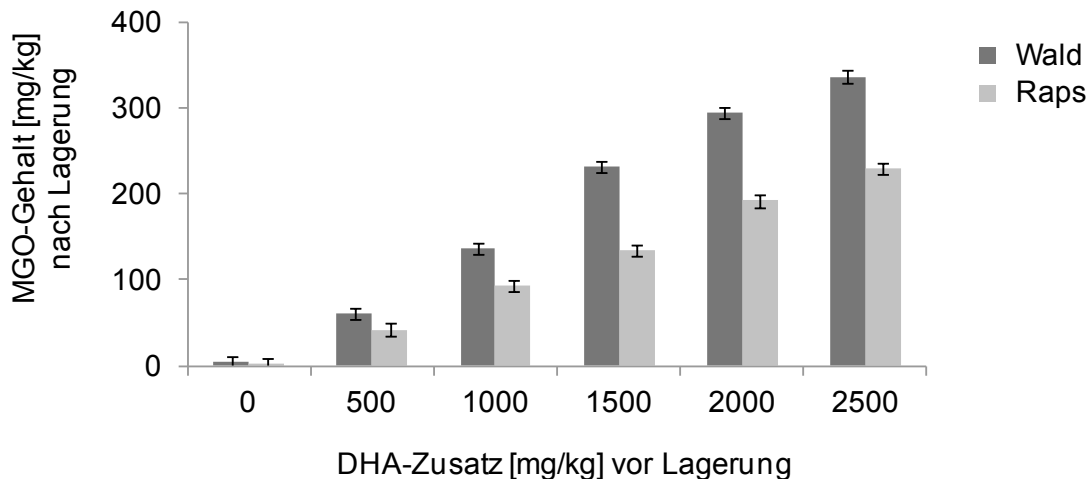


Abb. 4-19 MGO-Konzentrationen in Raps- und Waldhonig nach DHA-Dotierung und Lagerung (Dotierung von 500 bis 2500 mg/kg DHA, Lagerung für 6 Wochen bei 37 °C)

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse in Abb. 4-19, dass die Umsetzung von DHA in Raps- bzw. Waldhonig in unterschiedlich starkem Maße abläuft. Dies weist auf eine Beeinflussung der Reaktion durch die Honigmatrix hin. Um eine Zufälligkeit dieses Effekts auszuschließen, wurden weitere Honige mit je 2500 mg/kg DHA dotiert und gelagert. Die Ergebnisse lassen hierfür eine Varianz der Bildung an MGO zwischen 200 und 400 mg/kg erkennen (Abb. 4-20). Tendenziell weisen dabei Honigtau-Honige nach Lagerung höhere MGO-Konzentrationen auf als Nektar-Honige, in denen größere Variationen hinsichtlich der Bildung von MGO aus der zugesetzten Menge an DHA vorherrschen. In reiner Zuckermatrix wurde hingegen nur ein deutlich geringerer MGO-Gehalt bestimmt. Dies entspricht einem Basisumsatz von etwa 3%, während in Honig ein Umsetzungsgrad von im Mittel 12,0% (Nektar) bzw. 15,5% (Honigtau) nach Lagerung ermittelt wurde. Da im Kunsthonig lediglich Glucose und Fructose enthalten sind, wird der Unterschied auf die weiteren Inhaltsstoffe des Honigs zurückgeführt.

Darüber hinaus wird aus den Modellinkubationen allerdings auch deutlich, dass ein erheblicher Anteil des zugesetzten DHA nicht umgesetzt wird. Dies steht in Relation zu den hohen Konzentrationen in „ausgereiften“ Manuka-Honigen. In der Konsequenz ergibt sich daraus die Fragestellung, ob das nicht zu MGO umgesetzte DHA noch vollständig im Honig vorliegt oder zusätzliche Reaktionswege eingegangen ist. Hierzu wurden dotierte Honige nach Lagerung auf den verbliebenen DHA-Gehalt untersucht. Aus diesen Werten wird ersichtlich, dass die DHA-Abnahme wie erwartet mit der MGO-Zunahme einhergeht (Tab. 4-10). Allerdings wird ebenfalls deutlich, dass zwischen der Abnahme an DHA und

dem MGO-Gehalt nach Lagerung eine Diskrepanz besteht. Während in Honig N 1 nicht umgesetztes DHA nahezu vollständig vorliegt, lassen sich in anderen Proben, z.B. HT-2, eine zwei- bis dreifach so hohe DHA-Abnahme als MGO-Zunahme ausmachen. Hierbei sind weitere Reaktionen des DHA parallel zu einer Umsetzung zu MGO anzunehmen. Am Beispiel typischer Lagerungsparameter wird dieser Aspekt in Kapitel 4.3 näher betrachtet.

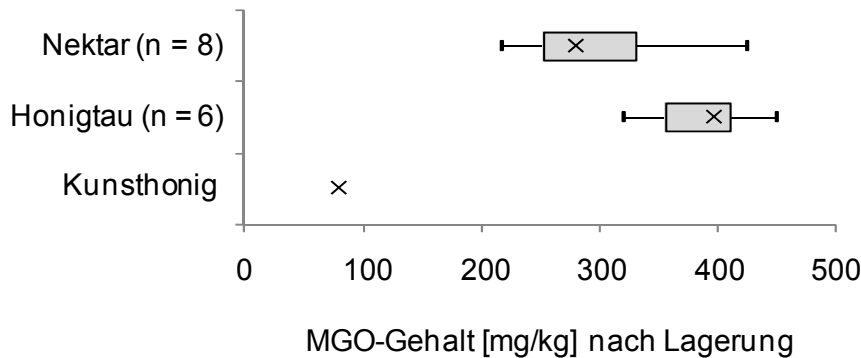


Abb. 4-20 MGO-Konzentration in Nektar- und Honigtau-Honigen sowie Kunsthonig nach DHA-Zusatz und Lagerung (Dotierung von 2500 mg/kg DHA, Lagerung für 6 Wochen bei 37 °C)

Das für diese Proben ebenfalls bestimmte DHA-MGO-Verhältnis von etwa 4:1 bis 11:1 lässt darüber hinaus erkennen, dass die Umsetzung im Modell vergleichbar zu frischen Manuka-Honigen ist. Hierbei konnten ähnliche Werte berechnet werden, die sich im Zuge der Lagerung einem Verhältnis von 2:1 annäherten (Vgl. Kapitel 4.1.3.3). Dies lässt darauf schließen, dass unter fortgesetzter Lagerung in den dotierten Honigen gleichfalls ein Faktor von 2 erhalten wird, was die Grenzen dieses Parameters in der eindeutigen Identifizierung und Charakterisierung von Manuka-Honig aufzeigt.

Tab. 4-10 MGO- und DHA-Gehalt sowie DHA-Abnahme und DHA-MGO-Verhältnis in ausgewählten Honigmatrixen nach Lagerung und DHA-Zusatz

Honig	MGO ₁ [mg/kg]	DHA ₁ [mg/kg]	Δ DHA [mg/kg]	DHA ₁ /MGO ₁
N 1	196 ± 1	2204 ± 20	296	11,2
N 2	256 ± 7	2021 ± 63	479	7,9
N 3	328 ± 3	1690 ± 78	810	5,2
HT 1	370 ± 2	1476 ± 20	1024	4,0
HT 2	387 ± 2	1373 ± 86	1127	3,6
HT 3	405 ± 2	1599 ± 73	901	4,0

(N = Nektar-Honig, HT = Honigtau-Honig, Zusatz von 2500 mg/kg DHA, Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen, Δ DHA = 2500 mg/kg – DHA₁ = DHA-Abnahme, DHA₁/MGO₁ = Verhältnis von DHA- zu MGO-Gehalt)

3.2.2.2 Prüfung mittels ausgewählter multivariater Analyseverfahren

Wie in Kapitel 4.2.2.1 deutlich gezeigt wurde, besteht ein Einfluss der Honigmatrix auf die Umsetzung von DHA zu MGO. Es stellt sich die Frage, ob dies auf einzelne Faktoren zurückzuführen oder vielmehr von verschiedenen Bestandteilen des Honigs abhängig ist. Durch eine Analyse typischer und charakteristischer Honiginhaltsstoffe sollten mögliche Einflussparameter und ein eventuelles Zusammenwirken dieser identifiziert werden. Hierfür wurden 14 verschiedene Honige auf den pH-Wert und die Gehalte an Wasser, Fructose, Glucose, freier Aminosäuren, Proteinen, phenolischen Verbindungen sowie der Honigfarbe untersucht und bezüglich der Menge an gebildeten MGO verglichen. Dabei erfolgte eine einheitliche Dotierung von 2500 mg/kg DHA mit anschließender Lagerung für 6 Wochen bei 37 °C. Eine Übersicht der bestimmten Werte für die genannten Inhaltsstoffe und Parameter ist in Tab. 4-11 gegeben, welche die natürlichen Variationen der unterschiedlichen Honigsorten veranschaulicht. Diese Vielfältigkeit wurde gewählt, um ein möglichst breites Spektrum der genutzten Parameter in die Untersuchungen einfließen zu lassen und auf diese Weise eventuelle Einflüsse einzelner Faktoren deutlich herausstellen zu können.

Tab. 4-11 Analysenparameter für Bildungsstudien in 14 Nicht-Manuka-Honigen

	MGO mg/kg	Frc %	Glc %	pH	H ₂ O %	Prot. mg/100g	AS mg/100g	GP mg/100g	ΔE_{Farbe}
1	259	37,4	34,5	3,84	16,2	207,8	29,1	17,0	0,177
2	223	44,6	26,4	3,74	15,8	127,9	21,5	12,0	0,063
3	338	38,0	26,4	4,11	14,0	249,4	53,3	19,5	0,129
4	270	36,9	36,9	3,82	18,4	106,8	54,8	11,1	0,066
5	217	41,8	25,2	3,87	17,6	182,6	23,1	15,7	0,159
6	288	40,5	34,0	3,61	17,7	223,7	40,4	13,8	0,156
7	395	32,9	26,2	4,30	15,7	461,4	130,0	35,4	0,311
8	391	40,2	30,2	4,11	15,4	358,8	28,4	17,8	0,132
9	390	38,4	28,8	4,15	17,1	1116,5	83,7	58,8	0,399
10	398	32,5	27,6	4,41	16,0	456,5	53,6	31,8	0,282
11	414	37,7	28,8	4,30	16,1	421,5	24,2	20,1	0,148
12	288	36,6	18,9	4,92	18,1	547,5	60,1	50,4	0,400
13	305	36,5	28,5	4,03	17,6	470,4	70,7	41,5	0,214
14	379	31,4	23,9	4,37	16,4	421,9	71,2	42,0	0,502
min	217	31,4	18,9	3,61	14,0	106,8	21,5	11,1	0,063
max	414	44,6	36,9	4,92	18,4	1116,5	130,0	58,8	0,502
med	321	37,5	28,0	4,11	16,3	390,2	53,4	19,8	0,168

(MGO-Gehalt nach Lagerung für 6 Wochen bei 37 °C, analytische Parameter: Fructose- und Glucosegehalt, pH-Wert, Wassergehalt (H₂O), Proteingehalt nach Bradford (Prot.), Anteil freier Aminosäuren (AS), Gesamtphenolgehalt nach Folin (GP) und Farbe)

Zur Identifizierung der Stärke (Zahl) sowie der Art und Weise (Vorzeichen) potentieller Zusammenhänge zwischen der MGO-Bildung und einzelnen Honigparametern wurde eine Korrelationsanalyse aller Werte durchgeführt. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten (Tab. 4-12) weisen jedoch auf keine eindeutige Abhängigkeit der MGO-Bildung von nur einem einzelnen Parameter hin. Die Daten zeigen allerdings einen mittleren Zusammenhang der MGO-Konzentration zu den Faktoren Fructose- und Protein-Gehalt sowie zum pH-Wert auf. Demnach geht eine starke MGO-Bildung mit einem höheren pH-Wert, hohen Proteingehalt sowie niedrigen Gehalt an Fructose einher bzw. wird unter den Bedingungen begünstigt. Ebenso kann eine geringe Korrelation zwischen der Bildung an MGO und den Faktoren Wasser-, Aminosäure-, Gesamtphenolgehalt und Farbe ermittelt werden, wohingegen nahezu kein Zusammenhang zum Glucose-Gehalt besteht.

Tab. 4-12 Korrelationsanalyse der ausgewählten Faktoren in 14 Honigproben

	Frc	Glc	pH	H ₂ O	Prot.	AS	GP	ΔE_{Farbe}
r zu MGO	-0,5995	-0,1145	0,5126	-0,4084	0,5815	0,4444	0,4369	0,4467

Korrelationskoeffizient r des MGO-Gehaltes gegenüber den Faktoren Fructose- (Frc), Glucose-Gehalt (Glc), pH-Wert, Wasser- (H₂O), Protein- (Prot.), Aminosäure- (AS), Gesamtphenolgehalt (GP) und Farbe

Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die ermittelten Unterschiede in dem resultierenden MGO-Gehalt trotz Zusatz gleicher Menge an DHA nicht einer speziellen Größe zugeordnet werden können, sondern aus der Gesamtheit der Honigmatrix bzw. aus dem Zusammenspiel der einzelnen Faktoren resultieren. Daraufhin wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um einen möglichen Beitrag einzelner Faktoren zu bestimmen. Generell dient die Regressionsanalyse zum Aufzeigen von Beziehungen einer abhängigen Variable zu ein oder mehreren unabhängigen Faktoren bzw. Regressoren (*Backhaus et al., 2006*). In diesem Fall sollte die Abhängigkeit des aus DHA-Zusatz resultierenden MGO-Gehalts von den aufgeführten Analyseparametern geprüft werden. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) gibt dabei an, welcher Anteil der Variation durch die Regressoren erklärt werden kann, wobei Werte zwischen 0 und 1 möglich sind. Da hierbei ein Einfluss durch Stichprobenumfang und Anzahl der Variablen erfolgt, wird unter Berücksichtigung ein korrigiertes Bestimmtheitsmaß (R^2_{kor}) angegeben. Die Gültigkeit des Modells wird über eine berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (P) geprüft, die eine Aussage über die Signifikanz der Regression erlaubt. Darüber hinaus können auch die berechneten Koeffizienten der einzelnen Variablen, die aus der für das Modell ermittelten Regressionsgerade hervorgehen, auf Signifikanz geprüft werden (P_i). Die statistischen Größen sind für die Analyse ausgewählter Kombinationen in Tab. 4-13 angegeben.

Unter Einbeziehen aller acht Parameter ergibt sich ein R^2_{kor} von 0,664, was jedoch mit einem zu hohen P behaftet ist und somit einem Signifikanzniveau von $< 0,05$ nicht genügt.

Zudem weisen die berechneten P_i für die Koeffizienten der Variablen sehr hohe und somit inakzeptable Werte, welche deutlich über einem Niveau von 0,05 liegen, auf. Demzufolge kann dieses Modell keine zufriedenstellende Erklärung für eine unterschiedliche MGO-Bildung liefern. Im Folgenden wurde daher die Anzahl der berücksichtigten Parameter verringert, wobei bereits für sieben Regressoren signifikante lineare Regressionen ermittelt wurden (Vgl. Tab. 4-13). Die einzelnen P_i sind jedoch immer noch zu hoch, um eine gute Modellanpassung zu gewährleisten. Dennoch wird anhand dieser Werte deutlich, dass der Protein- und Gesamtphenolgehalt entscheidende Einflussfaktoren sind, während der Gehalt an Glucose und freien Aminosäuren sowie die Farbe nur in geringem Maße zu den Unterschieden in der resultierenden MGO-Konzentration beitragen.

Tab. 4-13 Multivariate Regressionsanalyse der MGO-Bildung zu ausgewählten Parametern

n	$R^2_{\text{kor}}r$	P	P_i							
			Frc	Glc	pH	H ₂ O	Prot.	AS	GP	Farbe
8	0,664	0,07	0,22	0,87	0,58	0,37	0,06	0,89	0,15	0,95
7	0,719	0,02	0,10	0,87	0,49	0,30	0,03	0,85	0,10	–
	0,559	0,08	0,40	0,59	0,57	0,09	0,16	0,77	–	0,66
	0,718	0,02	0,11	0,82	0,55	0,32	0,03	–	0,11	0,90
	0,379	0,19	0,95	0,15	0,24	0,06	–	0,81	0,73	0,73
	0,644	0,04	0,08	0,40	0,76	–	0,01	0,88	0,04	0,76
	0,700	0,03	0,02	0,35	–	0,39	0,02	0,90	0,12	0,73
	0,718	0,02	0,07	–	0,27	0,19	0,01	0,84	0,10	0,98
	0,612	0,06	–	0,21	0,06	0,14	0,11	0,36	0,23	0,35
6	0,758	0,01	0,03	–	0,23	0,16	0,01	0,83	0,03	–
	0,758	0,01	0,05	0,84	0,47	0,25	0,02	–	0,07	–
	0,757	0,01	0,02	–	0,23	0,14	0,01	–	0,06	0,98
5	0,787	< 0,01	0,01	–	0,19	0,12	0,01	–	0,02	–
4	0,737	< 0,01	0,01	–	0,11	–	< 0,01	–	< 0,01	–
	0,763	< 0,01	< 0,01	–	–	0,07	< 0,01	–	0,03	–
3	0,683	< 0,01	< 0,01	–	–	–	< 0,01	–	0,01	–
	0,635	< 0,01	0,04	–	–	0,03	0,02	–	–	–

(n = Anzahl Parameter, $R^2_{\text{kor}}r$ = korrigiertes Bestimmtheitsmaß, P = Irrtumswahrscheinlichkeit, bestimmt mit multiplen Regressionsanalyse über Microsoft Excel; Parameter: Frc Fructosegehalt, Glc Glucosegehalt, pH, H₂O Wassergehalt, Prot. Proteingehalt, AS Gehalt freier Aminosäuren, GP Gesamtphenolgehalt, Farbe)

Auf diese Weise wurde eine weitere Reduzierung der Parameter vorgenommen. Es konnte eine signifikante lineare Regression für die Kombination aus Fructose-, Protein-, Wasser-, Gesamtphenolgehalt und pH-Wert ermittelt werden. Anhand dieser Faktoren lassen sich etwa 80% der beobachteten Unterschiede in der MGO-Bildung erklären, sodass von einer

guten Modellanpassung ausgegangen werden kann. Eine weitere Verringerung der Anzahl an Regressoren ermöglicht zwar eine Senkung der P_i , führt jedoch gleichzeitig zu einer Verschlechterung des $R^2_{\text{kor}}r$ und folglich zu keiner besseren Modellanpassung.

Für die Umsetzung von DHA zu MGO in Honig sind demzufolge insbesondere die Gehalte an Fructose, Protein und phenolischen Verbindungen sowie Wassergehalt und pH-Wert von Bedeutung. In Anbetracht des Reaktionsschemas in Abb. 4-18 wirkt sich ein geringer Wassergehalt durch eine Gleichgewichtsverschiebung begünstigend aus, da die Umsetzung auf einer Wasserabspaltung basiert. Für die anderen Parameter ist davon auszugehen, dass sie katalytisch auf die Reaktion zu MGO einwirken. Dies lässt sich beispielsweise für pH-Wert, Protein- und Gesamtphenolgehalt diskutieren. Eine Erklärung für den inversen Zusammenhang zum Fructose-Gehalt ist anhand dieses Aspektes nicht möglich, da eine zusätzliche Bildung von MGO aus dem Zuckerabbau mit einer positiven Korrelation einhergeht. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es sich im Fall der Fructose nur um einen zufälligen und keinen kausalen Zusammenhang handelt.

Ein auf einer katalysierten Umsetzung beruhender Mechanismus wurde bereits von *Shipar (2006a, b)* für die Reaktion von DHA mit Glycin zu MGO dokumentiert (Abb. 4-21). Auf dieser Basis ist eine katalytische Wirkung von Aminosäuren im Allgemeinen zu vermuten. Jedoch konnte für die MGO-Bildung in den Modellansätzen nur ein geringer Zusammenhang zum Anteil freier Aminosäuren in der Honigmatrix ermittelt werden. Auch die Daten der Regressionsanalyse ließen diesen Faktor nicht als relevant erkennen. Das deutet darauf hin, dass Aminosäuren zwar verstärkend auf die Umsetzung von DHA zu MGO einwirken, aber der Effekt nicht konzentrationsabhängig ist, sodass ein „Grundlevel“ an Aminokomponenten zur Katalyse ausreichend ist. Des Weiteren können nur einzelne der enthaltenen Aminosäuren maßgeblich daran beteiligt sein, wie z.B. für Glycin gezeigt wurde (*Shipar, 2006a, b*). Erste Dotierungsexperimente mit einzelnen Aminosäuren weisen dabei auf einen vergleichsweise starken katalytischen Effekt von Arginin hin (*Haberlau, 2010*).

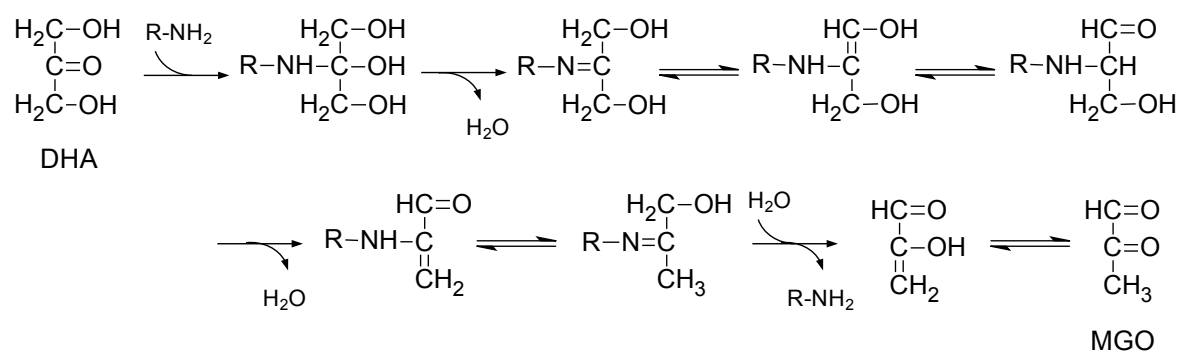


Abb. 4-21 Mechanismus zur Reaktion von DHA mit Glycin (R-NH₂) zum MGO nach *Shipar (2006a, b)*

Eine analoge Verstärkung kann für die Anwesenheit von Proteinen diskutiert werden, da auch proteingebundene Aminosäuren an einer Reaktion beteiligt sein können. So lassen die Ergebnisse der statistischen Auswertung auf eine Steigerung der MGO-Bildung mit zunehmendem Proteingehalt schließen.

Trotz der Beeinflussung durch die Honigzusammensetzung ist der DHA-Gehalt selbst der am stärksten ausschlaggebende Faktor für die MGO-Bildung. Es ist allerdings herauszustellen, dass die Schwankungen in der Umsatzrate von DHA zu MGO mit den betrachteten Parametern zu 70% bis 80% erklärt werden können. In der Praxis kann dies für eine Vorabschätzung des zu erwartenden MGO-Gehalts genutzt werden. Hierzu ist neben einer Quantifizierung des DHA-Gehalts z.B. eine Analyse des Proteingehaltes nach Bradford, die Ermittlung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin sowie eine enzymatische Zuckerbestimmung heranzuziehen. Weitere mögliche Ansatzpunkte bietet die Einstellung und Kontrolle des Wassergehaltes oder auch des pH-Wertes während der Honigverarbeitung. In Hinblick auf eine „Optimierung“ der MGO-Ausbeute ist jedoch zu bedenken, dass Honig während der Verarbeitung keine Stoffe entzogen oder zugefügt werden dürfen. Demnach ist eine Modifizierung ausgewählter Parameter zugunsten einer eventuellen besseren Umsetzung des DHA aus lebensmittelrechtlicher Sicht nicht gestattet.

3.3 Charakterisierung von Lagerparametern in Manuka-Honig

Honig unterliegt bestimmten Qualitätsansprüchen, welche in Kapitel 2.2.7 bereits benannt wurden. Dabei ist die Prüfung auf einen Einfluss in Folge einer unsachgemäßen Lagerung oder thermischen Behandlung des Honigs ein wesentlicher Bestandteil. Hierzu werden der Gehalt an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) sowie die Aktivität des Enzyms Diastase in Form der Diastasezahl (DZ) zur Beurteilung herangezogen. Qualitätsmindernd gelten dabei Werte, die den gesetzlich festgelegten Grenzwerten von höchstens 40 mg/kg HMF und einer DZ von mind. 8 nicht entsprechen (*Honig-V, 2004*).

Für Manuka-Honig existieren in der wissenschaftlichen Literatur nur wenige Daten zu Bildung und Konzentration von HMF oder Angaben zur Diastase-Aktivität. Jedoch lassen Mitteilungen aus der Praxis eine gewisse Problematik aufgrund hoher HMF-Werte trotz nachweislich konformer Honigverarbeitung erkennen. Ziel nachfolgender Analysen war daher eine Prüfung, inwieweit eine generelle Beeinträchtigung dieser Qualitätsparameter in Manuka-Honig vorliegt, die ggf. auf andere Faktoren zurückzuführen ist.

3.3.1 Bildung an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

3.3.1.1 Vorkommen und Bildung von HMF in Manuka-Honigen

Die Beurteilung von HMF in Manuka-Honig erfordert zunächst eine Analyse des „Ist-Zustands“. Hierfür wurden sowohl frisch gewonnene Manuka-Honige als auch Handelsproben auf ihren HMF-Gehalt untersucht. Die Quantifizierung von HMF erfolgte dabei mittels RP-HPLC und UV-Detektion unter Anwendung einer externen Kalibrierung (*Weigel et al., 2004*).

In der Regel ist HMF in frischen Honigen nur zu einem geringen Anteil nachzuweisen. Während der Alterung erfolgt dessen Bildung in direkter Weise aus 3-DG (*White, 1964; Deifel, 1989*). Die aus den Untersuchungen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass auch in frischen Manuka-Honigen analog zu anderen Honigsorten nahezu kein HMF detektierbar ist. Es wurden lediglich sehr geringe Konzentrationen bis höchstens 2 mg/kg ermittelt. Im Vergleich dokumentieren *Morales et al. (2009)* für frisch gewonnene Honige aus Spanien HMF-Gehalte von 0,9 bis 14,6 mg/kg. Aus den Werten wird somit ersichtlich, dass in Manuka-Honig keine generelle Beeinträchtigung in Form einer erhöhten Grundkonzentration an HMF in frischen Proben vorliegt.

Die HMF-Bestimmung in Manuka-Handelshonigen ergab hingegen eine weite Streuung der Konzentrationen von 3 bis 75 mg/kg (Tab. 4-14). In den untersuchten Manuka-Proben sind somit vereinzelt Überschreitungen des Grenzwertes vorzufinden.

Tab. 4-14 Konzentrationen an 3-DG und HMF in Handelshonigen

Honigquelle	3-DG [mg/kg]		HMF [mg/kg]	
	Min – Max	Median	Min – Max	Median
Manuka (n = 20)	328 – 1169	565	2 – 75	13,6
Nektar (n = 12)	140 – 644	301	n.d. – 28	6,1
Honigtau (n = 8)	365 – 1453	872	n.d. – 26	3,5

Die Analyse von fünf Manuka-Proben durch *Mavric et al. (2008)* ließ bereits eine gewisse Variation der HMF-Konzentrationen erkennen (3 – 43 mg/kg), die aus den Ergebnissen dieser Arbeit noch deutlicher hervorgeht. Vergleichend hierzu wurden in mitgeführten Nektar- und Honigtau-Honigen anderer botanischer Herkunft im Mittel geringere HMF-Gehalte bestimmt. Die Werte bestätigen dabei im Wesentlichen die Daten von *Weigel et al. (2004)*, die in vergleichbaren Honigproben im Mittel HMF-Konzentrationen von 2 mg/kg, mit Höchstwerten von 44 mg/kg, ermittelten. Ähnliche HMF-Gehalte wurden auch für Nektar-Honige aus Spanien dokumentiert (0,2 bis 41,2 mg/kg, *Serrano et al., 2006*).

Im Folgenden wurden die frischen Proben einer definierten Lagerung bei 37 °C unterzogen und in sechswöchigen Abständen auf den Gehalt an HMF untersucht, um die Bildung von HMF in Manuka-Honig im Zuge der Alterung näher charakterisieren zu können. Hierbei wurde ein deutlicher Anstieg der HMF-Konzentrationen ermittelt (Abb. 4-22), welcher in ähnlicher Form bereits in anderen Studien beschrieben wurde (*Weigel et al., 2004; Morales et al., 2009*). Nach Inkubation von 18 Wochen übersteigen etwa 75% der Proben den gesetzlich festgelegten Grenzwert von 40 mg/kg. Darüber hinaus zeigen die Werte, dass die Variation in den ermittelten Konzentrationen mit ansteigender Lagerzeit entscheidend zunimmt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Schwankungsbreite der HMF-Gehalte in Handelsproben (Tab. 4-14), welche demnach aus einer unterschiedlich starken HMF-Bildung innerhalb der Manuka-Honige während der Reifung resultiert.

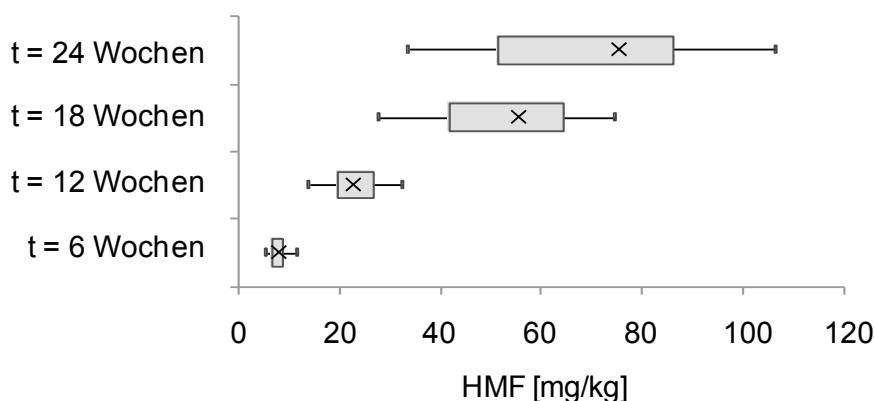


Abb. 4-22 HMF-Bildung in frischen Manuka-Honigen nach Lagerung bei 37°C (n = 14; Lagerzeit 6 bis 24 Wochen; Whiskers min/max, x = Median)

Da die beobachteten Schwankungen auch lediglich aus Unterschieden im 3-DG-Gehalt resultieren können, wurde die Precursor-Verbindung ebenfalls berücksichtigt. Die Analyse von 3-DG erfolgte analog zu MGO per RP-HPLC-UV nach Derivatisierung mit OPD zum entsprechenden Chinoxalin (Vgl. Kapitel 3.3.1). Die untersuchten Manuka-Honige weisen dabei erneut eine hohe Variation innerhalb der gemessenen Werte auf (Tab. 4-14). Dabei gehen hohe HMF-Gehalte zwar tendenziell mit hohen 3-DG-Konzentrationen einher, allerdings lässt sich keine direkte Korrelation zwischen 3-DG und HMF ermitteln, was die Ergebnisse von *Weigel et al. (2004)* bestätigt. Darüber hinaus wurden in Manuka-Honig teilweise sehr hohe 3-DG-Konzentrationen bis zu 1170 mg/kg bestimmt. Ähnliche Größenordnungen sind auch in Honigtau-Honigen detektierbar. Im Vergleich wurden in diesen jedoch trotz hoher 3-DG-Werte nur geringe HMF-Konzentrationen ermittelt. Dies weist darauf hin, dass die HMF-Bildung nicht ausschließlich durch 3-DG bestimmt, sondern durch weitere Parameter beeinflusst wird.

Die Entstehung von HMF ist vom pH-Wert abhängig. Unter sauren Bedingungen läuft die Reaktion schneller ab (*Kroh, 1994*). Honigtau-Honige weisen durch die Anwesenheit von puffernd wirkenden Substanzen in der Regel einen etwas höheren pH-Wert als Nektar-Honige auf (Vgl. Kapitel 4.2.1.1), was demzufolge einen möglichen Einfluss darstellen kann. Als alleinige Erklärung für die mitunter vergleichsweise geringen HMF-Konzentrationen bei hohen 3-DG-Gehalten kann dieser Faktor jedoch nicht ausschlaggebend sein, da innerhalb der Nektar-Honige aufgrund natürlicher Variation ebenfalls höhere pH-Werte vorliegen. Zusätzlich wurde für Manuka-Honig ein mittlerer pH-Wert von 4,0 bestimmt (Vgl. Kapitel 4.2.1.1), wodurch dieser Parameter nicht für die hohen HMF-Werte in den Handelsproben verantwortlich gemacht werden kann.

Darüber hinaus geht eine erhöhte Bildung von HMF in den untersuchten frischen Manuka-Honigen tendenziell mit einer hohen MGO-Bildung einher. Zwar kann zwischen beiden Parametern keine Korrelation aufgezeigt werden, doch wurden in Proben mit einem hohen Bildungspotential an MGO, und somit einer hohen DHA-Konzentration im frischen Honig, oftmals hohe HMF-Gehalte nach Lagerung ermittelt.

3.3.1.2 Einfluss von DHA auf die Bildung von HMF

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen spezifischen Einfluss auf die HMF-Bildung in Manuka-Honig durch DHA hin. Um diesen Aspekt im Folgenden näher zu untersuchen, wurden Dotierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden ein handelsüblicher Raps- und Waldhonig mit DHA in drei Konzentrationsstufen (500, 1500, 2500 mg/kg) versetzt und 6 Wochen bei 37 °C gelagert. Die gewählten DHA-Mengen repräsentieren dabei einen geringen, mittleren und hohen Gehalt im Honig.

Nach Lagerung der Proben wird deutlich, dass es unter Zugabe von DHA zu einer höheren Bildung an HMF kommt als im Vergleichsansatz (Abb. 4-23). Die Unterschiede zur mitgeführten DHA-freien Probe sind dabei zwar relativ gering, jedoch signifikant. In der Relation ist der Einfluss der Lagerung selbst allerdings als dominanter zu bewerten. Die hierzu durchgeführte Inkubation führte in den betrachteten Proben zu einer Zunahme des HMF-Gehaltes um das Vierfache des Ausgangswertes. Durch DHA-Zugabe wurde eine zusätzliche Bildung um weitere 4% bis 20% beobachtet. Dies verdeutlicht, dass HMF auch für Manuka-Honig als typischer Parameter zum Anzeigen von Lagereffekten herangezogen werden kann, jedoch eine zusätzliche Beeinflussung durch DHA in der Honigmatrix erfolgt. Dies ist insofern als relevanter Faktor zu betrachten, da in frischen Manuka-Honigen zwar zu Beginn nur geringe HMF-Gehalte detektierbar sind, allerdings hohe DHA-Konzentrationen vorliegen können. Im Zuge der Honigalterung erfolgt eine Umwandlung von DHA zu MGO, wobei gezeigt wurde, dass die Reaktion unvollständig verläuft. In der Folge verbleiben auch in ausgereiften Honigen noch vergleichsweise hohe DHA-Konzentrationen (Vgl. Kapitel 4.1.3.3), wodurch langfristig eine Erhöhung der HMF-Bildung hervorgerufen werden kann.

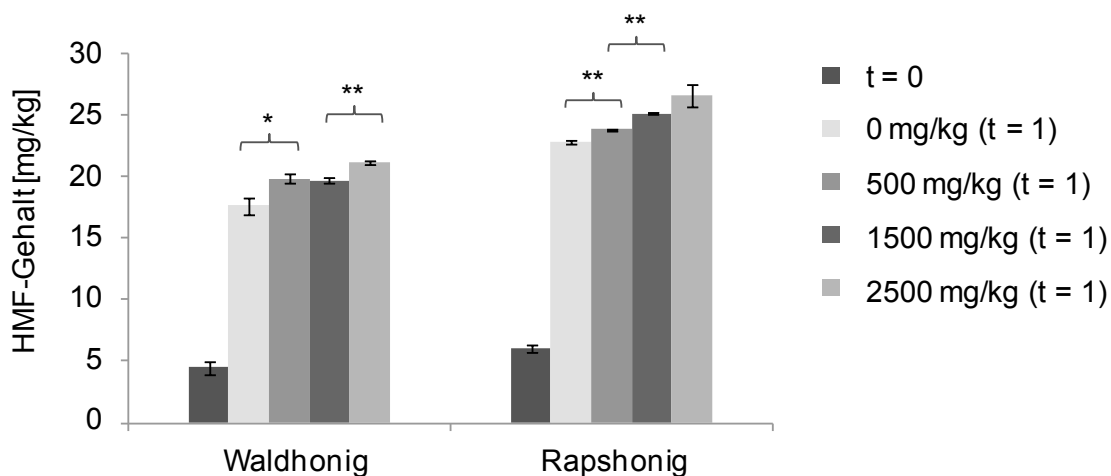


Abb. 4-23 Bildung an HMF in Raps- und Waldhonig nach DHA-Dotierung und Lagerung (Zusatz von 500 bis 2500 mg/kg DHA, Lagerung für 6 Wochen bei 37 °C (t = 1), Mittelwert-Vergleich mit t-Test, * P < 0,05, ** P < 0,01)

Entgegen dem HMF wird der Gehalt an dessen Precursor 3-DG nicht beeinflusst. Bei der Bestimmung der 3-DG-Gehalte in den Dotierungsproben nach Lagerung wurden lediglich geringfügige Schwankungen festgestellt, welche nicht signifikant waren. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass eine gesteigerte Bildung von HMF nicht direkt auf einen höheren 3-DG-Gehalt im Honig zurückzuführen ist, sondern vielmehr ein Eingriff des DHA in die Umsetzung des 3-DG zum HMF erfolgt.

Ein genereller Einfluss von DHA auf die HMF-Bildung in Honig sollte durch die Analyse zwölf weiterer Honigproben aufgezeigt werden. Diese wurden hierfür mit je 2500 mg/kg

DHA versetzt und gelagert. Zu Beginn der Untersuchungen wiesen die Honige HMF-Gehalte zwischen 0 und 2 mg/kg auf. Nach Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen ist in den undotierten Proben erwartungsgemäß ein Anstieg der Konzentration zu verzeichnen, der sich auf 2 bis 20 mg/kg HMF beläuft. (Abb. 4-24). Ein DHA-Zusatz führt bei der überwiegenden Anzahl der Proben zu einer zusätzlichen Erhöhung des HMF-Gehalts. Die Differenz, die der Dotierung mit 2500 mg/kg DHA zugeschrieben werden kann, variiert dabei zwischen 0 und 9 mg/kg HMF. Dies entspricht im Mittel einer prozentualen Zunahme von ca. 30%. Die zwischen den einzelnen Proben zu beobachtenden Unterschiede können dabei weitgehend mit der Charakteristik der Sortenhonige erklärt werden. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 deutlich wurde, kann innerhalb der Honige diesbezüglich eine große Variation beobachtet werden. Weitere Parameter, wie z.B. der pH-Wert oder Gehalt freier Aminosäuren, können demnach eine Ursache für die unterschiedlich intensive Einflussnahme durch das zugegebene DHA darstellen.

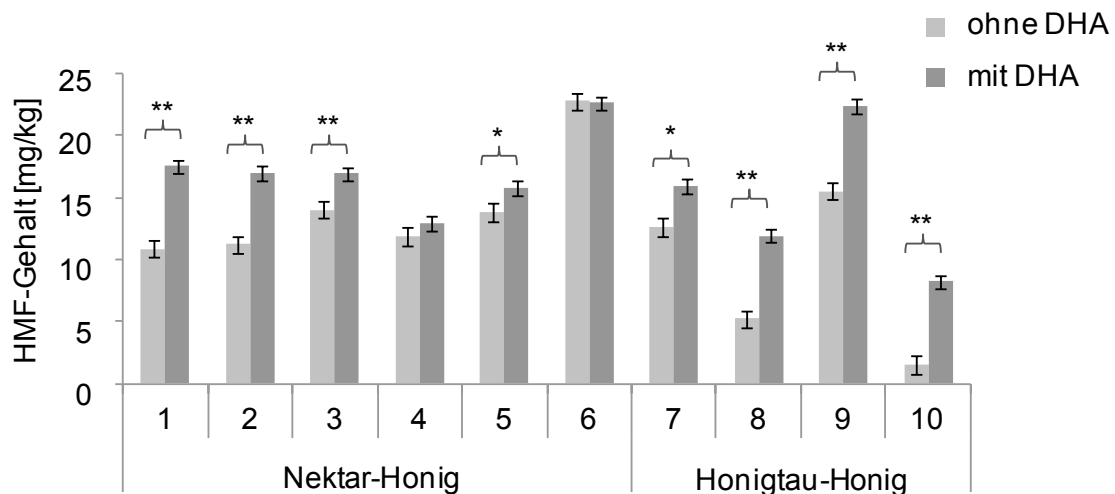


Abb. 4-24 HMF-Gehalt in ausgewählten Nektar- und Honigtau-Honigen mit und ohne DHA-Zusatz (Zusatz von 2500 mg/kg DHA, Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen, Mittelwert-Vergleich mit t-Test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$)

3.3.1.3 Einfluss von Aminosäuren auf die Bildung von HMF

Als weitere Prüfgröße sollten ausgewählte Aminosäuren in die Diskussion einfließen. Zum Einen können sie als Ursache für vergleichsweise geringe HMF-Werte in 3-DG-reichen Honigtau-Honigen dienen. Zum Anderen stellen sie generell potentielle Reaktionspartner für 1,2-Dicarbonylverbindungen dar und können so am Reaktionsgeschehen beteiligt sein. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde Kunsthonig mit ausgewählten Aminosäuren dotiert und gelagert. Dieses Vorgehen sollte einen isolierten Blick auf Konzentrationsänderungen von HMF und 3-DG ermöglichen.

Zu Beginn der Inkubation sind im Kunsthonig kein HMF und nur sehr geringe Mengen an 3-DG nachweisbar (Abb. 4-25). Durch die simulierte Lagerung kommt es zu einem Anstieg der Konzentrationen beider Verbindungen. Unter Einbeziehen der mit Aminosäuren versetzten Proben werden allerdings Unterschiede in der Entwicklung der Gehalte sichtbar. Am Beispiel von Arginin lässt sich somit aufzeigen, dass die Konzentration an 3-DG eine deutliche Zunahme erfährt, während die Bildung von HMF inhibiert wird. Die weiteren in die Untersuchung einbezogenen Aminosäuren können zwar einen ähnlichen Effekt vorweisen, dieser ist jedoch weniger markant ausgeprägt.

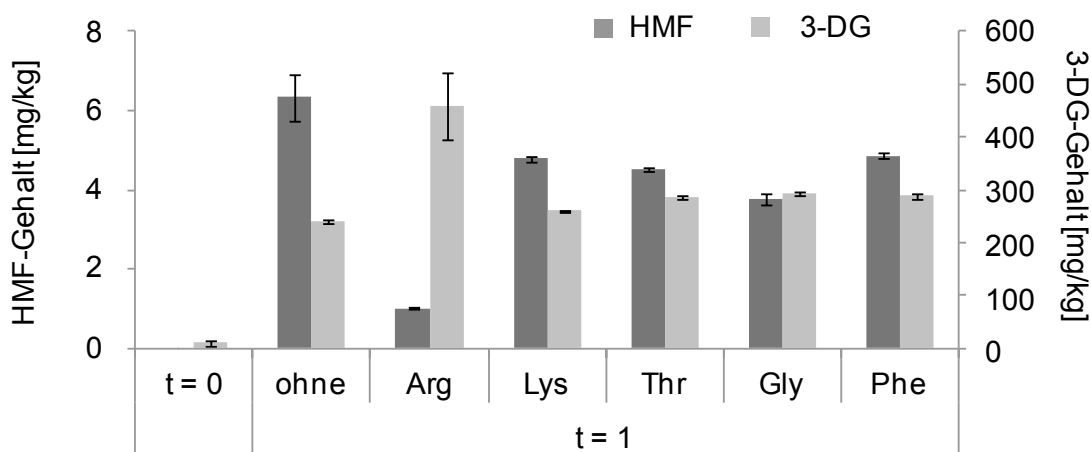


Abb. 4-25 HMF- und 3-DG-Gehalte in Kunsthonig nach Dotierung mit einzelnen Aminosäuren (20 mg/100g) und Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen (t = 1)

Die Daten lassen folglich einen Einfluss von Aminosäuren auf die Bildung von 3-DG und HMF erkennen. Daraus ist zu folgern, dass ein Zusammenhang der vergleichsweise hohen Gesamtgehalte an Aminosäuren in Honigtau-Honigen zu deren hohen 3-DG- jedoch in der Relation niedrigen HMF-Konzentrationen besteht. Zum Einen kann durch die Aminosäurekomponenten die Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen wie 3-DG gefördert werden, da hierbei die Maillard-Reaktion der vorhandenen reduzierenden Zucker mit Aminosäuren in höherem Maße abläuft. Zum Anderen findet demzufolge gleichzeitig eine Hemmung der HMF-Entstehung statt. Dies ist insofern erstaunlich, da HMF direkt aus 3-DG über das Intermediat 3,4-Dideoxyglucoson-3-en (3,4-DGE) gebildet wird. Trotz höherer Gehalte des Precursors erfolgt die weitere Umsetzung demnach in geringerem Maße. Dies weist darauf hin, dass Aminosäuren wie Arginin nicht nur die Bildung fördern, sondern zugleich als Reaktionspartner des 3-DG zur Verfügung stehen. Ist diese Reaktion bevorzugt, lässt sich in der Folge eine verringerte HMF-Bildung beobachten.

Bei der Beurteilung dieses Sachverhaltes ist zu beachten, dass es sich bei den durchgeführten Untersuchungen um Modellinkubationen handelt. In Honigtau-Honigen mit sehr hohem Gehalt an freien Aminosäuren ist zwar eine vergleichsweise geringe HMF-Bildung im Zuge von Lagerungsversuchen bestimmbar, allerdings kann kein genereller Zusammen-

hang zwischen Gesamtgehalt an Aminosäuren und Zunahme der Konzentration an HMF im Laufe der Lagerung anhand der verfügbaren Honige aufgezeigt werden.

Ein hoher Anteil an Aminokomponenten führt nicht zwingend zu einem niedrigen Gehalt an HMF, wie am Beispiel von Heidehonig deutlich wird. Diese Sorte zeichnet sich durch ein hohes Maß an Aminosäuren und Proteinen aus, in der jedoch auch ein hoher HMF-Gehalt detektiert werden konnte. Aminosäuren sind in bestimmten Honigen demnach in der Lage, die HMF-Bildung abzumildern, sodass trotz hoher Gehalte an 3-DG niedrige Werte für HMF in diesen Proben resultieren. Die Ergebnisse der Modellversuche lassen sich dabei nur zum Teil auf die Honigmatrixen, welche eine entsprechend hohe natürliche Diversität aufweisen, übertragen. So wurde in den analysierten Handelsproben kein allgemeingültiger bzw. direkt konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet. Dennoch lassen die Daten die Folgerung zu, dass die HMF-Bildung nicht allein durch den Gehalt an 3-DG bestimmt wird, sondern weitere Faktoren der Matrix wie z.B. Aminosäuren Anteil nehmen.

In der Folge können in Honigen mit einem hohen Anteil an Aminokomponenten weitere Folgeprodukte neben HMF aus der Umsetzung von 3-DG enthalten sein. Dabei ist ein Abbau zu Pyrrol- und Pyridinderivaten zu erwarten. Eine typische Verbindung, die aus der Reaktion von 3-DG mit Lysin resultiert und üblicherweise als Markersubstanz für die fortgeschrittene Maillard-Reaktion herangezogen wird, stellt das (2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrol)-norleucin (Pyrralin, Abb. 4-26, *Nakayama et al., 1980*) dar. Erste orientierende Untersuchungen an einem Honigtau-Honig, in dem nur eine sehr geringe HMF-Bildung zu beobachten war, ermöglichten jedoch bislang keinen eindeutigen Nachweis von Pyrralin (*Haberlau, 2010*). Die Anwesenheit dieser Verbindung in geringen Konzentrationen in Aminosäure-reichen Honigen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. In den durchgeführten Modellversuchen übte besonders Arginin deutliche Effekte auf die analysierten Parameter aus. Somit ist eine Reaktion von 3-DG mit Arginin zu 3-DG-H1 (Imidazolone A, Abb. 4-26, *Niwa et al., 1997*) ebenfalls möglich. Eine fortführende Untersuchung hinsichtlich dieser oder weiterer Derivate von 3-DG ist sinnvoll.

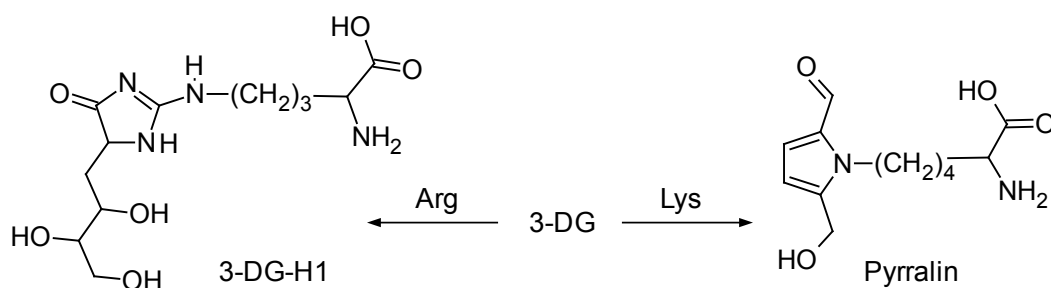


Abb. 4-26 Ausgewählte Folgeprodukte von 3-DG

3.3.1.4 Zusammenwirken der Parameter während der Lagerung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt wurde, bestimmt der 3-DG-Gehalt die HMF-Bildung in Honig zwar wesentlich, jedoch nicht ausschließlich. So konnte gezeigt werden, dass DHA und Aminosäuren isoliert betrachtet auf die HMF-Entwicklung im Zuge einer simulierten Lagerung einwirken. In Modellversuchen mit Kunsthonig führte ein Zusatz von DHA hierbei zu einem zusätzlichen HMF-Anstieg. Dementgegen konnten ausgewählte Aminosäuren eine Verringerung des Gehaltes hervorrufen. Unter Kombination beider Faktoren wird deutlich, dass die HMF-Bildung in den einzelnen Honigsorten in unterschiedlichem Maße beeinflusst werden kann (Abb. 4-27).

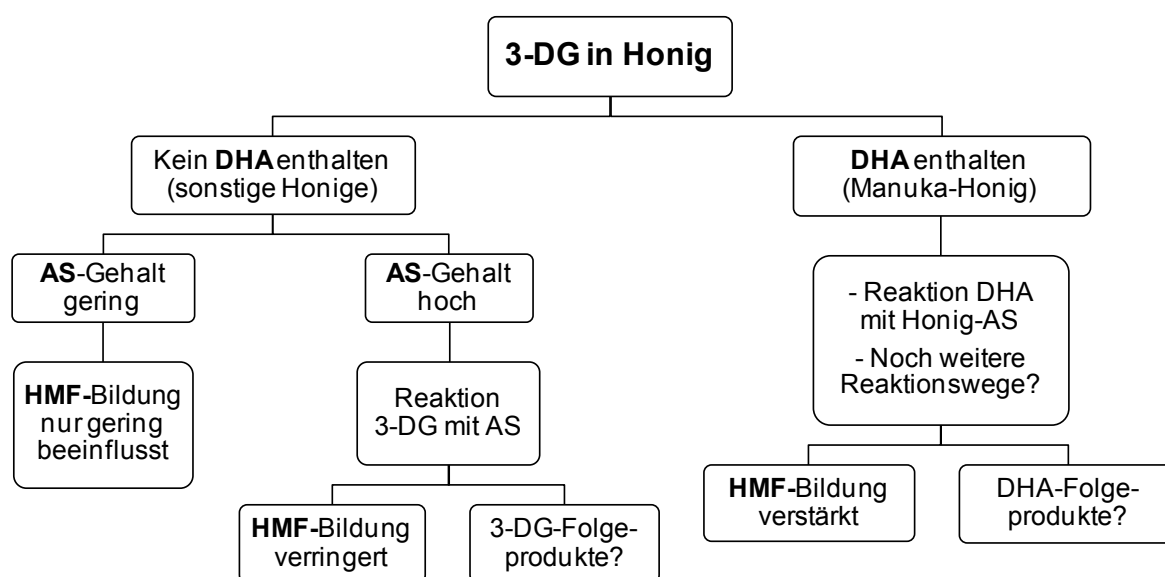


Abb. 4-27 Übersichtsschema zu postulierten Einfluss- und Reaktionswegen der HMF-Bildung in Honig (AS = Aminosäuren)

In erster Linie bildet 3-DG die bestimmende Basis der während der Honiglagerung ablaufenden HMF-Bildung. Bei geringem Gehalt freier Aminosäuren findet demzufolge nur eine geringe Beeinflussung der Umsetzung des 3-DG zum HMF statt. Bei Vorliegen eines hohen Anteils an freien Aminosäuren läuft die HMF-Bildung in verringertem Maße ab. Es kann zu Nebenreaktionen des 3-DG mit anwesenden Aminosäuren kommen, wodurch dieses nicht mehr in vollem Umfang für die Umsetzung zu HMF zur Verfügung steht. Dies bedeutet in der Folge jedoch auch, dass weitere Reaktionsprodukte des 3-DG nachgewiesen werden können. Ist in der Honigmatrix hingegen DHA enthalten, übt diese Verbindung einen zusätzlichen, entscheidenden Einfluss auf die HMF-Bildung aus. Hierbei kann es zur Reaktion von DHA anstelle 3-DG mit den Honig-Aminosäuren kommen. Folglich ist ein höherer Anteil an 3-DG verfügbar, der in die Umsetzung zu HMF münden kann. In der Konsequenz resultieren höhere HMF-Gehalte als in Vergleichshonigen mit vergleichbarem 3-DG-Gehalt, wobei Folgeprodukte aus der Reaktion von DHA mit Aminosäuren zu erwarten sind.

Konkret auf Beispielhonige bezogen bedeutet dies, dass nur Manuka-Honige DHA als zusätzlichen Inhaltsstoff aufweisen. Im Vergleich zu anderen Sorten ist daher bei einem gleichen Gehalt an 3-DG stets eine höhere HMF-Bildung im Zuge einer Langzeitlagerung zu erwarten. Die relativ geringen HMF-Mengen, welche in Honigtau-Honigen nachweisbar waren, lassen sich durch die hohen Aminosäure-Gehalte erklären, wodurch der ebenfalls vorhandene hohe Anteil an 3-DG nicht ungehindert zu HMF umgesetzt wird. Der Großteil der Nektarhonige kann hingegen durch einen geringen Anteil an Aminosäuren und die Abwesenheit von DHA charakterisiert werden, wobei die resultierenden HMF-Gehalte im Wesentlichen durch die Mengen an 3-DG bestimmt werden.

Darüber hinaus können noch weitere, hier nicht betrachtete Faktoren auf die HMF-Bildung Einfluss nehmen. So dient Heidehonig als Beispiel für einen Protein- und Aminosäure-reichen Nektar-Honig, welcher dennoch hohe HMF-Gehalte aufweisen kann. Auch *Ajlouni & Sujirapinyokul (2010)* diskutieren, dass die Honigzusammensetzung den HMF-Gehalt beeinflusst. Wie bereits diskutiert wurde, kann die Anwesenheit weiterer Folgeprodukte neben HMF in älteren bzw. gelagerten Honigen erwartet werden. Am Beispiel von Pyrralin wurden erste Versuche durchgeführt, ohne jedoch eine eindeutige Detektion zu erreichen (*Haberlau, 2010, Vgl. Kapitel 4.3.1.3*). Auch in der Literatur finden sich bislang keine Hinweise auf einen Nachweis dieser oder vergleichbarer Verbindungen in Honig. In Bezug auf weitere Produkte der Maillard-Reaktion neben 1,2-Dicarbonylverbindungen und HMF konnte nach derzeitigem Kenntnisstand lediglich Furosin in spanischen Honigen nachgewiesen werden, welches daraufhin als zusätzlicher Lagerungsparameter von den Autoren diskutiert wurde (*Villamiel et al., 2001; Morales et al., 2008*). Da Furosin aus der Reaktion zwischen Glucose und Lysin hervorgeht, ist eine generelle Auffälligkeit für Manuka-Honig unter Annahme eines positiven Nachweises nicht anzunehmen. Dennoch kann dieser Parameter als zusätzliche Größe neben HMF zum Anzeigen einer thermischen Behandlung oder langen Lagerung zur Anwendung kommen. Für Manuka-Honig können hingegen spezifische Verbindungen, welche ihren Ursprung im DHA haben, erwartet werden. Untersuchungen von *Fearnley et al. (2012)* deuten auf die Anwesenheit von charakteristischen Substanzen im höher molekularen Bereich hin. Darüber hinaus lassen erste orientierende elektrophoretische Untersuchungen von Manuka-Honig eine Modifizierung der Proteine erkennen, deren Ursache in den enthaltenen Mengen an DHA oder MGO begründet liegen kann (*Kunze, 2009*). Hierbei waren sowohl eine Verschiebung der Molmassen einzelner Proteine, als auch zusätzliche in den Auftragstaschen verbliebene Banden, welche auf höhermolekulare Verbindungen hinweisen, zu beobachten. Dies kann einerseits als Bestätigung des in Abb. 4-27 postulierten Schemas verstanden werden. Andererseits lassen sich darauf aufbauend ggf. typische Markerverbindungen für Manuka-Honig definieren, welche für die Beurteilung potentieller Lagereinflüsse, aber auch als Beitrag zur Identifizierung dieser Sorte dienen können.

3.3.2 Beeinflussung von Diastase und Invertase

Neben der Konzentration an HMF wird üblicherweise auch die Enzymaktivität in Honig zur Prüfung auf thermische Einflüsse herangezogen. Hierbei ist die Diastasezahl (DZ) als Maß für die Aktivität dieses Enzyms von Bedeutung. Aufschluss über eine eventuelle Enzymschädigung kann aber auch die Invertase-Aktivität (IA) geben. Die Invertase gilt als lagerungs- und hitzeempfindlicher als die Diastase und kann auf diese Weise zum Anzeigen einer kurzzeitigen thermischen Einwirkung dienen. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde die DZ nach der Phadebas-Methode und die IA nach der Methode von Siegenthaler ermittelt (Siegenthaler, 1975; SLMB 2004).

3.3.2.1 Enzymaktivitäten in Manuka-Honig

Hinsichtlich der Enzymaktivität von Manuka-Honigen können der Literatur bislang keine Daten entnommen werden. Um eine erste Einordnung und Bewertung dieses Honigs im Vergleich zu anderen Honigsorten zu erreichen, wurden zehn handelsübliche Manuka-Proben auf ihre DZ und IA untersucht. Dabei ist eine relativ weite Streuung der Ergebnisse in den Honigen festzustellen (Abb. 4-28).

Es wurden vier von zehn Honigen mit einer DZ niedriger als 8,0 bestimmt, sodass sie aus rechtlicher Sicht zu beanstanden sind (Honig-V, 2004). Selbst unter der Annahme, dass Manuka-Honig als enzymschwache Sorte einzuordnen ist, entsprechen zwei Proben nicht der dafür geltenden Norm ($DZ > 3,0$). Trotz der Grenzwertunterschreitungen kann jedoch nicht von einer generellen Beanstandung von Manuka-Honig aufgrund zu niedriger DZ ausgegangen werden. Im Mittel erfüllen diese Honige die gesetzlichen Anforderungen.

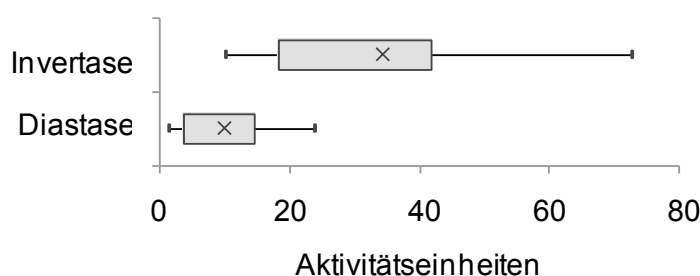


Abb. 4-28 Diastasezahl und Invertase-Aktivität (U/kg) in Manuka-Honige (n = 10, Whiskers min/max, x = Median)

Im Vergleich wurden in australischen Honigen etwas höhere Werte für die DZ zwischen 9,4 und 22,1 ermittelt (Ajlouni & Sujirapinyokul, 2010), in argentinischen Nektar-Honigen konnten Werte von 11,2 bis 25,8 bestimmt werden (Tosi et al., 2008). Auch in Bezug auf die Daten von Oddo et al. (1990), die zwölf italienische Honigsorten auf ihre Diastase-Aktivität untersuchten, wird deutlich, dass Manuka-Honig eher niedrige bis mittlere DZ aufweist (Abb. 4-29). Demnach kann Manuka-Honig hinsichtlich der Enzymaktivität z.B.

mit Heide-, Zitrus- oder Akazienhonig verglichen werden, wobei letzterer im Allgemeinen als enzymschwacher Sortenhonig eingeordnet wird.

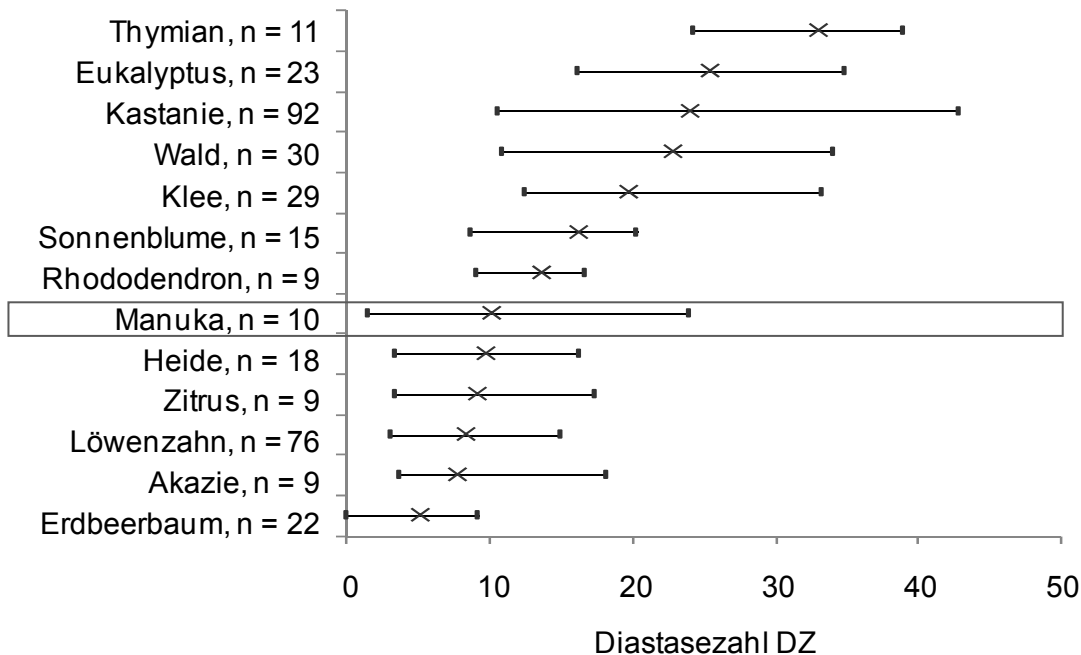


Abb. 4-29 Diastase-Aktivität in italienischen Honigen (Oddo et al., 1990) und Manuka-Honig (Messung Manuka-Honig nach Angaben aus Kapitel 3.6.1, Daten der Vergleichshonige aus Oddo et al. (1990) übernommen, Balken = min/max, x = Median)

Auch die Invertase zeigt eine verhältnismäßig geringe Aktivität in Manuka-Honig, wie ein Vergleich mit den Daten von *Dustmann et al. (1985)* sichtbar werden lässt. Die Autoren konnten dabei Werte zwischen 13 bis 217 U/kg für Honige unterschiedlichen Ursprungs bestimmen. Für spanische Nektar-Honige dokumentieren *Sanchez et al. (2001)* ebenfalls höhere IA von 48 bis 251 U/kg. Die IA ist in Manuka-Honig jedoch höher als in KleeHonig aus Neuseeland (22 U/kg, *Dustmann et al., 1985*). Aus rechtlicher Sicht unterliegt die Invertase-Aktivität keinen Anforderungen. Im Vergleich zu den darüber hinausgehenden *Bestimmungen des Deutschen Imkerbundes e.V. (2006)* wird deutlich, dass ein Großteil der untersuchten Honige die vorgeschlagene Mindestaktivität (64 U/kg) nicht aufweisen. Dies kann einerseits das Resultat beginnender Lagereinflüsse sein, sodass in den Handelsproben bereits ein Absinken der Enzymaktivität erfolgte. Andererseits kann dies auch ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei Manuka-Honig um eine enzymschwache Sorte handelt, da die Diastase ebenfalls eine tendenziell geringe Aktivität aufwies.

Werden die Enzymaktivitäten in Relation gesetzt, ist ein Zusammenhang beider Größen zu erkennen. Tendenziell gehen somit niedrige DZ mit geringen IA einher. Eine derartige Korrelation zwischen Aktivität von Invertase und Diastase wurde bereits von *Oddo et al. (1999)* unter Einbeziehen von Misch- und 16 verschiedenen Sortenhonigen beschrieben. Es ist demnach davon auszugehen, dass Manuka-Honig ein zu anderen Sorten ähnliches Verhältnis beider Enzyme aufweist. Die Berechnung des Quotienten aus IA und DZ

beträgt hierbei 1,8 bis 10, was wiederum eine hohe Variation innerhalb von Manuka-Honig aufzeigt. Darüber hinaus lässt sich auch ein Bezug der Enzymaktivitäten der Honige zum MGO-Gehalt herstellen, wenngleich anhand der untersuchten Proben keine direkte Korrelation aufzuzeigen ist. Niedrige Enzymaktivitäten gehen allerdings tendenziell mit einer höheren MGO-Konzentration einher (Abb. 4-30). Dies deutet auf eine spezifische Beeinflussung der Enzymaktivität unabhängig von einer thermischen Behandlung hin.

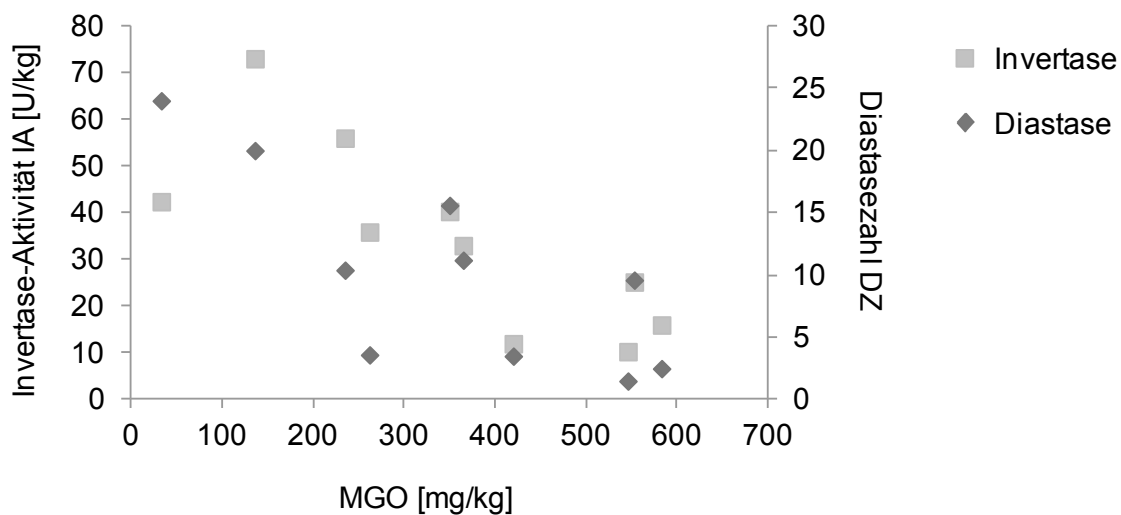


Abb. 4-30 Zusammenhang zwischen MGO-Gehalt und Diastasezahl bzw. Invertase-Aktivität in Manuka-Honig (n = 10)

Dieser Aspekt wird durch das Einbeziehen von sechs frischen Manuka-Honigen ebenfalls deutlich. Diese Proben stammten aus verschiedenen Gegenden Neuseelands und wurden nach der Entnahme aus dem Bienenstock nachweislich keiner weiteren Behandlung unterzogen. Hierbei sind gleichermaßen hohe Variationen in der DZ festzustellen (Abb. 4-31). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Probe bereits im frischen Zustand den rechtlichen Anforderungen nicht genügt (*Honig-V*, 2004). Somit kann Manuka-Honig auch im unbehandelten Zustand ohne thermische oder Lagereinflüsse sehr niedrige Diastase-Aktivitäten aufweisen.

Die frischen Manuka-Honige wurden anschließend bei 37 °C für 6 Wochen inkubiert, um den Einfluss der Lagerung zu beurteilen. Die Ergebnisse lassen eine markante Abnahme der DZ erkennen (Abb. 4-31). So ist nach der simulierten Lagerung nur noch eine Probe verkehrsfähig (*Honig-V*, 2004). Unter der Voraussetzung, dass Manuka-Honig als enzym-schwache Sorte einzustufen ist, sind die untersuchten Proben noch nicht vollständig zu beanstanden. Die Halbwertszeit der Diastase beträgt bei Raumtemperatur etwa 17 Monate (*White et al.*, 1960). Bei erhöhter Temperatur von etwa 40 °C verkürzt sie sich auf 31 Tage (*SLMB*, 2004). Dieser Effekt ist an den frischen Manuka-Proben ersichtlich, deren DZ im Mittel um etwa 60% abnimmt. Im Detail bestehen zwischen den Proben Unterschiede in der Höhe der Abnahme, sodass sich die Lagerung demnach verschieden stark auswirkt.

Da in frischen Manuka-Honigen DHA in Konzentrationen bis zu 2700 mg/kg enthalten ist (Vgl. Kapitel 4.1.3.3), ergibt sich daraus die These, dass ein Zusammenhang der geringen DZ zu den in den Honigen vorherrschenden DHA-Gehalten besteht.

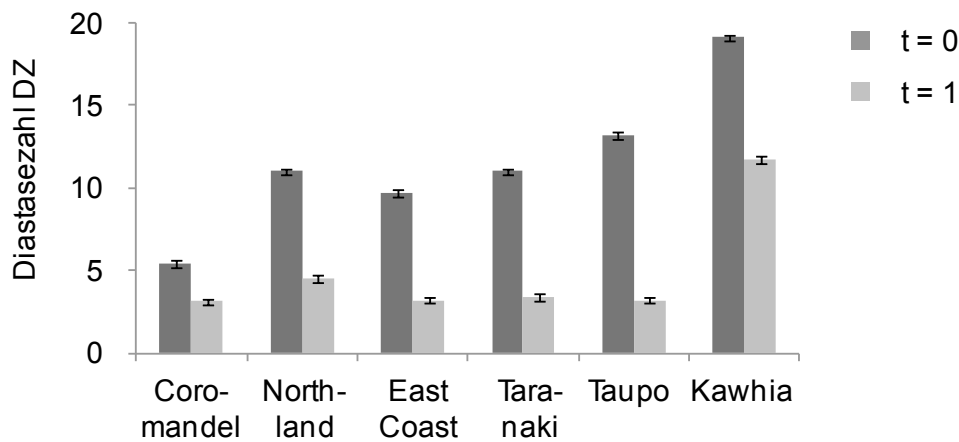


Abb. 4-31 Diastasezahl in frischem Manuka-Honig aus 6 Regionen Neuseelands vor und nach Lagerung (Lagerung bei 37 °C für 0 Wochen (t = 0) und 6 Wochen (t = 1))

Ein Rückschluss auf die DZ der frischen Ausgangsproben vom DHA-Gehalt kann anhand der vorliegenden Honige allerdings nicht gezogen werden. So weist z.B. die Honigprobe der Gegend Coromandel sowohl die kleinste DZ als auch die geringste Konzentration an DHA auf. Darüber hinaus lässt sich jedoch ein linearer Zusammenhang ($R^2 = 0,624$) zwischen dem DHA-Gehalt des frischen Honigs und der während der Lagerung stattfindenden, prozentualen Abnahme der Enzymaktivität feststellen (Abb. 4-32). Daraus wird deutlich, dass hohe DHA-Konzentrationen in frischen Manuka-Honigen mit einer größeren Beeinträchtigung der Diastase einhergehen, als es bei niedrigeren Gehalten der Fall ist.

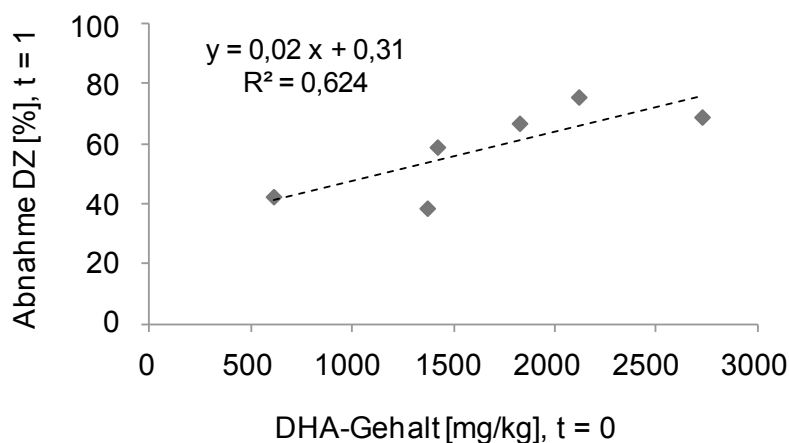


Abb. 4-32 Zusammenhang zwischen der Abnahme der Diastasezahl in frischen Manuka-Honigen (n = 6) durch Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen (t = 1) und dem DHA-Gehalt im Honig (t = 0)

3.3.2.2 Einfluss von DHA auf die Enzymaktivitäten

Durch die unvollständige Umsetzung von DHA zu MGO besteht ein gewisses Potential der Verbindung, zusätzliche Reaktionen einzugehen. Um einen möglichen Einfluss auf die Enzymaktivität der Diastase näher zu untersuchen, wurde ein Waldhonig mit hoher DZ gewählt und mit DHA im Bereich 500 bis 2500 mg/kg dotiert. Im Anschluss wurden die Proben einer definierten Lagerung bei 37 °C für 6 Wochen unterzogen.

Die Ergebnisse zeigen einen Abfall der DZ während der Lagerung um etwa 16% (Abb. 4-33). Durch einen Zusatz von DHA zur Honigmatrix wird diese Abnahme signifikant verstärkt. Unter dem Einsatz höherer DHA-Gehalte konnte jedoch kein lineares Absinken der DZ beobachtet werden. Ausgeprägter gestaltet sich diese Tendenz in der Aktivität der Invertase für diese Proben (Abb. 4-33). Für den eingesetzten Waldhonig wurde ein Abfall der IA um 30% nach Lagerung bestimmt, der durch Anwesenheit von DHA auf 40% erhöht wurde. Darüber hinaus konnte ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der DHA-Konzentration in der Honigmatrix vor und der IA nach Lagerung festgestellt werden, aufgrund der Messunsicherheit sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant.

Generell dienen beide Enzyme zum Anzeigen einer Lagerung, was auch aus den erhaltenen Daten abgelesen werden kann. Aber die Werte lassen auch einen Einfluss von DHA nach der Dotierung erkennen. Dies kann auf eine Inhibierung der Enzyme durch DHA, z.B. in Folge einer Modifizierung, hinweisen. Die etwas markantere Abnahme der IA ist damit zu erklären, dass dieses Enzym generell sensibler gegenüber äußeren Einflüssen reagiert als die Diastase. Wenngleich eine Beeinflussung der Diastase unter den betrachteten Bedingungen nur in geringem Maße stattfindet, können langfristig dennoch niedrigere DZ in Honig in Folge von hohen DHA-Gehalten resultieren.

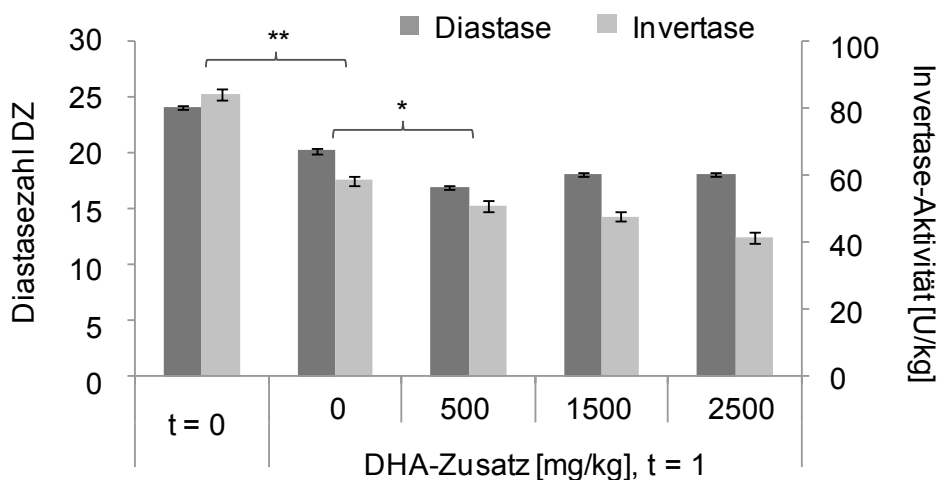


Abb. 4-33 Diastasezahl und Invertase-Aktivität in Waldhonig unter DHA-Zusatz und Lagerung (Lagerung bei 37 °C für 0 Wochen (t = 0) und 6 Wochen (t = 1), Mittelwert-Vergleich mit t-Test: * P < 0,05, ** P < 0,01)

Dementgegen muss jedoch auch festgestellt werden, dass durch die Lagerung selbst der entscheidende Einfluss auf die Enzymaktivitäten erfolgt. Die ermittelten Abnahmen in der DZ bzw. IA im Zuge der durchgeführten Inkubationen waren markanter als eine mögliche Verstärkung durch den Zusatz von DHA. Folglich ist die Honigbehandlung über den betrachteten Zeitraum von größerer Bedeutung als die Anwesenheit von DHA. Hinzu kommt, dass für die DZ keine eindeutige Einflussnahme in Folge steigender DHA-Gehalte im Honig festzustellen war. Einerseits ist es möglich, dass kein konzentrationsabhängiger Effekt vorliegt, jedoch bereits die Präsenz geringer Mengen im Honig einen zusätzlichen Abfall der Enzymaktivität bewirkt. Andererseits können die Werte auch als allgemeine Schwankungen der DZ interpretiert werden, wodurch geringe Unterschiede zwischen den Ansätzen nicht auf die DHA-Dotierung zurückführbar sind.

3.3.2.3 DHA als Erklärung einer niedrigen Enzymaktivität in Manuka-Honig?

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 4.3.2.2 dargestellten, möglichen Enzymhemmung durch in der Honigmatrix enthaltenes DHA ist zu diskutieren, inwieweit dies als Erklärung für die teilweise sehr niedrigen DZ herangezogen werden kann. Es wurde gezeigt, dass bereits in frischen Manuka-Proben eine geringe Aktivität trotz Abwesenheit von Lagerinflüssen vorliegen kann, wenngleich kein direkter Zusammenhang zum DHA-Gehalt hergestellt werden kann. Dennoch ist DHA ein spezifischer Einflussfaktor, da während der Lagerung eine unterschiedlich intensive Abnahme der Enzymaktivität erfolgte, wie an den frischen Proben gezeigt wurde (Vgl. Abb. 4-32). Hinzu kommt, dass unter analogen Bedingungen behandelte Vergleichshonige nur eine geringe Minderung der Aktivität zeigten. Beispielhaft sei hier der Vergleich zwischen einem Waldhonig, dessen DZ durch die sechswöchige Lagerung von 24,1 auf 20,2 abfiel, und einem frischen Manuka-Honig der Gegend Kawhia angeführt, welcher hingegen eine Abnahme der DZ von 19,1 auf 11,7 zeigte. Obwohl beide Proben zu Beginn der Lagerung ähnliche Werte aufweisen, wirkt sich der Vorgang in unterschiedlichem Maße auf das Enzym aus. Folglich kann dies als eine spezifische Beeinflussung der Enzyme durch DHA verstanden werden.

Dieser Einfluss kann in einer Enzymhemmung durch die Modifikation von Aminosäure-Seitenketten resultieren. Auf diese Weise kann das aktive Zentrum nicht mehr zugänglich sein bzw. eine Verdrängung des Substrates in Form einer kompetitiven Hemmung erfolgen. Als Hinweis darauf dient auch die orientierende elektrophoretische Untersuchung an Manuka-Honig, die eine Verschiebung der Molmassen der Enzyme zeigte (Kunze, 2009). Da auch MGO ein hohes Potential zur Modifizierung von Proteinseitenketten besitzt, ist eine vergleichbare Inhibierung zu erwarten. In der Konsequenz kann auch mit zunehmender Alterung und der Umsetzung von DHA eine etwa gleichbleibende Hemmung der Enzyme resultieren. Der Literatur lassen sich bereits Hinweise auf eine solche Enzymhemmung entnehmen. So beschreiben *Zakrzewska et al. (1989)* eine Inhibierung einer

Pankreas- α -Amylase durch DHA. Darüber hinaus wird ein vergleichbarer Einfluss für MGO auf Honigenzyme von *Majtan et al. (2012)* diskutiert. In der Folge können weitere Enzyme wie z.B. die Glucoseoxidase in Manuka-Honig eine partielle Inhibierung erfahren. Auf diese Weise kann auch der im Allgemeinen niedrige Anteil an Wasserstoffperoxid in Manuka-Honigen erklärt werden.

Ungeachtet einer potentiellen Hemmung der Diastase durch DHA im Zuge der Lagerung von Manuka-Honig, kann dies nicht hinreichend zur Erklärung der ermittelten DZ dienen. So erklärt die Präsenz von DHA nicht die generelle Varianz oder auch das Vorliegen sehr niedriger Werte der Enzymaktivität in frischen Proben mit geringem DHA-Gehalt, welche nachweislich keine sonstige Bearbeitung erfahren haben. Dieser Aspekt kann einerseits auf eine botanisch begründete Variation zurückgeführt werden, wie sie bereits für andere Honigsorten beobachtet wurde (*Oddo et al., 1990*). Andererseits kann neben DHA ein genereller Einfluss der Honigmatrix erfolgen, wie bereits *White (1960)* diskutierte. So konnte beispielsweise durch Pflanzenextrakte eine Hemmung einer Pankreas- α -Amylase erreicht werden, die auf enthaltene Kaffeesäurederivate und Flavonoide zurückgeführt wurde (*Funke, 2007; Oboh et al., 2012*). Durch einen hohen Gesamtphenolgehalt kann dies auch für Manuka-Honig eine Relevanz aufweisen. Darüber hinaus können regionale oder klimatische Einflüsse vorliegen, wodurch eine Abhängigkeit der DZ von der Gegend, aus welcher der Honig stammt, resultiert. *Oddo et al. (1999)* diskutieren, dass die variierenden Aktivitäten der Enzyme auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen sind, wie z.B. auch Menge und Zuckergehalt des Nektars oder Alter und Pollenverzehr der Bienen.

3.3.3 Einfluss einer Erhitzung auf ausgewählte Parameter

3.3.3.1 Einfluss einer Erhitzung auf den MGO-Gehalt

Honig darf nicht erhitzt werden (*Codex Standard, 1981; Honig-V, 2004*). Dennoch sind in der Praxis Spekulationen über Vorteile einer solchen Behandlung von Honig vorhanden, z.B. um den MGO-Gehalt durch erhöhte Temperaturen zu steigern und auf diese Weise eine „optimierte“ Bioaktivität zu erzielen. Eine Freisetzung von zuckergebundenem MGO durch eine Erhitzung wird als Grund für diesen möglichen Konzentrationsanstieg diskutiert (*Stephen & Schlothauer, 2010*). Des Weiteren ist eine steigende MGO-Bildung in Modellsystemen mit Kohlenhydraten mit zunehmender Erhitzung sowohl durch die Maillard-Reaktion als auch die Karamellisierung zu beobachten (*Homoki-Farkas et al., 1996*).

Zur näheren Prüfung dieses Sachverhaltes wurden drei ausgewählte Manuka- sowie ein handelsüblicher Rapshonig herangezogen und kurzzeitig auf 70 °C erwärmt. Die gewählte Inkubationszeit von 10 min war hierbei an die Bedingungen einer möglichen Pasteurisation angelehnt. Zusätzlich wurden diese Proben im Anschluss einer Lagerung für 12 Wochen

bei 37 °C unterzogen, um einen möglichen Langzeiteffekt dieser Behandlung sichtbar zu machen. Darüber hinaus wurden die Honige bis zu 24 h bei 70 °C erhitzt, um eine länger andauernde thermische Behandlung zu simulieren. Die Analyse des MGO-Gehalts erfolgte mittels RP-HPLC (Vgl. Kapitel 3.3.1).

Die Manuka-Honige können als handelsübliche Vertreter mit einem niedrigen, mittleren und hohen MGO-Gehalt betrachtet werden. Die MGO-Konzentrationen in diesen Proben bleiben bei kurzzeitiger Erhitzung nahezu konstant (Tab. 4-15). Während einer Langzeiterhitzung kommt es hingegen zu einer markanten Abnahme des MGO-Gehaltes um ca. 60%. Dementgegen führt eine Erhitzung des Rapshonigs zu keiner wesentlichen Änderung des MGO-Gehalts unabhängig von der Inkubationsdauer. Dies ändert sich auch nicht im Zuge der angeschlossenen Lagerung. In den Manuka-Honigen führt dies bereits zu einer leichten Abnahme des MGO-Gehalts um etwa 10%. Der Konzentrationsabfall fand dabei noch ausgeprägter statt, wenn die Honige zuvor erhitzt wurden. Der Abbau von MGO kann durch seine Reaktivität begründet werden. Hierbei können beispielsweise Reaktionen mit Aminosäuren bzw. Proteinseitenketten stattfinden. In deren Folge sind entsprechende Reaktionsprodukte wie z.B. MG-H1 (Vgl. Abb. 2-8) in diesen Honigen zu erwarten.

Tab. 4-15 MGO-Gehalt in ausgewählten Honigen nach Erhitzung bei 70 °C

Inkubation 70 °C		0 min	0 min	10 min	10 min	8 h	24 h
Inkubation 37 °C		-	12 w	-	12 w	-	-
MGO	MH 1	100,7 ± 1,0	90,6 ± 2,5	107,9 ± 1,8	67,4 ± 2,6	68,7 ± 1,2	35,9 ± 1,5
[mg/kg]	MH 2	307,2 ± 1,5	268,1 ± 3,1	329,1 ± 1,6	241,8 ± 2,0	237,8 ± 2,6	132,8 ± 9,5
	MH 3	518,5 ± 5,6	411,3 ± 4,1	551,6 ± 8,6	384,6 ± 5,5	362,7 ± 4,0	201,3 ± 3,2
	Raps	2,3 ± 0,3	5,3 ± 1,4	3,1 ± 0,2	5,5 ± 1,1	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,2

(MH = Manuka-Honig)

Die Ergebnisse dieser Erhitzungsexperimente zeigen somit eindeutig, dass eine thermische Behandlung z.B. bei 70 °C nicht zu einer MGO-Bildung in Honig führt. Vielmehr findet im Manuka-Honig ein Abbau der 1,2-Dicarbonylverbindung unter Hitzeeinwirkung statt, sodass eher von einer Minderung des „bioaktiven“ Potentials dieser Honige ausgegangen werden kann. Demnach ist ein Generieren von MGO in handelsüblichen Honigen durch das alleinige Einwirken von erhöhten Temperaturen nicht möglich. Folglich besitzt eine MGO-Bildung, welche z.B. im Zuge einer beginnenden Karamellisierung stattfinden kann, für Honig nur eine geringe Relevanz. Für einen derartigen Effekt sind Temperaturen über 100 °C notwendig (Homoki-Farkas et al., 1996).

Stephen & Schlothauer (2010) postulieren, dass eine Erhitzung des Honigs nach der Ernte zu einer künstlichen Zunahme des MGO-Gehalts führt, was sie mit einer Freisetzung von

zuckergebundenem MGO in Verbindung bringen. Dem kann auf Grundlage der erhaltenen Daten nicht generell zugestimmt werden. So ist in frischen Manuka-Honigen unter dem Einfluss leicht erhöhter Temperaturen (37 °C), wie sie auch im Bienenstock vorherrschen, zwar eine deutliche MGO-Bildung zu beobachten (Vgl. Kapitel 4.1.1), diese liegt jedoch ausschließlich in der Umsetzung von DHA begründet. Folglich ist für die Entstehung entsprechender Mengen MGO im Honig die Anwesenheit des Precursors unabdingbar, die Einwirkung der Temperatur aber offenbar nur aus kinetischer Sicht relevant.

3.3.3.2 Einfluss auf weitere Parameter

Im Allgemeinen geht eine thermische Bearbeitung stets mit Änderungen der sensorischen Eigenschaften wie Farbe, Geruch oder Geschmack einher, wie auch am Beispiel eines Manuka-Honigs zu beobachten ist. So führt eine kurzzeitige Erhitzung bei 100 °C bereits zu einer sichtbar dunkleren Farbgebung (Vgl. Abb. 4-34). Diese kann mit der Bildung potentieller Folgeprodukte wie z.B. Melanoidinen (*Brudzynski & Kim, 2010*) oder HMF (*Boonchiangma et al., 2009*) einhergehen. Neben dieser optischen Veränderung lässt sich zudem ein negativer Einfluss der einwirkenden Temperatur auf das Aroma des Honigs feststellen, z.B. durch das Wahrnehmen eines „Kochgeschmacks“ oder zusätzlicher, honig-untypischer Geruchsstoffe. Aus sensorischer Sicht kann demnach von einer Minderung der Qualität durch die Erhitzung bei hohen Temperaturen ausgegangen werden.

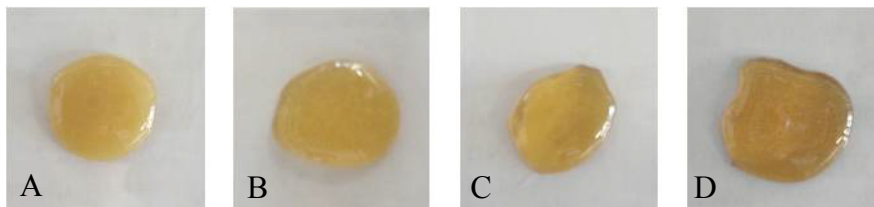


Abb. 4-34 Optischer Vergleich einer Manuka-Honig-Probe vor (A) und nach Erhitzung bei 60 °C (B), 80 °C (C) und 100 °C (D) für 15 min

Neben den genannten sensorischen Einschränkungen geht eine Erhitzung von Honig auch mit Änderungen in der Zusammensetzung einher. Als typische Parameter können hierbei 3-DG und HMF angeführt werden, welche bei Erhitzung nachgebildet werden. So wird deutlich, dass eine Erhitzung bei 70 °C über einen längeren Zeitraum insbesondere zu einer drastischen Erhöhung des HMF-Gehaltes in den Manuka-Honigen führt (Tab. 4-16). Dem entgegen weist der Rapshonig einen signifikant geringeren Anstieg des HMF-Gehaltes auf. Der Effekt der Lagerung (37 °C, 12 Wochen) wirkt sich hingegen sehr stark aus, da alle untersuchten Proben eine deutliche Zunahme der HMF-Konzentration erfahren. Geht der Lagerung noch eine kurzzeitige Behandlung bei höheren Temperaturen voraus, wie es z.B. im Zuge einer eventuellen Pasteurisation des Honigs möglich ist, deutet sich eine zusätzliche Verstärkung des Effekts an.

Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei Betrachtung der zugehörigen Konzentrationen an 3-DG. Eine kurzzeitige Inkubation bei 70 °C bringt in den gewählten Honigen nahezu keine direkten oder langfristigen Veränderungen mit sich. Werden die Proben jedoch über einen längeren Zeitraum diesen Temperaturen ausgesetzt, kommt es zum deutlichen Anstieg des 3-DG-Gehaltes. Dabei unterscheiden sich Manuka-Honige nicht wesentlich in ihrem Verhalten zu Rapshonig.

Tab. 4-16 Gehalt an HMF und 3-DG in ausgewählten Honigen nach Erhitzung bei 70 °C

Inkubation 70 °C		0 min	0 min	10 min	10 min	8 h	24 h
Inkubation 37 °C		-	12 w	-	12 w	-	-
HMF [mg/kg]	MH 1	2,4 ± 0,2	36,0 ± 0,5	n.a.	36,3 ± 4,0	8,0 ± 0,5	38,3 ± 1,8
	MH 2	6,0 ± 0,4	93,4 ± 0,8	n.a.	107,5 ± 0,8	24,6 ± 0,8	98,0 ± 2,7
	MH 3	7,0 ± 0,5	67,6 ± 1,5	n.a.	81,0 ± 2,2	8,9 ± 0,6	17,3 ± 2,5
	Raps	2,4 ± 0,1	48,2 ± 1,0	n.a.	70,8 ± 2,7	4,8 ± 0,2	12,9 ± 0,6
3-DG [mg/kg]	MH 1	527 ± 9	1264 ± 16	536 ± 16	1209 ± 10	904 ± 26	1379 ± 14
	MH 2	561 ± 10	961 ± 10	559 ± 10	965 ± 11	781 ± 35	1076 ± 94
	MH 3	811 ± 12	1188 ± 13	819 ± 11	1218 ± 10	970 ± 11	1297 ± 45
	Raps	269 ± 5	620 ± 34	242 ± 19	610 ± 49	449 ± 20	745 ± 10

(MH = Manuka-Honig, n.a. = nicht analysiert)

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche lassen folglich erkennen, dass sich eine Erhitzung bei höheren Temperaturen über einen längeren Zeitraum in hohem Maße auf die Gehalte an 3-DG und HMF auswirkt. Zudem führt eine kurzzeitige thermische Behandlung ebenfalls zu einer langfristigen Erhöhung des HMF-Gehaltes, währenddessen der Einfluss auf 3-DG geringer ist. Darüber hinaus läuft die HMF-Bildung in Manuka-Honig in höherem Maße ab als im Rapshonig, was mit dem Zusammenwirken der beteiligten Faktoren erklärt werden kann (Vgl. Kapitel 4.3.1.4).

Wie in anderen Honigen eignet sich HMF somit auch in Manuka-Honigen als Erhitzungs- und Lagerungsindikator, da beide simulierten Vorgänge sich in deutlichen Veränderungen im Gehalt widerspiegelten. Als weitere Parameter lassen sich wiederum die Honigenzyme Diastase und Invertase heranziehen, die an dieser Stelle nicht näher betrachtet wurden. Ein deutlicher Abfall der Aktivität in Folge höherer Temperaturen wurde bereits von *Ajlouni & Sujirapinyokul (2010)* beschrieben. Ungeachtet der Tatsache, dass die Erhitzung von Honig aus rechtlicher Sicht nicht gestattet ist, ergeben sich aus den gewonnenen Daten auch keine positiven Aspekte einer solchen Behandlung. Spekulationen über eine Erhitzung von Manuka-Honig als „Optimierungsmaßnahme“ sind daher unberechtigt.

3.3.4 Konsequenzen für die rechtliche Beurteilung von Manuka-Honig

Die rechtlichen Anforderungen von Honig umfassen verschiedene Parameter (Vgl. Kapitel 2.2.7). Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde der Fokus auf die Faktoren HMF-Gehalt und Diastase-Aktivität gelegt. Diese gelten als Indikatoren für eine Lagerung oder thermische Behandlung von Lebensmitteln, wobei für Honig Grenzwerte definiert sind (*Codex Standard, 1981; Honig-V, 2004*).

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen bestätigen zum Einen die prinzipielle Eignung beider Faktoren zum Anzeigen einer Honigalterung. Dabei ist dem HMF-Gehalt die größere Aussagekraft zuzuschreiben. So wiesen frische Manuka-Honige nur geringe HMF-Konzentrationen auf, die in der simulierten Lagerung deutlich anstiegen, während die DZ stark variierte. Zum Anderen sind aber auch gewisse Einschränkungen in der Einschätzung der Honigqualität anhand dieser Parameter zu erkennen.

So wird die Honigbeurteilung aufgrund der Diastaseaktivität durch die vorherrschenden botanischen Variationen erschwert. Es können innerhalb einer Sorte große Unterschiede in der Höhe der DZ bestehen (*Oddo et al., 1990; SLMB, 2004*), wie auch für Manuka-Honig aufgezeigt wurde. Doch auch zwischen verschiedenen Honigsorten lassen sich prinzipielle Differenzen in der Enzymaktivität unabhängig vom Alter der Proben aufzeigen (*Oddo et al., 1990*), was ebenfalls am Beispiel der frischen Manuka-Honige sichtbar wurde. Hinzu kommt, dass es für die DZ keinen klaren Ausgangswert gibt, an dem eine potentielle Abnahme bewertet werden kann. Dies steht im Gegensatz zum HMF, welches erst in der Honigreifung und –alterung gebildet wird und damit in frischen Proben ein Gehalt von nahezu 0 mg/kg vorliegt. Eine alleinige Qualitätsbewertung von Honig aufgrund der DZ ist daher nicht empfehlenswert.

In der Literatur wird eine Eignung der Diastase ebenfalls kontrovers diskutiert. Bereits *Dustmann et al. (1985)* attestieren der Diastase nur eine geringe Eignung als Indikator für Wärme- und Lagerschäden. Dementgegen beschreiben *Tosi et al. (2008)* die Diastase als eindeutigen Faktor zum Anzeigen einer Erhitzung. Des Weiteren wird die Bestimmung der Invertase als vielversprechend bewertet, um die Naturbelassenheit des Honigs zu beurteilen (*Dustmann et al., 1985*). *Oddo et al. (1999)* betrachten beide Enzyme kritisch für eine solche Aussage, während HMF als verlässlicher Parameter charakterisiert wird. Ein Konzentrationsanstieg durch Lagerungsprozesse ist in der Literatur mehrfach beschrieben (*White et al., 1964; Deifel 1989; Weigel et al., 2004*).

Darüber hinaus wird aber auch ein Einfluss auf den HMF-Gehalt, z.B. durch Honigzusammensetzung, pH-Wert und floraler Quelle, diskutiert (*Ajlouni & Sujirapinyokul, 2010*). In Manuka-Honig konnte eine Beeinflussung der HMF-Bildung und DZ-Abnahme durch DHA aufgezeigt werden. Zwar scheint die Einwirkung von Lagertemperatur und –zeit als

der dominante Parameter zu fungieren, es konnten jedoch eindeutige Anzeichen einer Beeinflussung durch die spezifische Honigzusammensetzung erhalten werden.

Eine zusätzliche Problematik in der öffentlichen Diskussion um dieses Thema ergibt sich zusätzlich durch die unvollständige Definition von „Erhitzung“. Nach rechtlicher Regelung darf ein Honig keiner Erhitzung unterzogen werden, allerdings ist dieser Begriff nicht näher spezifiziert, beispielsweise durch Angabe von Temperaturen. Üblicherweise herrscht im Bienenstock eine Temperatur von etwa 35 bis 40 °C vor. Folglich kann eine Inkubation von frisch gewonnenem Honig bei diesen Temperaturen als eine natürliche Nachreifung verstanden oder aber bereits als unsachgemäße Erwärmung dieses Lebensmittels betrachtet werden.

In der Konsequenz ergibt sich dadurch eine gewisse Schwierigkeit in der rechtlichen Beurteilung. Ein allgemeingültiger Grenzwert für eine Vielzahl an Honigsorten scheint einerseits eine unzureichende Bewertungsgrundlage darzustellen. Potentielle Einflussfaktoren, die aus der charakteristischen Zusammensetzung der Honige resultieren, können auf diese Weise keine Berücksichtigung finden. In Bezug auf die Diastase kommt die natürlicherweise vorliegende Variation der Enzymaktivität hinzu. Andererseits führt eine thermische Behandlung zu einer drastischen Veränderung, insbesondere im HMF-Gehalt, sodass ein Anzeigen einer Einwirkung hoher Temperaturen als mögliche unsachgemäße Bearbeitung durch diesen Faktor gewährleistet werden kann.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse kann von der Anwendung des HMF-Gehaltes zur Bewertung der Honigqualität unter Nutzung der gesetzlichen Grenzwerte nicht abgeraten werden. Es ist allerdings zu erwägen, weitere Parameter in die Beurteilung einzubeziehen. Diese können insbesondere bei eventuellen Abweichungen vom Grenzwert eine klärende Funktion ausüben. Am Beispiel von Manuka-Honig kann hierfür beispielsweise eine Quantifizierung von DHA als spezifischen Einflussfaktor vorgeschlagen werden. Zudem kann ein Einbeziehen weiterer Folgeprodukte neben HMF sinnvoll sein. So wird bereits die Kombination aus HMF- und Furosingehalt zur Beurteilung der Frische diskutiert (*Villamiel et al., 2001; Sanz et al., 2003; Morales et al., 2008*). Des Weiteren wurde in Zitrus Honig neben der Bildung von Furan- und Pyran Komponenten während der Lagerung auch niedrige Gehalte an Monosacchariden bzw. hohe an Maltose als mögliche Indikatoren benannt (*Castro-Vázquez et al., 2008*). Eine derartige Umsetzung der Zucker im Rahmen der Honigalterung wurde bereits von *White et al. (1961)* beschrieben. Welche Parameter zur Beurteilung der Honigqualität dabei eine relevante Aussagekraft haben, auch in Bezug auf Manuka-Honig, sollte somit Gegenstand fortführender Untersuchungen sein.

3.4 Mikrobiologische Untersuchungen von Manuka-Honig

Die antibakterielle Aktivität von Manuka-Honig wurde bereits in verschiedenen Studien wissenschaftlich belegt, wobei eine ungewöhnlich hohe nicht-peroxidische Aktivität festzustellen war (*Allen et al., 1991; Snow & Manley-Harris, 2004*). Die Aufklärung dieser Beobachtung gelang *Mavric et al. (2008)* mit der Identifizierung von MGO als Komponente von Manuka-Honig, welche direkt mit den antibakteriellen Eigenschaften des Honigs in Verbindung gebracht werden konnte. Darauf aufbauend sollten im Rahmen dieser Arbeit fortführende Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von MGO und Manuka-Honig erfolgen, um die 1,2-Dicarbonylverbindung eindeutig als für die Wirkung verantwortliche Substanz zu bestätigen. Des Weiteren galt es, für MGO minimale Hemmkonzentrationen (MHK) gegen ausgewählte Bakterien zu ermitteln, um dessen antibakterielle Aktivität näher zu charakterisieren.

Die MHK stellt dabei die niedrigste Konzentration einer Substanz dar, bei der kein Wachstum von Mikroorganismen mehr auftritt. Übliche Verfahren zur Bestimmung dieses Wertes sind der Agardiffusionstest und der Dilutionstest (*Burkhart, 1992*). Bei der erstgenannten Methode wird die Testsubstanz in gestanzte Löcher einer Nähragarplatte, welche zuvor mit Bakterienkultur beimpft wurde, definiert ausgebracht und die Entstehung eines Hemmhofs um das Loch beurteilt. Grundlage des Dilutionstests, der sowohl im Makro- als auch Mikromaßstab anwendbar ist, bildet eine Verdünnungsreihe der Testsubstanz, die mit einer definierten Menge an Bakteriensuspension inkubiert wird. Dabei weist das Auftreten einer Trübung im Inkubationsansatz auf ein Bakterienwachstum hin. Die Verdünnung, bei der keine Trübung mehr wahrgenommen werden kann, gibt die MHK der geprüften Substanz wieder. Im Rahmen der Untersuchungen wurde der Mikrodilutionstest eingesetzt.

3.4.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

3.4.1.1 Stabilität von MGO im Testmedium

Die Durchführung des Mikrodilutionstests erfordert den Einsatz von Müller-Hinton-Bouillon als Kulturmedium für die Bakteriensuspensionen sowie als Lösungsmittel für die zu testenden Substanzen. Aufgrund der bekannten Reaktivität von Dicarbonylverbindungen gegenüber Proteinen, wurde zunächst die Stabilität von MGO in dieser Nährbouillon unter Testbedingungen beurteilt. Hierzu wurde eine MGO-Standardlösung der Konzentration 128 mg/l in Wasser sowie Müller-Hinton-Bouillon mit und ohne Zusatz eines MGO-armen Manuka-Honigs für bis zu 18 h bei 37 °C inkubiert und mittels RP-HPLC analysiert (Vgl. Kapitel 3.3.1). Die bestimmten Konzentrationen sind in Abb. 4-35 prozentual bezogen auf den Ausgangswert angegeben.

Während in wässriger Lösung keine Änderung der MGO-Konzentration zu verzeichnen ist, lässt sich ein deutlicher Abbau der Verbindung unter Verwendung von Müller-Hinton-Bouillon als Lösungsmittel beobachten. Durch den Zusatz von Honig erfolgt der Abfall der MGO-Konzentration in geringerem Maße. Dabei kann eine Bildung von MGO aus den enthaltenen Zuckern ausgeschlossen werden, da ein Blindwert mit Müller-Hinton-Bouillon unter Zusatz von Manuka-Honig mitgeführt wurde. In diesen Proben war sowohl vor als auch nach der Inkubation bei 37 °C kein MGO messbar, unabhängig von der zugegebenen Menge an Honig.

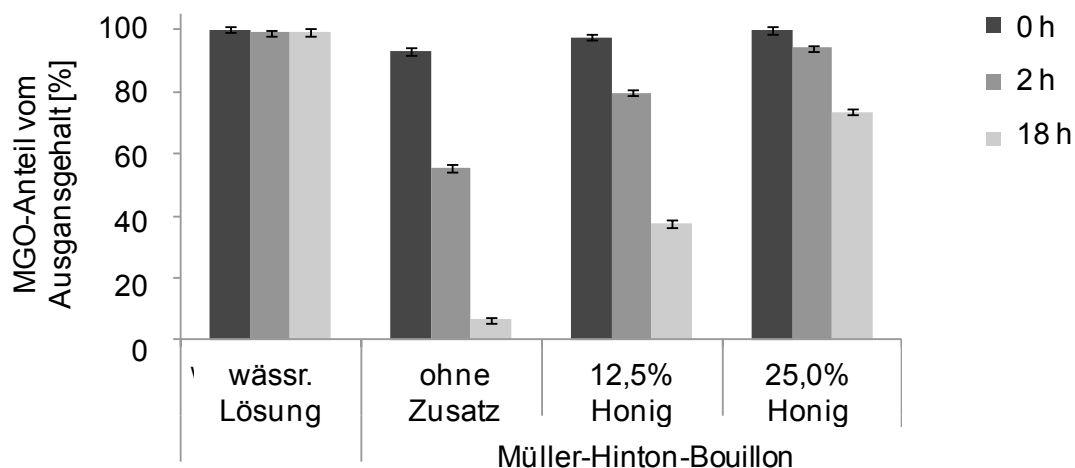


Abb. 4-35 Stabilität von MGO in Wasser und Müller-Hinton-Bouillon (mit und ohne Honigzusatz) (Zusatz: MGO-armer Manuka-Honig, RP-HPLC nach Inkubation bei 37 °C für 0 h, 2 h, 18 h)

Die Beobachtungen deuten folglich auf eine Stabilisierung von MGO in Anwesenheit der Honigmatrix hin. Der Abbau von MGO in der verwendeten Müller-Hinton-Bouillon kann dabei auf die darin enthaltenen Amino-Komponenten zurückgeführt werden, da es laut Herstellerangaben vor allem Caseinhydrolysat enthält. Bei der leicht erhöhten Temperatur von 37 °C ist daher eine Reaktion mit MGO zu erwarten, wodurch der deutliche Abfall der Konzentration im Laufe der Inkubation resultiert. Eine Neubildung von MGO aus im Honig enthaltener Glucose bzw. Fructose kann nicht als Ursache herangezogen werden, auch eine Umsetzung von noch vorhandenem DHA liefert keine hinreichende Erklärung. Zwar sind in ausgereiften Honigen noch entsprechende Mengen an DHA detektierbar (Vgl. Kapitel 4.1.3.3), wodurch sich eine zusätzliche Umsetzung zu MGO diskutieren lässt, allerdings wurde für die Stabilitätsprüfungen ein sehr MGO-armer Manuka-Honig gewählt, welcher demzufolge auch nur einen geringen DHA-Gehalt aufweist. Die beobachteten Unterschiede durch den Zusatz an Honig sind auf diese Weise nicht zu erklären. Zudem ließen die Umsetzungsexperimente von DHA (Vgl. Kapitel 4.2.2.1) eine gewisse zeitliche Abhängigkeit erkennen, sodass während einer Inkubationszeit von 18 h keine wesentliche Neubildung von MGO zu erwarten ist.

In der Folge ist davon auszugehen, dass vorhandenes MGO durch die Matrix „geschützt“ wird. Hierbei kann eine Ein- bzw. Anlagerung in die Matrix oder einzelne Bestandteile erfolgen. Auf diese Weise kann MGO reversibel gebunden vorliegen, sodass es zum Einen durch analytische Methoden detektierbar ist und zum Anderen hinsichtlich der hemmenden Wirkung auf Bakterien zur Verfügung steht, jedoch ein Abbau durch externe Substanzen gehindert wird. Darüber hinaus sind Reaktionen der Zucker oder auch von 3-DG mit dem Caseinhydrolysat wahrscheinlich. Somit ist dieses weniger für MGO als Reaktionspartner verfügbar, wodurch ebenfalls ein höherer Gehalt resultieren kann.

Die Müller-Hinton-Bouillon erlaubt das Wachstum vieler heterotropher Mikroorganismen und gewährleistet weiter eine gute Versorgung mit Nährstoffen, wodurch es standardmäßig zur Empfindlichkeitsprüfung von Testsubstanzen eingesetzt wird. Ein Verzicht auf den Einsatz der Nährlösung zur Kultivierung der Bakterien und Durchführung des Mikrodilutionstest ist daher unter standardisierten Bedingungen nicht möglich. Allerdings sind bei der Bestimmung der MHK von MGO die beobachtete Instabilität in Müller-Hinton-Bouillon bzw. die Unterschiede in Anwesenheit von Zucker zu bedenken.

3.4.1.2 MHK von MGO und Vergleichsantibiotika

Unter Durchführung des Mikrodilutionstests wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben konnte für alle zum Test eingesetzten Bakterien eine Hemmung durch MGO beobachtet werden. Zum Einsatz kamen dabei vier Standard-Referenzstämme von Mikroorganismen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) hergestellt wurden. Es wurden zwei klinisch relevante, gram-positive Stämme mit *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*, ATCC 29213) und *Streptococcus pyogenes* (*S.pyogenes*, ATCC 19615) sowie die gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853) gewählt. Die Empfindlichkeit dieser Standard-Referenzbakterien gegenüber MGO war dabei unterschiedlich stark ausgeprägt (Tab. 4-17). Es kann hierbei folgende Rangfolge der Mikroorganismen angegeben werden:

$$S.pyogenes > St. aureus > E. coli > P. aeruginosa$$

Die ermittelten MHK-Werte, aufgeführt in Tab. 4-17, variieren demzufolge auch sehr stark zwischen 0,44 und 3,55 mM MGO. Zum Vergleich wurden die bekannten Antibiotika Ampicillin, Vancomycin und Gentamycin in den Untersuchungen mitgeführt. Hierfür konnten mittels Mikrodilutionstest MHK-Werte im Bereich von 0,3 bis 10 µM bestimmt werden. Das bedeutet, dass die zu beobachtende Wachstumshemmung durch MGO in der Relation deutlich geringer ist.

Tab. 4-17 MHK-Werte für ausgewählte Antibiotika und MGO gegen Standard-Referenzbakterienstämme (*E. coli*, *St. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*)

Testsubstanz	MHK [mM]			
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>St. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Ampicillin	0,010	0,003	< 0,001	-
Vancomycin	-	0,001	3·10 ⁻⁴	-
Gentamycin	0,006	0,004	0,003	0,008
MGO	1,33	0,78	0,67	3,55
MGO + Zucker	1,18	0,44	0,67	3,55
MGO + Honig	1,78	0,44	0,67	3,55

(MGO: in MH-Bouillon, MGO+Zucker: in MH-Bouillon unter Zusatz von 25,0 % Zucker, MGO+Honig: in Müller-Hinton-Bouillon unter Zusatz von 12,5 % MGO-armen Manuka-Honig; Dreifachbestimmung)

In die Untersuchungen wurden auch ausgewählte multiresistente Bakterien einbezogen, deren Ergebnisse in Tab. 4-18 aufgeführt sind. Es wird ersichtlich, dass diese Stämme eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber MGO aufweisen wie die dazugehörigen Wild-Typ-Stämme. Folglich hat eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika keinen Einfluss auf eine Hemmwirkung von MGO, was frühere Publikationen z.B. von *Molan (2009)* bestätigt.

Tab. 4-18 MHK-Werte für ausgewählte Antibiotika und MGO gegen vier multiresistente Bakterien (*E. coli* ESBL, *St. aureus* MRSA „Barnimer“, *St. aureus* MRSA „USA 300“, *P. aeruginosa* res.)

Testsubstanz	MHK [mM]			
	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>St. aureus</i> (MRSA „Barnimer“)	<i>St. aureus</i> (MRSA „USA 300“)	<i>P. aeruginosa</i> res. (multi- resistent)
Vancomycin	-	4·10 ⁻⁴	7·10 ⁻⁴	-
Gentamycin	0,012	0,002	0,004	0,006
MGO	1,78	0,89	0,74	7,10

(*E. coli* ESBL = extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli*, MRSA = methicillin-resistent *St. aureus*; Dreifachbestimmung)

Um mögliche synergistische Effekte hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung von MGO zu prüfen, wurde der Bouillon auch eine honiganaloge Zuckermischung nach den Angaben von *Wahdan (1998)* sowie ein Manuka-Honig mit sehr geringem MGO-Gehalt (33 mg/kg) zugegeben. Die MHK-Werte von MGO in Anwesenheit von Zucker bzw. Manuka-Honig sind in Tab. 4-17 angegeben. Anhand der ermittelten Werte für *S. pyogenes* und *P. aeruginosa* wird deutlich, dass sich die Hemmwirkung von MGO gegenüber diesen Bakterien durch die Anwesenheit von Honig nicht ändert. Demgegenüber wird die inhibierende Wirkung von MGO auf *E. coli* und *St. aureus* leicht verstärkt. Generell ist dabei meist kein

Unterschied zwischen dem Zusatz der honiganalogen Glucose-Fructose-Mischung und Manuka-Honig erkennbar (Abb. 4-36). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass kein spezifischer Honiginhaltsstoff für die Steigerung der inhibierenden Wirkung verantwortlich ist.

Werden weiterhin die ermittelten Werte der Stabilitätsuntersuchungen einbezogen (Vgl. Kapitel 4.4.1.1), so ist die vermeintlich stärkere Inhibierung vielmehr ein Ergebnis der höheren Stabilität von MGO in Anwesenheit von Zucker- bzw. Honigmatrix. Wie in Kapitel 4.4.1.1 bereits dargelegt, wurde unter dem Einfluss von Matrix ein deutlich geringerer Abbau von MGO durch Komponenten der Müller-Hinton-Bouillon beobachtet. Folglich kann über den Inkubationszeitraum eine etwas höhere Konzentration auf die Bakterien einwirken, sodass deren Wachstum in größerem Maße eingeschränkt werden kann. Dass keine generelle Senkung der MHK-Werte festzustellen ist, ist mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der untersuchten Mikroorganismen gegenüber MGO zu erklären. Zudem werden bedingt durch die Methode nur Konzentrationsstufen geprüft, sodass geringfügige Änderungen im Wachstumsverhalten der Testkulturen ggf. nicht erfasst werden. Hinzu kommt, dass eine Auswertung nach Standardvorgaben lediglich visuell erfolgt, die eine Quantifizierung der vorhandenen Menge an Bakterien über die Trübung nicht ermöglicht.

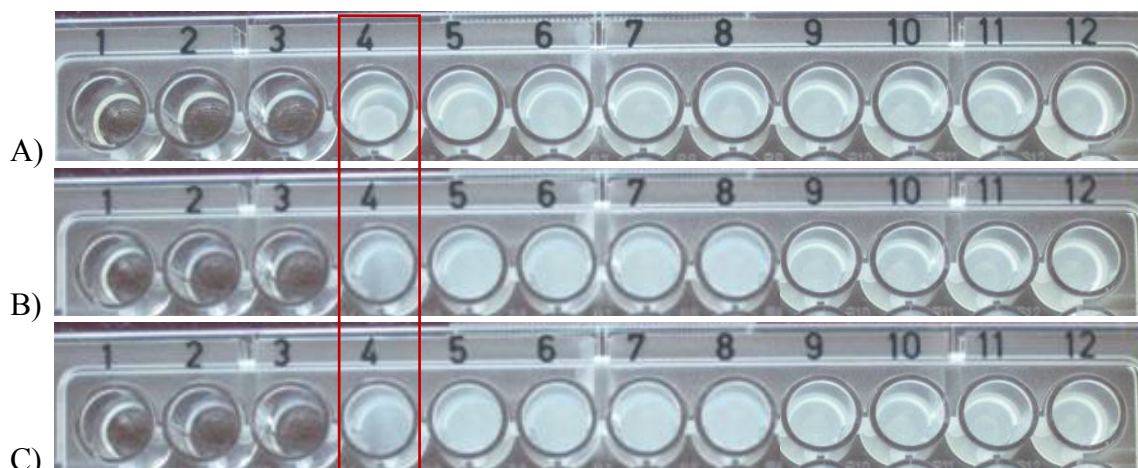


Abb. 4-36 Mikrodilutionstest von MGO gegen *E. coli*, MGO-Konzentrationsreihe (512 bis 0,25 mg/l) in A) MH-Bouillon, B) MH-Bouillon mit Zusatz von 25,0 % Kunsthonig, C) MH-Bouillon mit Zusatz von 12,5 % MGO-armen Manuka-Honig

Demzufolge liegen die ermittelten MHK-Werte für MGO als Standardlösung aufgrund dessen Instabilität im Testmedium etwas zu hoch. Die standardmäßige Durchführung des Mikrodilutionstest erfordert die Verwendung von Müller-Hinton-Bouillon für optimale Wachstumsbedingungen der Bakterien. Hierbei kann kein weniger kritisches Medium in Bezug auf einen möglichen MGO-Abbau, z.B. eine physiologische Salzlösung, verwendet werden. Wie in Abb. 4-35 zu erkennen ist, beginnt die Abnahme der MGO-Konzentration in Müller-Hinton-Bouillon bei 37 °C Inkubation unmittelbar. So sind nach 2 h unter Testbedingungen nur noch 55% des Ausgangsgehaltes im Ansatz detektierbar. In der Folge ist die zur Bestimmung der MHK eingesetzte Menge an MGO nicht über den gesamten

Inkubationszeitraum von 18 h für das Einwirken auf die Bakterien verfügbar. Für die Konzentrationsreihen in zuckerhaltiger Matrix waren geringere MHK-Werte bestimmbar, welche durch die signifikant höhere Stabilität von MGO in diesem Medium erklärt werden können. Demnach stellen die ermittelten Daten in Anwesenheit von Matrix valide MHKs für die gewählten Bakterien dar. Werden darüber hinaus vorangegangene Untersuchungen von *Mavric et al. (2008)* vergleichend einbezogen, lässt sich eine gleiche Größenordnung der bestimmten Werte feststellen. In dieser Studie wurde mittels Agardiffusionstest ohne die Verwendung einer vergleichbaren Nährbouillon die MHK von MGO gegenüber *E.coli* und *St.aureus* zu 1,1 mM bestimmt. Weitere, parallel zu dieser Arbeit veröffentlichte MHK von MGO gegen *St.aureus* und *Staphylococcus epidermis* von 1,05 und 2,11 mM bekräftigen zusätzlich die erhaltenen Daten (*Fidaleo et al., 2010*).

Die antibakterielle Wirkung von Manuka-Honig ist dabei laut *Blair et al. (2009)* einzigartig und über mehrere Faktoren realisiert. Bereits *Fraval & McBrien (1980)* zeigten, dass für *E.coli* eine Wachstumshemmung durch MGO mit einer sofortigen Inhibierung der Proteinsynthese sowie der Initiierung der DNA-Replikation einhergeht. Zudem wird ein Abbau und eine verminderte Umwandlungsfähigkeit der DNA berichtet, was auf eine Interaktion von MGO mit nukleophilen Zentren der DNA zurückgeführt wird (*Ferguson et al., 1998*). Dementgegen wurde für *St.aureus* ein Angriff auf den Zellzyklus beobachtet, der als Folge nicht mehr vollständig durchlaufen wird und keine Zellteilung mehr erfolgt (*Henriques et al., 2010*). Diese Hemmung könnte mit der Abwesenheit bestimmter Stressproteine erklärt werden (*Jenkins et al., 2011*). Der Wirkmechanismus auf gram-negative Bakterien wurde bislang in geringerem Maße untersucht. *Henriques et al. (2011)* konnten jedoch für *P.aeruginosa* nach MGO-Inkubation verschiedene strukturelle Veränderungen der Bakterienzellen bis hin zur Lyse feststellen. Das bedeutet, dass MGO zwar eine Vielzahl an Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu inhibieren vermag, dies jedoch trotzdem auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen kann. In der Folge sind auch die Unterschiede in den MHK-Werten als Maß für die Empfindlichkeit gegenüber MGO zu erklären.

3.4.1.3 Medizinische Anwendbarkeit von MGO

Auf Basis der Ergebnisse lässt sich ein medizinischer Einsatz von MGO als antibakterielles Agens diskutieren. Die gewählten Bakterien sind klinisch relevante Keime, welche im Zusammenhang mit Entzündungen, insbesondere von der Haut und von Wunden, auftreten können. So können *S.pyogenes* oder auch *St. aureus* diverse oberflächliche Erkrankungen der Haut verursachen, z.B. Ekzeme oder Furunkel, aber auch an systemischen Infektionen bis hin zur Sepsis beteiligt sein (*Burkhart, 1992*). *P. aeruginosa* kann ebenfalls eine Vielzahl an Infektionen endogen und exogen verursachen. Darüber hinaus weist dieser Bakterienstamm eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Antibiotika auf (*Burkhart, 1992*). *E. coli* als charakteristischer Vertreter der *Enterobacteriaceae* kann für Infektionen des

Gastrointestinaltrakts oder der Harnwege verantwortlich sein, aber auch Wunden durch Schmierinfektionen besiedeln.

Aufgrund der ermittelten MHK-Werte kann hauptsächlich eine topische Anwendung von MGO in Betracht gezogen werden. Dementgegen ist eine systemische Nutzung z.B. als Antiinfektivum nicht zweckmäßig. Hierfür sind vergleichsweise hohe MGO-Konzentrationen notwendig, um einen signifikanten Effekt auf die Bakterien zu erzielen. Demzufolge kann MGO mit den effektiven Antibiotika, welche in der pharmazeutischen Behandlung von Infektionen eingesetzt werden, nicht gleichgesetzt werden.

Auch wenn die Empfindlichkeit dieser Bakterien gegenüber MGO stark variiert und im Allgemeinen schwächer ausgeprägt ist als gegenüber gängigen Antibiotika, lässt sich der 1,2-Dicarbonylverbindung dennoch eine gewisse Relevanz zuordnen. Von Vorteil kann hierbei zum Einen die generelle Hemmung unterschiedlicher Stämme sein. Im Gegensatz dazu sind einige Antibiotika wie Vancomycin zwar potenter als MGO, jedoch in ihrer Hemmwirkung auf gram-positive Bakterien beschränkt. Zum Anderen unterscheiden sich die MHKs von MGO gegen multiresistente Bakterien nur geringfügig zu den Werten gegen Standard-Referenzstämme. Immer häufiger stellen Resistenzen gegenüber Antibiotika ein Problem in der Behandlung von Infektionen dar. Beispielhaft sei die Substanz Mupirocin erwähnt, welche verbreitet in der Behandlung von Wundinfektionen mit Staphylokokken sowie zur Bekämpfung von *MRSA* genutzt wird, gegen die jedoch eine zunehmende Resistenzbildung beobachtet wird (*Patel et al., 2009*). Demzufolge besteht ein großes Interesse hinsichtlich der Etablierung „neuer“ Wirksubstanzen und alternativer Behandlungsmethoden, sodass MGO als antibakteriell wirksame Komponente eine gewisse Bedeutung erlangen kann. Dabei ist für einen Einsatz ebenfalls relevant, wenn eine höhere Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika nach MGO-Behandlung resultiert, wie sie von *Jenkins et al. (2011)* diskutiert wird. Darüber hinaus bildet eine Inhibierung mit Honig keine Resistenzen in Bakterien aus (*Cooper et al., 2010*), was für einen Einsatz in der klinischen Praxis von Vorteil ist.

Unterstützend kommt hinzu, dass MGO im gelösten Zustand unverändert vorliegt und auf diese Weise einen Eintrag in ein Trägermaterial für die klinische Anwendung ermöglicht. Dabei kommen insbesondere flüssige Formulierungen wie z.B. Gele oder Cremes in Betracht. So konnten *Fidaleo et al. (2010)* eine stabile Formulierung mit Hydrogelmatrix erhalten. Für Manuka-Honig beschreiben *Gethin & Cowman (2008)* in diesem Zusammenhang die klinische Anwendung als Wundauflage. Des Weiteren sind auch *in vitro* Studien zu einem vielversprechenden Einsatz von Honig in Hydrogelmatrix verfügbar (*Wang et al., 2012*). Generell wird medizinischer Honig, der aus *Leptospermum*-Honig wie Manuka produziert wird, aufgrund des antibakteriell wirksamen MGO als effektives Mittel in der Wundbehandlung betrachtet (*Molan, 2006; Simon et al., 2009*).

Problematisch für eine derartige Nutzung kann die toxikologische Bewertung von MGO sein. So wird die Substanz im Allgemeinen mit einem toxischen und mutagenen Potential in Verbindung gebracht (*Kalapos, 1999*). Bislang wurden bereits verschiedene Studien zu möglichen toxischen Effekten auf Säugetiere durchgeführt, wobei sowohl von tumorigenen und antitumorigenen Einflüssen berichtet wird. Des Weiteren ist MGO in der Lage, *in vivo* mit Proteinseitenketten im Zuge von Glykierungsreaktionen zu interagieren, wodurch es zur Bildung von AGEs kommen kann (*Thornalley, 1998; Kalapos, 1999*).

In Bezug auf eine potentielle medizinische Anwendung von MGO zur Behandlung von bakteriellen Infektionen ist daher weiterführend eine Prüfung der wirksamen und somit für einen Einsatz relevanten MGO-Konzentrationen erforderlich, um mögliche toxikologische Komplikationen näher beurteilen und ggf. ausschließen zu können. Dementgegen konnte für verschiedene Studien zum klinischen Einsatz von Manuka-Honig eine gute Kompatibilität und verbesserte Wundheilung aufgezeigt werden (*Molan, 2006; Robson et al., 2008; Gethin & Cowman, 2008; Wang et al., 2012*). Demzufolge können für die darin wirksame Komponente MGO in einer entsprechenden Trägermatrix ebenso vergleichbare Ergebnisse in klinischen Tests möglich sein. Dennoch ist zu bedenken, dass aus toxikologischer Sicht eine Grenze der möglichen Einsatzkonzentration von MGO zur medizinischen Anwendung relevant ist. Darüber hinaus sehen *Majtan (2010)* ein mögliches Risiko in der Behandlung chronischer Beinwunden von Diabetikern. Dabei diskutieren die Autoren eine potentielle Beeinträchtigung des Heilungsprozesses, da MGO und daraus entstehende AGEs in der Pathogenese dieser Wunden durch Modifizierung von Proteinstrukturen und –funktionen beteiligt sind.

3.4.2 Untersuchungen an Honigproben

Die Bestimmung der MHK-Werte von MGO gegen ausgewählte Bakterien wurde sowohl mit reiner Standardlösung, als auch in Anwesenheit von Honigmatrix durchgeführt. Der Vergleich ließ erkennen, dass keine Verstärkung der antibakteriellen Wirkung von MGO durch Honiginhaltsstoffe vorliegt. Im Folgenden wurden ausgewählte Honigproben mit bekanntem MGO-Gehalt in die Untersuchungen einbezogen, um diese Feststellung zu bestätigen. Dabei galt es zunächst, die Honige auf die Anwesenheit von Mikroorganismen zu prüfen, um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden.

3.4.2.1 Mikroorganismen in Manuka-Honig

Die Anwesenheit von Mikroorganismen in Manuka-Honig sollte über Wachstumsversuche in Form eines Screenings beurteilt werden. Hierfür kamen sieben Manuka-Honigen, in denen MGO-Gehalte von 33 bis 583 mg/kg bestimmt wurden, sowie vergleichend zwei Nektar-Honige (Raps und Buschblüte) zum Einsatz. Diese Proben wurden auf Agarplatten

aufgebracht und nach einer Inkubation von 24 h bzw. 48 h visuell auf mikrobielles Wachstum geprüft. Um ein möglichst weites Spektrum an Mikroorganismen abdecken zu können, wurden verschiedene Kulturplatten sowie eine Flüssigbouillon verwendet (Vgl. Tab. 3-13).

Es zeigte sich, dass in den untersuchten Honigen generell nur ein geringer Bewuchs auf den Nährböden beobachtet werden konnte (Tab. 4-19). Im Allgemeinen entspricht das der Erwartung, dass in der Matrix Honig nur wenige Mikroorganismen lebensfähig sind und daher eine geringe mikrobielle Belastung dieses Lebensmittels vorliegt. Dies ist auf die geringe Verfügbarkeit von freiem Wasser sowie auf die hohen Zuckerkonzentrationen zurückzuführen. Dennoch können speziell osmotolerante Hefen als Sedimentbestandteile enthalten sein (*Beckh et al., 1999*). Allerdings ist bei entsprechend niedrigem Wassergehalt im Honig davon auszugehen, dass keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Hefen bzw. keine Gärfähigkeit vorliegt (*Beckh et al., 2004*).

Tab. 4-19 Wachstumsversuche ausgewählter Honige auf verschiedenen Nährmedien, Inkubation für 24 h (bzw. 48 h für anaerobe Platten) bei 37 °C

Honig Nr.	MGO [mg/kg]	Bakterienkolonien [kbE] auf bzw. im Nährmedium						
		Blut (A)	Koch (B)	Galle (C)	CAP (D)	Pilz (E)	Anaerob (F)	Flüssig (G)
1	10	0 – 1	0 – 1	0	0 – W	0	0 – W	0
2	30	1 – W	0 – 1	0	0	0	0	0
3	33	0	0 – 2	0	0	0	0	0
4	146	0 – 1	0	0	0 – 1	0	0	0
5	235	1 – 3	0 – 1	0	3	0	0	0 – W
6	251	1 – 6	0 – 1	0	2 – 3	0	0	0
7	365	0	0	0	0	0	0	0
8	546	0	0 – 1	0	0	0	0	0
9	583	0	0	0	0	0	0	0

(Honig-Proben: 1 Raps, 2 Buschblüte, 3-8 Manuka; Nährmedien: A Columbia Blutagar, B Kochblutagar, C Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar, D Columbia CAP-Agar, E Sabouraud-Agar, F Hemin-Cystein-Blutagar, G Schädler-Bouillon; kbE – koloniebildende Einheiten, W – Wachstum, Anzahl kbE nicht bestimmbar)

In keiner der Honigproben waren Pilze oder Hefen nachweisbar, beispielhaft dargestellt in Abb. 4-37. Zudem konnte kein Wachstum von Anaerobiern oder Enterobakterien detektiert werden. Die Platten aus Blut-, Kochblut- und CAP-Agar wiesen hingegen vereinzelte Bakterienkolonien auf (Abb. 4-38). Diese meist weißen, runden Kolonien, teilweise auch mit leichter Hämolyse auf den Blutagarplatten, können der Anwesenheit von Bazillen und koagulase-negativen Mikroorganismen wie Staphylokokken zugeordnet werden. Durch

eine automatisierte Analyse mittels MALDI-TOF-MS konnten ausgewählte isolierte Kolonien als *Bacillus pumilus* und *Bacillus cereus* identifiziert werden.



Abb. 4-37 Prüfung auf Mikroorganismen von Manuka-Honig Nr. 9 auf Galle-Chrysoidin-Glycerin-Agar (grün) und Sabouraud-Agar (weiß) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂

Zusammenfassend wurden in den untersuchten Honigen damit nur sog. „Umweltkeime“ wie *Bacillus spp.* nachgewiesen, welche durch ihr ubiquitäres Vorkommen als Kontamination während der Honigverarbeitung eingetragen werden können. So wurden diese Spezies z.B. auch in argentinischen Honigen detektiert (Iurlina & Fritz, 2005). Wie bereits erwähnt stellt Honig kein steriles Lebensmittel dar, sodass auch ein natürliches Vorkommen der Mikroorganismen in der Matrix selbst möglich ist. Die Wachstumsversuche der Manuka-Honige machen darüber hinaus deutlich, dass MGO aufgrund der antibakteriellen Aktivität als natürliches konservierendes Agens im Honig wirken kann. Innerhalb der Manuka-Honige wiesen Proben mit einem hohen MGO-Gehalt nur ein geringes bis kein Wachstum an Mikroorganismen auf. Die beiden mitgeführten Blütenhonige (Nr. 1 und 2) sind im Vergleich hierzu in höherem Maß mit Bakterien versehen, ersichtlich an einem teilweise vollständigen Bewuchs der Platten. Diese Beobachtung kann als Indiz für eine potentiell konservierende Wirkung von MGO in Manuka-Honig betrachtet werden.

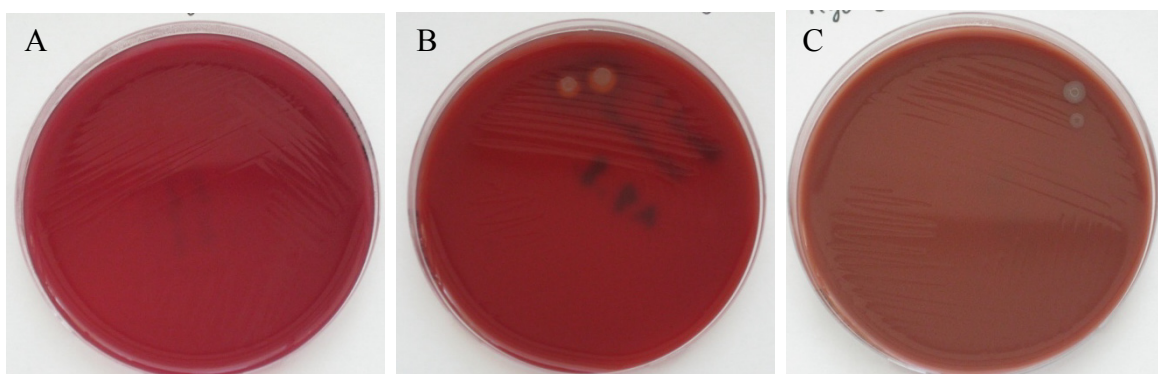


Abb. 4-38 Prüfung auf Mikroorganismen von A) Manuka-Honig Nr. 9 auf Blutagar, B) Manuka-Honig Nr. 5 auf Blutagar und C) Manuka-Honig Nr. 4 auf Kochblutagar nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂

Darüber hinaus kann allerdings die Anwesenheit von Manuka-spezifischen Bakterien oder Hefen ausgeschlossen werden. Ein eventueller Nachweis charakteristischer Mikroorganismen kann demnach als ein Erklärungsansatz für das ungewöhnliche Vorkommen von DHA und MGO im Manuka-Honig dienen (Vgl. Kapitel 4.1.4). So werden diese Verbindungen in der Literatur auch mit dem Stoffwechsel ausgewählter Bakterien oder Hefen in Bezug gebracht (Waites & Quayle, 1980; Bystryk et al., 1981). Diese Annahme stützt sich jedoch auf die Voraussetzung, dass eventuelle auf oder in der Manuka-Pflanze enthaltene Mikroorganismen in den Honig übergehen und folglich ein Nachweis erbracht werden kann. Das in der Pflanze entstehende Produkt DHA wird in den Nektar überführt. Inwieweit an der DHA-Bildung Bakterien oder Hefen beteiligt sind, kann aus den orientierenden Versuchen nicht abgeleitet werden. Hinweise auf die Anwesenheit spezifischer Organismen, die auch im resultierenden Honig detektierbar sind, können bislang nicht erhalten werden.

Die Ergebnisse dieser Versuche weisen vorerst nur darauf hin, dass in Manuka-Honig im Allgemeinen nur wenige Mikroorganismen in geringer Zahl vorhanden sind. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine spezifischen Bakterien oder Hefen vorliegen und für die Anwesenheit von DHA im Manuka-Nektar bzw. die Umsetzung von DHA zu MGO in Honig verantwortlich sind. Das bestätigt die bereits dargelegte Folgerung, dass diese Besonderheit im Metabolismus der Manuka-Pflanze begründet liegt. Ein Einsatz von fünf der untersuchten Manuka-Honige (Nr. 3, 4, 7, 8, 9) in Hemmtests ist durch die geringe Kontamination unproblematisch, während die mitgeführten Nektar-Honige hierzu nicht verwendet wurden.

3.4.2.2 Einsatz von Honigproben zum Mikrodilutionstest

Ergänzend zur MHK-Bestimmung von MGO wurden somit ausgewählte Manuka-Honige mit variierendem MGO-Gehalt mittels Mikrodilutionstest untersucht. Diese wurden in den Konzentrationen 12,5% und 25,0% zum Test eingesetzt. Als Bakterien wurden *E. coli* und *St. aureus* einbezogen. Aus den Versuchen konnte abgelesen werden, ob die Honige in der eingesetzten Konzentration das Bakterienwachstum zu hemmen vermögen.

Die Ergebnisse, dargestellt in Tab. 4-20, lassen erkennen, dass die MGO-Konzentration im Testansatz dabei der ausschlaggebende Faktor für eine auftretende Hemmung ist. Honige, deren MGO-Gehalt im Testansatz über der MHK lag, waren in der Lage, das Wachstum von *E. coli* bzw. *St. aureus* zu inhibieren. Dies ist z.B. bei den Proben Nr. 3 bis 5 für beide untersuchte Konzentrationen gegenüber *St. aureus* der Fall. Dementgegen führte ein geringerer MGO-Gehalt zu einer Trübung im Testansatz, gleichbedeutend mit einem Wachstum der Bakterien, wie es für Honig Nr. 1 festzustellen war. Proben mit einem MGO-Gehalt nahe dem MHK-Wert zeigten im Rahmen der durchgeführten Dreifachbestimmung sowohl Wachstum als auch Hemmung, wie es beispielweise für Probe 4 und 5 gegenüber *E. coli*

beobachtet wurde. Dies kann einerseits einer gewissen Unsicherheit des Testverfahrens unter Verwendung lebender Organismen zugeschrieben werden. Andererseits kann daraus gefolgert werden, dass ein potentielles Hemmvermögen der Probe zwar vorhanden ist, jedoch im „Grenzbereich“ liegt. In der Folge geben die Daten damit keinen Hinweis auf einen verstärkenden Effekt der Matrix oder weiterer Substanzen auf MGO, da andernfalls auch unterhalb der MHK eine gewisse Inhibierung zu erwarten ist. Es können demzufolge auch keine Anzeichen auf eventuelle Synergisten, z.B. diskutiert von *Russel et al. (1990)* oder *Kwakman et al. (2011)*, erhalten werden.

Tab. 4-20 Wachstum (+) bzw. Hemmung (-) von *E.coli* bzw. *St.aureus* durch fünf Manuka-Honige mit unterschiedlichem MGO-Gehalt im Mikrodilutionstest

Nr.	Honig-Probe		MGO im Testansatz [mM]		Wachstum <i>E. coli</i>		Wachstum <i>St. aureus</i>	
	MGO [mg/kg]		25,0%	12,5%	25,0%	12,5%	25,0%	12,5%
3	33		0,11	0,06	- + -	+++	- + +	+++
4	146		0,51	0,25	+ + -	+++	- - -	+++
7	365		1,26	0,64	- - -	+++	- - -	- - -
8	546		1,90	0,94	- - -	+ + -	- - -	- - -
9	583		2,03	1,01	- - -	+ + -	- - -	- - -

(Honig als 25,0 und 12,5%ige Lösung in MH-Bouillon, Inkubation 18 h bei 37 °C, Dreifachbestimmung)

Generell werden antibakterielle Effekte von Honig neben nicht-peroxidischen Faktoren auf die Parameter Osmolarität und pH-Wert sowie die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Glucoseoxidase zurückgeführt. Insbesondere dem Wasserstoffperoxid wurde dabei für eine Vielzahl an Honigen eine hohe Relevanz zugeschrieben (*White et al., 1963*). Hinsichtlich der Zucker- bzw. Wassergehalte sowie des pH-Wertes ausgewählter Manuka-Honige konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden (Vgl. Kapitel 4.2.1). Der Gehalt an Wasserstoffperoxid wurde im Rahmen der Untersuchungen nicht betrachtet. Für Manuka-Honig wird jedoch als charakteristisches Merkmal stets die außergewöhnlich hohe nicht-peroxidische Aktivität benannt (*Allen et al., 1991; Snow & Manley-Harris, 2004*). Dabei kann zuweilen die gesamte antibakterielle Aktivität nicht-peroxidischen Faktoren zugeordnet werden (*Snow & Manley-Harris, 2004*). Demzufolge ist das Wasserstoffperoxid in dieser Honigsorte eher von untergeordneter Bedeutung.

Zusammenfassend ergibt sich die Folgerung, dass MGO den verantwortlichen Parameter für die antibakterielle Wirkung von Manuka-Honig darstellt. Ein Beitrag von möglichen synergistisch wirkenden, Honig-spezifischen Substanzen kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden, sodass deren Existenz und Bedeutung in Frage gestellt werden kann. Dies steht in Zusammenhang mit den Daten von *Mavric et al. (2008)* und *Adams et al.,*

(2008), die MGO bereits als für die antibakterielle Aktivität verantwortliche Komponente bestimmten.

3.4.2.3 Korrelation zwischen MGO-Gehalt und antibakterieller Aktivität

Durch die eindeutige Zuordnung von MGO als antibakterielle Verbindung in Manuka-Honig ergibt sich die Annahme, dass ein direkter Rückschluss einer hemmenden Wirkung auf Bakterien aus dem MGO-Gehalt des Honigs möglich ist. Für einen Vergleich dieser beiden Parameter wurden 61 Manuka-Honige herangezogen und auf ihren MGO-Gehalt sowie ihre antibakterielle Wirkung mittels Agardiffusionstest gegen *St. aureus* untersucht (Vgl. Kapitel 3.7.3). Die MGO-Konzentrationen variierten zwischen 189 und 835 mg/kg. Die entsprechenden antibakteriellen Wirkungen wurden im Bereich von 12,4 bis 30,9% äquivalente Phenolkonzentration (äqu. Phenol) bestimmt. Diese Werte sind in Abb. 4-39 einander gegenübergestellt, wodurch sich eine gute lineare Korrelation zwischen beiden Größen ergibt ($R^2 = 0,9053$).

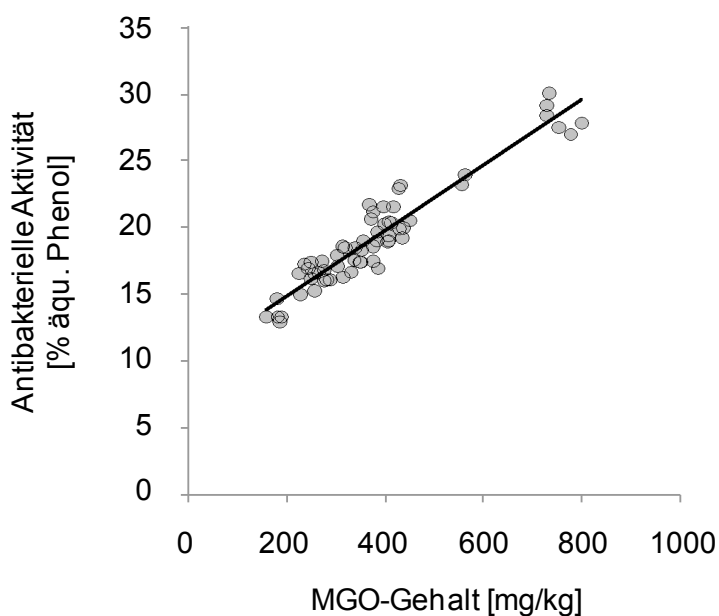


Abb. 4-39 Zusammenhang zwischen antibakterieller Aktivität und MGO-Gehalt in Manuka-Honig (Atrott & Henle, 2009)

In Ergänzung zu *Mavric et al. (2008)* kann somit ein direkter Zusammenhang zwischen MGO-Gehalt und antibakterieller Wirkung beschrieben werden. Zudem lassen sich die Werte in Übereinkunft mit den Daten von *Adams et al. (2008)* bringen, welche die antibakterielle Wirkung von Manuka-Honigen von nicht nachweisbar bis 27,5% äqu. Phenol bestimmen konnten. Wenngleich die Autoren eine nachträgliche Korrektur ihrer Werte vorgenommen haben, lässt sich eine analoge Relation ablesen, wodurch eine gute Übereinstimmung der zwei unabhängigen Untersuchungen resultiert.

Aufgrund der Unsicherheit und begrenzten Empfindlichkeit des standardmäßig genutzten Tests zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Manuka-Honig sind die Daten mit einer antibakteriellen Aktivität von kleiner 10% äqu. Phenol als kritisch zu bewerten. Dies ist als Ursache dafür zu sehen, dass die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt verläuft. Für diese relativ niedrige antibakterielle Wirkung können weitere Honiginhaltsstoffe wie phenolische Verbindungen oder organische Säuren einen zusätzlichen Beitrag leisten. Ab einer MGO-Konzentration von etwa 150 mg/kg ist MGO als alleiniger Faktor für die antibakterielle Wirkung von Manuka-Honig verantwortlich. Dies unterstreicht den dominanten Charakter von MGO als bioaktive Komponente dieses Lebensmittels.

In der Folgerung lässt sich die antibakterielle Aktivität von Manuka-Honig auch mit dem MGO-Gehalt charakterisieren. Demnach kann dieser Wert als nützliches Hilfsmittel bei der Klassifizierung dieser Honige herangezogen werden. Zudem birgt die Quantifizierung des MGO-Gehaltes per RP-HPLC deutliche Vorteile gegenüber dem zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität standardmäßig angewandten Agardiffusionstest. Bei vergleichsweise einfacher Methodik ist dennoch eine hohe Richtigkeit und Präzision erreichbar. So kann die MGO-Konzentration als Alternative zur Deklaration von Manuka-Honig dienen.

3.5 Antioxidative Eigenschaften von Manuka-Honig

Honig wird generell auch mit antioxidativen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Dabei lassen sich der Literatur bereits Angaben zu verschiedenen Honigen entnehmen, sodass auch für Manuka-Honig eine entsprechende antioxidative Wirkung zu erwarten ist. Daher sollten die antioxidativen Eigenschaften von Manuka-Honig im Rahmen dieser Arbeit einbezogen werden. Es sollte zudem geprüft werden, inwieweit diese Honige hierbei einen Unterschied zu anderen Sorten aufweisen.

Zur Beurteilung dieser Eigenschaften erfolgt die Messung der antioxidativen Kapazität von Honig. Der Begriff beschreibt das allgemeine Potential der untersuchten Probe, Radikale abzufangen, wobei sämtliche in der Matrix vorhandene Antioxidantien erfasst werden. In Bezug auf Einzelverbindungen wird das Vermögen als antioxidative Aktivität bezeichnet.

3.5.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

3.5.1.1 Auswahl des TEAC-II-Tests als geeignetes Testverfahren

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, lassen sich eine Reihe von Testverfahren zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Lebensmitteln einsetzen. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde der TEAC-II-Test angewandt, um eine Aussage zur antioxidativen Kapazität von Manuka-Honig im Vergleich zu anderen Honigsorten zu erhalten.

Prinzipiell kann der TEAC-Test sowohl zur Beurteilung der antioxidativen Kapazität von hydrophilen als auch lipophilen Systemen herangezogen werden (*Re et al., 1998*). Dabei liegt ein Einfluss des Extraktions- bzw. Lösungsmittels auf das Ergebnis vor (*Siddhuraju & Becker, 2003*). Für polare Extrakte resultieren dabei in der Untersuchung von Gemüseproben meist höhere Werte im Vergleich zu unpolaren (*Oboh et al., 2008*). So konnten unter Anwendung des Verfahrens z.B. Wasser und Methanol sowie deren Mischungen als geeignete Lösungsmittel zur hydrophilen Extraktion charakterisiert werden (*Raddatz et al., 2007*). Darauf aufbauend erwies sich in Voruntersuchungen für die Analyse der Matrix Honig eine Methanol-Wasser-Mischung (1:1, v/v) als optimal zur Aufarbeitung der Proben (*Atrott, 2007*).

Generell ist dabei zu beachten, dass eine umfassende Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften des Einsatzes weiterer Methoden bedarf. So beschreibt *Beretta et al. (2005)* die Kombination von mehreren Testverfahren zur Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften als zweckmäßig. Für die dargelegte Zielstellung dieser Arbeit soll jedoch die Anwendung eines Testsystems genügen.

3.5.1.2 Antioxidative Kapazität von Honig

Es wurden 23 verschiedene Honige zur Analyse eingesetzt (Vgl. Tab. 3-6 und Tab. 3-7). Für alle dieser untersuchten Proben konnte eine antioxidative Kapazität mittels TEAC-II-Test bestimmt werden. Die Honige wurden hierfür als 5%ige Lösungen zur Messung eingesetzt und die Ergebnisse als Trolox-Äquivalente (TE) angegeben. Wie aus Abb. 4-40 hervorgeht, bestehen zwischen den einzelnen Honigen Unterschiede in der antioxidativen Kapazität. Die verwendeten Nektar-Honige, die Raps-, Akazien, und Blütenmischhonige umfassten, weisen die geringsten Werte auf. Die dazu höhere antioxidative Kapazität der zwei untersuchten Waldhonige steht in Einklang mit den Ergebnissen von *Bertoncelj et al. (2006)*. Die Autoren leiten aufgrund der höheren Werte für dunklere Honigtau- im Vergleich zu helleren Nektarhonigen einen Zusammenhang zwischen antioxidativer Kapazität und Farbe von Honig ab. Für Manuka-Honig lassen sich signifikant höhere antioxidative Kapazitäten als für die betrachteten Nektar-Honige bestimmen (Abb. 4-40). Auch wenn die Aussagekraft der Werte der Honigtau-Honige für einen Vergleich aufgrund der limitierten Probenanzahl begrenzt ist, zeichnet sich Manuka-Honig insgesamt durch eine hohe antioxidative Kapazität aus.

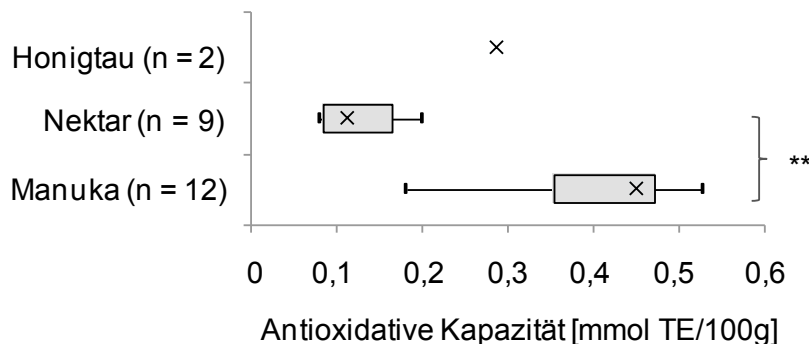


Abb. 4-40 Antioxidative Kapazität von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen (bestimmt mittels TEAC-II-Test, Whiskers min/max, x = Median; Mittelwert-Vergleich mit t-Test, ** $P < 0,01$)

Dies wird auch unter Berücksichtigung weiterer Daten zur antioxidativen Kapazität von Honig, welche ebenfalls auf Basis des ABTS-Radikalkations gewonnen wurden, deutlich. In Tab. 4-21 sind die Daten für Manuka-Honig aus der vorliegenden Arbeit bereits bestehenden Literaturwerten gegenübergestellt. Demnach kann Manuka-Honig hinsichtlich der antioxidativen Kapazität mit australischem Busch- (*Oddo et al., 2008*) sowie mit brasilianischem Eukalyptushonig (*Sant'Ana et al., 2011*) verglichen werden.

Andere veröffentlichte Studien attestieren Manuka-Honig bereits gute Eigenschaften als Radikalfänger (*Henriques et al., 2006; Venugopal & Devarajan, 2011*), die im Ausmaß vergleichbar zu Buchweizenhonig und signifikant höher zu Akazienhonig sind (*Inoue et al., 2005*). Dabei schildern die Autoren zudem eine spezifische Aktivität von Manuka-

Honig, Superoxid-Radikale abzufangen. Die hierfür angewandten Verfahren beruhen im Vergleich zum TEAC-II-Test auf anderen Mechanismen bzw. Radikalstartern, wodurch die erhaltenen Resultate nicht direkt gegenübergestellt werden können (*Küçük et al., 2007*). Die Ergebnisse ergänzen sich dennoch und bestätigen die vergleichsweise hohe antioxidative Kapazität von Manuka-Honig.

Tab. 4-21 Antioxidative Kapazität von Honig

Honigproben (Sorte, Herkunft)	Antioxidative Kapazität [mmol TE/100g]	Quelle
Akazie, Slowakei	0,04 – 0,05	<i>Zalibera et al. (2008)</i>
Buschhonig, Australien	0,18 – 0,30	<i>Oddo et al. (2008)</i>
Eukalyptus, Brasilien	0,31 – 0,59	<i>Sant’Ana et al. (2011)</i>
Mischblüte, Mexiko	0,13 – 0,23	<i>Rodríguez et al. (2012)</i>
Wald, Slowakei	0,09 – 0,11	<i>Zalibera et al. (2008)</i>
Manuka, Neuseeland	0,18 – 0,51	

(bestimmt auf Basis des ABTS-Radikalkations mittels TEAC-II- oder TEAC-III-Test)

In Bezug auf den bereits angesprochenen möglichen Zusammenhang zur Honigfarbe kann die These von *Bertoncelj et al. (2006)* dabei nur teilweise auf Manuka-Honig übertragen werden. Wie in Kapitel 4.2.1.6 dargelegt wurde, lassen sich diese Honige hinsichtlich der Farbe im mittleren Bereich einordnen. Demzufolge sind sie in der Regel dunkler als einige Vertreter der Nektarhonige wie z.B. Raps- oder Blütenmischhonig, aber zuweilen heller als typische Honigtau-Honige. Da für die im Test eingesetzten Honige keine Farbmessungen durchgeführt wurden, kann ein möglicher Zusammenhang nicht näher geprüft werden.

3.5.1.3 Einordnung der antioxidativen Kapazität von Honig im Vergleich zu anderen Lebensmitteln

Da Honig nicht das einzige Bienenprodukt ist, welches mit antioxidativen Eigenschaften in Verbindung gebracht wird, sollten ausgewählte Proben an Propolis, Gelée Royal und Pollen ebenfalls Eingang in die Untersuchung finden. Propolis ist dabei auch unter der Bezeichnung Bienenkittharz bekannt, was sowohl auf den botanischen Ursprung als Harz verschiedener Bäume, als auch auf die hauptsächliche Nutzung im Bienenstock hinweist (*Bogdanov, 2002*). Gelée Royal stellt im Wesentlichen ein Drüsensekret der Bienen zur Ernährung der Bienenkönigin dar (*Bogdanov, 2002; Dany, 1999*). Dementgegen weisen Pollen einen direkten Bezug zur pflanzlichen Quelle auf. Der Imker versteht darunter den durch die Bienen bei der Nektarsuche eingesammelten Blütenstaub, der als Futterreserve im Bienenstock eingelagert wird (*Dany, 1999*).

Die antioxidative Kapazität von Propolis-Extrakten, bestimmt mittels TEAC-II-Test, lag um ein Vielfaches über den für Honig ermittelten Werten (Tab. 4-22). Die Extrakte von Gelée Royal weisen hingegen ähnlich geringe Werte wie Blütenhonig auf. Die extrahierten Pollen zeigen eine etwa zehnfach höhere antioxidative Kapazität als Honig. Für einen direkten Vergleich der Werte ist zu beachten, dass hierfür unterschiedliche Extraktionsmittel genutzt wurden. Dies war als Anpassung auf die Grundzusammensetzung des jeweiligen Produkts notwendig, wobei das so gewählte Extraktionsmittel auch die jeweils höchste antioxidative Kapazität im Test zeigte (*Atrott, 2007*).

Tab. 4-22 Antioxidative Kapazität von Propolis, Gelée Royal und Pollen

	Propolis (n = 3)	Gelée Royal (n = 4)	Pollen (n = 3)
Extraktionsmittel	MeOH	Wasser	MeOH-Wasser (1:1)
Antioxidative Kapazität Extrakt [mmol TE/100g]	97 – 172	0,2	3,2 – 7,5

(bestimmt mit TEAC-II-Test nach Extraktion)

Aus diesen Daten resultiert innerhalb der betrachteten Bienenprodukte die Rangfolge:

Propolis > Pollen > Manuka-Honig > Honigtau-Honig > Gelée Royal und Blütenhonig

Eine ähnliche Reihung konnte auch von *Nagai et al. (2001)* und *Buratti et al. (2007)* vorgenommen werden, wobei Pollen und Manuka-Honig jeweils nicht berücksichtigt wurden. Propolis kann im Allgemeinen jedoch stets als das Produkt mit der höchsten antioxidativen Kapazität charakterisiert werden. Diese Feststellung lässt sich mit der direkten pflanzlichen Abstammung von Propolis in Zusammenhang bringen. So sind eine Vielzahl von Substanzen beschrieben, darunter phenolische Verbindungen, die zur antioxidativen Wirkung von Propolis beitragen (*Mohammadzadeh et al., 2007*). Auf diesen Aspekt soll durch Einbeziehen des Gesamtphenolgehalts in Kapitel 4.5.2.1 am Beispiel von Honig näher eingegangen werden.

Im Vergleich mit anderen Lebensmitteln wie beispielsweise Obst- und Gemüseproben wird deutlich, dass die antioxidativen Eigenschaften von Honig nur sehr gering ausgeprägt sind, auch wenn für alle untersuchten Proben eine antioxidative Kapazität bestimmt wurde. Die für Brokkoli oder Himbeeren ermittelten Werte liegen dabei etwa um Faktor 10 höher als für Manuka-Honig (Tab. 4-23, *Schubert, 2006*). Auch in Hinblick auf andere Lebensmittel ist die antioxidative Kapazität von Honig im Allgemeinen geringer. Die höchste für Honig bestimmte antioxidative Kapazität befindet sich in den Größenordnungen wie die niedrigsten Werte für Hülsenfrüchte, Nüsse oder getrocknete Früchte (*Pellegrini et al., 2006*). Daraus wird ersichtlich, dass eine Vielzahl an Lebensmitteln bei Vorliegen eines antioxidativen Potentials höhere Werte in entsprechenden Testsystemen aufweist.

Tab. 4-23 Antioxidative Kapazität ausgewählter Lebensmittel

Lebensmittel	Antioxidative Kapazität [mmol TE/100g]
Brokkoli	2,1
Getrocknete Früchte	0,4 – 1,5
Gewürze	3,7 – 5,3
Himbeeren	8,0
Hülsenfrüchte	0,3 – 1,3
Kräuter (frisch)	0,8 – 4,8
Mehl und Cerealien	0,2 – 2,6
Nüsse	0,5 – 13,7
Schokolade	3,6 – 5,0

(Pelligrini et al., 2006; Schubert, 2006; bestimmt mit TEAC-Test nach Extraktion)

Im Vergleich mit den Referenzsubstanzen Ascorbylpalmitat und α -Tocopherol, welche als typische Antioxidantien Einsatz finden, kann dies noch einmal bekräftigt werden. Für diese Verbindungen konnte eine hohe antioxidative Kapazität von jeweils 260 mmol TE/100g im genutzten Testsystem ermittelt werden. Eine potentiell ähnliche Wirkung kann folglich höchstens Propolis zugeschrieben werden, da für dieses Bienenprodukt vergleichbare Werte im TEAC-II-Test bestimmbar waren. Hierbei ist prinzipiell zu bedenken, dass es sich um *in-vitro*-Untersuchungen handelt, die noch keine Aussage über eine antioxidative Wirkung auf den Organismus, z.B. nach äußerlicher Anwendung oder Verzehr, liefern können. Für Honig hingegen ist aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen und unter Beachtung üblicher Verzehrsmengen eine entsprechende antioxidative Wirkung als nicht wesentlich zu beurteilen. Demzufolge ist kein wesentlicher Beitrag zur Ernährung, wie verschiedenen Honigen in Form der antioxidativen Eigenschaften oftmals attestiert wird, zu erwarten.

Darüber hinaus ist ein Zusatz von Honig als Wirk- und Hilfsstoff zu kosmetischen Mitteln beschrieben, welcher u.a. aufgrund der antioxidativen Eigenschaften erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Kapazität der eingearbeiteten Bienenprodukte wie Honig oder Propolis in der kosmetischen Formulierung erhalten bleibt (Marquele et al., 2005; Atrott, 2007), wodurch sie einen Beitrag zu einer möglichen antioxidativen Wirkung des Produktes erbringen können. Hierfür ist allerdings ein vergleichsweise hoher Anteil von Honig im Kosmetikum notwendig, um *in vitro* einen analogen Effekt auszuüben wie typische Referenzmaterialien wie Ascorbylpalmitat, sodass nur Propolis eine praktische Relevanz zugeschrieben werden konnte (Atrott, 2007). Ungeachtet dieser *in-vitro*-Daten zur antioxidativen Kapazität, kann daraus wiederum keine Folgerung für eine mögliche Wirksamkeit auf oder in der menschlichen Haut gezogen werden.

3.5.2 Erklärungsansätze für die antioxidative Kapazität von Honig

3.5.2.1 Zusammenhang zum Gesamtphenolgehalt nach Folin

Auch wenn Honig eine eher geringe antioxidative Kapazität aufweist, so lassen sich innerhalb der einzelnen Sorten doch Unterschiede feststellen, für die im Folgenden mögliche Erklärungsansätze angebracht und beurteilt werden sollen. Dabei wird ein wesentlicher Anteil an der antioxidativen Kapazität den in Honig enthaltenen Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren zugeschrieben. Aus diesem Grund wurde für die eingesetzten Proben der Gesamtphenolgehalt nach Folin in die Untersuchungen einbezogen, die Quantifizierung erfolgte als Gallussäure-Äquivalente (GE). Dabei weisen die untersuchten Manuka-Honige wiederum höhere Werte auf als die untersuchten Blütenhonige. Die beiden Waldhonige weisen für Honigtau-Honige eher geringe bis mittlere Werte auf (Vgl. Kapitel 4.2.1.5).

Aus einer Gegenüberstellung der gewonnenen Daten, wird ein Zusammenhang zwischen antioxidativer Kapazität, bestimmt mittels TEAC-II-Test, und Gesamtphenolgehalt nach Folin ersichtlich (Abb. 4-41). Diese Feststellung lässt sich mit den Ergebnissen von *Bertoncelj et al. (2006)* und *Buratti et al. (2007)* in Übereinstimmung bringen, die eine lineare Korrelation beider Messgrößen beschreiben konnten. Unter Berücksichtigung aller Honigproben kann davon bei den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls ausgegangen werden ($R^2 = 0,7584$).

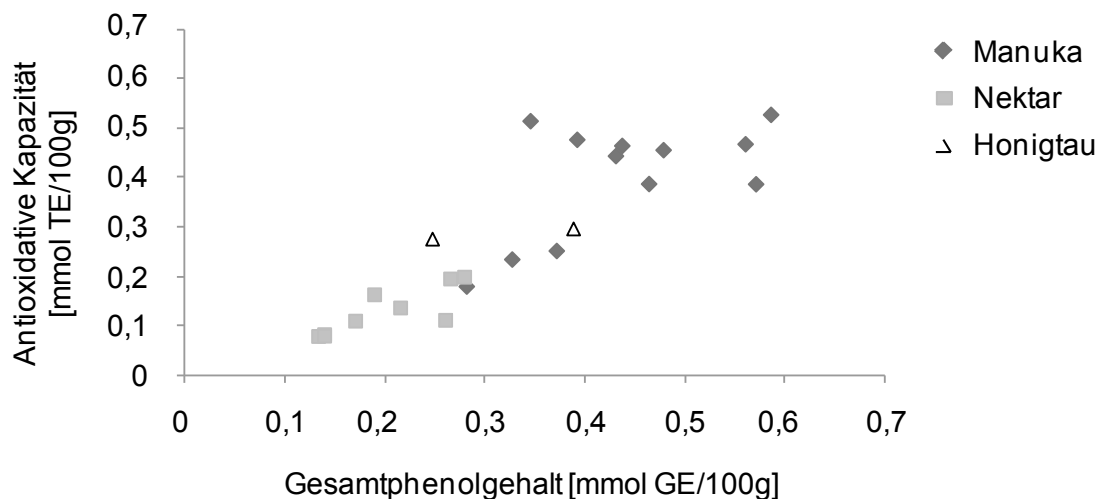


Abb. 4-41 Zusammenhang zwischen antioxidativer Kapazität und in Honig (antioxidative Kapazität mittels TEAC-II-Test, Gesamtphenolgehalt nach Folin)

Gleichzeitig ist zu erkennen, dass der Gesamtphenolgehalt nicht allein für die antioxidative Kapazität verantwortlich ist. Insbesondere innerhalb der Manuka-Honige sind Abweichungen in Bezug auf einen linearen Zusammenhang festzustellen. Die Beobachtung lässt den Rückschluss zu, dass die antioxidative Kapazität von Manuka-Honig im Vergleich zu

anderen Honigsorten etwas weniger stark von phenolischen Verbindungen abhängt. Da die Honige eine hohe antioxidative Kapazität aufweisen, kann weiterhin der Anteil anderer antioxidativ wirksamer Substanzen erhöht sein.

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehalts ermöglicht darüber hinaus keine Angaben zur Zusammensetzung der Polyphenole. Die Klasse der Flavonoide beinhaltet eine Vielzahl von Verbindungen, welche sich auch in der antioxidativen Kapazität unterscheiden. So wurde z.B. für Aglycone gegenüber Glycosiden eine höhere antioxidative Aktivität aufgezeigt (*Schubert, 2006*). Dies wurde mit Unterschieden in der Struktur und Stabilität der Verbindungen begründet. In Honigen mit ähnlichem Gesamtphenolgehalt können demnach durch das Vorkommen verschiedener Substanzen auch Variationen in der antioxidativen Kapazität resultieren.

3.5.2.2 Möglicher Beitrag von MGO und weiteren Inhaltsstoffe

Da sich Manuka-Honige durch den hohen Gehalt an MGO und DHA auszeichnen, stellt sich die Frage, inwieweit ein Einfluss der Verbindungen auf die antioxidativen Kapazität von Honig besteht. Die MGO-Gehalte sind für diese Honige nicht bekannt, allerdings kann der UMF-Wert als Maß für die antibakterielle Aktivität, zu der eine direkte Abhängigkeit besteht (Vgl. Kapitel 4.4.2.3), herangezogen werden. Auch wenn die Anzahl der Proben für eine aussagekräftige Folgerung gering ist, lässt sich anhand der Werte in Tab. 4-24 eine gewisse Relation beider Größen erkennen. Demnach weisen Manuka-Honige mit hoher MGO-Konzentration auch eine höhere antioxidative Kapazität auf. Das ist insofern ungewöhnlich, da MGO prinzipiell eher mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht wird und weniger mit dessen Abschwächung.

Tab. 4-24 UMF-Wert und antioxidative Kapazität für ausgewählte Manuka-Honige

UMF-Wert	o.A.	5+	10+	20+	25+
Antioxidative Kapazität [mmol TE/100g]	0,18	0,24	0,25	0,45	0,47

(bestimmt im TEAC-II-Test; o.A. = ohne Angabe eines UMF, kein „aktiver“ Manuka-Honig laut Etikett)

Neben einem direkten Beitrag von MGO zum antioxidativen Potential können mögliche Folgeprodukte hierfür verantwortlich sein. Beispielsweise beschreiben *Kawashima et al. (1977)* die Bildung potenter antioxidativer Bräunungsprodukte aus der Reaktion von MGO und DHA mit ausgewählten Aminosäuren. Auch wenn der Anteil freier Aminosäuren im Honig eher gering ist, kommt eine vergleichbare Umsetzung auch für diese Matrix in Betracht. Insbesondere DHA und dessen Folgeprodukten kann hierbei eine entsprechende Bedeutung zukommen (*Bailey & Um, 1992; Bedinghaus & Ockerman, 2006*). So wurde für Reaktionsprodukte von DHA mit Aminosäuren eine Inhibierung der Lipidperoxidation

in Fleisch aufgezeigt (*Bedinghaus & Ockerman, 2006*). *Turkmen et al. (2006)* beschreiben des Weiteren eine Zunahme der antioxidativen Kapazität in Nektar-Honig durch Erhitzung, die mit einer ansteigenden Bildung von Farbpigmenten einhergeht, was ebenfalls auf einen Beitrag von Maillard-Reaktionsprodukten hindeutet. Auf Basis der vorliegenden Daten kann hierzu keine nähere Aufklärung erfolgen, sodass fortführende Untersuchungen zur Prüfung auf Folgeprodukte von DHA oder MGO notwendig sind. Aufgrund der ebenso hohen Konzentrationen an 3-DG in Honig kann diese Verbindung in analoger Weise einen Beitrag direkt oder als Vorstufe von Bräunungsprodukten liefern.

Des Weiteren gelten Vitamine generell als antioxidative Komponenten von Lebensmitteln. Auch in Honig kommen sie als Minorbestandteile vor, sodass ein geringer Anteil der antioxidativen Kapazität auf Verbindungen wie Ascorbinsäure zurückgeführt werden kann. Beide Aspekte gelten aber allgemein für Honig und können demnach nicht zur Erklärung der höheren Kapazität von Manuka-Honig herangezogen werden.

3.6 Zytotoxische Wirkung von Manuka-Honig

3.6.1 Anwendung von Zelltests für Dicarbonylverbindungen und Honig

3.6.1.1 Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Testsystems

Die Nutzung von Zelltests zur Beurteilung von zytotoxischen Eigenschaften einer Substanz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgegriffen. Aufgrund der Vielfalt möglicher Testsysteme galt es jedoch, zuerst eine geeignete Bestimmungsmethode auszuwählen und für die Anwendung auf Honigproben und 1,2-Dicarbonylverbindungen zu etablieren.

Die Resultate zytotoxischer Untersuchungen sind stets in Bezug zur eingesetzten Zelllinie zu betrachten. Da Honig primär ein Lebensmittel darstellt, wurden Darmzellen für die Versuche ausgewählt. Diese sind als Modell zur Beurteilung einer Wirkung von Honig und dessen Inhaltsstoffen geeignet, da die Aufnahme in den Organismus beim Verzehr von Honig über den Gastrointestinaltrakt erfolgt und damit potentielle Effekte von enthaltenen Substanzen *in vivo* auf Zellen des Darms zu erwarten sind. Üblicherweise werden für Zellkulturversuche permanente Tumorzelllinien eingesetzt, da sie eine gute Reproduzierbarkeit bei hoher Wachstumsrate zeigen und ihre Eigenschaften über einen langen Zeitraum stabil bleiben (Lindl, 2002). Konkret kam die Tumorzelllinie HT-29 zum Einsatz. Dabei handelt es sich um humane Kolonkarzinomzellen, welche 1964 nach der Entnahme von einer 44-jährigen Patientin etabliert wurden (www.dsmz.de). Die Zellen, dargestellt in Abb. 4-42 A, wachsen hierbei als adhärenente Monolayer und sind in der Lage, typische Differenzierungscharakteristika von normalen Darmzellen auszubilden. Diese vielfach verwendete Zelllinie wurde daher als gut geeignetes Modell für *in-vitro*-Untersuchungen charakterisiert (Le Bivic et al., 1988).

Zur Beurteilung zytotoxischer Effekte einer Substanz im Zellkultursystem existiert eine Vielzahl an Testsystemen, die auf unterschiedlichen Mechanismen bzw. detektierten Endpunkten beruhen können (Vgl. Tab. 2-7). Ein gängiges Verfahren stellt der Neutralrottest dar, der zunächst auch für die Bestimmung der Zytotoxizität von Honig in Betracht gezogen wurde. Der Test lässt durch Anfärben der Zellen einen direkten Rückschluss auf die Zellvitalität zu (Borenfreund & Puerner, 1985) und kann zur Bewertung der unmittelbar auftretenden Effekte genutzt werden. In ersten Untersuchungen gestaltete sich dieses Verfahren jedoch als problematisch, um eine Beurteilung von Honig vorzunehmen. So unterschieden sich die betrachteten Honig-Proben nicht wesentlich von einem vergleichend mitgeführten Kunsthonig (Fröhlich, 2009). Es ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte nur auf den vorliegenden Zucker zurückzuführen und potentielle Wirkungen weiterer Inhaltsstoffe unter den genutzten Bedingungen nicht detektierbar sind.

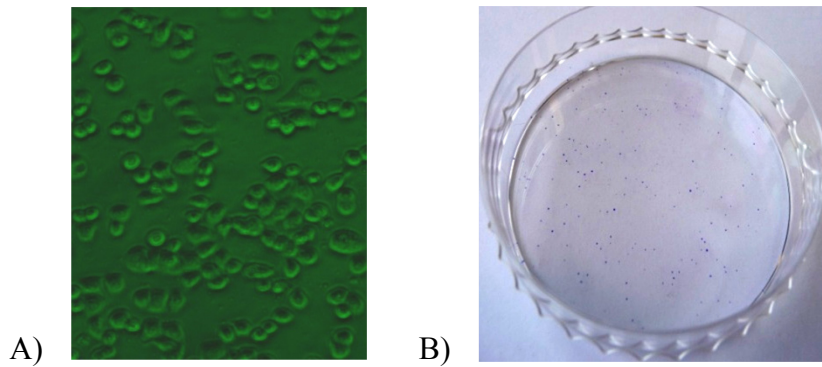


Abb. 4-42 A) HT-29-Zellen in DMEM-Medium, Lichtmikroskop 20fach vergrößert, B) Koloniebildungstest unter optimierten Bedingungen (Negativkontrolle)

Als dienliche Methode zur Bestimmung einer subakuten Wirkung der Minorkomponenten erwies sich hingegen der Koloniebildungstest (*Fröhlich, 2009*). Im Folgenden wurde dieser für eine Untersuchung von Honigproben etabliert und optimiert. Als geeignete Parameter wurden hierfür ein Ausstreuen von 250 Zellen/ml mit anschließender einstündiger Inkubation der Testsubstanz bzw. Honiglösung sowie eine Weiterkultivierung der Zellen im Nährmedium von sieben Tagen ermittelt (*Fellendorf, 2010*). Die gewählte Zellzahl erlaubt ein praktikables Auszählen der während der Kultivierung gebildeten Kolonien, wohingegen eine höhere Anzahl ausgestreuter Zellen zunehmend fehlerbehaftet ist. Die Wahl der Inkubationszeit ergibt sich durch die ermittelten Daten zur Stabilität von MGO, welche in Kapitel 4.6.1.2 näher dargestellt sind. Die Testauswertung durch ein Anfärben der Zellen erfolgt nach einer definierten Kultivierungszeit, wobei das korrekte visuelle Erfassen der Kolonien zu gewährleisten ist. Nach sieben Tagen besteht für die HT-29-Zellen eine gute Balance zwischen hinreichender Größe der Kolonien und ausreichendem Abstand zueinander zur Vermeidung eines Zusammenwachsens (Vgl. Abb. 4-42 B).

3.6.1.2 Stabilität von MGO im Inkubationsmedium

Die Kultivierung der Zellen erfolgt mit einem Nährmedium, das eine Mischung aus Salzen, Glucose, Aminosäuren und Vitaminen darstellt (*Boxberger, 2007*). Üblicherweise dient das Medium auch zum Lösen der zu prüfenden Substanzen und in der Folge zur Inkubation der Zellen. Aufgrund der bekannten Reaktivität von MGO wurde im Zuge der Untersuchungen auch die Stabilität der 1,2-Dicarbonylverbindung unter Testbedingungen analysiert. Hierzu wurden sowohl eine MGO-Standardlösung als auch ausgewählte Manuka-Honige in Nährmedium gelöst und analog den Testbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte inkubiert. Da eine Behandlung der Zellen mit Testsubstanz üblicherweise über bis zu 24 h oder sogar 48 h erfolgen kann, wurden den Testansätzen jeweils nach 8 h, 16 h und 24 h Aliquote entnommen und auf ihren Gehalt an MGO per RP-HPLC nach Derivatisierung mit OPD untersucht (Vgl. Kapitel 3.3.1).

In allen betrachteten Proben konnte ein genereller Abfall der MGO-Konzentration im Zuge der Inkubation beobachtet werden, welcher insbesondere nach 24 h sehr ausgeprägt war (Abb. 4-43). Bereits nach dem Lösen der Proben in Nährmedium, welches als Wert für den Inkubationsbeginn (0 h) herangezogen wurde, ist eine Differenz zum „Soll-Gehalt“ festzustellen. Daraus wird ersichtlich, dass es unmittelbar zu Abbau- bzw. Weiterreaktionen des MGO kommt. Hierbei sind insbesondere Reaktionen mit den im Medium enthaltenen Aminosäuren wahrscheinlich. Durch die anschließende Inkubation erfolgt eine weitere Senkung der MGO-Konzentration in den einzelnen Testansätzen. Das verbleibende MGO kann dabei einen „Rest-Gehalt“ widerspiegeln, welcher reversibel gebunden vorliegt (*Lo et al., 1994*).

Der Gehalt der Standardlösung war hierbei noch einer stärkeren Abnahme unterworfen als im Honig enthaltenes MGO. Dies weist auf eine Stabilisierung von MGO durch die Honigmatrix hin. Hierbei kann eine reversible Bindung an andere Inhaltsstoffe erfolgen, wodurch die Verfügbarkeit für einen „externen“ Abbau verringert wird. Zudem ist es möglich, dass unter Anwesenheit von Matrix zusätzlich darin enthaltene Zucker oder auch 3-DG mit Aminosäuren des Mediums reagieren, wodurch es zu einem etwas geringeren MGO-Abbau kommt. Darüber hinaus kann durch den Abbau von MGO eine zusätzliche Umsetzung von noch im Honig vorhandenem DHA provoziert werden, wobei hierfür eine untergeordnete Bedeutung anzunehmen ist. Ein ähnliches, jedoch deutlicher ausgeprägtes Verhalten wurde bereits im Zuge der mikrobiologischen Untersuchungen bei der Prüfung der Stabilität in Nährbouillon beobachtet, wobei eine Nachbildung von MGO in diesem Ausmaß nicht festgestellt wurde.

In der Konsequenz ist eine Inkubation über einen längeren Zeitraum in Nährmedium zur Beurteilung einer zytotoxischen Wirkung von MGO nicht sinnvoll. Zwar sind in einem solchen Testsystem ebenfalls variierende Effekte zu erwarten, aufgrund der beschriebenen Instabilität können diese aber nur anteilig mit dem enthaltenen MGO in Zusammenhang gebracht werden. In diesem Fall können vielmehr mögliche Folgeprodukte von MGO an einer zytotoxischen Wirkung beteiligt sein.

Um eine Prüfung von MGO dennoch mit dem in Kapitel 4.6.1.1 beschriebenen *in-vitro*-Testsystem zu ermöglichen, wurde alternativ eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) als Lösungsmittel für Honige und Standard herangezogen. Dadurch wurde eine deutlich verbesserte Stabilität der Testsubstanz MGO erreicht (Abb. 4-43). Der geringe MGO-Abbau in Puffer lässt sich auf die im Inkubator vorherrschenden Bedingungen wie die leicht erhöhte Temperatur von 37 °C zurückführen. So konnte bereits zuvor ein signifikanter Abbau des MGO in Manuka-Honig unter thermischer Behandlung verzeichnet werden (Vgl. Kapitel 4.3.3.1).

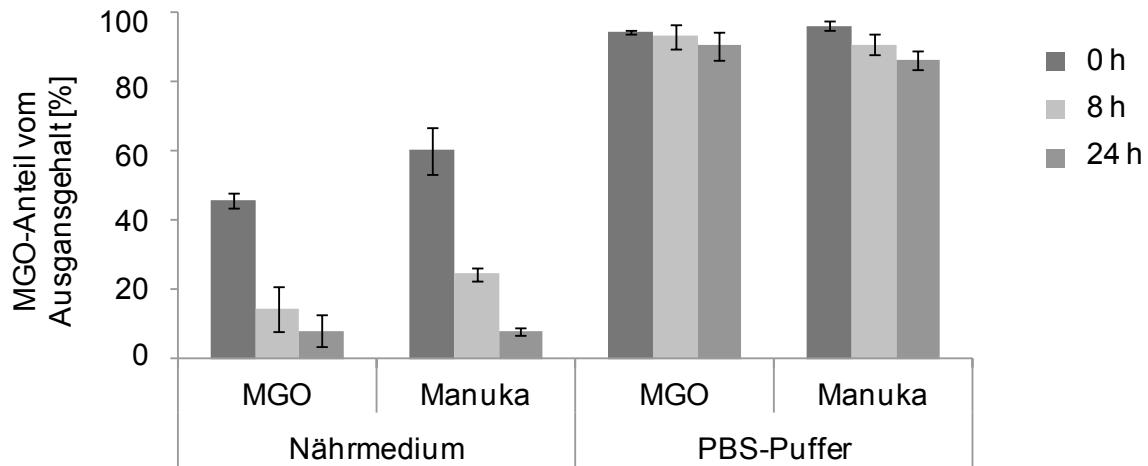


Abb. 4-43 Stabilität von MGO-Standard und MGO in Manuka-Honig in Nährmedium und PBS-Puffer (RP-HPLC nach Inkubation für 0 h, 8 h und 24 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte)

Trotz der höheren Stabilität des MGO, die durch ein Lösen in PBS-Puffer erreicht werden konnte, ist eine Inkubation der Zellen mit dieser Lösung über einen langen Zeitraum wie 24 h problematisch. Wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben wurde, benötigen isolierte Zellen zur erfolgreichen Kultivierung ein entsprechendes Milieu und relevante Nährstoffe. Durch einen Austausch von Nährmedium durch PBS-Puffer über den Inkubationszeitraum ist eine hinreichende Versorgung der Zellen gefährdet. Um dadurch resultierende potentielle Nebeneffekte auszuschließen und optimale Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten, wurde eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 1 h vorgenommen. Ein Vergleich von PBS-Puffer und Nährmedium bei einstündiger Behandlung der Zellen resultierte in einer äquivalenten Koloniebildung. Daraus lässt sich schließen, dass durch den PBS-Puffer keine zusätzliche Schädigung der Zellen erfolgt und er ein geeignetes Lösungsmittel darstellt.

3.6.2 Bestimmung des IC₅₀ von MGO und Vergleichsproben

Eine Einschätzung der zytotoxischen Wirkung einer Substanz kann anhand von Parametern wie dem IC₅₀ („inhibitory concentration“) erfolgen. Dieser Wert beschreibt die Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibierung der Zellen durch die Testsubstanz in Bezug auf die Kontrolle hervorgerufen wird. Mittels Koloniebildungstest wurde eine Abschätzung des IC₅₀ der Standardsubstanz MGO vorgenommen. Eine exakte Berechnung des IC₅₀ kann für die untersuchten Dicarbonylverbindungen nicht erfolgen, da hierfür weitere Daten für eine vollständige Inhibierungskurve von 0% bis 100% notwendig sind.

Die Inkubation der HT-29-Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.9.3 beschrieben mit PBS-Puffer für 1 h unter nachfolgender Kultivierung für sieben Tage und Anfärben mit Giemsa-Lösung. Die so erhaltenen Werte für die relative Anheftungseffizienz („relative plating efficiency“, rel. PE, Tab. 4-25) von MGO zeigen, dass durch den betrachteten Konzentra-

tionsbereich eine teilweise bis nahezu vollständige Inhibierung der Koloniebildungsfähigkeit erzielt wurde. Der IC_{50} kann aus den ermittelten Daten zu 0,7 mM MGO abgeschätzt werden (Vgl. Tab. 4-25).

Tab. 4-25 Koloniebildungsfähigkeit von MGO (rel. PE) als Standardlösung und in Kunsthonig (KH)

Konzentration [mM]	0,17	0,35	0,69	1,39	2,78
Rel. PE [%]					
MGO	72,6 ± 3,8	60,0 ± 2,4	51,6 ± 5,4	18,6 ± 4,5	2,3 ± 2,1
MGO in KH	86,4 ± 5,1	75,0 ± 3,2	60,0 ± 7,7	29,1 ± 2,6	2,3 ± 0,6

(Inkubation mit PBS-Puffer für 1 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte; Dreifachbestimmung)

Neben einem isolierten Einsatz als Standardsubstanz in PBS-Puffer wurde die zytotoxische Wirkung von MGO auch in Anwesenheit von Kunsthonig bestimmt. Dabei wurde in Analogie zu den nachfolgend dargestellten Honigproben eine 2%ige Kunsthoniglösung in PBS-Puffer mit variierenden MGO-Gehalten im Koloniebildungstest eingesetzt. In den erhaltenen Werten bestehen dabei nur geringe Unterschiede. Die rel. PE für MGO sind in Anwesenheit von Kunsthonig etwas größer als ohne Matrix, was auf eine etwas geringere Wachstumshemmung der Zellen hinweist.

Glucose und Fructose dienen den Zellen generell als Nährstoff, sodass dies als mögliche Erklärung für die etwas höheren Werte herangezogen werden kann. Allerdings ist durch eine alleinige Behandlung der HT-29-Zellen mit 2%iger Zuckerlösung ebenfalls eine Inhibierung der Koloniefähigkeit zu etwa 24% zu beobachten, die auf osmotische Effekte zurückzuführen ist. Bei der Analyse von MGO in Zuckermatrix ist demnach eine Verstärkung der beobachteten zytotoxischen Wirkungen zu erwarten. Die Ergebnisse lassen allerdings keinen additiven Effekt erkennen, sondern vielmehr eine leichte Abschwächung der Zytotoxizität des MGO. Dies kann durch Wechselwirkungen zwischen MGO und Glucose bzw. Fructose begründet sein. Im Zuge der Stabilitätsprüfungen wurde in Anwesenheit von Kunsthonig ein verringerter Abbau von MGO beobachtet. Wenn MGO für einen möglichen Abbau z.B. in Folge einer Immobilisierung in der Matrix nicht mehr verfügbar ist, kann auch ein Angreifen an die Zellwand im Rahmen der zytotoxischen Wirkung vermindert stattfinden, was sich in einer größeren Koloniebildung widerspiegelt. Dementgegen ist durch eine höhere Stabilität der Testsubstanz MGO in Anwesenheit von Zucker auch eine stärkere Wirkung aufgrund der dadurch höheren auf die Zellen einwirkenden Konzentration zu erwarten, welche jedoch durch die ermittelten Daten nicht aufgezeigt werden konnte.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die bereits in der Literatur beschriebene Zytotoxizität von MGO. Der IC_{50} von 0,7 mM bzw. 50,4 mg/l liegt dabei etwas höher als der von

Wieslander et al. (1995) bestimmte Wert (11,8 mg/l), aber ordnet sich zwischen den Daten von *Ayoub et al. (1993)* und *Milanesa et al. (2000)* ein. Ein direkter Vergleich ist hierbei nur eingeschränkt möglich, da Unterschiede auch auf die Wahl des Zellkultur-Testsystems zurückzuführen sind. In Abhängigkeit von der Methodik dienen verschiedene Endpunkte zur Detektion der zytotoxischen Wirkung einer Substanz. Folglich können aufgrund von Differenzen in der Wirkungsweise von zytotoxischen Verbindungen Variationen beim Vergleich unterschiedlicher Testbedingungen auftreten. Zudem ist die gewählte Zelllinie in der Diskussion von IC₅₀-Werten von Bedeutung, da Unterschiede in der Empfindlichkeit auf die Testsubstanz bestehen können.

Um den gemessenen IC₅₀ und auf diese Weise die zytotoxische Wirkung von MGO einordnen zu können, sollen neben dem Vergleich mit der Literatur noch weitere Substanzen in die Untersuchungen einbezogen werden. Hierzu kamen 3-DG als in Honigen verbreitete 1,2-Dicarbonylverbindung sowie Bisphenol A als typisches zytotoxisches Agens zum Einsatz. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl an Konzentrationsstufen sind diese vorrangig als orientierende Untersuchungen zu betrachten, die aber einen Vergleich der zytotoxischen Wirkung auf die HT-29-Zellen im Koloniebildungstest ermöglichen.

Die ermittelten Werte für Bisphenol A zeigen eine stärkere Inhibierung der HT-29-Zellen als für MGO auf (Tab. 4-26). Während für das Hervorrufen einer rel. PE von 50% eine Konzentration von 0,7 mM MGO notwendig ist, genügen für Bisphenol A weniger als 0,2 mM. Für 3-DG wurde ebenfalls eine zytotoxische Wirkung auf die HT-29-Zellen verzeichnet. Im Vergleich zu MGO fällt diese allerdings ein wenig schwächer aus, was auf die höhere Reaktivität der kurzkettigeren Verbindung zurückzuführen ist. Dies wird auch an den gemessenen Daten deutlich, aus denen sich eine etwa 50%ige Inhibierung bei der eingesetzten Konzentration von 0,9 mM ergibt (Vgl. Tab. 4-26), welche größer als der abgeschätzte IC₅₀ von MGO ist.

Tab. 4-26 Koloniebildungsfähigkeit von 3-DG und Bisphenol A (rel. PE)

Konzentration [mM]	0,09	0,18	0,23	0,35	0,90
Rel. PE [%]					
3-DG	-	-	57,5 ± 9,8	-	50,8 ± 1,1
Bisphenol A	42,4 ± 17,1	38,6 ± 1,1	-	30,3 ± 3,2	-

(Inkubation mit PBS-Puffer für 1 h bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte; Dreifachbestimmung)

3.6.3 Zytotoxische Wirkung von Manuka-Honig

3.6.3.1 Untersuchung von Honigproben mittels Koloniebildungstest

Zur Prüfung einer potentiellen zytotoxischen Wirkung von Manuka-Honig, welche aus den hohen Gehalten von MGO resultieren kann, wurden ausgewählte Honig-Proben als 2%ige Lösungen in PBS unter einstündiger Inkubation von HT-29-Zellen im Koloniebildungstest untersucht. Neben handelsüblichen Manuka-Honigen kamen hierbei auch weitere Nektar- und Honigtau-Honige zum Einsatz. Die Ergebnisse werden wiederum als rel. PE bezogen auf PBS-Puffer als Kontrolle angegeben (Abb. 4-44). Es wird ersichtlich, dass alle Honige unter den gewählten Bedingungen eine Inhibierung der Koloniebildung der HT-29-Zellen hervorrufen. Die stärkste Hemmung zeigte dabei ein Manuka-Honig der Klassifizierung MGO 550+. Die geringste Beeinträchtigung wurde von einem Rapshonig herbeigeführt.

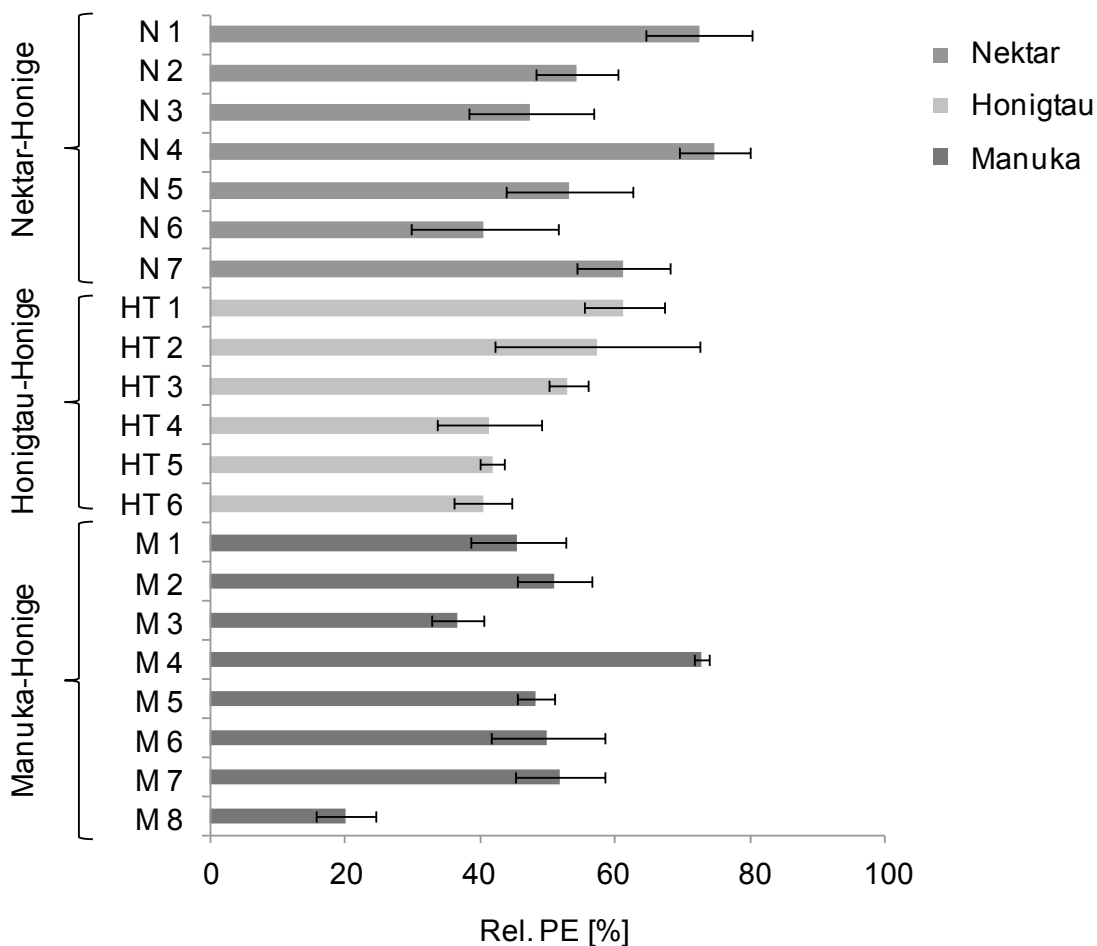


Abb. 4-44 Koloniebildungsfähigkeit (rel. PE) von Manuka, Nektar- und Honigtau-Honigen (N = Nektar-Honig, HT = Honigtau-Honig, M = Manuka-Honig)

Vergleichend wurde zusätzlich eine 2%ige Kunsthoniglösung bestehend aus Glucose und Fructose in für Honig typischen Konzentrationen in den Untersuchungen mitgeführt. Dabei konnte eine rel. PE von 76,3% ermittelt werden. Dies bedeutet, dass durch die gewählte

Probenkonzentration im Testsystem bereits eine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch die vorliegenden Zucker induziert wird. Da keine weiteren Substanzen zugesetzt wurden, ist die zu beobachtende Inhibierung von knapp 24% ausschließlich auf die hohe Zuckerkonzentration zurückzuführen. Dies lässt sich mit osmotischen Effekten begründen.

Einige Honige, wie z.B. N 1, N 4 oder M 1, unterscheiden sich in der bestimmten Koloniebildungsfähigkeit nicht wesentlich von Kunsthonig, sodass diese zytotoxische Wirkung hauptsächlich von den hohen Zuckerkonzentrationen ausgeht und die Minorkomponenten nur einen geringen Einfluss ausüben. Eine stärkere Inhibierung der Koloniebildung der HT-29-Zellen, wie sie durch die restlichen Honig-Proben hervorgerufen werden konnte, resultiert folglich aus der Anwesenheit weiterer zytotoxisch wirkender Substanzen, wie z.B. MGO in Manuka-Honig. Insbesondere ausgewählte Manuka- und Honigtau-Honige sind in der Lage eine vergleichsweise hohe Hemmung der Koloniebildung zu bewirken. Hierbei ist herauszustellen, dass Manuka-Honige keine generell stärkere Zytotoxizität als andere Honige aufweisen. Vielmehr besteht hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften von Manuka-Honig eine große Variation.

Diese Feststellung wird auch in der Zusammenfassung der erhaltenen Werte in Abb. 4-45 deutlich, wobei Manuka-Honig den untersuchten Nektar- und Honigtau-Honige gegenübergestellt ist. Die berechneten Medianwerte der gewählten Probengruppen unterscheiden sich zwar leicht, jedoch nicht signifikant. Andernfalls kann der Gruppe der betrachteten Honigtau-Honige die stärkste zytotoxische Wirkung zugeschrieben werden. Die im Vergleich deutlich größere Varianz in der Koloniebildungsfähigkeit der HT-29-Zellen nach Inkubation mit Manuka-Honig ist auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Minorverbindungen als potentiell verantwortliche Substanzen zurückzuführen. Des Weiteren sind konzentrationsabhängige Effekte einzelner Komponenten möglich.

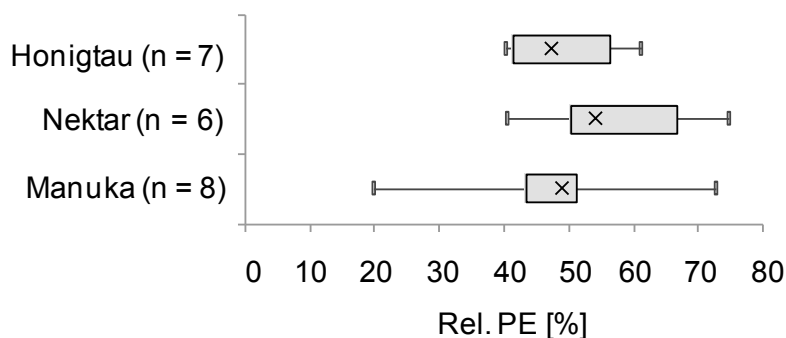


Abb. 4-45 Übersicht der Koloniebildungsfähigkeit (rel. PE) von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honige (Whiskers min/max, x = Medianwert)

3.6.3.2 Erklärungsansätze für die zytotoxische Wirkung von Honig

Da 1,2-Dicarbonylverbindungen unter den genutzten Testbedingungen eine zytotoxische Wirkung hervorrufen können (Vgl. Kapitel 4.6.2), ergibt sich die Schlussfolgerung, dass in Manuka-Honig vor allem MGO zur beobachteten Zytotoxizität beiträgt. Hierfür wurden die ermittelten rel. PE den MGO-Konzentrationen der untersuchten Honig-Proben gegenübergestellt (Abb. 4-46). Aus dieser Darstellung geht hervor, dass die stärkste zytotoxische Wirkung zwar mit dem höchsten Gehalt an MGO einhergeht, ansonsten aber kein direkter Zusammenhang beider Größen besteht. Werden die Honige mit einer rel. PE zwischen 40% und 60% betrachtet, ist die Inhibierung der Zellen unabhängig von der MGO-Konzentration. Daraus lässt sich schließen, dass MGO zwar an einer Veränderung der Zellen bei Inkubation mit Manuka-Honig beteiligt ist, aber nicht als allein verantwortlicher Faktor benannt werden kann.

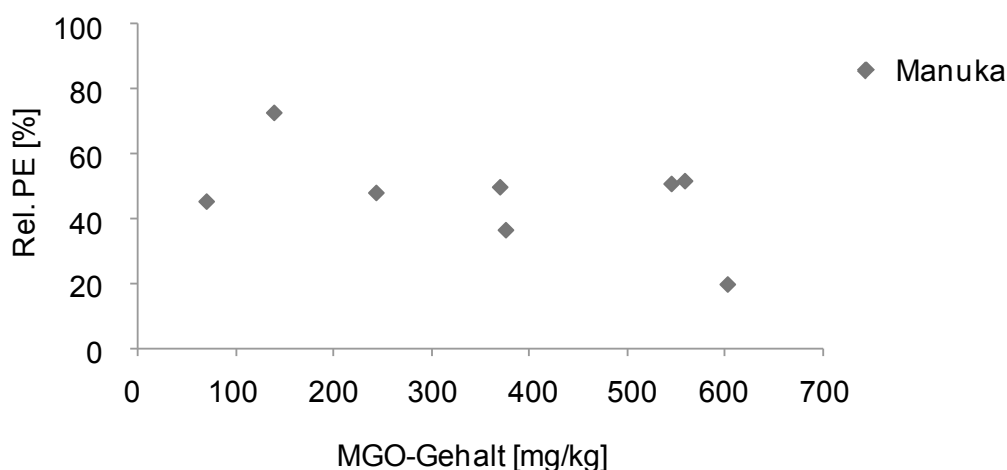


Abb. 4-46 Vergleich der bestimmten rel. PE von Manuka-Honig mit dem MGO-Gehalt

Auch unter Einbeziehen des 3-DG- und Gesamtphenolgehaltes als zusätzliche Parameter, lässt sich kein direkter Zusammenhang dieser Inhaltsstoffe zur beobachteten Zytotoxizität herstellen. Unter Berücksichtigung aller untersuchten Honige geht zwar eine niedrige Koloniebildung tendenziell mit einem hohen Gehalt an 3-DG und MGO einher, innerhalb der Probengruppen kann jedoch keine Abhängigkeit der Größen zueinander beschrieben werden (Abb. 4-47). Auch zum Gesamtphenolgehalt ist, mit Ausnahme der Nektar-Honige, lediglich eine Tendenz zu diskutieren (Abb. 4-48). Auch wenn kein Zusammenhang der rel. PE zum Gesamtphenolgehalt besteht, können Einzelsubstanzen einen entscheidenden Beitrag liefern. Innerhalb der phenolischen Verbindungen existieren große Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung, sodass konzentrationsabhängige Effekte einzelner Substanzen im Koloniebildungstest vorliegen können, die sich jedoch nicht im Gesamtphenolgehalt widerspiegeln. Hierzu ist eine fortführende Analyse der Substanzklasse notwendig, um relevante Einzelverbindungen zu identifizieren.

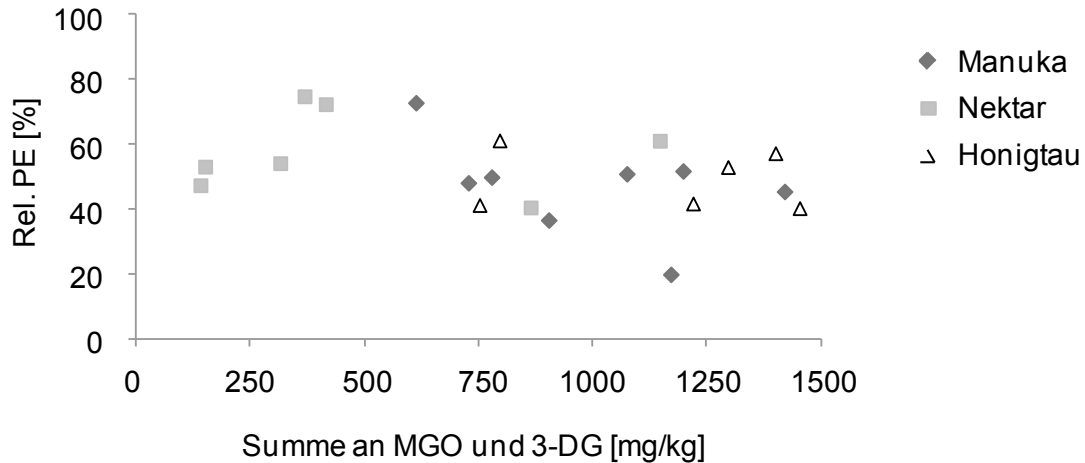


Abb. 4-47 Vergleich der rel. PE von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen mit dem Gehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen

Demnach sind die in Honig enthaltenen 1,2-Dicarbonylverbindungen und phenolischen Komponenten durch ihr zytotoxisches Potential in der Lage, einen Beitrag zu einer inhibierenden Wirkung auf das Wachstum und die Proliferation von Zellen zu liefern. Anhand der untersuchten Proben kann jedoch keine direkte Korrelation zur zytotoxischen Wirkung aufgezeigt werden. Die Zytotoxizität liegt folglich in der komplexen Zusammensetzung der Minorbestandteile in Honig begründet, wodurch eine vollständige Aufklärung durch die betrachteten Faktoren nicht gelingt.

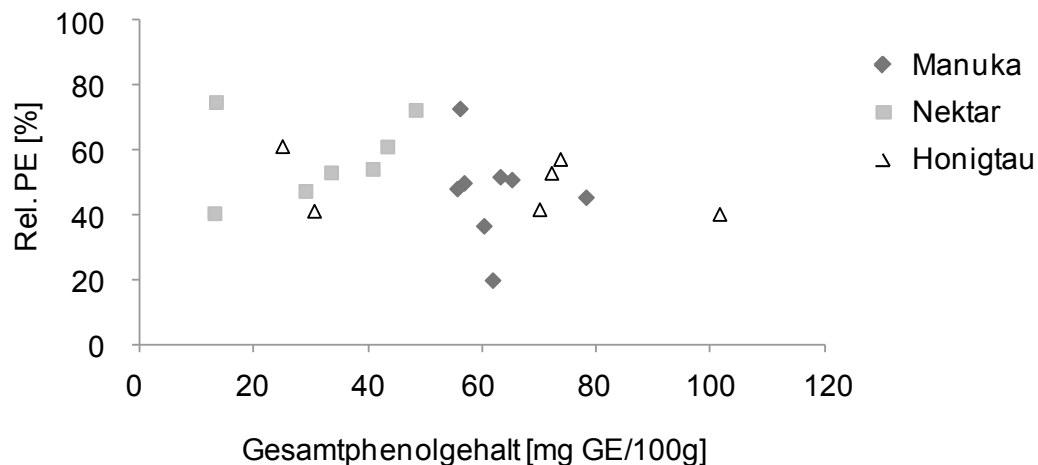


Abb. 4-48 Vergleich der rel. PE von Manuka-, Nektar- und Honigtau-Honigen mit dem Gesamtphenolgehalt

Darüber hinaus können weitere Verbindungen des Zuckerabbaus beteiligt sein. DHA als für Manuka-Honig ebenfalls charakteristische Verbindung neben MGO wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen, stellt aufgrund der Reaktivität gegenüber Aminosäureseitenketten von Proteinen einen möglichen Einflussfaktor dar. Gegen einen relevanten Beitrag

spricht jedoch, dass „ausgereiften“ Manuka-Honigen zum Koloniebildungstest eingesetzt wurden, welche ein gleichbleibendes Verhältnis von DHA zu MGO von etwa 2:1 aufweisen. Demnach geht aus einer Gegenüberstellung von rel. PE und DHA-Gehalt ein ähnliches Ergebnis, wie in Abb. 4-46 dargestellt, hervor. Zudem ist DHA bislang nicht als zytotoxisches Agens in der Literatur bekannt. Eine Reaktion mit Aminokomponenten der Haut nach Anwendung von kosmetischen Produkten mit DHA gilt hierbei als nicht-toxisch (*Burkhart & Bukhart, 2009*). Darüber hinaus können jedoch mögliche Folgeprodukte von MGO oder DHA einen Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften von Honig ausüben.

Eine weitere in diesem Kontext relevante Verbindung ist 3,4-Didesoxyglucoson-3-en (3,4-DGE). Durch *Linden et al. (2002)* erfolgte die Einstufung von 3,4-DGE als das Glucoseabbauprodukt mit der höchsten Zytotoxizität, welches bislang in Peritoneal-Dialyse-Flüssigkeiten identifiziert wurde. Als Intermediat in der HMF-Bildung steht es mit seinem Vorläufer 3-DG in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht (*Ortiz et al., 2006*). Ein Nachweis von 3,4-DGE in Honig ist durch *Marceau & Yaylayan (2009)* beschrieben. Auch wenn hierbei noch keine konkreten Konzentrationen bestimmt wurden, wiesen die Autoren Manuka-Honig sowohl die höchste Menge an 3-DG und MGO als auch an 3,4-DGE zu.

Ein Beitrag dieser Verbindung zur zytotoxischen Wirkung ausgewählter Honige kommt demnach in Betracht. Erste Hinweise darauf wurden auch in Bezug auf die vorliegenden Honige erhalten. Hierfür wurde eine 3,4-DGE-Lösung nach den Angaben von *Frischmann et al. (2008)* synthetisiert und nach OPD-Derivatisierung per RP-HPLC analysiert (Abb. 4-49). Der Peak bei ca. 14 min zeigte bei einer Wellenlänge von 334 nm eine höhere Intensität als bei 312 nm (Abb. 4-49). Im Gegensatz zu anderen 1,2-Dicarbonylverbindungen ist dieses Verhalten für 3,4-DGE charakteristisch (*Frischmann et al., 2008*).

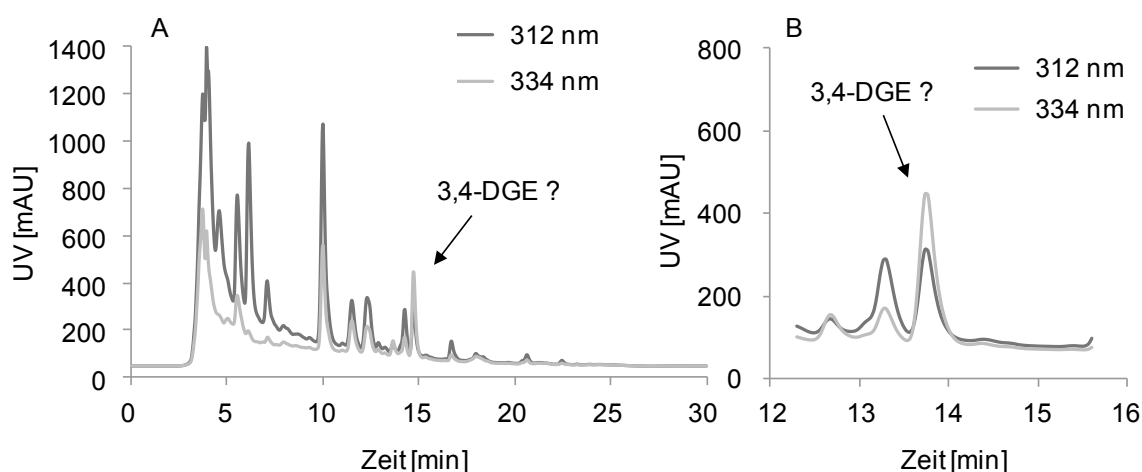


Abb. 4-49 RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung einer erhitzten Glucose-Lösung zur Synthese von 3,4-DGE nach *Frischmann et al. (2008)*
A) vollständige Ansicht und B) Detailansicht; UV-Detektion bei 312 und 334 nm

Eine Untersuchung mit LC-MS ergab eine Massezahl m/z für $[MH]^+$ von 217, was mit den Angaben von *Frischmann et al. (2008)* sowie *Marceau & Yaylayan (2009)* überein stimmt und folglich einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen von 3,4-DGE liefert. Eine eindeutige Identifizierung oder Isolierung eines 3,4-DGE-Standards, beispielsweise aus der underivatisierten Syntheselösung nach den Angaben von *Linden et al. (2002)*, konnte im Rahmen der Untersuchungen noch nicht realisiert werden. Allerdings konnte im Folgenden auch in den Chromatogrammen ausgewählter Honige der potentielle 3,4-DGE-Peak bei etwa 14 min detektiert werden (Abb. 4-50). Im Gegensatz zu *Marceau & Yaylayan (2009)* ist 3,4-DGE somit nicht nur für Manuka-Honige, sondern auch für Honigtau-Honige von Bedeutung. Dies kann in der Folge als Erklärung für die erhöhte zytotoxische Wirkung beider Honiggruppen (Vgl. Kapitel 4.6.3.1) dienen.

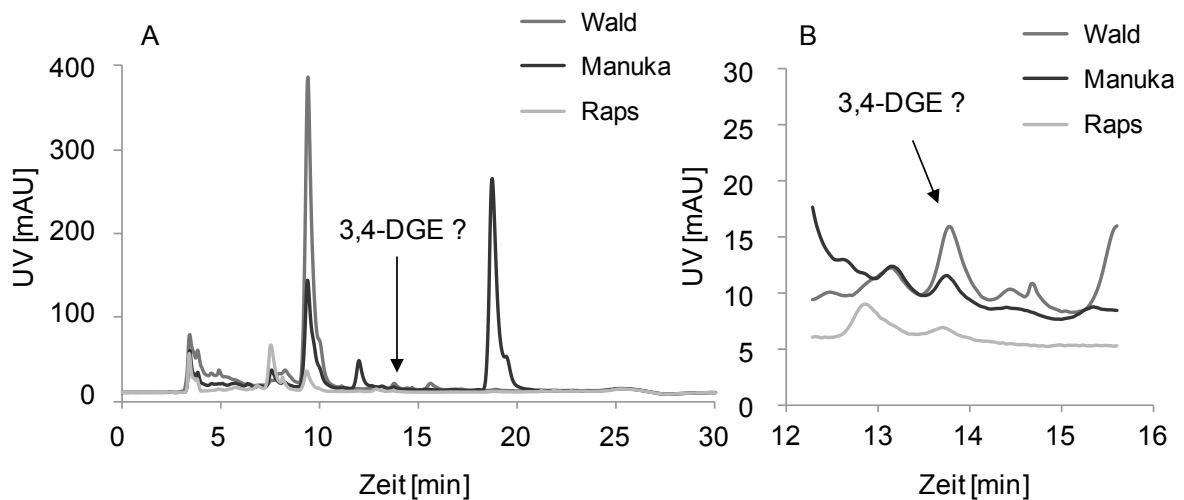


Abb. 4-50 RP-HPLC nach OPD-Derivatisierung von Wald-, Manuka- und Raps-Honig
A) vollständige Ansicht und B) Detailansicht; Detektion bei 334 nm

3.6.3.3 Beurteilung der Zytotoxizität von Honig

Es konnte gezeigt werden, dass alle analysierten Honigproben eine Hemmung der Koloniebildung induzieren konnten. Dabei unterscheiden sich Manuka-Honige im Durchschnitt nicht wesentlich von anderen Sorten, wie in Kapitel 4.6.3.1 dargelegt wurde. In Folge dieser Ergebnisse ist Manuka-Honig nicht als besonders zytotoxisch zu bewerten. Potentielle Diskussionen hinsichtlich einer Gefährdung durch den Verzehr von Manuka-Honig aufgrund des „toxischen“ Inhaltsstoffes MGO sind demnach nicht haltbar, da durch andere Honigproben unter den gewählten Testbedingungen analoge Wirkungen auf die gewählte Zelllinie beobachtet wurden. Daraus wird ersichtlich, dass eine Vielzahl an Verbindungen für diese zytotoxischen Eigenschaften verantwortlich gemacht werden kann und die zu beobachtende Wirkungen nicht auf einen Inhaltsstoff zurückführbar sind.

Im Zusammenhang mit zytotoxischen Eigenschaften ergibt sich auch die Diskussion um eine mögliche Antitumor-Wirkung. Da zur Durchführung von Zellkulturmethoden meist Tumorzelllinien zum Einsatz kommen, kann deren Wachstumshemmung durch gewählte Testsubstanzen als etwaiges antikanzerogenes Potential verstanden werden. Da anhand der erzielten Resultate für Manuka-Honige ein derartiger Effekt in Betracht gezogen werden kann, stellt sich die Frage, inwieweit eine medizinische Anwendung in Analogie zur antibakteriellen Wirkung möglich ist. In Bezug auf diesen Aspekt ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass Manuka-Honig keine stärkere Inhibierung der Koloniebildungsfähigkeit von Darmtumorzellen zugeschrieben werden können als anderen Honigsorten. Demnach ist für ausgewählte Honigtau-Honige eine entsprechende Verwendung aufgrund dieser Wirkung gleichermaßen in Erwägung zu ziehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind hierfür durch weitere Untersuchungen zu ergänzen, da ausschließlich ein Zellkulturmodell ausgewählt wurde. Für umfangreichere Aussagen ist das Einbeziehen anderer Zelllinien oder eines weiteren Testsystems hilfreich. Hinzu kommt, dass die Bewertung von potentiellen antikanzerogenen Eigenschaften von Manuka-Honig bzw. anderen Honig-Proben nur durch die Inkubation von Normalzelllinien erfolgen kann, auf welche keine inhibierende Wirkung bestehen sollte. Hierfür kann die Anwendung eines Modellsystems auf der Basis einer Normalzelllinie, welche in einem separaten Schritt spezifisch tumorgenisiert wird, einen direkten Vergleich der Zytotoxizität einer Substanz ermöglichen. Andernfalls können vergleichbare Zelllinien, beispielsweise aus analogen Kompartimenten des Körpers, hinsichtlich einer Wirkung beurteilt werden.

Wenngleich ein direkter Einsatz von Manuka-Honig als Antitumor-Mittel derzeit nicht wahrscheinlich ist, so kann ein Eingang in Behandlungsmethoden dennoch nicht ausgeschlossen werden. Neben der eigentlichen Krebstherapie verfolgen neue Strategien bereits eine Störung der Entstehung und des Wachstums des Tumors. Hierbei sollen für die Karzinogenese relevante Substanzen bzw. Enzyme inhibiert werden. Beispielhaft angeführt sei der Einsatz von Proteaseinhibitoren, welche sich als effektives Mittel in verschiedenen Testsystemen zeigten. Auch Honig konnte bereits eine hemmende Wirkung auf die Proteaseaktivität von Leberkrebszellen (Hep-G2) zugeschrieben werden (*Abdel-Aziz et al., 2009*), ohne diesen Effekt konkreten Inhaltsstoffen zuzuordnen. Hierbei ist für MGO und andere 1,2-Dicarbonylverbindungen zu erwarten, dass sie durch ihre Reaktivität gegenüber Proteinen ebenfalls eine Inaktivierung von Proteasen induzieren. In der Folge können Manuka-Honige aufgrund ihrer hohen Konzentrationen an MGO als potentielle Inhibitoren diskutiert werden und zu bestehenden Behandlungsmethoden und Präventionsmaßnahmen unterstützend beitragen.

3.7 Konsequenzen der chemischen und biofunktionellen Eigenschaften von Manuka-Honig für dieses Lebensmittel

3.7.1 Charakterisierung, Deklaration und Nachweis von Manuka-Honig

Die von *Mavric et al. (2008)* ermittelten hohen MGO-Konzentrationen in Manuka-Honig wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Darüber hinaus konnte DHA, welches parallel durch *Adams et al. (2009)* als Precursor für die MGO-Bildung identifiziert wurde, als weitere für Manuka-Honig charakteristische Komponente beschrieben werden. Es ist dabei nicht nur in frischen, sondern auch in „ausgereiften“ Honigen in hohen Konzentrationen detektierbar, wobei ein DHA-MGO-Verhältnis von 2:1 festgestellt wurde. In Bezug auf weitere Parameter wurden hingegen keine grundlegenden Abweichungen zu anderen Sorten beobachtet. So ist Manuka-Honig eine hell- bis dunkelbraune Sorte mit einem durchschnittlichen Anteil an Fructose und Glucose, jedoch vergleichsweise hohem Gehalt an Wasser, Proteinen, Aminosäuren und phenolischen Verbindungen. Er ist dabei eher den Nektarhonigen zuzuordnen, doch ein Beitrag von Honigtau ist aufgrund des hohen Anteils phenolischer Minorkomponenten gegeben. Zudem ist eine große Variation in den Werten der Lagerungsparameter HMF-Gehalt und DZ festzustellen, welche durch die Zusammensetzung der Honigmatrix selbst beeinflusst wird.

Diese Charakterisierung von Manuka-Honig birgt verschiedene Konsequenzen, was die Deklaration, aber auch die eindeutige Identifizierung betrifft. Eine Klassifizierung dieser Honigsorte wurde bislang mit dem UMF als Maß für die antibakterielle Aktivität vorgenommen. Da der MGO-Gehalt direkt mit der antibakteriellen Wirkung korreliert (Vgl. Kapitel 4.4.2.3), kann eine Einteilung der Manuka-Honige auch anhand dieses Faktors erfolgen. Die MGO-Analyse per RP-HPLC weist dabei methodische Vorteile in Bezug auf Richtigkeit und Präzision gegenüber der mikrobiologischen UMF-Bestimmung auf. Eine Klassifizierung der Manuka-Honige nach MGO hat bereits erfolgreich Eingang in die Praxis gefunden (*manukahealth.co.nz*). Die Kennzeichnung reicht dabei vom Label MGO[®] 30 bis hin zu MGO[®] 550+ und gibt die Mindestmenge an MGO im Honig an.

Da ein höherer MGO-Gehalt hierbei jedoch auch mit einem höheren Preis des Produkts einhergeht und folglich die Gefahr des Verfälschens durch Zusatz dieser Substanz gegeben ist, ergibt sich die Notwendigkeit einer eindeutigen Nachweismöglichkeit. MGO und DHA sind vergleichsweise günstige und einfach zu erwerbende Chemikalien. Bei Zusatz von DHA zu einem Honig wird sich auf Basis der durchgeführten Dotierungsexperimente eine analoge MGO-Bildung unter Ausbildung eines DHA-zu-MGO-Verhältnisses von 2:1 vollziehen. In der Folge dient dies zwar als Charakteristik von Manuka-Honig zur Abgrenzung von anderen Sorten, lässt jedoch keine potentielle Verfälschung sichtbar werden.

Einen Lösungsansatz bietet dabei möglicherweise die ^{13}C -Isotopen-Massenspektrometrie, welche bereits zum Nachweis eines Zuckerzusatzes bzw. von Zufütterungshonig eingesetzt wird. Die Grundlage bildet dabei der Anteil am ^{13}C -Isotop im Lebensmittel, der für die Herkunft typisch ist. Dies ist auch vom Photosynthesetyp der Pflanzen abhängig, sodass eine Unterscheidung zwischen Produkten von sog. C_3 - und C_4 -Pflanzen, z.B. Honig und Zucker, möglich ist (*Winkler & Schmidt, 1980*). Eine Differenzierung von zugesetztem und natürlicherweise enthaltenem MGO kann hierbei auf ähnliche Weise möglich sein. Einen alternativen Lösungsweg bieten weitere typische Verbindungen, beispielsweise aus der Klasse der Flavonoide und Phenolcarbonsäuren. So diskutieren *Kato et al. (2012)* bzw. *Oelschlaegel et al. (2012)* die Substanzen Leptosin, Kojisäure und 2-Methoxybenzoesäure als mögliche Markerverbindung für *Leptospermum*-Honige. Zuvor wurden bereits Methylsyringat (*Weston et al., 2000*) und Abscisinsäure (*Yao et al., 2003*) ein mögliches Potential zur Abgrenzung von Manuka-Honig zu anderen Honigsorten zugesprochen.

Die Problematik der rechtlichen Beurteilung von Manuka-Honig wurde in Kapitel 4.3.4 diskutiert. Eine generelle Anwendbarkeit der bestehenden Normen kann hierbei bestätigt werden. Ein fester Grenzwert für eine Vielzahl verschiedener Honigmatrizes ist allerdings nur teilweise geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass zum Einen eine sortenspezifische Variation besteht und zum Anderen Einflüsse durch weitere Inhaltsstoffe während der Lagerungsprozesse bestehen. Konkret für Manuka-Honig ergeben sich als Ansatzpunkte, in eine Beurteilung ggf. weitere Faktoren, z.B. den Gehalt an DHA oder Folgeprodukten wie MG-H1, einfließen zu lassen.

3.7.2 Gesundheitlicher Nutzen durch Manuka-Honig?

Honig gilt seit jeher als altbewährtes Hausmittel. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellt sich jedoch die Frage, ob dem neuseeländischen Manuka-Honig hierbei eine gesonderte Rolle zuzuschreiben ist und durch den Verzehr oder eine medizinische Anwendung dieses Lebensmittels ein gesundheitlicher Nutzen für den Verbraucher erzielt werden kann.

Die Maori nutzten die Manuka-Pflanze bereits seit Jahrhunderten aufgrund ihrer heilenden Wirkung für verschiedene Zubereitungen zur Behandlung von Entzündungen oder Verletzungen (*Carr, 1998*). Der wissenschaftliche Beleg der dabei zugrunde liegenden antibakteriellen und entzündungshemmenden Eigenschaften konnte am Beispiel von Manuka-Honig und -Öl durch eine Vielzahl von Studien erbracht werden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Wirkung von MGO als verantwortliche Komponente von Manuka-Honig gegenüber klinisch relevanten Bakterienstämmen. Eine medizinische, topische Anwendung als ergänzendes Agens in geeigneter Matrix ist dabei aufgrund der zu beobachtenden Hemmeffekte möglich. Für medizinischen Honig mit MGO sind bekanntlich positive Effekte für die Wundheilung in einer Reihe von Untersuchungen und klinischen Studien

dokumentiert (*Lusby, 2002, Molan, 2006; Robson et al., 2008; Simon et al., 2009*). Dieser wird aus *Leptospermum*-Honig, in der Regel Manuka-Honig, gewonnen und einer Filtration und Gammsterilisation unterzogen. Von einem eventuellen „Haushaltsgebrauch“ von Honig zur Behandlung von Verletzungen ist allerdings abzuraten, da es sich um kein steriles Produkt handelt.

Entgegen der Nutzung des Honigs aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften ist ein potentieller Einsatz als „Antikancerogen“ auf Basis der bisherigen Daten nicht relevant. MGO wird zuweilen sowohl mit einem kanzerogenen als auch antikanzerogenen Potential in Verbindung gebracht. Hierbei wurde aus den Ergebnissen deutlich, dass eine zytotoxische Wirkung auf ausgewählte Zellen vorliegt, welche jedoch geringer ist als andere typische Substanzen wie z.B. Bisphenol A. Eine Aussage, inwieweit dies eine spezifische Wirkung auf Tumorzellen darstellt, ist nicht möglich. Die zytotoxischen Untersuchungen von Honig bestätigen dies, da für Manuka-Honige keine höhere Wachstumshemmung als für andere Sortenhonige auf die im Testsystem eingesetzten Zellen beobachtet wurde. Das bedeutet aber auch, dass eine Titulierung von Manuka-Honig als potentiell „toxischer Honig“ aufgrund des darin enthaltenen MGO nicht gerechtfertigt ist. Andernfalls ist für ausgewählte Honigtau-Honige ebenfalls eine Risikobewertung vorzunehmen. Die Studie von *Wallace et al. (2010)* bewertet den Verzehr von Manuka-Honig ebenfalls als „sicher“.

Neben einer zunehmenden Bedeutung von Manuka-Honig für eine mögliche medizinische Anwendung stellt der Verzehr dieses Nahrungsmittels die maßgebliche Nutzung dar. Auf den Etiketten finden sich dabei bereits Hinweise auf eine Förderung des Wohlbefindens durch einen regelmäßigen Konsum (*manukahealth.co.nz, www.comvita.com*). Solche Auslobungen sind nur schwierig an einzelnen Effekten festzumachen, doch es kann hinterfragt werden, ob durch einen durchschnittlichen Verzehr wirklich ein Einfluss möglich ist.

Unter der Annahme einer täglichen Zufuhrmenge an Manuka-Honig von 10 bis 20 g, was etwa einem Teelöffel oder dem Belag eines Frühstücksbrottes entspricht, nimmt der Konsument bei einem hohen MGO-Gehalt des Honigs von 550 mg/kg zwischen 5,5 und 11 mg dieser Substanz zu sich. Weiter vorausgesetzt, dass es ungehindert zur direkten Aufnahme in den menschlichen Körper kommt, ist die Konzentration an MGO durch die dabei stattfindende Verdünnung mit körpereigenen Flüssigkeiten letztlich nur gering. Aufgrund der Reaktivität der Substanz ist darüber hinaus zu erwarten, dass es zur Reaktion mit Proteinen bzw. Aminosäuren anderer Nahrungsbestandteile oder von Membranen kommt. Untersuchungen von *Degen et al. (2012b)* haben gezeigt, dass MGO im Zuge einer simulierten Verdauung im Magentrakt noch hinreichend stabil vorliegt, nach der Darmpassage aber weitgehend abgebaut wurde. So ist auch eine verringerte Wirkung von Manuka-Honig unter simulierten Bedingungen des Gastrointestinaltrakts, wie sie *Lin (2010)* beobachtete, zu erklären.

Dies lässt die Folgerung zu, dass z.B. eine antibakterielle oder gar zytotoxische Wirkung von in Manuka-Honig enthaltenem MGO nach einer oralen Aufnahme nur in den oberen Segmenten des Gastrointestinaltraktes zur Geltung kommen kann. Ein markanter Einfluss auf Bakterien oder Zellen im Bereich des Darms ist hingegen nicht zu erwarten, auch wenn dieser von *Rosendale et al. (2008)* postuliert wurde. Die Autoren konnten hierbei *in vitro* eine dosisabhängige Zunahme an Probiotika und Abnahme an pathogenen Darmbakterien durch Manuka-Honig beobachten. *Lin (2010)* hingegen folgert, dass eine Heilung einer Mageninfektion durch geringe Mengen an Manuka-Honig in kurzer Zeit nicht wahrscheinlich ist, auch wenn eine solche Behandlung dennoch Vorteile gegenüber traditionellen Methoden aufweist. Eine Hemmung von *Helicobacter pylori* im Zuge von Infektionen des Gastrointestinaltrakts wird für Manuka-Honig ebenfalls diskutiert (*Al Somal et al., 1994*) und kann auf Grundlage der Erkenntnisse nicht ausgeschlossen werden, bedarf jedoch fortführender Untersuchungen. Eine solche Aktivität wird dabei Honigen aus Südafrika ebenso zugeschrieben (*Manyi-Loh et al., 2010*).

Demzufolge kann dem Verzehr von Manuka-Honig allerdings ein positiver Effekt in der Behandlung von Halsentzündungen im Zuge von Erkältungskrankheiten anerkannt werden, wozu er in der Volksheilkunde bereits eingesetzt wird (*Molan, 1998*). Auch pathogene Bakterien im Mund können auf diese Weise reduziert werden (*Badet & Quero, 2011*). Zusätzlich ist ein präventiver bzw. therapeutischer Nutzen von Honig für Entzündungen im Mundraum wie z.B. Mukositis möglich (*Khanal et al., 2010*).

Hinsichtlich der antioxidativen Eigenschaften von Manuka-Honig ist eine „echte“ Wirkung hingegen nicht zu vermuten. Die bestimmte antioxidative Kapazität erscheint im Vergleich zu Vitaminen oder auch anderen Lebensmitteln zu gering, um einen signifikanten Einfluss ausüben zu können. Dementgegen werden Honig und insbesondere den darin enthaltenen phenolischen Komponenten ein präventiver Effekt aufgrund des antioxidativen Potentials bei verschiedenen Leiden, wie z.B. Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Infektionen, oder gegen Alterung zugeschrieben (*Khalil et al., 2010*). So können diese Verbindungen des Honigs z.B. Zellfunktionen in Erythrozyten vor oxidativem Stress schützen (*Alvarez-Suarez et al., 2012*).

Neben der Nutzung als Nahrungs- oder Heilmittel spielt Honig seit jeher auch eine gewisse Rolle als Zusatz zu kosmetischen Mitteln. Hierbei erfolgt ein Einsatz z.B. zum Erzielen einer antibakteriellen oder antioxidativen Wirkung, sowohl auf und in der Haut als auch im Kosmetikum selbst. Manuka-Honig mit einem hohen MGO-Gehalt könnte dabei einen inhibierenden Effekt auf Bakterien ausüben. Aber durch die üblicherweise sehr niedrigen Einsatzkonzentrationen von Honig in kosmetischen Formulierungen ist eine adäquate Wirkung im Vergleich zu gängigen Zusatzstoffen nicht wahrscheinlich.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die weitere Aufklärung und Charakterisierung des Ursprungs und der Bildung des in Manuka-Honig enthaltenen MGO. Es stellte sich die Frage, warum MGO einen natürlichen Honigbestandteil darstellt, inwieweit die Bildung auf einer enzymatischen oder mikrobiellen Grundlage basiert und ob sie durch äußere Faktoren beeinflusst wird. In die Betrachtungen wurde auch der Gehalt an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) als Lagerungsparameter einbezogen. Auf Grundlage dieser molekularen Aspekte sollte der Bezug zu einer möglichen Biofunktionalität erfolgen. Es galt zu klären, welche antimikrobiellen, antioxidativen und zytotoxischen Wirkungen im Vergleich zu anderen Honigen *in vitro* bestimmbar sind und in welchem Maße sie mit der Zusammensetzung und insbesondere dem MGO-Gehalt in Verbindung gebracht werden können.

Analytische Charakterisierung

1 Bei der Lagerung frischer Manuka-Honige kommt es zu einem markanten Anstieg der MGO-Konzentration. Die Bildung ist dabei zu Beginn sehr stark ausgeprägt und nähert sich während einer Langzeitlagerung einem Plateau an. An diesem Punkt kann der Honig in Bezug auf den MGO-Gehalt als „ausgereift“ betrachtet werden. Eine weitere MGO-Nachbildung ist nicht zu induzieren, vielmehr kommt es zu beginnenden Abbaureaktionen. Direkter Precursor ist die Verbindung DHA, welche im Zuge der Honigreifung zu MGO umgesetzt wird.

2 Zur Bestimmung von DHA in Honig konnte eine RP-HPLC-Methode basierend auf einer Vorsäulen-Derivatisierung mit OPD und UV-Detektion erfolgreich etabliert werden. Das dabei entstehende DHA-OPD-Derivat wurde eindeutig als 2-Hydroxymethylchinoxalin identifiziert, wobei ein möglicher Reaktionsmechanismus aufgezeigt wurde. Optimale Bedingungen stellen eine Probenaufarbeitung mit Acetatpuffer (0,5 M; pH 4,0) und anschließender OPD-Derivatisierung für 16 h bei 37 °C dar. Eine sichere Quantifizierung wurde mittels Standardaddition realisiert und erfolgreich validiert.

3 DHA und MGO wurden sowohl in frischen als auch in kommerziellen Manuka-Honigen in vergleichsweise hohen Mengen quantifiziert. In frischen Honigen variierten die DHA-Gehalte dabei zwischen 600 und 2700 mg/kg, wohingegen MGO in Konzentrationen von 50 bis 250 mg/kg ermittelt wurde. In kommerziellen Proben, welche als „ausgereift“ anzusehen sind, beliefen sich die MGO-Gehalte auf 40 bis 700 mg/kg, während DHA im Bereich von 60 bis 1600 mg/kg bestimmt wurde. Es ergibt sich eine gute lineare Korrelation zwischen den Carbonylverbindungen, die mit einem mittleren DHA-MGO-Verhältnis von 2:1 beschrieben werden kann. In frischen Proben liegen die Relationen zwischen 7:1

und 16:1, nähern sich in der Lagerung jedoch dem Verhältnis von 2:1 an, wodurch eine Einteilung nach „Reifegrad“ möglich ist. DHA und MGO lassen sich als typische Komponenten von Manuka-Honig charakterisieren, wobei das Verhältnis zueinander als Qualitätsparameter dienen kann. Honige anderer botanischer Herkunft weisen kein DHA oberhalb der Bestimmungsgrenze sowie nur geringe Mengen MGO auf.

4 Die zur Verfügung stehenden Manuka-Honige wurden hinsichtlich der Gehalte an Wasser, Fructose, Glucose, Proteinen, freier Aminosäuren, phenolischer Verbindungen sowie der Parameter pH-Wert und Honigfarbe analysiert. Dabei kann diese Sorte im Allgemeinen als hell- bis dunkelbrauner Honig beschrieben werden, der sich durch vergleichsweise hohe Mengen an Proteinen und freien Aminosäuren sowie einen hohen Gesamtphenolgehalt auszeichnet. Zudem konnte ein signifikant höherer Wassergehalt im Vergleich zu mitgeführten Honigen anderer botanischer Herkunft ermittelt werden.

5 Die Umsetzung von DHA zu MGO in der Honigmatrix wurde durch Dotierung von DHA-freien Honigsorten mit dieser Substanz und anschließender Lagerung untersucht. Hierbei war eine Varianz in der MGO-Bildung in den verschiedenen Proben feststellbar. Durch Einbeziehen weiterer Parameter wie z.B. pH-Wert, Wasser- oder Proteingehalt wurde deutlich, dass die Konzentration an DHA im Honig zwar den wesentlichen Faktor für den resultierenden MGO-Gehalt darstellt, die Umsetzung jedoch auch durch Unterschiede in der Honigmatrix beeinflusst wird. Hierbei kann jedoch keine Korrelation zu einzelnen Parametern herausgestellt werden.

6 Frische Manuka-Honige zeichnen sich in Analogie zu anderen frischgewonnenen Honigen durch einen sehr geringen Gehalt an HMF aus, welcher während der Lagerung stark ansteigen kann. In handelsüblichen Manuka-Honigen ergeben sich daher große Unterschiede in den bestimmmbaren Konzentrationen von 3 bis 75 mg/kg. Anhand von Dotierungs- und Lagerexperimenten mit Kunsthonigmatrix und ausgewählten Honigen konnte ein Einfluss der freien Aminosäuren und des DHA auf die Bildung von HMF aufgezeigt werden. In der Folge kann von einer honigspezifischen Beeinflussung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung ausgegangen werden.

7 Hinsichtlich der Enzymaktivitäten konnten für Manuka-Honig Diastasezahlen (DZ) im Bereich 1,5 bis 24,0 ermittelt werden. Im Vergleich zu anderen Honigsorten zeichnet sich Manuka-Honig demnach durch eher niedrige bis mittlere DZ aus. Da frische, nachweislich unbehandelte Proben ebenfalls geringe Werte aufweisen können, ist dies nicht auf eine unsachgemäße Behandlung oder Erhitzung zurückzuführen. Neben der natürlichen Variation der DZ in den frischen Honigen, kann ein zusätzlicher Einfluss von DHA diskutiert werden. Durchgeführte Dotierungsversuche lassen ein stärkeres Absinken der DZ bei der Lagerung unter Anwesenheit von DHA erkennen, dessen Ursache ver-

mutlich in einer Hemmung des Enzyms durch eine Modifizierung relevanter Seitenketten begründet liegt. Untersuchungen an dem Honigenzym Invertase bestätigten diese These.

8 Eine Behandlung von Honig mit hohen Temperaturen (70 °C) führte nachweislich zu keiner MGO-Bildung, wohingegen sowohl sensorische Beeinträchtigungen, als auch ein drastischer Anstieg an HMF zu verzeichnen waren. Spekulationen über das Erreichen einer „optimierten“ Bioaktivität durch eine aus rechtlicher Sicht unzulässige Erhitzung sind folglich nicht haltbar.

Biofunktionelle Charakterisierung

9 Mittels Mikrodilutionstest wurden für MGO gegen vier klinisch relevante Bakterien (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes* und *Pseudomonas aeruginosa*) minimale Hemmkonzentrationen (MHK) zwischen 0,44 und 3,55 mM bestimmt, wobei die Inhibierung im Vergleich zu typischen Antibiotika geringer ausfällt. Eine Antibiotika-Resistenz der Bakterien hatte dabei keinen Einfluss auf die inhibierende Wirkung von MGO. In Anwesenheit von Zucker- bzw. Honigmatrix resultierten vergleichbare MHK-Werte für MGO. Geringe Unterschiede sind hierbei auf eine bessere Stabilität des MGO in Honigmatrix zurückzuführen, während etwaige synergistische Effekte durch weitere Komponenten nicht zu vermuten sind. Untersuchungen an ausgewählten Manuka-Honigen bestätigten MGO als maßgeblichen für die inhibierende Wirkung verantwortlichen Faktor. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen MGO-Gehalt im Honig und antibakterieller Aktivität aufgezeigt.

10 Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Honig und 1,2-Dicarbonylverbindungen konnte der Koloniebildungstest als geeignetes Verfahren unter Nutzung einer einstündigen Inkubation der Zellen mit Proben in Phosphatpuffer etabliert werden. Für die verwendeten HT-29-Zellen wurde eine 50%ige Inhibierung für einen MGO-Gehalt von 0,7 mM bestimmt. Trotz hoher MGO-Gehalte zeigen Manuka-Honige im Mittel keine signifikant stärkere zytotoxische Wirkung als andere mitgeführten Nektar- und Honigtau-Proben. Die Werte lassen eine hohe Varianz innerhalb der Manuka-Honige erkennen, die nicht ausschließlich mit deren MGO-Konzentration in Verbindung gebracht werden kann.

11 Die Beurteilung der antioxidativen Kapazität von Manuka-Honigen erfolgte mittels TEAC-II-Test, bezogen auf Trolox als Referenz. Im Vergleich zu anderen Sorten konnten signifikant höhere Werte zwischen 0,18 und 0,51 mmol TE/100 g ermittelt werden. Dabei ist ein direkter Zusammenhang zum Gesamtphenolgehalt festzustellen. Für Manuka-Honig lässt sich ein zusätzlicher Beitrag von MGO oder daraus entstehenden Folgeprodukten diskutieren. Prinzipiell ist die antioxidative Kapazität von Honig als sehr gering einzustufen.

6 Literatur

- Abdel Aziz A.**, Rady H.M., Amer M.A., Kiwan H.S. (2009). Effect of some honey bee extracts on the proliferation, proteolytic and gelatinolytic activities of the hepatocellular carcinoma HepG2 cell line. *Austral. J. Basic Appl. Sci.* 3, 2754-2769
- Adams C.J.**, Boulton C.H., Deadman B.J. Farr J.M., Grainger M.N. Manley-Harris M., Snow M.J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* 343, 651-659
- Adams C.J.**, Manley-Harris M., Molan P.C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* 344, 1050-1053
- Agbagwa O.E.**, Otokunefor T.V., Frank-Peterside N. (2011). Quality assessment of Nigeria honey and manuka honey. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1, 20-31
- Ahmed M.U.**, Frye E.B., Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1997). *N*-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 324, 565-570
- Ahn M.R.**, Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101, 1383-1392
- Ajlouni S.**, Sujirapinyokul P. (2010). Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chem.* 119, 1000-1005
- Allen K.L.**, Molan P.C., Reid G.M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 817-822
- Alonso-Torre S.R.**, Cavia M.M., Fernández-Muiño M.A., Moreno G, Huidobro J.F., Sancho M.T. (2006). Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chem.* 97, 750-755
- Al-Somal N.**, Coley K.E., Molan P.C., Hancock B.M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J. Royal Soc. Med.* 87, 9-12
- Alvarez-Suarez J.M.**, Giampieri F., González-Paramás A.M., Damiani E., Astolfi P., Martínez-Sánchez G., Bompadre S., Quiles J.L., Santos-Buelga C., Battino M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1508-1516
- Anklam E.** (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 63, 549-562
- Apple M.A.**, Greenberg D.M. (1967). Inhibition of cancer growth in mice by a normal metabolite. *Life Sci.* 6, 2157-2160
- Arena E.**, Ballistreri G., Tomaselli F., Fallico B. (2011). Survey of 1,2-dicarbonyl compounds in commercial honey of different floral origin. *J. Food Sci.* 76, 1203-1210
- Arribas-Lorenzo G.**, Morales F.J. (2010). Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2966-2972

- Astwood K.**, Lee B., Manley-Harris M. (1998). Oligosaccharides in New Zealand honeydew honey. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4958-4962
- Atrott (2007)**. Honig, Gelée Royal, Propolis und Pollen als antioxidativ wirksame Kosmetikinhaltsstoffe. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Ayoub F.M.**, Allen R.E., Thornalley P.J. (1993). Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by methylglyoxal *in vitro*. *Leukemia Res.* 17, 397-401
- Azeredo L. da C.**, Azeredo M.A.A., Souza S.R. de, Dutra V.M.L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem.* 80, 249-254
- Babacan S.**, Rand A.G. (2007). Characterization of honey analyse. *J. Food Sci.* 72, 50-55
- Babel W.**, Hofmann K.H. (1981). The conversion of triosephosphate via methylglyoxal, a bypass to the glycolytic sequence in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Letters* 10, 133-136.
- Backhaus K.**, Erichson B., Plinke W., Weiber R. (2006). Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. 11. überarb. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Badet C.**, Quero F. (2011). The *in vitro* effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe* 17, 19-22
- Bailey M.E.**, Um K.W. (1992). Maillard reaction products and lipid oxidation. In: Lipid oxidation in food, ACS Symposium Series, Vol. 500, 122-139
- Baltrušaitytė V.**, Venskutonis P.R., Čeksterytė V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.*, 101, 502-514
- Banskota A.H.**, Tezuka Y., Kadota S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.* 15, 561-571
- Barboni E.**, Kemeny D.M., Campos S., Vernon C.A. (1987). The purification of acid-phosphatase from honey-bee venom (*Apis mellifica*). *Toxicon* 25, 1097-1103
- Baroni M.V.**, Chiabrando G.A., Costa C., Wunderlin D.A. (2002). Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1362-1367
- Basnet P.**, Matsuno T., Neidlein R. (1997). Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch. C* 52, 828-833
- Beckh G.**, Lüllmann C. (1999). Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte. Teil 1: Hefegehalt. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 95, 457-463
- Beckh G.**, Wessel P., Lüllmann C. (2004). Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte. Teil 2: Der Wassergehalt und die Wasseraktivität als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 100, 14-17
- Beckmann K.** (2008). Neue Ansätze in der Qualitätssicherung von Honig. *Dissertation*. Dresden. Technische Universität Dresden
- Bedinghaus A.J.**, Ockerman H.W. (2006). Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino acids in cooked ground pork patties. *J. Food Sci.* 60, 992-995

- Bednarski W.**, Jedrychowski L., Hammond E.G., Nikolov Z.L. (1989). A method for the determination of α -dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 72, 2474-2477
- Belitz H.D.**, Grosch W., Schieberle P. (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. überarb. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Bender K.**, Seibert R.T., Wienker T.F., Kren V., Pravenec M., Bissbort S. (1994). Biochemical genetics of methylglyoxal dehydrogenases in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Biochem. Genetics* 32, 147-154
- Beretta G.**, Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric /fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chimica Acta* 533, 185-191
- Bergner K.**, Hahn H. (1972). Zum Vorkommen und zur Herkunft der freien Aminosäuren in Honig. *Apidologie* 3, 5-34
- Bergner K.G.**, Diemair S. (1975). Proteine des Bienenhonigs. II Gelchromatographie, enzymatische Aktivität und Herkunft von Bienenhonig-Proteinen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 157, 7-13
- Bernal J.L.**, Nozal M.J., Toribo L., Diego J.C., Ruiz A. (2005). A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *J. Separation Sci.* 28, 1039-1047
- Berridge M.V.**, Tan A.S., McCoy K.D., Wang R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4, 14-19
- Bertoncelj J.**, Doberšek U., Jamnik M., Golob T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 105, 822-828
- Bestimmungen des Deutschen Imkerbundes e.V.** (2006). Honiguntersuchung. Richtlinien zur Untersuchung/Beurteilung von Honig unter dem Warenzeichen des Deutschen Imkerbundes e.V.
- Biswas S.**, Ray M., Misra S., Dutta D.P., Ray S. (1997). Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* 323, 343-348
- Blair S.E.**, Cokcetin N.N., Harry E.J., Carter D.A. (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 28, 1199-1208
- Blasa M.**, Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M.P., Albertini M.C., Piatti E. (2006). Raw Millifiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 97, 217-222
- Block** (2011). Zytotoxische Eigenschaften von 1,2-Dicarbonylen in Manuka-Honigen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- BMELV** (2011). Fragen und Antworten zum „Honig-Urteil“ des Europäischen Gerichtshofs. <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Pflanze/GrueneGentechnik/FAQGentechnikUrteilSeptember2011.html>
- Bodeker G.C.**, Ryan T.J., Ong C.-K. (1999). Traditional approaches to wound healing. *Clinics in Dermatology* 17, 93-98

- Bogdanov S. (1981).** Bestimmung von Honigprotein mit Coomassie Brilliantblau G250, *Mitteilungen Leb. Hyg.* 72, 411-417
- Bogdanov S. (1997).** Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 30, 748-753
- Bogdanov, S. (2002).** Bienenprodukte. Vorlesung Bienenzucht, ETH. Mitteilungen des Schweizerischen Zentrums für Bienenforschung, Mitteilung Nr. 50, 1-15
- Bonvehí J.S., Coll F.V. (2003).** Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *J. Sci. Food Agric.* 83, 275-282
- Boonchiangma S., Chantai S., Srijaranai S., Srijaranai S. (2009).** Chemical composition and non-enzymatic browning compounds of Thai honey: A kinetic study. *J. Food Proc. Engineer.* 34, 1584-1596
- Borenfreund E., Puerner J.A. (1985).** Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Tox. Lett.* 24, 119-124
- Bosi G., Battaglini M. (1978).** Gas chromatographic analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. *J. Apic. Res.* 17, 152-166
- Bouseta A., Scheirman V., Collin S. (1996).** Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *J. Food Sci.* 61, 683-687
- Boxberger H.J. (2007).** Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur, Einführung in Grundlagen und Techniken. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Bradford M.M. (1976).** Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brambilla G., Sciabà L., Faggini P., Finollo R., Bassi A.M., Ferro M., Marinari U.M. (1985).** Methylglyoxal-induced DNA-protein cross-links and cytotoxicity in 88-lycera hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 6, 683-686
- Brudzynski K., Kim L. (2011).** Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chem.* 126, 1155-1163
- Brudzynski K., Miotto D. (2011).** The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem.* 124, 869-874
- Buratti S., Benedetti S., Cosio M.S. (2007).** Evaluation of antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* 71, 1387-1392
- Burdurlu H.S., Koca N., Karadeniz F. (2006).** Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *J. Food Engineer.* 74, 211-216
- Burkhart C.G., Burkhart C.N. (2009).** Dihydroxyacetone and methods to improve its performance as artificial tanner. *The Open Dermatol. J.* 3, 42-43
- Burkhart F. (1992).** Mikrobiologische Diagnostik. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart New York
- Bystrykh L.V., Sokolov A.P., Trotsenko Y.A. (1981).** Purification and properties of dihydroxyacetone synthase from the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* 132, 324-328

- Campos M.G.**, Webby R.F., Markham K.R., Mitchell K.A., da Cunha A.P. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 51, 742-745
- Carr A.C.** (1998). Tea trees and their therapeutic properties. The Linus Pauling Institute, Oregon State University. Newsletter Fall/ Winter 1998
- Carter C.**, Thornburg R.W. (2004). Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends Plant Sci.* 9, 320-324
- Casazza J.P.**, Felver M.E., Veech R.L. (1984). The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259, 231-236
- Castro-Vásquez L.**, Díaz-Maroto M.C., González-Viñas M.A., de la Fuente E., Pérez-Coello M.S. (2008). Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1999-2006
- Chang T.**, Wang R., Wu L. (2005). Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 286-293
- Chaplen F.W.R.**, Fahl W.E., Cameron D.C. (1998). Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5533-5538
- Chen J.H.**, Ho C.T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2374-2378
- Choudhary D.**, Chandra D., Kale R.K. (1997). Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol. Lett.* 93, 141-152
- Clynes M.** (1998). Animal cell culture techniques. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Codex Standard for honey** (1981). Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for honey, Codex STAN 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2 (2001)
- Cooper R.A.-**, Jenkins L., Henriques A.F.M., Duggan R.S., Burton N.F. (2010). Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *Eur. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 29, 1237-1241
- Cooper R.A.**, Molan P.C., Harding K.G. (2002). The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.* 93, 857-863
- Cotte J.F.**, Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F. (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1342-1350
- Da Silva Ferreira A.C.**, Reis S., Rodrigues C., Oliveira C., De Pinho P.G. (2007). Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.* 72, 314-318
- Daher S.**, Gülaçar F.O. (2010). Identification of new aromatic compounds in the New Zealand manuka honey by gas chromatography mass spectrometry. *E-J. Chem.* 7, 7-14
- Dany B.** (1999). Selbstgemachtes aus Bienenprodukten: Vollwertkost, Sportnahrung, Naturkosmetik, Naturheilmittel. Ehrenwirt-Verlag München

- De la Berrera E., Nobel P.S. (2004).** Nectar: propertiesfloral aspects, and speculations on origin. *Trends Plant Sci.* 9, 65-69
- De Revel G., Pripis-Nicolau L., Barbe J.C., Bertrand A. (2000).** The detection of α -dicarbonyl compounds in wine formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* 80, 102-108
- de Vega C., Herrera C.M., Johnson S.D. (2009).** Yeasts in some floral nectar of some South African plants: Quantification and associations with pollinator type and sugar concentration. *South African J. Botany* 75, 798-806
- Degen J., Hellwig M., Henle T. (2012).** 1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7071-7079
- Degen J., Vogel M., Richter D., Hellwig M., Henle T. (2012).** Metabolischer Transit von alimen-tärem Methylglyoxal., *Posterbeitrag*; 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Münster
- Deifel A. (1989).** Die Chemie des Honigs. *Chemie in unserer Zeit* 23, 25-33
- Dold D., Du D.H., Dzaio S.T. (1937).** Nachweis antibakterieller, hitze- und lichtempfindlicher Hemmstoffe (Inhibine) im Naturhonig. *Z. Hyg. Infekt.* 120, 155-167
- Doner L.W. (1977).** The sugars of honey – a review. *J. Sci. Food Agric.* 28, 443-456
- Dustmann J.H. (1971).** Activity of catalase in honey of Ericaceae-flow. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 145, 294-295
- Dustmann J.H. (1972).** Über den Einfluss des Lichtes auf den Peroxid-Wert (Inhinbin) des Honigs. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 148 (5), 263-268
- Dustmann J.H. (1979).** Antibacterial effect of honey. *Apiacta* 14, 7-11
- Dustmann J.H., van Praagh J.P., Bote K. (1985).** Zur Bestimmung von Diastase, Invertase und HMF in Honig. *Apidologie* 16, 19-30
- Edelhäuser M., Bergner K.G. (1987).** Proteine des Bienenhonigs. VIII. Honigsaccharase, Iso-lierung, chromatographisches Verhalten und Eigenschaften. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184, 189-194
- Efem S.E.E. (1988).** Clinical observations on the wound healing properties of honey. *Br. J. Surg.* 75, 679-681
- Eisenbrand G., Metzler M. (2001).** Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 2. Auf-lage, Thieme-Verlag Stuttgart
- Eisenbrand G., Schreier P. (2006).** Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, 2. Auflage, Thieme-Ver-lag Stuttgart New York
- Elliott W.H. (1959).** Aminoacetone - Its isolation and role in metabolism. *Nature* 183, 1051-1052.
- Erixon M., Lindén T., Kjellstrand P., Carlsson O., Ernebrant M., Forsbäck G., Wieslander A., Jönsson J.A. (2004).** PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization. *Peritoneal Dialysis Int.* 24, 392-398
- Falbe J., Regitz M. (1997).** Römpp Lexikon Chemie, 10. Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart New York

- Fearnley L.**, Greenwood D.R., Schmitz M., Stephens J.M., Schlothauer R.C., Loomes K.M. (2012). Compositional analysis of manuka honeys by high-resolution mass spectrometry: Identification of a manuka-enriched archetypal molecule. *Food Chem.* 132, 948-953
- Fedoronko M.**, Koenigstein J. (1969). Kinetics of mutual isomerization of trioses and their dehydration to methylglyoxal. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 34, 3881-3894
- Fellendorf (2010)**. Etablierung von Methoden zur Bestimmung zytotoxischer Eigenschaften von Honig und 1,2-Dicarbonylverbindungen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Ferguson G.P.**, Töttemeyer S., MacLean M.J., Booth I.R. (1998). Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Arch. Microbiol.* 170, 209-219
- Ferreres F.**, Ortiz A., Silva C., Garcia-Viguera C., Tomás-Barberán F.A., Tomás-Lorente F. (1992). Flavonoids of "La Alcarria" honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194, 139-143
- Fidaleo M.**, Zuurro A., Lavecchia R. (2010). Methylglyoxal: A new weapon against *Staphylococcal* wound infections? *Chem.Lett.* 39,322-323
- Fraval H.N.A.**, McBrien D.C.H. (1980). The effect of methylglyoxal on cell division and the synthesis of protein and DNA in synchronous and asynchronous cultures of *Escherichia coli* B/r. *J. General Microbiol.* 117, 127-134
- French F.A.**, Frelander B.L. (1958). Carcinostatic activity of methylglyoxal and related substances in tumour-bearing mice. *Ciba Found. Symp.* 67, 271-300
- Frischmann M.**, Spitzer J., Fünfroeken M., Mittelmaier S., Deckert M., Fichert T., Pischetsrieder M (2008). Development and validation of an HPLC method to quantify 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids. *Biomed. Chromatogr.* 23, 843-851
- Fröhlich (2009)**. Untersuchungen zur tumorzellspezifischen Zytotoxizität von Manuka-Honig. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Funk W.**, Dammann V., Donnevert G. (2005). Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. 2. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Funke I. (2007)**. Untersuchungen zur Beeinflussung der α -Amylase-Aktivität durch Pflanzenextrakte und polyphenolische Reinstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von *Cynara cardunculus L. ssp. Flavescens* Wikl. und seiner Inhaltsstoffe. *Dissertation*, Freie Universität Berlin
- George N.M.**, Cutting K.F. (2010). Antibacterial honey (MedihoneyTM): in-vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multiresistant gram-negativ. *Wounds* 19, 231-236
- Gethin G.**, Cowman S. (2008). Manuka honey vs. hydrogel – a prospective, open label, multi-centre, randomized controlled trial to compare desloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. *J. Clin. Nursing* 18, 466-474
- Gheldorf N.**, Wang X.H., Engeseth N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5870-5877
- Giri K.V. (1938)**. The chemical composition and enzyme content of Indian honey. *Madras Agric. J.* 26, 68-72

- Girolamo F.**, D'Amato A., Rhighetti P.G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *J. Proteomics* 75, 3688-3693
- Gómez Pérez J.A.**, Garcia-Villanova R.J., Elvira Garcia S., Conzález Paramás A.M. (1999). Optimization of the capillary gas chromatographic analysis of mono- and oligosaccharides in honeys. *Chromatographia* 50, 461-469
- González Paramás A.M.**, Gómez Báez J.A., Cordon Marcos C., García-Villanova R.J., Sanchez Sanchez J. (2006). HPLC fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee pollen). *Food Chem.* 95, 148-156
- Green M.L.**, Elliott W.H. (1964). Enzymic formation of aminoacetone from threonine and its further metabolism. *Biochem. J.* 92, 537-549.
- Green M.L.**, Lewis J.B. (1968). Oxidation of aminoacetone by a species of *Arthrobacter*. *Biochem. J.* 106, 267-270
- Green S.R.**, Westfield N.J. (1960). Process for producing dihydroxyacetone. *Patent*, US Patent Office, 2,948,658
- Greim H.**, Deml E. (1996). Toxikologie – eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim New York Basel Cambridge Tokyo
- Günther F.**, Burekhardt O. (1967). Determination of total acid phosphatase in honey. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 63, 41-44
- Haberlau (2010)** . Analytische Charakterisierung von Manuka-Honigen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Hayashi T.** Shibamoto T. (1985). Analysis of methylglyoxal in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 33, 1090-1093
- Heim K.E.**, Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584
- Hellwig M.**, Degen J., Henle T. (2010). 3-Desoxygalactosone, a „new“ 1,2-dicarbonyl compound in milk products. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10752-10760
- Henle T.** (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* 29, 313-322
- Henle T.** (2007). Dietary advanced glycation end products – a risk to human health? A call for an interdisciplinary debate. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1075-1078
- Henle T.**, Walter A.W., Haeßner R., Klostermeyer H. (1994). Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199, 55-58
- Henle T.**, Walter H., Krause I., Klostermeyer H. (1991) Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* 1, 125-135
- Henriques A.**, Jackson S., Cooper R., Burton N. (2006). Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *J. Antimic. Chemotherapy* 58, 773-777

- Henriques A.F., Jenkins R.E., Burton N.F., Cooper R.A. (2010).** The intracellular effects of manuka honey on *staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 45-50
- Henriques A.F., Jenkins R.E., Burton N.F., Cooper R.A. (2011).** The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec Dis.* 30, 167-171
- Hermosín I., Chicón R.M., Cabezudo M.D. (2003).** Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.* 83, 263-268
- Hodge J.E. (1953).** Dehydrated foods: Chemistry of browning reaction in mode systems. *J. Agric. Food Chem.* 1, 928-943
- Hollnagel A. (2000).** Beiträge zur Chemie der nichtenzymatischen Bräunung von oligomeren Kohlenhydraten. *Dissertation*, Technische Universität Berlin
- Hollnagel A., Kroh L.W. (1998).** Formation of α -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 207, 50-54
- Hollnagel A., Kroh L.W. (2002).** 3-Deoxypentosulose: an α -dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharides in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 13, 1659-1664
- Homoki-Farkas P., Örsi F., Kroh L.W. (1996).** Methylglyoxal determination from different carbohydrates during feat processing. *Food Chem.* 59, 157-163
- Honig-V (2004).** Honig-Verordnung vom 16.01.2004 (BGBl. I S. 92), zuletzt geändert durch Art. 9 der Verordnung vom 08.08.2007 (BGBl. I S. 1816)
- Hopper D.J., Cooper R.A. (1971).** The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase: a new control site in glycolysis? *FEBS Letters* 13, 213-216
- Horn F. (2012).** Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium.5. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J.A., Fujita M. (2012).** Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Botany* Article ID 872875, 37 pages, doi: 10.1155/2012/872875
- Hughes S.J. (1976).** Sooty moulds. *Mycologia* 68, 451-691
- Iglesias M.T., De Lorenzo C., Polo M.D., Martin-Alvarez P.J., Pueyo E. (2004).** Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *J. Agric. Food Chem.* 52, 84-89
- Iglesias M.T., Martin-Alvarez P.J, Polo M.D, De Lorenzo C., Gonzalez M., Pueyo E. (2006).** Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9099-9104
- Inoue K., Murayama S., Seshimo F., Takeba K., Yoshimura Y., Nakazawa H. (2005).** Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Sci. Food Agric.* 85, 872-878

- Irish J., Blair S., Carter D.A. (2011).** The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoSone* 6, e18229
- Isidorov V.A., Czyżewska U., Jankowska E., Bakier S. (2011).** Determination of royal jelly acids in honey. *Food Chem.* 124, 387-391
- Iurlina M.O., Fritz R. (2005).** Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 297-304
- Ivanov T. (1978).** Study on Invertase, acid and alkaline phosphatase and esterase activity in bee honey. *Zhivotnov"dni Nauki* 15, 103-112
- Ivanov T. (1981).** Activity of glucose oxidase, catalase and proteolytic enzymes and the inactivation of enzymes in honey by heating and preservation. *Zhivotnov"dni Nauki* 18, 119-125
- Jenkins R., Burton N., Cooper R. (2011).** Effect of manuka honey on the expression of universal stress protein A in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 373-376
- Jeong E.Y., Jeon J.H., Kim H.W., Kim M.G., Lee H.S. (2009).** Antimicrobial activity of leptospermon and its derivatives against human intestinal bacteria. *Food Chem.* 115, 1401-1404
- Johnston P.R. (1998).** Leaf endophytes of manuka (*Leptospermum scoparium*). *Mycol. Res.* 102, 1009-1016
- Joueva V.A., Johnson D.L., Hassett J.P., Nowak D.J., Shipunova N.A., Barbarossa D. (2006).** Role of sooty mold fungi in accumulation of fine-particle-associated PAHs and metals on deciduous leaves. *Environm. Res.* 102, 272-282
- Kalapos M.P. (1999).** Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110, 145-175
- Kalapos M.P. (2008).** The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biol. Interactions* 171, 251-271
- Kang Y., Edwards L.G., Thornalley P.J. (1996).** Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: Modification of DNA, G₁ growth arrest and induction of apoptosis. *Leukaemia Res.* 20, 397-405
- Kapoulas V.M., Mastronicolis S.K., Galanos D.S. (1977).** Identification of the lipid components of honey. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 163, 96-99
- Kaškonienė V., Venskutonis P.R. (2010).** Floral markers in honey of various botanical and geographical origins: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 620-634
- Kato Y., Umeda N., Maeda A., Matsumoto D., Kitamoto N., Kikuzaki H. (2012).** Identification of a novel glycoside, Leptosin, as a chemical marker of manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3418-3423
- Kawashima K., Itoh H., Chibata I. (1977).** Antioxidant activity of browning products prepared from low molecular carbonyl compounds and amino acids. *J. Agric Food Chem.* 25, 202-204
- Khalil M.I., Sulaiman S.A., Boukraa L. (2010).** Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *Open Nutraceuticals J.* 3, 6-16

- Khanal B., Baliga M., Uppal N. (2010).** Effect of topical honey on limitation of radiation-induced oral mucositis: an intervention study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 39, 1181-1185
- Kirk D.L. (1965).** Preparing baked goods utilizing dihydroxyacetone to enhance browning. *Patent*, US 3220850 19651130
- Krause R. (2005).** Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen. *Dissertation*, Technische Universität Dresden
- Kroh L.W. (1994).** Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* 51, 373-379
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F. (2007).** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* 100, 526-534
- Kunze (2009)** . Untersuchungen zur Aminosäure- und Proteinzusammensetzung von Manuka-Honigen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Kwakman P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J. (2010).** How honey kills bacteria. *FASEB J.* 24, 1-7
- Kwakman P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J. (2011).** Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS one* 6, e17709
- Lacerda J.J.D., dos Santos J.S., dos Santos S.A., Rodrigues G.B., dos Santos M.L.P. (2010).** Influence of physicochemical and elemental composition on honey colors produced by *Apis mellifera* in Southwest Bahia using multivariate analysis. *Quimica nova* 33, 1022-1026
- Lachman J., Koliňová D., Míňolová D., Košata J., Titěra D., Kult K. (2007).** Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chem.* 101, 973-979
- Langford V., Gray J., Foulkes B., Bray P., McEwan M.J. (2012).** Application of selected ion flow tube-mass spectrometry to the characterization of monofloral New Zealand honeys. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6806-6815
- Laurie V.F., Waterhouse A.L. (2006).** Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine, potential effects on wine color. *J. Agric. Food Chem.* 54 (13), 4668-4673
- Le Bivic A., Hirn M., Reggio H. (1988).** HT-29 cells are an *in vitro* model for the generation or cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 136-140
- Ledl F., Schleicher E. (1990).** Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* 102, 597-734
- Lin S.M. (2010).** The effect of manuka honey on enterobacteria. *Dissertation*, University of Waikato, Neuseeland
- Lin S.M., Molan P.C., Cursons R.T. (2011a).** The controlled *in vitro* susceptibility of gastrointestinal pathogens to the antibacterial effect of manuka honey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 569-574
- Lin S.M., Molan P.C., Cursons R.T. (2011b).** The post antibiotic effect of manuka honey on gastrointestinal pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 467-468

- Linden T.**, Cohen A., Deppisch R., Kjellstrand P., Wieslander A. (2002). 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 62, 697-703
- Lindl T.** (2002). Zell- und Gewebekultur. 5. überarb. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Heidelberg Berlin
- Lo C.Y.**, Li S., Wang Y., Tan D., Pan M.H., Sang S., Ho C.T. (2008). Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup. *Food Chem.* 107, 1099-1105
- Lo T.W.C.**, Selwood T., Thornalley P.J. (1994). The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1865-1870
- Low N.H.**, Vong K.V., Sporns P. (1986). A new enzyme, β -glucosidase, in honey. *J. Apic. Res.* 25, 178-181
- Lusby P.E.**, Coombes A., Wilkinson J.M. (2002). Honey: A potent agent for wound healing? *J. WOCN* 29, 295-300
- Lüttge U.** (1977). Nectar composition and membrane transport of sugars and amino acids: a review on the present state of nectar research. *Apidologie* 8, 305-319
- Maddock-Jennings W.**, Wilkinson J.M., Cavanagh H.M., Shillington D. (2009). Evaluating the effects of the essential oils *Leptospermum scoparium* (manuka) and *Kunzea ericoides* (kanuka) on radiotherapy induced mucositis: A randomized, placebo controlled feasibility study. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 13, 87-93
- Madejczyk M.**, Baralkiewicz D. (2008). Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Anal. Chimica Acta* 617, 11-17
- Maillard L.C.** (1912). Action des acides amines sur le sucres. Formation des mélanoides par voie méthodique. *Comptes rendus hebd. des séances de l'Académie des sciences.* 145, 66-68.
- Majtan J.** (2010). Methylglyoxal – a potential risk factor of manuka honey in healing diabetic ulcers. *eCAM* 22, 1-5
- Majtan J.**, Klaudiny J., Bohova J., Kohutova L., Dzurova M., Sediva M., Bartosova M., Majtan V. (2012). Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: Possible therapeutic implications. *Filoterapia* 83, 671-677
- manukahealth.co.nz
- Manyi-Loh C.E.**, Clarke A.M., Munzhelele T., Green E., Mkwetshana N.F., Ndip R.N. (2010). Selected South African honeys and their extracts possess *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity. *Arch. Med. Res.* 41, 324-331
- Marceau E.**, Yaylayan V.A. (2009). Profiling of α -dicarbonyl content of commercial honeys from different botanical origins: Identification of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10837-10844
- Marconi E.**, Caboni M.F., Messia M.C., Panfili G. (2002). Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2825-2829

- Marquele F.D., Di Mambro V.M., Georgetti S.R., Casagrande R., Valim Y.M.L., Fonseca M.J.V. (2005).** Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39, 455-462
- Marshall T., Williams K.M. (1987).** Electrophoresis of honey: Characterization of trace proteins from a complex biological matrix by silver staining. *Anal. Biochem.* 167, 301-303
- Martins S.I.F.S., Marcelis A.T.M., van Boekel M.A.J.S. (2003).** Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part I – Reaction mechanism. *Carbohydr. Res.* 338, 1651-1663.
- Mato I., Huidobro J.F., Simal-Lozano J., Sancho M.T. (2003).** Significance of nonaromatic organic acids in honey. *J. Food Protection* 66, 2371-2376
- Mavric E. (2006).** Argininderivatisierung und 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln. *Dissertation*, Technische Universität Dresden
- Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. (2008).** Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 483-489
- McGovern D.P.B., Abbas S.Z., Vivian G., Dalton H.R. (1999).** Manuka honey against *Helicobacter pylori*. *J. Royal Soc. Med.* 92, 439-439
- Meyerhof O., Lohmann K. (1934).** The enzymatic stable reaction between hexose diphosphoric acid and dioxiacetone phosphoric acid. *Biochem. Z.* 271, 89-110.
- Milanesa D.M., Choudhary M.S., Mallouh C., Tazaki H., Konno S. (2000).** Methylglyoxal-induced apoptosis in human prostate carcinoma: Potential modality for prostate cancer treatment. *Eur. Urology* 37, 728-734
- Moar N.T. (1985).** Pollen analysis of New Zealand honey. *NZ J. Agric. Res.* 28, 39-70
- Mohammadzadeh S., Sharriatpanahi M., Hamed M., Amanzadeh Y., Ebrahimi S.E.S., Stad S.N. (2007).** Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.* 103, 729-733
- Molan P. (2009).** Honey: antimicrobial actions and role in disease management. In: Ahmad I, Aquil F (ed.) *New Strategies combating bacterial infection*, Wiley-VCH, Weinheim, 229-253
- Molan P.C. (1998).** A brief review of honey as a clinical dressing. *Primary Intention* 8, 87-92
- Molan P.C. (2006).** The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int. J. Lower Extrem. Wounds* 5, 40-54
- Molan P.C., Russel (1988).** Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J. Apic. Res.* 27, 62-67
- Molin M., Norbeck J., Blomberg A. (2003).** Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J. Biol. Chem.* 278, 1415-1423
- Monfrecola G., Prizio E. (2001).** Self tanning. *Compr. Ser. Photosci.* 3, 487, 489-493
- Morales V., Sanz M.L., Martín-Álvarez P.J., Corzo N. (2008).** Combined use of HMF and furosine to assess fresh honey quality. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1332-1338

- Morales V.**, Sanz M.L., Olano A., Corzo N. (2006). Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. *Chromatographia* 64, 233-238
- Nagai T.**, Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem.* 75, 237-240
- Nagao M.**, Fujita Y., Wakabayashi K., Nukaya H., Kosuge T., Sugimura T. (1986). Mutagens in coffee and other beverages. *Environ. Health Persp.* 67, 89-91
- Nagaraj R.H.**, Shipanova I.N., Faust F.M. (1996). Protein cross-linking by the Maillard reaction – Isolation, characterization, and *in vivo* detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol. Chem.* 271, 19338-19345
- Nakayama T.**, Hayase F., Kato H. (1980). Formation of ϵ -(2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-Glucose und L-Lysin. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1201-1202
- Nelson J.M.**, Cohn D.J. (1924). Invertase in honey. *J. Biol. Chem.* 61, 193-224
- Niwa T.** (1999). 3-Desoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity and clinical implications. *J. Chrom. B* 731, 23-36
- Niwa T.**, Katsuzaki T., Ishizaki Y., Hayase F., Miyazaki T., Uematsu T., Tatemichi N., Takei Y. (1997). Imidazolone, a novel advanced glycation end product, is present at high levels in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett.* 407, 297-302
- O'Brien J.**, Wilson I., Orton T., Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426
- Oberriesser W.** (2001). *Imkereiprodukte: Verarbeitung von Honig, Pollen, Wachs & Co.* Leopold-Stocker-Verlag Graz
- Oboh G.**, Ademiluyi A.O., Akinyemi A.J., Henle T., Saliu J.A., Schwarzenbolz U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. *J. Functional Food* 4, 450-458
- Oboh G.**, Raddatz H., Henle T. (2008). Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2486-2492
- Oborsh E.V.**, Barkate J.A., Wesu C., Owen T.M. (1979). Food preservation with dihydroxyacetone and an antimycotic agent. *Patent, Can.* CA 1054434 A1 19790515
- Odani H.**, Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K. (1999). Increase in three α,β -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 89-93
- Oddo L.P.**, Baldi E., Accorti M. (1990). Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie* 21, 17-24
- Oddo L.P.**, Heard T.A., Rodríguez-Malaver A., Pérez R.A., Fernández-Muiño M., Sancho M.T., Sesta G., Lusco L., Vit P. (2008). Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *J. Med. Food* 11, 789-794
- Oddo L.P.**, Piazza M.G., Pulcini P. (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie* 30, 57-65

- Oelschlaegel S.**, Gruner M., Wang P.N., Boettcher A., Koelling-Speer I., Speer K. (2012). Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7229-7237
- Okado A.**, Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fuji J., Taniguchi N. (1996). Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-desoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 219-224
- Ortiz A.**, Wieslander A., Linden T., Santamaria B., Sanz A., Sanchez-Nino M.D., Benito A., Kjellstrand P. (2006). 3,4-DGE is important for the side effects in peritoneal dialysis what about its role in diabetes. *Current Med. Chem.* 13, 2695-2702
- Patel J.B.**, Gorwitz R.J., Jernigan J.A. (2009). Mupirocin resistance. *Clin. Infect. Dis.* 49, 935-941
- Pätzold R.**, Brückner H. (2006). Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as a result of the Maillard reaction. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 347-354
- Pellegrini N.**, Serafini M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M., Brighenti F. (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1030-1038
- Pompliano L.**, Peyman A., Knowles J.R. (1990). Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device - Definition of the functional-role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186-3194.
- Pontoh J.**, Low N.H. (2002). Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 679-690
- Porter N.G.**, Wilkins A.L. (1998). Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochemistry* 50, 407-415
- Raddatz H.**, Schubert H., Henle T. (2007). Vergleichende Untersuchungen zur Messung der antioxidativen Aktivität von pflanzlichen Polyphenolen. *Z. Lebensmittelchemie* 61, 15-16
- Ray M.**, Halder J., Dutta S.K., Ray S. (1991). Inhibition of respiration of tumor cells by methylglyoxal and protection of inhibition by lactaldehyde. *Int. J. Cancer* 47, 603-609
- Ray S.**, Ray M. (1981). Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *J. Biolog. Chem.* 256, 6230-6233
- Re R.**, Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231-1237
- Rizzi G.P.** (2004). Role of phosphate and carboxylate ions in Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52, 953-957
- Robson V.**, Dodd S., Thomas S. (2008). Standardized antibacterial honey (Medihoney™) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *J. Advanced Nursing* 65, 565-575
- Rodríguez B.A.**, Mendoza S., Iturriga M.H., Castaño-Tostado E. (2012). Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *J. Food Sci.* 71, 121-127
- Rose I.A.**, Nowick J.S. (2002). Methylglyoxal synthetase, enol-pyruvaldehyd, glutathione and the glyoxalase system. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13047-13052

- Rosendale D.I., Maddox I.S., Miles M.C., Rodier M., Skinner M., Sutherland J. (2008).** High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 2257-2267
- Ross D.J., Scott N.A., Lambie S.M., Trotter C.M., Rodda N.J., Townsend J.A. (2009).** Nitrogen and carbon cycling in New Zealand pumice soil under a manuka (*Leptospermum scoparium*) and kanuka (*Kunzea ericoides*) shrubland. *Austral. J. Soil Res.* 47, 725-736
- Rotarescu R., Vidican C. (2010).** Impact's assessment of thermal processing and storage conditions on enzymatic activity and HMF content in honey. *Carpathian J. Food Sci. Technol.* 2, 1-13
- Russel K.M., Molan P.C., Wilkins A.L., Holland P.T. (1990).** Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* 38, 10-13
- Russo A., Longo R., Vanella A. (2002).** Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Filoterapia* 73, 21-29
- Sanchez M.P., Huidobro J.F., Mato I., Muniategui S., Sancho M.T. (2001).** Evolution of invertase activity in honey over two years. *J. Agric. Food Chem.* 49, 416-422
- Sant'Ana L.D'O., Sousa J.P.L.M., Salguero F.B., Lorenzon M.C.A., Castro R.N. (2011)** Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. *J. Food Sci.* 71, 135-140
- Sanz M.L., Del Castillo M.D., Corzo N., Olano A. (2003).** 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4278-4283
- Sanz M.L., González M., Lorenzo C. de, Sanz J., Martínez-Castro I. (2004).** Carbohydrate composition and physicochemical properties of artisanal honeys from Madrid (Spain): occurrence of *Echium sp* honey. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1577-1584
- Schepartz A.I. (1966).** Honey catalase: occurrence and some kinetic properties. *J. Apic. Res.* 5, 167-176
- Schepartz A.I., Subers M.H. (1964).** The glucose oxidase in honey. I. Purification and some general properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 85, 228-237
- Schubert (2006).** Testung von Methoden zur Messung der antioxidativen Kapazität von pflanzlichen Polyphenolen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*, Technische Universität Dresden
- Serrano S., Espejo R., Villarejo M., Jodral M.L. (2007).** Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 76-79
- Severin T., Hiebl J., Popp-Ginsbach H. (1984).** Untersuchungen zur Maillard-Reaktion: Nachweis von Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und anderen hydrophilen Zuckerabbauprodukten in Caramellisierungsgemischen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 178, 284-287
- Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Gethin G., Cowman S. (2010).** Comparison of the antimicrobial activity of ulmo honey from Chile and manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complem. Altern. Med.* 10, 1-5
- Shipar Md.A.H. (2006a).** Formation of methylglyoxal in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. *Food Chem.* 98, 395-402

- Shipar Md.A.H. (2006b)**. Formation of the Heyns rearrangement products in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. *Food Chem.* 97, 231-243
- Siddhuraju P., Becker K. (2003)**. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric Food Chem.* 51, 2144-2155
- Siegenthaler U. (1975)**. Determination of α -amylase in bees' honey with a commercial, dye-labelled substrate. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 66, 393-399
- Siegenthaler U. (1977)**. A simple and quick method for determining α -glucosidase (saccharase) in honey. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 68, 251-258
- Simon A., Traynor K., Santos K., Blaser G., Bode U., Molan P. (2009)**. Medical honey for wound care – Still the “latest resort”? *eCAM* 6, 165-173
- Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. (2001)**. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999)**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178
- SLMB (2004)**. Schweizerisches Lebensmittelbuch 23A: Honig. Neuauflage Nov. 1995, Ergänzung Dez. 1999, Überarbeitung Nov. 2003
- Smits M.M., Johnson M.A. (1981)**. Methylglyoxal: enzyme distributions relative to its presence in Douglas-fir needles and absence in Douglas-fir needle callus. *Biochem. Biophys.* 208, 431-439
- Snow M.J., Manley-Harris M. (2004)**. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chem.* 84, 145-147
- Sojka C. (2005)**. Eigenschaften und antimikrobielle Wirksamkeit von β -Triketonen in ätherischen Ölen der Myrtaceae. *Dissertation*. Hamburg. Universität Hamburg
- Sporns P., Plhak L., Friedrich J. (1992)**. Alberta honey composition. *Food Res. Int.* 25, 93-100
- Stadelmeier M., Bergner K.G. (1986)**. Proteine des Bienenhonigs. VII. Eigenschaften und Herkunft der Honigamylase. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182, 196-199
- Stephens J.C. (2006)**. The factors responsible for the varying levels of UMF in manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Dissertation*. Hamilton, Neuseeland. University of Waikato
- Stephens J.C., Schlothauer R.C. (2010)**. Honey analysis for determining age, fortification with methylglyoxal, region, and plant species. *PCT Int. Appl.* WO 2010/082845 A1
- Stephens J.M., Schlothauer R.C., Morris B.D., Yang D., Fearnley L., Greenwood D.R., Loomes K.M. (2010)**. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chem.* 120, 78-86
- Stephens J.M.C., Molan P.C., Clarkson B.D. (2005)**. A review of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) in New Zealand. *NZ J. Botany* 43, 431-449
- Stinson E.E., Subers M.H., Petty J., White J.W. Jr. (1963)**. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Archives Biochem. Biophys.* 89, 6-12

- Takagi M.**, Mizutani M., Tsuchiva K. (1972). Thin-layer chromatographic studies on quinoxalines formed from carbohydrates by reaction with o-phenylenediamine in alkaline solution, with special emphasis on their specific color development on substituent structure. *Bulletin Univ. Osaka Prefect., Series B: Agric. Life Sci.* 24, 43-48
- Tan S.T.**, Holland P.T., Wilkins A.L., Molan P.C. (1988). Extractives from New Zealand honeys. 1. White clover, manuka, and kanuka honeys. *J. Agric. Food Chem.* 36, 453-460
- Teixidó E.**, Núñez O., Santos F.J., Galceran M.T. (2011). 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem.* 126, 1902-1908
- Thornalley P.J.** (1993). The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 14, 287-371
- Thornalley P.J.** (1996). Pharmacology of methylglyoxal: Formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification – a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmac.* 27, 565-573
- Thornalley P.J.** (1998). Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase-system: involvement in disease mechanism and antiproliferative activity of glyoxalase inhibitors. *Chemico-Biol. Interactions* 111, 137-151
- Thornalley P.J.**, Langborg A., Minhas H.S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-desoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 344, 109-116
- Thornalley P.J.**, Waris S., Fleming T., Santarius T., Larkin S.J., Winklhofer-Roob B.M., Stratton M. R., Rabbani N. (2010). Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res.* 38, 5432-5442
- Tonks A.**, Cooper R.A., Price A.J., Molan P.C., Jones K.P. (2001). Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. *Cytokine* 14, 240-242
- Tosi E.**, Martinet R., Ortega M., Lucero H., Ré E. (2008). Honey diastase activity modified by heating. *Food Chem.* 106, 883-887
- Trautvetter S.**, Koelling-Speer I., Speer K. (2009). Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie* 40, 140-150
- Turkmen N.**, Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu Y.S. (2006). Effects of prolonged heating on anti-oxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* 95, 653-657
- Val A.**, Huidobro J.F., Sánchez M.P., Muniategui S., Fernández-Muiño M.A., Sancho M.T. (1998). Enzymatic determination of galactose and lactose in honey. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1381-1385
- van Epenhuisen K.C.W.**, Henderson R.C., Carpenter A., Burge G.K. (2000). The rise and fall of manuka blight scale: a review of the distribution of *Eriococcus orariensis* (Hemiptera: Eriococcidae) in New Zealand. *NZ Entomologist* 23, 67-70
- VanderJagt D.L.**, Robinson B., Tayler K.K., Hunsaker L.A. (1992). Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto-reductase – Aldose reductase, methylglyoxal and diabetic complications. *J. Biol. Chem.* 267, 4364-4369
- Vanhanen L.P.**, Emmertz A., Savage G.P. (2011). Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chem.* 128, 236-240

- Venugopal S., Devarajan S. (2011).** Estimation of total flavonoids, phenols and antioxidant activity of local and New Zealand manuka honey. *J. Pharm. Res.* 4, 464-466
- Venugopal S.C., Chanda B., Vaillancourt L., Kachroo A., Kachroo P. (2009).** The common metabolite glycerol-3-phosphate is a novel regulator of plant defense signaling. *Plant Sign. Behavior* 4, 746-749
- Villamiel M., del Castillo M.D., Corzo N., Olano A. (2001).** Presence of furosine in honeys. *J. Sci. Food Agric.* 81, 790-793
- von der Ohe K., Dustmann J.H., von der Ohe K. (1991).** Prolin als Kriterium der Reife des Honigs. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 87, 383-386
- Vorlová L., Borkovcová I., Kalábová K., Večerek V. (2006).** Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *J. Food Nutr. Res.* 45, 34-38
- Wahdan H.A.L. (1998).** Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 26, 30-35
- Waites M.J., Quayle J.R. (1980).** Dihydroxyacetone: a product of xylulose 5-phosphate-dependent fixation of formaldehyde by methanol-grown *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 118, 321-327
- Wallace A., Eady S., Miles M., Martin H., McLachlan A., Rodier M., Willis J., Scott R., Sutherland J. (2010).** Demonstrating the safety of manuka honey UMF[®] 20+ in a human clinical trial with healthy individuals. *Brit. J. Nutrition* 103, 1023-1028
- Wang T., Zhu X.K., Xue X.T., Wu D.Y. (2012).** Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr. Polymers* 88, 75-83
- Wardle P. (1991).** Vegetation of New Zealand. Cambridge University Press Cambridge New York Port Chester Melbourne Sydney
- Warenverein Hamburger Börse e.V. (2011).** Bundesverband des Außen- und Großhandels, Jahresbericht 2010 (Stand Juni 2012), www.waren-verein.de
- Weigel K.U. (2004).** α -Dicarbonyl in Lebensmitteln und glucosehaltigen Lösungen der Peritonealdialyse. *Dissertation*, Technische Universität Dresden
- Weigel K.U., Opitz T., Henle T. (2004).** Studies on the occurrence and formation of 1,2 dicarbonyls in honey. *Eur. Food Res. Technol.* 218 (2), 147-151
- Weston R.J. (2000).** The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chem.* 71, 235-239
- Weston R.J., Brocklebank L.K. (1999).** The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chem.* 64, 33-37
- Weston R.J., Brocklebank L.K., Lu Y (2000).** Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem.* 70, 427-435
- White J.W. (1978).** Honey. *Advances in Food Res.* 24, 287-374
- White J.W., Kushnir I., Subers M.H. (1964).** Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technol.* 18, 153-156
- White J.W., Riethof M.L., Kushnir I. (1961).** Composition of honey. VI. The effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content. *J. Food Sci.* 26, 63-71

- White J.W., Rudyj O.N. (1978).** The protein content of honey. *J. Apic. Res.* 17, 234-238.
- White J.W., Subers M.H., Schepartz A.I. (1963).** The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* 73, 57-70
- White J.W.Jr., Hoban N. (1959).** Composition of honey. IV. Identification of the disaccharides. *Archives Biochem. Biophys.* 80, 386-392
- White J.W.Jr., Maher J. (1953).** Transglucosidation by honey Invertase. *Archives Biochem. Biophys.* 42, 360-367
- Wieslander A., Andrén A., Nilsson-thorell C., Muscalu N., Kjellstrand P., Rippe B. (1995a).** Are aldehyds in heat-sterilized peritoneal dialysis fluids toxic *in vitro*? *Peritoneal Dial. Int.* 15, 348-452
- Wieslander A.P., Deppisch R., Svensson E., Forsbäck G., Speidel R., Rippe B (1995b).** *In vitro* biocompatibility of a heat-sterilized, low-toxic, and less acidic fluid for peritoneal dialysis. *Peritoneal Dial. Int.* 15, 158-164
- Windsor S., Pappalardo M., Brooks P., Williams S., Manley-Harris M. (2012).** A convenient new analysis of dihydroxyacetone and methylglyoxal applied to Australian *Leptospermum* honeys. *J. Pharm. Phyto.* 4, 6-11
- Winkler F.J., Schmidt H.L. (1980).** Einsatzmöglichkeiten der ¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171, 85-94
- Won S., Lee D., Ko S.H., Kim J., Rhee H. (2008).** Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Res. Int.* 41, 952-956
- www.comvita.com
- www.dsmz.de
- Yadav S.K., Singla-Pareek S.L., Ray M., Reddy M.K., Sopory S.K. (2005).** Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 337, 61-67
- Yamaguchi M., Ishida J., Xuan Z.X., Nakamura A., Yoshitake T. (1994).** Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, and 2,3-pentanedione in fermented foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chrom.* 17, 203-211
- Yao L., Datta N., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., Martos I., Singanusong R. (2003).** Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem.* 81, 159-168
- Zakrzewska I., Prokopowicz J., Worowski K., Skrzydlewska E., Puchalski Z., Piotrowski Z. (1989).** Low molecular organic inactivators in differentiating organ origin of alpha-amylase in humans. Part I. *Mater Med. Pol.* 21, 274-276
- Zalibera M., Staško A., Šlebodová A., Jančovičová V., Čermáková T., Brezová V. (2008).** Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. *Food Chem.* 110, 512-521

ZZuIV (1998). Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung), vom 29.01.1998 (BGBl. I S. 230, 231), zuletzt geändert durch Art. 3 der Verordnung vom 21.05.2012 (BGBl. I S. 1201)

Wissenschaftliche Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalpublikationen

Atrott J., Henle T. (2009). Methylglyoxal in manuka honey – Correlation with antibacterial properties. *Czech. J. Food Sci.* 27, 163-165

Atrott J., Haberlau S., Henle T. (2012). Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* 361, 7-11

Beiträge auf Tagungen, Poster

Atrott J., Raddatz H., Henle T. (2008). Honig und andere Bienenprodukte als antioxidativ wirksame Kosmetikinhaltsstoffe. *Posterbeitrag*, 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern

Atrott J., Henle T. (2009). Methylglyoxal in manuka honey – Correlation with antibacterial properties. *Posterbeitrag*, 6th Int. Conference on Chemical Reactions in Food, Prag

Atrott J., Henle T. (2009). Methylglyoxal in Manuka-Honig – Korrelation mit antibakteriellen Eigenschaften. *Posterbeitrag*, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin

Atrott J., Haberlau S., Kunze S., Henle T. (2010). Analytische Charakterisierung von Manuka-Honigen. *Posterbeitrag*, 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart

Atrott J., Haberlau S., Kunze S., Henle T. (2011). Carbonylverbindungen in Manuka-Honig. *Vortrag*, 21. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost der LChG, Halle/S

Atrott J., Scheer A., Henle T. (2011). Ist eine Neubewertung von HMF und Diastase als Qualitätsparameter für Manuka-Honig notwendig? *Posterbeitrag*, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle/S.

Atrott J., Henle T. (2012). Carbonyl compounds in manuka honey and related consequences. *Posterbeitrag*, 11. Int. Symposium on the Maillard Reaction, Nancy

Danksagung

Zunächst möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Henle, Professur für Lebensmittelchemie der TU Dresden, für die Möglichkeit, dieses interessante und vielseitige Thema bearbeiten zu können, sowie für das dabei entgegengebrachte Vertrauen, die stetige Unterstützung und die vielen konstruktiven Anregungen danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Gerold Barth, Professur für allgemeine Mikrobiologie der TU Dresden, für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Manuka Health Ltd., Neuseeland, danke ich für die finanzielle und die materielle Unterstützung im Rahmen des Projekts. Für die Möglichkeit, den „Entstehungsort“ des Honigs kennenlernen zu dürfen, und für die freundliche Aufnahme vor Ort möchte ich Herrn Kerry Paul und den Mitarbeitern in Te Awamutu herzlich danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Gerold Barth und Herrn Dr. Stephan Mauersberger, Professur für allgemeine Mikrobiologie der TU Dresden, sowie Herrn Prof. Enno Jacobs und Herrn Dr. Percy Schröttner, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene / Institut für Virologie der TU Dresden, für die Unterstützung bei der Bearbeitung mikrobiologischer Aspekte. Frau Prof. Tanja Schwertle und den Mitarbeitern der Professur für Lebensmittelchemie und Toxikologie der TU Berlin sei für die Einführung in die Zellkultur gedankt. Frau Prof. Sabine Kulling und Frau Dr. Stefanie Wiese danke ich für die Hilfe bei den an der Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaften, durchgeführten Untersuchungen. Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau Karla Schlosser für die Durchführung der Aminosäureanalysen, Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz für die Aufnahme von Massenspektren sowie Frau Dr. Margit Gruner für die Aufnahme von NMR-Spektren.

Für ihr Engagement im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeiten möchte ich Frau Christiane Bendler, Frau Johanna Fröhlich, Frau Susan Kunze, Frau Susann Fellendorf, Frau Steffi Haberlau, Frau Josephin Block und Frau Anne Scheer danken. Zudem möchte ich Frau Anne Kühne, Frau Susann Lindner und Frau Janine Schlafke für ihre zuverlässige Mitarbeit im Zuge ihrer SHK-Tätigkeit danke sagen.

Allen Mitarbeitern der Lebensmittelchemie sei ein herzliches Dankeschön gewidmet für die freundliche Aufnahme, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft sowie die diversen amüsanten und leckeren „Runden“. Meiner „410er-Laborfamilie“ danke ich für die gute Zusammenarbeit und konstruktiven Diskussionen, und dass der Humor trotz allem nicht zu kurz kam. Darüber hinaus geht ein extra Dank an Herrn Dr. Michael Hellwig für das Korrekturlesen im Vorfeld und die mannigfaltigen Anregungen hierbei.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und dabei insbesondere meinen Eltern für all ihre Unterstützung auf diesem Weg sowie meinen Freunden für offene Ohren und geistigen Ausgleich. Meinem „Komplizen“ Frank möchte ich von Herzen für den Rückhalt und die aufmunternden Worte in den Phasen des Zweifels, das Ertragen aller (Ver-)Stimmungen und die Hilfe bei technischen oder organisatorischen Problemen danken.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Henle im Zeitraum von Oktober 2007 bis September 2012 angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011 erkenne ich in allen Teilen an. Weiterhin versichere ich, dass bisher kein erfolgloses, früheres Promotionsverfahren stattgefunden hat.

Ort, Datum

Unterschrift