

## FREIE AMINOSÄUREN, QUALITATIV BESTIMMT IN EINIGEN BLÜTEN-WALD-UND MISCHHONIGEN

### *Détermination qualitative des acides aminés libres dans quelques miels de fleurs, miels de miellat et miels mixtes*

---

Edith KULLMANN

*Forstzoologisches Institut, Freiburg \**

---

#### SUMMARY

##### QUALITATIVE DÉTERMINATION OF FREE AMINO ACIDS IN SOME HONEYDEW HONEYS, MIXED HONEYS AND HONEYS FROM FLOWERS

The purpose of the analysis was to find out the variety of amino acids in blossom-, forest- and mixed-honeys. The qualitative analyses of the honeys for free amino acids were made by paperchromatography. This method enabled to prove 18 amino acids; in the honeys tested, however, a maximum of 16 amino acids was found. Methionine and tryptophan were lacking.

A difference between blossom- and forest-honey came out by the lack of cystine, glycine and histidine in blossom-honey whereat, however, rarely al 3 amino acids mentioned above were lacking in one sample.

Only in *Trifolium pratense*-honey asparagin could be found. The highest number of amino acids identified in one fixed honey was 15, this was relevant only in 1 sample of *Castanea sativa*-honey and in 3 samples of *Pinus sylvestris*-honey and all mixed-honeys. For the first time the 2-methyl-alanine ( $\alpha$ -amino-iso-butyric acid) could be proved in several honeys.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Zweck der Untersuchung war, das Spektrum der Aminosäuren von Blüten-, Wald- und Mischhonigen kennenzulernen. Die Untersuchungen der Honige auf freie Aminosäuren wurde qualitativ mit Hilfe der Papierchromatographie ausgeführt. Diese Methode gestattete den Nachweis von 18 Aminosäuren; in den Honigen konnten maximal 16 analysiert werden; es fehlten Methionin und Tryptophan.

Ein Unterschied zwischen Blüten- und Waldhonig ergab sich durch das Fehlen von Cystin, Glycin und Histidin bei Blütenhonigen, wobei aber selten alle 3 der genannten Aminosäuren gleichzeitig fehlten.

\* Forstzoologisches Institut der Universität Freiburg, 78 Freiburg/Br., Bertholdstrasse 17.

Allein im *Trifolium pratense*-Honig war Asparagin auffindbar. Es waren höchstens 15 Aminosäuren in einem bestimmten Honig nachweisbar; dies trifft für 3 Proben der *Pinus sylvestris*-Honige, 1 Probe des *Castanea sativa*-Honigs und für alle Mischhonige zu.

Erstmals wurde der Nachweis von 2-Methylalanin ( $\alpha$ -Amino-isobuttersäure) in verschiedenen Honigen erbracht.

## I. — EINLEITUNG

Honige verschiedener Herkunft (von Nektarspendern bzw. Honigtauerzeugern) werden meist nach mikroskopischer Prüfung ihrer Pollen-, Algen- und Pilzsporen- Anteile unterschieden. Die elektrische Leit-fähigkeit sowie der bakterizide Hemmtest (BUCHNER 1966, 1967) ermöglichen weitere zuverlässige Trennungen. Die chemischen Bestandteile des Honigs und Honigtaues wurden im Bereich der Kohlenhydrate gut aufgeklärt (MAURIZIO 1959, 1962).

Die qualitative Bestimmung freier Aminosäuren im Honig sollte zunächst als Hinweis auf geplante quantitative Analysen gelten. 1961, zur Zeit dieser Untersuchungen, war mir nur die Arbeit von BAUMGARTEN und MÖCKESCH (1956) zugänglich. Aus einer Aufstellung über den Nachweis einzelner Aminosäuren im Honig bei BERGNER und HAHN (1972) geht hervor, daß KOMAMINE (1960) darüber gearbeitet hat und gleich mir (1961) Asparagin im Honig fand. Weitere Asparagin- Nachweise werden aufgeführt bei CURTI und RIGANTI (1966) sowie BERGNER und HAHN (1972). Da ich Asparagin nur im *Trifolium pratense*-Honig nachweisen konnte, ließ der Vergleich mit den genannten Arbeiten das Ergebnis auch 1972 noch erwähnenswert erscheinen.

## II. — METHODIK

### 2.1. — Material

Untersucht wurden

- 14 Blütenhonige, davon 7 aus *Trifolium pratense*-Tracht, die bereits pollen- und zuckeranalytisch geprüft waren (MAURIZIO 1949, 1959); weitere 7 aus der Sammlung des Tierhygienischen Institutes, Abt. Bienenkunde, Freiburg/i. Br., die innerhalb der Institutsserien pollenanalytisch untersucht waren; diese sind unter Weglassung der Einzel- pollen in Tabelle 1 aufgeführt,
- 10 Waldhonige, davon 6 aus der vorgenannten Sammlung; diese und die oben erwähnten Proben sind auf ihre bakterizide Wirkung getestet worden (BUCHNER 1966, 1967); je 2 aus *Pinus sylvestris*- und *Picea abies*- Trachtgebieten, jedoch nicht pollenanalytisch kontrolliert,
- 4 Mischhonige von Imkern; nicht mikroskopisch überprüft,
- 1 Zuckerfütterungshonig,
- 2 Honigtaue, die im Labor von der Buchenkrebs-Baumlaus (*Lachnus exciccator* Alt. = *Schizodryobius pallipes* Htg.) bzw. der Zirbelkiefern-Rindenlaus (*Cinaria cembrae* Chol.) gewonnen waren.

TAB. 1. — Pollenanalysen und Werte des Bakterizidtests der Honigproben aus dem Tierhygienischen Institut, Abt. Bienenkunde, Freiburg/Br.

TABL. 1. — Analyse pollinique et valeurs du test d'activité bactéricide des échantillons de miel provenant de l'Institut vétérinaire, section apicole, de Fribourg en Br.

Honige	Nr.	Zeichen HU	Ernte jahr	LP	BP	Bakteri- * zidtest nach BUCHNER (1966-1967)
Miels	N°	Référence HU	Année de récolte			Test d'activité bactériocide selon BUCHNER (1966, 1967)
Rotklee- Trèfle violet . . . . . <i>Trifolium pratense</i>	1	871	1959	B 90 %	—	1 : 8
Löwenzahn- Pissenlit . . . . . <i>Taraxacum officinale</i>	1 2	766 765	1959 1959	— —	d 30 % g 17 % k 22 % b, l, m	0 0
Heide- Bruyère . . . . . <i>Calluna vulgaris</i>	1 2	827 830	1953 1958	I 80 % —	— a, c	1 : 8 1 : 8
Edelkastanie- Châtaignier . . . . . <i>Castanea sativa</i>	1 2	799 800	1959 1959	J 95 % J 95 %	— —	1 : 8 1 : 16
Kiefer- Pin . . . . . <i>Pinus sylvestris</i>	1 2	232 651	1957 1959	— —	— f, h, n	1 : 32 1 : 8
Fichte- Épicea . . . . . <i>Picea abies</i>	1 2	508 686	1958 1959	C 46 % A	— —	1 : 16 1 : 16
Tanne- Sapin . . . . . <i>Abies alba</i>	1 2	869 1180	1959 1960	— —	a, e f	1 : 32 fehlt- manque

Zu TAB. 1 — TABL. 1 (Explications)

LP : Leitpollen A-N LP : Pollen dominant	BP : Begleitpollen, a-n BP : Pollens d'accompagnement	EP : Einzelpollen sind weggelassen EP : On ne tient pas compte des Pollens isolés	
		LP	BP
Leguminosae	<i>Trifolium repens</i>	A	a
Rosaceae	<i>Trifolium pratense</i>	B	b
Compositae	Obstbäume (Gruppe) Arbres fruitiers	C	c
Cruciferae	<i>Taraxacum officinale</i>	D	d
Umbelliferae	<i>Solidago spec.</i>	E	e
Liliaceae	<i>Cruciferae</i> (diverses)	F	f
Ericaceae	<i>Anthriscus</i> -Form	G	g
Formes diverses	<i>Asparagus officinalis</i>	H	h
	<i>Calluna vulgaris</i>	I	i
	<i>Castanea sativa</i>	J	j
	<i>Ranunculus spec.</i>	K	k
	<i>Phyteuma nigrum</i>	L	l
	<i>Sambucus spec.</i>	M	m
	<i>Papaver spec.</i>	N	n

\* Vergleiche Fußnote Seite 30.  
Cf. note en bas de la page 30.

## 2.2. — Testsubstanzen

Die nachstehenden Aminosäuren (Reinsubstanzen von Th. Schuchardt, München und E. Merck, Darmstadt) wurden als 0,5 %ige wässrige Lösungen mit 6 µl fassenden Glaskapillaren als Vergleichssubstanzen aufgetropft.

Die angegebenen Färbungen gelten für die Lösungsmittel Butanol/Eisessig/Wasser, 4/1/1 und 4/1/5 gemischt. Die Färbungen in Phenol sind nicht angegeben.

1) Alanin	(Ala)	blau
2) 2-Methylalanin ( $\alpha$ -Amino-iso-buttersäure)	(nicht verzeichnet)	blau
3) Arginin	(Arg)	blau
4) Asparagin	(Asn)	orange
5) Asparaginsäure	(Asp)	grün bis blaugrün
6) Cystin	(Cys-S) 2	rosa bis hellblau
7) Glutaminsäure / Threonin ungetrennt	(Glu / Thre)	blau
8) Glycin (Glykokoll)	(Gly)	braun
9) Histidin	(His)	braun
10) Leucin / Isoleucin ungetrennt	(Leu / Ileu)	blau
11) Lysin	(Lys)	blau
12) Phenylalanin	(Phe)	hellblau
13) Prolin	(Pro)	oliv (grüngelb)
14) Serin	(Ser)	blau
15) Tyrosin	(Tyr)	grau
16) Valin	(Val)	blaublaß-blau
17) Methionin	(Met)	lila
18) Tryptophan	(Try)	braublau

2.3. — *Chemikalien und Geräte für*

- Säule = Glasrohr m. Hahn (Glaswolle) 30 cm lang, 0,9 cm  $\varnothing$  Ionenaustauscher I (stark saurer Kationenaustauscher) Austauschkapazität ca 4,5 mval/g, Merck
- |                |                 |
|----------------|-----------------|
| Äthanol        | 80 % ig         |
| Salzsäure      | 1 N und 10 % ig |
| Ammoniaklösung | 10 % ig         |
- Erlmeyerkolben, Tropftrichter
- Destillation = Schlifffdest. f. Halbvakuum  
Aeromat Standart-Laborkompressor (Saugluft 660 mm QS)
- Durchlaufchromatographie  
Butanol-(1) (n-Butylalkohol) f. Chromatographie  
Essigsäure min. 96 % ig f. Chromatographie
- Sprühreagenz nach Diss. MERTEN.  
Ninhydrin, Aceton, 2,4 - Lutidin f. Chromatographie (0,5 % ige Ninhydrinlsg. in Aceton, je 100 ml 5 ml Lutidin)
- Sprühreagenz nach CRAMER (1958).  
(0,2 % ige Ninhydrinlösung in 95 % igem Butanol u. 5 % 2 N Essigsäure)  
Glasgefäße 50  $\times$  50  $\times$  20 cm mit Trog u. Einsatz
- Aufsteigende Chromatographie, eindimensional  
Phenol krist. (org. Phase) f. Chromatographie  
Natriumcyanid gepulvert  
Standzylinder ca 40 cm hoch  
Scheidetrichter
- Sonstiges : Abzug, Trockenschrank, Eisschrank, Tourenzentrifuge, Handzuckerrefraktometer nach Zeiß, Glaskapillare 6  $\mu$ l, Whatman,-Papier-Bogen 46  $\times$  46 cm.

2.4. — *Vorbereitung des Untersuchungsmaterials*

Mittels Kationenaustauscher wurden die Zucker aus der wässrigen Honig-oder Honigtäulösung entfernt. Der Reproduzierbarkeit und der Aufnahmekapazität der Säule wurde durch die Einstellung der Honiglösung auf 20 % Trockensubstanz mit dem Handzuckerrefraktometer nach Zeiß entsprochen.

Die Eiweißfällung wurde durch Zugabe hochprozentigen Äthanol nach DÖRFEL in LINSKENS (1959) ausgeführt.

2.5. — *Reinigung und Anreicherung der Aminosäuren am Kationenaustauscher*

In Anlehnung an die Methoden, die G. ZIMMERMANN, Staatsexamenskandidat (1961) im Botanischen Institut der T. H. Darmstadt unter Prof. ZIEGLER, zur Bestimmung von Aminosäuren in Siebröhrensäften verwendete, verfuhr ich mit allen Honigen und Honigtäuen wie folgt :

*Zuckereleuierung.*

Ionenaustauscher I Merck (stark saurer Kationenaustauscher) mit 300 ml 10 % iger Salzsäure versetzen, mit 80 % igem Äthanol auf pH 6 gewaschen ca 12 Stunden stehen lassen. Die Analysenlösung pH 3 (saurer als Säule) wird innerhalb von 1 Stunde mit 100 ml Aqua dest. (0,2 ml/Min.) von den Zuckern befreit und mit Ninhydrin-Reagenz die Aminosäure-freiheit festgestellt.

*Aminosäureleuierung.*

Aminosäuren mit 300 ml NH<sub>3</sub> und 150 ml Aqua dest. in ca 5 Std. eluiert. Bei 600 bis 620 mm QS Saugluft (Halbvakuum) bis auf 1 ml Volumen eingedampft.

2.6. — *Papierchromatographie*

Ein Eluat liegt vor, enthält alle Aminosäuren.

Durchlaufchromatographie auf W<sub>1</sub>-Papier 46  $\times$  46 cm, Verlust durch Papierpiervorbereitung 10-12 cm. Je Bogen 13 Tropfen, die mit 6  $\mu$ l Glaskapillaren aufgebracht wurden. Davon

sind 2 Tropfen Honiganalysengemisch mit je 30  $\mu$ l pro Tropfen und 11 Tropfen der Testgemische mit 30  $\mu$ g pro Aminosäure. Laufzeit 22 Stunden.

Lösungsmittelgemisch Butanol/Eisessig/Wasser, 4/1/5 trennt besser in Startpunktnähe und 4/1/1 in Startpunktferne.

Jede Honigprobe wurde darum mit beiden Lösungsmittelgemischen getestet. Sprühreagenz (MERTEN 1963) 0,5 % iges Ninhydrin in Aceton mit Lutidinzusatz (je 100 ml 5 ml Lutidin).

Vor und nach dem Besprühen 30-60 Minuten im Luftstrom aufhängen. Trocknung ca 4 Minuten bei 62 °C.

Als sicher anwesend gilt eine Aminosäure nach 8-17 maliger Wiederkehr. Asparaginsäure, hellgrün gefärbt, verblaßt besonders rasch, dagegen waren Asparagin mit orangefarbenem und Prolin mit olivfarbenem Fleck immer sehr deutlich und anhaltend sichtbar.

Glutaminsäure und Threonin konnten nicht voneinander getrennt bestimmt werden, ebenso war es mit Leucin und Isoleucin.

Die aufsteigende Chromatographie, eindimensional, mit Phenol und Natriumcyanid (Org. Phase) (CRAMER 1958) wurde im Standzylinder auf einer Papierrolle (Zone 34 cm) ausgeführt. Sie eignete sich nur zur Nachprüfung einzelner Aminosäuren.

### III. — ERGEBNISSE

#### 3.1. — *Aminosäuren im Honig*

In allen 28 untersuchten Honigen aus Blüten-, Wald- und Mischtracht, die als Blüten-, Wald- und Mischhonige aufgeführt sind, konnten qualitativ nachgewiesen werden :

Alanin, Glutaminsäure/Threonin (ungetrennt), Leucin/Isoleucin (ungetrennt), Lysin (mit 2 Ausnahmen), Phenylalanin, Prolin, Serin (mit 3 Ausnahmen), Tyrosin und Valin. Folgende Aminosäuren waren nicht in allen Honigen nachweisbar : 2- Methyl- alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystin, Glycin und Histidin.

Die letztgenannten 3 Aminosäuren eigneten sich durch ihr unterschiedliches Fehlen zur Unterscheidung von Blüten- und Waldhonig.

Asparagin, das Halbamid der Asparaginsäure, wurde zu einem spezifischen Nachweis für *Trifolium pratense*- Honig.

Von den 18 nachweisbaren Aminosäuren konnten 16 in den Honigen aufgefunden werden. Methionin und Tryptophan bleiben davon ausgenommen.

Die Analyse ergab als Durchschnittszahl aus 14 Proben der Blütenhonige 12 Aminosäuren, aus 10 Proben der Waldhonige 14 Aminosäuren und aus 4 Proben der Mischhonige 15 Aminosäuren.

#### 3.2. — *Blütenhonige*

Alle Blütenhonige wiesen im Vergleich zu den Chromatogrammen der Waldhonige eine schwächere Färbung der Aminosäuren auf. Im Blütenhonig

fehlten Cystin, Glycin, Histidin im Wechsel, jedoch nie alle drei zu gleicher Zeit, außer bei einer Probe von *T. pratense* (Tab. 2, A 534). Von den 14 Blütenhonigen (Tab. 2) fallen die Proben *T. pratense* A 485 und *Castanea sativa* HU 800 nicht unter diese Definition; es wurde Cystin, Glycin und Histidin analysiert. Die Aussage gilt für 11 Honige, davon waren 7 mal die Kombination Glycin/Histidin, 2 mal Cystin/Glycin und 2 mal Cystin allein nicht nachweisbar. 2-Methyl-alanin ( $\alpha$ -Amino-iso-buttersäure), meines Wissens bisher in Honigen noch nicht festgestellt, ließ sich in 8 von 14 Proben auffinden. Asparagin war nur in *T. pratense*-Honig nachweisbar, und zwar in 6 von 8 Proben.

### *Honige aus Trifolium pratense-Tracht*

Der erste zur Untersuchung gekommene Honig (Tab. 2, HU 871) aus Boxtal bei Wertheim in Nordbaden (1959) zeigte im Chromatogramm alle Aminosäuren ganz schwach an, deutlich war nur ein orangefarbener Fleck. Zur besseren Identifizierung kam dieser Honig in doppelter Konzentration auf die Säule. Dieser bisher nie erschienene Fleck erwies sich als Asparagin; ihn konnte ich in 6 der 8 *T. pratense*-Proben in derselben Deutlichkeit wiederfinden. Um eine Erklärung für die Anwesenheit von Asparagin zu haben, verglich ich Nektare von *T. pratense*, *T. repens* und *Vicia spec.* mit denen einer *Senecio spec.* und einer *Impatiens spec.* Da es nur auf diesen einzelnen Nachweis ankam, nahm ich vorbereitetes Chromatographiepapier mit auf die Wiese hinaus. Einmal drückte ich den Nektar der Blüten direkt auf dem Papier aus, zum anderen löste ich mit Aqua dest. den Nektar aus den Blüten heraus und tropfte ihn mit einer Kapillare auf. Die Chromatogramme zeigten bei Nektar von *T. pratense* und *T. repens* sowie von *Vicia spec.*, den Leguminosen, eindeutig Asparagin im Gegensatz zu dem Nektar von *Senecio spec.* und *Impatiens spec.*, bei denen der Nachweis negativ verlief.

Aus diesen wenigen Untersuchungen an *T. pratense*-Honigen und verschiedenen Nektaren läßt sich nicht sicher schließen, daß bei vermehrtem Stickstoffgehalt, wie er in Leguminosen anzutreffen ist, auch überall Asparagin zu finden sein müßte. Daß aber Asparagin bei einem erhöhtem Stickstoffhaushalt anwesend sein kann, geht aus folgendem Zitat hervor, das ich im Lehrbuch von STRASBURGER, 1958, S. 238 fand: « Bei den meisten Pflanzen aber spielt die schon früher genannte Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure die Rolle eines Ammoniakentgifters, indem sich die entsprechenden Amide Glutamin und Asparagin bilden, die sich oft in größerer Menge in der Pflanze ansammeln und offenbar auch transportiert werden können (Amidtyp). Auch ihre  $\text{NH}_2$ -Gruppen können leicht zu neuen Synthesen von Aminosäuren wieder abgespalten und übertragen werden — — »

Es lagen 8 *T. pratense*-Honige zur Untersuchung vor (Tab. 2). Asparagin





Zu TAB. 2. — TABL. 2. (*Explications*)

		Herkunft der Honige Origine des miels	
<i>Trifolium pratense</i>	Nr. 1 .....	Boxtal bei Wertheim, Odenwald	Nordbaden Bade Schweiz Suisse
	Nr. 2 .....	Bern- Liebefeld	
	Nr. 3 .....	siehe	
	à bis	(MAURIZIO	
	Nr. 8 .....	1949, 1959)	
<i>Taraxacum officinale</i>	Nr. 1 .....	Illertissen	Schwaben Souabe Südbaden- Bade
	Nr. 2 .....	Waldau bei Neustadt	
<i>Calluna vulgaris</i>	Nr. 1 .....	Celle	Lüneburger Heide Lande du Lunebourg
	Nr. 2 .....	Celle	
<i>Castanea sativa</i>	Nr. 1 .....	Jockgrimm	Pfalz- Palatinat Pfalz- Palatinat
	Nr. 2 .....	Dürkheim	

wurde sowohl in der Probe aus Nordbaden (HU 871) wie in der frisch geernteten Probe (2198) aus Bern- Liebefeld, Schweiz und in den Honigen aus der Sammlung MAURIZIO aufgefunden. Aus dieser Sammlung stammen allerdings auch die beiden Proben, denen Asparagin fehlt (A 484 und A 485). Die Probe A 485 wurde schon erwähnt; sie fiel nicht unter die Definition, die sich für die Blütenhonige ergab, sie hebt sich außerdem aus diesem Rahmen noch durch den Gehalt von 14 Aminosäuren heraus. Vergleicht man die *T. pratense*- Proben mit den übrigen Blütenhonig-Proben, so fällt auf, daß Arginin nur bei *T. pratense*-Honigen fehlt und zwar bei 4 von 8 Proben. 2- Methyl-alanin und Asparaginsäure war jeweils in 3 Fällen nicht nachweisbar; Lysin fehlte 2 mal innerhalb der *T. pratense*-Honige.

Die Durchschnittszahl der gefundenen Aminosäuren beträgt unter Berücksichtigung von Asparagin für *T. pratense*- Honig allein und für Blütenhonige insgesamt 12,5.

#### *Honige aus Taraxacum officinale*-Tracht

Die Probe aus Illertissen, Schwaben (Tab. 2, HU 766) wurde ein zweites Mal mit doppelter Ausgangskonzentration über die Säule geschickt. Das Erscheinungsbild zeigte keinen Unterschied, die Nachweise waren intensiver gefärbt. Die Probe HU 765 aus Waldau bei Neustadt im Schwarzwald, Südbaden, hat mit der ersten Probe das Erntejahr (1959), das Fehlen von 2- Methylalanin und den Nachweis von 12 Aminosäuren gemeinsam. Unterschiedlich wiesen sie sich als Blütenhonige aus, indem der ersten Probe Cystin allein und der zweiten Probe die Kombination Glycin/Histidin fehlte. Der *T. officinale*-Probe HU 766 fehlte außerdem Asparaginsäure, als einzigem der 6 Blütenhonige aus *T. officinale*-, *Calluna vulgaris* und *Castanea sativa*- Tracht.

*Honige aus Calluna vulgaris-Tracht*

Die Proben aus der Lüneburger Heide (Tab. 2, HU 827 und HU 830) Ernte 1953 und 1958, unterscheiden sich, indem der ersten Probe die Kombination Cystin/Glycin, der zweiten Probe Glycin/Histidin und außerdem Serin fehlen. So wurden einmal 13, das andere Mal 12 Aminosäuren analysiert.

*Honige aus Castanea sativa-Tracht*

Beide Proben sind aus den Edelkastanienbeständen der Pfalz und dem Erntejahr 1959. Die Probe HU 799 weist nur 11 Aminosäuren auf, es fehlen neben der Kombination Glycin/Histidin noch 2- Methyl-alanin und Serin. Im Gegensatz dazu konnten in der Probe HU 800, 15 Aminosäuren, die höchste Zahl der in den Honigen nachgewiesenen Aminosäuren, bestimmt werden.

Dieses Bild ergibt sich sonst nur bei Mischhonigen und in 3 von 10 Waldhonigen. Damit fällt diese Probe aus dem Rahmen der Blütenhonige heraus, obwohl die Pollenanalyse 95 % *Castanea sativa* als Leitpollen aufweist. Es liegt die Vermutung nahe, daß diese Probe Honigtauteile enthielt. Der angegebene Wert aus dem Bakterizidtest (Tab. 1) beträgt 1 : 16; er unterstützt somit diese Annahme\*.

3.3. — *Waldhonige*

Bekanntlich verarbeiten die Bienen den Honigtau, ein Ausscheidungsprodukt von Blatt-Rinden- und Schildläusen, zu Tauhonigen. Die Pflanze ist letztlich immer der Lieferant mit den Inhaltsstoffen der Siebröhrensäfte. Die bienenwirtschaftliche Bedeutung der Honigtauproduktion ist durch zahlreiche Arbeiten, namentlich aus unserem Institut, bekannt (WELLENSTEIN 1958, 1960, 1961, 1967). Letzterer äußerte sich z. B. (1961, S. 199) : « Die Honigtauerzeuger nehmen als Nahrungslieferanten eine Schlüsselstellung in der Waldlebensgemeinschaft ein, deren walddhygienische Bedeutung schwer in Zahlen auszudrücken ist, während sich ihr Gewicht für die Imkerei recht genau in Zahlen angeben läßt. Die mit ihrer Hilfe von den Bienen gesammelten Waldhonige lassen sich heute nach Kiefern-, Fichten-, Tannen- und Lärchenhonigen gliedern und auch medizinisch-therapeutisch von den Blütenhonigen unterscheiden. » 6 Unterscheidungsmerkmale für Honige aus Blüten- und Honigtautracht führt BUCHNER (1967) auf; neben der bakteriziden Wirkung ist es die Farbe, das mikroskopische Bild, der Gehalt an Kohlenhydraten und Mineralstoffen sowie die elektrische Leitfähigkeit.

\* Die Werte aus dem Bakterizidtest geben an, in welcher Verdünnung die Honiglösung den Testkeim *Staphylokokkus aureus* abtötet. Nach BUCHNER (1966) entwickeln Honigtauhonige im Durchschnitt eine bedeutend höhere antibakterielle Wirkung als Blütenhonige.



Zu TAB. 3 --- TABL. 3. — (Explications)

Waldhonige Miels de miellat		Herkunft der Honige Origine des miels	
<i>Pinus sylvestris</i>	Nr. 1 .....	Erlangen	Mittelfranken - Franconie
	Nr. 2 .....	Graben-Neudorf	Nordbaden - Bade
	Nr. 3 .....	Frankenstein	Pfalz - Palatinat
	Nr. 4 .....	Mannheim-Neckarau	Nordbaden - Bade N.
<i>Picea abies</i>	Nr. 1 .....	Götzingen, Odenwald	Nordbaden - Bade N.
	Nr. 2 .....	Bräunlingen bei Donaueschingen Schw.	Südbaden - Bade S.
	Nr. 3 .....	Herbertingen, Donau	Oberschwaben - Souabe
	Nr. 4 .....	Donaueschingen Schw.	Südbaden - Bade S.
<i>Abies alba</i>	Nr. 1 .....	Schauinsland Schw.	Südbaden - Bade S.
	Nr. 2 .....	Ohlsbach, Ortenau	Mittelbaden - Bade
Mischhonige	Nr. 1 .....	Neisen bei Daun	Eifel - Eifel
	Nr. 2 .....	Heddesbach, Odenwald	Nordbaden - Bade N.
	Nr. 3 .....	unbekannt	
	Nr. 4 .....	Freiburg/Br. Schw.	Südbaden - Bade S.
Trachtangaben der Mischhonige Origine botanique des miels mixtes			
Nr. 1 .....	} <i>Quercus spec.</i> und <i>Picea abies</i>		
Nr. 2 .....			
Nr. 3 .....	} <i>Trifolium pratense</i> und <i>Pinus sylvestris</i>		
Nr. 4 .....		} <i>Castanea sativa</i> , <i>Raphanus spec.</i> und <i>Picea abies</i> , <i>Abies alba</i>	

Aus den Waldhonigen (Tab. 3) konnten im Vergleich zu den Blütenhonigen die Aminosäuren in höherer Anzahl und mit verstärkter Farbintensität bestimmt werden. Asparagin allerdings wurde in keinem der Honige gefunden. Bei lo Waldhonigen fehlten in 2 Fällen 2 Methylalanin, Arginin und Asparaginsäure. Serin fehlte in einer Probe.

Die Werte aus dem Bakterizidtest (Tab. 1) sind für 5 von lo Proben vorhanden; 4 davon zeigen eine höhere antibakterielle Wirkung an als die aufgeführten Blütenhonige, ausgenommen die schon besprochene *Castanea*-Probe HU 800.

#### *Honige aus Pinus sylvestris-Tracht*

Obwohl nach Herkunft und Erntejahren sehr verschieden (siehe Tab. 3), wiesen bis auf das einmalige Fehlen von Serin in Probe HU 651 alle Proben 15 Aminosäuren auf.

#### *Honige aus Picea abies-Tracht*

Die ersten beiden der insgesamt 4 Proben sind aus Götzingen, Nordbaden, aus der Ernte 1958 und aus Bräunlingen bei Donaueschingen, Südbaden, Ernte

1959. Ihnen fehlte jeweils 1 Aminosäure, nämlich einmal 2- Methyl-alanin, zum anderen Arginin. Die weiteren beiden Honige haben das Erntejahr 1961 und das Fehlen von Asparaginsäure gemeinsam. Geerntet sind sie in Herbertingen / Donau und Donaueschingen, Südbaden. In allen 4 Proben konnten 14 Aminosäuren nachgewiesen werden.

#### *Honige aus Abies alba-Tracht*

Einer der beiden Honige wurde 1959 auf dem Schauinsland, Schwarzwald, Südbaden geerntet, es fehlte ihm Arginin. Der andere kam aus Ohlsbach, Ortenau, Mittelbaden aus der Ernte 1960; ihm fehlte 2- Methyl-alanin. In beiden Proben wurden 14 Aminosäuren sichtbar.

### 3.4. — *Mischhonige*

Mischhonige werden aus den Rohstoffen Nektar und Honigtau von den Bienen bereitet. Asparagin war in den 4 untersuchten Proben nicht nachweisbar, obwohl die Probe Nr. 3 (Tab. 3) aus *Trifolium pratense*- und *Pinus sylvestris*- Tracht gemischt ist. Die Proben Nr. 1 und Nr. 2 stammen aus der Ernte 1960, einmal aus Neisen bei Daun, Eifel, zum anderen aus Heddesbach, Odenwald, Nordbaden, aus *Quercus spec.* -und *Picea abies*- Tracht. Die Probe Nr. 4 ist aus 4 verschiedenen Trachten gemischt : *Castanea sativa*, *Raphanus spec.*, *Picea abies* und *Abies alba*. Die Probe wurde in Freiburg /Br., Südbaden, geerntet. In allen 4 untersuchten Mischhonigen war das Gesamtspektrum der 15 nachweisbaren Aminosäuren enthalten.

### 3.5 — *Zuckerfütterungshonig*

Der in einem Flugzelt von Bienen aus Zuckerlösung bereitete « Honig » enthielt die Aminosäuren Alanin, Arginin, Glycin, Histidin, Lysin, Prolin, Serin (und Tyrosin ?). Es fehlten die in allen anderen Honigen vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure /Threonin, Leucin /Isoleucin, Phenylalanin und Valin. Schlüsse auf die Herkunft der Aminosäuren läßt eine Einzelprobe jedoch nicht zu.

### 3.6. — *Honigtaue*

Zweige mit Lauskolonien wurden in großen Standzylindern im Labor für etwa drei Wochen frisch erhalten. Während dieser Zeit ließ sich auf darunter festgeschraubten Glasplatten der abtropfende Tau sammeln. Von zwei Lachniden-Arten waren völlig staubfrei Honigtaumengen nur zwischen 1- 2 ml zu

erhalten. Dies ist ungefähr die Hälfte der Menge, die zur Analysenlösung benötigt wird. Ich setzte darum die Säulen in halber Höhe an, um zu gleichen Ergebnissen zu kommen.

Der Honigtau der Buchenkrebsbaumlaus, *Lachnus exciccator* Alt., syn. *Schizodryobius pallipes* Htg. sah glasklar aus; in ihm konnten alle 15 Aminosäuren nachgewiesen werden (ohne Asparagin). Cystin und 2 Methyl-alanin bleiben fraglich, da sie nicht in regelmäßiger Wiederholung erschienen. Prolin war in allen Proben sichtbar, aber wesentlich schwächer als in allen Honigen, obwohl das Gesamtchromatogramm eine starke Färbung aufwies.

Der Honigtau der Zirbelkiefer-Rindenlaus, *Cinaria cembrae* Chol., sah milchig weiß aus. Er wies außer Asparaginsäure und 2- Methyl-alanin alle übrigen 13 Aminosäuren auf. Das Chromatogramm war ebenfalls ausgeprägt, jedoch Prolin stark sichtbar. Überraschenderweise wurde als 14. Aminosäure Asparagin sichtbar, das bisher nur im *Trifolium pratense*- Honig nachweisbar war.

Die Zweige sind von der Engadin-Exkursion 1961 mitgebracht worden. Zur Erklärung, daß Zirbelkieferhonigtau Asparagin enthält, könnte folgender Gedankengang beitragen :

Auf den Bergwiesen im Engadin wachsen verschiedene Kleearten, z.B. *Trifolium pratense*, *T. montanum* (bis 2 000 m hoch), *T. repens*, der nach G. HEGI (1925) vom Flachland bis zum Oberengadin (2 600 m) vorkommt. Wenn wir annehmen, daß die Zirbelkiefer durch den Klee auf einem mit Stickstoff angereicherten Boden stand, könnte unter Umständen der Siebröhrensaft Asparagin, das Endprodukt der Stickstoffentgiftung der Pflanze, enthalten (vergleiche STRASBURGER 1958). Die Quelle der Lausnahrung sind die Siebröhrensäfte, auf diese Weise wäre Asparagin in den Honigtau gelangt.

Dies könnte eine Anregung dafür sein, mehrere Kleearten, Siebröhrensäfte der in der Nähe wachsenden Bäume und den Honigtau der sich auf diesen bildet, nebeneinander zu prüfen.

#### IV. — DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zur Zeit der vorliegenden Untersuchung (1961) war mir nur die Arbeit von BAUMGARTEN u. MÖCKESCH (1956), die in Honigen freie Aminosäuren nachwiesen, zugänglich. Im Gegensatz zu den genannten Autoren habe ich jedoch zur qualitativen Analyse andere Kationenaustauscher und papierchromatographische Methoden angewendet. Unabhängig hat KOMAMINE (1960) auf ähnliche Weise handelsüblichen finnischen Honig mit Importhonig verglichen. In letzterem fand er im Einzeltest Asparagin, wie ich im *Trifolium pratense*-Honig. Leider waren ihm die Nektarquellen der Honige nicht bekannt, wie er

ausdrücklich betont. Weitere Arbeiten, die Asparagin erwähnen, sind von CURTI u. RIGANTI (1966) und BERGNER u. HAHN (1972) veröffentlicht; in ihnen sind die einzelnen Aminosäuren auch quantitativ nachgewiesen. Bei CURTI u. RIGANTI wird in Honigen aus 20 Provinzen Italiens Asparagin mit Serin gemeinsam bestimmt. Serin allein wird bei allen erwähnten Autoren in allen Honigen nachgewiesen, BAUMGARTEN u. MÖCKESCH fanden es jedoch nur in 9 von 15 Proben. Bei BERGNER u. HAHN wird im Honigtau Honig des Schwarzwaldes und ebenso in deutschen und ausländischen Blütenhonigen Asparagin mit Glutamin ungetrennt analysiert. Im Gegensatz zu den vorgenannten Autoren habe ich in Waldhonig nie Asparagin gefunden, jedoch sind unsere Ergebnisse wegen verschiedener Analysemethoden nicht direkt vergleichbar. Glutamin wurde lediglich von KOMAMINE und zwar nur im Importhonig gefunden. Durch alle diese Ergebnisse ist meine Aussage, Asparagin nur im *Trifolium pratense*-Honig analysiert zu haben, mit meinem Hinweis auf ein mögliches Vorkommen in anderen Leguminose-Honigen, weder bestätigt noch widerlegt. Dieser stützt sich einmal auf den Asparagin-Nachweis in den Nektaren von *T. pratense* und *T. repens* sowie *Vicia spec.*, zum anderen auf die bekannte Tatsache, daß Leguminosen stickstoffbindende Pflanzen sind, zur Ammoniakentgiftung die Glutaminsäure und die Asparaginsäure brauchen und Endprodukte dieses Vorgangs Glutamin und Asparagin sind (STRASBURGER 1958). Glutaminsäure wurde von allen genannten Autoren, außer BERGNER u. HAHN, in allen Honigproben nachgewiesen; in der vorliegenden Arbeit konnte diese nicht von Threonin abgetrennt werden. Asparaginsäure wurde von BERGNER u. HAHN, gleich mir, aber im Gegensatz zu den übrigen Autoren, nicht in allen Honigproben gefunden.

2- Methylalanin ( $\alpha$ -Amino-iso-buttersäure), meines Wissens in Honig bisher nicht nachgewiesen, fand ich nicht in allen Proben. Arginin fehlte bei mir in einem Teil der Proben, bei BAUMGARTEN u. MÖCKESCH in ca der Hälfte des Untersuchungsmaterials, bei KOMAMINE im Importhonig und bei CURTI u. RIGANTI in allen Analysen; dagegen wird es von BERGNER u. HAHN in allen Honigen nachgewiesen.

Zur Unterscheidung von Blüten- und Waldhonig diente innerhalb dieser Arbeit das wechselnde Fehlen der Aminosäuren Cystin, Glycin und Histidin in Blütenhonigen; davon fehlt Cystin allein oder in der Kombination Cystin/Glycin, am häufigsten jedoch fehlt die Kombination Glycin/Histidin. Cystin findet nur KOMAMINE in allen Proben, sonst wird es als fehlend oder unter der Erfassungsgrenze oder als nicht überall aufgefunden registriert. Glycin wird von KOMAMINE und CURTI u. RIGANTI in allen Proben nachgewiesen, dagegen wird es von den übrigen erwähnten Autoren, gleich mir, nicht überall gefunden. Histidin weisen CURTI u. RIGANTI und BERGNER u. HAHN in allen Analysen nach, bei BAUMGARTEN u. MÖCKESCH fehlt es teilweise und bei KOMAMINE ganz.

Die Möglichkeit, daß die als fehlend aufgeführten Aminosäuren unter der

Erfassungsgrenze der angewendeten qualitativen Methode lagen, darf nicht ausgeschlossen werden, zumal Blütenhonige durchweg ein schwächeres Chromatogramm als Waldhonige zeigten. Vielleicht trifft dies auch für Methionin und Tryptophan zu, die ich allerdings in keiner der Proben nachweisen konnte.

*Eingegangen im November 1973.*

*Reçu pour publication en novembre 1973.*

### DANK

Diese Untersuchungen wurden auf Veranlassung des Direktors des Forstzoologischen Institutes der Universität Freiburg/Br., Herrn Professor Dr. Dr. G. WELLENSTEIN, 1961 durchgeführt und 1972 ausgearbeitet. Ihm sei mein ganz besonderer Dank dafür ausgesprochen. Zu danken habe ich außerdem Frau Dr. MAURIZIO, Bern-Liebefeld, Schweiz, für die Überlassung von Honigen und kritische Durchsicht des Manuskriptes, ebenso Herrn Dr. BUCHNER, Freiburg/Br.- Auch Herrn Professor Dr. ZIEGLER, München, danke ich für freundliche Unterstützung.

### RÉSUMÉ

Le but des recherches effectuées était de connaître le spectre des acides aminés des miels de fleurs, des miels de miellat et des miels mixtes (miels de fleurs mélangés naturellement à des miels de miellat). A l'origine de la question posée se trouvent les travaux sur l'importance de la fourmi rousse (*Formica rufa*) pour la production du miellat et l'économie apicole. (WELLENSTEIN, 1958, 1960, 1961).

#### *Méthodes*

Au moment où furent faites ces recherches (1961), seul le travail de BAUMGARTEN et MÖKESCH (1956) concernant la présence d'acides aminés libres dans le miel nous était accessible. Pour cette raison nous avons transposé des méthodes éprouvées sorties du domaine de la botanique à l'étude de notre matériel expérimental, le miel. Les acides aminés libres sont déterminés qualitativement au moyen de la chromatographie sur papier.

Les solutions à analyser sont préparées à l'aide d'un échangeur d'ions I de Merck (échangeur de cations très acide) et les acides aminés sont élués à l'ammoniaque; la séparation de ces acides se fait par chromatographie sur papier Whatman 1 avec comme solution le butanol/acide acétique glacial/eau dans les proportions 4/1/5 et 4/1/1.

Avec cette méthode on a pu mettre en évidence 18 acides aminés. Le réactif est une solution de ninhydrine dans l'acétone à 0,5 % avec addition de lutidine (5 ml pour 100 ml).

La sûreté des résultats est basée sur le test 8 à 17 fois positif par acide aminé et par solution à analyser.

Les résultats obtenus figurent dans les tableaux 2 et 3.

La répartition en miels de fleurs, miels de miellat et miels mixtes est faite selon les données fournies avec le matériel.

#### *Résultats*

1) On a mis en évidence dans les miels de fleurs, miels de miellat et miels mixtes examinés les acides aminés suivants : alanine, acide glutamique/thréonine (non séparés), leucine/iso-leucine (non séparés), lysine (avec deux exceptions), phénylalanine, proline, sérine (avec 3 exceptions), tyrosine et valine.



Les acides aminés suivants n'ont été trouvés que dans une partie des miels : 2-méthylalanine, arginine, asparagine, acide aspartique, cystine, glycine, histidine.

2) La méthode analytique permettait de mettre en évidence 18 acides aminés; dans les miels on n'a pu en trouver au maximum que 16; il manquait la méthionine et le tryptophane.

3) On a trouvé une différence entre les miels de fleurs et les miels de miellat; la cystine, la glycine et l'histidine manquent dans les miels de fleurs mais il est rare que ces trois acides aminés manquent à la fois.

4) L'asparagine n'a été trouvée que dans le miel de *Trifolium pratense*.

5) Pour la première fois on a mis en évidence la 2-méthylalanine (acide  $\alpha$ -iso-amino-butérique) dans différents miels.

6) Le nombre maximum d'acides aminés présents dans un miel déterminé est de 15; c'est le cas pour 3 échantillons de miellat de *Pinus sylvestris*, un échantillon de miel de *Castanea sativa* et pour tous les miels mixtes.

7) Sur 14 échantillons de miels de fleurs l'analyse a montré la présence, en moyenne, de 12 acides aminés (sans l'asparagine) et 12,5 acides aminés avec l'asparagine; sur 10 échantillons de miel de miellat, 14 acides aminés et sur 4 échantillons mixtes, 15 acides aminés.

## LITERATUR

- BAUMGARTEN, F., MÖCKESCH I., 1956. Über die Papierchromatographische Auffindung freier Aminosäuren im Bienenhonig. *Z. f. Bienenforsch.*, 3, 181-184.
- BERGNER K. G., HAHN HJ., 1972. Zum Vorkommen und zur Herkunft der freien Aminosäuren in Honig. *Apidologie*, 3, 5-34.
- BUCHNER R., 1966. Vergleichende Untersuchungen über die antibakterielle Wirkung von Blüten- und Honigtauhonigen. *Südwestdeutscher Imker*, 18, 240-241.
- BUCHNER R., 1967. Über den Unterschied von Bienenhonig aus Blüten- und Honigtautracht. *Mitt. bad. Landesver. Naturkd. u. Naturschutz*, 9, 589-593.
- CRAMER F., 1958. Papierchromatographie, Verl. Chemie GMBH., Weinheim/Bergstraße.
- CURTI R., RIGANTI V., 1966. Ricerche sugli aminoacidi del miele. *Rassegna Chimica*, N 6, 278-282.
- ECKLOFF W., 1972. Beitrag zur Ökologie und forstlichen Bedeutung bienenwirtschaftlich wichtiger Rindenläuse. *Z. f. angew. Entomol.* 70, 134-157.
- HEGI G., 1925. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Lehmanns-Verl., München, 4, 3 ter Teil.
- HEILENZ S., HÖFNER W., NEUMANN K., 1970. Biochemisches Praktikum f. Landwirtschafts-, Forstwirtschafts und Ernährungswissenschaften. Bibliogr. Inst. Mannheim, Wien, Zürich.
- KLOFT W., MAURIZIO A., KAESER W., 1965. Das Waldhonigbuch. Ehrenwirth-Verl., München.
- KOMAMINE A., 1960. Amino acids in Honey. *Suomen Kemistilehti* 33 B, 185-187.
- LINSKENS H. F., 1959. Papierchromatographie in der Botanik. Springer-Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- MAURIZIO A., 1949. Beiträge zur quantitativen Pollenanalyse des Honigs. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, 2, 320-421.
- MAURIZIO A., 1959. Papierchromatographische Untersuchungen an Blütenhonigen und Nektar. *Ann. l'Abeille*, 2, 291-431.
- MAURIZIO A., 1962. Papierchromatographische Untersuchungen an einigen Honigtau- und Tau-Honigarten. *Verh. 11. Int. Kongr. Ent.*, Wien, 11, 542-543.
- MERTEN B., 1963. Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen z. qualitativen u. quantitativen Bestimmung v. Aminosäuren, speziell quantitative Bestimmung von Oxyprolin, Glycin und Lysin zur Ermittlung des Bindegewebsanteils in Fleischerzeugnissen. Diss. Tierhyg. Freiburg/Br.

- STRASBURGER E., 1958. Lehrbuch der Botanik. Verl. Fischer Stuttgt.
- WELLENSTEIN G., 1958. Die Trophobiose der Waldameisen und ihre bienenwirtschaftliche Bedeutung. *Verh. d. Dtsch. Ges. f. angew. Entomol.*, 14. Vers. 1957, 109-114.
- WELLENSTEIN G., 1960. Ergebnisse vierjähriger Untersuchungen über die Steigerung der Waldbienentracht. *Z. f. angew. Entomol.* 47, 32-41.
- WELLENSTEIN G., 1961. Honigtaubildende Forstinsekten und ihre wirtschaftliche Bedeutung. Forstwiss. i. Dienste d. Praxis, Vortrag Forstl. Hochschulw., Freiburg/Br. 1961, 184-199.
- WELLENSTEIN G., 1967. Neunjährige Studien über die Beziehung zwischen Waldameisen, honigtauerzeugenden Insekten und Bienen im Schwarzwald. *Wiss., Z. T. Univ. Dresden*, 16, 596-598.
- ZIMMERMANN, G., o. J. Der Nachweis von Aminosäuren im Siebröhren- und Blutungssaft einiger Bäume. Staatsexamensarbeit (um 1961), Techn. Hochschule Darmstadt.
-