Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 52 (1961)

Heft: 2

Artikel: Zur Problematik der quantitativen Diastasebestimmung in Honig : Ueberprüfung verschiedener Methoden : Einfluss der Stärkepräparate auf die Diastasezahl : Ausarbeitung einer zuverlässigen Standardmethode zur Diastasezahlbestimmung sowie Anleitung zur Her...

Autor: Hadorn, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-981752

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 17.— per Jahrgang (Ausland Fr. 22.—) Preis einzelner Hefte Fr. 3.— (Ausland Fr. 4.—)
Suisse fr. 17.— par année (étranger fr. 22.—) Prix des fascicules fr. 3.— (étranger fr. 4.—)

BAND - VOL. 52 1961 HEFT - FASC. 2

Zur Problematik der quantitativen Diastasebestimmung in Honig

Ueberprüfung verschiedener Methoden · Einfluß der Stärkepräparate auf die Diastasezahl · Ausarbeitung einer zuverlässigen Standardmethode zur Diastasezahlbestimmung sowie Anleitung zur Herstellung und Prüfung von Standardstärke

Von *H. Hadorn*, Laboratorium VSK, Basel

Die Prüfung auf Honigdiastase bzw. die Bestimmung der Diastase-Aktivität dient seit Jahren zur Kontrolle, ob ein Honig echt und nicht durch Ueberhitzung nachteilig verändert ist. Auf Grund neuerer Untersuchungen von *Kiermeier* und *Köberlein* [1]), *Warnecke* und *Duisberg* [2]), *Duisberg* und *Gebelein* [3]), *Duisberg* und *Warnecke* [4]) sowie von *Hadorn* und *Kovacs* [5]) ist es allerdings nicht möglich, lediglich auf Grund einer Diastasezahl-Bestimmung mit Sicherheit zu beurteilen, ob ein Honig durch Ueberhitzung nachteilig verändert ist oder nicht. Da es von Natur aus diastasearme Honige gibt und die Diastasezahl der echten Honige innerhalb ziemlich weiter Grenzen variiert, müssen noch weitere enzymatische Versuche, sowie die chemische Bestimmung des Hydroxymethyl-furfurols nach *Winkler* [6]) herangezogen werden. Eine zuverlässige Bestimmung der Diastasezahl ist jedoch die Grundlage der Beurteilung. Zur Diastasezahlbestimmung in Honig und anderen Lebensmitteln sind zahlreiche, teilweise sich widersprechende

Methoden in allen möglichen Varianten beschrieben worden, was bereits vermuten läßt, daß diese Bestimmung mit gewissen Schwierigkeiten verbunden ist.

Die von verschiedenen Autoren veröffentlichten Diastasezahlen von Honigen lassen sich nur unter Vorbehalt miteinander vergleichen. Zum Teil sind die Reaktionsbedingungen ziemlich verschieden oder die Diastasezahl wird unterschiedlich definiert. So verhält sich beispielsweise die von *Fellenberg*sche Diastasezahl reziprok zur Diastasezahl nach *Gothe*. Wie wir zeigen werden, können sogar Diastasezahlen, die nach genau der gleichen Arbeitsvorschrift, z.B. nach *Gothe* ermittelt wurden, für ein und denselben Honig um mehr als 100 % voneinander abweichen, je nach Eigenschaften und Qualität des verwendeten löslichen Stärke-Präparates. Dieser Umstand ist früher viel zu wenig beachtet worden. Es hat daher keinen Sinn, Grenzwerte und Beurteilungsnormen für die Diastase-Aktivität von Honig festzulegen, bevor eine Methode bekannt ist, die zuverlässige und gut reproduzierbare Resultate liefert.

In dieser Arbeit sollen zunächst einige der gebräuchlichsten oder interessantesten Methoden kurz diskutiert und miteinander verglichen werden. Die Methode von *Gothe*, sowie diejenige von *Schade* und Mitarbeitern werden systematisch überprüft, wobei verschiedene Fehlermöglichkeiten aufgedeckt werden. Schließlich folgt ein Kapitel über Herstellung und Standardisierung von löslicher Stärke.

Am Schluß wird eine genaue, etwas modifizierte und verbesserte Arbeitsvorschrift zur Diastasezahl-Bestimmung nach *Schade* und Mitarbeitern angegeben. Die Methoden sind an einigen einheimischen und überseeischen Honigen und verschiedenen anderen diastasehaltigen Produkten ausprobiert worden.

I. Prinzip der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Diastasezahl

Die Methoden zur Bestimmung der Honigdiastase lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, je nachdem ob die Aktivität der α- oder β-Amylase ermittelt wird. Eine sehr schöne Uebersicht über die Wirkungsweise der verschiedenen Enzyme beim Stärkeabbau gibt *Richter* [7]). Die β-Amylase hydrolisiert nur die α-1,4-Bindungen und spaltet, beginnend am nichtreduzierenden Kettenende des Kohlenhydratmoleküls, fortlaufend Maltose ab, bis schließlich eine α-1,6-Bindung die Wirkung unterbricht. Da die α-1,6-Bindungen die Verzweigungsstellen im Amylopectin vermitteln, kann dieses von der β-Amylase nicht quantitativ verzuckert werden. Der Abbau der Amylose verläuft nach Untersuchungen von *Cek* [8]) wahrscheinlich so, daß zuerst eine Amylosekette vollständig bis zur Maltose abgebaut wird, und dann erst der Abbau der nächsten Kette erfolgt. Es entstehen daher unter der Wirkung der β-Amylase nach kurzer Zeit beträchtliche Mengen Maltose neben relativ wenig veränderter Stärke.

Die α-Amylase hydrolysiert ebenfalls α-1,4-Bindungen. Der Angriff erfolgt jedoch nicht wie bei der β-Amylase am Ende der Kohlenhydratketten, sondern

beginnt in ihrer Mitte, auch zwischen zwei Verzweigungen. Es entstehen zuerst Dextrine und erst in einer zweiten Phase durch langsame Verzuckerung Maltose, Glucose und Maltotriose. Bei der α-Amylolyse nehmen die Viscosität der Lösung und die blaue Jodfärbung der Amylose schnell ab, während die Bildung von Maltose nur langsam zunimmt.

Bestimmung der β-Amylase

Verfahren zur Bestimmung der β-Amylase-Wirkung von Honig haben folgende Forscher beschrieben: *Moreau* [9]), *Gorbach* [10]), *Täufel, de Mingo* und *Thaler* [11]) sowie *Valin* [12]). Die Methoden sind sich im Prinzip alle gleich. Man läßt die Honiglösung unter bestimmten Bedingungen auf eine Stärkelösung einwirken und ermittelt die gebildete Maltose in der Regel jodometrisch. Da aber im Honig große Mengen Zucker vorhanden sind, macht die unter dem Einfluß der Amylase gebildete Maltose nur einen relativ kleinen Anteil der reduzierenden Zucker aus, was sich nachteilig auf die Genauigkeit der Resultate auswirkt. *Moreau* [9]) und später auch *Valin* [12]) haben daher die Enzyme angereichert, indem sie die Honiglösung mit Alkohol versetzten, über Nacht stehen ließen, die ausgefällten Eiweißstoffe und Enzyme abzentrifugierten und diesen Rückstand für die Enzymversuche benutzten. Das Verfahren ist für die Praxis etwas umständlich; außerdem wird bei der Alkoholfällung die Diastase teilweise inaktiviert.

Da für Routine-Untersuchungen die Bestimmung der β-Amylase weniger in Frage kommt und sich die meisten Publikationen über Honigdiastase auf α-Amylase beziehen, haben wir uns auf diese letzteren Methoden beschränkt.

Halbquantitative α-Amylase-Bestimmung nach *Auzinger*

Bei der Bestimmung der α-Amylase läßt man den Honig ebenfalls unter definierten Versuchsbedingungen auf eine gegebene Menge Stärkelösung einwirken. Den Stärkeabbau verfolgt man durch die allmähliche Abnahme der Jodstärke-Reaktion. *Auzinger* [13]) hat die Prüfung auf Diastase in die Honigchemie eingeführt. Dieser halbquantitative Nachweis ist auch in das Schweizerische Lebensmittelbuch IV. Auflage [14]) aufgenommen worden. Inzwischen sind zahlreiche Modifikationen und Verbesserungen für die genaue quantitative Diastasebestimmung vorgeschlagen worden. Im folgenden sollen einige der wichtigsten Arbeiten kurz erwähnt werden. Auf ein lückenloses Zitieren der diesbezüglichen Publikationen muß verzichtet werden. In den besprochenen Arbeiten finden sich jeweils zahlreiche weitere Literaturhinweise.

Quantitative α-Amylase-Bestimmung nach visuellen Methoden

1. Methode Gothe

Gothe [15]) hat als erster eine brauchbare Methode zur quantitativen Bestimmung der Diastase ausgearbeitet, die heute noch vielfach angewandt wird. Unter defi-

nierten Bedingungen läßt *Gothe* in einer Reihe von Probegläsern steigende Mengen einer Honiglösung bei 45-50° C auf je 4 ml Stärkelösung einwirken. Nach genau 1 Stunde wird 1 Tropfen Jodlösung zugefügt und festgestellt, in welchem Glas die Stärke eben noch vollständig abgebaut wurde, was am Fehlen einer Blaufärbung erkannt wird. Aus diesem Grenzwert (Limes) berechnet *Gothe* die Diastasezahl.

Nach *Gothe* gibt die Diastasezahl die Anzahl ml 1 %iger Stärkelösung an, welche durch 1 g Honig bei einstündiger Einwirkung unter den gegebenen Bedingungen abgebaut werden. 1 g Honig mit der Diastasezahl 1 baut somit in 1 Stunde 10 mg Stärke ab (= 1 Diastase-Einheit). Nach *Gothe* wird die Honiglösung zunächst mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert und dann mit 0,5 ml 0,02 n-Essigsäure versetzt, was einer Pufferung gleichkommt. Zur Aktivierung der Honigdiastase setzt *Gothe* noch Natriumchlorid zu.

Die Methode *Gothe* ist von verschiedenen Autoren überprüft und verbessert worden. *Fiehe* und *Kordatzki* [16]) fanden, daß beim Neutralisieren der Honiglösung mit Natriumcarbonat der Umschlag schleppend ist und verwenden daher 0,05 n-Natronlauge. *Weishaar* [17]) hat sich eingehend mit der *Gothe*-Methode beschäftigt. Er konnte zeigen, daß nach dieser Vorschrift das pH der Versuchslösungen schlecht reproduzierbar ist und lehnt daher diese Methode ab. In den einzelnen Gläsern hat *Weishaar* große pH-Unterschiede gemessen (pH = 4,8 bis 6,7) was auf die wechselnde Honigkonzentration und die ungenügende Pufferung zurückzuführen ist. Das pH-Optium der Honigdiastase liegt nach den Versuchen von *Weishaar* bei pH = 4,7 bis 5,5.

Kiermeier und *Köberlein* [1]) haben die *Gothe*-Methode wieder aufgegriffen und für ihre Versuche verwendet. Um stets bei konstantem pH-Wert zu arbeiten, geben sie jedem Glas 2 ml Pufferlösung (pH = 5,2) zu. Sie haben auch die Skala stärker unterteilt, um feinere Unterschiede in der Amylase-Aktivität zu erkennen.

2. *Methode Koch*

Koch [18]) geht im Prinzip anders vor als *Gothe*. Honig- und Stärkelösung werden getrennt auf 40° C thermostatiert, dann gemischt und von dieser Mischung ohne Puffer oder Salzzusatz alle Minuten (bei geringer Aktivität evtl. nur alle 2 bis 3 Minuten) eine Probe von 2 ml herauspipettiert mit Wasser verdünnt, mit Jodlösung versetzt und die Farbe beobachtet. Wenn auf Zusatz von Jod nur noch eine schwache Gelbfärbung (wie in einer Blindprobe) entsteht, ist der Versuch beendet. Die erforderliche Reaktionszeit (im Mittel etwa 18 Minuten) ist der Diastase-Aktivität umgekehrt proportional. *Gorbach* und *Barle* [10]) haben diese Methode übernommen, aber die Lösungen gepuffert, um die pH-Abhängigkeit der α-Amylase zu untersuchen.

3. Methode von Fellenberg

Von Fellenberg und *Rusiecki* [19]) bestimmten die Diastase in 289 Honigen der Schweiz. Honigstatistik [20]). Ihre Methode ist im Prinzip ähnlich wie die Methode *Gothe*. Es werden ebenfalls Reihenversuche in Reagensgläsern mit steigender Honigkonzentration angestellt und während 1 Stunde bei 40° C bebrütet. Die *von Fellenberg*sche Definition der Diastasezahl ist jedoch reziprok derjenigen von *Gothe*. *Von Fellenberg* versteht unter Diastasezahl die kleinste Menge Honig (in g), welche während 1 Stunde bei 40° C 1 g Stärke in 1 %iger Lösung abbaut. Etwas unglücklich ist der Umstand, daß unter dem gleichen Ausdruck «Diastasezahl» ganz verschiedene Dinge verstanden werden. Die *von Fellenberg*sche Berechnung konnte sich nicht durchsetzen. Sie widerspricht übrigens der in der Enzymchemie allgemein üblichen Definition für Enzym-Aktivitäten. Die meisten in der Literatur angegebenen Diastasezahlen gehen auf analoge Definitionen zurück wie diejenige von *Gothe*.

Die Diastasezahlen (DZ) lassen sich jedoch ineinander umrechnen. Es gilt folgende Beziehung: Das Produkt aus Diastasezahl nach *von Fellenberg* und der Diastasezahl nach *Gothe* ist gleich 100.

DZ nach *von Fellenberg* × DZ nach *Gothe* = 100

Von Fellenberg gibt in der Schweiz. Honigstatistik nur Werte an, die von 5 zu 5 Einheiten abgestuft sind (Diastasezahlen 10, 15, 20, 25). Umgerechnet in *Gothe*-Einheiten ergeben sich für die 289 Honige der Honigstatistik 1937-1940 Diastasezahlen zwischen 4 und 10. Dieser Vergleich mit den *Gothe*-Werten ist nur unter gewissen Vorbehalten möglich, da, wie später gezeigt wird, die Stärke-Qualität einen großen Einfluß auf die Diastasezahl hat.

Quantitative α-Amylase-Bestimmung mit kolorimetrischen und spektralphotometrischen Methoden

1. Methoden verschiedener Autoren

Die Festlegung des Endpunktes, d.h. jenes Zustandes, bei dem die Stärke eben als vollständig abgebaut angesehen wird, bleibt Konventionssache. Um die bei der visuellen Beobachtung auftretenden Unsicherheiten in der Beurteilung zu vermeiden, hat man bald einmal versucht, die Jodfärbung kolorimetrisch zu verfolgen. *Gorbach* und *Barle* [10]) benützten einen *Walpool*schen Block.

Sandstedt, Kneen und *Blish* [24]) haben die Methode *Wohlgemuth* [25]) zur Amylasebestimmung in Malz modifiziert und den Endpunkt kolorimetrisch ermittelt. Er gilt als erreicht, wenn die Jod-Färbung der zu prüfenden Lösung gleich ist wie die Farbe einer Vergleichslösung von Dextrin mit Jod. *Redfern* [22]) hat festgestellt, daß die Resultate stark abhängig sind vom Dextrin-Vergleichspräparat. Er hat daher an Stelle dieser Dextrin-Jod-Vergleichslösung die Verwendung eines Farbfilters vorgeschlagen. *Schwimmer* [26]) hat für die Bestimmung der α-Amylase-Aktivität von Enzym-Präparaten, die er aus Gerstenmalz isolierte, eine

kolorimetrische Methode ausgearbeitet. Die Enzymlösung wird mit der auf pH = 4,7 gepufferten Stärkelösung gemischt und bei 30° C incubiert. Nach 5, 10 und 20 Minuten werden Proben von 0,5 ml herauspipettiert, mit 5 ml Jodlösung und 10 ml Wasser versetzt und die Lichtdurchlässigkeit bei 660 mμ gemessen. Die Diastaseaktivität wird aus einem Diagramm mit 3 Eichkurven, entsprechend den drei verschiedenen Incubationszeiten herausgelesen. *Gontarski* [27]) arbeitet im Prinzip analog, führt jedoch die Diastasebestimmung in drei Parallelversuchen bei verschiedenen pH-Werten durch, um die optimale Diastaseaktivität zu erhalten (pH-Werte: 4,2; 4,8; 5,4). Er entnimmt nach 15 und nach 20 Minuten Proben, die er mit Jodlösung versetzt. In einem lichtelektrischen Kolorimeter wird die Lichtdurchlässigkeit gemessen, aus einem Diagramm die nicht abgebaute Stärkemenge abgelesen und daraus die Diastasezahl berechnet.

Bei allen diesen kolorimetrischen Methoden werden Jod-Konzentration und Endvolumen der Reaktionsgemische konstant gehalten. Eigene Versuche ergaben, daß beim Verdünnen auf ein konstantes Endvolumen mit einer bestimmten Stärkesorte wohl gut reproduzierbare Resultate gefunden werden. Sobald jedoch ein anderes Stärkepräparat verwendet wird, findet man für den gleichen Honig stark abweichende Diastasezahlen.

Tabelle 2

Abhängigkeit der Diastasezahl vom Stärkepräparat bei kolorimetrischen Methoden mit konstantem Endvolumen

für einen ausländischen Bienenhonig

Nr.	Stärkepräparat	Blauwert nach *Hadorn* und *Doevelaar*	Diastasezahl
1	Noredux Standard	1,005	6,9) 6,9)
2	Lintner-Stärke I	1,025	5,9
3	Lintner-Stärke II	0,496	12,1
4	Riedel de Haën (VSK)	0,575	11,3
5	Riedel de Haën (GEG)	1,295	5,6
6	Zulkowsky	0,520	11,7
7	von Fellenberg I	1,095	6,7
8	von Fellenberg Frühbote	0,805	7,4
9	von Fellenberg Erstlinge	1,095	5,9
10	Merck	1,145	6,1

In der Tab. 2 sind die Resultate zusammengestellt, die wir für einen ausländischen Honig mit verschiedenen Stärkepräparaten fanden. Die Versuchsbedingungen hinsichtlich Jodmenge und Absorptionsmessung waren nicht genau gleich wie bei *Schwimmer* oder *Gontarski,* sie entsprachen denjenigen von *Schade* und Mitarbeitern [28]). Das Endvolumen der Jodstärke-Lösung betrug in allen Fällen 25 ml. Als Endpunkt des Stärkeabbaus wurde wie bei der Methode *Schade*

jener Zeitpunkt bestimmt, nach welchem die Lichtdurchlässigkeit der mit Jod angefärbten Probe 50 % betrug. Je nach Stärkeart findet man Diastasezahlen, die zwischen 5,6 und 12,1 schwanken. Die Fehler können über 100 % ausmachen. Den eben diskutierten kolorimetrischen Methoden haftet somit grundsätzlich der gleiche Fehler an, wie der Methode *Gothe,* indem das zur Bestimmung benutzte Stärkepräparat das Resultat sehr stark beeinflußt. Dies zeigen besonders deutlich die mit den beiden nach Original-Vorschrift selbst hergestellten *Lintner*-Stärken I und II gefundenen Diastasezahlen in Tabelle 2. Mit dem Präparat II erhält man eine doppelt so hohe Diastasezahl wie mit Präparat I.

2. Methode Schade, Marsh und Eckert

Schade, Marsh und *Eckert* [28]) haben das von *Schwimmer* entwickelte, sinnreiche kolorimetrische Verfahren etwas abgeändert und für die Diastasezahl-Bestimmung in Honig übernommen. Die Versuchsbedingungen sind weitgehend standardisiert und hinsichtlich Pufferung, Stärke- und Kochsalzkonzentration den Bedingungen angeglichen, die *Kiermeier* und *Köberlein* für die verfeinerte *Gothe*-Methode als optimal festgelegt haben.

Neuartig an der Methode von *Schade* und Mitarbeitern ist die Art der Verdünnung. In einem Leerversuch mit Stärke und Jodlösung aber ohne Honigzusatz wird die blaue Jodstärkelösung mit Wasser so weit verdünnt, daß sie eine genau vorgeschriebene Lichtdurchlässigkeit (1,7 bis 1,8 %) zeigt. Dieses empirisch ermittelte Endvolumen wird notiert und alle weiteren Versuche auf das gleiche Volumen verdünnt. In der Originalarbeit wird keine Erklärung für dieses sonderbare und etwas umständliche Vorgehen gegeben. Wie wir später feststellen konnten, wird durch Anpassen des Endvolumens auf eine definierte Lichtdurchlässigkeit das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Stärkepräparate weitgehend ausgeglichen.

White und *Pairent* [29]) haben die Methode von *Schade, Marsh* und *Eckert* überprüft und sie mit der *Gothe*-Methode verglichen. Sie fanden nach den beiden Methoden deutlich voneinander abweichende Resultate.

Da die *Gothe*-Methode seit vielen Jahren gut eingeführt ist, müßte nach ihrer Meinung die Arbeitsvorschrift von *Schade* und Mitarbeitern derart abgeändert werden, daß sie Werte liefert, die mit der *Gothe*-Methode möglichst genau übereinstimmen. Diese Aenderung erfolgte in der Wahl eines anderen Farbfilters (Interferenzfilter 600 mμ) und Festlegung anderer Extinktionswerte für die Ausgangslösung und der abgebauten Stärkelösung.

White und *Pairent* geben die Analysen von 20 Honigen bekannt. Die Diastasezahl wurde einmal nach *Gothe,* dann von zwei Analytikern unabhängig voneinander nach der abgeänderten kolorimetrischen Methode bestimmt. Es wurden durchwegs recht gut übereinstimmende Resultate gefunden.

Gegen das Vorgehen von *White* und *Pairent* ist jedoch einzuwenden, daß die beiden Methoden nur dann übereinstimmende Diastase-Zahlen liefern, wenn

immer das gleiche lösliche Stärkepräparat benutzt wird (Im vorliegenden Fall lösliche Stärke nach *Lintner* der Firma Pfanstiel). Mit einem anderen Stärkepräparat, vermutlich auch mit einem genau gleich bezeichneten Muster der gleichen Firma, aber aus einer anderen Produktion, würde die *Gothe*-Methode sicher ganz andere Werte ergeben, die Uebereinstimmung der beiden Methoden, auch der modifizierten, ist somit rein zufällig. Nach unserer Meinung hat es daher keinen Sinn, die Methode *Schade* und Mitarbeiter abzuändern. Man müßte eher für die *Gothe*-Methode eine Standardstärke vorschreiben, die immer in gleicher Qualität erhältlich wäre.

II. Ueberprüfung der *Gothe*-Methode (Modifikation *Kiermeier* und *Köberlein*)

Wir haben in zahlreichen Honigen nach der von *Kiermeier* und *Köberlein* [1]) verbesserten *Gothe*-Methode die Diastasezahl bestimmt. Die Methode hat verschiedene Mängel, die sich vermutlich nie ganz beheben lassen. Die Beurteilung der Färbung ist oft schwierig. Bei den durch die Honigdiastase vollständig abgebauten Proben ist die Jodfärbung gelb bis gelbbraun, bei den nicht abgebauten blauviolett. Dazwischen liegen aber meistens einige Proben, die alle Uebergänge von orangerot, rotbraun, rotviolett bis blauviolett zeigen. Es ist jeweils dem Beobachter überlassen, zu entscheiden, welche Probe er als Grenzwert annehmen will, woraus sich beträchtliche Unterschiede ergeben können. Die erhaltenen Färbungen wechseln schon nach wenigen Minuten ihre Intensität und Farbnuance, was auf den Verbrauch eines Teiles des Jods durch reduzierende Stoffe (Dextrine, Zucker) zurückzuführen ist. Die Gläser können also nicht aufbewahrt und mit einer anderen Serie verglichen werden. Auch ist die Reproduzierbarkeit der Methode nicht sehr gut. *Kiermeier* und *Köberlein* schreiben über ihre Methode wörtlich: «Die nach dieser Arbeitsweise erhaltenen Werte schwankten um die Diastasezahl eines Gläschens nach oben und unten. Es konnte also beispielsweise der Wert 19,1 bei einer wiederholten Bestimmung zu 21,0 oder zu 17,4 gefunden werden.» Relativ groß werden die Unterschiede bei niedrigen Diastasezahlen.

Es hat sich wiederholt gezeigt, daß Diastasezahlen, die in verschiedenen Laboratorien gefunden wurden, kaum miteinander verglichen werden konnten. Für den gleichen Honig ergeben sich gelegentlich unerklärlich große Unterschiede.

Wie wir im Laufe unserer Arbeit feststellen konnten, ist die Hauptursache für diese großen Abweichungen in der verschiedenartigen Qualität der handelsüblichen löslichen Stärke zu suchen, worauf in der Literatur nur gelegentlich hingewiesen wurde, ohne daß daraus die nötigen Konsequenzen gezogen wurden. Die Autoren begnügen sich meistens mit dem Hinweis, daß «lösliche Stärke nach Lintner» (oder Zulkowsky-Stärke) zu verwenden sei. Besonders wichtig ist der Abbaugrad der löslichen Stärke.

Weishaar [17]) hat bereits beobachtet, daß sich lösliche Stärke von *Merck* und lösliche Stärke nach *Zulkowsky* bei der Diastasezahl-Bestimmung ganz unterschiedlich verhalten. *Von Fellenberg* [21]) hat festgestellt, daß lösliche Stärke-Präparate mit gleicher Bezeichnung (nach *Zulkowsky*), selbst von der gleichen Firma geliefert, nicht immer gleiche Eigenschaften besitzen. *Redfern* [22]) hat ähnliche Erfahrungen mit *Lintner*-Stärke gemacht. Auch *Schmitt* [23]) berichtete in einer Sitzung über große Abweichungen der Diastasezahl, die für den gleichen Honig in verschiedenen Laboratorien gefunden wurden. Die Diastasezahlen nach *Gothe* differierten um 3 bis 4 Stufen (was das 2- bis 3fache der DZ ausmacht) und waren auf den verschiedenen Abbaugrad der löslichen Stärke (*Merck*-Präparate) zurückzuführen. Zur Illustration dieser Befunde haben wir mit 7 verschiedenen Stärke-Präparaten nach der von *Kiermeier* und *Köberlein* verbesserten *Gothe*-Methode die Diastasezahl des gleichen Honigs bestimmt. Aus den Resultaten in Tabelle 1 geht hervor, daß man je nach Stärkeart ganz verschiedene Diastasezahlen findet, die in unserem Beispiel zwischen 6,7 und 13,3 schwanken. In der Tab. 1 ist außerdem für jedes Stärkepräparat der sogenannte Blauwert angegeben (siehe Abschnitt Methodik). Der mit Jodlösung erhaltene Blauwert ist dem Amylose-Gehalt proportional und gibt ein ungefähres Maß für den Abbaugrad der Stärke. Wenig abgebaute Stärkepräparate, mit hohem Amylose-Gehalt geben in der Regel niedrigere Diastasezahlen als weitgehend abgebaute Präparate mit niedrigem Blauwert. Dies ist durchaus verständlich, denn eine bereits teilweise abgebaute, dextrinierte Stärke ist in kürzerer Zeit oder durch eine geringere Enzymmenge bis zum Grenzwert, wo die Blaufärbung mit Jod verschwindet, abgebaut. Solange es nicht gelingt, eine Standard-Stärke mit immer gleichen Eigenschaften zu erhalten, ist es völlig illusorisch, für Honig irgendwelche Anforderungen in Bezug auf Diastasezahlen nach der Gothe-Methode festlegen zu wollen. Je nach dem verwendeten Stärkepräparat wird man höhere oder niedrigere Resultate finden.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Diastasezahl vom Stärkepräparat

Diastasezahl nach *Gothe* (Modifikation *Kiermeier-Köberlein*) von Tessiner-Honig

Stärkepräparat	Blauwert nach *Hadorn* und *Doevelaar*	Diastasezahl
Noredux Standard-Stärke	1,005	8,7—10
Siegfried		6,7— 8,7
Lintner-Stärke I	1,025	6,7— 8,7
Lintner-Stärke II	0,496	10,0—11,4
Riedel de Haën (VSK)	0,575	11,4
Riedel de Haën (GEG)	1,295	6,7; 6,7
Zulkowsky	0,520	13,3; 13,3
von Fellenberg I	1,095	6,7

Im Kapitel über die verschiedenen löslichen Stärkepräparate werden wir zeigen, wie man die Stärke kontrollieren kann. Durch Mischen von zwei Stärken mit unterschiedlichem Abbaugrad gelingt es relativ einfach, selber eine Standardstärke mit jederzeit reproduzierbaren Eigenschaften herzustellen, die brauchbare Diastasezahlen liefert. Aus zwei löslichen Stärken mit extremen Eigenschaften, dem Präparat Riedel de Haën (Nr. 9 in Tab. 10), das wenig abgebaut war und der selbst hergestellten, stark abgebauten *Lintner*-Stärke II (Nr. 17) haben wir eine Mischung bereitet, deren Blauwert demjenigen der Noredux-Standard-Stärke entsprach. Aus den Resultaten in Tab. 11 geht hervor, daß mit unserer selbst gemischten Stärke die gleichen Diastasezahlen nach *Gothe* erhalten werden wie mit der von uns benutzten käuflichen Noredux Standardstärke. Gewisse Streuungen der Resultate, die auf die Unsicherheit bei der Beurteilung der Färbungen der Proben zurückzuführen sind, bleiben selbstverständlich bestehen, eine all zu große Präzision darf von der *Gothe*-Methode nicht erwartet werden.

III. Ueberprüfung der Methode von *Schade*, *Marsh* und *Eckert*

Diese Methode wird in der Literatur nur als knappe Arbeitsvorschrift angegeben. Bei unseren ersten Versuchen erhielten wir gelegentlich unbefriedigend übereinstimmende Resultate. Wir haben daher die Methode eingehend überprüft und sie in einigen, grundsätzlich nebensächlichen Punkten, die sich nur auf die kolorimetrische Stärkebestimmung beziehen, abgeändert. Nach unserer modifizierten Arbeitsweise erhielten wir schön reproduzierbare Resultate.

1. Definition

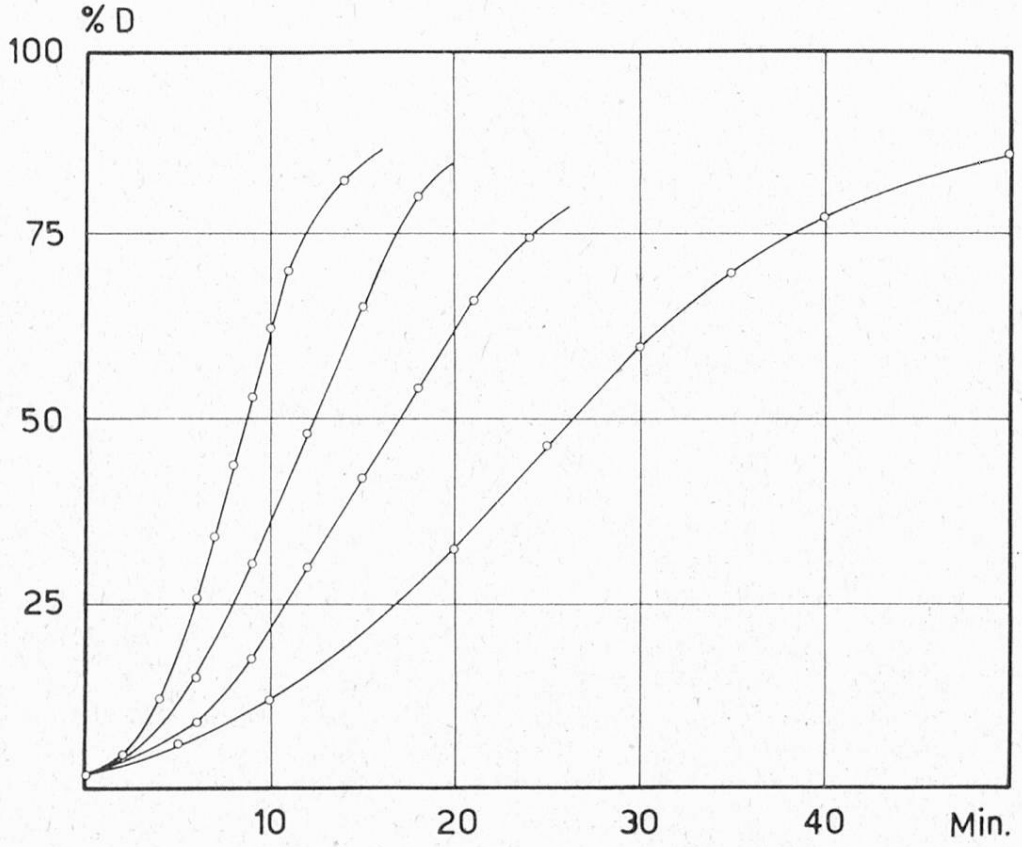
Schade und Mitarbeiter definieren die Diastasezahl analog wie *Gothe:* Die Diastasezahl gibt an, wie viele Diastase-Einheiten in 1 g Honig enthalten sind. Die Einheit der Diastase-Aktivität ist jene Enzymmenge (α-Amylase), die in 1 Stunde 0,010 g Stärke (oder 1 ml 1 %ige Stärkelösung) bis zum vorgeschriebenen Endpunkt abbaut. Zahlenmäßig sollte die Diastasezahl nach *Schade* und Mitarbeitern mit derjenigen nach *Gothe* übereinstimmen, was allerdings nur unter gewissen Voraussetzungen der Fall ist.

2. Zeit-Umsatzkurven

Zur Ermittlung des Endpunktes, bei dem die Stärke als vollständig abgebaut betrachtet wird, benützen *Schade* und Mitarbeiter ein einfaches graphisches Verfahren. Die gepufferte Honiglösung und die Stärkelösung werden gemischt und bei 40° C aufeinander einwirken gelassen. In bestimmten Zeitabständen werden vom Reaktionsgemisch Proben von 0,5 ml herauspipettiert, mit Jodlösung versetzt, entsprechend verdünnt und die Lichtdurchlässigkeit gemessen. Trägt

man auf Millimeterpapier die Lichtdurchlässigkeit (Transparenz) gegen die Reaktionszeit auf, so erhält man eine S-förmige Kurve. Der mittlere Teil dieser Kurve verläuft über eine größere Strecke angenähert linear. *Schade* und Mitarbeiter legen nun den Endpunkt des Stärkeabbaus willkürlich dort fest, wo die Lichtdurchlässigkeit 50 % beträgt. Aus dem Diagramm lesen sie die entsprechende Reaktionszeit ab und berechnen daraus die Diastasezahl. Unter den gewählten Standardbedingungen ist die zur Erreichung des Endpunktes erforderliche Zeit der Enzym-Aktivität umgekehrt proportional.

In Figur 1 sind als Beispiele die Zeit-Umsatzkurven einiger Honige mit verschiedener Diastasezahl aufgetragen. Bei hoher Diastasezahl verlaufen die Kurven steil, bei geringer Diastasezahl ziemlich flach. Der Typus der Kurven bleibt sich gleich, der mittlere Bereich zwischen 30 und 70 % Durchlässigkeit verläuft praktisch linear.



Figur 1
Zeit-Umsatzkurven von 4 Honigen mit verschiedenen Diastasezahlen

3. *Endvolumen und Stärkeart*

Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich die Methode *Schade*, *Marsh* und *Eckert* von den meisten anderen Verfahren durch die besondere Art der Verdünnung. Anstatt auf ein definiertes, konstantes Endvolumen zu verdünnen, wird in einem Leerversuch ohne Honig die Jodstärke-Lösung soweit mit Wasser verdünnt, bis ein vorgeschriebener Extinktionswert erreicht wird.

Die Ermittlung des Endvolumens muß empirisch erfolgen, weil die Jodstärke-Lösung beim Verdünnen mit Wasser dem *Beer*schen Gesetz nicht gehorcht, was verständlich ist, da auf Zusatz von Wasser auch die Jodkonzentration ändert. Das Endvolumen braucht allerdings für jedes Stärkepräparat nur einmal festgelegt zu werden.

Aus den Versuchen in Tab. 3 ist ersichtlich, daß man nach der am Schluß der Arbeit angegebenen modifizierten Methode *Schade* für ein und denselben Honig recht gut übereinstimmende Werte findet, gleichgültig was für ein Stärkepräparat verwendet wird. Es variiert lediglich das durch Verdünnen mit Wasser einzustellende Endvolumen innerhalb weiter Grenzen (11,6 bis 32,5 ml). Beim untersuchten Tessiner-Honig bewegten sich die Diastasezahlen zwischen 10,1 und 12,2, was verglichen mit allen anderen Methoden bereits als gut bezeichnet werden muß. Mit «normal» abgebauten löslichen Stärken findet man Diastasezahlen um 11,5. Nur mit den ganz extremen Stärkepräparaten erhält man etwas abweichende Diastasezahlen. So geben die beiden, offensichtlich nur ganz wenig abgebauten, mangelhaft löslichen Stärkepräparate Nr. 5 und 6 etwas zu niedrige Werte. Umgekehrt findet man mit den beiden weitgehend dextrinierten Präparaten Nr. 7 und 8 (mit sehr niedrigen Blauwerten) etwas zu hohe Diastasezahlen.

Tabelle 3

Weitgehende Unabhängigkeit der Diastasezahl nach Schade und Mitarbeiter vom Stärkepräparat

Kastanienhonig 1960 (Kanton Tessin)

Nr.	Stärkepräparat	Blauwert nach *Hadorn* und *Doevelaar*	Endvolumen ml	Diastasezahl	
1	Noredux Standard	1,005	26,8	11,4	11,0
				11,4	11,2
2	Eigene Standard-Stärke (aus Nr. 6 und 9)	1,030	28,5		
				11,1	11,3
3	Lintner I	1,025	28,5	11,7	
4	von Fellenberg I	1,095	31,8	11,4	
5	Schuchard	1,258	33,5	10,1	10,1
6	Riedel de Haën (GEG)	1,295	32,5	10,2	10,1
				10,0	
7	Riedel de Haën (VSK)	0,575	14,6	12,2	
8	Zulkowsky	0,520	13,7	12,2	12,0
9	Lintner II	0,496	11,6	11,4	

Durch Mischen eines wenig abgebauten Präparates (Riedel de Haën GEG) mit einem stark abgebauten (*Lintner* II) im berechneten Verhältnis, haben wir eine Standardstärke hergestellt, die nahezu die gleichen Eigenschaften besaß, wie das von uns benutzte Noredux-Präparat (siehe Absorptionsspektren der Jod-

stärke in Fig. 4). Wir fanden mit dieser Mischung in verschiedenen Honigen praktisch die gleichen Diastasezahlen wie mit der Noredux-Stärke, was aus den Resultaten der Tab. 4 hervorgeht.

Tabelle 4

Diastasezahl nach Schade mit Noredux- und eigener Standardstärke

Honigmuster	Mit Noredux Standardstärke	Eigene Standardstärke Mischung aus Lintner II und Riedel de Haën GEG
Schweizer Bienenhonig (Appenzell) (12)	19,2 18,9	19,1 18,8
Kastanienhonig (Tessin) (1)	11,0 11,2	11,1 11,3
Mexikanischer Honig (17)	10,6 10,9 10,7	10,5 10,5

Tabelle 5

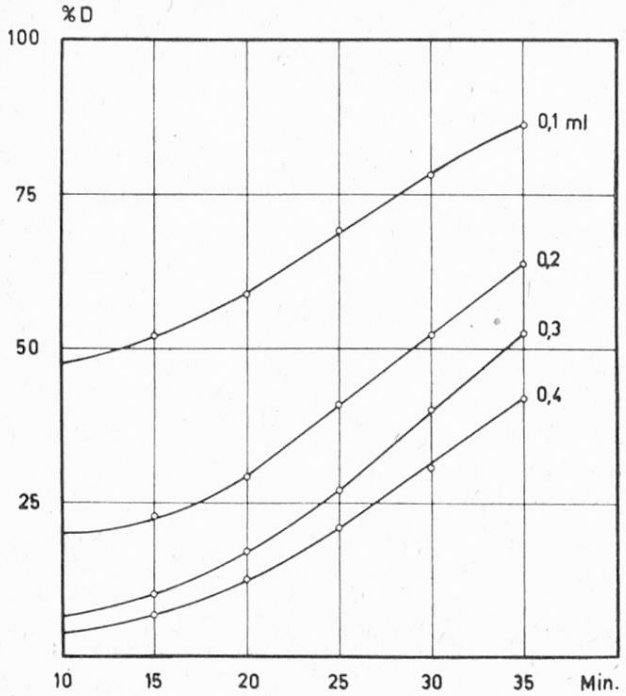
Jodkonzentration für Jodstärkefärbung bei Diastase-Bestimmungen nach verschiedenen Autoren

Autor	Zugesetzte Jodlösung		Endvolumen ml	J-Konzentr. in der Endlösung
	Menge ml	Konz. Normalität		
Auzinger	1,0	0,026-n	12,0	0,0022-n
Gothe, Kiermeier und Köberlein	0,05 (1 Tropfen)	0,1-n	17,0	0,00029-n
Schwimmer	5,0	0,0035-n	15,5	0,0011-n
Schade und Mitarbeiter	5,0	0,0007-n	ca. 25 *	0,00014-n *
Hadorn und Doevelaar	1,5	0,02-n	100,0	0,0003-n

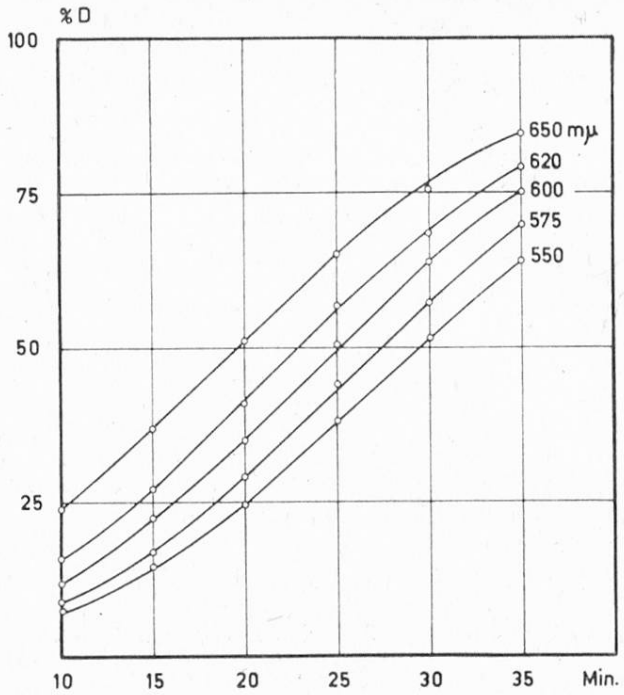
* Das Endvolumen ist variabel und wird für jede Stärkesorte festgelegt, daher variiert auch die Jod-Konzentration in der Endlösung.

4. *Jodkonzentration*

Die Intensität der Jodstärkefärbung ist in hohem Maß von der Jodkonzentration abhängig. Wie *Hadorn* und *Doevelaar* [30]) gezeigt haben, nimmt die Extinktion mit steigender Jodkonzentration zu. Das Maximum der Färbung wird erst annähernd erreicht, wenn auf 100 ml Endlösung 1,5 ml 0,02-n Jodlösung zugesetzt werden. Hohe Jodkonzentrationen haben den Nachteil, daß die Jodstärke leicht ausflockt. Bei Diastasebestimmungen in Honig werden von den verschiedenen Autoren recht unterschiedliche Jodkonzentrationen vorgeschlagen, wie aus den Angaben der Tab. 5 hervorgeht.



Figur 2
Einfluß der Jodkonzentration



Figur 3
Einfluß der Wellenlänge

In Figur 2 ist der Einfluß der Jodkonzentration dargestellt. Die Zeitumsatz-Kurven wurden unter den Bedingungen wie sie *Schade* und Mitarbeiter vorschreiben, erhalten, lediglich die Jodkonzentration ist bei den einzelnen Versuchsserien (bei konstantem Endvolumen von 25 ml) von 0,1 ml bis 0,4 ml 0,02-n Jod variiert worden. Bei höheren Jodkonzentrationen sind alle Lösungen intensiver gefärbt, die Lichtdurchlässigkeit also geringer.

Bei der Methode von *Schade* und Mitarbeitern wird, wie erwähnt, die vorgeschriebene Blaufärbung der Jodstärkelösung (Ext. = 1,76) im Leerversuch eingestellt, indem die Lösung mit Wasser auf das nötige, empirisch ermittelte Volumen verdünnt wird. Dadurch werden in erster Linie Unterschiede im Blauwert der löslichen Stärke, der je nach Provenienz und Herstellungsart stark schwanken kann, ausgeglichen. Aber auch Abweichungen der Jodlösung von der vorgeschriebenen Normalität (0,0007-n) werden gleichzeitig korrigiert, wie nachstehende Versuche zeigen. Wir haben bei Diastasezahl-Bestimmungen die Jodmenge willkürlich verdoppelt (10 ml) und das Endvolumen entsprechend erhöht, so daß im Leerversuch wiederum die Extinktion 1,76 erhalten wurde. Aus den Resultaten in Tab. 6 geht eindeutig hervor, daß man nach der Methode *Schade, Marsh* und *Eckert* auch mit anderen Jod-Konzentrationen genau gleiche Diastasezahlen findet, vorausgesetzt, daß das Endvolumen sorgfältig auf die vorgeschriebene Extinktion des Leerversuchs eingestellt wird. Abweichungen von der vorgeschriebenen Normalität der Jodlösung sind unter dieser Voraussetzung ohne Einfluß auf das Resultat. Erfahrungsgemäß ist es jedoch zweckmäßiger, die Normalität der Jodlösung genau einzuhalten, da die verdünnte Jodlösung aus der stets vorrätigen 0,1-n Jodlösung einfach zubereitet werden kann.

Tabelle 6

Variieren der Jodmenge bei gleichzeitiger Anpassung des Endvolumens

Jodmenge ml 0,0007-n J.	Endvolumen ml	Lindenhonig von Ringgenberg (Kt. Bern) Diastasezahl	Yucatan-Honig Diastasezahl
5,00	26,8	19,5	14,6
10,00	31,8	19,7	14,4

5. Wellenlänge

Das Absorptionsvermögen der Jodstärke ist bei den verschiedenen Wellenlängen ganz unterschiedlich. Das Maximum liegt bei normaler, nicht zu stark abgebauter löslicher Stärke bei 570 bis 580 mμ. Bei stark abgebauter Stärke verschiebt es sich nach kürzeren Wellen (Vgl. Fig. 4). Bei kolorimetrischen Diastasezahl-Bestimmungen ist es daher wichtig, die Wellenlänge festzulegen, bei der die Messungen vorzunehmen sind. *Schade, Marsh* und *Eckert* verwenden ein Filter von 660 mμ, *White* und *Pairent* empfehlen ein Rotfilter (660 mμ) oder ein Interferenzfilter von 600 mμ.

Bei einem Diastaseversuch nach der Methode *Schade, Marsh* und *Eckert* haben wir die nach verschiedenen Incubationszeiten mit Jodlösung angefärbten Reaktionsmischungen bei verschiedenen Wellenlängen ausgemessen. Das Endvolumen betrug in allen Fällen 26,8 ml und ergab für die Wellenlänge 575 mμ im Leerversuch die vorgeschriebene Extinktion. In Fig. 3 ist die erhaltene Kurvenschar dargestellt. Die einzelnen, annähernd parallel verlaufenden Kurven entsprechen dem mittleren, ziemlich linearen Stück der S-Kurve (Vgl. Fig. 1). Beim Verändern der Wellenlänge verschieben sich die Kurven ziemlich stark, was andere Diastasezahlen zur Folge hat. (Im Beispiel der Fig. 3. DZ 10,2 bis 15,3).

Der Einfluß der Wellenlänge läßt sich in ähnlicher Weise wie derjenige der Jodkonzentration weitgehend korrigieren, indem man wiederum nach der Vorschrift von *Schade, Marsh* und *Eckert* auf das zur Erreichung der Extinktion 1,76 erforderliche Endvolumen einstellt. Für einen Alpenhonig mit ziemlich hoher Diastasezahl haben wir die Messungen bei 575 mμ und bei 660 mμ durchgeführt, wobei das Endvolumen entsprechend variiert wurde. In der Tab. 7 sind alle wichtigen Daten angegeben.

Tabelle 7

Einfluß der Wellenlänge auf Endvolumen und Diastasezahl

Alpenhonig (Ringgenberg)

Wellenlänge	Jodmenge 0,007-n	Endvolumen	Anfangsextinkt. (Leerversuch)	Diastasezahl
575 mμ	5,00 ml	26,8 ml	1,77	19,5
660 mμ	5,00 ml	17,4 ml	1,76	21,7

Die bei 660 mμ erhaltene Diastasezahl ist deutlich höher als die bei 575 mμ ermittelte, obwohl die Anfangsextinktion des Leerversuchs in beiden Fällen praktisch gleich war. Dies hängt zweifellos damit zusammen, daß die Stärkeabbauprodukte («Dextrine») mit Jodlösung rotbraune Färbungen geben, die bei 660 mμ viel weniger Licht absorbieren als bei 575 mμ. Arbeitet man bei 660 mμ, so ist der vorgeschriebene Endpunkt (50 % Durchlässigkeit) nach kürzerer Zeit erreicht, was eine höhere Diastasezahl zur Folge hat.

Mit Spektralphotometern sollte daher immer im Absorptionsmaximum gemessen werden. Mit Filterinstrumenten wird man aber auch ganz brauchbare Werte erhalten, sogar wenn der Filterschwerpunkt merklich von 575 mμ abweicht.

6. *Temperatur*

In einer früheren Arbeit [30]) wurde gezeigt, daß die Jodstärkefärbung temperaturabhängig ist. Für jedes Grad Temperaturerhöhung nimmt die Extinktion um etwa 1 % ab. Es sollen daher alle Lösungen bei genau 20° C gemessen werden.

7. *pH-Wert und Beständigkeit der Jodstärke-Färbung*

Nach der Vorschrift von *Schade, Marsh* und *Eckert* erhält man Jodstärkelösungen, deren Färbungen nicht konstant bleiben und oft schlecht reproduzierbar sind. Nach dem Vermischen von Jod- und Stärkelösung stellt sich nicht sofort eine konstante Färbung ein. Die Extinktion steigt während etwa einer Stunde an und nimmt nachher wieder ab. Durch einen Zusatz von 5 ml 0,1-n Salzsäure werden die Jodstärkefärbungen viel stabiler. Das Maximum wird in saurer Lösung (pH etwa 1,8) nach etwa 1 Stunde erreicht und die Extinktion bleibt während mindestens 3 Stunden, in einigen Fällen bis 17 Stunden, konstant. In nicht angesäuerten Proben (pH = 4,9) erhält man meistens schwankende Werte und die Extinktion nimmt schon nach 1 Stunde merklich ab, weil offenbar Jod verbraucht wird.

8. *Reihenfolge der Reagenzien-Zusätze*

Bei der Einstellung des Blauwertes im Leerversuch erhielten wir im Anfang ziemlich große Streuungen, die sich auch auf die Diastasezahl auswirkten. Der Grund war darin zu suchen, daß man nach der Vorschrift von *Schade* und Mitarbeitern jeweils 0,5 ml der Stärkelösung in 5,0 ml Jodlösung einpipettiert und die tiefblaue Lösung anschließend mit Wasser auf das erforderliche Endvolumen verdünnt. Im Moment der Bildung der Jodstärke liegt die Stärke in relativ hoher Konzentration in wenig Flüssigkeit vor (0,5 ml), was zu Schwankungen in der Blaufärbung führen kann.

Als zweckmäßiger erwies sich folgende Arbeitsweise: Die Stärkelösung, bzw. 0,5 ml der Honig-Stärkemischung werden in 5,0 ml 0,1-n Salzsäure einpipettiert. Durch die Säure wird die Wirkung der Honigdiastase augenblicklich sistiert.

Anschließend gibt man die zum Verdünnen auf das Endvolumen ermittelte Menge Wasser zu und zum Schluß unter Umschwenken 5,0 ml 0,0007-n Jodlösung, mischt gut durch und läßt 1 Stunde im Dunkeln stehen. Nach dieser Methode erhielten wir viel besser reproduzierbare Werte. Im übrigen entsprechen alle Versuchsbedingungen denjenigen der Methode von *Schade, Marsh* und *Eckert,* so daß die Resultate ohne weiteres vergleichbar sind.

9. Puffern der Stärkelösung

Stabilere Stärkelösungen und besser reproduzierbare Blauwerte im Leerversuch erhielten wir durch Puffern der Stärkelösung. Die lösliche Stärke wurde vor dem Auflösen mit etwas Pufferlösung (pH = 5,3) versetzt und die Stärkesuspension während 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt (Siehe Abschnitt Methodik).

10. pH-Optium und Aktivierung der Diastase durch Natriumchlorid

Nach *Gorbach* und *Barle* [10]) liegt der optimal Bereich der Diastasewirkung für α- und β-Amylase bei pH = 5,1 bis 5,3 und ist unabhängig davon, ob zur Pufferung der Versuchsansätze Zitronensäure-Phosphat- oder *Soerensen*sche Natriumacetatgemische verwendet werden. Diese Resultate bestätigen die Befunde von *Elser* [31]) sowie diejenigen von *Lothrop* und *Paine* [32]). Natriumchlorid soll die Amylasen aktivieren, hat jedoch nach *Gorbach* und *Barle* keinen Einfluß auf das pH-Optimum. Nach *Gontarski* [27]) dagegen soll den Enzymversuchen kein Natriumchlorid zugefügt werden. *Gontarski* schreibt wörtlich: «Es hat sich gezeigt, daß eine NaCl-Zugabe die diastatische Wirkung im optimalen pH-Bereich nicht steigert, und daß andererseits bei nicht optimalem pH durch NaCl keine Optimalwirkung erreicht werden kann.» *Gontarski* weist darauf hin, daß das Wirkungsoptimum der Honigdiastase je nach Art und Herkunft des Honigs variiert. Er empfiehlt daher die Enzymaktivität bei 3 verschiedenen pH-Werten (pH = 4,2; 4,8; 5,4) zu bestimmen, um das Maximum der Diastaseaktivität zu erhalten.

Um die sich widersprechenden Behauptungen zu überprüfen, haben wir nach unserer am Schluß dieser Arbeit angegebenen etwas modifizierten *Schade*-Methode die Diastasezahl eines Kastanienhonigs bei verschiedenen pH-Werten, sowie mit und ohne Natriumchlorid-Zusatz bestimmt. Bei der Kontrolle der pH-Werte zeigte sich, daß die von *Schade* und Mitarbeitern angegebene Puffermenge etwas knapp bemessen war. Nach dem Mischen von Honig- und Pufferlösung ergaben sich infolge des Säure- und Salzgehaltes des Honigs pH-Verschiebungen, so daß beim Enzymversuch der pH-Wert um 0,2 bis 0,3 Einheiten vom pH-Wert der Pufferlösung abwich. Durch Verdoppeln der Puffermenge gelingt es, den gewünschten pH-Wert recht genau einzustellen. Die Tabelle 8 enthält alle Versuchsbedingungen und Resultate.

Tabelle 8

Einfluß von pH-Wert und NaCl-Zusatz auf die Diastase-Aktivität

Reiner Edelkastanienhonig

Ohne NaCl-Zusatz				Mit 1,5 ml 0,5 m NaCl in 25 ml Stammlösung			
Puffer pH	Honig+ Puffer pH	nach dem Enzym-versuch pH	Diastasezahl	Puffer pH	Honig+ Puffer pH	nach dem Enzym-versuch pH	Diastasezahl
4,80	4,45	4,41	5,65	4,80	4,48	4,42	6,75
4,20	4,81	4,85	7,70	4,20	4,80	4,88	10,2
5,30	5,13	5,13	9,00	5,30	5,11	5,12	11,2
5,60	5,56	5,60	8,27	5,30	5,30*	5,30	10,8
6,00	6,04	5,99	8,03	5,60	5,56*	5,58	11,3
				5,98	5,98*	5,98	10,0

In 25 ml Honigstammlösung waren enthalten:

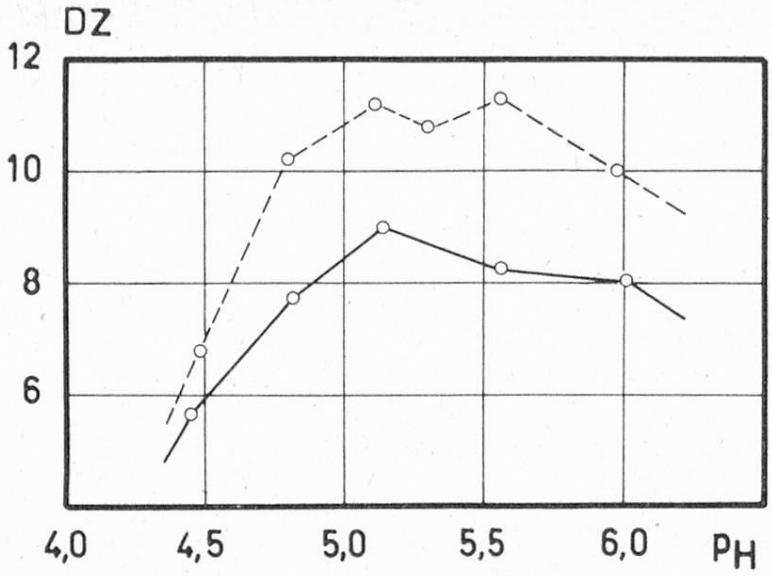
5,00 g Honig
2,50 ml 1,59-m Acetatpuffer (bzw. 5,0 ml bei *)
1,50 ml 0,5-m NaCl

Für den Enzymversuch wurden gemischt:

10,0 ml Honigstammlösung
5,0 ml 2 %ige Stärkelösung.

In Figur 5 ist die Diastasezahl in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Das Aktivitätsoptimum der α-Amylase des untersuchten Honigs liegt zwischen pH = 5,1 und pH = 5,6. Durch Natriumchlorid-Zusatz wird die Aktivität bei allen pH-Werten deutlich erhöht. Damit sind die Ergebnisse von *Gorbach* und *Barle* bestätigt. Der Natriumchlorid-Zusatz scheint jedoch nicht bei allen Honigen gleich zu wirken. In der Arbeit von *Gorbach* und *Barle* findet man in Fig. 3 das Verhalten eines Honigs eingezeichnet, dessen α-Amylase im Bereich von pH = 5,5 bis 6,3 durch Natriumchlorid *nicht* aktiviert wird, was wiederum mit den Befunden von *Gontarski* im Einklang steht.

Auf die Bestimmung der Diastasezahl bei drei verschiedenen pH-Werten, wie es *Gontarski* vorschlägt, muß bei Routineanalysen verzichtet werden. Nach eigenen Versuchen scheint der von *Schade* gewählte pH-Wert = 5,3 ziemlich optimal zu sein. Nach *Gontarski* sind übrigens im Bereich zwischen pH 4,6 und 5,6 die Wirkungsunterschiede meist verhältnismäßig gering. Zahlenangaben über die gemessenen Amylaseaktivitäten fehlen leider.



Figur 5
Einfluß von pH-Wert und NaCl-Zusatz auf die Diastasezahl
– – – – – – mit NaCl ———— ohne NaCl

11. Beständigkeit der Honig-Amylase in der gepufferten Stammlösung

Enzymversuche sollen in der Regel möglichst in einem Zuge durchgeführt werden, weil beim Aufbewahren verdünnter Lösungen die Enzym-Aktivität meistens abnimmt. Wir haben das Verhalten einer nach *Schade* und Mitarbeitern hergestellten auf pH = 5,3 gepufferten Honig-Stammlösung beim Aufbewahren bei Zimmertemperatur untersucht und folgende Ergebnisse erhalten:

Diastasezahl der frischen Lösung	=	10,1
nach 2 Stunden	=	10,2
nach 7½ Stunden	=	10,2
nach 24 Stunden	=	9,2

Die Diastase scheint demnach in der gepufferten Stammlösung recht stabil zu sein. Nach 7½ Stunden war die Aktivität noch unverändert. Erst nach 24 Stunden war ein deutlicher Rückgang feststellbar.

12. Modellversuche mit Honig-Verschnitt

Nach Angaben von *Schwimmer* [26]) soll die zum Abbau der Stärke bis zum definierten Endpunkt erforderliche Zeit, der Enzymmenge umgekehrt proportional sein. Mit anderen Worten: Die Diastasezahl ist der Enzym-Konzentration direkt proportional. Um diese Gesetzmäßigkeit zu überprüfen, haben wir echten Bienenhonig in genau bekanntem Verhältnis mit Rohrzucker gemischt. Bei der Herstellung der für die Diastasezahl-Bestimmung erforderlichen Stammlösungen haben wir die Honigmenge auf 50 % bzw. 25 % reduziert und die fehlende Honigmenge (Trockenmasse) durch Rohrzucker ersetzt. In der Tabelle 9 sind alle nötigen Angaben enthalten. Aus den Resultaten ist ersichtlich, daß in

diesen «Honig-Verschnitten» die Diastasezahl gegenüber dem reinen Honig fast theoretisch genau im erwarteten Verhältnis abnimmt. Das von *Schwimmer* bei Malzamylase gefundene Proportionalitätsgesetz stimmt somit auch bei der Bestimmung der Honigdiastase nach *Schade* und Mitarbeitern.

Tabelle 9

Diastasezahl von Honig und Honig-Verschnitt

Muster	25 ml Stammlösung enthielten 2,5 ml Puffer 1,5 ml NaCl-Lösung	Honig-Anteil	Alpenhonig von Ringgenberg		Yucatan-Honig	
			DZ gefunden	DZ in % des reinen Honigs	DZ gefunden	DZ in % des reinen Honigs
1. Honig rein	5,00 g Honig	100 %	19,5	100	14,7	100
2. Mischung mit 50 % Honig	2,50 g Honig 2,00 g Rohrzucker	50 %	10,0	51,3	7,33	49,8
3. Mischung mit 25 % Honig	1,25 g Honig 3,00 g Rohrzucker	25 %	4,92	25,2	3,92	26,7

IV. Ueber lösliche Stärkepräparate

Die löslichen Stärken des Handels verhalten sich, wie bereits erwähnt, je nach Herkunft und Darstellungsart bei der Diastasebestimmung stark verschieden. Zur Diastasebestimmung wird meistens entweder *Zulkowsky*- oder *Lintner*-Stärke vorgeschrieben. Diese Präparate werden jedoch nicht immer in gleicher Qualität geliefert, was zu Unstimmigkeiten bei der Diastasezahlbestimmung führt, worauf bereits *von Fellenberg* [21]), *Schmitt* [23]) und kürzlich auch *Ulmann* und *Richter* [33]) [34]) hingewiesen haben.

Die Vorschriften in der Literatur für die Herstellung löslicher Stärke sind oft nicht sehr präzis. *Von Fellenberg* hat gefunden, daß es beispielsweise nach der Originalvorschrift von *Zulkowsky* kaum gelingen dürfte, Stärkepräparate mit gleichem Abbaugrad und ungefähr gleichen Eigenschaften herzustellen.

Im folgenden sollen die wichtigsten Methoden kurz besprochen werden. Wir haben anschließend verschiedene lösliche Stärken selber hergestellt, ihre Eigenschaften studiert und sie mit löslichen Stärken des Handels verglichen.

1. Herstellung löslicher Stärke

Die Vorschrift von *Zulkowsky* [35]), die bereits *von Fellenberg* überprüft hat, lautet:

1 Teil Kartoffelstärke wird mit 16,7 Teilen Glycerin 30 Minuten lang auf 190° C erhitzt. Man läßt auf 120° C abkühlen und gießt die Lösung allmählich in das 2 bis 3fache Volumen Alkohol.

Von Fellenberg hat mit dieser Methode keine guten Erfahrungen gemacht. Das Erhitzen des Stärkekleisters lasse sich zu wenig genau reproduzieren. *Von Fellenberg* hat daher selber ein lösliches Stärkepräparat hergestellt, mit dem er gleiche Diastasezahlen erhielt wie mit der seinerzeit für die Honigstatistik [20]) verwendeten *Zulkowsky*-Stärke.

Die *von Fellenberg*sche Vorschrift lautet:

«20 g Kartoffelstärke werden in einem geräumigen Erlenmeyerkolben mit einer Mischung von 100 ml 95 %igem Alkohol und 7 ml 2-n Salzsäure 1 Stunde lang im Wasserbad am Rückflußkühler gekocht, wobei der Erlenmeyerkolben in das Wasserbad eintauchen soll. Man läßt abkühlen, filtriert durch eine Nutsche, wäscht mit 95 %igem Alkohol bis zum Verschwinden der Chlorreaktion aus, wäscht noch 1 bis 2 mal mit Aether und trocknet bei 35° C an der Luft.»

Lintner-Stärke wird durch Behandeln von Kartoffelstärke mit verdünnter, wässeriger Salzsäure erhalten. In der Originalvorschrift von *Lintner* [36]) findet man folgende Arbeitsweise angegeben, die zwei Varianten für die Herstellung löslicher Stärke vorsieht:

«Man mischt eine bestimmte Menge Prima-Kartoffelstärke mit 7,5 %iger Salzsäure, so daß die Säure über der Stärke steht. Nach siebentägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur (oder drei Tage bei 40° C) hat die Stärke die Fähigkeit, Kleister zu bilden, verloren. Man wäscht dieselbe durch Dekantieren mit kaltem Wasser aus, bis empfindliches Lackmuspapier keine saure Reaktion mehr zeigt, saugt das Wasser möglichst ab und trocknet die Stärke an der Luft. Das Präparat ist in heißem Wasser leicht und klar löslich.»

Wir haben nach den Vorschriften von *Lintner* und *von Fellenberg* selber einige Präparate löslicher Stärke hergestellt und zu verschiedenen Versuchen verwendet.

2. *Blauwert und Reduktionsvermögen*

Zur Charakterisierung der selbst hergestellten Präparate, sowie verschiedener löslicher Stärken des Handels, die wir aus Vorräten einiger Laboratorien erhalten haben, bestimmten wir den Blauwert und das Reduktionsvermögen.

Der Blauwert mit Jod ist ein Maß für den Amylosegehalt. Beim Abbau der Stärke, d.h. bei Verkürzung der Amyloseketten sinkt der Blauwert. Wir arbeiteten nach einer von *Hadorn* und*Doevelaar* [30]) angegebenen Methode wie folgt:

In einem 100-ml Meßkolben werden etwa 80 ml Wasser, 1,0 ml 1,0-n Salzsäure und 1,5 ml 0,02-n Jodlösung gemischt. Dazu pipettiert man langsam unter ständigem Umschwenken 1,0 ml 0,5 %ige wässerige Stärkelösung (entsprechend 5,00 mg wasserfreier Stärke). Nun wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und 1 Stunde im Dunkeln stehen gelassen. Die Messung der Extinktion erfolgt nach 60 bis 80 Minuten gegen eine Blindprobe ohne Stärke in 2 cm Küvetten bei 20,0° C und der Wellenlänge 575 mμ.

Das Reduktionsvermögen der Stärkepräparate bestimmten wir nach der Methode von *Ulmann* und *Richter* [37]) und berechneten daraus den Polymerisationsgrad. Diese Methode der Endgruppenbestimmung mit Hypojodit basiert auf der Aldosenbestimmung nach *Willstätter* und *Schudel*. Die Arbeitsvorschrift von *Ulmann* und *Richter* (nach einer privaten Mitteilung), die wir ohne Aenderung übernommen haben, lautet:

«5,0 ml einer 4 %igen Stärkelösung (genaue Einwaage S in g/100 ml bezogen auf die aschefreie Stärketrockensubstanz) werden in 15,0 ml 0,02-n Natronlauge pipettiert und langsam 10,0 ml 0,02-n Jodlösung zugefügt. Nach 20minütigem Stehen bei Zimmertemperatur im Dunkeln wird mit 3 ml 2-n Schwefelsäure angesäuert und das ausgeschiedene Jod aus einer Mikrobürette (10 ml) mit 0,02-n Natriumthiosulfatlösung (T = 1,00) titriert. Verbrauch z in ml 0,02-n Thiosulfat (T = 1,00). Zur gleichen Zeit wird der Thiosulfatverbrauch b von 10,0 ml obiger Jodlösung bestimmt. Aus 4 Ansätzen sind die Werte für b und z zu errechnen.

Berechnung:

$$R_M = \frac{100 \cdot 3{,}6\,(b-z)}{1{,}112 \cdot s} \cdot \%$$

b-z = Jodverbrauch
s = mg wasserfreie Stärke in 5 ml
3,6 = Umrechnungsfaktor : 1 ml 0,02-n $Na_2S_2O_3$ (T = 1,00) entspricht 1,00 ml 0,02-n J (T = 1,00) und damit 3,6 mg Maltosehydrat.
1,112 = Umrechnungsfaktor von Stärke in Maltosehydrat.»

Bei Stärke ist diese jodometrische Methode nach eigenen Erfahrungen rein empirisch, da die Reaktion nicht stöchiometrisch verläuft und die Resultate stark von der Reaktionszeit, sowie von der Einwaage und der Temperatur abhängig sind. Die Methode erlaubt unseres Erachtens keine zuverlässigen Aussagen über den wahren Polymerisationsgrad der Stärke. Zum orientierenden Vergleich verschiedener Stärkepräparate ist sie brauchbar.

Die Blauwerte sind viel besser reproduzierbar als das Reduktionsvermögen und zur Prüfung von Stärkepräparaten auf ihre Eignung für kolorimetrische Diastasezahlbestimmung besser geeignet.

Die Eigenschaften der verschiedenen löslichen Stärken des Handels, sowie der selbst hergestellten Präparate sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Aus den Zahlen ist ersichtlich, daß lösliche Stärkepräparate ganz unterschiedliche Blauwerte und Polymerisationsgrade aufweisen können, was auf den verschieden starken Abbaugrad zurückzuführen ist. Nur schwach abgebaut sind auf Grund der hohen Blauwerte von 1,2 bis 1,3 die Präparate 9, 10 und 15. Der Polymerisationsgrad ist mit 77 bis 89 relativ hoch, d.h. auf eine reduzierende Endgruppe kommen 77 bis 89 Glucosereste. Extrem stark abgebaut sind die Präparate 11 und 12 (Riedel de Haën) sowie die selbst hergestellte Lintnerstärke II. Die Blauwerte sind nur etwa halb so groß wie bei den wenig abgebauten Präparaten und der Polymerisationsgrad beträgt nur 17 bis 23. Zwischen diesen beiden Extremen

bewegen sich die meisten handelsüblichen löslichen Stärken. Etwas aus dem Rahmen fällt die *Zulkowsky*-Stärke (Nr. 14). Der Blauwert ist niedrig (0,52), der Polymerisationsgrad mit 52 aber noch verhältnismäßig hoch. Dies hängt möglicherweise mit der andern Darstellung der *Zulkowsky*-Stärke zusammen, die im Gegensatz zu allen anderen Präparaten, nicht durch partiellen Säureabbau der Stärkekörner, sondern durch rein thermischen Abbau in Lösung hergestellt wird.

Auffallend ist die Tatsache, daß man aus der gleichen Kartoffelstärke nach den beiden Varianten von Lintner Präparate mit ganz verschiedenen Eigenschaften erhält. Durch 7tägige Säurebehandlung bei Zimmertemperatur wird die Stärke relativ wenig abgebaut. Das Endprodukt (Nr. 16 Lintner I) entspricht im Blauwert ungefähr der löslichen Stärke, die man nach der Vorschrift *von Fellenberg* erhält. Nach der zweiten Variante von *Lintner* (3 Tage bei 40° C mit 7,5 %iger Salzsäure behandelt) wurde eine viel weiter abgebaute Stärke mit niedrigem Blauwert erhalten (Nr. 17 Lintner II). Auch die zur Herstellung der löslichen Stärke benützte Kartoffelstärke hat einen Einfluß auf das Endprodukt, da bekanntlich der Amylosegehalt der nativen Stärke innerhalb beträchtlicher Grenzen variieren kann. Aus drei verschiedenen Kartoffelstärken haben wir nach der Methode *von Fellenberg* lösliche Stärke hergestellt. Zwei der erhaltenen Präparate (Nr. 18 und 20) hatten ähnliche Eigenschaften. Die aus Kartoffelstärke «Frühbote» erhaltene lösliche Stärke Nr. 21 gab dagegen einen viel niedrigeren Blauwert, was zu erwarten war, da bereits der Blauwert dieser Kartoffelstärke von Natur aus niedrig war (vgl. *Hadorn* und *Doevelaar* [30]).

Nach diesen Ausführungen darf es nicht verwundern, wenn die im Handel erhältlichen «löslichen Stärkepräparate» sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Einmal variiert das Ausgangsmaterial und zudem sind die Vorschriften zur Herstellung löslicher Stärke wie etwa von *Lintner* oder *Zulkowsky* viel zu wenig präzisiert. Präparate der gleichen Firma können von einer Sendung zur andern stark variieren. So liefert beispielsweise die Firma Riedel de Haën unter der gleichen Bezeichnung Präparate mit grundverschiedenen Eigenschaften (vgl. Präparate Nr. 9 bis 12 in Tab. 10). Auch die von der Firma Siegfried vertriebene Noredux-Standard-Stärke weist von einer Sendung zur andern beträchtliche Unterschiede von über 10 % im Blauwert auf. Bei Diastasezahl-Bestimmungen verhalten sich die verschieden stark abgebauten löslichen Stärken, wie früher gezeigt wurde, ganz unterschiedlich.

3. *Absorptionsspektren der Jodstärkelösungen verschiedener Präparate*

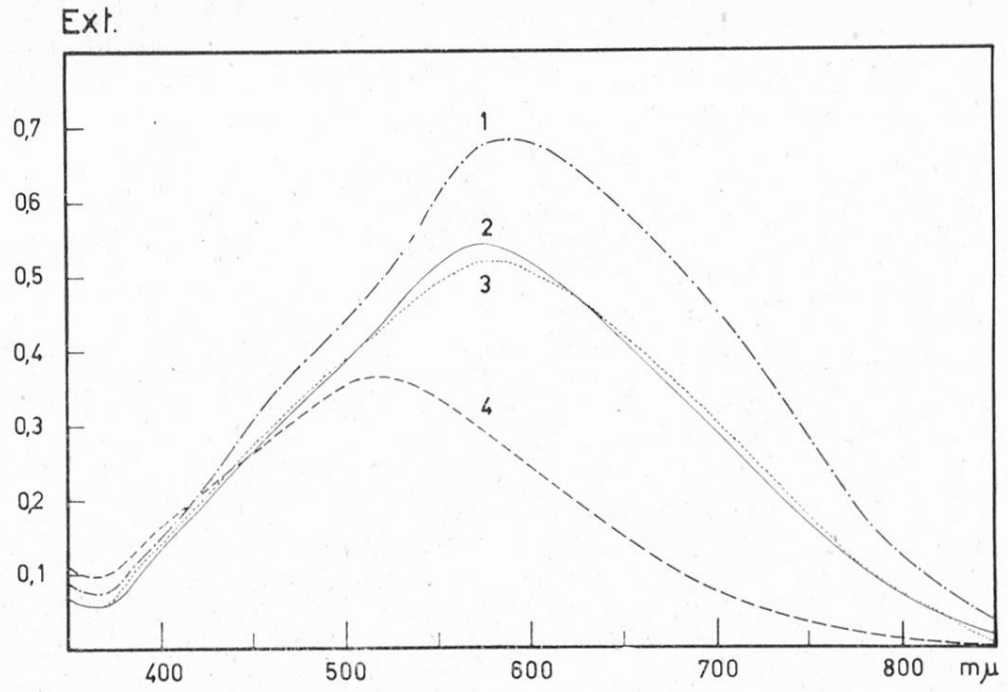
Mit Jodlösung geben die oben erwähnten Stärkepräparate sehr unterschiedliche Färbungen. Je nach Ausgangsmaterial und Behandlungsart enthält die lösliche Stärke mehr oder weniger Amylose, die allein mit Jod eine Blaufärbung gibt. Amylopektin, sowie teilweise abgebaute Amylose (dextrinartige Produkte) geben nur rötlich-braune und viel schwächere Färbungen. Diese Unterschiede kommen am deutlichsten im Absorptionsspektrum der Jodstärkelösung zum Ausdruck. In Fig. 4 sind die Absorptionsspektren von vier Jodstärkelösungen glei-

Tabelle 10

Eigenschaften verschiedener löslicher Stärkepräparate

Nr.	Lösliche Stärke	Trockensubstanz %	Blauwert	Reduktionsvermögen R_M	Polymerisationsgrad DP
	A. *Präparate des Handels*				
	Noredux Standardstärke Siegfried				
1	altes Laborpräparat	86,3	1,005	2,76	73
2	Nr. 21 8885	86,0	1,090	2,60	77
3	Nr. 21 8885	86,3	1,001	2,50	80
4	Nr. 21 8885	86,3	1,123	2,80	72
5	Nr. 22 9895	85,2	1,095	2,49	80
6	ohne Nummer	86,1	1,073	2,68	75
7	Nr. 28 9370	86,4	0,980	2,74	73
8	Neueingang Nr. 22 9895	84,7	1,100	2,43	82
9	Riedel de Haën (GEG)	93,5	0,575	11,6	17
10	Riedel de Haën (Thofra) 1960	86,5	1,295	2,25	89
11	Riedel de Haën (Thofra) 1959	89,7	1,305	2,59	77
12	Riedel de Haën (VSK)	93,2	0,660	11,3	18
13	Merck-Stärke	90,4	1,145	3,25	62
14	Zulkowsky-Stärke *	86,4	0,520	3,85	52
15	Schuchardt-Stärke	88,9	1,258	2,34	86
	B. *Selbst hergestellte Präparate*				
	Lösliche Stärke nach Vorschrift Lintner:				
16	Lintner I, 7 Tage bei 20 Grad behandelt	93,2	1,025	3,57	56
17	Lintner II, 3 Tage bei 40 Grad behandelt	84,1	0,496	8,61	23
	Lösliche Stärke nach Vorschrift von Fellenberg:				
18	v. Fellenberg I aus Kartoffelstärke des Handels	86,0	1,095	3,25	62
19	v. Fellenberg II aus Kartoffelstärke des Handels (Wiederholung)	88,5	1,015	3,67	55
20	v. Fellenberg E aus Kartoffelstärke der Sorte Erstlinge	86,3	1,095	3,38	59
21	v. Fellenberg F aus Kartoffelstärke der Sorte Frühbote	85,1	0,805	4,42	45

* Bei allen löslichen Stärkepräparaten, mit Ausnahme der Zulkowsky-Stärke, waren unter dem Mikroskop die Stärkekörner der Kartoffelstärke noch deutlich erkennbar. Die Körner zeigten kleinere oder größere Risse und Korrosionserscheinungen. Die Zulkowsky-Stärke dagegen ist völlig amorph und strukturlos. In kaltem Wasser geht sie bereits in Lösung, während alle anderen Präparate in kaltem Wasser unlöslich sind.



Figur 4
Absorptionsspektren der Jodstärkelösungen von verschiedenen Stärkepräparaten

1 —·—·—·— Riedel de Haën (GEG)
2 ———— Noredux-Standard
3 ····· Mischung aus 1 und 4
4 - - - - - - Lintner II

cher Konzentration dargestellt. Extrem verschieden sind die lösliche Stärke Riedel de Haën (Kurve 1) und die Lintner-Stärke II (Kurve 4). Die Riedel de Haën Stärke gibt mit Jod eine reine tiefblaue Färbung. Sie besteht vorwiegend aus Amylose. Das Absorptionsmaximum liegt bei 575 mμ, die Lösung absorbiert stark. Die Lintnerstärke II (Kurve 4) ist viel weiter abgebaut, mit Jodlösung entsteht eine schmutzig-braunrote bis rotviolette, viel schwächere Färbung. Das Absorptionsmaximum ist nach kürzeren Wellen verschoben und liegt bei 520 mμ. Die gesamte Lichtabsorption ist viel geringer. Zwischen diesen beiden Extremen liegt die Noredux-Standard-Stärke.

4. *Einfluß des Abbaugrades des Stärkepräparates auf die Diastasezahl*

Es ist ohne weiteres einleuchtend, daß derart verschiedene Stärkepräparate bei der Diastasebestimmung nach *Gothe*, wo der Endpunkt visuell beobachtet wird, voneinander abweichende Resultate liefern. Ein Stärkepräparat, das von Anfang an eine viel schwächere Blaufärbung mit Jod gibt, wird eben rascher so weit abgebaut sein, daß die Blaufärbung verschwunden ist, als ein Stärkepräparat mit intensiv blauer Färbung. Oder, was aufs gleiche herauskommt, bei der Methode *Gothe* muß einem bereits weitgehend abgebauten Stärkepräparat weniger Honiglösung zugefügt werden, um es in 1 Stunde bis zum Verschwinden

der Blaufärbung abzubauen. Die Diastasezahl nach *Gothe* wird also höher ausfallen.

In der Tabelle 1 wurden für einen Tessiner-Honig die mit verschiedenen Stärkepräparaten gefundenen Diastasezahlen nach *Gothe* bereits mitgeteilt. Auch bei der kolorimetrischen Endpunktsbestimmung mit konstantem Endvolumen, beispielsweise nach der Methode *Schwimmer*, liegen die Verhältnisse ähnlich. (Tabelle 2). Bei teilweise abgebauter Stärke ist der Endpunkt, d.h. die vorgeschriebene Lichtdurchlässigkeit, in viel kürzerer Zeit erreicht als bei wenig abgebauter Stärke. Hierauf sind auch die Unterschiede zurückzuführen, die *Redfern* [22]) mit verschiedenen Stärkepräparaten bei der kolorimetrischen Diastasebestimmung beobachtet hat.

In neuester Zeit haben *Ulmann* und *Richter* [33]) eine interessante Arbeit über Lintner-Stärken publiziert, die uns erst kurz vor dem Abschluß unserer Versuche zugänglich war. Sie fanden, daß sich die verschiedenen Handelspräparate hinsichtlich ihres Gehaltes an wasserlöslichen Anteilen, im Reduktionsvermögen und dem daraus berechneten Polymerisationsgrad, sowie in den Chromatogrammen an Aluminiumoxyd stark unterscheiden. Die Unterschiede werden auf einen ungleich starken Säureabbau zurückgeführt, was sich hauptsächlich auf den mittleren Polymerisationsgrad auswirkt. Bei Aktivitätsbestimmungen von α-Amylase ist unter gleichen Reaktionsbedingungen bei stärker abgebauten Präparaten der Endwert nach viel kürzerer Zeit erreicht als bei wenig abgebauten Präparaten. Die daraus berechneten Diastaseaktivitäten können bei stark abgebauten Stärkepräparaten 2 bis 3 mal höher ausfallen als bei wenig abgebauten.

In einer weiteren Arbeit [27]) erläutern die beiden Autoren diese Verhältnisse an einem anschaulichen Schema. Der Umschlag der Jodstärkefärbung von Blau nach Violett erfolgt nach *Ulmann* und *Richter* bei einer kritischen Kettenlänge von 30 bis 35 Glucoseresten. Bei einem ziemlich stark abgebauten Stärkepräparat ist unter der α-Amylasewirkung diese kritische Kettenlänge früher erreicht als bei einem wenig abgebauten höhermolekularen Präparat, da bei diesem eine größere Anzahl von Bindungen gelöst werden müssen.

5. Standardisieren der Stärke

Um bei der Methode *Gothe* brauchbare und in allen Laboratorien reproduzierbare Werte zu erhalten, muß eine Standardstärke mit möglichst gleichbleibenden Eigenschaften und vor allem mit gleichem Blauwert benutzt werden. Auf Grund unserer Erfahrungen dürfte es kaum möglich sein, im Handel ein derartiges, stets in gleicher Qualität erhältliches, lösliches Stärkepräparat aufzutreiben. Auch bei der eigenen Herstellung von löslicher Stärke nach der Methode *von Fellenberg* ergaben sich Schwankungen. Die native Kartoffelstärke variiert im Blauwert bereits beträchtlich, was auf die natürlichen Unterschiede im Amylose- und Amylopectingehalt zurückzuführen ist. Aber auch aus ein und demselben Ausgangsmaterial erhielten wir bei vermeintlich genau gleicher Be-

handlung nach *von Fellenberg* deutlich voneinander abweichende lösliche Stärkepräparate, was durch die Präparate Nr. 18 und Nr. 19 in Tabelle 10 belegt wird.

Wir versuchten nun, aus zwei löslichen Stärkepräparaten mit extremen Eigenschaften, durch Mischen im richtigen Verhältnis, ein Präparat herzustellen, das den gewünschten konstanten Blauwert aufwies. Zunächst bestimmten wir, wie im Abschnitt Methodik angegeben, nach der Methode *Hadorn* und *Doevelaar* die Blauwerte der verschiedenen Produkte.

Die von uns für zahlreiche Versuche benützte Noredux-Standard-Stärke (Präparat Nr. 1 in Tab. 10) zeigte unter *diesen* Bedingungen die Extinktion 1,00. Dieser Wert wurde willkürlich als Standard festgelegt. Eine eigene Standardstärke wurde hergestellt durch Mischen von zwei Stärkepräparaten, von denen das eine einen Blauwert über 1 und das andere einen Blauwert unter 1 aufwies (Vgl. Abschnitt Methodik).

Das Absorptionsspektrum dieser Mischung war recht ähnlich demjenigen der Noredux-Stärke. Absorptionsmaximum und maximale Extinktion stimmen weitgehend überein (vgl. Kurven 2 und 3 in Fig. 4). Mit dieser durch Mischen von 2 Stärkepräparaten erhaltenen eigenen «Standard-Stärke» fanden wir nach der Methode *Gothe* die gleichen Diastasezahlen, wie mit dem für die meisten Versuche benutzten Noredux-Präparat Nr. 1, was durch die Zahlen in Tabelle 11 belegt wird, während wir mit den Einzelkomponenten stark voneinander abweichende

Tabelle 11

Diastasezahl-Bestimmung nach verschiedenen Methoden mit Noredux und eigener Standardstärke

Honig	Methode *Schade* u. Mitarb. mit Noredux Standard-Stärke	Methode *Gothe*, Modifikation von *Kiermeier* und *Köberlein*	
		mit Noredux Standard-Stärke	mit eigener Standard-Stärke (aus Lintner II + Riedel de Haën GEG)
Einheimische Honige			
Kastanienhonig 1960 (Tessin)	11,3	8,7—10	8,7
Blütenhonig Etzgen 1960 (Kt. Aargau)	11,4	10,0—11,4	10,0
Blütenhonig Oberegg 1960 (Kt. Appenzell)	34,1	28,6—30,8	33,4
Blütenhonig Schwende 1960 (Kt. Appenzell)	23,8	21,0	22,9—25,0
Ausländische Honige			
Yucatan-Blütenhonig	14,5	11,4—13,3	11,4
Mexikanischer Honig	10,8	6,7	6,7— 8,7

Werte erhielten. Für den Kastanienhonig Nr. 1 fanden wir beispielsweise folgende Diastasezahlen:

mit Lintner II Stärke	=	11,4
mit Riedel de Haën (VSK)	=	6,8
mit Noredux-Standard-Stärke	=	10,0 bis 11,4
mit eigener Standard-Stärke (Mischung)	=	10,0

Die Methode *Gothe* gibt mit diesen beiden Standard-Stärken fast durchwegs etwas niedrigere Diastasezahlen als die kolorimetrische Methode von *Schade* und Mitarbeiter. Um bei der *Gothe*-Methode etwas höhere und besser mit den nach *Schade* erhaltenen Diastasezahlen übereinstimmende Werte zu erzielen, müßte eine etwas weiter abgebaute Stärke verwendet werden. Da aber die *Gothe*-Methode ohnehin nicht sehr genau ist und die Werte meistens um einige Einheiten streuen, wurde auf weitere Versuche in dieser Richtung verzichtet. Mit der eben beschriebenen Standard-Stärke wird man nach *Gothe* brauchbare und für Handelsanalysen genügend gut reproduzierbare Zahlen finden. In Grenzfällen, oder wenn zuverlässige Werte gewünscht werden, muß die Diastasezahl unter allen Umständen nach der photometrischen Methode von *Schade* bestimmt werden.

V. Anwendung der von uns modifizierten *Schade*-Methode auf Handelshonige und andere diastasehaltige Produkte

Die Diastasezahl verschiedener Honige wurde nach der am Schluß dieser Arbeit angegebenen Methodik bestimmt. Die Resultate sind in der Tabelle 12 aufgeführt. Bei den Doppel- und Mehrfachbestimmungen handelt es sich zum größten Teil um vollständig voneinander unabhängige Analysen, die auch zeitlich oft um Tage bis Wochen auseinander lagen. Die Reproduzierbarkeit ist durchwegs gut. Nach der neuen Methode läßt sich die Diastasezahl auf wenige Zehntel einer Diastase-Einheit reproduzieren. Die Streuung, (relative Standardabweichung) nach untenstehender Formel berechnet, beträgt auf Grund der in Tabelle 12 aufgeführten 54 Bestimmungen an 18 Honigen s = 1,37 %.

$$s = \sqrt{\frac{(x-M)^2}{m-n}}$$

Es bedeuten: x-M = Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert
m = Zahl der Einzelbestimmungen
n = Zahl der Proben (Anzahl Honige).

Die Diastasezahlen der von uns untersuchten naturreinen Honige bewegen sich innerhalb ziemlich enger Grenzen (DZ = 11 bis 34). Dies deckt sich mit den Ergebnissen *von Fellenbergs* aus der Schweiz. Honig-Statistik [20]), obschon jene Zahlen nicht ohne weiteres mit unsern Werten verglichen werden können. Auffallend niedrige Diastasezahlen wurden nur bei Honigen gefunden, die zweifel-

Tabelle 12

Diastasezahl und Hydroxymethyl-furfurol-Gehalt (HMF) von Honigen

Nr.	Bezeichnung des Honigs	Diastasezahl			HMF nach *Winkler* mg%
	Einheimische Honige				
1	Kastanienhonig 1960 (Tessin)	11,4 11,4	11,0 11,2	11,1 11,3	0,02
2	Blütenhonig Etzgen 1960 (Kt. Aargau)	11,2	11,6		0,60
3	Lindenhonig Ringgenberg (Kt. Bern)	19,1 19,5	19,8 19,5	19,7	0,44
4	Alpenhonig Mürren (Kt. Bern)	13,3	13,3		0,16
5	Blütenhonig Appenzell 1960	17,6	17,3		0,11
6	Blütenhonig Oberegg 1960 (Kt. Appenzell)	33,7	34,5		0,11
7	Blütenhonig Brülisau 1960 (Kt. Appenzell)	16,3	16,1		0,10
8	Blütenhonig Schwende 1960 (Kt. Appenzell)	24,0	23,6		0,18
9	Blütenhonig Haslen 1960 (Kt. Appenzell)	14,0	13,6		0,07
10	Blütenhonig Meisterrüti 1960 (Kt. Appenzell)	11,0	11,1		0,07
11	Blütenhonig Gonten 1960 (Kt. Appenzell)	16,8	17,0		0,15
12	Blütenhonig Eggerstanden 1960 (Kt. Appenzell)	19,3	19,2		0,15
13	Zuckerfütterungshonig 1 : 1 (1940) Sch. 1622	4,9			25,5
14	Zuckerfütterungshonig 1 : 2 (1940) Sch. 1623	6,5			23,9
15	Kontroll-Honig rein (1940) Sch. 1624	7,0			12,1
	Ausländische Honige				
16	Yucatan-Blütenhonig	14,6 14,4	14,6 14,7	14,5	1,15
17	Mexikanischer Honig	10,9	10,6	10,7	2,7
18	Ausländischer Honig	12,1	12,1		0,62
19	Yucatan light amber	16,0	16,4		0,60
20	Mexikanischer Honig, wärmegeschädigt	5,9			8,4
21	Ausländischer Honig, wärmegeschädigt	5,6	5,5		10,2

los durch Wärmeeinwirkung oder ungünstige Lagerung geschädigt waren, was durch die stark erhöhten Hydroxymethyl-furfurol-Gehalte (HMF) bewiesen wird.

Die beiden ausländischen Honige Nr. 20 und 21 mit geringen Diastasezahlen und auffallend hohem HMF-Gehalt waren zweifellos überhitzt.

Besonders interessant sind die 3 Honige Nr. 13 bis 15, die mir in freundlicher Weise von Fräulein Dr. *Maurizio*, Bienenabteilung Liebefeld-Bern, zur Verfügung gestellt wurden. Diese 1940 geernteten Honige, deren Pollenanalyse und chemischen Kennzahlen bereits veröffentlicht sind [39]), wurden in der Zwischenzeit bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Sie haben sich bei einer

mehr als 20jährigen Lagerung dunkel verfärbt. Die Diastasezahl ist niedrig, was nicht besonders verwunderlich ist, da bei übermäßig langer Lagerung die Enzym-Aktivität abnimmt. Auffallend hoch sind jedoch die HMF-Gehalte. Ursprünglich war HMF nicht nachweisbar (*Fiehe*-Reaktion negativ). Diese authentischen Honig-Proben beweisen, daß bei sehr langer Lagerung, auch unter sonst normalen Bedingungen (Raumtemperatur, im Dunkeln) der HMF-Gehalt stark ansteigt. Uebermäßig lange Lagerung des Honigs wirkt sich somit auf Diastasezahl und HMF-Gehalt in gleicher Weise aus, wie eine kurze Ueberhitzung.

Die Zahlen der Tabelle 12 bestätigen, daß die von *Hadorn* und *Kovacs* [5]) vorgeschlagenen Beurteilungsnormen hinsichtlich HMF-Gehalt und Diastasezahl für die meisten Honige zutreffend sind.

Interessehalber haben wir auch die Diastasezahl von Speichel nach dieser Methode bestimmt. Der Mundspeichel ist, verglichen mit Honig, hochaktiv. Die DZ ist etwa 100 mal höher als bei Honig. Wir fanden DZ von 1700 bis 2100. Aus diesem Grund ist bei DZ-Bestimmungen größte Vorsicht am Platz, damit beim Abpipettieren der Lösungen die Honig-Probe nicht mit Speichelspuren verunreinigt wird.

Diastasezahl-Bestimmung in Malzpräparaten

Die modifizierte *Schade*-Methode wurde auch auf Malzpräparate angewandt. Lösungen von diastasereichem Malzextrakt müssen vor dem Ansetzen des Enzymversuchs entsprechend verdünnt werden, damit die Enzymaktivität im Reaktionsgemisch ungefähr gleich ist wie bei Honig. Weil beim starken Verdünnen mit dest. Wasser die Enzyme geschädigt werden können, haben wir zum Verdünnen eine Lösung benützt, die in 100 ml je 10 ml Acetatpuffer (pH=5,3) und 6 ml Kochsalzlösung und 16 g Rohrzucker enthielt. Dadurch wird erreicht, daß die Diastasezahl unter möglichst ähnlichen Bedingungen bestimmt wird wie beim Honig.

Die gefundenen Resultate sind in der Tabelle 13 zusammengestellt. Malz, sowie hochaktive Malzextrakte besitzen Diastasezahlen um 2000. Je nach der Wärmebehandlung des Malzextraktes nimmt die Diastasezahl stark ab. Das Malzextrakt-Präparat Nr. 5, das pasteurisiert worden ist, enthält überhaupt keine Diastase mehr.

Tabelle 13

Nr.	Muster	Diastasezahl
1	Agrano-Malz, fein pulverisiert	2260
2	Malzextrakt A	2120
3	Malzextrakt B	1,5
4	Malzextrakt C	264
5	Malzextrakt-Präparat mit Eisen pasteurisiert	0
6	Malzextrakt N für Nährmittelfabrikation	2040
7	Nährmittel mit 50 % Malzextrakt N	795

VI. Diastasezahl-Bestimmung, nach *Schade* standartisierte Methode

1. Prinzip

Eine gepufferte Honig-Stammlösung wird bei 40° C auf Stärkelösung einwirken gelassen. Von Zeit zu Zeit entnimmt man diesem Reaktionsgemisch Proben und versetzt sie mit Jodlösung. Der Stärkeabbau wird photometrisch verfolgt. Als Endpunkt gilt die willkürlich festgesetzte Lichtdurchlässigkeit von 50 %. Die Diastasezahl (DZ) ist der zum Abbau erforderlichen Zeit umgekehrt proportional.

2. Definition

Die DZ gibt an, wie viele Diastase-Einheiten in 1 g Honig enthalten sind. Die Einheit der Diastase-Aktivität ist jene Enzymmenge (α-Amylase), die in 1 Stunde 0,010 g Stärke bis zum vorgeschriebenen Endpunkt abbaut.

3. Reagenzien

Acetatpuffer (pH=5,3). 43,5 g Natriumacetat ($CH_3COONa \cdot 3\ H_2O$) und 4,5 ml Eisessig werden in frisch ausgekochtem Wasser gelöst und auf 250 ml verdünnt. Längere Zeit haltbar.

Kochsalzlösung, 0,5-m. 2,92 g Natriumchlorid werden in frisch ausgekochtem Wasser gelöst und auf 100 ml verdünnt. Haltbarkeit nur einige Tage (verschimmelt).

Stärkelösung 2 %ig. Es können prinzipiell alle durch schwache Säurehydrolyse löslich gemachten Kartoffelstärken (*Lintner*-Stärke, *von Fellenberg*-Stärke) benutzt werden. Um gut reproduzierbare Resultate zu erhalten, sollte der Blauwert des Präparates (vgl. unter Ziffer 4) zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Die handelsübliche Noredux-Standard-Stärke (Siegfried AG, Zofingen) entspricht diesen Anforderungen.

Von der löslichen Stärke, deren Wassergehalt vorher bestimmt wurde, wägt man die genau 2 g Trockenmasse entsprechende Menge auf der Analysenwaage ab, bringt sie in einen 100-ml Meßkolben und versetzt mit 5 ml Acetatpufferlösung (pH = 5,3) und etwa 75 ml Wasser. Die Stärke wird gut in der Flüssigkeit suspendiert und während 5 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt, wobei am Anfang der Kolben ständig umgeschwenkt wird, bis die Stärke gelöst ist. Die Stärkelösung wird abgekühlt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Haltbarkeit 24 Stunden.

Salzsäure 0,1-n

Jodlösung, 0,0007-n, hergestellt aus vorrätiger 0,1-n Jodlösung. In einem 100-ml Meßkolben bringt man 4 g Kaliumjodid, löst es in wenig ausgekochtem Wasser, fügt mittels einer Präzisionspipette 0,70 ml 0,1-n Jodlösung zu und füllt mit Wasser zur Marke auf. Diese verdünnte Jodlösung ist nur wenige Tage haltbar.

4. Herstellung und Prüfung von löslichen Stärkepräparaten

Lösliche Stärke nach von Fellenberg

20 g Kartoffelstärke werden in einem Erlenmeyer- oder Stehkolben mit einer Mischung von 100 ml 95 %igem Alkohol und 7 ml n-Salzsäure 1 Stunde lang im Wasserbad im Rückflußkühler gekocht, wobei der Kolben in das Wasserbad eintauchen soll. Man kühlt ab, filtriert durch eine Nutsche und wäscht die Stärke mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion aus. Die Flüssigkeit wird scharf abgesaugt und die Stärke an der Luft bei mäßiger Wärme (35° C) getrocknet.

Präparate mit verschiedenem Blauwert erhält man aus Kartoffelstärken verschiedener Provenienz oder durch Variieren der Erhitzungszeit oder der Salzsäurekonzentration.

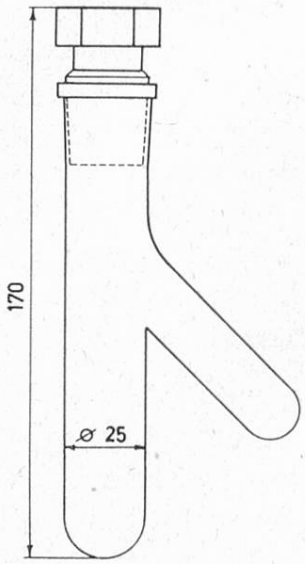
Bestimmung der Trockensubstanz von löslicher Stärke

Etwa 2 g Stärke werden auf dem Boden eines flachen Wägeglases (Durchmesser 5 cm) in dünner Schicht ausgebreitet, dann gewogen und während $1^1/_2$ Stunden bei 130° C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wird zurückgewogen. Der Gewichtsverlust entspricht dem Wassergehalt.

Bestimmung des Blauwertes des löslichen Stärke-Präparates

Als Ausgangslösungen dienen wässerige Stärkelösungen, die in 100 ml 1,000 g wasserfreie Stärke enthalten. Die genau abgewogene Menge lufttrockener Stärke wird in einem 100-ml Meßkolben in etwa 80 ml Wasser und 2,5 ml Acetatpufferlösung, pH = 5,3 aufgeschlämmt. Der Kolben wird in einem kochenden Wasserbad während 5 Minuten erhitzt. Am Anfang muß der Kolben ständig umgeschwenkt werden, bis die Stärke gelöst ist.

Für die Jodstärke-Reaktion gibt man in einen 100 ml-Meßkolben etwa 75 ml Wasser, 1,0 ml 1-n Salzsäure und 1,50 ml 0,02-n Jodlösung. Zuletzt fügt man unter ständigem Umschwenken langsam aus einer Meßpipette 0,50 ml obiger 1%iger Stärkelösung zu, füllt zur Marke auf und läßt 1 Stunde im Dunkeln stehen. Die Extinktion wird nach 60 bis 80 Minuten gegen eine Blindprobe ohne Stärke in der 2 cm-Küvette bei 20° C und der Wellenlänge 575 mμ gemessen. Die Küvette muß unmittelbar vor der Messung durch Einstellen in Wasser auf 20° C thermostatiert werden.



Figur 6

5. Apparatur

Reaktionsgefäß, mit Schliffstopfen und seitlichem Schenkel (siehe Figur 6).

6. Ausführung der Bestimmung

Vorbemerkung: Für alle Lösungen soll nur frisch ausgekochtes Wasser benützt werden. Alle Pipetten sind oben mit einem Wattepfropfen zu versehen, um zu verhindern, daß Spuren von Speichel in die Lösungen gelangen.

Herstellung der Honiglösung. 20 %ig. 5,00 g Honig werden in einem kleinen Becherglas abgewogen, in etwas frisch ausgekochtem Wasser gelöst, mit 2,5 ml Acetatpufferlösung versetzt und in ein 25-ml Meßkölbchen übergeführt. Zuletzt fügt man 1,5 ml Kochsalzlösung zu und füllt zur Marke auf. Zur Diastasebestimmung soll jeweils eine möglichst frische, höchstens 6 Stunden alte Honiglösung benützt werden.

Einstellen des Endvolumens. Das Endvolumen ist im voraus zu bestimmen und bildet für jedes Stärkepräparat eine Konstante (z.B. für Noredux-Standard-Stärke etwa 28 ml).

5 ml 2 %ige Stärkelösung und 10 ml dest. Wasser werden abpipettiert und gemischt (verdünnte Stärkelösung). In einen etwa 50-ml fassenden Schüttelzylinder oder ein geräumiges Reagensglas mit Schliffstopfen pipettiert man 5,0 ml 0,1-n Salzsäure. Dazu bringt man mittels Pipette 0,5 ml der verdünnten Stärkelösung und zuletzt unter Umschwenken mittels einer Vollpipette 5,0 ml 0,0007-n Jodlösung. Aus einer 50 ml Bürette setzt man nun portionenweise Wasser zu bis die Lösung die vorgeschriebene Extinktion von 1,75 bis 1,77 zeigt. Die Messungen erfolgen in 2 cm Küvetten bei 575 mμ und 20,0° C gegen eine Blindprobe von 5,0 ml Jodlösung, die ungefähr auf das zu erwartende Endvolumen verdünnt wurde. Vor jedem Wasserzusatz bringt man den Küvetten-Inhalt in den Schüttelzylinder zurück, fügt eine angemessene Portion Wasser zu, spült die Küvette mit der frisch verdünnten Lösung aus, achtet aber darauf, daß kein Tropfen der Flüssigkeit verloren geht.

Zur Kontrolle wird der Versuch wiederholt, indem man zu 5,0 ml 0,1-n Salzsäure der Reihe nach wiederum 0,5 ml der verdünnten Stärkelösung, dann die im ersten Versuch ermittelte Wassermenge und zuletzt unter Umschwenken 5,0 ml Jodlösung zufügt. Die Mischung bleibt 1 Stunde im Dunkeln stehen, worauf man die Lösung in die Küvette einfüllt, diese durch Einstellen in Wasser von 20,0° C thermostatiert und dann die Extinktion mißt. Wenn nötig, wird das Endvolumen noch etwas korrigiert.

Enzymversuch. In das Reaktionsgefäß (siehe Figur 6) pipettiert man 10,0 ml der 20 %igen Honiglösung in den geraden Schenkel und 5,0 ml unverdünnte 2 %ige Stärkelösung in den seitlichen Schenkel. Das verschlossene Gefäß wird in ein auf 40,0° C thermostatiertes Wasserbad eingetaucht. Es ist streng darauf zu achten, daß sich die Lösungen nicht vorzeitig vermischen. Nach etwa 15 Minuten werden die Lösungen durch mehrmaliges Kippen des Reaktionsgefäßes vermischt und die Zeit des Vermischens genau notiert (Anfangszeit).

In bestimmten Zeitabständen (je nach Diastasezahl alle 2 bis 6 Minuten) entnimmt man dem Reaktionsgemisch mittels einer 1-ml Stabpipette Proben und

läßt je 0,50 ml in einen 50 ml fassenden Schüttelzylinder oder ein Reagensglas mit Schliffstopfen fließen, in welchem sich 5,00 ml 0,1-n Salzsäure befinden. Durch die Säure wird die Enzymwirkung sofort unterbrochen. Man notiert jeweils den Zeitpunkt des Einfließens in die Säurelösung. In den Schüttelzylinder gibt man die im Leerversuch ermittelte zum Verdünnen nötige Wassermenge zu, mischt und gibt nun langsam unter Umschwenken 5,0 ml 0,0007-n Jodlösung zu. Es sind solange Proben zu entnehmen, bis die letzte auf Zusatz von Jod nur noch eine gelbbraune Färbung gibt (Lichtdurchlässigkeit: etwa 60 bis 70 %). Die Gläser werden nach dem Durchmischen des Inhalts eine Stunde im Dunkeln stehen gelassen. Gleichzeitig wird eine Blindprobe mit denselben Reagenzien angesetzt, bei der anstelle des Honig-Stärkegemisches 0,5 ml Wasser zugegeben werden.

Messung der Lichtdurchlässigkeit. Nachdem die Lösungen mindestens eine Stunde im Dunkeln gestanden haben, werden sie unter den gleichen Bedingungen photometriert wie beim Einstellen des Blauwertes. Wellenlänge 575 mμ, 2-cm Küvette, thermostatiert auf 20,0° C. Die Messung erfolgt gegen die Blindprobe.

In dieser Versuchsserie liest man nicht die Extinktion, sondern die Durchlässigkeit in % (oder Transparenz) ab.

7. Berechnung der Diastasezahl

Auf Millimeterpapier wird die Reaktionszeit in Minuten gegen die Lichtdurchlässigkeit in % aufgetragen (Beispiel siehe Figur 1). Zwischen 35 und 70 % Durchlässigkeit verläuft die Kurve praktisch linear. Nun liest man die Reaktionszeit (t) ab, die einer Durchlässigkeit von 50 % entspricht. Um diesen Wert mit genügender Genauigkeit zu erhalten genügen 3 bis 4 Meßpunkte im Bereich von 35 bis 70 % Durchlässigkeit.

Die Diastasezahl gibt an, wie viele Diastase-Einheiten in 1 g Honig enthalten sind. Die Einheit der Diastase-Aktivität ist jene Enzymmenge (α-Amylase), die in 1 Stunde 0,010 g Stärke bis zum vorgeschriebenen Endpunkt abbaut (Durchlässigkeit = 50 %). Da im Reaktionsgemisch 0,1 g Stärke und 2,0 g Honig vorhanden waren, ergibt sich die Diastasezahl aus folgender Formel:

$$\text{Diastasezahl (DZ)} = \frac{60}{t} \cdot \frac{0{,}10}{0{,}01} \cdot \frac{1{,}0}{2{,}0} \quad \text{oder DZ} = \frac{300}{t}$$

t = Reaktionszeit in Minuten um 50 % Lichtdurchlässigkeit zu erreichen.

Beispiel

Aus dem Kurvenverlauf des Tessinerhonigs in Fig. 1 ergibt sich für den Stärkeabbau bis zum vorgeschriebenen Endpunkt von 50 % Lichtdurchlässigkeit eine Reaktionszeit (t) von 26,4 Minuten.

$$\text{DZ} = \frac{300}{26{,}4} = 11{,}4$$

Genauigkeit: relative Standardabweichung s = 1,4 %.

VII. Diastasezahl-Bestimmung nach *Gothe*, Modifikation *Kiermeier* und *Köberlein*

Die Methode ist von *Kiermeier* und *Köberlein* [1]) genau beschrieben worden. Die Werte sind jedoch stark vom benutzten Stärke-Präparat abhängig. Daher soll überall eine Standardstärke mit möglichst gleichen Eigenschaften verwendet werden.

Herstellung der Standardstärke-Lösung

Für die DZ-Bestimmung nach *Gothe* soll eine Standardstärke mit einem Blauwert von 1,00 benützt werden. Da derart eingestellte lösliche Stärke im Handel nicht erhältlich ist, stellt man sie durch Mischen aus zwei Stärken mit niedrigerem und höherem Blauwert her. Man benötigt dazu zwei Stärkepräparate, eines mit einem Blauwert über 1, das andere mit einem Blauwert unter 1. Man stellt von jeder Stärke eine 1 %ige Lösung her (1,000 g Trockenmasse in 100 ml) und bestimmt den Blauwert jeder Lösung, wie bei der Methode *Schade* angegeben (S. 98). Auf Grund der Mischungsregel berechnet man, welche Mengen der beiden Lösungen vermischt werden müssen, um den Blauwert 1,00 zu erhalten. Diese Lösung ist für die *Gothe*-Methode jeden Tag frisch herzustellen.

Es ist zweckmäßig, die beiden Präparate getrennt aufzubewahren und erst vor Gebrauch die berechneten Mengen von jedem Präparat abzuwägen.

Zusammenfassung

1. Es wird eine kurze Literaturübersicht über die Methoden zur Diastasezahl-Bestimmung in Honig gegeben. Die wichtigsten Methoden werden besprochen.
2. Die Diastasezahl-Bestimmung nach *Gothe* in der verbesserten Modifikation von *Kiermeier* und *Köberlein* wurde überprüft. Die Methode hat verschiedene Mängel. Bei der subjektiven Beurteilung der Färbungen sind Zweifel möglich, ob die Stärke vollständig abgebaut ist. Mit verschiedenen löslichen Stärkepräparaten werden oft sehr stark voneinander abweichende Diastasezahlen gefunden.
3. Die photometrische Diastasezahl-Bestimmung von *Schade*, *Marsh* und *Eckert* wurde eingehend überprüft und verbessert. Bei dieser Methode werden die Unterschiede im Abbaugrad verschiedener Stärkepräparate weitgehend ausgeglichen.
4. Einige Methoden zur Herstellung löslicher Stärkepräparate werden diskutiert. Zahlreiche Präparate des Handels sowie einige selber hergestellte lösliche Stärken werden untersucht. Die Unterschiede im Blauwert und Polymerisationsgrad sind beträchtlich, selbst bei angeblich gleichen Präparaten aus verschiedenen Lieferungen derselben Firma. Diese Unterschiede wirken sich bei den meisten Methoden zur Diastasezahl-Bestimmung nachteilig aus, so daß ganz unzuverlässige, nicht vergleichbare Resultate gefunden werden.
5. Eine Methode zur Herstellung und zur Kontrolle von Standardstärke wird beschrieben.
6. Eine genaue Methode zur photometrischen Diastasezahl-Bestimmung wurde ausgearbeitet. Die Streuung der Diastasezahl nach dieser Methode beträgt auf Grund von 54 Bestimmungen an 18 Honigen 1,4 Prozent.

7. Die Diastasezahlen und die Hydroxymethylfurfurol-Gehalte von 21 Honigen werden mitgeteilt und diskutiert.

Résumé

1. On passe brièvement en revue les méthodes de détermination du pouvoir diastasique du miel et examine, plus en détail, les plus importantes d'entre elles.
2. Le contrôle de la méthode de *Gothe*, dans sa forme améliorée par *Kiermeier* et *Köberlein*, a montré que cette méthode présente divers défauts.
3. La méthode photométrique de *Schade*, *Marsh* et *Eckert* a été contrôlée à fond et améliorée. Sous sa forme améliorée c'est cette méthode qui est recommandée.
4. On décrit un mode de préparation et une méthode de contrôle de l'amidon soluble permettant d'obtenir des résultats reproductibles (on a trouvé que les divers modes de préparation usuels conduisent à un produit de degré de polymérisation très variable qui ne permet pas d'assurer la reproductibilité des résultats; il en va de même pour les produits du commerce, dont la composition peut varier d'une livraison à l'autre, pour la même maison).
5. Le pouvoir diastasique de 18 miels a été déterminé (54 déterminations); on a trouvé que les résultats présentent une dispersion de l'ordre de 1,4 %.
6. Le pouvoir diastasique et la teneur en hydroxymethylfurfurol de 21 miels sont indiqués.

Summary

1. Critical examination of various methods for the determination of the diastasic power of honey.
2. The photometric method of *Schade*, *Marsh* and *Eckert* has been improved and is recommended for this determination.
3. A procedure for the preparation and another one for the control of soluble starch have been developed. The soluble starch so prepared gives reproducible results, which is not the case with commercial soluble starches.
4. The diastasic power and the hydroxymethylfurfurol content of 21 honeys have been determined and are indicated. On 18 honeys (54 determinations) the deviation of the results of the determination of diastasic power is equal to 1,4 %.

Literatur

[1]) *F. Kiermeier* und *W. Köberlein*, Z.U.L. **98**, 329 (1954)
[2]) *B. Warnecke* und *H. Duisberg*, Z.U.L. **107**, 340 (1958)
[3]) *H. Duisberg* und *Gebelein*, Z.U.L. **107**, 489 (1958)
[4]) *H. Duisberg* und *Warnecke*, Z.U.L. **111**, 111 (1959/60)
[5]) *H. Hadorn* und *A. S. Kovacs*, diese Mitt. **51**, 373 (1960)
[6]) *O. Winkler*, Z.U.L. **102**, 161 (1955)
[7]) *M. Richter*, Ernährungsforschung **4**, 19 (1959)
[8]) *M. Cek*, Stärke **11**, 315 (1959)
[9]) *E. Moreau*, Annales des Falsifications et des Fraudes **28**, 29 (1911)
[10]) *G. Gorbach* und *K. Barle*, Z.U.L. **73**, 530 (1937)
[11]) *K. Täufel*, *M. de Mingo* und *H. Thaler*, Z.U.L. **71**, 190 (1936)
[12]) *J. Valin*, Annales des Falsifications et des Fraudes, **51**, 269 (1958)

[13]) *A. Auzinger*, Z.U.L. **19**, 65 und 353 (1910)
[14]) Schweiz. Lebensmittelbuch IV. Aufl., S. 161, Verl. Zimmermann & Co., Bern (1937)
[15]) *F. Gothe*, Z.U.L. **28**, 286 (1914)
[16]) *J. Fiehe* und *W. Kordatzki*, Z.U.L. **55**, 162 (1928)
[17]) *H. Weishaar*, Z.U.L. **65**, 369 (1933)
[18]) *J. Koch*, Der Honig, Verlag Ulmer Stuttgart (1927)
[19]) *Th. von Fellenberg* und *W. Rusiecki*, diese Mitt. **29**, 307 (1938)
[20]) Schweiz. Honigstatistik III 1937-40; Beihefte z. Schweiz. Bienen-Ztg. 1, 652 (1946)
[21]) *Th. von Fellenberg*, diese Mitt. **43**, 88 (1952)
[22]) *S. Redfern*, Cereal chemistry **24**, 259 (1947)
[23]) *Schmitt* (Sitzungsbericht) Z.U.L. **97**, 309 (1953)
[24]) *Sandstedt, Kneen* und *Blish*, Cereal Chemistry **16**, 72 (1939)
[25]) *J. Wohlgemuth*, Biochem. Ztschr. **9**, 1 (1908)
[26]) *S. Schwimmer*, Cereal Chemistry **24**, 315 (1947)
[27]) *H. Gontarski*, Z.U.L. **98**, 205 (1954)
[28]) *J. E. Schade, G. L. Marsh* und *J. E. Eckert*, Food Research **23**, 446 (1958)
[29]) *J. W. Withe* und *F. W. Pairent*, Journ. of AOAC **42**, 344 (1959)
[30]) *H. Hadorn* und *F. Doevelaar*, diese Mitt. **51**, 1, (1960)
[31]) *E. Elser*, Schweiz. Bienen-Zeitung 1927, S. 38
[32]) *R. E. Lothrop* und *H. S. Paine*, Ind. Chem. **23**, 71 (1929)
[33]) *M. Ulmann* und *M. Richter*, Die Pharmazie **14**, 617 (1959)
[34]) *M. Ulmann* und *M. Richter*, Monatsbericht Deutsch. Akad. d. Wissenschaft (Berlin) 1, 496 (1959)
[35]) *Zulkowsky*-Stärke, siehe Beilstein, 3. Aufl. Bd. 1, S. 1082
[36]) *C. J. Lintner*, Journ. f. prakt. Chemie **34**, 378 (1886), vgl. auch *H. Röttgers:* Lehrbuch der Nahrungsmittelchemie 4. Aufl. Bd. **2**, 717 (1913). Verlag J. A. Barth, Leipzig.
[37]) *M. Ulmann* u. *M. Richter*, Monatsber. Dtsch. Akad. Wissensch. (Berlin) **1**, 125 (1959)
[38]) *R. Willstätter* und *G. Schudel*, Ber. Dtsch. chem. Gesellschaft **51**, 780 (1918)
[39]) *A. Maurizio*, Beihefte Schweiz. Bienen-Zeitung **2**, 390/91 (1949)

Meinem Mitarbeiter, Herrn *K. Zürcher*, möchte ich an dieser Stelle bestens danken für die Durchführung der zahlreichen Versuche.

Fräulein Dr. *A. Maurizio*, Bienenabteilung, Liebefeld-Bern, hat mir einige Zuckerfütterungshonige überlassen und mir mit Literatur ausgeholfen.

Herr *K. Zürcher*, Bienenkontrolleur in Gonten (Kt. Appenzell), hat mir in zuvorkommender Weise einige Muster von authentischen Honigen aus dem Kanton Appenzell zugestellt.

Von den Herren Dr. *A. S. Kovacs*, Leiter des Zentrallaboratoriums der GEG, Hamburg; *O. Salvisberg*, Chemiker der Firma Thomi & Franck AG, Basel; Dr. *M. Refardt*, Kantonales Laboratorium, Basel, wurden mir verschiedene lösliche Stärkepräparate aus ihren Sammlungen zur Verfügung gestellt.

Für die freundliche Vermittlung der verschiedenen Proben bin ich allen oben genannten zu Dank verpflichtet.