

Die Erreger der Schimmelbildung bei Backwaren

2. Mitteilung: In verschimmelten Schnittbrotten auftretende Mykotoxine*)

Von Gottfried Spicher

1. Einleitung

Schimmelpilze bedingen nicht nur den Verderb von Lebensmitteln – und grenzen dadurch deren Haltbarkeit ein –, sie scheiden zudem Stoffwechselprodukte aus, die für Mensch und Tier toxisch sein und deren Gesundheit gefährden können. Von einer Kontamination mit Schimmelpilzen bzw. Mykotoxinen sind u. U. auch Backwaren betroffen (Reihs, 1983; Spicher, 1981). Die Mykotoxine können entweder infolge Verarbeitung eines in mikrobiologischer Hinsicht nicht einwandfreien Rohstoffes in die Backware gelangt sein oder sie treten im Gefolge einer Schimmelbildung am Enderzeugnis auf. Von den inzwischen bekannten, mehr als 90 Mykotoxinen haben bislang einzig die Aflatoxine eine lebensmittelrechtliche Bedeutung erlangt. Gleichwohl steht das Auftreten einiger der übrigen Mykotoxine bei den Cerealien und den unter deren Verwendung bereiteten Erzeugnissen, wie auch deren gesundheitliche Bewertung, in der Diskussion. Eine Untersuchung über die Art der Erreger einer Schimmelbildung bei verpackten Schnittbrotten, über deren Ergebnis kürzlich berichtet wurde (Spicher, 1984), gab Anlaß zu prüfen, mit welchen Mykotoxinen beim Aufkommen einer Schimmelbildung zu rechnen ist.

2. Material und Methoden

Wie bereits an anderer Stelle dargelegt (Spicher, 1984), wurden die zur DLG-Prüfung für Brot und Backwaren 1981 eingesandten Schnittbrot-Packungen einem Lagerungsversuch unterworfen. Die Lagerung der Brote erfolgte bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70%. Soweit bei den eingelagerten Broten im Verlaufe von sieben Tagen eine Schimmelbildung auftrat, wurden Proben entnommen und diese auf ihren Gehalt an Mykotoxinen überprüft.

Da die für den Mykotoxin-Nachweis in Betracht gezogenen Brote nicht gleichzeitig aufgearbeitet werden konnten, wurden diese jeweils in Aluminiumfolie verpackt und zwischenzeitlich in einem Tiefkühlfach gelagert. Vor Aufnahme der Untersuchungen wurden die Brotscheiben aufgetaut, mit einer Mischung aus 0,1 molarer H_3PO_4 und 250 ml CH_3CN versetzt und anschließend mittels eines Ultra-Turrax zerkleinert. Die auf diesem Weg gewonnene Suspension konnte nach Behandlung im Waring-Blender (30 min) weiter verarbeitet werden. Der Nachweis von Mykotoxinen richtete sich auf die Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , Ochratoxin A, Patulin, Zearalenon, Sterigmatocystin, Citrinin und Penicillinsäure. Die Extraktion und die sich anschließende Reinigung des Extraktes wurde entsprechend dem von van Egmond et al. (1979) beschriebenen Vorgehen (Multimykotoxin-Methode) vorgenommen. Hierbei erfolgt die Reinigung des Extraktes durch Anwendung einer Säulentrennung über Polyamid, die es ermöglicht, störende Substanzen vor der dünnsschichtchromatographischen Trennung weitgehend zu entfernen.

Die Dünnsschichtchromatographie erfolgte unter Verwendung einer Kieselgel-60-Schicht. Zur eindeutigeren Identifizierung der einzelnen Mykotoxine erwies sich die Anwendung der zweidimensionalen dünnsschichtchromatographischen Trenntechnik und der Auftrag eines Standards als erforderlich. Zu einer eindeutigen Identifizierung war es in einigen Fällen erforderlich, die Probe mit dem Standard zu vermischen.

Nach erfolgter Entwicklung wurde die Dünnsschichtplatte unter UV-Licht verschiedener Wellenlängen betrachtet und daran anschließend zur besseren Sichtbarmachung der Mykotoxine mit Sprühreagenzien behandelt.

Die quantitative Auswertung von Dünnsschichtplatten erfolgte unter Zuhilfenahme eines Fluorodensitometers, wobei die aufgetretenen Flecken jeweils mit einem Standard von annähernd gleicher Konzentration verglichen wurden.

3. Befunde

Im Zusammenhang mit den vorangegangenen Untersuchungen an lagernden Schnittbrotten hatte sich gezeigt, daß unter den gegebenen Bedingungen bei etwa 65% der Brote innerhalb von 7 Tagen eine Schimmelbildung

*) Nr. 5106 der Veröffentlichungen der Bundesforschungsanstalt für Getreide- und Kartoffelverarbeitung, Schützenberg 12, D-4930 Detmold.

eintritt (Spicher, 1984). Dieser Verderb war vornehmlich durch das Aufkommen von „Grünschimmel“ bedingt (Tab. 1). Eine Nachprüfung der Artzugehörigkeit der Erreger der Schimmelbildung ergab, daß es sich mehrheitlich (254 Stämme = 88,6%) um Vertreter des Genus *Penicillium* handelte. Insbesondere war *Penicillium roqueforti* vertreten (245 der isolierten Stämme). Daneben trat *P. verrucosum* var. *cyclopium* (6 Stämme), *P. brevicompactum* (1 Stamm), *P. citrinum* (1 Stamm) und *P. expansum* (1 Stamm) auf. Die den „Aspergillen“ zuzuordnenden Schimmelerreger wurden als *Eurotium amstelodami* (2 Stämme), *E. herbarium* (2 Stämme), *Aspergillus clavatus* (1 Stamm) und *A. niger* (4 Stämme) identifiziert. Bei den übrigen Isolaten handelte es sich um *Paecilomyces varioti* (4 Stämme) und *Rhizopus nigricans* (1 Stamm).

Von den verschimmelten Broten wurden – unter Berücksichtigung der Sorte und der Herkunft der Brote sowie der Art der Schimmelbildung – 88 Herkünfte ausgewählt und bezüglich einer Kontamination mit Mykotoxinen überprüft. Im weiteren wurden in diese Untersuchungen 22 Brote (15 Weizenbrote bzw. Weizentoastbrote, 2 Buttermilchbrote, 5 Roggenbrote) einbezogen, die zum gleichen Zeitpunkt von verschiedenen Herstellern zur Feststellung des Auftretens von Aflatoxinen vorgelegt worden waren (Tab. 1).

Der Mykotoxin-Nachweis ergab in 18 Fällen (16,4% der untersuchten Brote) einen positiven Befund. Es wurden die Mykotoxine Citrinin, Ochratoxin A und Zearalenon festgestellt (Tab. 2). Dabei stand das Auftreten von Citrinin mit 11 Nachweisen im Vordergrund. Die Kontamination mit den genannten Mykotoxinen ging in keinem Fall über 8 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) hinaus (Tab. 2).

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen ergab sich kein Hinweis dafür, daß bestimmte Brotsorten in besonderem Maße durch eine Kontamination mit Mykotoxinen gefährdet seien (Tab. 3). Einzig bei den Roggenschrotbroten und Vierkornbroten, von denen jedoch nur 12 Proben in die Untersuchung einbezogen wurden, fiel der Mykotoxin-Nachweis negativ aus. Ebenfalls betraf der Nachweis eines Mykotoxins sowohl Brote, die zur Verzögerung des Wachstums von Schimmelpilzen mit den Konservierungsstoffen Sorbinsäure oder Propionsäure bzw. Propionaten versehen waren, wie auch Brote, die keinen Konservierungsstoff enthielten (Tab. 3).

4. Besprechung der Ergebnisse

Das Auftreten von giftigen Stoffwechselprodukten gewisser Schimmelpilze – den Mykotoxinen – in einem Lebensmittel kann eine Gefährdung der Gesundheit des Konsumenten bedeuten. Im Falle der Aflatoxine hat der Gesetzgeber wegen deren hoher Giftigkeit und der weiten Verbreitung der für ihre Bildung ursächlichen Schimmelpilze gesetzliche Regelungen über die Höhe der duldbaren Kontamination erlassen.

Eine Kontamination durch Mykotoxine ist auch bei Brot und Backwaren nicht auszuschließen (Spicher, 1970). Allerdings ist ihre aufgrund von Laborversuchen zu erwartende Zahl bislang noch größer als die Zahl derjenigen Mykotoxine, die in „natürlich“ kontaminierten Backwaren nachgewiesen wurden. Dies gilt in gleicher Weise bezüglich der von den Erregern der Schim-

melbildung in der Backware jeweils ausgeschiedenen Menge. Auf Broten, die künstlich mit toxinogenen Schimmelpilzen beimpft wurden, sind Citrinin, Ochratoxin A und Sterigmatocystin nachgewiesen worden (Reihs, 1981). Entscheidender für die Abschätzung eines möglichen Risikos für die Gesundheit des Konsumenten ist jedoch die Frage, ob Mykotoxine auch in spontan verschimmelten Broten gebildet werden können. Dies trifft nach der bisherigen Kenntnis für die Aflatoxine, das Patulin und die Penicillinsäure zu (Reihs, 1981). Den dargelegten Befunden zufolge sind diesen auch das Citrinin und das Ochratoxin A hinzuzurechnen. Zudem muß dem Auftreten von Zearalenon in Backwaren bzw. Broten Beachtung geschenkt werden. Die Kontamination von Brot und Backwaren kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Sind bereits die Rohstoffe (Getreide, Mehl, Schrot u. a.) von Schimmelpilzen befallen gewesen und ist es während deren Wachstum zu einer Bildung von Mykotoxinen gekommen, dann gelangen diese bei der Verarbeitung in das Backgut (primäre Kontamination). Andererseits kann die Kontamination sekundär auftreten, wenn die Backwaren nach ihrer Herstellung verschimmelten und damit Mykotoxine in ihr abgelagert wurden. Stellt sich die Frage nach der Ursache der festgestellten Kontamination, dann läßt sich aus der Gegenüberstellung der für das Verschimmeln der Brote ursächlichen Schimmelpilze mit den nachgewiesenen Mykotoxinen eine erste Aussage ableiten. Soweit es das Citrinin anbelangt, finden sich unter den Isolaten *Penicillium citrinum* und *P. expansum* als mutmaßliche Produzenten. Für das Ochratoxin ergibt sich eine derartige Beziehung nicht. Obgleich von den als Ochratoxin-Produzenten infrage kommenden Schimmelpilzen *Aspergillus ochraceus* als Erreger bei Backwaren ausgewiesen ist, konnte im vorliegenden Zusammenhange sein Auftreten nicht belegt werden. Da andererseits *A. ochraceus* auch unter der Mikroflora des Mehles vertreten ist, könnte der fehlende Nachweis den Schluß zulassen, daß es sich möglicherweise um eine primäre, vom Mehl ausgehende Kontamination der Brote handele. Demgegenüber gibt der Nachweis von Zearalenon schon eher Anlaß für die Vermutung, daß die Ursache in der Verarbeitung von nicht einwandfreien Rohstoffen, insbesondere Mahlerzeugnissen, zu suchen sei. Dieses Mykotoxin wird nach derzeitiger Kenntnis von verschiedenen Arten der Gattung *Fusarium* gebildet, die sich der sog. Feldflora des Getreidekornes zuordnen. Die Wachstumsansprüche der Fusarien lassen es im allgemeinen nicht zu, daß diese Pilze als Erreger einer Schimmelbildung des Brotes hervortreten.

Zusammenfassung

Es wurde überprüft, in welchem Umfange in verschimmelten Schnittbroten die Mykotoxine Aflatoxin, Citrinin, Patulin, Penicillinsäure, Sterigmatocystin und Zearalenon auftreten.

Zur Untersuchung gelangten 110 spontan verschimmelte Schnittbrote (verpackt) unterschiedlicher Sorte und Herkunft. Bei 18 Broten (entspr. 16,4% der untersuchten Brote) war eine Kontamination mit Mykotoxinen nachzuweisen.

Bei den aufgefundenen Mykotoxinen handelte es sich um Citrinin (11 Nachweise), Ochratoxin (4 Nachweise) und Zearalenon (5 Nachweise). Zumeist traten die Mykotoxine einzeln auf; nur bei 2 Broten lag eine gleichzeitige Kontamination mit Ochratoxin A und Zearalenon vor.

Tab. 1. Auf verpackten Schnittbrotten im Verlaufe der Lagerung aufgetretene Erreger der Schimmelbildung (Spicher, 1984).

Lagerungsbedingungen: t = 25°C rH = 70% d = 7 Tage	Zuordnung der isolierten Schimmelpilze					
	1980/1981		1980		1981	
	Anzahl	Häufigkeit (%)	Anzahl	Häufigkeit (%)	Anzahl	Häufigkeit (%)
Anzahl der Isolate	287	100	159	100	128	100
davon						
- Penicillium spp.	254	88,6	146	91,8	108	84,4
- Aspergillus spp.	9	3,1	2	1,3	7	5,5
- „Kreideschimmel“	19	6,6	9	5,7	10	7,8
- Sonstige Species	5	1,7	2	1,2	3	2,3

Tab. 2. In verschimmelten Schnittbrotten nachgewiesene Mykotoxine.

Mykotoxine	Anzahl der Nachweise	Häufigkeit der Nachweise (%)		Aufgefundene Höchstmenge
		unters. Brote (110)	bezogen auf: positive Befunde (20)	
Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	n.n.*)	-	-	-
Citrinin	11	10,0	55,0	5 ppb
Ochratoxin A	4	3,6	20,0	8 ppb
Patulin	n.n.	-	-	-
Penicillinsäure	n.n.	-	-	-
Sterigmatocystin	n.n.	-	-	-
Zearalenon	5	4,5	25,0	5 ppb
Insgesamt	20	16,4**)	100,0	

*) n.n. = nicht nachzuweisen

**) Differenz ergibt sich, da bei 2 Broten mehrere Mykotoxine (Ochratoxin A und Zearalenon) nachzuweisen waren.

Tab. 3. Verbreitung der in Schnittbrotten verschiedener Sorten nachgewiesenen Mykotoxine.

Brot-Gruppe	Anzahl der untersuchten Brote	Nachweise		Nachgewiesene Mykotoxine			Mykotoxinnachweis in konservierten Broten
		Anzahl	Häufigkeit (%)	Citrinin	Ochratoxin	Zearalenon	
Roggenbrot	5	1	20,0	-	+	+	-
Roggenschrotbrot	15	2	13,0	+	-	+	1 × Propionsäure
Roggenvollkornbrot	8	/	/	-	-	-	-
Roggenmischbrot	28	5	17,9	+	+	+	3 × Propionsäure
Weizenmischbrot	22	1	4,5	-	+	-	1 × Propionsäure
Weizenbrot/Toastbrot	15	3	20,0	+	-	-	2 × Propionsäure
Vierkornbrot	4	/	/	-	-	-	-
Leinsamenbrot	8	4	50,0	+	-	-	1 × Propionsäure
Buttermilchbrot	5	2	40,0	+	-	-	1 × Propionsäure

Bei Gegenüberstellung der Befunde mit dem Spektrum der von den verschimmelten Broten isolierten Pilzarten bzw. den auf Broten allgemein anzutreffenden Schimmelpilzen, liegt der Schluß nahe, daß es sich beim Citrinin und gegebenenfalls beim Ochratoxin um eine sekundäre Kontamination handeln wird.

Im Falle des Nachweises von Zearalenon in den verschimmelten Schnittbrotten ist hingegen zu vermuten, daß diese Kontamination mit der Verwendung mykotoxinhaltiger Getreidemahlerzeugnisse in Zusammenhang steht.

Summary

We have checked to what extent the mycotoxins aflatoxin, citrinin, patulin, penicillin acid, sterigmatocystine and zearalenon are occurring in moulded sliced breads.

We examined 110 sliced breads (packed) of various types and origins that had moulded by themselves. In 18 of these breads (i. e., 16.4% of breads examined), there was evidence of mycotoxin contamination. Mycotoxins determined were citrinin (11 times), ochratoxin (4 times),

and zearalenon (5 times). In most cases, mycotoxins occurred only one at a time; only 2 breads showed contamination by both ochratoxin A and zearalenon.

If one compares these results of fungus species isolated from the moulded breads with the spectrum of mould fungi generally encountered on bread, the conclusion suggests itself that the citrinin and possibly the ochratoxin represent a secondary contamination.

Where on the other hand zearalenon was detected in moulded sliced bread, one might assume that this contamination has to do with the use of mycotoxin-holding cereal milling products.

Résumé

On a recherché dans quelle mesure les mycotoxines aflatoxine, citrinine, patuline, acide pénicillique, stérigmatocystine et zéaralénone se retrouvent dans les pains en tranches moisiss.

Pour l'analyse, on a utilisé 110 pains en tranches (emballés) de différentes sortes et provenances, à moisissure spontanée. Sur 18 pains

(correspondant à 16,4% des pains analysés), on a décelé une contamination par mycotoxines.

Parmi les mycotoxines décelées, il s'agissait de citrinine (11 décellements), ochratoxine (4 décellements) et zéaralénone (5 décellements). Les plus souvent, les mycotoxines se présentaient séparément; dans 2 pains seulement, on a trouvé une contamination simultanée par ochratoxine A et zéaralénone.

En comparant les résultats avec le spectre des sortes de moisissures isolées dans les pains moisis ou des moisissures se retrouvant le plus couramment dans les pains, on peut en conclure qu'il s'agit pour la citrinine et éventuellement pour l'ochratoxine d'une contamination secondaire.

Dans les cas de décellement de zéaralénone dans les pains en tranches moisis, il y a lieu au contraire de penser que cette contamination est liée à l'utilisation de produits céréaliers contenant des mycotoxines.

Danksagung

Für das stete Interesse und die gewissenhafte Durchführung der Untersuchungen danke ich meiner Mitarbeiterin, Frau U. Versen.

Literatur

van Egmond, H. P., W. E. Paulsch, E. A. Sizoo and P. L. Schuller: RIV-report Nr. 152/79 LCLO: Multimycotoxin methods of analysis for feedstuffs. – Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, Report No. 157/79 LCO (1979).

Reihs, J.: Schimmelpilze und Mykotoxine in Mahlprodukten und Backwaren. – In: Reihs, J. (Herausg.) Mykotoxine in Lebensmitteln“, S. 381 – 395; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart u. New York, 1981.

Spicher, G.: Über das Auftreten von Aflatoxinen in Getreide und Getreideprodukten. – In: Deutsche Forschungsgemein. (Herausg.) „Rückstände in Getreide und Getreideprodukten“, S. 93 – 108, Boldt-Verlag, Boppard 1981.

Spicher, G.: Einige Beobachtungen über das Wachstum von *Aspergillus flavus* auf Brot und die Bildung von Aflatoxin. – *Getreide Mehl u. Brot* 27 (1973) 10, S. 320 – 323.

Spicher, G.: Die Erreger der Schimmelbildung bei Backwaren. 1. Mitt.: Auf verpackten Schnittbrotten auftretende Schimmelpilze. – *Getreide Mehl u. Brot* 38 (1984), Heft 3, im Druck.

Über den Einfluß von Polysacchariden auf die Klärung und Filtrierfähigkeit von Weinen unter besonderer Berücksichtigung des Botrytisglucans

Von K. Wucherpennig, H. Dietrich und R. Fauth

Forschungsanstalt für Weinbau, Gartenbau, Getränketechnologie und Landespflege, Institut für Weinchemie und Getränkeforschung, Postfach 1154, 6222 Geisenheim

I. Einleitung und Problemstellung

Eine Reihe von Untersuchungen, die in den letzten Jahren durchgeführt worden sind, zeigten übereinstimmend, daß bei der Filtration von Wein auftretende Probleme in erster Linie auf die Anwesenheit von kolloid gelösten Polysacchariden zurückzuführen sind¹⁻³). Diese behindern aber nicht nur die Filtrationsleistung, sondern auch die Selbstklärung und Schöpfung. Die einzelnen Polysaccharide können recht verschieden gebaut sein und aus diesem Grunde den Ausbau und das Vorbereiten des Weines zur Abfüllung in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Sie können aus den Trauben selbst stammen, von Mikroorganismen, die diese während der Reife befallen, gebildet werden oder von der Hefe während oder nach der Gärung an den Wein abgegeben werden. Nach Untersuchungen von *Usseglio-Tomasset*¹) und *Villettaz*²) sind die Bausteine der Polysaccharide Galactose, Arabinose, Mannose, Glucose, Rhamnose und in geringen Mengen Fucose sowie Galacturonsäure und Glucuronsäure. Die aus diesen Monomeren aufgebauten Polysaccharide haben Molekulargewichte, die zwischen 10 000 und 1 000 000 liegen. Die in den Most gelangenden Mengen hängen in hohem Maße von der mechanischen und thermischen Beanspruchung des Lesegutes beim Keltern ab. Während der Gärung verändern sie sich in erheblichem Umfang, so daß die kolloid gelösten Polysaccharide des Mostes eine andere Zusammensetzung aufweisen als die des Weines. Eigene Untersuchungen zeigten, daß in filtrierten Weinen noch ca. 0,2 bis 1 g/l kolloid gelöste Substanzen vorhanden sind³). Es besteht aber zwischen der Menge der Kolloide und der Klärung sowie Filtrierbarkeit keine Korrelation, woraus zu schließen ist, daß ihre Art für die bei der Filtration auftretenden Probleme verantwortlich ist. Eine Reihe von Untersuchungen haben diese Überlegung bestätigt, daß vor allen

Dingen ein von *Botrytis cinerea* gebildetes Glucan in hohem Umfang die Poren von Tiefbettfiltern verstopft und die von Membranfiltern belegt³). Schon Mengen von 2 mg/l beeinflussen die Mengenleistung der Filter, bei Anwesenheit von 50 mg/l und mehr wird die Filtration praktisch unmöglich. Diese Feststellung beruht darauf, daß das Glucan nicht nur ein Molekulargewicht von 1 000 000 besitzt⁵), sondern darüber hinaus in Gegenwart relativ geringer Mengen Alkohol ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten aufweist. Die Bildung von Molekül aggregaten läßt sich durch eine qualitative Trübungsmessung und Bestimmung der Viskosität feststellen³).

Das die Probleme bei der Filtration verursachende Glucan kann mittels spezifischer $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucanasen enzymatisch abgebaut werden. Die dazu benötigten Enzyme sind im Pflanzenreich und auch bei Bakterien und Pilzen weit verbreitet. Sie können nach der Art ihres Wirkungsmechanismus in zwei Gruppen gegliedert werden; in endo-Glucanasen, welche die Glucanketten vom Ketteninnern her in kleinere Bruchstücke spalten und exo-Glucanasen, welche die Glucane vom nichtreduzierenden Kettenende her in die einzelnen Zuckerbausteine zerlegen.

Zum Abbau des Botrytisglucans im Wein wurden verschiedene Enzyme untersucht. So scheidet *Botrytis cinerea* auf glucosefreiem Medium eine extracelluläre exo- $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucanase aus, deren biologische Funktion darin besteht, das als Reservkohlenhydrat wirkende Glucan wieder zu Glucose abzubauen⁶). Dieses Enzym ist jedoch aufgrund seiner geringen Stabilität und Aktivität beim pH-Wert der Weine für eine Weinbehandlung nicht geeignet, abgesehen von den Problemen seiner großtechnischen Produktion.

Erfolgreich verliefen die Versuche mit dem aus einem Trichoderma Stamm gewonnenen $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucanasepräparat Novozym 116⁷). Das Temperaturoptimum gegenüber Botrytisglu-