

Untersuchungen über den Einfluß von Hydrogensulfitionen auf das Schimmelpilzgift Patulin

2. Mitteilung: Versuche mit Apfelsäften

Von R. Adam

Institut für Lebensmittelchemie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

1. Einleitung

Patulin kann auf verschiedenen Obst- und Gemüsearten bzw. in deren Verarbeitungsprodukten als Stoffwechselprodukt einiger Schimmelpilze, wie z. B. *Aspergillus clavatus*, *Penicillium claviforme*, *P. expansum*, *P. patulum* und *P. urticae* gebildet werden^{3,4,11,13,14}). Während die Giftigkeit für Pflanze und Tier schon seit längerem bekannt ist^{8,13}), konnte in neueren Untersuchungen der Verdacht auf karzinogene Eigenschaften des Patulins zumindest bei oraler Zufuhr an Mäuse nicht bestätigt werden⁹). Die Zerstörung des Mykotoxins in Lebensmitteln gelingt offensichtlich nicht durch Erhitzen^{3,5}). Eine der wenigen chemischen Reaktionen zur Beseitigung von Patulin, die in Lebensmitteln anwendbar wäre, ist die Umsetzung mit schwefliger Säure bzw. Hydrogensulfitionen. In Mitteilung 1 wurde gezeigt, wie sich der Patulingehalt in wäßrigen Lösungen mit und ohne Zusatz von Hydrogensulfit im Laufe der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur verändert, wobei für die Reaktionspartner praxisorientierte Konzentrationen gewählt wurden¹). Als Fortsetzung dieser Versuche wurden nun zwei handelsübliche Apfelsäfte als Reaktionsmedium herangezogen.

2. Untersuchungsmethodik

2.1 Extraktion von Patulin aus Apfelsaft

Bei der einfachen Extraktion von Apfelsaft mit Essigsäureäthylester wurden neben Patulin noch zahlreiche Begleitsubstanzen mit extrahiert, welche die nachfolgende hochdruck-flüssigkeits-chromatographische Bestimmung von Patulin stören. Deshalb wurde das nachfolgend beschriebene Extraktionsverfahren ausgearbeitet: 50 ml Apfelsaft und 5 g Natriumchlorid in Mischzylinder (100 ml) geben und mit 25, 20, 20 und zuletzt 15 ml Essigsäureäthylester jeweils 4 Minuten lang schütteln. Nach dem jeweiligen Stehenlassen bis zur Schichttrennung (ggf. mit dünnem Draht die Flüssigkeitsblasen zum Platzen bringen) die überstehenden Extrakte mit einer Pipette vorsichtig abziehen und in einen weiteren Mischzylinder (100 ml) geben. 2,5 g Natriumchlorid und 25 ml 2,5 %ige, mit Essigsäureäthylester gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung hinzufügen und 2 Minuten lang schütteln. Den überstehenden Esterextrakt in Meßkolben (100 ml) weitestgehend abpipettieren und die wäßrige Phase 2mal mit je 10 ml Essigsäureäthylester je 4 Minuten lang schütteln. Die im Meßkolben vereinigten Esterschichten mit 2 g wasserfreiem Natriumsulfat versetzen, 2 Minuten lang durch Umstürzen durchmischen und 1 bis 2 Stunden stehenlassen. Davon einen möglichst großen aliquoten Teil, z. B. 75 ml, in ein Rundkölbchen abpipettieren und bei 30° C am Rotationsverdampfer zur Trockene eindampfen. Das belüftete Kölbchen mit Luft spülen, die mit Essigsäureäthylester gesättigt wurde, den

Rückstand in 1 ml Ester aufnehmen, durch eine Filterspritze mit Glasfaserfilter (Porenweite 0,6 µm) in Schraubdeckelfläschchen mit Septum geben.

2.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Gerät: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit Trennsäule µ-Porasil (Länge 300 mm; Innendurchmesser 3,9 mm; Teilchendurchmesser 10 µm) der Fa. Waters Ass. Ltd.

Fließmittel: Mischung von Diisopropyläther und Dichlormethan (95:5) mit 0,1 % Eisessig.

Detektor: UV-Spektrophotometer (LC 55) der Fa. Perkin Elmer, auf eine Wellenlänge von 277 nm eingestellt.

Auswertung: Integrator (Autolab, System IV) der Fa. Spectra-Physic.

Je nach Größe des zu erwartenden Patulin-Signals wurden 10 oder 20 µl gereinigter Essigsäureäthylester-Extrakt für die Bestimmung verwendet. Zur Absicherung der Retentionszeit wurden vor und nach jeder Reihe von Einzelbestimmungen mehrfach 5 µl einer Patulin-Standardlösung (s. 2.4) in den Chromatographen eingespritzt. Sofern gegen Ende einer Versuchsperiode die Konzentration des Patulins soweit abgesunken war, daß das Patulin-Signal nur noch schwierig zu erfassen war (ab etwa 5 bis 10% der Ausgangsmenge), wurden den Proben bekannte Mengen Patulin-Standard beigemischt. Die Überprüfung dieses Verfahrens mit bekannten Patulin-Ausgangsmengen ergab Standardabweichungen vom theoretischen Wert von max. 4%.

2.3 SO₂-Bestimmungen

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes an schwefliger Säure wurde nach *Reith-Willems*¹⁶) durchgeführt, die freie schweflige Säure wurde jodometrisch¹⁷) bestimmt.

2.4 Patulin-Lösungen

Patulin-Standardlösungen: 5,1 bzw. 5,3 mg Patulin in 250 ml Essigsäureäthylester.

Patulin-Versuchslösung Nr. 1: 204 µg Patulin in 2000 ml Apfelsaft I (rund 100 ppb Patulin).

Patulin-Versuchslösung Nr. 2: 204 µg Patulin und 593,5 mg Natriumdisulfit in 2000 ml Apfelsaft I (200 ppm SO₂, rund 100 ppb Patulin).

Patulin-Versuchslösung Nr. 3: 212 µg Patulin und 593,5 mg Natriumdisulfit in 2000 ml Apfelsaft II (200 ppm SO₂, rund 100 ppb Patulin).

Patulin-Versuchslösung Nr. 4: 212 µg Patulin und 296,8 mg Natriumdisulfit in 2000 ml Apfelsaft II (100 ppm SO₂, rund 100 ppb Patulin).

Patulin-Versuchslösung Nr. 5: 212 µg Patulin und 296,8 mg Natriumdisulfit in 2000 ml Apfelsaft II (100 ppm SO₂, rund 100 ppb Patulin), nach der Herstellung 20 Minuten lang auf 75° C erhitzt, innerhalb 15 Minuten mit Leitungswasser auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Die Zugabe der für die einzelnen Versuchslösungen erforderlichen Patulinmengen erfolgte durch Abpipettieren eines ent-

sprechenden Volumens Patulin-Standardlösung. Die mit I und II bezeichneten Apfelsäfte waren Handelsware von uns bekannter Herkunft und enthielten kein Patulin. Alle Versuchslösungen wurden bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt und nach jeder Probenahme mit Stickstoff gespült.

3. Versuchsergebnisse und Diskussion

In dem Apfelsaft, der nur mit Patulin versetzt, jedoch nicht geschwefelt worden war (Patulin-Versuchslösung Nr. 1), blieb der Patulingehalt innerhalb von etwa 30 Tagen nahezu unverändert (Abb. 1, Kurve 1) und verringerte sich dann sehr langsam im Verlauf von weiteren 270 Tagen auf 55%.

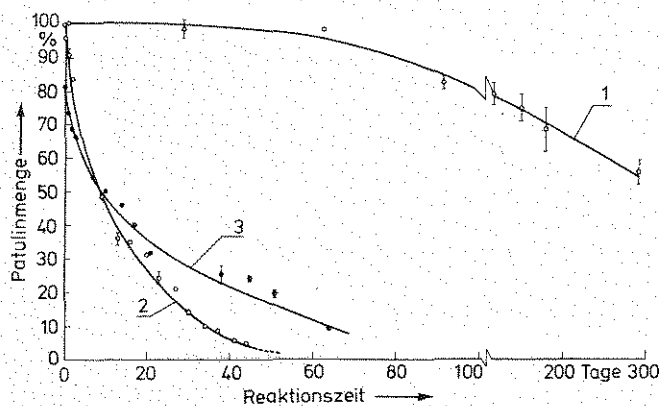


Abb. 1. Zeitliche Abnahme des Patulingehalts in ungeschwefeltem Apfelsaft (Kurve 1) und in zwei mit 200 ppm SO₂ versetzten Apfelsäften verschiedener Herkunft (Kurven 2 und 3).

200 ppm Schwefeldioxid bewirkten in dem mit rund 100 ppb Patulin versetzten und bei Raumtemperatur unter Stickstoff gelagerten Apfelsaft der Herkunft I (Versuchslösung Nr. 2) innerhalb von 10 Tagen eine Patulinabnahme auf die Hälfte, innerhalb von 45 Tagen auf weniger als 5% (Abb. 1, Kurve 2). Die Extrapolation der Abnahmekurve läßt eine Abnahme bis auf nahezu 0% nach etwa 60 Tagen erwarten. In dem gleich behandelten Apfelsaft der Herkunft II (Versuchslösung Nr. 3) dauerte die Verringerung des Patulingehaltes auf 50% ebenfalls 10 Tage, auf weniger als 5% etwa 75 Tage (Abb. 1, Kurve 3). Die Geschwindigkeit des Patulinabbaus ist also, wie zu erwarten, von Saft zu Saft etwas verschieden.

Halbierung des Schwefeldioxidzusatzes zu Apfelsaft II (Versuchslösung Nr. 4) führte zu einer wesentlichen Verlangsamung der Reaktion: waren mit 200 ppm Schwefeldioxid in Versuchslösung Nr. 3 nach 10 Tagen noch 50% Patulin auffindbar, so konnten mit 100 ppm nach demselben Zeitraum noch rund 75% nachgewiesen werden. Erst nach 40 Tagen war in Versuchslösung Nr. 4 die Hälfte des zugesetzten Patulins abgebaut (Abb. 2, Kurve 4). Durch Extrapolation der weiteren Patulinabnahme nach dem letzten Meßpunkt abgeschätzt, sinkt die Patulinkonzentration erst nach etwa 200 Tagen in die Nähe von 0% ab.

Die kurzfristige Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 75° C zu Beginn des Versuchs (Versuchslösung Nr. 5), führte mit nur 100 ppm SO₂ zu einem solch raschen Patulinverlust (Abb. 2, Kurve 5), daß die Abnahmekurve ähnlich verläuft wie bei Zusatz von 200 ppm SO₂ bei Zimmertemperatur (Abb. 2, Kurve 3).

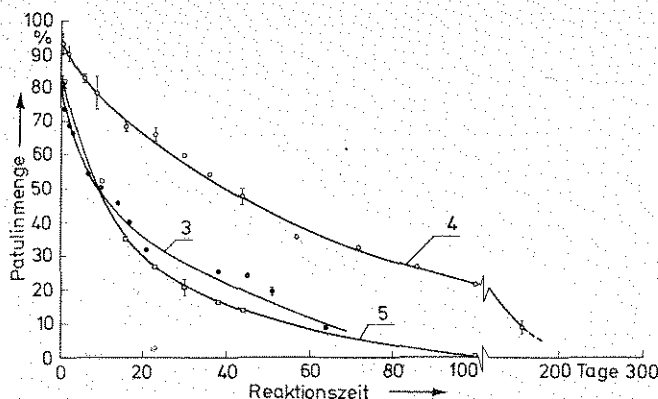


Abb. 2. Zeitliche Abnahme des Patulingehalts in einem Apfelsaft nach Sulfittierung mit 200 ppm SO₂ (Kurve 3), 100 ppm SO₂ (Kurve 4) und 100 ppm SO₂ nach kurzfristigem Erhitzen (Kurve 5).

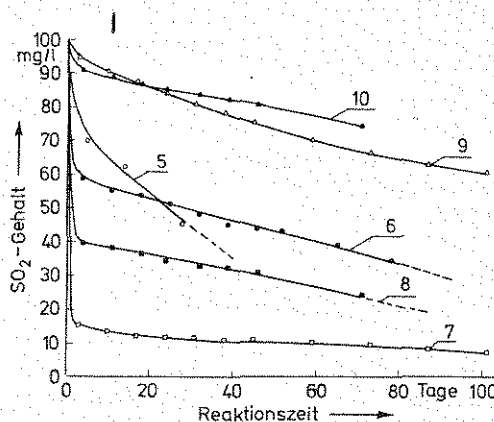


Abb. 3. Verlust an freier schwefliger Säure in den beiden mit 200 ppm SO₂ versetzten Apfelsäften (Kurven 5 und 6), in den mit 100 ppm versetzten Apfelsaftproben ohne (Kurve 9) und mit kurzfristigem Erhitzen (Kurve 10).

Die zeitliche Änderung der Gehalte an freier und gesamter schwefliger Säure ist in Abb. 3 zusammengefaßt. Die Kurven 5 und 6 zeigen die Verluste an freier schwefliger Säure in den beiden Patulinversuchslösungen Nr. 2 und 3 auf, die mit jeweils rund 100 ppb Patulin und 200 ppm SO₂ angesetzt worden waren. Die Gehalte an freier schwefliger Säure der Versuchslösungen Nr. 4 und 5 (jeweils rund 100 ppb Patulin und 100 ppm SO₂; bei Nr. 5 20 Minuten auf 75° C erhitzt) sind in den Kurven 7 und 8 wiedergegeben. Da der Kopfraum der Probenbehälter nach jeder Saftentnahme mit Stickstoff gespült wurde, konnte der Gehalt der gesamten schwefligen Säure durch Oxidation mit Luftsauerstoff nicht beeinflußt werden. Die Verringerung des Gehaltes an gesamter schwefliger Säure verlief deshalb entsprechend langsam. Zur Veranschaulichung dieser langsamen Konzentrationsabnahmen wurden in Bild 3 die Gehalte an gesamter schwefliger Säure für die Versuchslösungen Nr. 4 und 5 mit eingezeichnet. Der Verlauf der Kurven entspricht im wesentlichen den Erwartungen: geringer Gehalt an freier schwefliger Säure geht konform mit langsamem Patulinabbau und umgekehrt.

Prinzipiell ließe sich also Patulin in Apfelsaft durch Zusatz kleiner SO₂-Mengen relativ rasch beseitigen, besonders wenn die Sulfittierung mit einer Hitzebehandlung kombiniert würde. Wünschenswerter wäre allerdings die Verarbeitung ausschließlich von patulinfreier Ausgangsware.

Zusammenfassung

Die Abnahme des Patulingehaltes in Apfelsaft mit und ohne Zusatz von Natriumhydrogensulfid wurde im Laufe der Lagerung bei Zimmertemperatur untersucht. Als Ausgangsmengen wurden 100 ppb Patulin und 100 bzw. 200 ppm SO₂ gewählt. Bereits ohne Hydrogensulfid-Zusatz verringerte sich der Patulingehalt: nach etwa einem Jahr war nur noch die Hälfte der Ausgangsmenge nachweisbar. Mit 200 ppm SO₂ nahm der Patulingehalt schon innerhalb 10 Tagen um 50% ab, mit 100 ppm SO₂ erst nach 40 Tagen. Kurzfristiges Erhitzen (20 min, 75° C) unmittelbar nach der Sulfidierung mit 100 ppm SO₂ führte ebenfalls innerhalb von 10 Tagen zu einer Patulinabnahme um 50%.

Summary

The decrease of the patulin content in apple juice with and without sodium hydrogen sulfite during storage at room temperature was investigated. Initial quantities were 100 ppb patulin, and 100 and 200 ppm SO₂, resp. The patulin content was found to decrease already without sulfitation. Only half of the initial quantity was still detected after about one year. In presence of 200 ppm SO₂ the patulin decreased by 50% already within 10 days, in presence of 100 ppm SO₂ only after 40 days. A 50% decrease of the patulin content within 10 days was also recorded when the apple juice was exposed to heat (20 min, 75° C) immediately following the sulfitation using 100 ppm SO₂.

Résumé

On a déterminé la diminution de teneur en patuline dans du jus de pommes avec et sans adjonction de bisulfure de sodium au cours du stockage à température ambiante. Comme quantités de départ, on a choisi 100 ppb de patuline et 100 ou 200 ppm de SO₂. Déjà sans adjonction de bisulfure de sodium, la teneur en patuline avait diminué: au bout d'environ un an, on n'a pu déceler que la moitié de la quantité de départ. Avec 200 ppm de SO₂, la teneur en patuline a déjà diminué de 50% au bout de 10 jours et avec 100 ppm de SO₂, au bout de 40 jours seulement. Un

réchauffement de courte durée (20 min, 75° C) aussitôt après l'addition de 100 ppm de SO₂ a conduit également au bout de 10 jours à une perte de 50% en patuline.

Literatur:

- 1) Adam, R., W.-D. Koller: Dt. Lebensm.-Rundsch. **75** (1979) 8, S. 254-56.
- 2) Eyrich, W.: Mikrobiol. Technol. Lebensm. **4** (1975) S. 17-19.
- 3) Frank, H. K., R. Orth, R. Hermann: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **162** (1976) S. 149-57.
- 4) Frank, H. K., R. Orth, A. Figge: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **162** (1977) S. 111-14.
- 5) Frank, H. K.: Ann. Nutr. Alim. **31** (1977) S. 459-65.
- 6) Frede, W.: Lebensmittelchemie und gerichtl. Chemie **33** (1979) S. 30-42.
- 7) Hunt, D. C., A. T. Bourdon, N. T. Crosby: J. Sci. Fd. Agric. **29** (1978) S. 239-44.
- 8) Miescher, G.: Phytopath. Zeitschr. **16** (1950) S. 369-97.
- 9) Osswald, H., H. K. Frank, D. Komitowski, H. Winter: Fd. Cosmet. Toxicol. **16** (1978) S. 243-47.
- 10) Pfannhauser, W., G. Blaicher: Ernährung/Nutrition **2** (1978) 11, S. 523-25.
- 11) Pohland, A. E., R. Allen: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists **53** (1970) 4, S. 686-87.
- 12) Polzhofer, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **163** (1977) S. 183-85.
- 13) Scott, P. M., E. Somers: Agric. Fd. Chem. **16** (1968) 3, S. 483-85.
- 14) Ullmanns Encycl. d. tech. Chemie, Bd. 3, S. 751. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg-Verlag 1953.
- 15) Ware, G. M.: J. Assoc. Off. Analyt. Chemists **58** (1975) 4, S. 754-56.
- 16) Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. VII, S. 431-32. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1968).
- 17) Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. VII, S. 433. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1968).

Herrn Prof. Dr. H. K. Frank, Institut für Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, danke ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für die Überlassung einer Patulinprobe sowie zahlreicher Literatur.

Qualität und Lagerverhalten heiß geräucherter Fischereiprodukte

III. Mikrobiologie und Einfluß der Räucherintensität auf die Haltbarkeit von Heilbutt, Bückling und Aal

Von G. Karnop

Aus dem Institut für Biochemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg

1. Einleitung

Zwei vorangehende Mitteilungen über Untersuchungen an einigen heiß geräucherten Fischereiprodukten befaßten sich mit Qualitätsparametern der rauchfrischen Ware und den Haltbarkeiten, die diese Erzeugnisse unter verschiedenen Bedingungen der Temperatur und Abpackung zunächst nach rein sensorischen Gesichtspunkten aufwiesen^{1, 2}). In der vorliegenden Mitteilung werden die mikrobiologischen Veränderungen wiedergegeben, die diese Produkte während der Lagerung erlitten. Außerdem wird der Räucherintensität wegen ihrer großen Bedeutung ein besonderes Kapitel gewidmet.

2. Methoden

Die bakteriologischen Untersuchungen erfolgten wie bereits in der ersten Mitteilung dargestellt¹). Insgesamt fielen dabei 1100 Gesamtkeimgehaltsbestimmungen an. Der Vollständigkeit halber muß erwähnt werden, daß an 10 Heilbuttstücken die in den bakteriellen Verderbsfloreten vorkommenden Saprophyten-Genera quantitativ ermittelt wurden und eine Ansprache sichtbarer Verschimmelungen nach Menge und Form der Pilzkolonien stattfand:

leichter Befall: höchstens 2 Bücklinge bzw. Heilbuttstücke einer Kiste oder 2 von 15-20 Aalen kleinflächig verpilzt.