

Anmerkung 1

Nach der üblichen Vorreinigung mit Leitungswasser und Spülmittel werden die Flaschen oder Zylinder $\frac{1}{2}$ Stunde in eine 80 bis 90° C heiße 2 %ige Lösung eines Detergens, z. B. Extran (Merck), gelegt, dann ausgiebig mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült. Man läßt das anhaftende Wasser auf Filterpapier auslaufen und trocknet im Trockenschrank bei 105° C.

Anmerkung 2

Ob ein Öl mit Luft gesättigt ist, läßt sich durch Bestimmung des Sauerstoffgehaltes, z. B. mit dem Beckman Oxygen-Analyser, prüfen. Er soll ca. 3,5 bis 4,1 mg, entsprechend einem Sauerstoffpartialdruck von 135 bis 160 Torr, betragen. Wenn das nicht der Fall ist, bringt man das Öl in eine Flasche aus dunklem Glas unter Einhaltung eines Kopfraums von ca. 80 Vol. % und schüttelt $\frac{1}{4}$ Stunde auf einer Schüttelmaschine.

B) der 20 000-Lux-Test

Die Beschreibung beschränkt sich auf den Teil der Arbeitsvorschrift, der von der für den 1000-Lux-Test abweicht.

2. Geräte

Belichtungsapparatur nach Abbildung 3, bestehend aus:

einem aus Aluminium gefertigten Kasten (300 mm breit, 300 mm hoch und 1320 mm lang) mit einem Deckel, der drei Bohrungen von 20 mm Durchmesser zur Aufnahme von zwei normalen Thermometern und einem Kontaktthermometer besitzt. Der Apparat enthält an zwei gegenüberliegenden Längsseiten je 3 Fluoreszenz-Röhrenleuchten von 120 cm Länge, Fabrikat Philips, Type TL 40 W/33, die übereinander angeordnet sind. Zur Kühlung ist an der Stirnseite ein Ventilator, Type Xpelair SX 125 Z, 30 Watt, montiert, der mit Hilfe eines Regelkreises ein- und ausgeschaltet wird. Auf dem Boden des Gerätes ist die Einstellzone markiert, innerhalb der eine Lichtintensität von 20 000 bis 22 000 Lux herrscht;

zwei Einschlußthermometern, 0 bis +100° C, geteilt in $\frac{1}{2}$ ° C; einem Kontaktthermometer, 0 bis +100° C, $\frac{1}{1}$ ° C; einem Ruhestromrelais, Typ TR 63, Colora GmbH, Lorch; Flaschen und Lux-Meßgerät wie bei dem 1000-Lux-Test.

4. Verfahren

4.1. Prüfung der Apparatur

Die Belichtungsapparatur wird in einen Raum von ca. 18 bis 20° C gebracht und eingeschaltet. Nach 10 Minuten wird geprüft, ob in der Meßzone eine Lichtintensität von ca. 20 000 Lux herrscht. Da die Emission der Leuchtröhren nach längerer Benutzung nachläßt, müssen die Röhren von Zeit zu Zeit erneuert werden.

4.2. Untersuchung von losen Ölen

Die frisch raffinierten und mit Luft gesättigten Öle werden in sechs sorgfältig gereinigten Glasflaschen mit identischen Abmessungen gefüllt. Die Flaschen werden unter Einhaltung eines Abstandes von 3 bis 5 cm in den Meßraum des Belichtungsapparates gestellt und bei 20 bis 22° C belichtet. Nach $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4 bzw. 6 Stunden wird je eine Flasche entnommen. Nach 24stündiger Zwischenlagerung im Dunkeln bei 20° C wird die Peroxidzahl des Öls in duplo bestimmt und die Geschmacksnote mit Hilfe einer Prüfgruppe von mindestens 6 Personen ermittelt.

4.3. Untersuchung von handelsüblichen in durchsichtigen Flaschen verpackten Ölen

Diese Öle werden in der ungeöffneten Originalverpackung bestrahlt und dann geprüft.

4.4. Prüfung von festen Fetten

Feste Fette werden aufgeschmolzen, auf 40° C temperiert, belüftet, in Glasflaschen abgefüllt und dann, wie unter 4.2. beschrieben, belichtet, wobei jedoch die Temperatur mit Hilfe von Kontaktthermometer und Ruhestromrelais auf 40 ± 2 ° C eingestellt wird. Wenn es sich um sehr oxydationsbeständige Fette, z. B. gehärtete Öle, handelt, empfiehlt es sich, die Belichtungszeit auf 8 bzw. 10 Stunden auszudehnen.

5. Auswertung

Wie beim 1000-Lux-Test, mit der Ausnahme, daß die Oxydationsbereitschaft als die Zunahme der Peroxidzahl in der ersten Stunde definiert wird.

Anmerkung

Einer Haltbarkeit von 1 Stunde im 20 000-Lux-Test entspricht eine solche von 1 bis 2 Tagen im 1000-Lux-Test.

LITERATUR

- 1) Handbuch der Lebensmittelkunde, Bd. IV (Berlin, Heidelberg, New York 1969) S. 903 ff
- 2) Sedlaček, B. A. J., Nahrung 2, 655 (1958)
- 3) Pardun, H., u. E. Kroll, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 66, 413 (1970)
- 4) Meijboom, P. W., J. amer. Oil Chem. Soc. 41, 326 (1964)
- 5) Henick, A. S., M. F. Benca und J. H. Mitchell jr., J. amer. Oil Chem. Soc. 31, 88-91 (1954)
- 6) Radtke, R., P. Smits und R. Heiss, Fette, Seifen, Anstrichmittel 72, 497 (1970)
- 7) Becker, E., und A. Niedersterbruch, Fette, Seifen, Anstrichmittel 68, 135 (1966)
- 8) Moser, H. A., C. D. Evans, J. C. Cowan und W. F. Kwolek, J. amer. Oil Chem. Soc. 42, 30 (1965)
- 9) Popov, A., M. Gardev und T. Petkova, Nahrung 11, 429 (1967)
- 10) Robinson-Görnhardt, L., Ernährungswirtschaft 8, 764 (1961)
- 11) Gunstone, F. D., und T. P. Hilditch, J. chem. Soc. (London) 1945, 836

Aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelrisikoforschung Karlsruhe

Mikrobiologische Verunreinigungen in Enzympräparaten für die Lebensmitteltechnologie

I. Aflatoxin und antibiotische Restaktivitäten

Von H. K. Frank

Enzympräparate werden in zunehmendem Maße bei lebensmitteltechnologischen Prozessen eingesetzt. Neben sehr alten Anwendungstechniken, etwa dem Labzusatz bei der Käseherstellung oder dem Mälzen im Braugewerbe, finden mehr oder weniger gereinigte Enzyme bei der Herstellung von Fruchtsäften, zur Verbesserung der Teigstruktur und der Backeigenschaften, zur Mazeration pflanzlicher Gewebe, zur Entbitterung von Citrussäften, zur Einstellung der Viskosität bei Eiskrems, zur Aromaregeneration bei verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln u. a. m. immer häufiger Verwendung.

Die Ausgangsprodukte für die Herstellung solcher Enzympräparate sind sehr verschiedenartig. Pflanzenteile, wie Sojasamen, Gerste bzw. Malz, Kambium verschiedener Bäume, Teile verschiedener Bromeliaceen, Latex einiger Ficus-Arten, aber auch Organe von Tieren, wie Käl-

bermägen, Leber oder Drüsen des Verdauungstraktes, spielen eine Rolle. Bedeutender sind heute Mikroorganismen, die in beliebiger Menge kultiviert werden können, um daraus Enzyme allein oder neben speziellen Stoffwechselprodukten zu isolieren. Neben Bakterien und Hefen stehen Pilze im Vordergrund. Da manche Mikroorganismen pathogen oder zur Produktion von Toxinen und/oder antibiotisch aktiven Stoffwechselprodukten befähigt sind, muß dafür Sorge getragen werden, daß bei Verwendung solcher Stämme keine lebenden Zellen und keine Toxine oder Antibiotika in das Endprodukt gelangen (vergl. ¹⁾).

Dem gewonnenen Rohenzym werden im Laufe der weiteren Verarbeitung zur Stabilisierung, Dosierung und Konfektionierbarkeit Verdünnungsmittel — vorzugsweise Trinkwasser — oder Trägerstoffe und andere Trennmittel

zugemischt. Letztlich kann auch noch eine Haltbarmachung durch Zusatz chemischer Konservierungsstoffe notwendig sein, da Enzympräparate wegen ihres Proteinanteiles leicht verderblich sind.

Auf Grund des Herstellungsverfahrens, bei dem sich infolge der Empfindlichkeit der zu isolierenden Enzyme in allen Reinigungsstufen die Anwendung hoher Temperaturen verbietet, ist mit dem Vorkommen von lebenden Mikroorganismen und mit mikrobiellen Stoffwechselprodukten im Endprodukt zu rechnen. Stoffwechselprodukte wie auch vermehrungsfähige Mikroorganismen können aber direkt oder indirekt gesundheitsschädigend wirken und die Haltbarkeit oder die Keimbelastung der zu behandelnden Lebensmittel nachteilig beeinflussen.

Als Herkunft für solche unerwünschten Kontaminationen kommen folgende Quellen in Frage:

1. Der Enzymproduzent selbst oder, soweit es sich um vielzellige Organismen handelt, ihm anhaftende Mikroorganismen.
2. Unerkannte oder nicht beachtete Infektionen bei der Massenkultur von Mikroorganismen.
3. Nährsubstrate für die Massenzucht, wie etwa Maisquellwasser, Melasse, Getreideschrot, Soja- oder Erdnuß-Schrot, Weizenkleie, Obsttrester usw.
4. Verdünnungs- und Adsorptionsmaterial wie Kleie, Zellulose, Holzmehl, Stärke, Getreide-Mehle, Gelatine u. a. m.

Man ist aus diesen Gründen auf nationaler und internationaler Ebene bemüht, in Richtlinien und Standardanforderungen für Enzympräparate auch mikrobiologische Kontaminationen zu berücksichtigen, um das Risiko für Benutzer, für Lebensmittel-Endverbraucher aber auch für die Enzymhersteller selbst so gering wie möglich zu halten²⁾. Die vorgelegten Untersuchungen sind als Beitrag zu diesen Bestrebungen gedacht.

Problemstellung

Fridman³⁾ hat 1964 darauf hingewiesen, daß in Proteinkonzentraten verschiedene toxische Beimengungen auftreten können, die z. T. mikrobiologischen Ursprungs sind. Er nannte die Mykotoxine, sowie antibiotisch aktive Stoffe. Auch Reed⁴⁾ (1966) hält das Vorkommen von Aflatoxinen und anderen toxischen Verbindungen in Enzympräparaten nicht für ausgeschlossen.

Es erschien daher sinnvoll bei einer größeren Zahl von Enzymen nach Mykotoxinen zu suchen. Dabei war von Anfang an klar, daß es unmöglich sein würde, alle bisher bekannten Toxine — z. Z. etwa 60 verschiedene Substanzen — zu erfassen. Man mußte sich also auf einige wenige beschränken, wobei natürlich die Aflatoxine wegen ihrer hohen akuten Toxizität und ihrer carcinogenen Wirkung im Vordergrund des Interesses standen. Da viele Mykotoxine nicht nur für höhere Organismen giftig sind, sondern auch Bakterien am Wachstum hindern oder abtöten, boten sich die leicht durchführbaren Antibiosetests für die Sammlung weiterer Information an. Es soll damit nicht gesagt werden, daß auf diese Weise Mykotoxine schlechthin erfaßt werden können, aber es sollte möglich sein, einen Teil dieser Stoffe auf diesem völlig unspezifischen Weg zu finden. Daß dabei alle jene Mykotoxine unberücksichtigt bleiben mußten, die nicht wasserlöslich sind — z. B. Sterigmatocystin — oder solche mit einer ausgesprochenen Organspezifität wie

etwa Zearalenon, Tremortin, Sporodesmin, 8-Methoxiporsoralen u. a. m. versteht sich von selbst.

Andererseits konnte man aber erwarten, daß mit einem Antibiosetest auch antibiotische Restaktivitäten erfaßt würden, die auf jeden Fall als unerwünschte Beimengungen in Lebensmitteln zu betrachten sind, da sie zur Entstehung resistenter Stämme und von Sensibilisierungen beitragen könnten¹⁾.

Material und Methode

Für die ersten Untersuchungen standen etwa 80 Enzympräparate zur Verfügung, die teilweise aus dem Handel stammten, teilweise in dankenswerter Weise von den Herstellern überlassen wurden. Die Präparate kamen aus Dänemark, Deutschland, Frankreich, Japan, Schweiz und USA. Soweit bekannt wurde, woraus die Enzyme gewonnen wurden, ist dies in den Tabellen 2 bis 5 angegeben.

Aflatoxine wurden nach der von Frank⁵⁾ (1969) mitgeteilten Methode dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung verschiedener Fließmittelsysteme und Schwefelsäure als Sprühmittel nachgewiesen. Aflatoxinverdächtige Flecken auf dem DSC wurden massenspektrometrisch nachgeprüft.

Antibiotische Restaktivitäten im Chloroform-Extrakt der Enzyme

Der für die Aflatoxinbestimmung hergestellte Extrakt wurde zunächst mit dem Blättchentest (Schleicher und Schüll Nr. 595, \varnothing 9 mm) geprüft. Als Testkeime dienten *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter aerogenes* (penicillinresistent) und *Bacillus megaterium*. Zum Vergleich wurde ein Antibiotika-Testbesteck für die Sensibilitätsbestimmung (Oxoid Nr. 30-IH) mit 10 μ g Chloramphenicol, 10 μ g Erythromycin, 100 μ g Sulphafurazol, 1,5 IE Penicillin G, 10 μ g Streptomycin und 10 μ g Tetracyclin eingesetzt. Mit Penicillin G wurde eine Eichkurve für *B. megaterium* erstellt, die es ermöglichte, quantitative Aussagen über nachgewiesene Hemmwirkungen zu machen. Der Durchmesser des Hemmhofes diente als Maß für die Angabe der Hemmwirkung in „Penicillin-Äquivalenten“.

Antibiotische Restaktivitäten im wäßrigen Milieu

Da Enzyme praktisch nur im wäßrigen Milieu verwendet werden, wurde in Anlehnung an die Bestimmung der „minimalen Hemmstoff Konzentration“ (MHK) nach Wallhäuser und Schmidt⁶⁾ vorgegangen.

Testkeime: *Bacillus stearothermophilus* isoliert von Sporen-Teststreifen zur Sterilisatorkontrolle von Oxoid (Nr. BR 23) (vergl. 7)).

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis*, der für den Nachweis von Antibiotika in Milch verwendet wird, entsprechend der Vorschrift von Kraack und Tolle (1967)⁸⁾.

Es wurden von beiden Keimarten bei 55° C Sporensuspensionen hergestellt, die zur Anzucht einer rasch wachsenden Suspension vegetativer Zellen als Impfmateriale für den Test vorkultiviert wurden.

Nährlösung: 10 g Pepton aus Casein, 5 g Glucose, 0,04 g Bromkresolpurpur (Oxoid CM 73), 0,001 g Brillantschwarz (Merck Nr. 1921) pro 1000 ml. Der Zusatz von Brillantschwarz war nötig, da ein Teil der Präparate das Medium bereits so ansäuerte, daß es gelb wurde. Mit dem in dieser Verdünnung blau erscheinenden Brillantschwarz entstand eine grüne Färbung, die durch das Wachstum und die damit verbundene Reduktion in Gelb umschlug. Um bakterielle Verunreinigung der Präparate auszuschalten und die Enzyme zu inaktivieren wurden die Röhren vor dem Beimpfen 5 min auf 100° C im Wasserbad erhitzt.

Anschließend wurde 24 Std. lang bei 68° C bebrütet. Eventuell noch vorhandene Sporen von Fremdkleimen konnten auf diese Weise ausgeschaltet werden, da nur ganz wenige Arten in der Lage sind, bei dieser Temperatur zu keimen und zu wachsen. Bei jedem Versuch lief eine Blindprobe mit, die nur die Nährlösung und das Enzym (0,1 g) enthielt, um denkbare chemische Reaktionen, die zu Farbveränderungen hätten führen können, oder bakterielle Verunreinigungen zu bemerken.

Bei der Auswertung wurde die Farbe der Kulturflüssigkeit beurteilt, die von einem schmutzigen Purpur nach Gelb umgeschlagen sein mußte. Eine Trübung war nach 24 Std. meist noch nicht sichtbar, doch schien dieses Kriterium auch nicht sehr sinnvoll zur Beurteilung des Wachstums, da die ersten 2 oder 3 Verdünnungen durch die Enzympräparate in vielen Fällen schon mehr oder weniger trüb waren.

Durch Vergleich mit standardisiertem Penicillin G ließen sich die erzielten MHK vergleichbaren Penicillin-Konzentrationen zuordnen, wodurch auch hier eine quantitative Angabe in „Pencillin-Äquivalenten“ möglich ist. Es ist damit freilich keinerlei Kenntnis über die Art des evtl. vorhandenen Hemmstoffes verbunden. Tabelle 1 zeigt eine Auswertungstabelle für eine Verdünnungsreihe 1:1 bei 100 mg Enzym-Einwaage im 1. Röhrchen und *B. stearo-thermophilus* (OXOID Nr. BR 23) unter den o. g. Bedingungen.

Mit *B. stearo-thermophilus* var. *calidolactis* ergaben sich etwa die gleichen Werte.

Tabelle 1
Umrechnungstabelle für MHK-Werte in IE-Pencillin-Äquivalente pro Gramm Enzympräparat

Einwaage pro Verdünnungsstufe (mg)	Verdünnungsstufe (MHK-Stufe)	„IE Pen-Äquival“ g
100	1	0,004
50	2	0,008
25	3	0,016
12,5	4	0,03(2)
6	5	0,06(4)
3	6	0,12
1,5	7	0,24
0,75	8	0,48
0,38	9	1
0,19	10	2
0,1	11	4
0,05	12	8

Die Empfindlichkeitsgrenze der Methode liegt bei 0,003 IE-Penicillin-Äquivalenten. Die Methode hat den Vorteil, daß nicht steril gearbeitet zu werden braucht, was bei Betriebskontrollen und Stufenkontrollen angenehm sein kann.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 2 bis 5 zusammengestellt. Als Einteilungsprinzip wurde bei Präparaten mit Nebenaktivitäten⁹⁾ das hauptsächlich deklarierte Enzym gewählt. Soweit bekannt, wurde auch angegeben, woraus die Enzyme gewonnen wurden sowie stichwortartige Hinweise auf die vom Hersteller empfohlene Anwendung.

1. Aflatoxine

Von den insgesamt 79 Enzympräparaten war in einem Falle ein erheblicher Gehalt an Aflatoxinen (480 ppb) festzustellen. Es handelte sich dabei um eine Cellulase, bei der jedoch nicht eruiert werden konnte, über welchen der o. g. Wege das Toxin in das Endprodukt gelangt war. Rücksprachen mit dem Hersteller brachten keine Klarheit. Nachuntersuchte spätere Chargen waren toxinfrei.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die ursprünglich angenommene Möglichkeit tatsächlich vorkommen kann. Daneben verdient noch Beachtung, daß manche Enzyme mit Hilfe „klassischer“ Aflatoxinproduzenten hergestellt werden, z. B. die Protease Nr. 14 (Tab. 5) — wobei dem Hersteller die Möglichkeit, einen potentiell toxischen Stamm zu benutzen, unbekannt war.

Eine Überprüfung des Pilzes war nicht möglich. Es ist zu vermuten, daß manche der verwendeten *Aspergillus oryzae*-Stämme in Wirklichkeit zu *A. flavus* gehören; die Abgrenzung dieser beiden Arten ist unklar.

In zwei weiteren Fällen — Protease 70 und Amylase 57 — wurden dünn-schichtchromatographisch aflatoxinverdächtige Substanzen gefunden; erst die massenspektrometrische Nachuntersuchung konnte sicherstellen, daß in diesen Fällen keine Aflatoxine vorgelegen hatten.

2. Antibiotische Restaktivitäten

Von 71 geprüften Zubereitungen, bei welchen deklarationsgemäß keine Konservierungsmittel zugesetzt waren, zeigten 19 (27%) nachweisbare antibiotische Aktivität gegenüber *B. stearo-thermophilus* in wäßriger Lösung. Die Tabellen 2 bis 5 gegen darüber im einzelnen Aufschluß. Dabei fällt auf, daß bei den Pektinasen und Proteasen relativ häufig antibiotische Restaktivitäten vorkommen, bei den anderen Enzymen aber nicht ins Gewicht fallen. Hier muß jedoch einschränkend gesagt werden, daß bei Invertasen, Lipasen und Glucoseoxidasen sicherlich keine repräsentative Zahl von Untersuchungen vorliegt.

Bei den Chloroform-Extrakten der Enzyme ergab sich im allgemeinen eine merklich höhere Antibioseaktivität. Diesem Befund kann aber sicher keine große Bedeutung beigemessen werden, da es sich in diesen Fällen nicht um Antibiotika handelte, die häufig in der Medizin verwendet werden. Es lag nämlich in keinem einzigen Fall eine Hemmstufen-Gleichheit mit den Antibiotika des Sensibilitätstestes und den

Tabelle 2

1. Amylasen

Nr.	Ausgangsmaterial für die Herstellung	Antibiotische Restaktivität in „IE-Pen-Äquival.“ in wäßr. Milieu	Vom Hersteller empfohlene Anwendung
1	Asp. oryzae	0	Bäckerei, Maltose-Herstellung
4*	Pilz	0	Glucose-Herstellung
13	?	0	Fruchtsaft; Mehl
25	?	0	Pharmazie
52	Pilz	0	Pektin-Herstellung; Schokoladesirup
53*	?	0	Glucose-Herstellung; Alkohol aus Stärke
54	Pilz	0	Stärkezuckersirup
55	Asp. oryzae	0	Brotbäckerei
56	Bac. subtilis	0	Glucose, Stärkever-zuckerung; Alkohol
57*	Bac. subtilis	0	Glucose, Stärkever-zuckerung; Kinder-nährmittel
58	?	0	Kindernährmittel; Stärkezuckersirup; Pharmazie
69	Bakterien	kons.	Stärkeverflüssigung
71	?	0	Backwaren

* = flüssige Präparate, 0 = unter der Nachweisgrenze, kons. = mit deklariertem Konservierungsmittel

2. Pektinasen

Tabelle 3

Nr.	Ausgangsmaterial für die Herstellung	Antibiotische Restaktivität in „IE-Pen.-Äquival.“ in wäbr. Milieu	Vom Hersteller empfohlene Anwendung
7	Aspergillus sp.	0	
9	?	0	
10	Pilz	0	
11	Pilz	0	
17*	Pilz	0	
18	Pilz	0,032	
19	Pilz	0	
20*	Pilz	0	
26	Pilz	0	
27	Pilz	0	
28	Pilz	0,48	
29	Pilz	0	
30	Pilz	0,12	
31	Pilz	0,04	
32	Pilz	0	
33	Pilz	—	Klärung von Fruchtsäften
36	Aspergillus sp.	0,003	Herstellung von Obstnektaren und Gemüsehydrolysaten
39	Pilz	0,003	
40*	Pilz	0	
41	Pilz	0,012	
42*	Pilz	—	
43	Pilz	0	
44	Pilz	0,024	
45	Pilz	0,016	
46	Pilz	0,016	
63*	?	0	
75	Pilz	0,004	
76	Pilz	0	
77	Pilz	0	

* = flüssige Präparate, 0 = unter der Nachweisgrenze, — = nicht untersucht

3. Invertase

Tabelle 4

Nr.	Ausgangsmaterial für die Herstellung	Antibiotische Restaktivität in „IE-Pen.-Äquival.“ in wäbr. Milieu	Vom Hersteller empfohlene Anwendung
34	Pilze	0	Herstellung von Süßwaren, besonders Pralinenfüllungen
35*	Pilze	0	
47*	?	0	
4. Cellulasen			
3	Aspergillus sp.	0	
8	Aspergillus sp.	0	Aufschluß von Cellulose- und Hemicellulosehaltigem Material für Pflanzenextrakte, Pharmazie
22	?	0	
48	?	0	
64	?	0	
65	?	0	
94	Aspergillus sp.	0	
5. Lipasen			
2	?	0	Aromabildung
66	?	0	Käsereifung
6. Glucoseoxidase			
62*	?	0	Trockenei; Mayonnaisen, Dressings; Fruchtsaft
7. Urease			
24	?	0,48	Pharmazie

* = flüssige Präparate, 0 = unter der Nachweisgrenze

8. Proteasen

Tabelle 5

Nr.	Ausgangsmaterial für die Herstellung	Antibiotische Restaktivität in „IE-Pen.-Äquival.“ in wäbr. Milieu	Vom Hersteller empfohlene Anwendung
5	Wirbeltier	0	Pharmazie
6	Wirbeltier	0	Pharmazie
12	Pilz	0,016	Gerberei
14	Asp. parasiticus	0,04	Gerberei
15	Bac. subtilis	0,03	Gerberei
16	Asp. parasiticus	—	Gerberei
23	Ficus sp.	1,0	Pharmazie
49	Wirbeltier	0,004	Pharmazie
50	Wirbeltier	0	Pharmazie
51	Wirbeltier	0	Pharmazie
59	Asp. oryzae	0	Brotbäckerei
60	Bac. subtilis	0,06	Keks und Dauerbackwaren
61	?	0	Fleisch-Zartmacher
67	Bakterien	0,03	Hydrolysate von tierischem Eiweiß für Futtermittel
68	Pilz	0	Backwaren; Bier; Zartmacher
70	?	0	Backwaren
72	?	0	Waschmittel
73	?	0	Waschmittel
74	?	0	Waschmittel
78	Aspergillus sp.	0	?
9. Rennet (Lab)			
37	Wirbeltier	kons.	Käserei
38*	Wirbeltier	kons.	Käserei
79	Endothia parasitica	0	Käserei

* = flüssige Präparate, 0 = unter der Nachweisgrenze, — = nicht untersucht, kons. = mit deklariertem Konservierungsmittel

oben angeführten 3 Teststämmen vor, was einen Identitätsverdacht ausschließt.

Bei den Pektinasen ist hervorzuheben, daß eine Reihe dieser Präparate aus verschiedenen Chargen mit unterschiedlichen Reinigungsverfahren aber gleichem Pilz als Ausgangsmaterial stammte. Neben schwacher Aktivität kommen auch solche ohne nachweisbare antibiotische Wirkung vor, was zeigt, daß herstellungstechnisch die Gewinnung von Enzymen ohne antibiotische Restaktivität zumindest in diesen Fällen möglich ist.

Diskussion

Für Lebensmittel-Zusatzstoffe, zu welchen auch die Enzyme zu rechnen sind, muß die Freiheit von krebserregenden Substanzen gefordert werden. Dies gilt besonders für die Aflatoxine, wie der Vergleich der carcinogenen Mindestmengen von Aflatoxinen B₁ mit anderen oral wirkenden Hepatocarcinogenen in Tabelle 6 zeigt.

Tabelle 6

Tägliche Dosis pro kg Ratte zur Erzeugung von primären Lebercarcinomen bei mindestens 50 % der Tiere.

Aflatoxin B ₁	10 µg
Dimethylnitrosamin	750 µg
Buttergelb	9000 µg

Aus analytisch-methodischen Gründen ist man aber in der Gesetzgebung von der sog. Nulltoleranz abgegangen und wird daher auch für Enzympräparate nur weniger als die derzeit praktikable Standardmethode nachweisen kann, fordern können; das ist für Aflatoxin B₁ etwa 10 ppb oder 10 µg/kg. Die FAO will für Lebensmittel 30 ppb dulden, jedoch nur im Hinblick auf die schlechte Ernährungslage eines großen Teiles der Weltbevölkerung; bei der Beschränkung auf 10 ppb müßten sehr große Mengen von Lebensmitteln, vor allem tropischer und subtropischer Herkunft, aus dem Verkehr gezogen werden¹⁰).

In diesem Zusammenhang wäre auch zu überlegen, ob man „Gesamt-Aflatoxine“ limitieren soll — wie es z. B. in den USA angestrebt wird — oder nur Aflatoxin B₁, das die giftigsten Komponente des Gemisches ist und in aflatoxinhaltigen Produkten immer vorkommt, während die G- und M-Aflatoxine u. U. fehlen können.

Das Vorhandensein von antibiotischen Restaktivitäten sollte vermieden werden. Es handelt sich dabei in der Regel um unbekannte Wirkstoffe hoher Aktivität. Es wird auch immer der Verdacht geäußert werden, daß Antibiotika im Sinne des Arzneimittelgesetzes vorliegen könnten, die aus lebensmittelrechtlichen Gründen in diesem Falle abzulehnen sind. Den Gegenbeweis anzutreten, daß es sich bei diesen Aktivitäten um harmlose Verbindungen handelt, dürfte schwer und sehr zeitraubend sein. Außerdem kann es sich bei diesen Stoffen auch um allgemeine Toxine — z. B. wie eingangs bemerkt auch Mykotoxine — handeln.

Man sollte aber nicht vergessen, um wie geringe Anwendungsmengen es sich handelt. So wäre zu überlegen, ob in Abhängigkeit vom Verwendungszweck eines Enzympräparates nicht eine antibiotische Restaktivität von z. B. 0,03 IE Penicillin-Äquivalenten/g zu tolerieren ist.

Beispiel: 2 g Pektinase mit 0,03/g IE Pen.-Äqui. werden auf 100 l Fruchtsaft technologisch eingesetzt. 1 l Fruchtsaft enthielte dann 0,0006 Einheiten, eine Menge, die sicher nicht zur Resistenselektion oder zu Sensibilisierungen führen kann.

Über diese Fragen wird man sich bei der Erstellung von Standards für Enzympräparate noch eingehend unterhalten müssen.

Zusammenfassung

80 handelsübliche Enzympräparate wurden auf ihren Gehalt an Aflatoxin und antibiotischen Restaktivitäten untersucht. Eine Probe war Aflatoxin B₁-haltig, zwei andere zeigten Aflatoxin vortäuschende Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm. Antibiotische Restaktivitäten von 0,003 bis 1,0/g IE-Penicillin-Äquivalenten wurden bei 27 % der Präparate nachgewiesen; vor allem Pektinasen und Proteasen waren davon betroffen.

Eine Methode zum Nachweis antibiotischer Restaktivitäten im wäßrigen Milieu mit *Bacillus stearothermophilus*

wird beschrieben. Die Befunde werden im Hinblick auf die in Ausarbeitung befindlichen nationalen und internationalen Standards für Enzyme diskutiert.

Summary

80 enzyme preparations for food processing were analysed for their content of aflatoxin and residual antibiotic activities. One sample was found to contain aflatoxin B₁ and two others showed spots on thin layer chromatography-plates that resembled those of aflatoxin, but were shown not to be identical with aflatoxin. Residual antibiotic activities were present in 27 % of the preparations in a range of 0.003 to 1.0/g IU-penicillin-equivalents; especially pectinases and proteases were contaminated with these activities.

A method for the detection of residual antibiotic activities in aqueous solution with *Bacillus stearothermophilus* is described. The results are discussed with respect to official (national and international) specifications for enzyme preparations.

Résumé

80 préparations enzymatiques d'usage courant furent analysées quant à leur teneur en aflatoxine et leur activité antibiotique résiduelle. Un échantillon contenait de l'aflatoxine B₁ et deux autres donnèrent en chromatographie en couche mince des taches qui ressemblaient à celles de l'aflatoxine, sans toutefois y être identiques. Une activité antibiotique résiduelle fut décelée dans 27 % des préparations et avec une teneur allant de 0,003 à 10/g UI-équivalent pénicilline; son effet avait surtout été sensible sur des pectinases et des protéases.

Une méthode de détection de l'activité antibiotique résiduelle en solution aqueuse en présence de *Bacillus stearothermophilus* est décrite. Les résultats sont discutés en tenant compte des spécifications officielles actuelles (nationales et internationales) en matière de préparations enzymatiques.

Ich danke Frau R. Beck für ihre gewissenhafte Mitarbeit, Herrn Dipl.-Chem. Koller für die massenspektrometrischen Untersuchungen und Herrn Prof. Tolle, Kiel, für den Teststamm *Bac. stearothermophilus*, var. *calidolactis*.

LITERATUR

- 1) World Health Org., Techn. Report Series, No. 430, 1969.
- 2) DFG, Kommission zur Prüfung fremder Stoffe bei Lebensmitteln, Mitteilung VI vom 20. Juli 1970.
- 3) Fridmann, L., Food Technol. 18, 49 (1964).
- 4) Reed, G., Enzymes in food processing. (Academic Press, New York and London, 1966).
- 5) Frank, H. K., Alimenta, 8, 67 (1969).
- 6) Wallhäußer, K. H. und H. Schmidt, Sterillisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. (Thieme Verlag, Stuttgart, 1967).
- 7) FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 45A; WHO/Food Add./69.34: Specifications for Identity and Purity of Some Antibiotics. 1969.
- 8) Kraack, J., und A. Tolle, Milchwissenschaft 22, 669 (1967).
- 9) Uhlig, H., Naturwissenschaften 57, 261 (1970).
- 10) Anonym: Nature 212, 1512 (1966).

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. H. K. Frank

Institut für Physik und Biologie an der
Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung
75 Karlsruhe 1, Engesserstraße 20.