
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Nachweis und Verhalten von Deoxynivalenol und Ochratoxin A während der Bierbereitung

Georg Stettner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor – Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr.rer.nat.habil. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

2. apl. Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing.habil. Heinz Miedaner

3. Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.agr.habil. Harun Parlar

Die Dissertation wurde am 21.12.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.02.2001 angenommen.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1997 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München in Weihenstephan angefertigt.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Eberhard Geiger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die fruchtbaren Diskussionen.

Ganz besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau Dr. Michaela Böhm-Schraml, die mich an das Thema herangeführt und durch den von ihr gestellten Forschungsantrag diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Bei Herrn Dr. Ludwig Niessen, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, bedanke ich mich für den regen Austausch an fachlichen Informationen, seine Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Heinz Miedaner, Brautechnische Prüf- und Versuchsanstalt Weihenstephan, und Herrn Dr. Bertram Sacher, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, danke ich für die Überlassung von Probenmaterial.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls, insbesondere Frau Susan Illing, sowie den Diplomanden, Semesterarbeitern und wissenschaftlichen Hilfskräften. Durch das hervorragende Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft haben sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF), über die das Forschungsvorhaben aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft gefördert wurde. Vielen Dank auch an Frau Dr. Lydia Junkersfeld, Deutscher Brauerbund, für die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglichten und mich stets unterstützten, meinem Bruder für die guten fachlichen Diskussionen und natürlich meiner Frau Michaela, die immer Verständnis für meine Arbeit aufgebracht und mich auch in schwierigen Situationen meist klaglos ertragen hat.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AcDON	<u>A</u> cetyl <u>d</u> eox <u>y</u> nivalenol
BE	<u>B</u> itter <u>e</u> inheit (mg α -Säure / l Ausschlagwürze)
DON	<u>D</u> eox <u>y</u> nivalenol
EBC	<u>E</u> uropean <u>B</u> rewing <u>C</u> onvention
FX	<u>F</u> usarenon <u>X</u>
GG-%	<u>G</u> ewichts/ <u>G</u> ewichts-%
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
MEBAK	<u>M</u> itte <u>e</u> uropäische <u>B</u> rautechnische <u>A</u> nalysen <u>k</u> ommission
NIV	<u>N</u> ivalenol
NG	<u>N</u> achweisgrenze
OTA	<u>O</u> chra <u>t</u> oxin <u>A</u>
p	Extrakt
ppb	<u>P</u> arts per <u>b</u> illion (μ g / kg)
ppm	<u>P</u> arts per <u>m</u> illion (mg / kg)
PTDI	provisional tolerable <u>d</u> aily <u>i</u> ntake
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
U	<u>u</u> nits
UV	<u>u</u> ltraviolett
WBC	<u>W</u> orld <u>B</u> rewing <u>C</u> onvention

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	DAS MYKOTOXIN-PROBLEM	1
1.2	DIE BEDEUTUNG DER TRICHOTHECEN-MYKOTOXINE	2
1.3	DIE BEDEUTUNG VON OCHRATOXIN A	4
1.4	MYKOTOXINE UND DIE BIERBEREITUNG	6
1.5	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	11
2	<u>Material und Methoden</u>	12
2.1	MATERIAL	12
2.1.1	GERÄTE	12
2.1.1.1	HPLC-Analytik	12
2.1.1.2	Dünnschicht-Chromatographie	12
2.1.1.3	Rotationsverdampfer	13
2.1.1.4	Brauereigeräte	13
2.1.1.5	Sonstige Geräte	13
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIAL UND CHEMIKALIEN	14
2.1.3	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	15
2.2	METHODEN	16
2.2.1	BESTIMMUNG RELEVANTER ROTER KÖRNER	16
2.2.2	GUSHINGTEST	16
2.2.3	MODIFIZIERTES KONGRESSMAISCHVERFAHREN	16
2.2.4	KLEINMAISCHVERFAHREN	17
2.2.5	PRAXISMAISCHVERFAHREN	17
2.2.6	GÄRVERFAHREN	18
2.2.7	EXTRAKTION UND BESTIMMUNG VON TRICHOTHECEN-MYKOTOXINEN	18
2.2.7.1	Dünnschichtchromatographische Auftrennung	18
2.2.7.2	Extraktion aus festem Probenmaterial	18
2.2.7.3	Extraktion aus flüssigem Probenmaterial	19
2.2.7.4	Vorbereitung der Extraktionssäulen	19
2.2.7.5	HPLC-Parameter für die Trichothecenbestimmung	20
2.2.8	EXTRAKTION UND BESTIMMUNG VON OCHRATOXIN A UND B	20

2.2.8.1	Extraktion aus festem Probenmaterial	20
2.2.8.2	Extraktion aus flüssigem Probenmaterial	21
2.2.8.3	HPLC-Parameter für die Ochratoxin-Bestimmung	21
2.2.9	BESTIMMUNG DER AMINOSÄUREN	22
2.2.10	BESTIMMUNG DER VERWERTBAREN KOHLENHYDRATE	22
3	<u>Ergebnisse</u>	23
3.1	DEOXYNIVALENOL (DON) WÄHREND DER BIERBEREITUNG	23
3.1.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR MASKIERUNG VON DEOXYNIVALENOL	23
3.1.1.1	Screening von Rohware, Malz und Bier auf verschiedene Trichothecene	23
3.1.1.2	Maischen unter Zusatz von Deoxynivalenol-Reinsubstanz	24
3.1.1.3	Nachweis von Deoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol bei Temperaturbelastung	26
3.1.1.4	Maischen mit natürlich belastetem Malz	27
3.1.1.5	Inkubation belasteter Malze und Würzen mit Enzymen	28
3.1.1.6	Screening zur Beschaffung geeigneten Probenmaterials für Kongreßmaisversuche	31
3.1.1.7	Untersuchungen zum Verlauf von Deoxynivalenolkonzentrationen in Kongreßmais	33
3.1.1.8	Maischen unter Einsatz technischer Enzyme	36
3.1.1.9	Nachweis von Deoxynivalenol in β -Glucanlösung	40
3.1.1.10	Einfluß der Oberfläche von Malzschrot auf die Nachweisbarkeit von Deoxynivalenol	43
3.1.2	VERHALTEN VON DEOXYNIVALENOL WÄHREND DER GÄRUNG	44
3.1.2.1	Vergleich des Konzentrationsverlaufes von Deoxynivalenol bei Vergärung künstlich kontaminierter sowie natürlich belasteter Würze	44
3.1.2.2	Gärversuche mit unter- und obergärigen Hefen und verschiedenen Gärverfahren in natürlich kontaminierter Würze	46
3.1.2.3	Verschleppung von Deoxynivalenol durch Weiterführung von kontaminierter Hefe	51
3.1.2.3.1	<i>Würzeanalysen</i>	51
3.1.2.3.2	<i>Hefeanalysen</i>	54
3.1.2.4	Bestimmung der verwertbaren Kohlenhydrate bei Vergärung kontaminierter und nicht kontaminierter Würze	55

3.1.2.5	Bestimmung des Aminosäurespektrums bei Vergärung kontaminierter und nicht kontaminierter Würze	58
3.1.2.6	Vergleich unterschiedlicher Gärverfahren bis zum fertigen Bier	62
3.2	OCHRATOXIN A (OTA) WÄHREND DER BIERBEREITUNG	70
3.2.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR NACHWEISBARKEIT VON OCHRATOXIN A WÄHREND DES MAISCHPROZESSES	70
3.2.1.1	Screening von Rohware, Malz und Bier auf Ochratoxin A	70
3.2.1.2	Nachweis von Ochratoxin A in Kongreßmaische	71
3.2.1.3	Nachweis von Ochratoxin A bei der Würzebereitung mit einem praxisgerechten Infusionsmaischverfahren	72
3.2.1.4	Nachweis von Ochratoxin A in β -Glucan- und Pentosanlösung	73
3.2.2	VERHALTEN VON OCHRATOXIN A WÄHREND DER GÄRUNG	76
3.2.2.1	Vergärung von Würze mit unter- und obergäriger Hefe unter Zusatz von Ochratoxin A-Reinsubstanz	76
3.2.2.2	Anlagerung von Ochratoxin A an die Hefe	78
3.2.2.3	Vergleich verschiedener Hefen bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze	79
3.2.2.4	Analyse von Ochratoxin A in Hefe und Waschpuffer	83
3.2.2.5	Verschleppung von Ochratoxin A durch Weiterführung kontaminierter Hefe	86
3.2.2.6	Vergleich unterschiedlicher Gärverfahren bis zum fertigen Bier	87
4	<u>Diskussion</u>	95
4.1	MASKIERUNG VON DEOXYNIVALENOL	95
4.2	VERHALTEN VON DEOXYNIVALENOL WÄHREND DER GÄRUNG	100
4.3	NACHWEISBARKEIT VON OCHRATOXIN A WÄHREND DES MAISCHPROZESSES	104
4.4	VERHALTEN VON OCHRATOXIN A WÄHREND DER GÄRUNG	107
5	<u>Ausblick</u>	111
6	<u>Zusammenfassung</u>	112
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	115
8	<u>Anhang</u>	122

1 Einleitung

1.1 Das Mykotoxin-Problem

Ein Befall von Getreide mit Schimmelpilzen hat stets eine Qualitätsminderung zur Folge, wovon alle getreideverarbeitenden Industriezweige, so auch Mälzereien und Brauereien betroffen sind. Die Infektion von Braugetreide mit Schimmelpilzen der Gattungen *Fusarium*, *Aspergillus* oder *Penicillium* ist in zweifacher Hinsicht als kritisch einzustufen. Zum einen können die meisten dieser Pilze durch deutliche Verminderung der Malzqualität sowie eventuell auftretendes Gushing zu erheblichen finanziellen Schäden und, vielleicht noch schlimmer, zu Prestigeverlusten führen. Zum anderen kann es durch Bildung und Anreicherung von gesundheitsschädlichen Stoffwechselprodukten, sog. Mykotoxinen, in toxikologischer Hinsicht zu Problemen kommen. Dies kann aufgrund des Produkthaftungsgesetzes, wonach Lebensmittelhersteller für die Folgen, die unmittelbar oder mittelbar aus dem Verzehr ihrer Produkte entstehen, verantwortlich gemacht werden können, Konsequenzen ungeahnten Ausmaßes nach sich ziehen. Eine einwandfreie hygienische Qualität der verwendeten Rohstoffe muß deshalb oberste Priorität haben.

In Mitteleuropa findet man auf Getreidekörnern am häufigsten die *Fusarium*-arten *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti* und *F. tricinctum*, von denen einige potentielle Bildner des in der vorliegenden Arbeit fokussierten Toxins Deoxynivalenol sind. Eine Infektion findet auf dem Feld, ausgehend vom Boden, während der Blüte des Getreides statt. Dabei hat sich ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Mais als Vorfrucht und erhöhter Befallsstärke gezeigt. Eine feucht-warme Witterung mit heftigen Gewitterschauern während dieses sensiblen Abschnittes scheint die Ausbreitung der Pilze ebenso zu fördern, wie verspätete Ernten aufgrund naß-kalten Klimas. Hinzu kommen kurze Halme und kornreiche Ähren (sechszehnlige Sorten sind in der Regel anfälliger) sowie sortenspezifische Präpositionen [1]. Hundertprozentig wirksame Fungizide gibt es bisher noch nicht. Mit einigen erhältlichen Präparaten, die Azol-Wirkstoffe (Tebuconazol und Metconazol) enthalten, ist zumindest eine teilweise Eindämmung möglich, sofern sie in dem engen Zeitfenster während der Blüte auf die Ähren ausgebracht werden. Eine wichtige Maßnahme, durch die der Befall mit Fusarien erheblich reduziert werden kann, ist die wendende Bodenbearbeitung. Auch die Züchtung resistenter Sorten und gentechnische Veränderungen sollen zur Lösung des Problems

1 Sacher, B.: Diss., Technische Universität München, 1997, S. 139-166

beitragen [1]. Das Toxin DON wird bereits auf dem Feld, aber auch bei entsprechend unsachgemäßer Lagerung, Transport und Verarbeitung gebildet. Ochratoxin A ist ein Sekundärmetabolit von *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten, sog. Lagerpilzen, weshalb es bisher als alleinige Folge falscher, d. h. zu feuchter und zu warmer Lagerung betrachtet wurde. Die beiden Pilzgattungen werden zwar unter diesen Bedingungen erst dominant gegenüber der Feldflora, sie sind jedoch auch auf dem Feld bereits latent vorhanden und neueste Analysen erbrachten auch auf optimal gelagerter Ware geringe Konzentrationen des Toxins. Die massive Bildung von OTA kann allerdings sehr einfach durch Trocknung des Getreides vor der Lagerung bei ca. 13 °C auf unter 14 % Wassergehalt und ständig gute Belüftung unter Verhinderung von Kondenswasserbildung verhindert werden. Beide Toxine sind sog. Sekundärmetaboliten, da sie aus Vorläufern des Primärstoffwechsels synthetisiert werden. Sie werden von engumgrenzten Gruppen von Pilzen unter bestimmten Kulturbedingungen gebildet. Bisher sind ca. 300 Mykotoxine bekannt, die 25 Strukturgruppen zugeordnet und von ca. 250 Schimmelpilzarten gebildet werden. Da über die Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit behandelten Toxine bereits hinreichend berichtet wurde, soll diese im folgenden nur kurz skizziert werden.

1.2 Die Bedeutung der Trichothecen-Mykotoxine

Die Trichothecene sind zyklische Sesquiterpene und Sekundärmetabolite von Schimmelpilzgattungen wie *Fusarium*, *Cladosporium*, *Stachybotris*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium* und *Verticimonosporium*. Sie sind sehr weit verbreitet und kommen vor allem in Getreide und Mais vor. Aufgrund ihrer Struktur werden sie in vier Untergruppen eingeteilt, jedoch sind am häufigsten vorkommend die A- und B-Trichothecene [2]. Allen gemeinsam ist die 12,13-Epoxytrichothec-9-en-Grundstruktur, auch Scirpen genannt. Die B-Trichothecene, zu denen auch Deoxynivalenol (vgl. Abbildung 1) gehört, weisen zusätzlich eine Ketofunktion in Position 8 („8-Ketotrithothecene“) auf. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind Nivalenol, 3- und 15-Acetyldeoxynivalenol sowie Fusarenon X. Die in der einschlägigen Literatur oftmals erwähnten Toxine T2-Toxin, HT2-Toxin und Diacetoxyscirpenol zählen dagegen zum Typ A. Für die biologische Aktivität bzw. die toxische Wirkung verantwortlich ist der Epoxidring, der durch Säurehydrolyse geöffnet wird, was in der Regel von

1 N. N.: In: Ernährungsdienst, 08.12.1999

2 Smith, J. E.; Lewis, C. W.; Anderson, J. G.; Solomons, G. L.: Mycotoxins in human nutrition and health. Glasgow: Department of Bioscience & Biotechnology, University of Strathclyde, 1994, EUR 16048 EN, S. 12

einer intramolekularen Ringumlagerung zu den Apotrichothecenen begleitet wird [1]. Für detailliertere Informationen zur Bildung und den chemischen Eigenschaften von Trichothecenen sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [z.B. 2]. Die Trichothecene hemmen die Proteinbiosynthese sehr stark, weshalb sie allgemein zellschädigend wirken. Sie sind jedoch nicht erbschädigend und die häufigsten Substanzen, darunter Deoxynivalenol, werden als nicht krebserregend eingestuft. Zu den typischen beschriebenen Wirkungen dieser Toxine auf Mensch und Tier zählen Hautreizungen, -ödeme und -blutungen, Durchfall, Erbrechen, Schwächung des Immunsystems, Einflüsse auf die Leistungsfähigkeit des Herzens und das Nervensystem, Blutungen im Intestinaltrakt, Degeneration der Leber, Atrophie der Ovarien, Atrophie der Nierenglomeruli, Destruktion des hämatopoetischen Systems, Reduktion der weißen Blutkörperchen sowie Blutungen in den Gehirnhäuten, bei Tieren auch Futterverweigerung, Fruchtbarkeitsstörungen, Verwerfen und Leistungsrückgang [3,4,5,6,7,8,9,10,11]. Typische Krankheiten des Menschen bei anhaltendem Verzehr von Trichothecenen sind die Alimentäre Toxische Aleukie (ATA) [12,13], das Kashin-Beck-Syndrom [14] sowie Red Mold Disease [15]. Einen Überblick über verschiedene Gruppen von Mykotoxinen, Produzenten, Verbreitung und Wirkung auf Menschen, Tiere und Pflanzen gibt z. B. [16]. Deoxynivalenol und Nivalenol sind heute die bedeutendsten Mykotoxine im Getreideanbau, wobei DON wahrscheinlich das am

-
- 1 Bamberg, J. R. : In: Mycotoxins and other fungal related food problems. Washington D.C.: Advances in Chemistry Series 149 (1976), S. 144-162
 - 2 Tamm, C. ; Breitenstein, W. : In: The biosynthesis of mycotoxins – a study in secondary metabolism. Ed.: P. S. Steyn. New York: Academic Press, 1980, S. 69-104
 - 3 Pang, V. F.; Schiefer, H. B.; Beasley, V. R.: In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989, S. 123-133
 - 4 Matsuoka, Y.; Kubota, K.: In: Toxicol. Appl. Pharmacol. 91 (1987), S. 326-332
 - 5 Ishii, K.; Ando, Y.; Ueno, Y.: In: Chem. Pharmacol. Bull. 23 (1975), S. 2162-2164
 - 6 Taylor, M. J.; Pang, V. F.; Beasley, V. R.: In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989, S. 1-33
 - 7 Obara, T.; Masuda, E.; Takemoto, T.; Tatsuno, T.: In: Toxicogenic fungi – their toxins and health hazard. 1. Aufl. Hrsg.: H. Kurata et al. Amsterdam: Elsevier, 1984, S. 301-311
 - 8 Bubien, J. K.; Lundeen, G.; Templeton, C.; Woods, W. T.: In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989, S. 91-109
 - 9 Feuerstein, G.; Lorenzana, R. M.: In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989, S. 111-122
 - 10 Leibetseder, J.: In: Ernährung/Nutrition Vol. 13 (1989) Nr. 12, S. 739-745
 - 11 Leyk, W.: In: 21. Mykotoxin-Workshop - Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), 1999, S. 49-55
 - 12 Joffe, A. Z.: In: Microbial Toxins, Vol. 7. Algal and fungal toxins. New York: Academic Press, 1971, S. 139-189
 - 13 Bamberg, J. R.: In: Progress in molecular and subcellular biology. Vol. 8. Hrsg.: F. E. Hahn. Berlin: Springer, 1983, S. 41-110
 - 14 Joffe, A. Z.: Fusarium species: their biology and toxicology. 1. Aufl. New York: Wiley & Sons, 1986, S. 287-291
 - 15 Yoshizawa, T.: In: Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects. 1. Aufl. Hrsg.: Y. Ueno. Amsterdam: Elsevier, 1983, S. 195-209
 - 16 Marasas, W. F. O. ; Nelson, P. E. : Mycotoxicology – Introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man. 1. Aufl. University Park and London: The Pennsylvania State University Press, 1987

häufigsten in Nahrungs- und Futtermitteln vorkommende Mykotoxin ist [1]. Grenzwerte für Deoxynivalenol gibt es in Deutschland bisher nicht, jedoch soll ein erstes Konzept vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BgVV intern bereits vorliegen, wonach für Babykost ein Höchstwert von 100 ppb vorgeschlagen werde [2].

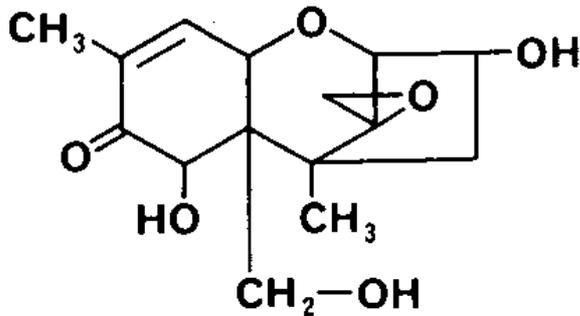


Abbildung 1: Struktur von Deoxynivalenol

1.3 Die Bedeutung von Ochratoxin A

Eines der bedeutendsten und weitverbreitetsten Mykotoxine ist Ochratoxin A, das 1965 zum ersten Mal aus Kulturen von *Aspergillus ochraceus* isoliert wurde, von dem es auch seinen Namen hat [3]. Es wird als Sekundärmetabolit von verschiedenen Arten von *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet, wobei in unserer gemäßigten Klimazone vor allem letztere aufgrund entsprechender Temperaturoptima die Bildner sind. Ochratoxin A besteht wie alle Ochratoxine aus einem Isocumarinrest, der peptidartig mit L-β-Phenylalanin verbunden ist. Vorstufe ist in diesem Fall das ungiftige Ochratoxin α. Die Reaktion wird durch das Enzym Ochratoxin-Synthetase katalysiert [4]. Über die Temperaturstabilität von OTA gibt es unterschiedliche Angaben. Während es nach BOUDRA et al. beim Erhitzen in Weizen relativ stabil war [5] beobachteten MILANEZ und LEITAO beim Kochen von Bohnen Abnahmen bis zu 84 % [6]. Ochratoxin A wird als nieren- und genotoxisch sowie karzinogen eingestuft. Zudem kann es zur Schädigung von Leber und Herz führen und besitzt eine immunsuppressive sowie teratogene Wirkung. OTA wird außerdem für eine auf dem Balkan weitverbreitete aber auch in Europa und Nordamerika vorkommende Krankheit, die mit einer erhöhten Krebsrate assoziiert ist, verantwortlich gemacht, die sog. Endemische Balkan-Nephropathie. Das Toxin kann entweder

1 Engelhardt, G. : In: www.lfe.bayern.de/lebensmittel/mykotox.html, 14.09.1999, S. 6-7

2 Koch, C.: In: DEMETER Bayern, Rundbrief Nr. 44, 2000, S. 3

3 Scott, De B. : In: Mycopath. Mycol. 25 (1965), S. 213

4 Ferreira, N. P. ; Pitout, M. J.: In: J. S. Afr. Chem. Inst. XXII (1969), S. 1-8

5 Boudra, H.; Bars Le, P.; Bars Le, J. : In: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 61 (1995) Nr. 3, S. 1156-1158

6 Milanez, T. V.; Leitao, M. F. F.: In: Food Additives and Contaminants, Vol. 13 (1996) Nr. 1, S. 89-93

über Primärprodukte, d. h. verschimmelte Produkte pflanzlichen Ursprungs, oder über Fleisch und Fleischprodukte sekundär aufgenommen werden. Die Kontamination der Sekundärprodukte erfolgt dabei durch sog. „carry-over“ bei Aufnahme von kontaminiertem Futter durch die Schlachttiere. Rinder sind jedoch hiervon weitgehend auszunehmen, da in ihrem Pansen eine Spaltung des Toxins in das oben bereits erwähnte ungiftige Ochratoxin α stattfindet [1]. Eine ausführliche Darstellung zur Synthese und den chemischen Eigenschaften, dem Vorkommen, der Toxikologie sowie dem Metabolismus von Ochratoxin A mit sehr umfangreichen Literaturangaben ist bei RUHLAND [2] nachzuschlagen, weshalb an dieser Stelle nur ein Abriss der wichtigsten Informationen gegeben wurde. Einer aktuellen deutschen Studie zu Folge wurde bei der Untersuchung von potentiell belasteten Lebensmitteln (Getreide, Mehl, Brot, Brötchen, Nahrungsmittel, Milch, Milchprodukte, kakaohaltige Produkte, Müsli, Knabbergebäck, Trockenfrüchte, Nüsse, Öl, Ölsaaten, Kaffee, Tee, Bier, Fleisch, Fleischerzeugnisse, Wein, Saft, Würzmittel, Essig) in Produkten aller Warengruppen OTA nachgewiesen. Dies zeigt, daß der Verbraucher ständig dem Toxin ausgesetzt ist. Allerdings waren nie alle getesteten Produkte einer Warengruppe kontaminiert und die gefundenen Konzentrationen im Mittel sehr gering. Zudem ist die Aufnahme durch die einzelnen Lebensmittel aufgrund der Verzehrsgewohnheiten sehr unterschiedlich. Der berechnete Anteil von Bier dürfte demzufolge bei 6–11 % an der Gesamt-OTA-Aufnahme liegen, welche mit 0,5 ng/kg Körpergewicht und Tag den PTDI-Wert zu 9-31% auslastet [3]. Grenzwerte gibt es in Deutschland bisher auch für dieses Toxin nicht, allerdings wird aufgrund einer Empfehlung des BgVV (Bundesanstalt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) in der EU die Festlegung einer Höchstmenge von 3 ppb für Lebensmittel und 0,3 ppb für Rohprodukte zur Herstellung von Kleinkindernahrung gefordert.

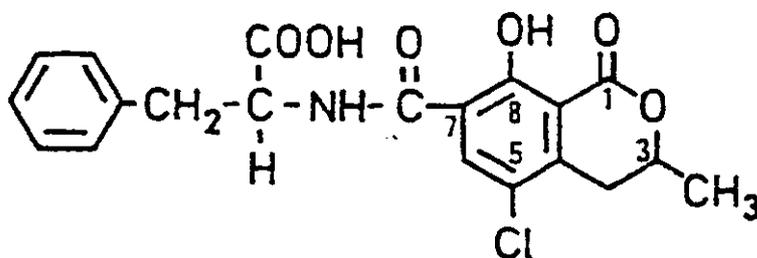


Abbildung 2: Struktur von Ochratoxin A

1 Engelhardt, G. : In: www.lfe.bayern.de/aktuell/1997/ochratoxina2.html, 18.01.2000, S. 1-6

2 Ruhland, M. : Diss., Technische Universität München, 1994

3 Wolff, J.; Bresch, H.; Cholmakow-Bodechtel, C.; Engel, G.; Erhardt, S.; Gareis, M.; Majerus, P.; Rosner, H.; Scheuer, R.: Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht. Forschungsverbund Produkt- und Ernährungsforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Deutschland, 1999, S. 239-243

1.4 Mykotoxine und die Bierbereitung

Seit man sich auf wissenschaftlicher Basis mit dem Problem von Mykotoxinen und deren Nachweisbarkeit in Lebensmitteln beschäftigt, wurde auch immer wieder Bier Gegenstand von Untersuchungen. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, welch großen Stellenwert es unter den Getränken weltweit innehat. In der Vergangenheit wurde deshalb eine ganze Reihe von Arbeiten publiziert, die sich zum einen mit dem Nachweis von Deoxynivalenol und Ochratoxin A in Handelsbieren beschäftigten, zum anderen aber auch das Verhalten und den Verbleib dieser Toxine während Würzebereitung und Gärung fokussierten. OTA als Toxin der Lagerflora galt dabei offensichtlich mehr Aufmerksamkeit als DON. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und weil sich ein Großteil dieser Arbeit mit dem Fusarientoxin befaßt, soll zunächst in chronologischer Reihenfolge auf die bisher bekannten Publikationen zu Deoxynivalenol und im Anschluß auf diejenigen zu Ochratoxin A eingegangen werden.

Erst aus dem Jahr 1983 stammt die erste Untersuchung von europäischen Bieren hinsichtlich ihres Gehaltes an DON, jedoch wurde nur in einer Probe eine Konzentration von 20 ppb gefunden [1]. Dann dauerte es zehn Jahre bis NIESSEN et al. [2] 196 Handelsbiere, darunter 36 gushingpositive Proben, mittels ELISA bei einer Nachweisgrenze von 5 ppb analysierten. Dabei enthielten 69 % der Gushingbiere und 37 % der gushingfreien Biere DON. Weizenbiere zeigten signifikant höhere Gehalte als Biere aus reinem Gerstenmalz ebenso wie Gushingbiere höhere Konzentrationen enthielten als gushingfreie Biere. Die Durchschnitts- und Maximalwerte lagen für Weizenbiere bei 245 ppb und 569 ppb sowie für Lagerbiere bei 148 ppb und 478 ppb. Ebenfalls 1993 untersuchten SCOTT et al. 50 kanadische und importierte Biere mit einer gaschromatographischen Methode, deren Nachweisgrenze bei 0,1-1,5 ppb lag. Hiervon waren 29 Proben DON-positiv, darunter neun über 5 ppb [3]. 1995 lagen von 77 tschechischen Handelsbieren 23 % unter der Nachweisgrenze von 6 ppb des verwendeten ELISA-Kits. Alle anderen Biere erbrachten Werte von 7–70 ppb bei einem ermittelten Medianwert von 12,6 ppb [4]. Eine Arbeit von SHIM et al. [5] aus dem Jahr 1997 über 54 koreanische und nach Korea importierte Biere erbrachte in 14 Proben DON, allerdings auch in 43 Proben NIV. Insgesamt lag der Anteil DON-haltiger Biere an den Inlandsbieren bei 19 %, an den Importbieren bei 50 % im

-
- 1 Payen, J.; Girard, Th.; Gaillardin, M.; Lafont, P.: In: *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, Vol 1 (1983), S. 143-146
 - 2 Niessen, L.; Böhm-Schraml, M.; Vogel, H.; Donhauser, S.: In: *Mycotoxin Research*, Vol. 9 (1993) Nr. 2, S. 99-109
 - 3 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Weber, D.: In: *Food Additives and Contaminants*, Vol. 10 (1993) Nr. 4, S. 381-389
 - 4 Ruprich, J.; Ostry, V. : In: *Cent. Eur. J. public Health* 3(4) (1995), S. 224-229
 - 5 Shim, W.-B.; Kim, J.-Ch.; Seo, J.-A.; Lee, Y.-W.: In: *Food Additives and Contaminants*, Vol. 14 (1997) Nr. 1, S. 1-5

Gegensatz zu 85 % und 58 % für NIV-haltige Biere. JUNKERSFELD hat über den Zeitraum 1995–1998 Daten aus jeweils 20 verschiedenen deutschen Brauereien gesammelt [1]. Die errechneten Mittelwerte der Proben lagen bei 8 ppb (1995), 22 ppb (1996), 29,4 ppb (1997) und 17,9 ppb (1998). Ganz aktuell ist die Arbeit von MOLTO et al. [2], die in einer Untersuchung zum Vorkommen von Trichothecenen in 50 argentinischen Bieren neun verschiedener Marken nur DON detektieren konnten. Dies war jedoch in 44 % der Proben nachweisbar, wobei 18 % über 20 ppb enthielten.

Aufgrund der Erkenntnis, daß DON offensichtlich aus der infizierten Rohware in das fertige Bier gelangen kann, wurden im Lauf der Zeit von verschiedenen Autoren und Arbeitsgruppen auch vertiefende Untersuchungen zum Verhalten dieses Mykotoxins während des Bierbereitungsprozesses angestellt. Bereits 1989 stellten WHITEHEAD und FLANNIGAN fest, daß selbst 20 ppm DON in glucosemodifiziertem Wickerham-Medium die Hefe bezüglich der Glucosevergärung und der Ethanolbildung nicht beeinflussen konnten [3]. Drei Jahre später berichteten SCOTT et al. bei Vergärung von künstlich kontaminierter Würze mit drei verschiedenen Hefestämmen leichte Anstiege der DON-Konzentrationen zum Ende der Gärung. Ebenfalls zugesetztes Zearalenon wurde dagegen zu 69 % β -Zearalenol und 8,1 % α -Zearalenol umgesetzt [4]. NIESSEN beobachtete 1993 [5], daß eine mit Malz eingebrachte DON-Menge während des Maischprozesses noch zunimmt, das fertige Bier aber bezüglich der DON-Konzentration unter dem Wert der Anstellwürze liegt. BÖHM-SCHRAML zeigte bei Mälzungsversuchen teilweise erhebliche Zunahmen der durch Rohware eingebrachten DON-Konzentrationen im Malz, wobei das Toxin auch das Schwelken und Darren weitgehend unbeschadet überstand [6]. SCHWARZ et al. berichteten diesbezüglich von Abnahmen. Bei Brauversuchen konnten sie zwischen 80 % und 93,4 % der durch die Malze eingebrachten DON-Mengen in den entsprechenden Bieren wiederfinden. Zwischen 0 % und 3,4 % wurden in den resultierenden Treber nachgewiesen und auch eine der vier Erntehefen war positiv [7]. Anhand von Wachstumsversuchen mit vier verschiedenen Hefestämmen zeigten BÖSWALD et al. 1995, daß nach 24 Stunden in Gegenwart von bis zu 2 ppm DON nach lichtmikroskopischen Untersuchungen keiner der Stämme morphologische Veränderungen oder eine Hemmung des Wachstums aufwies. Eine Toxinabnahme war auch nach weiteren acht Tagen Inkubation nicht

1 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

2 Molto, G.; Samar, M. M.; Resnik, S.; Martinez, E. J.; Pacin, A.: In: Food Additives and Contaminants, Vol. 17 (2000) Nr. 9, S. 809-813

3 Whitehead, M. P.; Flannigan, B.: In: J. Inst. Brew., Vol. 95 (1989), S. 411-413

4 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: In: Mycotoxin Research, Vol. 8 (1992) Nr. 2, S. 58-66

5 Niessen, L. M.: Diss., Technische Universität München, 1993, S. 147-153

6 Böhm-Schraml, M. C.: Diss., Technische Universität München, 1995

7 Schwarz, P. B.; Casper, H. H.; Beattie, S.: In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

zu verzeichnen [1]. Auch BOEIRA et al. unternahmen Wachstumsversuche mit Bierhefen. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß zur Hemmung des Hefewachstums in MXGB-Nährmedium für eine Lagerhefe mindestens 100 ppm und für eine Alehefe mindestens 50 ppm DON notwendig sind [2].

Im Gegensatz zu Deoxynivalenol, das wie berichtet erst 1983 zum ersten Mal im Zusammenhang mit Bier erwähnt wurde, weckte Ochratoxin A diesbezüglich bereits zehn Jahre früher das Interesse einiger Wissenschaftler. 1973 untersuchten FISCHBACH und RODERICKS Malze und Biere aus 130 amerikanischen Brauereien, fanden das Toxin allerdings in keiner der Proben, was nicht zuletzt auch an der aus heutiger Sicht relativ hohen Nachweisgrenze lag [3]. Erst wieder im Jahr 1983 prüften Majerus und Woller 41 deutsche, zumeist Pils- und Exportbiere, sowie 52 ausländische Biere, welche bis auf eine südafrikanische Probe aus dem europäischen Raum stammten. Auch sie fanden bei einer Nachweisgrenze von 1-2 ppb keine der Proben mit Ochratoxin A belastet und sahen deshalb die Situation bezüglich der gesundheitlichen Gefährdung der Verbraucher als sehr befriedigend an. Nach der im Zusammenhang mit Deoxynivalenol bereits erwähnten, aus dem selben Jahr stammenden Studie von PAYEN et al. konnte von 37 getesteten Bieren nur in vieren mit 110 ppb, 75 ppb, 35 ppb und ca. 5 ppb OTA nachgewiesen werden. Von einer gesundheitlichen Gefährdung wurde auch hier nicht ausgegangen, außer für starke Trinker [4]. Auch bei einer 1987 durchgeführten italienischen Studie von CERUTTI et al. konnte neben anderen Mykotoxinen auch OTA in keiner der 24 Importbierproben aus 11 europäischen Ländern nachgewiesen werden. Die Analyse erfolgte hier jedoch mit einer dünnschichtchromatographischen Methode bei einer Nachweisgrenze von 3 ppb [5]. Zwei Jahre später veröffentlichten TRESSL et al. die Ergebnisse ihrer Untersuchung von Braugersten, Malzen und Bieren aus den Jahren 1982 und 1983 [6]. Danach war von 83 Braugersten keine, von 85 Malzen eines mit 12 ppb und von 75 Bieren wiederum keines OTA-positiv. Allerdings wurde hier die Nachweisgrenze mit 5 ppb angegeben, was um einen Faktor 50 bis 500 über den heutigen Methoden liegt. 1992 untersuchte EL-DESSOUKI 56 Biere, darunter 26 Starkbiere, aus dem Groß- und Einzelhandel Nordwürttembergs [7]. Mit Ausnahme einer Weizenbierprobe mit 0,3 ppb konnte in keinem der Vollbiere OTA detektiert werden. Neun der 26 Starkbiere enthielten dagegen zwischen 0,35 ppb und 1,53 ppb.

1 Böswald, C.; Engelhardt, G.; Vogel, H.; Wallnöfer, P. R.: In: Natural Toxins 3 (1995), S. 138-144

2 Boeira, L. S.; Bryce, J. H.; Stewart, G. G.; Flannigan, B.: In: J. Inst. Brew., Vol. 105 (1999) Nr. 6, S. 376-381

3 Fischbach, H.; Rodericks, J. H.: In: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56 (1973), S. 767-770

4 Payen, J.; Girard, Th.; Gaillardin, M.; Lafont, P.: In: Microbiologie-Aliments-Nutrition, Vol 1 (1983), S. 143-146

5 Cerutti, G.; Vecchio, A.; Finoli, C.; Trezzi, A.: In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 11 (1987), S. 455-457

6 Tressl, R.; Hommel, E.; Helak, B.: In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 8 (1989), S. 331-335

7 El-Dessouki, S.: In: Deutsche Lebensmittel Rundschau, 88. Jahrgang, 11 (1992), S. 354-355

SCOTT und KANHERE (1995) testeten 41, in verschiedenen Provinzen Kanadas gekaufte Biere, darunter 11 Importbiere die zum Teil aus Europa stammten. Dabei fanden sie in 26 Proben Spuren des Toxins in einem Bereich bis 0,2 ppb und darunter [1]. Wohl auch im Zuge einer geplanten Vereinheitlichung bzw. Erstellung eines OTA-Grenzwertes in Lebensmitteln für die gesamte Europäische Union wurden in letzter Zeit mehrere Studien veröffentlicht. Aus dem Jahr 1998 stammen Daten wonach 38 spanische Biere im Mittel 0,024 ppb und 42 aus anderen europäischen Ländern kommende Biere im Mittel 0,025 ppb enthielten [2]. In 21 vorwiegend in Dänemark gebrauten Bieren wurden im Mittel Konzentrationen von 0,049 ppb gefunden [3]. TASCHAN und PUCHTINGER berichteten 1999, daß 107 von 133 Malzproben kleiner 1,0 ppb (NG = 0,4 ppb) und 43 von 84 Bierproben über der Nachweisgrenze von 0,1 ppb mit OTA belastet waren [4]. Nach einer großangelegten deutschen, vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten, und im Zeitraum 1995-1998 angefertigten Studie waren von 250 untersuchten Pils-, Export-, Weizen- und Starkbierproben über 70 % positiv mit Mittelwerten der belasteten Proben von 0,0262-0,0313 ppb bei einer angegebenen Nachweisgrenze von 0,01 ppb [5]. Schließlich liegen auch die von JUNKERSFELD ermittelten Werte, die von 18-20 deutschen Brauereien aus dem selben Zeitraum stammen, im gleichen Bereich mit Mittelwerten von 0,012-0,032 ppb [6]. Aufgrund dieser Ergebnisse und der indirekten Überwachung über die Rohwaren, wobei ein Grenzwert von 3 ppb europaweit eingeführt werden soll, wurde Bier nach längerer Diskussion bezüglich eines speziellen Grenzwertes von 0,2 ppb wieder von der Liste der zu überwachenden Lebensmittel genommen.

Zu Ochratoxin A gab es, im Gegensatz zur Problematik von Deoxynivalenol, bereits parallel zu den ersten Bieranalysen auch die ersten Untersuchungsergebnisse über dessen Verbleib während des Mälzens und der Bierbereitung von bzw. aus kontaminiertem Getreide. So berichteten GJERTSEN et al. beim 14ten EBC-Kongreß 1973 in Salzburg, daß eine mit Gerste eingebrachte OTA-Menge nach der Mälzung nicht mehr nachweisbar war. Zwei andere kontaminierte Gerstenproben (2,06 ppm bzw. 27,5 ppm) konnten aufgrund ihrer sehr geringen Keimfähigkeit von unter 2 % nicht vermälzt werden, weshalb sie unter Zusatz von Bakterienamylase, -proteinase und Schwefelsäure vermaischt wurden. In den Ausschlagwürzen

1 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.: In: Food Additives and Contaminants, Vol. 12 (1995) Nr. 4, S. 591-598

2 Legarda, T. M., Burdaspal, P.A.: In: Alimentaria, Vol. 291 (1998), S. 115-122

3 Jørgensen, K.: In: Food Additives and Contaminants, Vol. 15 (1998), S. 550-554

4 Taschan, H.; Puchtinger, G.: In: 21. Mykotoxin-Workshop - Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), 1999, S. 185-187

5 Wolff, J.; Bresch, H.; Cholmakow-Bodechtel, C.; Engel, G.; Erhardt, S.; Gareis, M.; Majerus, P.; Rosner, H.; Scheuer, R.: Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht. Forschungsverbund Produkt- und Ernährungsforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Deutschland, 1999, S. 56-64

6 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

konnten hierdurch nur noch 19 % bzw. 11 %, in den resultierenden Treber 10 % bzw. 6 % sowie in den fertigen Bieren 7 % bzw. 2 % detektiert werden. Ein Brauversuch mit unbelastetem Malz unter Zusatz von 1 ppm OTA-Reinsubstanz (bezogen auf das Malzgewicht) erbrachte in der Ausschlagwürze 16 %, in den Treber 10 % und im fertigen Bier noch 4 % der eingesetzten Menge [1]. Es scheint dadurch bestätigt, daß die Zugabe von Reinsubstanz zu Beginn des Maischens dem Eintrag durch natürliche Kontamination des Malzes gleicht. Die selben Ergebnisse wurden 1974 durch KROGH et al. in einer Fachzeitschrift noch einmal veröffentlicht [2]. Im Jahr 1975 berichteten CHU et al. nach Zusatz von 1 µg bzw. 10 µg OTA pro 1 g Brausubstanz beim Maischen von Wiederfindungen in den Ausschlagwürzen von 54 % bzw. 48 % und in den fertigen Bieren von 14 % bzw. 28 %. Während des Maischprozesses wurde das Toxin offenbar abgebaut. Eine Art Rohfruchtkochung eines Teils der Maische überstand es jedoch nahezu unbeschadet [3]. Aufbauend auf diese Ergebnisse machten NIP et al. im selben Jahr die gleichen Versuche noch einmal, wobei sie aber zum einen radioaktiv markiertes OTA einsetzten, um dessen Verbleib verfolgen zu können und zum anderen auch die Treber sowie Ernte- und Lagerhefe analysierten. Die Resultate von CHU et al. wurden im wesentlichen bestätigt. Zusätzlich wurden 28 % bzw. 39 % der eingesetzten OTA-Menge in den Treber, 8 % bzw. 20 % in den Erntehefen und je ca. 3 % in den Gelägerhefen gefunden, wobei diese Werte gegenüber den Radioaktivitätsmessungen, abhängig von der eingesetzten OTA-Konzentration, geringer waren. Daß dies auch bei den anderen untersuchten Fraktionen zu beobachten war, konnte als Nachweis für eine Metabolisierung von OTA während der Bierbereitung gelten [4]. Erst 1995 berichteten SCOTT et al. über tendenziell leichte Konzentrationsabnahmen von OTA bei der Vergärung von Würze, der das Toxin künstlich zugesetzt wurde [5]. Die letzte und neben der vorliegenden somit aktuellste Arbeit wurde beim WBC-Kongreß 2000 in Orlando von BAXTER vorgestellt [6]. Sie zeigte, daß ein mit dem Malz eingebrachtes OTA-Kontingent in der Würze noch zu 45-65 % und in den Treber zu ca. 15 % nachweisbar war. Die Würzekochung vermochte das Toxin nicht zu beeinträchtigen. Während der Gärung kam es zu mehr oder weniger weitgehenden Abnahmen (ca. 15 % und ca. 55 %), wobei ein geringer Teil bis ca. 5 % in den Erntehefen gefunden wurde, der größere Teil aber nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

1 Gjertsen, P.; Myken, F.; Krogh, P.; Hald, B.: In: European Brewery Convention – Proceedings of the 14th Congress, Salzburg 1973. Amsterdam: Elsevier, 1974, S. 373-380

2 Krogh, P.; Hald, B.; Gjertsen, P.; Myken, F.: In: Appl. Microbiol., Vol. 28 (1974) Nr. 1, S. 31-34

3 Chu, F. S.; Chang, C. C.; Ashoor, S. H.; Prentice, N.: In: Appl. Microbiol., Vol. 29 (1975) Nr. 3, S. 313-316

4 Nip, W. K.; Chang, F. C.; Chu, F. S.; Prentice, N.: In: Appl. Microbiol., Vol. 30 (1975) Nr. 6, S. 1048-1049

5 Scott, P.M.; Kanhere, S. R.; Lawrence, G. A.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: In: Food Additives and Contaminants, Vol. 12 (1995) Nr. 1, S. 31-40

6 Baxter, E. D.: WBC Session IV, 024, July 2000

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war zunächst, durch Bilanzierung des meßbaren Verlaufes der Konzentration von DON und OTA während des Würzebereitungsprozesses Hinweise auf mögliche Formen der Maskierung dieser Toxine zu erhalten. Durch den Einsatz entsprechender Enzyme sollte versucht werden, das Trichothecen aus solchen maskierten Formen freizusetzen und damit für die eingesetzte Extraktionsmethode zugänglich zu machen. Die erwarteten Ergebnisse waren sowohl aus Sicht der Grundlagenforschung (An welche Malz- bzw. Maischeinhaltsstoffe kann DON gebunden sein?) als auch vom praktischen Standpunkt interessant. Eine mögliche Vorhersagbarkeit der Deoxynivalenolkonzentration von aus belasteten Malzen hergestellten Würzen könnte ganz wesentlich zur Beurteilung der Verarbeitbarkeit solcher Malze aus toxikologischer Sicht beitragen.

Im Bereich der Vergärung von mit beiden Toxinen belasteten Würzen stand die Erhebung von Daten im Vordergrund, da zum Konzentrationsverlauf sowohl von DON als auch von OTA bisher nur sehr lückenhafte Angaben vorhanden waren. Auch sollte der Einfluß verschiedener Hefen ebenso wie unterschiedlicher Gärverfahren und -temperaturen erforscht werden. Im weiteren Verlauf sollten Fragestellungen zur Auswirkung von natürlich vorkommenden Toxin-Konzentrationen in Würzen auf die Gäraktivität von Hefen und den Verlauf von Zucker- und Aminosäurespektren geklärt werden. Für die Praxis außerordentlich wichtig und bisher ebenfalls unbeantwortet war das Problem einer eventuellen Verschleppung der Toxine durch Weiterführung von Hefe aus kontaminierten Würzen. Möglicherweise könnten solche Würzen bei Vergärung, zumindest zum Teil, saniert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 HPLC-Analytik

Auswertesoftware Spectralys 1.55, J&M, Aalen

Auswertesoftware Turbochrom 4, Perkin Elmer, Überlingen

Autosampler ISS 200, Perkin Elmer, Überlingen

Dioden-Array-Detektor NMC 301 TIDAS, J&M, Aalen

Dioden-Array-Lichtquelle CLD 35W, J&M, Aalen

Fluoreszenzdetektor LC 240, Perkin Elmer, Überlingen

HPLC-Hauptsäule CC 250/4 Lichrospher 100-5 RP-18 ec, Macherey-Nagel, Düren

HPLC-Hauptsäule LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm), Merck, Darmstadt

HPLC-Pumpe Binary LC Pump 250, Perkin Elmer, Überlingen

HPLC-Pumpe Series 200 LC Pump, Perkin Elmer, Überlingen

HPLC-Vorsäule LiChroCART[®] 4-4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm), Merck, Darmstadt

Interface Series 900, PE Nelson, Überlingen

UV-Detektor 785 A Programmable Absorbance Detector, Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.1.2 Dünnschicht-Chromatographie

Auftragegerät AS 30, Desaga, Wiesloch

Auftragegerät Linomat IV, CAMAG, Muttenz, Schweiz

Auswertesoftware Densitometer CD 60 Ver. 4.3, Desaga, Wiesloch

Densitometer CD 60, Desaga, Wiesloch

Heizplatte Thermoplate S, Desaga, Wiesloch

Sprühgerät SG 1, Desaga, Wiesloch

2.1.1.3 Rotationsverdampfer

Rotationsverdampfer VV 2000, Heidolph, Kelheim

Vakuumpumpe MZ2C, Vacuubrand, Werheim

Vakuumpumpe MZ4C, Vacuubrand, Werheim

Vakuumpumpensteuerung CVC 24, Vacuubrand, Werheim

Wasserbad WB 2000, Heidolph, Kelheim

2.1.1.4 Brauereigeräte

Flaschenfüller mit Hubzylinder, Esau und Hueber, Schrobenhausen

Pilot-Sudwerk, BAM, Freising

Rahmen- und Schichtenfilter Pilot, Seitz, Bad Kreuznach

2.1.1.5 Sonstige Geräte

Autoklav Varioklav Typ 500, H & P Labortechnik, Oberschleißheim

French Pressure Cell Press, SLM Instruments

Klimakammer, Hofmann, Freising

Magnetrührer IKAMAG RET, IKA-Werk, Staufen i. Br.

Maischbäder, Bender & Hobein, München

MEBAK-Mühle 702, Bühler Miag, Braunschweig

Mühle KE 02T/S, “Krone”-Mühlen u. Gerätebau, Schuchardt & Beckmann

pH-Meter pH 521, Wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim

Pilz-Heizhaube, Heraeus, Braunschweig

Rührmotor, Heidolph, Kelheim

Schüttler Heidolph REAX 2, Heidolph, Kelheim

Trockenschrank 500, Memmert, Schwabach

Ultraschallbad Sonorex RK 102, Bandelin electronic KG, Berlin

Ultrazentrifuge Optima TL, Beckmann

Vortex Genie 2, Bender und Hobein, Zürich

Waage Sartorius analytic, Sartorius, Göttingen

Waage Sartorius laboratory, Sartorius, Göttingen

Waage Sartorius universal, Sartorius, Göttingen

Zentrifuge Heraeus Labofuge GL, Heraeus Separationstechnik, Hanau

Zentrifuge Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, Bad Nauheim

Zweistrahlfotometer Uvikon 810, Kontron, Eching

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Acetonitril, J.T. Baker, Deventer, Holland

3-Acetyldeoxynivalenol, SIGMA, St. Louis, USA

15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol, SIGMA, St. Louis, USA

Acetylerase, SIGMA, St. Louis, USA

Aktivkohle, Fluka Chemika, Neu-Ulm

Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck, Darmstadt

Arabinoxylan, Gamma Chemie, München

(±)-2-Butanol, Fluka Chemika, Neu-Ulm

Buttersäureethylester, Fluka Chemika, Neu-Ulm

Cellite Type 545, Serva, Heidelberg

Cellulase, SIGMA, St. Louis, USA

Chloroform, Merck, Darmstadt

Darco G 60, Serva, Heidelberg

Deoxynivalenol, SIGMA, St. Louis, USA

Dichlormethan, Merck, Darmstadt

DOWEX[®] 50 WX8 Kationentauscher, Serva, Heidelberg

Emzymlösung AMG 300 L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark

Emzymlösung Ceremix 2X L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark

Emzymlösung Neutrased 0.5 L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark

Emzymlösung Ultraflo L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark

Essigsäure, Merck, Darmstadt

Essigsäureethylester, Riedel-deHaën, Seelze

Esterase, SIGMA, St. Louis, USA

Extrelut[®] NT 20 Nachfüllpackungen für Säulenfüllungen, Merck, Darmstadt

Fusarenon X, SIGMA, St. Louis, USA

Galactosidase, SIGMA, St. Louis, USA

β -Glucan, Gamma Chemie, München
 β -Glucosidase, SIGMA, St. Louis, USA
Hemicellulase, SIGMA, St. Louis, USA
HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60, Merck, Darmstadt
Isovaleriansäure, Fluka Chemika, Neu-Ulm
Lipase, SIGMA, St. Louis, USA
Methanol, Fluka Chemika, Neu-Ulm
(\pm)-2-Methyl-1-butanol, Fluka Chemika, Neu-Ulm
3-Methyl-1-butanol, Fluka Chemika, Neu-Ulm
Milchsäure, SIGMA, St. Louis, USA
Millex-HV-Filter (\emptyset 13 mm, 0,45 μ m), Millipore, Eschborn
Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt
4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridin (NBP), SIGMA, St. Louis, USA
Nivalenol, SIGMA, St. Louis, USA
OchraTest™ Säulen, Vicam, Matertown, USA
Ochratoxin A, SIGMA, St. Louis, USA
Ochratoxin B, SIGMA, St. Louis, USA
PENTA, Erbslöh, Geisenheim
1-Propanol, Fluka Chemika, Neu-Ulm
Proteinase K, SIGMA, St. Louis, USA
Sabouraud-Agar, DIFCO, Detroit, USA
Salzsäure, Merck, Darmstadt
Sulfatase, SIGMA, St. Louis, USA
Tetrachlorkohlenstoff, Merck, Darmstadt
Tetraethylenpentamin (TEPA), SIGMA, St. Louis, USA
1,4- β -D-Xylanase, SIGMA, St. Louis, USA

2.1.3 Untersuchungsmaterial

- Verschiedene unbelastete und DON-belastete Gersten- und Weizenmalze
- DON-belasteter Weizen

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung relevanter roter Körner

Mit Fusarien infizierte Körner zeichnen sich durch rote bis violette Mycele auf dem Keimling, oft auch in der Bauchfurche sowie in schweren Fällen das ganze Korn bedeckend, aus. Da die intensive Färbung durch Schwelken, Darren und Putzen des Malzes nicht verloren geht, können diese Körner mit etwas Übung relativ leicht erkannt werden [1]. Von sog. nicht relevanten roten Körnern können sie durch die schwammig-filzige Oberfläche der gefärbten Stellen unterschieden werden.

2.2.2 Gushingtest

Zur Überprüfung der Gushingneigung von Malzen diente der Gushingtest nach WEIDENEDER [2]. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils zweimal fünf Flaschen.

2.2.3 Modifiziertes Kongreßmaisverfahren

Zur Überprüfung des DON-Verlaufes natürlich kontaminierter Praxismalze während des Maischens wurde das Kongreßmaisverfahren nach MEBAK dahingehend modifiziert, daß 50 g gemahlene Malz mit 300 ml Wasser von 45 °C eingemaischt werden [3]. Der weitere Verlauf entspricht obiger Methode. Nach jeder Probenahme wird der Maischbecher samt Inhalt gewogen. Jeweils vor der nächsten Probenahme wird mit Wasser auf das vorher ermittelte Gewicht aufgewogen und gut durchgemischt, um Konzentrationszunahmen aufgrund von Verdampfungsverlusten auszuschließen.

1 Niessen, L.; Donhauser, S.; Weideneder, A.; Geiger, E.; Vogel, H.: - In: Brauwelt 131 (1991), S. 1556-1562

2 Donhauser, S.; Weideneder, A.; Winnewisser, W.; Geiger, E.: - In: Brauwelt 32 (1990), S. 1317-1320

3 Drawert, F. (Hrsg.): Brautechnische Analysenmethoden. Band I. 2. Aufl. neubearbeitet und ergänzt. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK, 1984, S. 189-191

2.2.4 Kleinmaisverfahren

Das Kleinmaisverfahren diente der genauen Bilanzierung von Toxinen beim Maischen, da keine Verluste durch Rohrleitungen oder sonstige Verdünnungen entstehen konnten.

In einem Topf wurden 5 l Brauwasser (90 % vollentsalztes Wasser, 10 % Leitungswasser) von 35 °C bis zu einer gewünschten Toxinkonzentration kontaminiert und anschließend 1,25 kg geschrotetes Malz eingemaischt. Nach guter Homogenisierung durch Umrühren und 10 min Rast folgten Aufheizen auf 62 °C, 15 min Rast, Aufheizen auf 72 °C, 15 min Rast, Aufheizen auf 78 °C, Abläutern, Nachgüsse und 60 min Würzekochen. Dabei wurden die Nachgüsse so berechnet, daß kein Glattwasser anfiel und Ausschlagwürzemengen von ca. sieben Litern erhalten wurden. Abgeläutert wurde über ein Baumwolltuch, das nachweislich keines der untersuchten Toxine in die Würze abgab. Gehopft wurde auf ca. 25 BE.

2.2.5 Praxismaisverfahren

Das Praxismaisverfahren diente zur Herstellung der Würzen für die Bilanzierung der Toxine bis zum fertigen Bier und wurde im Pilotsudwerk des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II eingesetzt. Dabei wurden 12,5 kg Weizenmalzschrot mit 50 l Brauwasser (90 % vollentsalztes Wasser, 10 % Leitungswasser) eingemaischt und folgende Temperaturen und Rasten gehalten:

- Einmaischen 38 °C Rast 20 min
- Aufheizen 52 °C Rast 30 min
- Aufheizen 62 °C Rast 30 min
- Aufheizen 68 °C Rast 25 min
- Aufheizen 72 °C Rast 30 min
- Aufheizen 78 °C Abmaischen
- Vorderwürzeabläutern
- 3 Nachgüsse
- Würzekochen 90 min

Gehopft wurde mit Hopfenpellets Typ 90 auf eine Bittere von ca. 25 BE bei einer geschätzten α -Säureausbeute von 30 %.

2.2.6 Gärverfahren

Für die drucklosen Gärungen standen kühlbare zylindrokonische Gärtanks (ZKG) mit einem Fassungsvermögen von 18 Litern zur Verfügung, wobei die Würzen von unten durch das Einbringen einer Sintermetallkerze in den Konus bis 10 mg/l Sauerstoff belüftet wurden. Die Druckgärungen fanden, nach Belüftung in den ZKG's, in sog. 10 l-Corneliusbehältern statt, welche zur Temperaturregelung in einer Klimakammer aufgestellt waren.

2.2.7 Extraktion und Bestimmung von Trichothecen-Mykotoxinen

2.2.7.1 Dünnschichtchromatographische Auftrennung

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Trichothecene wurde eine Methode von TAKITANI et al. eingesetzt, die auf einer Farbreaktion zwischen der 12,13-Epoxygruppe dieser Toxine und 4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridin (NBP) beruht [1].

2.2.7.2 Extraktion aus festem Probenmaterial

Extraktion und Bestimmung der Trichothecene wurden nach folgender modifizierter Methode von LAUREN und AGNEW durchgeführt [2]: 20 g Probenmaterial fein mahlen und mit 100 ml Acetonitril/Methanol/Wasser (80/5/15) eine Stunde schütteln. Vom Überstand 10 ml auf eine DOWEX[®]-Säule (2.2.7.4) geben, wobei die Flüssigkeit nur aufgrund der Schwerkraft hindurch laufen soll. Nach guter Mischung des Eluates ein 5 ml-Aliquot in einem Rundkolben mittels Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene einengen, in 2 ml Methanol lösen und auf eine Aktivkohle-Säule (2.2.7.4) geben. Den Kolben anschließend noch zweimal mit jeweils 2 ml Methanol spülen und dieses ebenfalls auf die Säule aufbringen. Nach dem Durchlaufen der Aktivkohle-Säule die 6 ml Eluat wiederum bis zur Trockene einengen, den Rückstand in 1 ml Wasser/Methanol (95/5) aufnehmen und über einen Millex-HV-Filter in ein Rollrandfläschchen füllen. Die extrahierte Toxinmenge entstammt somit 1 g Probenmaterial.

1 Takitani, S.; Asabe, Y.; Kato, T.; Suzuki, M.; Ueno, Y.: - In: Journal of Chromatography 172 (1979), S. 335-342
2 Lauren, D. R.; Agnew, M. P.: - In: J. Agric. Food Chem. 39 (1991), S. 502-507

2.2.7.3 Extraktion aus flüssigem Probenmaterial

Kohlendioxidhaltige flüssige Proben vor der Extraktion entgasen. Anschließend 20 ml Probe auf eine Säule, die mit dem Inhalt einer Packung Extrelut[®] NT 20 gefüllt ist, geben. Nach einer Einwirkzeit von 15 min mit 100 ml Essigsäureethylester eluieren und das Eluat mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene einengen. Den Rückstand in 10 ml Acetonitril/Methanol/Wasser lösen und weiter verfahren wie in 2.2.7.2 beschrieben. Die dabei extrahierte Toxinmenge entstammt jedoch 10 ml Probenmaterial.

2.2.7.4 Vorbereitung der Extraktionssäulen

DOWEX[®]-Säule:

50 g DOWEX[®] 50 WX8 zur Vorreinigung mit 100 ml Methanol aufschwemmen und in eine Glassäule (Ø 20 mm) geben, in die vorher etwas Watte gestopft wurde. Nachdem das Methanol abgelaufen ist, in dieser Reihenfolge mit 2 x 50 ml Methanol, 2 x 50 ml Methanol/bidest. Wasser (1/1), 1 x 50 ml bidest. Wasser und 1 x 100 ml bidest. Wasser waschen. Anschließend das Kationentauscherharz mit Hilfe einer Vakuumpumpe trocknen.

Zur Herstellung einer DOWEX[®]-Säule in eine unten sich verjüngende Glassäule (Ø 10 mm) etwas Quarzwolle stopfen, darauf erst 1 g Aluminiumoxid/Aktivkohle (20+1), dann 2 g vorgereinigtes DOWEX[®] und zum Schluß wieder etwas Quarzwolle aufgeben.

Aktivkohle-Säule:

Zur Herstellung einer Aktivkohle-Säule in eine Pasteurpipette zuerst etwas Quarzwolle stopfen und diese mit 40 mg Cellite und 120 mg Aktivkohle (in dieser Reihenfolge) überschichten.

2.2.7.5 HPLC-Parameter für die Trichothecenbestimmung

Zur besseren Auftrennung der Substanzen und um auch die acetylierten Formen von Deoxynivalenol zufriedenstellend erfassen zu können, wurde folgende Gradientenelution mit UV-Detektion bei 224 nm und RT entwickelt:

- 15 min Methanol/Wasser (85/15)
- in 10 min linear auf Methanol/Wasser (70/30)
- 15 min Methanol/Wasser (70/30)
- 10 min linear regenerieren auf Methanol/Wasser (85/15)

Die Flußrate beträgt 1 ml/min bei 50 µl Injektionsvolumen und einer CC 250/4 Lichrospher 100-5 RP-18 ec-Säule von Macherey-Nagel. Die quantitative Bestimmungsgrenze liegt für festes und flüssiges Probenmaterial bei 10 ppb. Zur Absicherung der gefundenen Peaks wurden mit Hilfe eines dem UV-Detektor nachgeschalteten Dioden-Array-Detektors Spektren der jeweiligen Substanzen erstellt sowie Additionsmessungen durchgeführt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei parallelen Bestimmungen der jeweiligen Probe.

2.2.8 Extraktion und Bestimmung von Ochratoxin A und B

2.2.8.1 Extraktion aus festem Probenmaterial

Die Bestimmung von Ochratoxin A und B erfolgte im Prinzip nach der RIDASCREEN® Ochratoxin A-Methode von R-Biopharm, welche jedoch zur Minimierung des Streuungsfehlers beim Pipettieren bezüglich einiger Aliquote wie folgt angepaßt wurde [1]:

2 g fein gemahlene Probenmaterial in ein verschraubbares Zentrifugengefäß einwiegen, 5 ml 1 N Salzsäure hinzufügen, mit einem Vortex-Gerät gut mixen und 5 min stehen lassen. Dann 10 ml Dichlormethan zugeben, 15 min über Kopf schütteln und 15 min bei 4000 U/min mittels einer Laborzentrifuge zentrifugieren. Die obere wäßrige Phase bis zum Probenkuchen vollständig absaugen und verwerfen und von der unteren Phase 7,5 ml in ein zweites Zentrifugengefäß pipettieren. Nach Zugabe von 10 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,1) wieder 15 min über Kopf schütteln, zentrifugieren und von der oberen wäßrigen Phase 5 ml am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene einengen. Den Rückstand anschließend

1 N. N.: RIDASCREEN Ochratoxin A – Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A. Arbeitsanleitung. R-Biopharm GmbH, Darmstadt, 1996

in 1 ml Wasser/Methanol (57/43) aufnehmen und über einen Millex-HV-Filter in ein Rollrandfläschchen füllen. Somit entstammt die extrahierte Toxinmenge 0,75 g Probenmaterial.

2.2.8.2 Extraktion aus flüssigem Probenmaterial

Das Prinzip entspricht dem unter 2.2.8.1 beschriebenen Verfahren. Kohlendioxidhaltige flüssige Proben vor der Extraktion entgasen. Anschließend 2 ml Probe mit 2,5 ml 1 N Salzsäure versetzen, mit einem Vortex-Gerät gut mixen und 5 min stehen lassen. Dann 4 ml Dichlormethan zugeben, 15 min über Kopf schütteln und 15 min bei 4000 U/min mittels einer Laborzentrifuge zentrifugieren. Die obere wäßrige Phase bis zum Probenkuchen vollständig absaugen und verwerfen und von der unteren Phase 2,5 ml in ein zweites Zentrifugengefäß pipettieren. Nach Zugabe von 3 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,1) wieder 15 min über Kopf schütteln, zentrifugieren und 2,5 ml der oberen wässrigen Phase in einen Rundkolben pipettieren. Diesen Schritt nochmals wiederholen und die so gewonnenen 5 ml der Natriumhydrogencarbonatphase am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene einengen. Den Rückstand in 1 ml Wasser/Methanol (57/43) aufnehmen und über einen Millex-HV-Filter in ein Rollrandfläschchen füllen. Die extrahierte Toxinmenge entspricht hier 1,19 ml Probenflüssigkeit.

2.2.8.3 HPLC-Parameter für die Ochratoxin-Bestimmung

Die Bestimmung von Ochratoxin A und B erfolgt nach isokratischer Elution mit Acetonitril/Wasser/Essigsäure (49,5/49,5/1) von einer LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18e-Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml/min und RT durch Fluoreszenzdetektion bei einer Extinktionswellenlänge von 332 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm. Die Laufzeit beträgt 20 min. Die quantitative Bestimmungsgrenze liegt für festes und flüssiges Probenmaterial bei 0,1 ppb. Zur Absicherung erfolgten Derivatisierungen des Ochratoxins zum Methylester [1]. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei parallelen Bestimmungen der jeweiligen Probe.

1 Wolff, J.; Bresch, H.; Cholmakow-Bodechtel, C.; Engel, G.; Erhardt, S.; Gareis, M.; Majerus, P.; Rosner, H.; Scheuer, R.: Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht. Forschungsverbund Produkt- und Ernährungsforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Deutschland, 1999, S. 249

2.2.9 Bestimmung der Aminosäuren

Extraktion und Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in flüssigem Probenmaterial erfolgten nach einer Methode von DONHAUSER et al. mittels HPLC [1]. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei parallelen Bestimmungen der jeweiligen Probe.

2.2.10 Bestimmung der verwertbaren Kohlenhydrate

Extraktion und Bestimmung der verwertbaren Kohlenhydrate in den Würze- und Bierproben wurden nach einer Methode von DONHAUSER et al. ebenfalls mittels HPLC durchgeführt [2]. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei parallelen Bestimmungen der jeweiligen Probe.

1 Donhauser, S.; Wagner D.; Meier, G.: - In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 11 (1986), S. 391-396
2 Donhauser, S.; Wagner, D.: - In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 43 (1990), S. 306-309

3 Ergebnisse

3.1 Deoxynivalenol (DON) während der Bierbereitung

3.1.1 Untersuchungen zur Maskierung von Deoxynivalenol

3.1.1.1 Screening von Rohware, Malz und Bier auf verschiedene Trichothecene

Ein Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war, zu untersuchen, ob und wenn ja, in welchen maskierten Formen Trichothecene im Getreide vorliegen und unter welchen Bedingungen diese Substanzen freigesetzt, also meßbar werden. Um einen Überblick zum Vorkommen von Deoxynivalenol und ähnlicher Verbindungen in Rohware, Malz und Bier im Projektzeitraum 1997/98 zu erlangen, wurden laufend Praxisproben auf die Trichothecene Nivalenol, Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol und Fusarenon X untersucht. Gleichzeitig sollte dieses Screening zur Beschaffung und Auswahl geeigneten Probenmaterials für die geplanten Versuche dienen.

In Tabelle 1 und 2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich Nivalenol und Deoxynivalenol aufgelistet. So konnte nur in zwei von 34 Gerstenproben sowie in einer von 128 Malzproben NIV nachgewiesen werden. DON wurde zwar ebenfalls nur in zwei Gerstenproben gefunden, jedoch waren 21 Malzproben, darunter 17 Weizenmalze, positiv und quantifizierbar. Zusätzlich waren von den 60 getesteten Bieren sieben positiv, allerdings nur zwei auswertbar. Wieviele der positiven Biere mit einem Weizenmalzanteil hergestellt wurden, konnte im Nachhinein leider nicht mehr nachvollzogen werden. Daß in keiner der Proben eines der drei weiteren oben benannten Trichothecene nachgewiesen werden konnte, bestätigt die allgemeine Auffassung, daß Deoxynivalenol das am häufigsten vorkommende Trichothecen-Mykotoxin ist.

Tabelle 1: Screening von Praxisproben auf Nivalenol (NIV)

Probenmaterial	Gesamt / nicht nachweisbar / < Bestimmungsgrenze / positiv	Meßwerte [ppb]
<i>Gerste</i>	34 / 32 / 0 / 2	99 / 123
<i>Weizen</i>	4 / 4 / 0 / 0	—
<i>Malz</i>	128 / 127 / 0 / 1	80 ¹
<i>Malzkeime</i>	2 / 2 / 0 / 0	—
<i>Malzstaub</i>	3 / 3 / 0 / 0	—
<i>Würze</i>	4 / 4 / 0 / 0	—
<i>Bier</i>	60 / 60 / 0 / 0	—
¹ = Gerstenmalz		

Tabelle 2: Screening von Praxisproben auf Deoxynivalenol (DON)

Probenmaterial	Gesamt / nicht nachweisbar / < Bestimmungsgrenze / positiv	Meßwerte [ppb]
<i>Gerste</i>	34 / 32 / 0 / 2	47 / 87
<i>Weizen</i>	4 / 4 / 0 / 0	—
<i>Malz</i>	128 / 107 / 0 / 21	14 ¹ / 31 ¹ / 40 ¹ / 41 ¹ / 14 ² / 83 ² / 126 ² / 175 ² / 218 ² / 227 ² / 253 ² / 355 ² / 360 ² / 380 ² / 390 ² / 433 ² / 450 ² / 522 ² / 567 ² / 960 ² / 1037 ²
<i>Malzkeime</i>	2 / 2 / 0 / 0	—
<i>Malzstaub</i>	3 / 3 / 0 / 0	—
<i>Würze</i>	4 / 4 / 0 / 0	—
<i>Bier</i>	60 / 53 / 5 / 2	147 / 310
¹ = Gerstenmalz ² = Weizenmalz		

3.1.1.2 Maischen unter Zusatz von Deoxynivalenol-Reinsubstanz

Da die enzymatischen Wechselwirkungen während des Maischens einen sehr komplexen Vorgang darstellen, wurde zunächst das Verhalten von Deoxynivalenol-Reinsubstanz (Zugabe von 408 ng/ml Hauptguß) während eines Kleinsudes bilanziert. Der Versuch wurde mittels eines Infusionsmaisverfahrens mit 5 Litern Hauptguß durchgeführt, da hier, im Gegensatz zu Dekoktionsmaisverfahren, die Fehlerquellen minimiert und somit eine bestmögliche

Bilanzierung erreicht wurde (2.2.4). Die Nachgüsse wurden so berechnet, daß eine Ausschlagwürze mit 12 % Stammwürze erhalten wurde und kein Glattwasser anfiel.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, verringerte sich bereits unmittelbar nach dem Einmaischen bei 35 °C die meßbare DON-Menge um ca. 45 %. Dieser Wert blieb bis zum Ende der Maltoserast bei 62 °C relativ konstant. Nach Anheben der Temperatur auf 72 °C stieg die Toxinkonzentration bis zum Ende der Verzuckerungsrast auf einen Maximalwert an. Daraus errechnet sich ein Gesamt-DON-Wert von ca. 75 % gegenüber der ursprünglich zugesetzten Menge. Erstaunlicherweise konnten nach dem Abläutern in der Vorderwürze nur noch ca. 39 % der Ausgangsmenge detektiert werden. Im weiteren Verlauf wurde selbst nach 60-minütiger Kochung keine Reduzierung des DON-Gehaltes mehr erzielt. Diese Beobachtung entspricht Literaturangaben, wonach Trichothecene weitgehend temperaturstabil sind.

Da die Toxinmengen in Vorderwürze und Pfannevollwürze identisch waren, kann davon ausgegangen werden, daß mit dem Auswaschen der Treber durch die Nachgüsse kein weiteres DON in die Würze eingebracht wird. Dies widerspricht jedoch früheren Untersuchungen von NIESSEN [1], der zumindest im ersten Nachguß noch Deoxynivalenol nachweisen konnte. Die anschließende Analyse der Treber ergab keine meßbare DON-Konzentration.

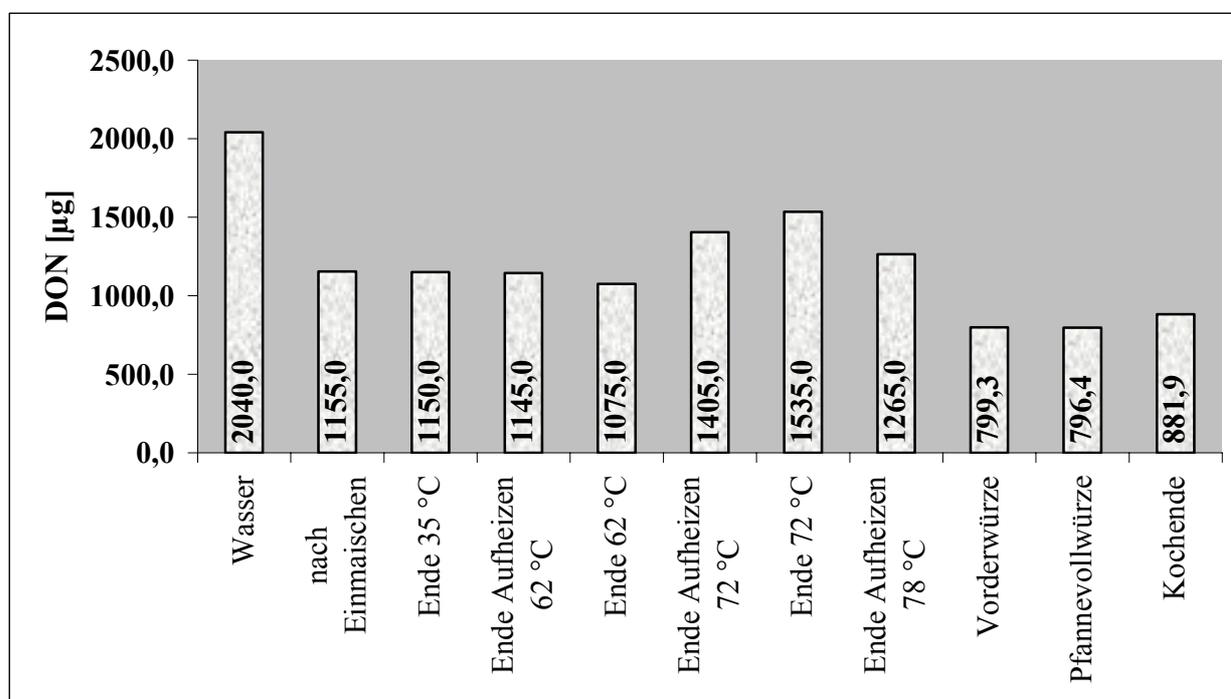


Abbildung 3: DON-Bilanzierung in künstlich kontaminierter Maische

1 Niessen, M. L.: Diss., Technische Universität München, 1993, S. 148-152

3.1.1.3 Nachweis von Deoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol bei Temperaturbelastung

Aufgrund der Reduzierung der detektierbaren DON-Menge aus 3.1.1.2 ab dem Ende der Rast bei 72 °C bis zum Ende des Vorderwürzeabläuterns war ein thermischer Abbau von Deoxynivalenol nicht ganz auszuschließen, wenn auch anhand der gemessenen Menge bei Kochende sehr unwahrscheinlich.

Aus diesem Grund wurden sowohl Deoxynivalenol als auch 15-Acetyldeoxynivalenol, das den Untersuchungen von SCHWARZ et al. [1] zufolge nicht sehr temperaturstabil zu sein scheint, 90 min in Brauwasser (90 % vollentsalztes Wasser, 10 % Leitungswasser) gekocht und alle 30 min Proben gezogen, bis zur Trockene eingengt, in HPLC-Laufmittel aufgenommen und vermessen. Dabei konnten die in Abbildung 4 dargestellten Konzentrationsverläufe beobachtet werden.

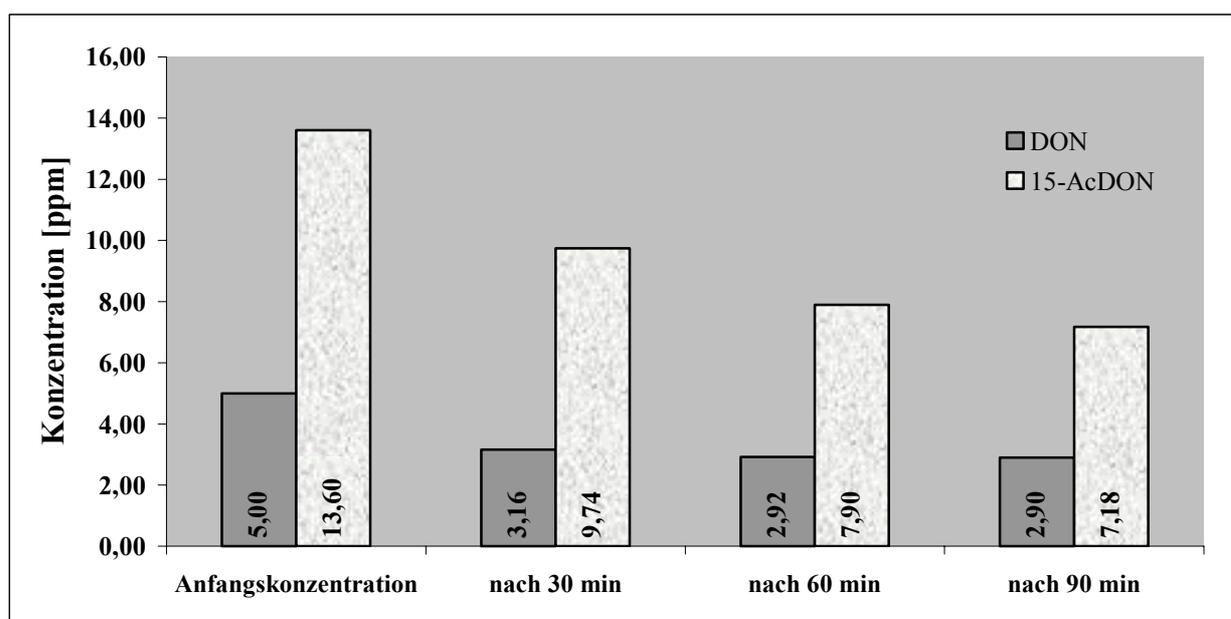


Abbildung 4: Kochung von Deoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol in Brauwasser

Die Konzentration an DON im Wasser war nach 30 bzw. 60 min um 37 % bzw. 42 % geringer als zu Versuchsbeginn. Eine weitere Toxinmessung nach 90 min Kochdauer ergab keine Konzentrationsänderungen mehr. Dies bedeutet, daß zumindest in Wasser eine teilweise Zerstörung von Deoxynivalenol stattfindet. In Würze ist dies offensichtlich nicht der Fall (vgl. 3.1.1.2). Möglicherweise bewirken Würzeinhaltsstoffe einen gewissen Schutz des Toxins

1 Schwarz, P. B.; Casper, H., H.; Beattie, S.: - In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

gegenüber thermischer Belastung. 15-AcDON wurde nach 30, 60 und 90 min nur noch mit 72 %, 58 % und 53 % des Ausgangswertes detektiert, was die Ergebnisse von SCHWARZ et al. bestätigt.

Eine mit dem 15-AcDON-Standard eingeschleppte DON-Menge mit einer näherungsweise berechneten Konzentration von 6,8 ppm reduzierte sich während der ersten 30 min Kochdauer bis auf 2 ppm. Anschließend war bis zur 60sten Minute eine Zunahme auf 5,2 ppm und bis zur 90sten Minute auf 6,2 ppm zu verzeichnen. Während die anfängliche DON-Abnahme noch mit dem oben beschriebenen Versuch übereinstimmt, sind die späteren Zunahmen größer als die AcDON-Abnahmen und können deshalb nicht ganz dadurch erklärt werden. Zudem wurde bereits nach 30 min eine zusätzliche Substanz detektiert, deren Retentionszeit zwischen denjenigen von DON (8,3 min) und 15-AcDON (29,9 min) bei 21,0 min lag. Bei dieser unbekanntem Substanz handelte es sich jedoch nicht um Fusarenon X. Im weiteren Verlauf kam es anhand des Peakhöhenvergleichs von der 30sten zur 60sten Kochminute zu einer Zunahme dieser Substanz um ca. 61 % während bis zur 90sten Minute die Konzentration wieder um ca. 10 % abnahm.

Sehr wahrscheinlich dürfte es sich bei dieser Verbindung nur um ein Zwischenprodukt der Vorstufe 15-AcDON zu DON handeln, die allerdings von Fusarien nicht oder nur in sehr geringen Mengen gebildet wird, da sie sonst bei der Untersuchung von Praxisprobenmaterial früher bereits aufgefallen wäre.

3.1.1.4 Maischen mit natürlich belastetem Malz

Um überprüfen zu können, inwieweit die beschriebenen Beobachtungen zum Verhalten von DON-Reinsubstanz auch bei Verwendung von natürlich infiziertem Malz zutreffen, wurden vergleichbare Untersuchungen mit Praxismaterial durchgeführt [1]. Hierfür wurde ein mit Fusarien natürlich infiziertes Malz mit einer DON-Belastung von 3,37 ppm (40,44 mg DON insgesamt) eingesetzt. Die Teilproben wurden jeweils vor und nach den entsprechenden Maischrasten gezogen.

Am Beispiel eines Dreimaischverfahrens mit Rasten bei 53 °C, 64 °C und 78 °C konnte festgestellt werden, daß die DON-Konzentration in der Gesamtmaische ab der Eiweißrast (53 °C, 15,66 mg DON) stetig ansteigt. Die beobachteten Zunahmen an DON beruhen sehr wahrscheinlich auf einer enzymatischen Freisetzung, evtl. in Verbindung mit einem thermischen

1 Zwicklbauer, T.: Diplomarbeit, Technische Universität München, 1997

Aufschluß. Der höchste Toxinwert wurde am Kochende der letzten Kochmaische gefunden, was zusammen mit der Rastmaische einen Gesamt-DON-Gehalt von 45,87 mg bzw. 112 % der eingebrachten Menge ergibt. In der Vorderwürze wurden etwa 100 ppb weniger ermittelt als theoretisch aus Koch- und Rastmaische zu errechnen war, was in der Tendenz mit den Ergebnissen aus 3.1.1.2 gut übereinstimmt. Abweichend davon ist allerdings der unerklärlich niedrige Wert in der Ausschlagwürze. Anstatt der gemessenen 178 ppb hätten bei reiner Verdünnung durch die Nachgüsse noch ca. 350 ppb detektiert werden müßen. Auch im Treber wurde bei diesem Versuch eine geringe Menge Deoxynivalenol mit einer Konzentration von 10 ppb gefunden.

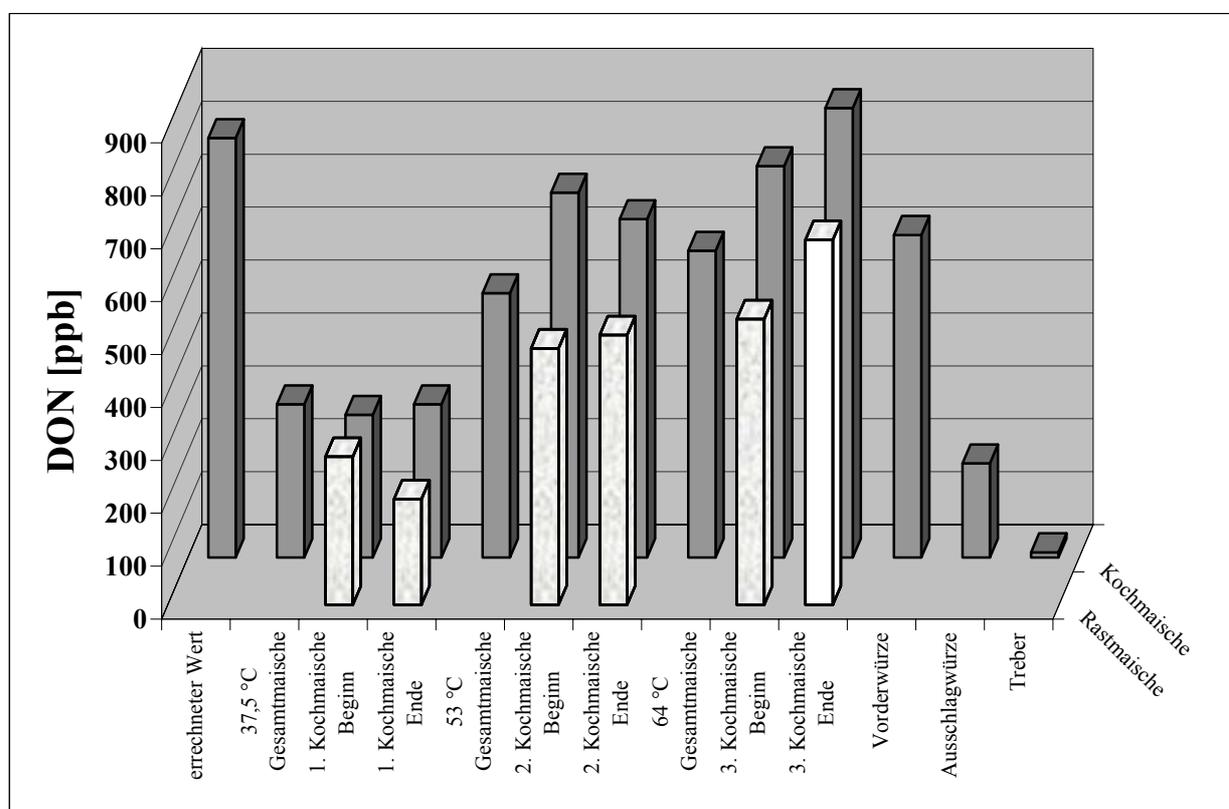


Abbildung 5: Bestimmung der DON-Konzentration während des Maischens mit natürlich belastetem Malz

3.1.1.5 Inkubation belasteter Malze und Würzen mit Enzymen

Während des Maischprozesses werden die Rasten bzgl. Temperatur und Zeit so gewählt, daß die durch das Malz eingebrachten Enzyme in ihrer Wirkung optimal genutzt werden können. Deshalb kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vermutet werden, daß die beobachteten

Toxinzunahmen auf die Aktivität bestimmter Enzyme bzw. Enzymkombinationen zurückzuführen sind. Dies sind im wesentlichen Proteasen (50–53 °C), β -Amylase (60–62 °C) und α -Amylase (70–72 °C). Gleichzeitig müssen sicherlich noch weitere amylolytische, cytolytische und proteolytische Enzyme in Betracht gezogen werden. Es wurde deshalb versucht, diese Freisetzungen mit verschiedenen käuflichen Enzymen nachzuvollziehen.

Hierzu wurden belastete Malzschrote zunächst auf ihren Gehalt an NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON und FX untersucht. Anschließend wurden Aliquote dieser Proben mit Natriumacetat- bzw. Natriumphosphatpuffer versetzt, so daß der laut Herstellerangaben für die einzelnen Enzyme (vgl. 2.1.2) optimale pH-Wert eingestellt wurde. Die Proben wurden mit verschiedenen Enzymmengen im Bereich von 1 U bis 30 U für 14,5 Stunden bei entsprechender Optimaltemperatur inkubiert. In ähnlicher Weise wurde auch mit Würzen verfahren, die mit dem Kongreßmaisverfahren [1] hergestellt wurden. Hier wurden jedoch die Enzyme direkt zugesetzt, weshalb der pH-Wert substratbedingt bei ca. 5,2 lag.

Folgende Enzyme wurden in Einzelansätzen getestet:

- Acetylerase
- Cellulase
- Esterase
- Galactosidase
- β -Glucosidase
- Hemicellulase
- Lipase
- Proteinase K
- Sulfatase

Aufgrund des geringeren Reinigungsaufwandes gegenüber der HPLC-Analytik (Puffer und Würzen wurden direkt aufgetragen oder nur über ein Aliquot Extrelut[®] gegeben (vgl. 2.2.7.3)) bei gleichzeitiger Minimierung des Risikos, während der Aufreinigung relevante Substanzen zu verlieren, wurde zur Detektion der Trichothecene eine dünnschichtchromatographische Methode nach TAKITANI et al. gewählt (vgl. 2.2.7.1). Zudem konnten Veränderungen des Toxinspektrums bereits visuell festgestellt werden.

1 Drawert, F. (Hrsg.): Brautechnische Analysenmethoden. Band I. 2. Aufl. neubearbeitet und ergänzt. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK, 1984, S. 189-191

Wie die Auswertung dieser Versuche zeigte, konnten in verschiedenen Einzelansätzen nach Inkubation mit β -Glucosidase Substanzen bestimmt werden, die sich aufgrund der Blaufärbung wie Trichothecene verhielten, zumindest aber eine 12,13-Epoxygruppe aufwiesen. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten in der Vergleichsprobe ohne β -Glucosidase-Zusatz diese Verbindungen nicht nachgewiesen werden.

Mit allen anderen Enzymen konnten keine Veränderungen in den Trichothecenspektren festgestellt werden. Auch der Nachweis einer Trichothecen-Glykosid-Verbindung durch das Anfärben von Zuckern nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung konnte nicht erbracht werden.

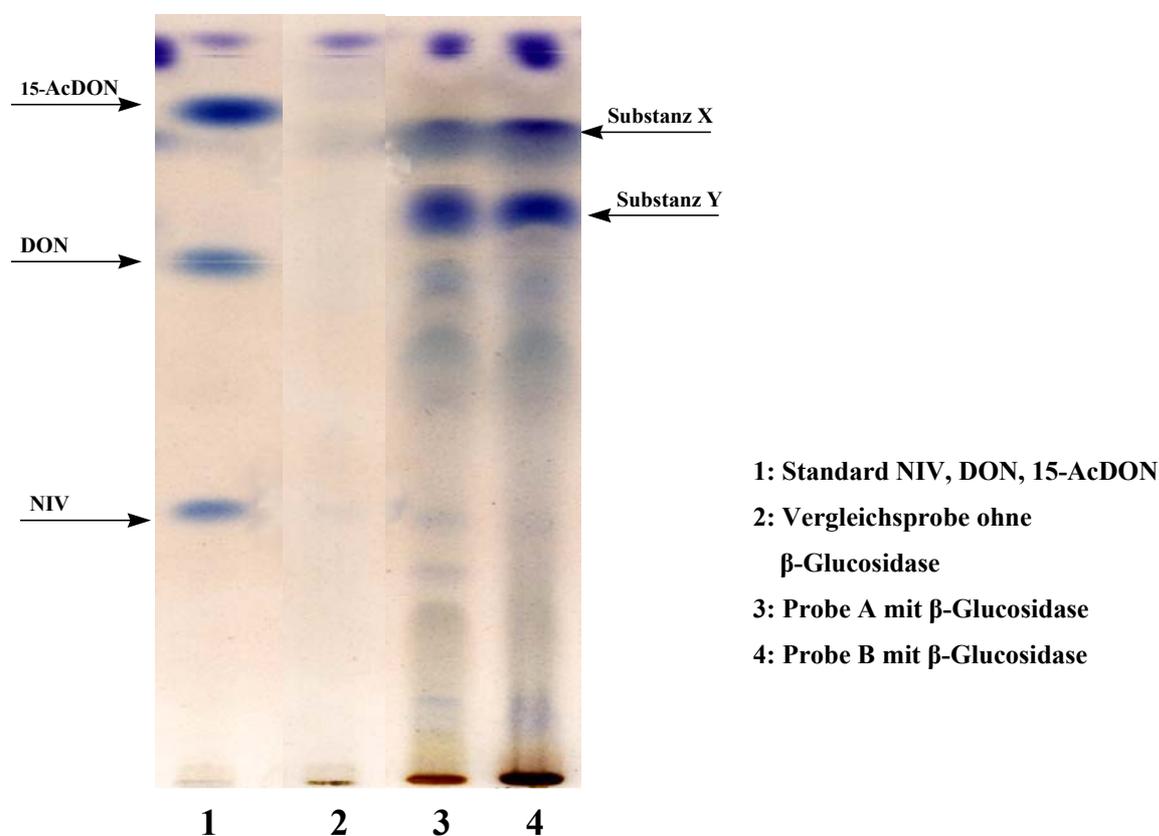


Abbildung 6: Dünnschichtchromatogramme von Kongreßwürzen belasteter Malze nach β -Glucosidase-Behandlung. 120 ml Würze bis zur Trockene eingengt, in 60 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) gelöst, 14,5 h bei 37 °C mit 1 u β -Glucosidase inkubiert, mit 120 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, bis zur Trockene eingengt, in 1 ml Methanol gelöst und aufgetragen. Laufmittel: Chloroform/Methanol (9/1).

Von diesen beiden unbekannt Substanzen wurden anschließend mit einem Dioden-Array-Detektor Spektren erstellt. Ein Vergleich dieser Spektren mit den Spektren von Standardsubstanzen zeigte, daß die gefundenen Verbindungen weder mit Fusarenon X noch mit

3- oder 15-Acetyldeoxynivalenol identisch waren. Abbildung 7 zeigt den Vergleich am Beispiel der Substanz Y, da die Spektren beider unbekannter Stoffe fast identisch waren.

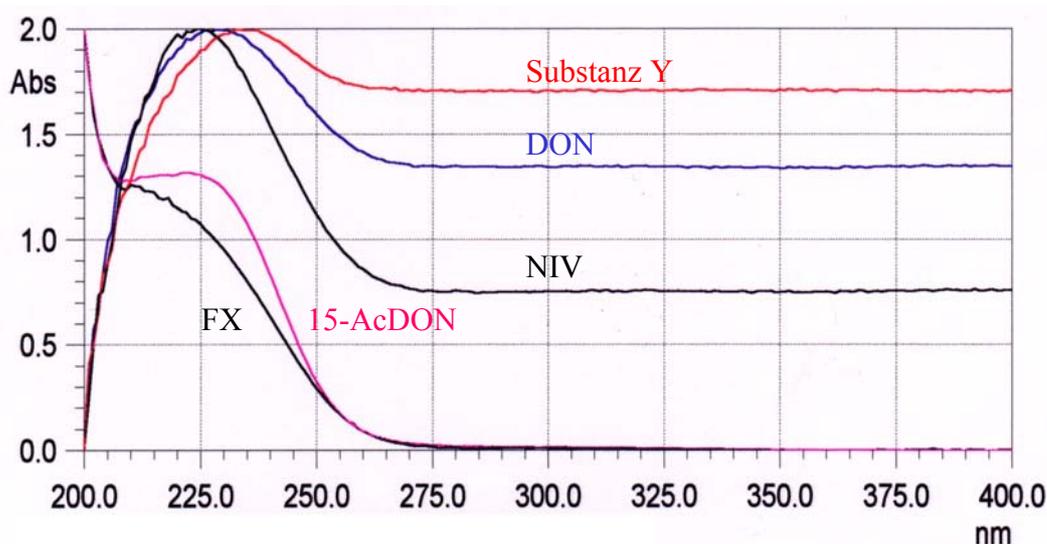


Abbildung 7: DAD-Spektrenvergleich der unbekannt Substanz Y mit verschiedenen Trichothecenen

3.1.1.6 Screening zur Beschaffung geeigneten Probenmaterials für Kongreßmaisversuche

Da aufgrund der fraglichen Praxisnähe bei den folgenden Versuchsansätzen nicht auf künstlich DON-infiziertes Malz zurückgegriffen werden sollte, wurden anhand der Kriterien „Überschäumvolumen beim Gushing-Test“ und „Anzahl relevanter roter Körner in 200 g Malz“ zunächst Weizen- und Gerstenmalzmuster verschiedener Mälzereien und Brauereien ausgewählt und anschließend auf ihren natürlichen Gehalt an Trichothecenen untersucht (die Ergebnisse sind auch in 3.1.1.1 eingegangen).

Von 15 untersuchten gushenden Weizen- und Gerstenmalzen, die ein Überschäumvolumen zwischen 40 ml und 225 ml aufwiesen, konnte lediglich in zwei Proben (Nr. 7 und 9) Deoxynivalenol in Konzentrationen von 360 ppb und 390 ppb bestimmt werden. In allen anderen untersuchten Malzmustern konnte keines der getesteten Trichothecene nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3).

Es wurde hier sehr deutlich, daß selbst Malze, die zu sehr starkem Gushing neigen, nicht mit Trichothecenen belastet sein müssen. Zulässig ist deshalb nur der Umkehrschluß, daß bei einem Nachweis von DON in einem Malz eine Infektion mit *Fusarium* spp. vorgelegen haben muß und aufgrund dessen die Möglichkeit besteht, daß das Malz zu Gushing neigt.

Tabelle 3: Deoxynivalenolwerte gushing-positiver Malze

Nr.	Malzart	Überschäumvolumen [ml]	DON-Konzentration [ppb]
1	Weizenmalz	40	0
2	Weizenmalz	46	0
3	Weizenmalz	47	0
4	Weizenmalz	50	0
5	Weizenmalz	53	0
6	Weizenmalz	72	0
* 7	Weizenmalz	84	360
8	Weizenmalz	90	0
* 9	Weizenmalz	168	390
10	Gerstenmalz	76	0
11	Gerstenmalz	92	0
12	Gerstenmalz	120	0
13	Gerstenmalz	134	0
14	Gerstenmalz	220	0
15	Gerstenmalz	225	0
* = Malze wurden bei Kongreßmaisversuchen weiterverwendet			

In drei der sechs Gerstenmalze mit fünf bis 13 relevanten roten Körnern sowie in 13 von 18 Weizenmalzen mit einem bis 105 relevanten roten Körnern in 200 g Malz konnten DON-Konzentrationen zwischen 14 ppb und 3844 ppb bestimmt werden. Keines der untersuchten Malze enthielt NIV, FX, 3- oder 15-AcDON.

Wie aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe eindeutig hervorgeht, kann von dem Ausmaß an relevanten roten Körnern nicht zwangsläufig auf eine Mykotoxinbelastung oder gar auf die Höhe einer Toxinkonzentration geschlossen werden (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Deoxynivalenolwerte und Anzahl relevanter roter Körner von Praxismalzen

Nr.	Malzart	Relevante rote Körner [Stück in 200 g Malz]	DON-Konzentration [ppb]
* 16	Weizenmalz	8	175
17	Gerstenmalz	6	14
18	Gerstenmalz	13	31
* 19	Weizenmalz	7	14
* 20	Gerstenmalz	5	41
* 21	Weizenmalz	20	227
* 22	Weizenmalz	17	450
23	Weizenmalz	1	433
* 24	Weizenmalz	8	1037
* 25	Weizenmalz	15	253
26	Weizenmalz	6	522
* 27	Weizenmalz	11	355
* 28	Weizenmalz	14	567
29	Gerstenmalz	10	0
30	Weizenmalz	9	0
31	Weizenmalz	10	0
32	Weizenmalz	5	0
33	Weizenmalz	10	0
34	Weizenmalz	18	0
* 35	Weizenmalz	12	960
* 36	Weizenmalz	9	380
37	Gerstenmalz	6	0
38	Gerstenmalz	10	0
* 39	Weizenmalz	105	3844
* = Malze wurden bei Kongreßmaisversuchen weiterverwendet			

3.1.1.7 Untersuchungen zum Verlauf von Deoxynivalenolkonzentrationen in Kongreßmais

Zur Durchführung eines Maischversuches in der institutseigenen Kleinsudanlage werden ca. 8-12,5 kg Malzschrot benötigt. Um die damit erhaltenen Ergebnisse anschließend reproduzierbar darstellen zu können, müssen sämtliche Ansätze mehrfach wiederholt werden. Da in den Jahren 1997 und 1998 trotz Auftretens von Fusarieninfektionen ein erheblicher Mangel an ausreichenden Mengen geeigneten Ausgangsmaterials bestand, wurden die folgenden Untersuchungen im Kleinstmaßstab durchgeführt. Dazu wurde das Kongreßmaisverfahren

nach MEBAK zu einem Infusionsmaisverfahren mit 50 g Schüttung und 300 ml Wasser modifiziert, wodurch eine reproduzierbare Bilanzierung über den gesamten Maischverlauf möglich war (vgl. 2.2.3). Gleichzeitig konnten bis zu acht verschiedene Probenmuster unter identischen Bedingungen verarbeitet werden.

Für die Untersuchungen wurden die unter 3.1.1.6 mit * gekennzeichneten Malzprobenmuster herangezogen. Zunächst wurden, ausgehend von den durchgeführten Malzanalysen, die zu erwartenden DON-Konzentrationen nach dem Verhältnis von Schüttung zu Hauptguß (1:6) berechnet. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, wurden in 50 % der Proben unmittelbar nach dem Einmaischen höhere DON-Werte ermittelt als errechnet. Im weiteren Maischverlauf konnten unregelmäßige Zu- und Abnahmen der DON-Gehalte festgestellt werden. Besonders auffällig verhielten sich die Muster 9 und 36; der Toxinwert von Maische 9 fiel kontinuierlich ab, Maische 36 zeigte dagegen Konzentrationsschwankungen von bis zu 60 % vom „Einmaischen“ bis „nach Aufheizen auf 70 °C“.

Bemerkenswert ist, daß mit Ausnahme der Muster 9 und 39 bei allen verwendeten Malzen am Ende des Maischverfahrens höhere Werte (Faktor 1,1 bis 19) ermittelt werden konnten als die entsprechenden Malzanalysen ergaben. Dies entspricht einem Anteil von 85,7 %. Da auch eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von NIESSEN gegeben ist, stellt das Verfahren eine sehr gute Methode dar, um eine zu erwartende DON-Konzentration in einer Würze, die aus belastetem Malz hergestellt werden soll, abzuschätzen (vgl. Abbildung 9). Je höher die Konzentration im Malz, desto geringer die prozentuale Zunahme.

Tabelle 5: Werte aus Malz- und Maischeanalysen verschiedener Praxisproben

Nr.	Werte aus	Einmaischen	nach 30 min	nach Aufheizen	nach 60 min
	Malzanalysen	bei 45 °C	bei 45 °C	auf 70 °C	bei 70 °C
	berechnet [ppb]	[ppb]	[ppb]	[ppb]	[ppb]
7	60	43	28	23	87
9	65	51	45	32	27
16	29	171	162	125	235
19	2	16	25	35	38
20	7	33	41	57	54
21	38	109	130	157	209
22	75	60	79	103	183
24	173	148	180	145	287
25	42	50	50	82	94
27	59	90	66	89	122
28	95	75	106	91	118
35	160	143	160	187	175
36	63	168	48	149	164
39	641	451	485	496	522

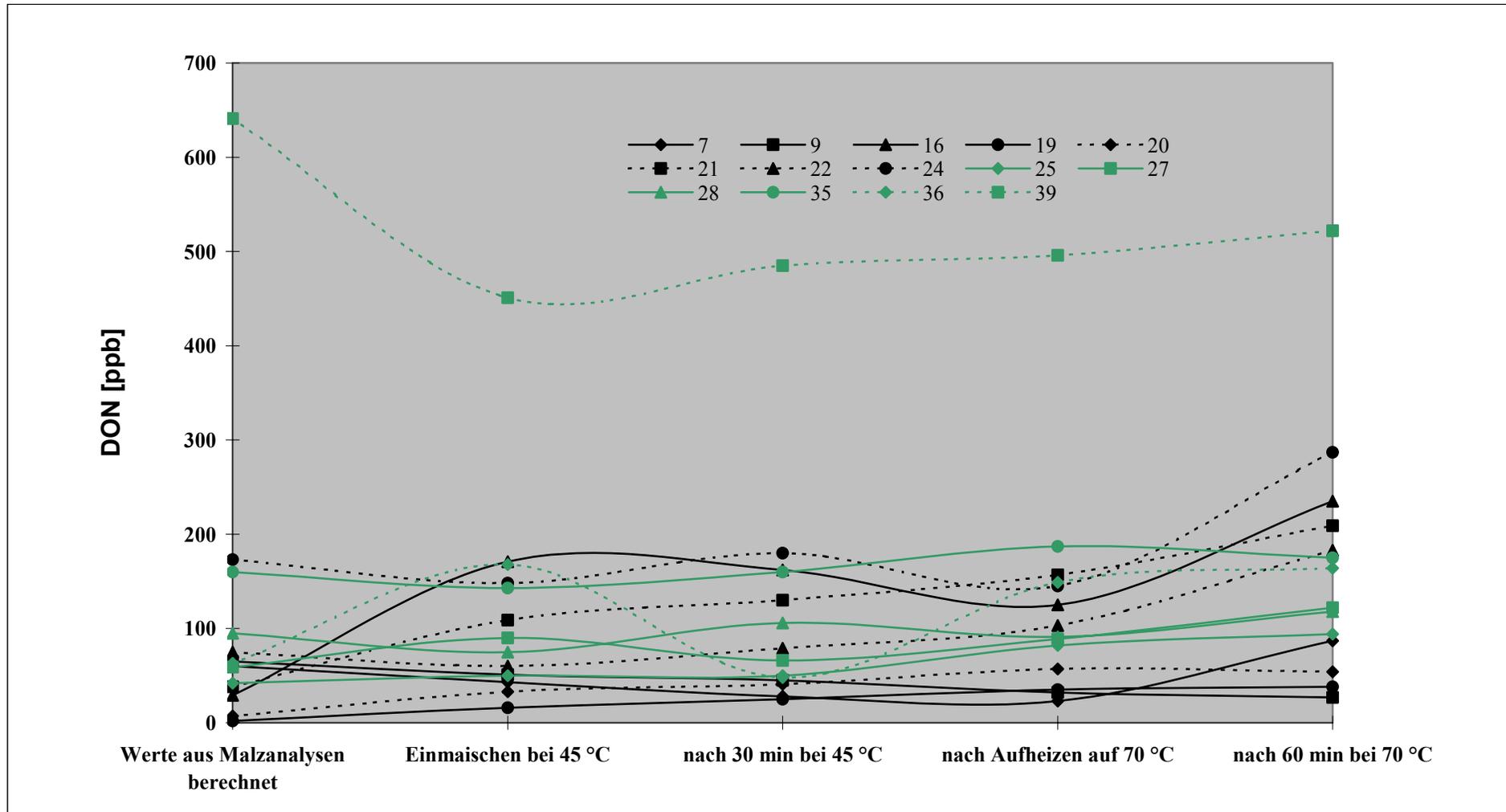


Abbildung 8: Vergleich der Werte von Malz- und Maischeanalysen aus Tabelle 5

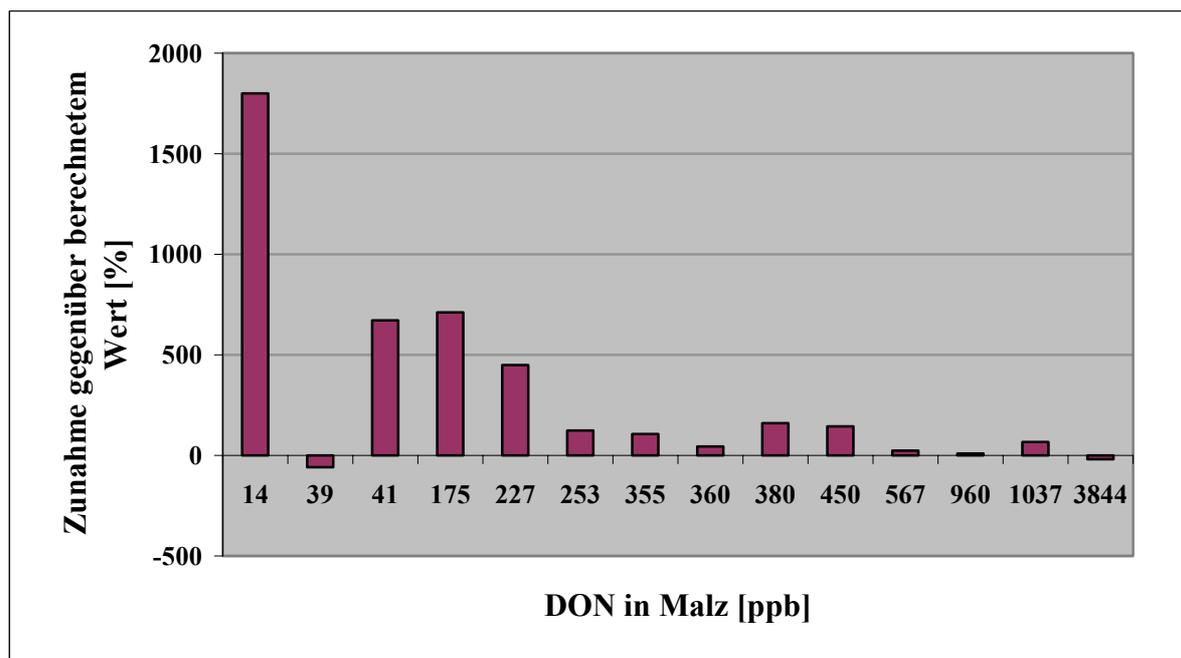


Abbildung 9: Prozentuale Zunahme der DON-Konzentration in Maische in Abhängigkeit von der DON-Konzentration im Malz

3.1.1.8 Maischen unter Einsatz technischer Enzyme

Wurden ausgewählte Enzyme einzeln den Testmalzen zugesetzt, konnten keine meßbaren Konzentrationserhöhungen von DON nachgewiesen werden. Nach Durchführung von Kongreßmaischen wurden jedoch bei den gleichen Malzen zum Teil deutliche Zunahmen an DON festgestellt. Grund für diese widersprüchlichen Beobachtungen könnte sein, daß entweder die getesteten Enzyme trotz Verwendung von entsprechenden Puffern nicht in der Lage waren, noch vorhandene „Toxinressourcen“ aus der Malzmatrix freizusetzen oder aber das Zusammenwirken mehrerer Enzyme für einen Aufschluß Voraussetzung ist.

In Abhängigkeit von der herrschenden Temperatur sind insbesondere cytolytische, proteolytische und amylolytische Enzyme während des Maischens wirksam. Die Eigenschaften dieser Enzymgruppen bezüglich pH-Wert, Temperaturoptimum und Inaktivierungstemperatur sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: pH-Wert- und Temperaturoptima verschiedener Maischenzyme [1]

			pH-Opt.	Temp.-Opt. °C	Inakt.-Temp. °C
Cytolytische Enzyme	Glucanasen	Endo- β -1,4-Glucanase	4,5 - 4,8	40 - 45	55
		Gersten-endo- β -Glucanase	wahrscheinlich ähnliches Verhalten		
		Endo- β -1,3-Glucanase	4,6 / 5,5*	60	70
		β -Glucan-Solubilase	6,6 - 7,0**	62	73
	Pentosanasen	Endo-Xylanase	5,0	45	
		Exo-Xylanase	5,0	45	
		Arabinosidase	4,6 - 4,7	40 - 50	60
Proteolytische Enzyme	Endo-Peptidasen	Sulfhydryl-Enzyme	3,9 / 5,5	45 - 50	> 60
		metallaktivierte Enzyme	5,5/6,9/8,5	45 - 50	> 60
	Exo-Peptidasen	Carboxypeptidasen	4,8 - 5,6	50 (40 - 60)	> 70
		Aminopeptidasen	7,0 - 7,2	45 (40 - 50)	> 55
		Dipeptidasen	8,8	45 (40 - 47)	> 50
Amylolytische Enzyme		α -Amylase	5,6 - 5,8	70 - 75	> 80
		β -Amylase	5,4 - 5,6	60 - 65	> 70
		Grenzdextrinase	5,1	55 - 60	65
		Maltase	6,0	35 - 40	> 40
		Saccharase	5,5	50	55
		R-Enzym	5,3	40	nicht bei 70
* entsprechend dem Substrat:					
	Laminarin	pH 4,6			
	Carboxymethylcellulose	pH 5,5			
** Esterase-Aktivität					
	Carboxypeptidase-Aktivität	pH 4,6 - 4,9			

1 Narziss, L.: Die Bierbrauerei, Band II, Die Technologie der Würzebereitung. Stuttgart: Enke, 1985

Darauf aufbauende Untersuchungen sollten deshalb Aufschluß darüber geben, inwieweit durch den gleichzeitigen Einsatz verschiedener Enzyme tatsächlich eine Veränderung des Toxinspektrums hervorgerufen werden kann. Da jedoch die vom Hersteller angegebenen pH-Wert- und Temperaturoptima der o. g. Enzyme (vgl. 3.1.1.5) meist nicht mit den entsprechenden Bedingungen in der Maische übereinstimmen, wurde für weitere Versuche auf spezielle technische Enzyme für die Würzebereitung zurückgegriffen. Um bei diesen Testreihen die Wirkung der im Malz bereits vorhandenen Enzyme weitgehend vernachlässigen zu können, wurde ein mit Deoxynivalenol belasteter unvermälzter Weizen (11,7 ppm DON) zur Verarbeitung nach dem modifizierten Kongreßmaisverfahren (2.2.3) eingesetzt.

Folgende Enzymprodukte wurden getestet:

- AMG 300 L: exo-1,4- α -D-Glucosidase (Glucoamylase), isoliert aus *Aspergillus niger*.
- Neutrase 0.5 L: endo-Protease, isoliert aus *Bacillus amyloliquefaciens*, kann nach Herstellerangaben geringe Mengen an β -Glucanasen enthalten, ist jedoch frei von jeglicher α -Amylase-Aktivität.
- Ultraflo L: hitzestabile, multiaktive β -Glucanase, isoliert aus *Humicola insolens*. Die wichtigsten Nebenaktivitäten sind Zellulase, Xylanase, Pentosanase und Arabanase.
- Ceremix 2X L: Gemisch aus α -Amylase, β -Glucanase und Protease, isoliert aus *Bacillus subtilis*.

Die Enzympräparate wurden den Maischen unmittelbar nach dem gemahlene Weizen zugegeben. Die jeweilige Menge wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen für 50 g Brausubstanz wie folgt berechnet: AMG 300 L: 146 μ l, Neutrase 0.5 L: 60 μ l, Ultraflo L: 8,3 μ l, Ceremix 2X L: 60 μ l.

Aus Abbildung 10 geht hervor, daß unmittelbar nach dem Einmaischen die gemessenen Konzentrationen 58–71 % des berechneten Ausgangswertes betragen. Nach einer 30minütigen Rast bei 45 °C konnte bei allen Testreihen eine Erhöhung des DON-Gehaltes beobachtet werden. Dabei zeigte sich je nach Einsatz des verwendeten Enzyms folgende Tendenz: die deutlichste Toxinzunahme ergab sich mit Ceremix 2X L, gefolgt von Ultraflo L, AMG 300 L und Neutrase 0.5 L. Den niedrigsten Wert ergab die Vergleichsprobe ohne Enzymzusatz. Bemerkenswert ist, daß nur mit Ceremix der aus der Rohwarenanalyse berechnete Wert von 1,95 ppm bestätigt werden konnte.

Mit Erhöhung der Temperatur auf 70 °C reduzierten sich die Konzentrationen wieder, im Falle von AMG- und Nullprobe sogar unter den gemessenen Ausgangswert. Die 60minütige Rast bei 70 °C bewirkte bei diesen beiden Maischen einen abermaligen Anstieg der Konzentrationen um 94 ppb bzw. 63 ppb, bei Ceremix-, Ultraflo- und Neutrasemaische eine weitere Abnahme um 29 ppb, 214 ppb und 213 ppb.

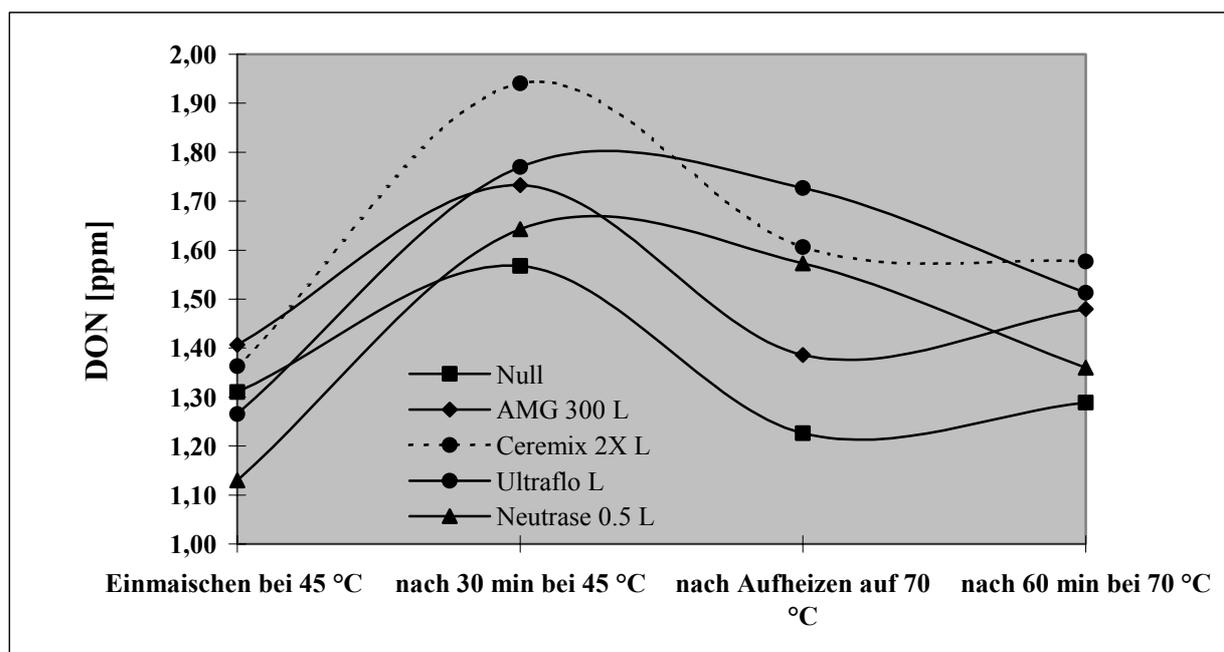


Abbildung 10: Vergleich verschiedener technischer Enzyme beim Maischen von belastetem Weizen

Sowohl die beobachteten Toxinerhöhungen bis zum Ende der 45 °C-Rast als auch die Tatsache, daß die Enzympräparate Ceremix 2X L und Ultraflo L β -Glucanase enthielten, liessen einen Zusammenhang zwischen β -Glucan und meßbarem Deoxynivalenol vermuten. Diese Annahme wird zusätzlich durch Literaturangaben gestützt, wonach der Gehalt an β -Glucan beim Maischen eines normal gelösten Malzes wie in Abbildung 11 bilanziert werden kann. Ein Vergleich des Abbaus von β -Glucan bei 45 °C mit dem Anstieg der DON-Konzentration bei 45 °C aus Abbildung 10, erbringt einen fast identischen Kurvenverlauf. Es schien deshalb naheliegend, daß mit dem Abbau von β -Glucan zu Glucose zeitgleich DON freigesetzt und damit meßbar wird.

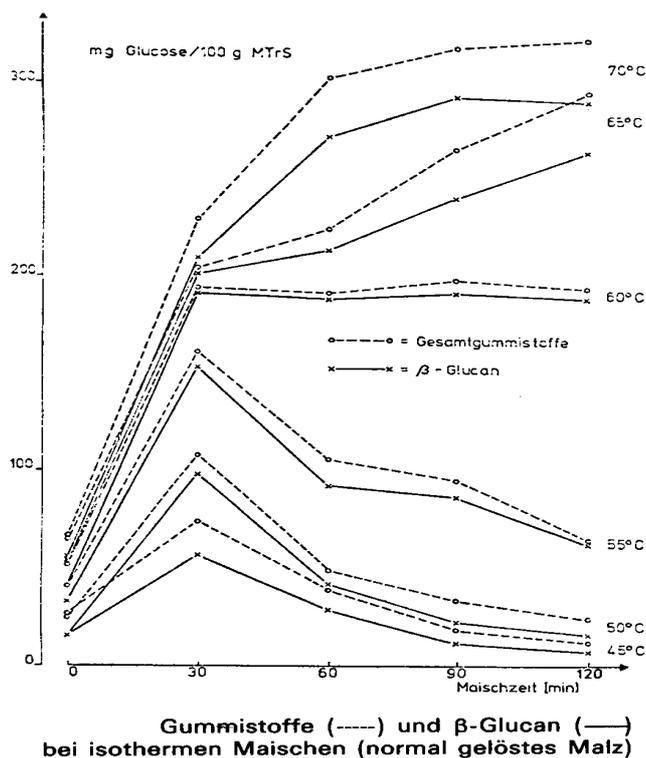


Abbildung 11: Abbau von Gummistoffen und β-Glucanen bei isothermen Maischen nach NARZISS [1]

3.1.1.9 Nachweis von Deoxynivalenol in β-Glucanlösung

Zur Darstellung des direkten Zusammenhanges zwischen den beiden unter 3.1.1.8 beschriebenen stofflichen Umsetzungen wurde DON-Reinsubstanz einer β-Glucanlösung zugesetzt und bei 45 °C inkubiert (Wirkungsoptimum der β-Glucanase). Die Berechnung der eingesetzten β-Glucanmenge von 0,6 g in 30 ml bidest. Wasser erfolgte anhand einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. Sacher über durchschnittliche β-Glucanwerte in Malzen [2]. Die β-Glucanlösung wurde durch kurzes Aufkochen homogenisiert und anschließend auf 45 °C abgekühlt. Die Zugabe von 75,75 µg DON (entsprechend 2,525 ppm) erfolgte unmittelbar vor dem Einmaischen.

Wie Abbildung 12 demonstriert, wird DON bereits bei Maischbeginn (0 min) von β-Glucan maskiert, wodurch es mit den verwendeten Extraktions- und Nachweisverfahren nicht mehr quantitativ detektiert werden kann. Ca. 66 % der Reinsubstanz waren nicht mehr nachzuweisen. Selbst nach 30minütiger Rast bei 45 °C konnten keine wesentlichen Änderungen

1 Narziss, L.: Die Bierbrauerei, Band II, Die Technologie der Würzebereitung. Stuttgart: Enke, 1985, S. 139

2 Sacher, B.: Persönliche Mitteilung. Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München

festgestellt werden. In einem Parallelansatz wurde hingegen bei Inkubation mit Ceremix 2X L die eingesetzte DON-Menge mit 99,1 % nahezu quantitativ wiedergefunden.

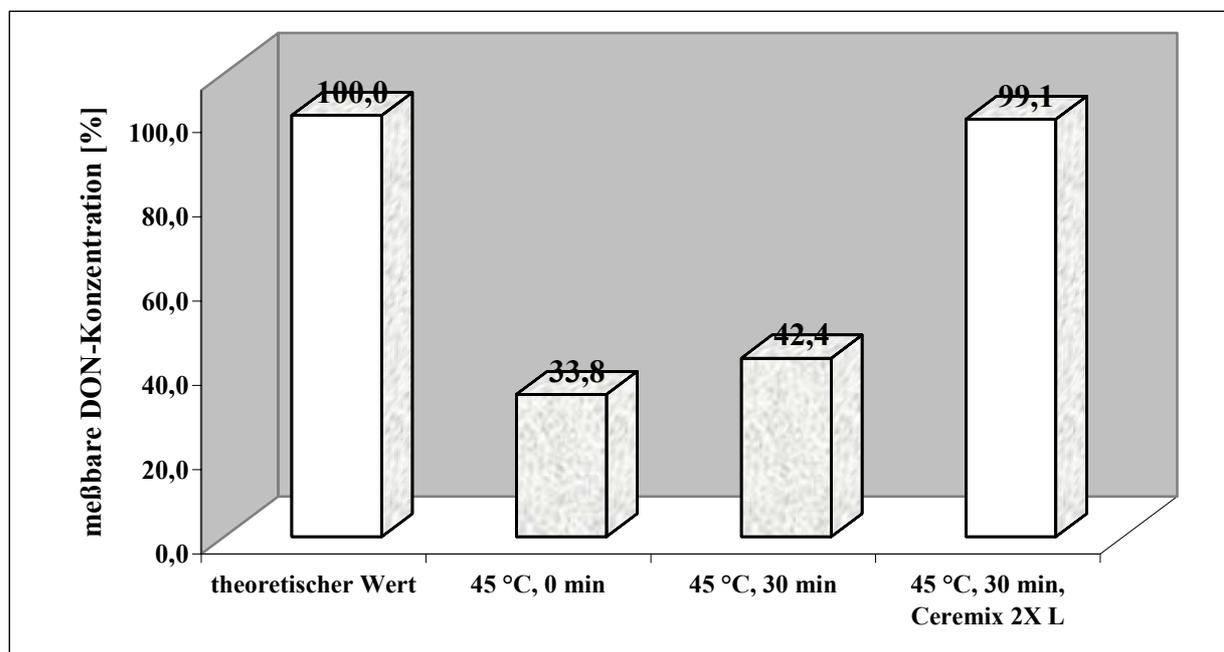
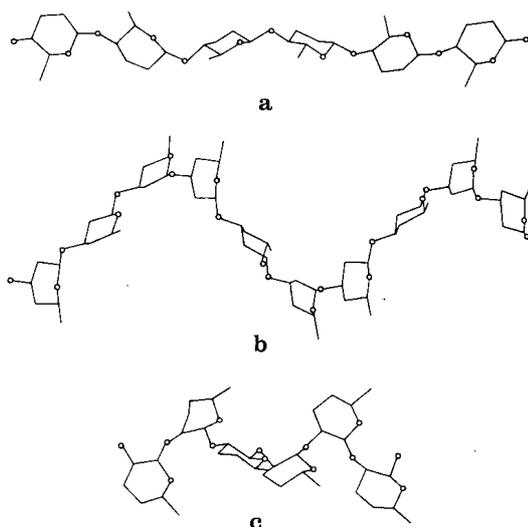


Abbildung 12: DON-Bestimmung in β -Glucanlösung mit/ohne Enzymzusatz

Anhand der Konzentrationsverläufe ist eine Adsorption durch physikalische Bindungen von Deoxynivalenol an β -Glucan sehr wahrscheinlich. Insbesondere die Geschwindigkeit, mit der DON maskiert wird, spricht für diese Theorie. Dabei erscheint eine Bindung durch Wasserstoffbrückenbindungen an Seitenketten des β -Glucan am wahrscheinlichsten.

Aus der Formel (vgl. Abbildung 13) ist zu ersehen, daß die gestreckte Konformation der Kette aus der Zick-Zack-Geometrie der von den Monomeren ausgehenden Bindungen zu den Sauerstoffbrücken folgt. Dabei kann die Kette etwas gestaucht sein, so daß H-Brücken zwischen HO-Gruppen benachbarter Reste möglich werden, die zur Stabilität beitragen [1]. Betrachtet man die chemische Struktur von DON, so werden auch hier die Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen anhand der HO-Gruppen deutlich (vgl. Abbildung 14). Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus könnte dann auch beim Vorhandensein weiterer Trichothecene in Getreide zutreffen.

1 Belitz, H. D.; Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin: Springer, 1992, S. 265



Konformation einiger β -D-Glucane. Bindung: **a** 1 \rightarrow 4, **b** 1 \rightarrow 3, **c** 1 \rightarrow 2. (Nach Rees, 1977)

Abbildung 13: Konformation von β -D-Glucanen [1]

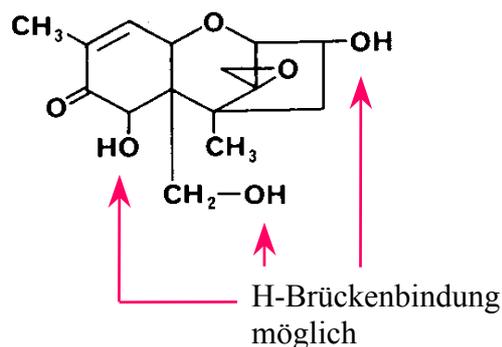


Abbildung 14: Möglichkeiten für H-Brückenbindungen bei DON

Ähnliche Untersuchungen zur Bindung von DON an Arabinoxylan (Pentosan) mit Mengen von 0,3 g und 0,6 g in 40 ml bidest. Wasser scheiterten insofern, als Deoxynivalenol zwar maskiert wurde und folglich auch nicht mehr quantitativ detektierbar war. Allerdings konnte das Toxin weder durch Inkubation mit 1,4- β -D-Xylanase noch mit Beerzym PENTA wieder freigesetzt werden. Beerzym PENTA ist dabei ein technisches Enzymgemisch, isoliert aus speziell selektierten Stämmen von *Penicillium* und *Trichoderma*, mit den Hauptenzymaktivitäten einer thermostabilen β -Glucanase und verschiedener Hemicellulasen. Die Wiederfindungen lagen bei ca. 10 % für die Proben nach dem Einmischen und nach 30 min

1 Belitz, H. D.; Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin: Springer, 1992, S. 265

Maischen bei 45 °C ohne Enzym sowie bei ca. 17 % für die Proben nach 30 min Maischen mit 1,4-β-D-Xylanase bzw. PENTA.

3.1.1.10 Einfluß der Oberfläche von Malzschrot auf die Nachweisbarkeit von Deoxynivalenol

Nachdem festgestellt wurde, daß die Bindung von DON an β-Glucan höchstwahrscheinlich auf einer Adsorptionsreaktion basiert, wurde überprüft, inwiefern die Größe der Oberfläche von Malzschrot Einfluß auf den meßbaren DON-Gehalt in der Maische nehmen kann. Dazu wurde ein natürlich infiziertes Weizenmalzmuster (2,98 ppm) unterschiedlich fein/grob mit einer Analysenmühle bei den Einstellungen 1, 5, 9 (abnehmende Feinheit; < 1,25 mm) gemahlen sowie praxisgerecht mit einer Zweiwalzenmühle (Walzenabstand 1,25 mm) geschrotet. Die Maischarbeit erfolgte wiederum anhand des modifizierten Kongreßmaisverfahrens (vgl. 2.2.3).

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, verringerte sich mit zunehmender Feinheit des Schrottes die meßbare DON-Konzentration nach 30 min bei 45 °C. Mit zunehmend feinerer Struktur des Schrottes vergrößert sich dessen Oberfläche und somit die Anzahl möglicher Bindungspartner für adsorptive Reaktionen. Der Widerspruch, daß in größerem Schrot β-Glucan für den Abbau durch β-Glucanasen schlechter zugänglich sein und daraus eine geringere Freisetzung von Deoxynivalenol resultieren müßte, könnte mit einem besseren Schutz der Enzyme in dickeren Maischen (vgl. High Gravity- Maischen) begründet werden.

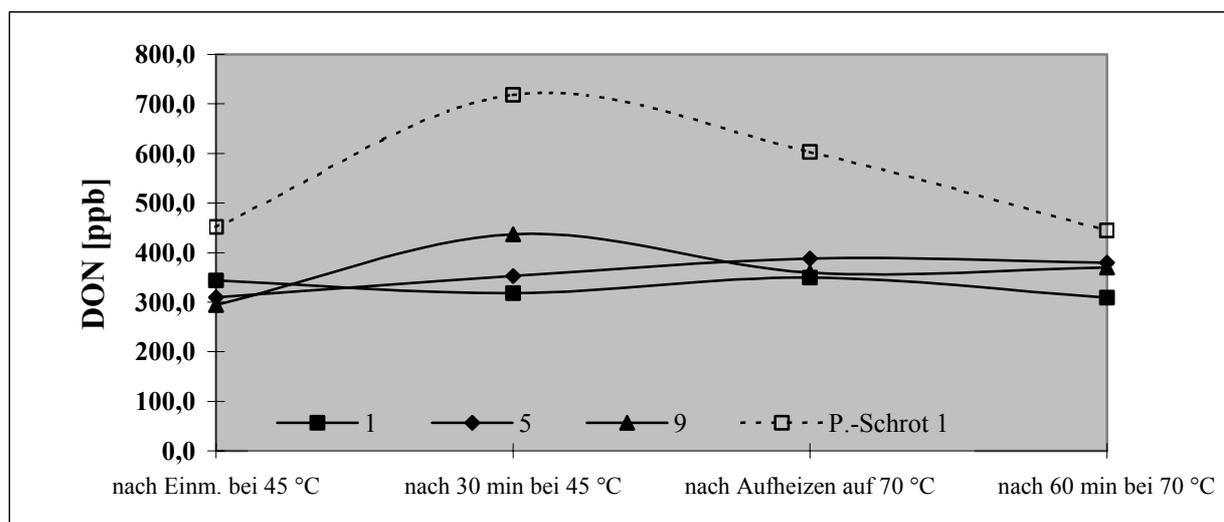


Abbildung 15: Vergleich verschiedener Schrotgrößen eines Malzes beim Maischen

3.1.2 Verhalten von Deoxynivalenol während der Gärung

Sowohl zum Verlauf einer Deoxynivalenolkonzentration während der Vergärung von Würze als auch zum Einfluß von DON auf das Hefewachstum während der Gärung gibt es bisher nur sehr wenige Arbeiten [1,2,3,4,5,6,7]. Über mögliche Veränderungen der Verläufe von verwertbaren Zuckern und Aminosäuren in Würze bei Vergärung in Gegenwart von DON konnten keinerlei Daten recherchiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb zum einen, festzustellen, ob bzw. inwiefern sich die Meßbarkeit von Deoxynivalenol von der Anstellwürze bis hin zum fertigen Bier ändert. Zum anderen sollte der Einfluß auf die Hefe während der Gärung und eine mögliche Verschleppung des Toxins durch Weiterführen einer Hefe untersucht werden.

3.1.2.1 Vergleich des Konzentrationsverlaufes von Deoxynivalenol bei Vergärung künstlich kontaminierter sowie natürlich belasteter Würze

Zu Beginn der Versuchsreihen wurde getestet, ob Ergebnisse zum Konzentrationsverlauf von DON aus Gärversuchen mit künstlich kontaminierter Würze vergleichbar sind mit Ergebnissen aus Untersuchungen an natürlich kontaminierten Würzen. Dazu wurde toxinfreie Anstellwürze mit DON-Reinsubstanz kontaminiert (560 ng/ml) und mit untergäriger Hefe bei 7 °C vergoren. Wie in Abbildung 16 zu sehen, konnten noch 496 ppb detektiert werden, was einer Wiederfindung von 89 % entspricht. Nach vier Stunden waren weniger als 50 % der eingesetzten DON-Menge detektierbar. In der 8., 12., 16. und 24. Gärstunde konnten 72 %, 51 %, 68 % und 75 % der Ausgangsmenge nachgewiesen werden. Zu Gärende waren lediglich noch ca. 280 ppb bestimmbar.

Parallele Versuche wurden mit natürlich belasteten Würzen aus 3.1.1.7 durchgeführt, die 60 min gekocht wurden. Auch hier konnten deutliche Konzentrationsveränderungen während der ersten 24 Gärstunden beobachtet werden. Bei drei der vier Würzen kam es innerhalb der ersten vier Stunden zu einem Konzentrationsanstieg während nur eine entsprechend der gespikten

1 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

2 Schwarz, P. B. ; Casper, H. H.; Beattie, S.: – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

3 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: – In: Mycotoxin Research, Vol. 8 (1992) Nr. 2, S. 58-66

4 Niessen, L. M.: Diss., Technische Universität München, 1993, S. 148-153

5 Boeira, L. S.; Bryce, J. H.; Stewart, G. G.; Flannigan, B.: – In: J. Inst. Brew., Vol. 105 (1999) Nr. 6, S. 376-381

6 Böswald, C.; Engelhardt, G.; Vogel, H.; Wallnöfer, P. R.: – In: Natural Toxins 3 (1995), S. 138-144

7 Whitehead, M. P. ; Flannigan, B.: – In: J. Inst. Brew., Vol. 95 (1989), S. 411-413

Würze mit einem erniedrigten Wert gemessen wurde. Bei allen vier Würzen konnten innerhalb der ersten 24 Stunden höhere DON-Konzentrationen gefunden werden als die entsprechenden Werte der Anstellwürzen waren. Dabei kam es zu maximalen Zunahmen um 227 % (Würze 1), 28 % (Würze 2), 563 % (Würze 3) und 543 % (Würze 4).

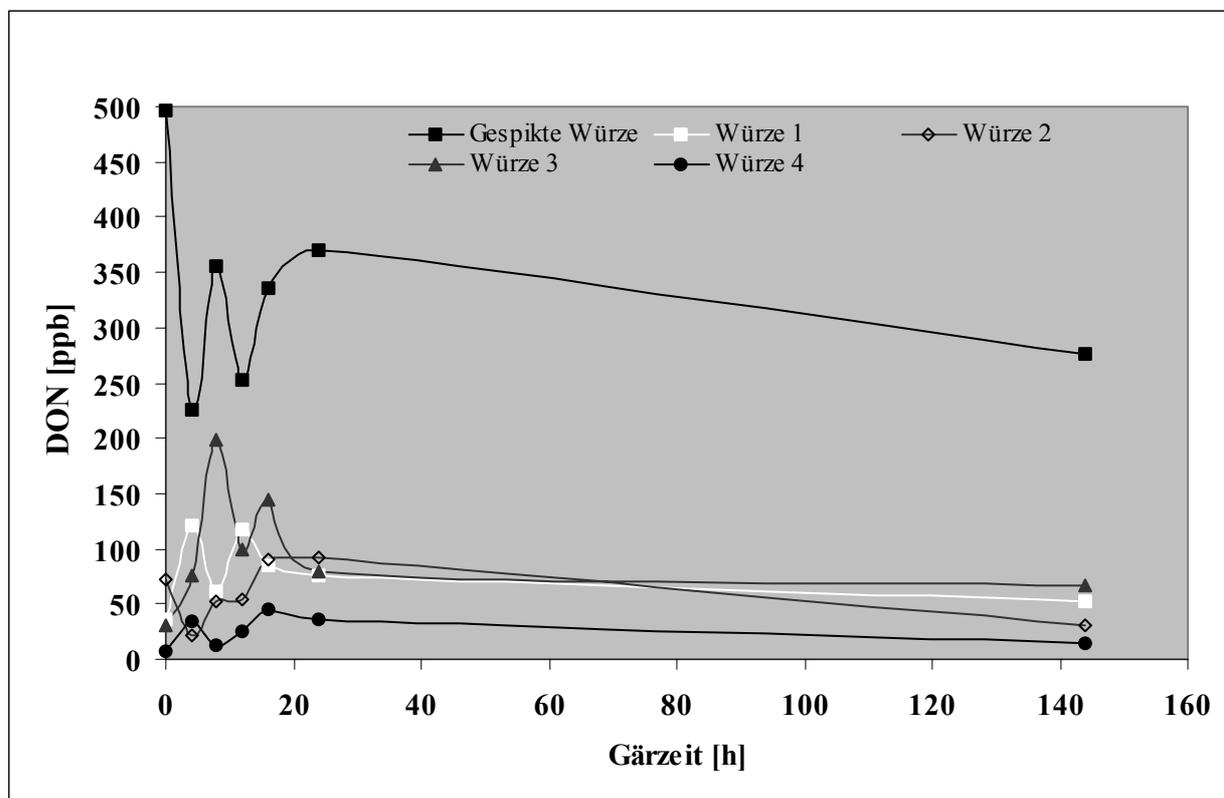


Abbildung 16: Verlauf der DON-Konzentration bei Vergärung einer künstlich (gespikte Würze) und vier natürlich (durch kontaminiertes Malz) DON-belasteter Würzen (1 – 4)

Aufgrund des Ergebnisses ist nachträglich kontaminierte Würze für praxisgerechte Untersuchungen nicht geeignet.

3.1.2.2 Gärversuche mit unter- und obergärigen Hefen und verschiedenen Gärverfahren in natürlich kontaminierter Würze

Mit der unter 3.1.1.4 hergestellten Würze ($p = 12,6 \%$) wurden erste Gärversuche im 5 l-Maßstab durchgeführt [1]. Dabei wurden sowohl unter- (St. 34/70) und obergärige (St. 68, 177) Hefen als auch verschiedene Gärverfahren getestet. Besonders auffallend war auch hier, daß bei den einzelnen Gärversuchen in den ersten Stunden eine Zunahme der DON-Konzentration, mit Hefestamm 34/70 bei einer maximalen Gärtemperatur von $14 \text{ }^\circ\text{C}$ sogar bis um 411% , gemessen wurde (Anfangskonzentration 178 ppb). Diese Spitzenwerte reduzierten sich jedoch im Verlauf der Hauptgärung wieder, so daß die Konzentrationen in allen Jungbieren auf dem Niveau der Anstellwürze oder darunter lagen.

Ein Vergleich der Gärungen mit Hefestamm 34/70 zeigt, daß die Konzentrationsverläufe für Deoxynivalenol bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$, $14 \text{ }^\circ\text{C}$ und Rührgärung bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ sehr ähnlich waren. Ausgehend von der $10 \text{ }^\circ\text{C}$ -Gärung erbrachte die $14 \text{ }^\circ\text{C}$ -Gärung einen höheren Spitzenwert ($+ 220 \text{ ppb}$) und verlief gegen Ende, ab der 84. Stunde etwas schleppend, wobei es zu einer nochmaligen DON-Zunahme kam. Bei der Rührgärung wurde dagegen ein sehr viel niedrigerer Spitzenwert von 390 ppb gemessen. Im weiteren Verlauf wurden keine größeren Schwankungen festgestellt; erst zwischen der 54. und 68. Stunde fiel die Konzentration nochmals erheblich von 218 ppb auf 75 ppb ab. Einen außergewöhnlichen Verlauf zeigte die Vergärung mit $1,6 \text{ bar}$ Überdruck bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$, da hier der höchste Wert von 332 ppb erst zwischen der 60. und der 72. Gärstunde ermittelt wurde, woraufhin bis zur 91. Stunde ein Absinken der Kurve auf 14 ppb zu verzeichnen war.

Die nicht forcierten Gärungen mit den Stämmen 68 und 177 erbrachten sehr ähnliche Ergebnisse wie für den Stamm 34/70 beschrieben, jedoch fiel auf, daß die Höchstwertpeaks erst um die 24. Gärstunde auftraten. Die Rührgärungen zeigten mit Hefestamm 68 einige Schwankungen, mit Stamm 177 dagegen nach dem anfänglichen Höchstwertpeak einen linearen Verlauf.

Bezüglich des Extraktabbaus verliefen die einzelnen Gärungen normal, wenngleich mit Hefestamm 34/70 bei einer maximalen Gärtemperatur von $14 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen Ende etwas schleppend (vgl. Abb. im Anhang).

Ein Einschleppen von Deoxynivalenol durch die zugegebene Hefe konnte ausgeschlossen werden. Auch konnten weder Nivalenol noch 3- oder 15-Acetyldeoxynivalenol detektiert werden.

1 Zwicklbauer, T.: Diplomarbeit, Technische Universität München, 1997

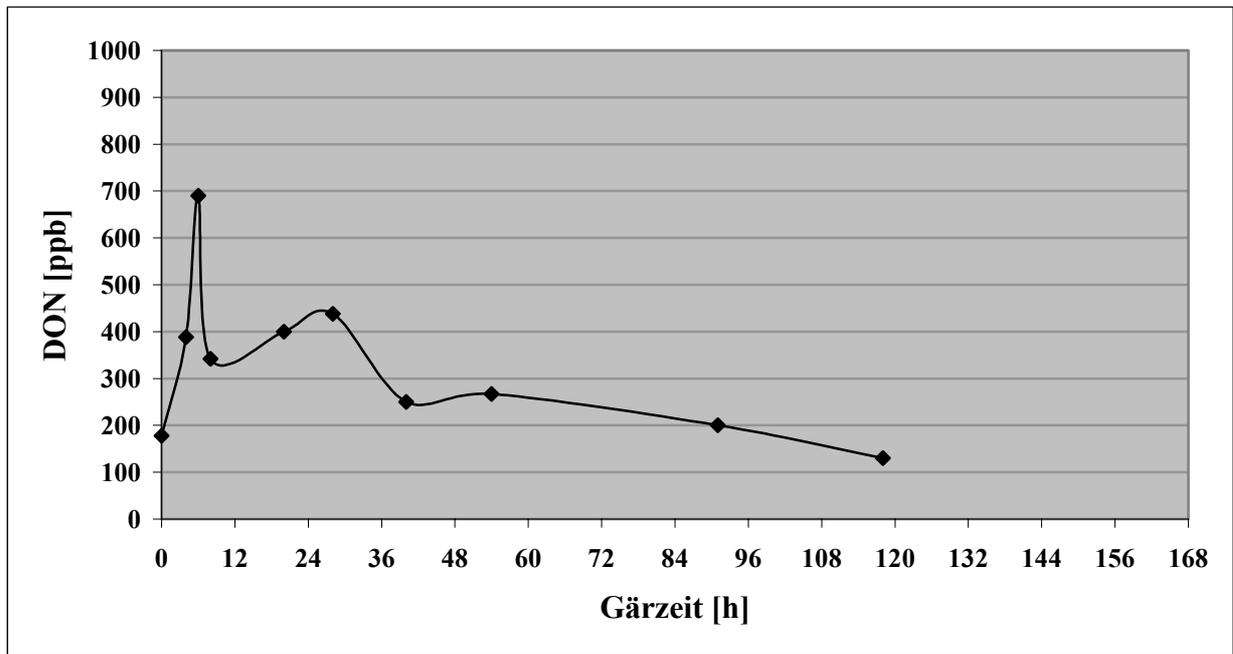


Abbildung 17: DON-Verlauf mit Hefestamm 34/70; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 10 °C

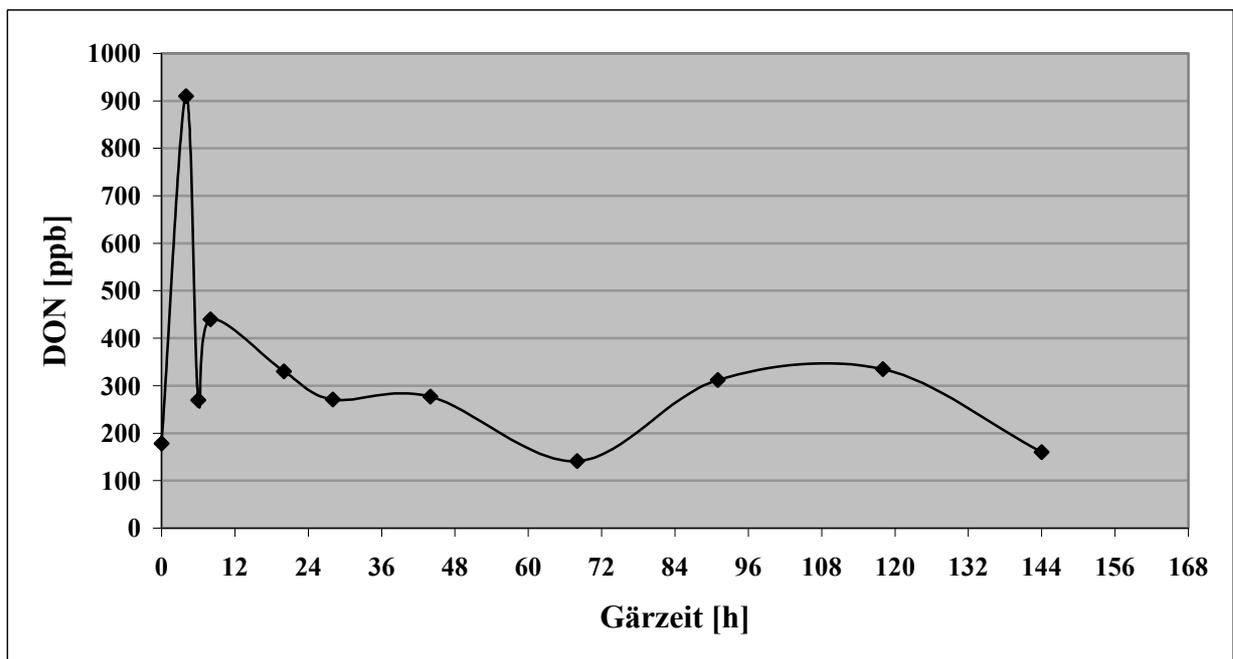


Abbildung 18: DON-Verlauf mit Hefestamm 34/70; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 14 °C

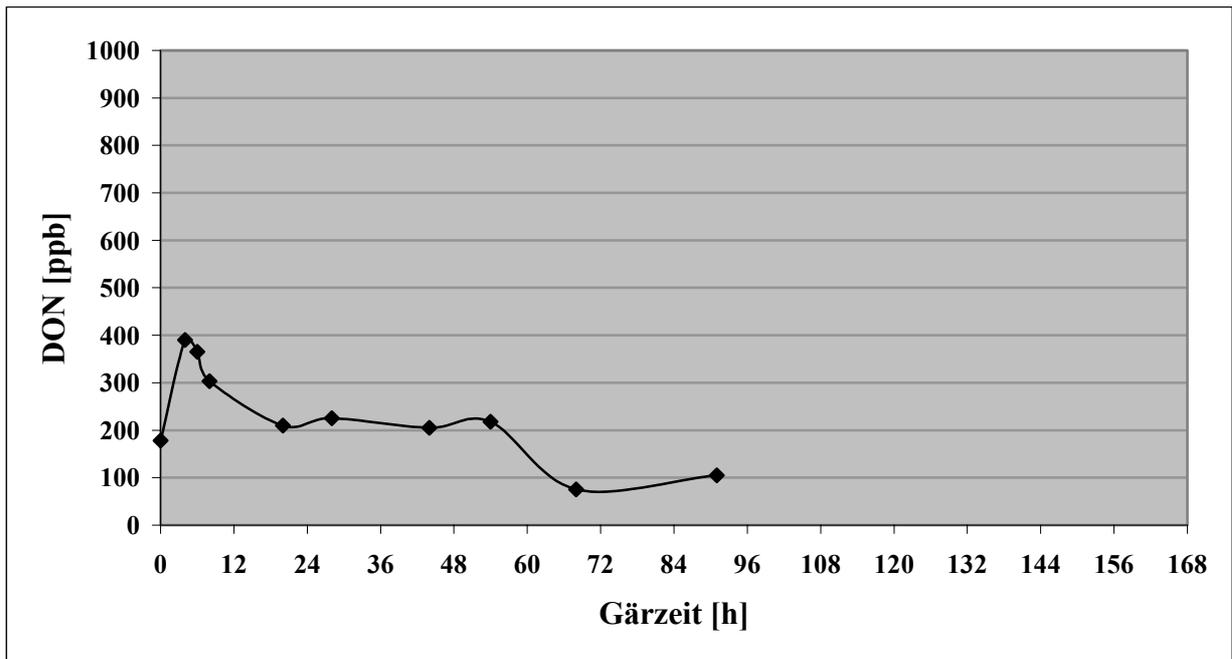


Abbildung 19: DON-Verlauf mit Hefestamm 34/70; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 15 °C, Rührgärung

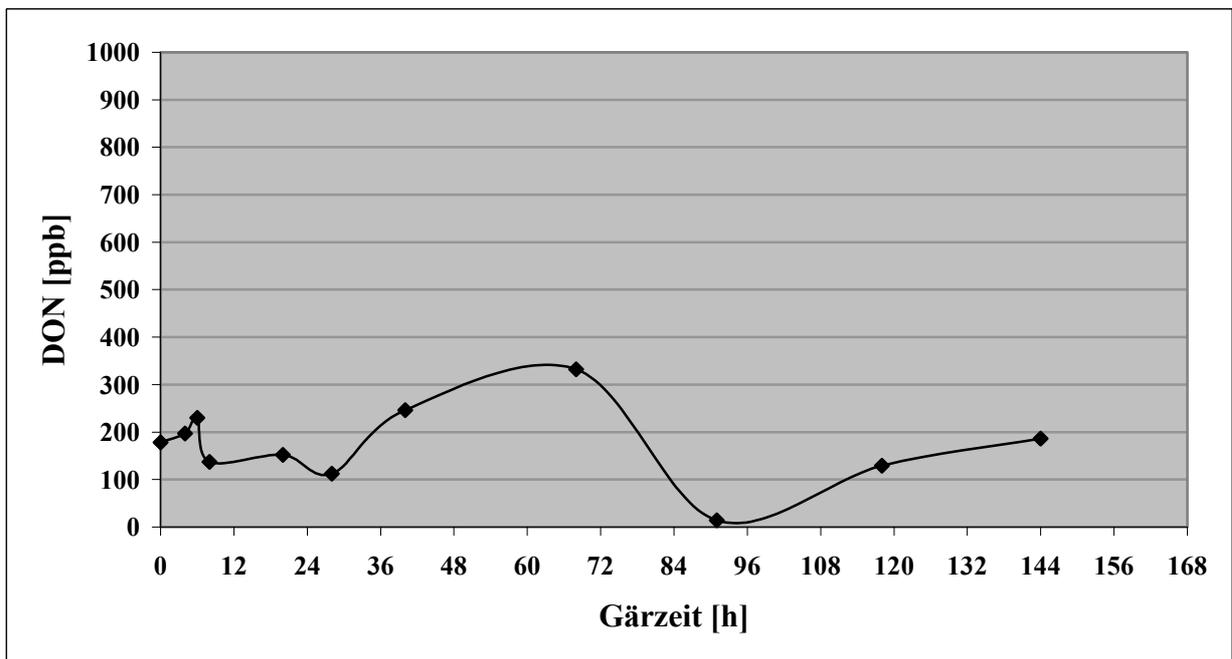


Abbildung 20: DON-Verlauf mit Hefestamm 34/70; Anstellhefemenge 25 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 22 °C, Druckgärung bei 1,6 bar Überdruck

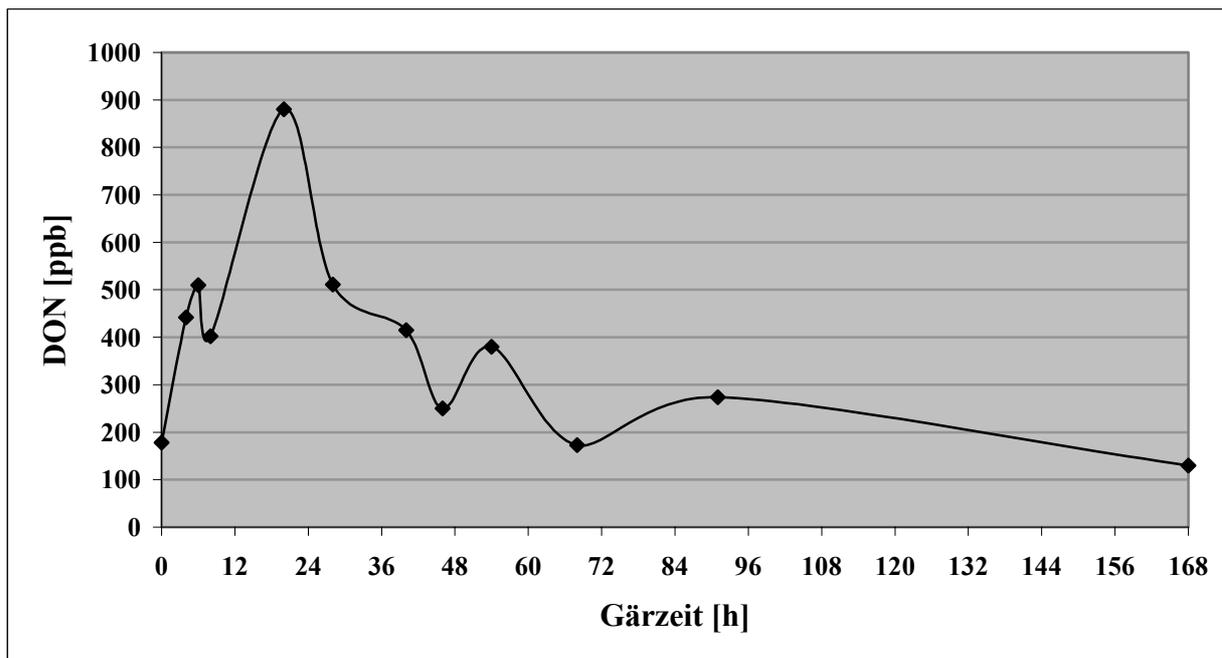


Abbildung 21: DON-Verlauf mit Hefestamm 68; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 20 °C

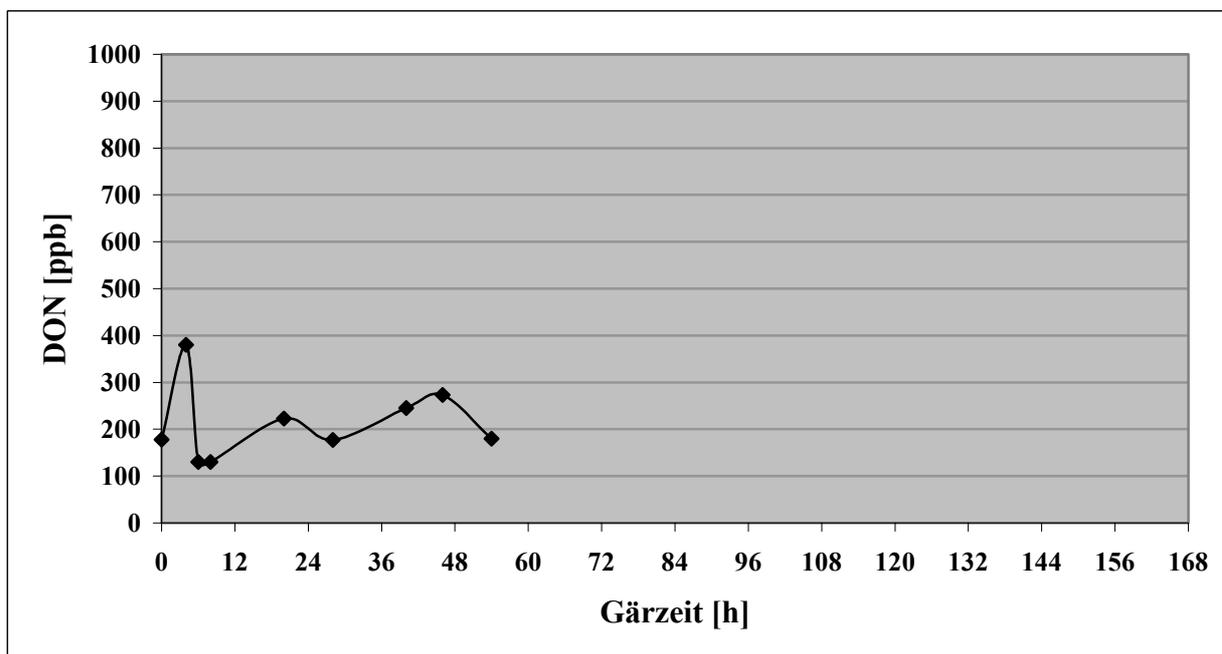


Abbildung 22: DON-Verlauf mit Hefestamm 68; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 20 °C, Rührgärung

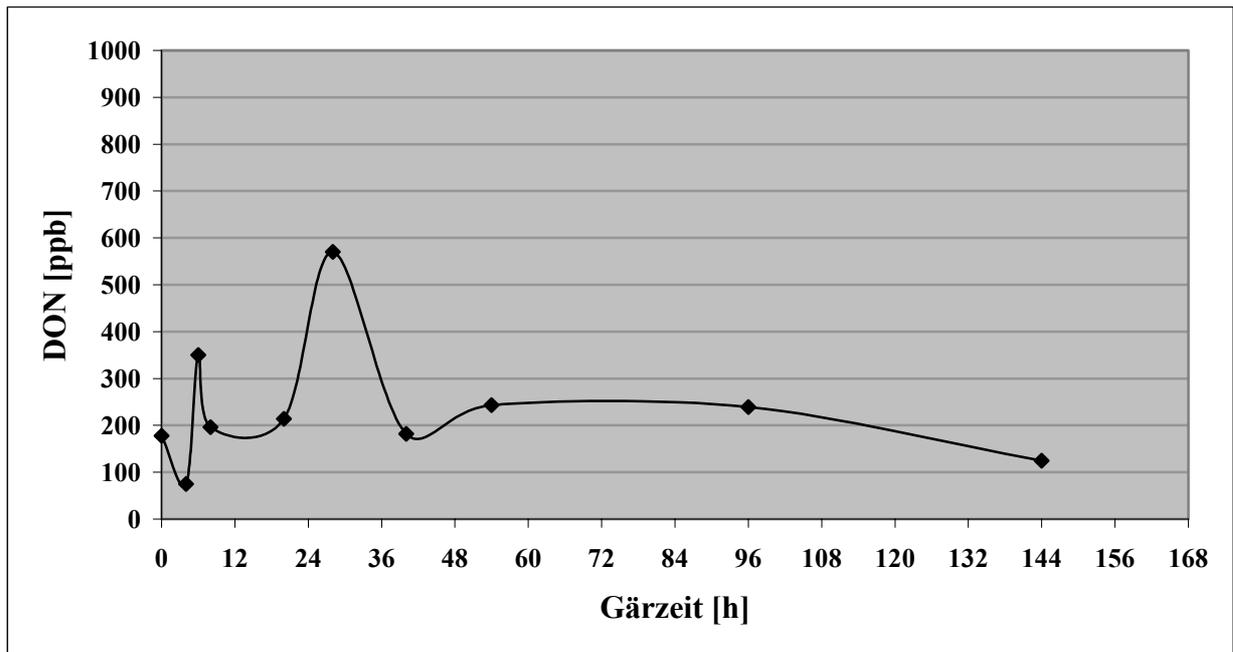


Abbildung 23: DON-Verlauf mit Hefestamm 177; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 25 °C

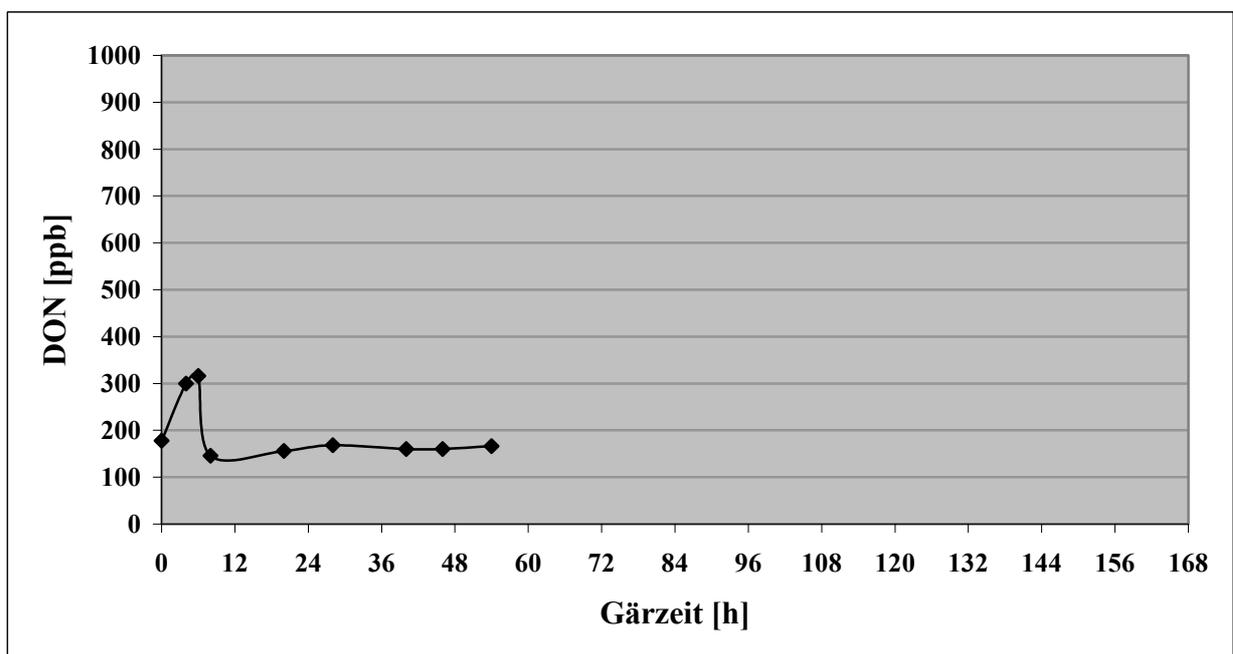


Abbildung 24: DON-Verlauf mit Hefestamm 177; Anstellhefemenge 10 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 25 °C, Rührgärung

3.1.2.3 Verschleppung von Deoxynivalenol durch Weiterführung von kontaminierter Hefe

Vor allem in mittelständischen und kleineren Brauereien ohne eigene Hefepropagationsanlage ist es immer noch üblich, eine Hefe mehrmals zu führen. Wie aus den unter 3.1.2.1 und 3.1.2.2 beschriebenen Untersuchungen hervor geht, können Hefen auf die DON-Konzentration einer belasteten Würze Einfluß nehmen. Aus diesem Grund sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob es durch Weiterführung einer Hefe, die bereits zur Vergärung von kontaminierter Würze eingesetzt war, zu einer Verschleppung von Deoxynivalenol in eine zweite Würze kommen kann.

3.1.2.3.1 Würzeanalysen

Zunächst wurde Würze (305 ppb DON) aus kontaminiertem Weizenmalz bereitet, die anschließend mit dem obergärigen Hefestamm 68 bei 20 °C vergoren wurde [1]. Um eine zügige Gärung zu gewährleisten, wurde auf ca. 8 mg/l Sauerstoff belüftet und jeweils mit ca. 18 Mio Zellen/ml angestellt.

Der ermittelte DON-Verlauf des Gärversuches entsprach in etwa den Ergebnissen aus 3.1.2.2, jedoch war die Endkonzentration im Jungbier verhältnismäßig geringer gegenüber der Konzentration in der Anstellwürze. Abbildung 25 zeigt den Verlauf der DON-Konzentration. Hier war besonders auffallend, daß parallel zur stärksten Extraktabnahme (10.–34. Gärstunde) auch eine drastische Reduzierung von Deoxynivalenol erfolgte. Abbildung 26 zeigt anhand von Extrakt- und pH-Wert-Abnahme dieser Würze, die nach 62 Stunden einen pH-Wert von 4,11 und einen Gärkellervergärungsgrad von 81 % erreichte, einen normalen Gärverlauf. Um eine Abscheidung von Deoxynivalenol, welches eventuell an Eiweiß-Gerbstoffkolloide oder Hopfenharze gebunden sein konnte, zu vermeiden, wurden die Kräusendecken während der Gärung nicht abgehoben.

Um ein Absetzen insbesondere der obergärigen Hefe zu erreichen, wurden die zylindrokonischen Gärtanks am Ende der Gärung heruntergekühlt. So konnten jeweils 3–4 Liter dickflüssige Hefe geerntet werden, die zum Anstellen von nicht kontaminierter Würze verwendet wurde.



Abbildung 25: DON-Verlauf mit Hefestamm 68; Anstellhefemenge 18 Mio Zellen/ml, maximale Gärtemperatur 20 °C

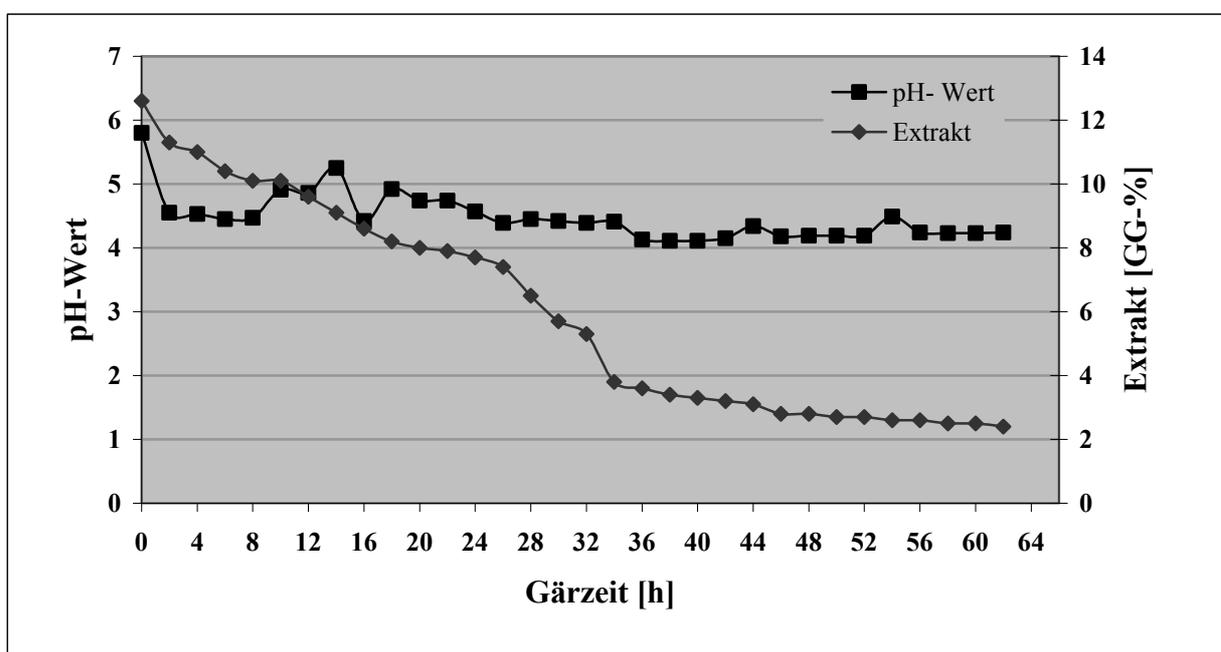


Abbildung 26: Extrakt- und pH-Wertverlauf mit Hefestamm 68 bei 20 °C, kontaminierte Würze, Reinzuchthefer

Zur Überprüfung einer Verschleppung von Deoxynivalenol durch Weiterführen von Hefe in nicht kontaminierte Würze wurden zwei Sude mit DON-freiem Malz eingebraut und zu gleichen Gärbedingungen wie oben beschrieben angestellt. Für den ersten Gärversuch wurde die

Erntehefe des „Toxinsudes“ zum Anstellen verwendet. Zum Vergleich wurde ein zweiter Gäransatz mit frischer Reinzuchtheffe durchgeführt.

In der Würze, welche mit der Erntehefe des Toxinsudes angestellt wurde, konnte im Rahmen der Nachweisgrenze zu keinem Zeitpunkt Deoxynivalenol nachgewiesen werden. Bezüglich der Gäraktivität zeigte die weitergeführte Hefe gegenüber der Reinzuchtheffe ein praktisch synchrones Gärverhalten was den Extraktabbau betrifft. Der pH-Wertabfall verlief in den nicht kontaminierten Würzen sowohl bei Vergärung mit Reinzuchtheffe als auch mit weitergeführter Hefe sehr glatt, während bei Vergärung der kontaminierten Würze erhebliche Schwankungen auftraten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen eindeutig, daß eine Verschleppung von Deoxynivalenol durch die Weiterführung von Hefe praktisch ausgeschlossen werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, daß Hefen auch durch relativ hohe Kontaminationen von Würzen mit DON in ihrer Gärleistung nicht beeinträchtigt werden.

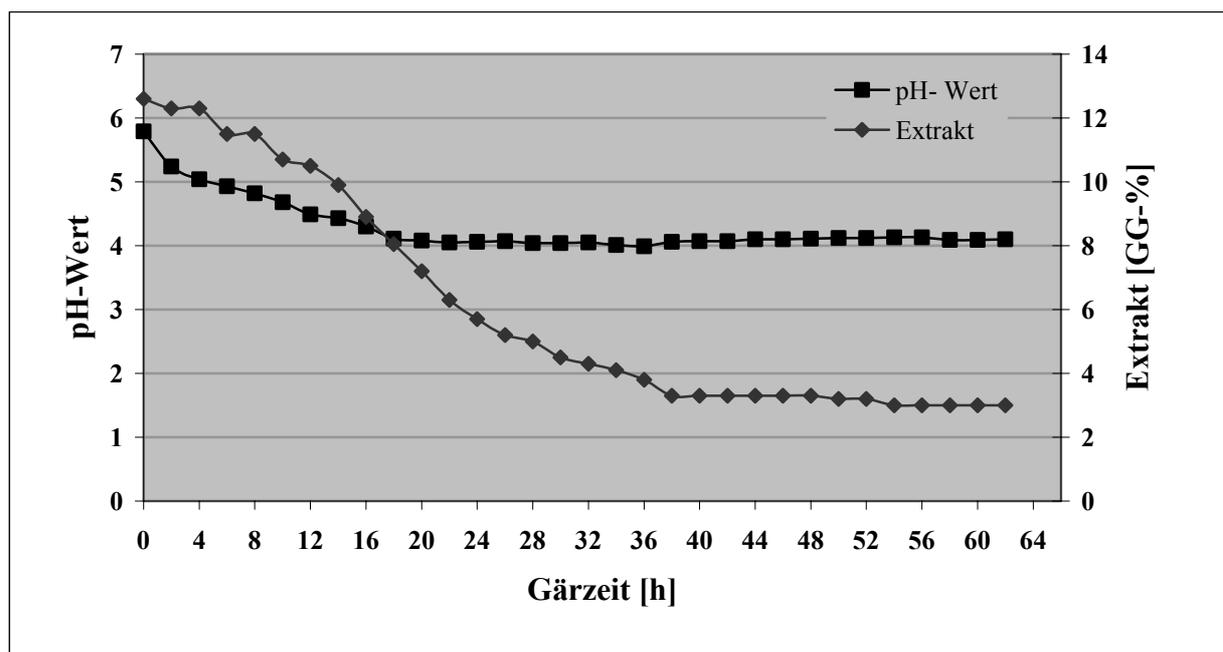


Abbildung 27: Extrakt- und pH-Wertverlauf mit Hefestamm 68 bei 20 °C, nicht kontaminierte Würze, weitergeführte Hefe

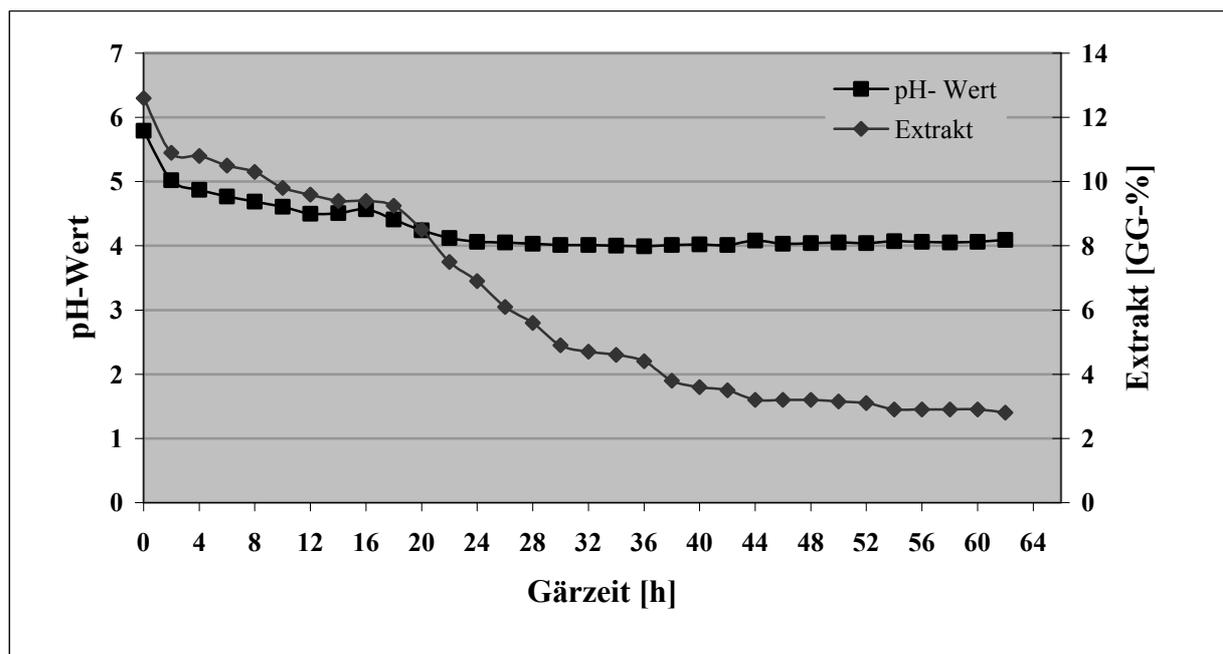


Abbildung 28: Extrakt- und pH-Wertverlauf mit Hefestamm 68 bei 20 °C, nicht kontaminierte Würze, Reinzuchthefer

3.1.2.3.2 Hefeanalysen

Wie die Analysen von belasteter Würze zeigten, erfolgte während der Gärung eine Reduktion der DON-Konzentration (vgl. 3.1.2.3.1). Es konnte deshalb angenommen werden, daß Hefen dieses Toxin, zumindest vorübergehend, aus der Würze aufnehmen. Selbst wenn man davon ausgeht, daß in der Hefezelle eine weitere Derivatisierung oder Metabolisierung zu nicht detektierbaren Substanzen stattfindet, sollte doch zumindest ein Teil des in der Würze fehlenden Deoxynivalenols im Zellinneren nachzuweisen sein.

Hierzu wurde die Hefe aus den Gärproben der kontaminierten Würze aus 3.1.2.3.1 zunächst abzentrifugiert. Das überstehende Jungbier wurde abdekantiert und die Zentrifugenröhrchen anschließend mit der Öffnung nach unten aufgestellt bis noch anhaftende Bierreste vollständig abgelaufen waren. Um auszuschließen, daß eventuell im Agglutinationsschleim der Hefen enthaltenes DON die Ergebnisse verfälscht, wurde dieser durch Aufschlännen der Hefepellets mit 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer und nochmaliges Zentrifugieren abgewaschen und zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls untersucht. Das gereinigte Pellet wurde daraufhin ein zweites Mal im gleichen Puffer gelöst und mittels French-Press bei einem Druck von 2580 psi aufgeschlossen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Zellen allein durch die hohen auftretenden Scher- oder Dehnkräfte beim Austritt aus dem

Gerät platzen und keine Lysepuffer verwendet werden, die unter Umständen die Zusammensetzung des Probenmaterials verändern könnten. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach 2.2.7.3.

Bei der Analyse der Hefe aus dem Gärversuch mit belasteter Würze konnte erstaunlicherweise in keiner der Proben Deoxynivalenol nachgewiesen werden. Auch Nivalenol und 3- bzw. 15-Acetyldeoxynivalenol wurden nicht gefunden. Die Untersuchung von Hefeproben aus Würze, die mit weitergeführter Hefe bzw. Reinzuchthefer vergoren wurde, fiel erwartungsgemäß ebenfalls negativ aus.

Auch die Untersuchung des oben beschriebenen Waschpuffers mit dem Agglutinationsschleim der Hefen erbrachte keine positiven Resultate. Da auch hier weder DON noch eines der genannten Derivate oder NIV gefunden wurden, gibt es bislang keinen Hinweis auf den Verbleib der in den Würzen nicht mehr detektierbaren DON-Mengen.

3.1.2.4 Bestimmung der verwertbaren Kohlenhydrate bei Vergärung kontaminierter und nicht kontaminierter Würze

Anhand der Gärversuche mit dem obergärigen Hefestamm 68 bei einer Gärtemperatur von 20 °C aus 3.1.2.3.1 wurde die Zusammensetzung der Zuckerspektren während verschiedener Gärstadien mittels HPLC analysiert (vgl. 2.2.10). Damit sollte einerseits geklärt werden, inwieweit sich eine Kontaminierung des Malzes mit Fusarien bzw. einer Würze mit Deoxynivalenol bei der Gärung in Bezug auf die vergärbaren Zucker auswirkt. Andererseits sollten mögliche Veränderungen im Spektrum bei Weiterführung von „kontaminierter“ Hefe untersucht werden [1].

Die einzelnen Werte (mg/100 ml) der Zuckerbestimmung beider Anstellwürzen sahen folgendermaßen aus:

Tabelle 7: Zuckerwerte von belasteter und nicht belasteter Anstellwürze

	DON-freie Würze	DON-haltige Würze
Fructose	91	196
Glucose	896	767
Saccharose	171	99
Maltose	5131	4324
Maltotriose	1213	1091
Summe	7502	6405

Beide Sude wiesen einen Stammwürzegehalt von 12,6 % auf. Da für die Herstellung beider Würzen das selbe Maischverfahren verwendet wurde, ist hier besonders auffällig, daß die Gehalte an Glucose, Maltose und Maltotriose in der kontaminierten gegenüber der unbelasteten Würze um 10–15 % niedriger waren. Während die Fructosemenge im Toxinsud mehr als doppelt so hoch war, lag die Saccharosekonzentration um fast die Hälfte niedriger. Insgesamt enthielt der Toxinsud ca. 15 % weniger vergärbare Kohlenhydrate als der Vergleichssud.

Die Vergärung von DON-freier Würze mit Reinzuchtheefe (vgl. Abbildung 29) zeigte, daß Fructose in den ersten vier Stunden leicht anstieg, um dann kontinuierlich bis zur 18. Stunde abgebaut zu werden. Glucose wurde von Beginn an verbraucht, wobei zwischen der vierten und sechsten Stunde die stärkste Abnahme zu verzeichnen war. Saccharose konnte bereits nach zwei Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Maltose als wichtigster Zucker erfuhr anfänglich eine geringe Zunahme. Anschließend wurde sie jedoch erwartungsgemäß bis zur 34. Stunde komplett verbraucht. Auffallend war allerdings, daß von der sechsten bis zur 16. Stunde der Konzentrationsabfall etwas schwächer verlief. Maltotriose blieb nach einer anfänglichen 25 %igen Abnahme mit gewissen Schwankungen bis zur 26. Stunde unverändert und wurde schließlich zusammen mit Maltose bis zur 34. Gärstunde aufgebraucht.

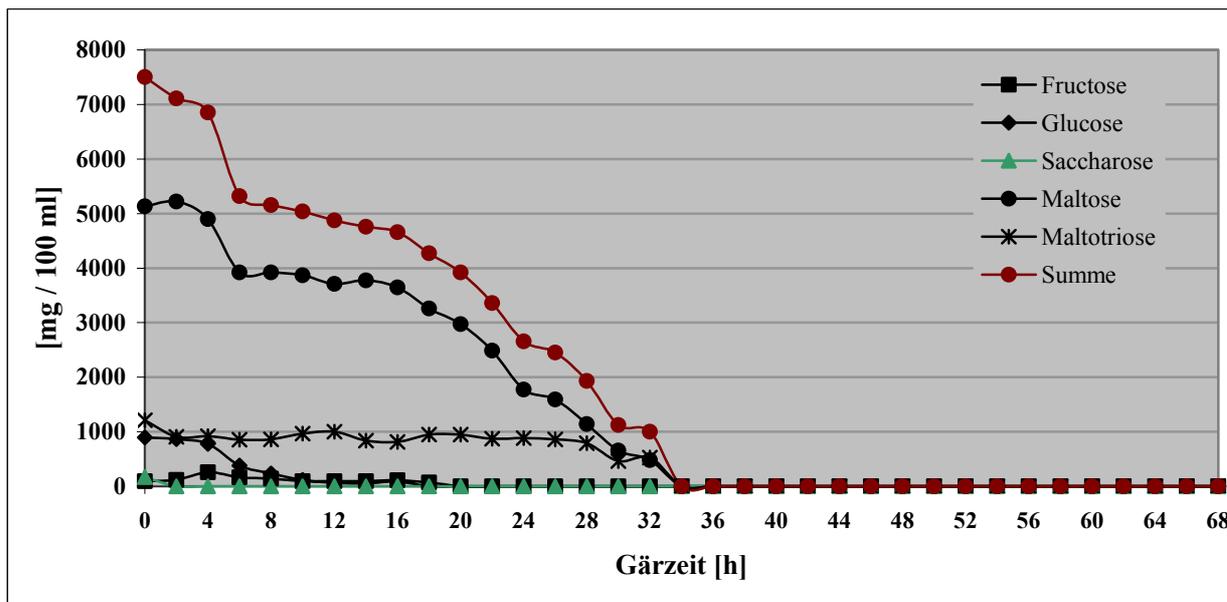


Abbildung 29: Zuckerspektrum mit Hefestamm 68 bei 20 °C, nicht kontaminierte Würze, Reinzuchtheffe

Abbildung 30 zeigt den Verlauf der vergärbaren Kohlenhydrate bei Gärung der DON-haltigen Würze. Sowohl Fructose als auch Saccharose wurden in der frühen Angärphase sofort verwertet. Bis auf einen etwas gleichmäßigeren Kurvenverlauf erfolgte die Verwertung von Glucose und Maltose ähnlich der in toxischer Würze beobachteten Abnahme. Maltotriose zeigte zu Beginn der Gärung überraschenderweise einen Anstieg. Ein Vergleich des Verlaufes der Summe der Zucker mit dem Verlauf der DON-Konzentration (vgl. Abbildung 25) von der 12. bis zur 32. Stunde läßt eine offensichtliche Parallelität erkennen.

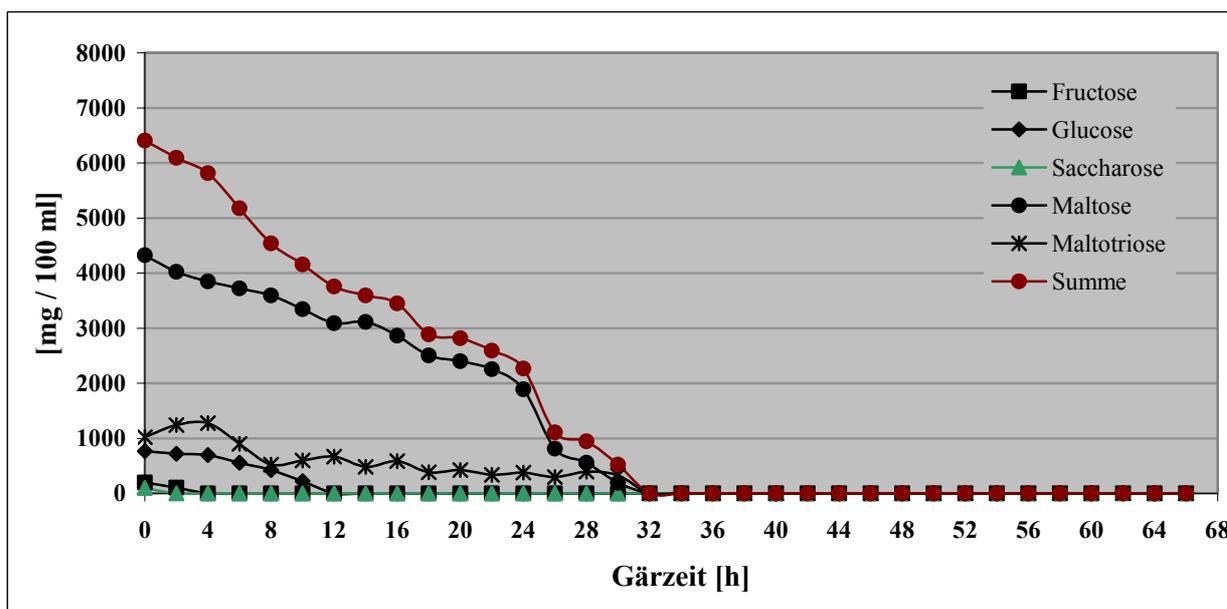


Abbildung 30: Zuckerspektrum mit Hefestamm 68 bei 20 °C, kontaminierte Würze, Reinzuchtheffe

Die Analyse des Zuckerspektrums einer nicht kontaminierten Würze, die mit weitergeführter Hefe aus der belasteten Würze vergoren wurde (vgl. Abbildung 31), erbrachte für Fructose, Glucose und Saccharose einen fast identischen Verlauf gegenüber der Vergärung mit Reinzuchtheffe (vgl. Abbildung 29). Der Abbau der Maltose war jedoch verzögert und begann erst ab der zehnten Gärstunde. Maltotriose wurde bereits ab der 16. Stunde verwertet. Die Gärung insgesamt verlief genauso schnell wie bei Vergärung mit Reinzuchtheffe.

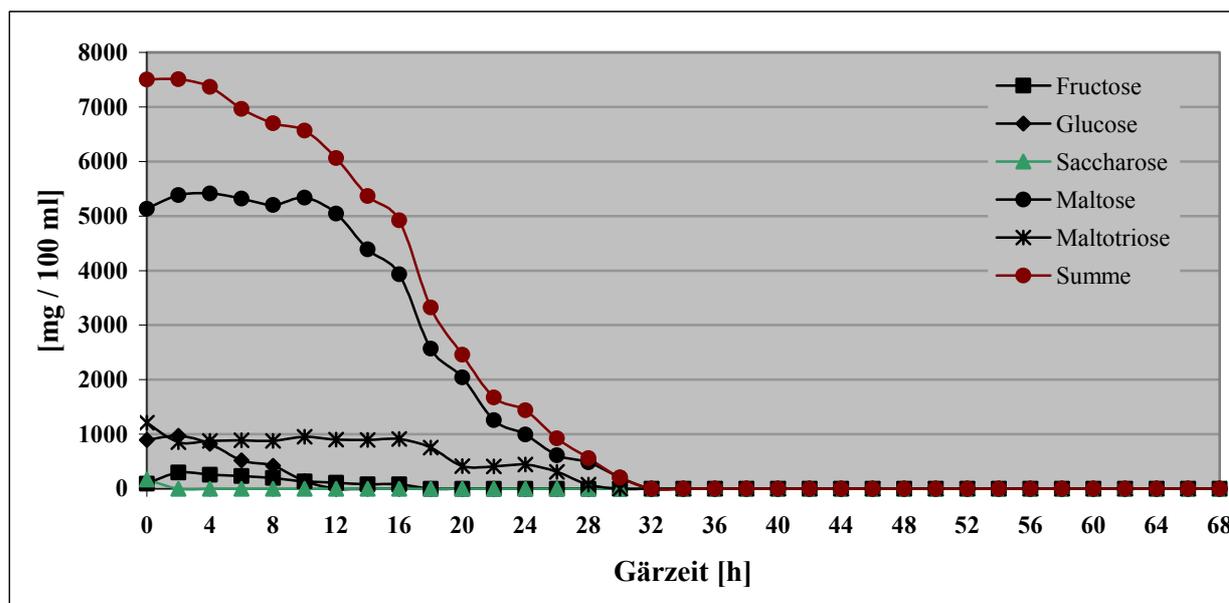


Abbildung 31: Zuckerspektrum mit Hefestamm 68 bei 20 °C, nicht kontaminierte Würze, weitergeführte Hefe

3.1.2.5 Bestimmung des Aminosäurespektrums bei Vergärung kontaminierter und nicht kontaminierter Würze

Neben einem eventuellen Einfluß von Deoxynivalenol auf das Spektrum der vergärbaren Zucker sollte auch untersucht werden, inwiefern sich das Toxin auf den Aminosäurepool in Würze und Hefe auswirkt. Hierfür wurden anhand der Gärproben aus 3.1.2.4 die Aminosäurespektren von kontaminierter und nicht kontaminierter Würze sowie den entsprechenden Hefen während verschiedener Gärstadien mittels HPLC nach 2.2.9 ermittelt [1].

Als Ergebnis wurde festgestellt, daß die Aminosäurenkonzentrationen zu Beginn der Gärung in der kontaminierten Würze gegenüber der nicht kontaminierten Würze im Mittel um den Faktor 1,7 erhöht waren (vgl. Tabelle 8). Die Ursache hierfür dürfte in einem vermehrten

1 Helmstadt, J.: Studienarbeit, Technische Universität München, 1998

Abbau von Weizenprotein durch die proteolytischen Enzyme der Fusarien während Wachstum und Vermälzung des Weizens liegen.

Tabelle 8: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von nicht DON-kontaminierter und DON-kontaminierter Anstellwürze

1	2	3	4
Aminosäure	nicht kontaminierte Würze [mg / 100 ml]	kontaminierte Würze [mg / 100 ml]	Faktor 3 / 2
Asparaginsäure	3,5	7,9	2,26
Glutaminsäure	9,0	10,1	1,12
Asparagin	7,7	10,3	1,34
Glutamin	5,2	4,9	0,94
Serin	6,3	10,8	1,71
Threonin	5,3	9,4	1,77
Methionin	2,5	3,3	1,32
Glycin	3,6	6,3	1,75
Alanin	9,2	17,7	1,92
Tyrosin	6,1	10,1	1,66
Valin	8,3	14,6	1,76
Isoleucin	5,9	9,5	1,61
Leucin	12,4	22,1	1,78
Phenylalanin	8,5	15,5	1,82
Histidin	3,2	5,3	1,66
Arginin	10,3	20,7	2,01
Lysin	5,4	7,9	1,46
γ-Aminobuttersäure	4,4	8,8	2,00
Tryptophan	5,3	8,3	1,57
Durchschnittlicher Faktor			1,70

Das selbe Verhältnis ergibt sich auch für die Jungbiere, wobei die Werte für die einzelnen Aminosäuren jedoch deutlich differieren können (vgl. Tabelle 9). Der Vergleich von Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigt beispielhaft für alle gemessenen Aminosäuren, daß der Abbau im nicht kontaminierten Sud um ca. acht Stunden schneller erfolgte. Die Analysenwerte aus den Hefeuntersuchungen sind in Tabelle 10 dargestellt. In der Erntehefe der toxischen bzw. der toxinbelasteten Würze konnten nur noch durchschnittlich 62 % bzw. 52 % der Ausgangskonzentration detektiert werden. Daraus ergibt sich eine um 12 % geringere

Aminosäuremenge in der „kontaminierten“ Hefe gegenüber der „sauberen“ Hefe. Auf die Gäraktivität hatte dies, wie oben bereits gezeigt, keine Auswirkungen.

Tabelle 9: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von nicht DON-kontaminiertem und DON-kontaminiertem Jungbier

1	2	3	4
Aminosäure	nicht kontaminierte Würze [mg / 100 ml]	kontaminierte Würze [mg / 100 ml]	Faktor 3 / 2
Asparaginsäure	1,6	1,1	0,69
Glutaminsäure	3	3,8	1,27
Asparagin	1,4	0,9	0,64
Glutamin	1,3	1	0,77
Serin	1,2	1,4	1,17
Threonin	1,2	0,5	0,42
Methionin	1,2	0,3	0,25
Glycin	1,6	2,3	1,44
Alanin	1,9	4,6	2,42
Tyrosin	1,6	4,2	2,63
Valin	1,5	2,6	1,73
Isoleucin	1,4	0,8	0,57
Leucin	1,5	4,3	2,87
Phenylalanin	1,8	2	1,11
Histidin	1,3	1,5	1,15
Arginin	2	1,9	0,95
Lysin	2,3	1,7	0,74
γ-Aminobuttersäure	1,2	10,6	8,83
Tryptophan	1,9	3,8	2,00
Durchschnittlicher Faktor			1,70

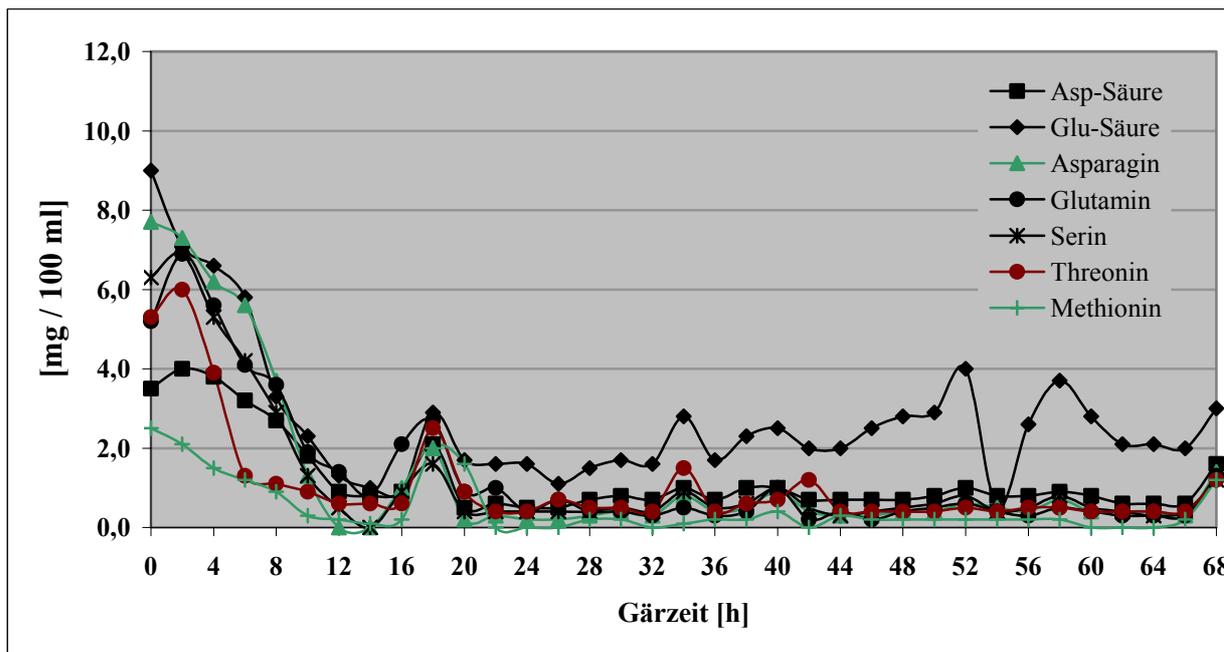


Abbildung 32: Aminosäurenverlauf bei Vergärung von nicht DON-kontaminierter Würze mit Hefestamm 68 bei 20 °C

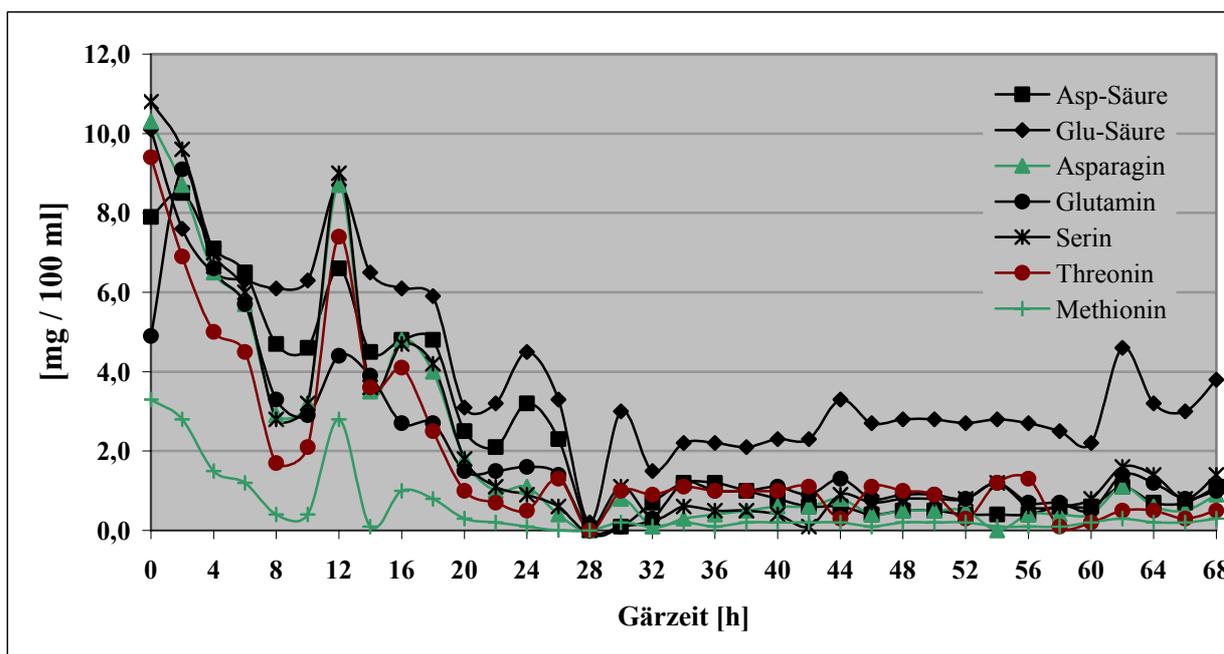


Abbildung 33: Aminosäurenverlauf bei Vergärung von DON-kontaminierter Würze mit Hefestamm 68 bei 20 °C

Tabelle 10: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Erntehefe aus nicht DON-kontaminierter und DON-kontaminierter Würze gegenüber der Anstellhefe

1	2	3	4	5	6	7
Aminosäure	Anstellhefe [mg / g Hefe]	Erntehefe nicht kontaminierter Würze	Erntehefe kontaminierter Würze	3 / 2	4 / 2	4 / 3
		[mg / g Hefe]	[mg / g Hefe]			
Asparaginsäure	2,4	0,8	1,0	0,33	0,42	1,25
Glutaminsäure	2,7	1,1	1,3	0,41	0,48	1,18
Asparagin	1,4	1,0	0,6	0,71	0,43	0,60
Glutamin	5,0	2,1	1,7	0,42	0,34	0,81
Serin	3,2	1,5	1,2	0,47	0,38	0,80
Threonin	2,6	0,9	1,0	0,35	0,38	1,11
Methionin	1,6	0,6	0,5	0,38	0,31	0,83
Glycin	2,7	0,6	0,6	0,22	0,22	1,00
Alanin	5,1	1,7	1,4	0,33	0,27	0,82
Tyrosin	0,3	1,3	1,1	4,33	3,67	0,85
Valin	3,8	1,8	1,5	0,47	0,39	0,83
Isoleucin	1,6	1,6	1,4	1,00	0,88	0,88
Leucin	6,0	2,8	2,2	0,47	0,37	0,79
Phenylalanin	4,3	1,6	1,3	0,37	0,30	0,81
Histidin	1,3	0,3	0,4	0,23	0,31	1,33
Arginin	4,6	1,5	1,3	0,33	0,28	0,87
Lysin	3,7	1,8	1,7	0,49	0,46	0,94
γ -Aminobuttersre	2,9	0,1	0,1	0,03	0,03	1,00
Tryptophan	0,7	0,3	0,0	0,43	0,00	0,00
Durchschnittlicher Faktor				0,62	0,52	0,88

3.1.2.6 Vergleich unterschiedlicher Gärverfahren bis zum fertigen Bier

Bei diesen abschließenden Versuchsreihen zur Deoxynivalenolproblematik bei der Bierbereitung wurden die meßbaren DON-Gehalte von belasteten Würzen vom Anstellen der Hefe über Gärung, Reifung und Lagerung bis hin zum fertigen Bier bilanziert.

Untersucht wurden dabei die Verläufe bei kalter (8-10 °C) und warmer (14-15 °C) Gärführung sowie bei Druckgärung (18-20 °C).

Um die Versuche im 15 l-Maßstab durchführen zu können, wurde für jede Gärung ein Sud im Kleinsudwerk des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II hergestellt (vgl. 2.2.5),

dessen Ausschlagwürze anschließend jeweils in vier gleiche Volumina geteilt wurde. So konnten bei jeder Gärtemperatur eine untergärige (U = St. 34/70) und eine obergärige (O = St. 68) Hefe im Parallelversuch geführt werden (vgl. 2.2.6). Dabei wurden folgende Gärparameter angesetzt:

Kalte Gärführung:

- Anstelltemperatur: 8 °C
- Max. Gärtemperatur: 9 °C
- Anstellhefemenge: 15 Mio Zellen/ml

Warme Gärführung:

- Anstelltemperatur: 14 °C
- Max. Gärtemperatur: 15 °C
- Anstellhefemenge: 15 Mio Zellen/ml

Druckgärung:

- Anstelltemperatur: 12 °C
- Max. Gärtemperatur: 19 °C
- Anstellhefemenge: 24 Mio Zellen/ml
- Bei einem Vergärungsgrad von ca. 50 % wurden die Gärgefäße mit 1,8 bar Druck beaufschlagt. Am Ende der Gärung wurde der Druck auf 1,0 bar abgesenkt.

Die DON-haltigen Würzen hierfür wurden durch Vermischen von DON-belastetem Weizenmalz hergestellt. In den Anstellwürzen wurden DON-Konzentrationen von 678 ppb (9 °C), 578 ppb (15 °C) und 589 ppb (19 °C / Druck) gemessen. Im Anschluß an die Gärungen erfolgten jeweils 14 / 3 Tage Reifung (drucklose Gärung / Druckgärung) bei 4 °C sowie 14 Tage Lagerung bei 0 °C. Filtriert wurde über einen Kieselgurfilter im Pilotmaßstab sowie einen Membranfilter. Das Jungbier aus dem Versuch mit Hefestamm 68 bei 9 °C wurde verworfen, da hier aufgrund der niedrigen Temperatur effektiv keine Gärung stattfand. Aufgrund der technischen Gegebenheiten konnten bei den Druckgärungen während der Phase mit Druckbeaufschlagung keine Proben gezogen werden.

Anhand der Extraktabnahmen kann gezeigt werden, daß die Parallelversuche bezüglich des Gärverlaufes identisch waren und keinerlei Gärstörungen aufgetreten sind (Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 36). Vergleicht man kalte, warme und Druckgärung bezüglich des Verlaufes der DON-Konzentration, so kann festgestellt werden, daß bei 9 °C bzw. 15 °C von der

Anstellwürze über Gärende, Ende der Lagerung/Unfiltrat bis zum Filtrat tendenziell eine Zunahme um 11 % bis 40 % zu verzeichnen ist. Die Druckgärungen zeigen am Ende der Gärung ebenfalls Zunahmen von 8 % bis 28 %, jedoch wurden Abnahmen am Ende der Lagerung von 17 % bis 50 % und im Filtrat von 7 % bis 44 % gemessen (vgl. Abbildung 37). Dies widerspricht größtenteils den Ergebnissen aus 3.1.2.2 und 3.1.2.3.1. Ein gravierender Unterschied zwischen unter- und obergäriger Hefe konnte nicht ermittelt werden.

Für den Umstand, daß bei allen drei Versuchsreihen die DON-Konzentrationsverläufe der Parallelansätze zum Teil deutlich voneinander abwichen, konnte keine plausible Erklärung gefunden werden. Jedoch teilte Herr BOSCH vom Deutschen Brauerbund anlässlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium im Mai 2000 mit, daß derartige Beobachtungen auch schon bei Versuchen des Verbandes mit OTA-belasteten Würzen gemacht wurden [1].

Ungewöhnlich waren bei einigen Versuchen auch Zunahmen der DON-Konzentration während der Filtration. Meßfehler konnten durch eine Dreifachbestimmung aller Proben und die nochmalige Überprüfung der Proben vor und nach dem Filter ausgeschlossen werden. Es wurden derlei Phänomene allerdings auch schon bei der Bestimmung anderer Bierinhaltsstoffe (Polyphenole) beobachtet. Die einzelnen Gärversuche sind in Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40 dokumentiert.

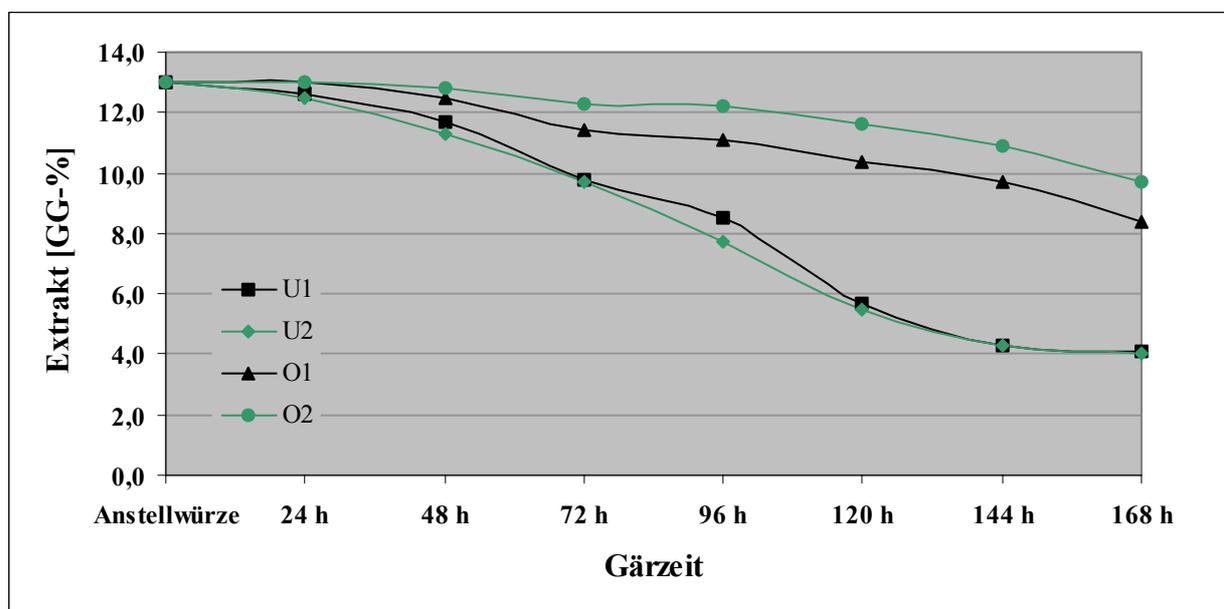


Abbildung 34: Extraktabnahmen der DON-Gärungen bei 9 °C

1 Bosch, H.: Offizielle Mitteilung anlässlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium. Deutscher Brauerbund, Mai 2000

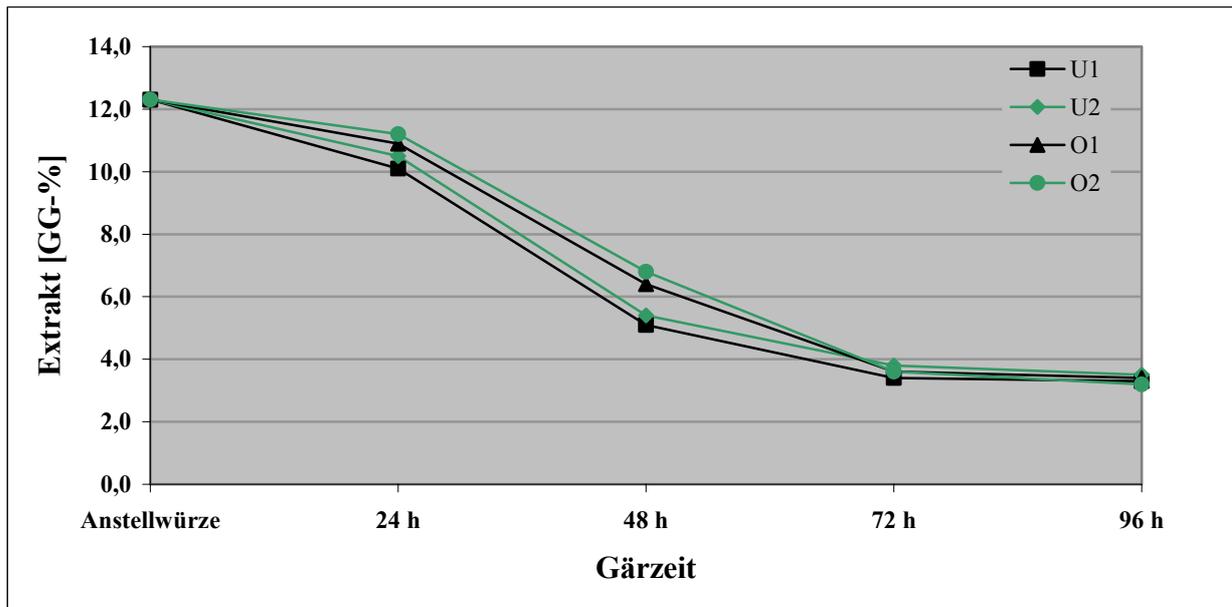


Abbildung 35: Extraktabnahmen der DON-Gärungen bei 15 °C

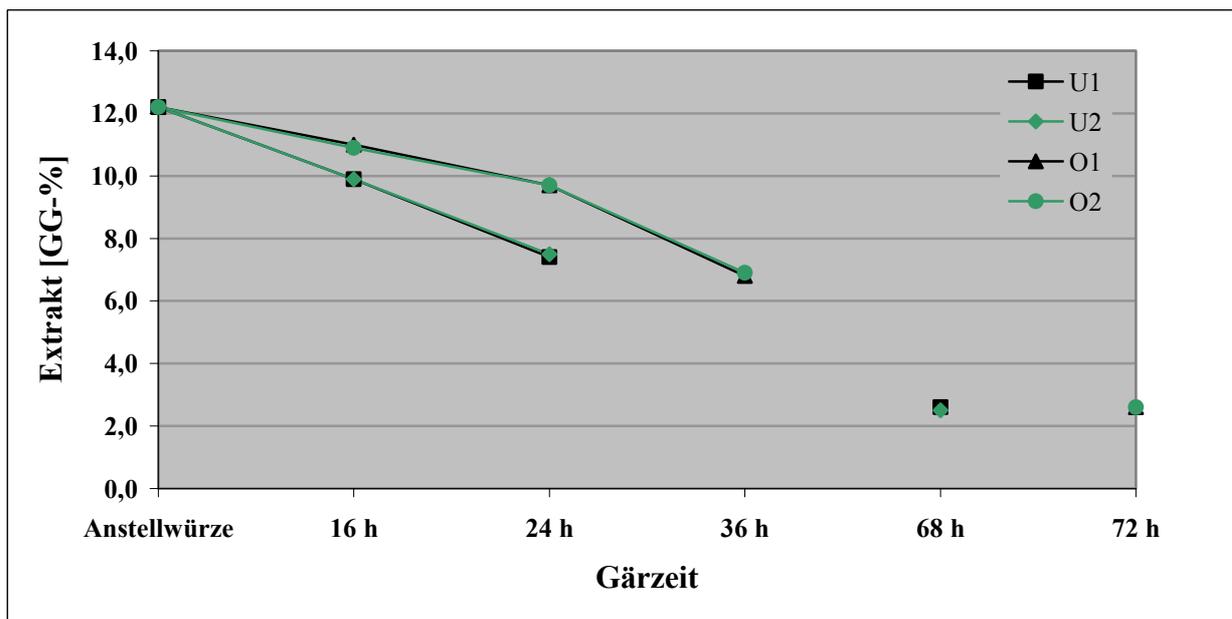


Abbildung 36: Extraktabnahmen der DON-Gärungen bei 19 °C unter Druck

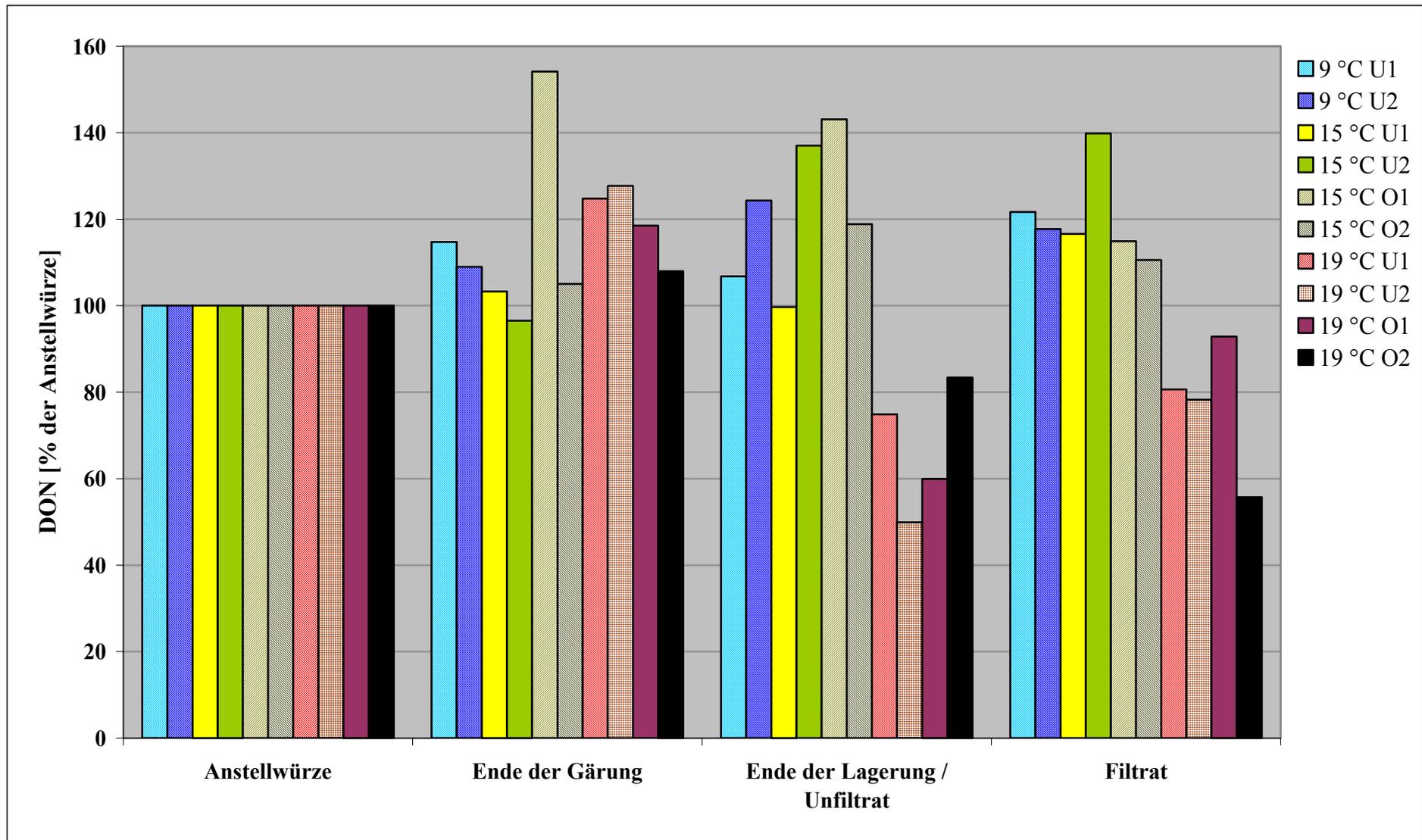


Abbildung 37: Vergleich aller Gärversuche mit DON-kontaminierten Würzen

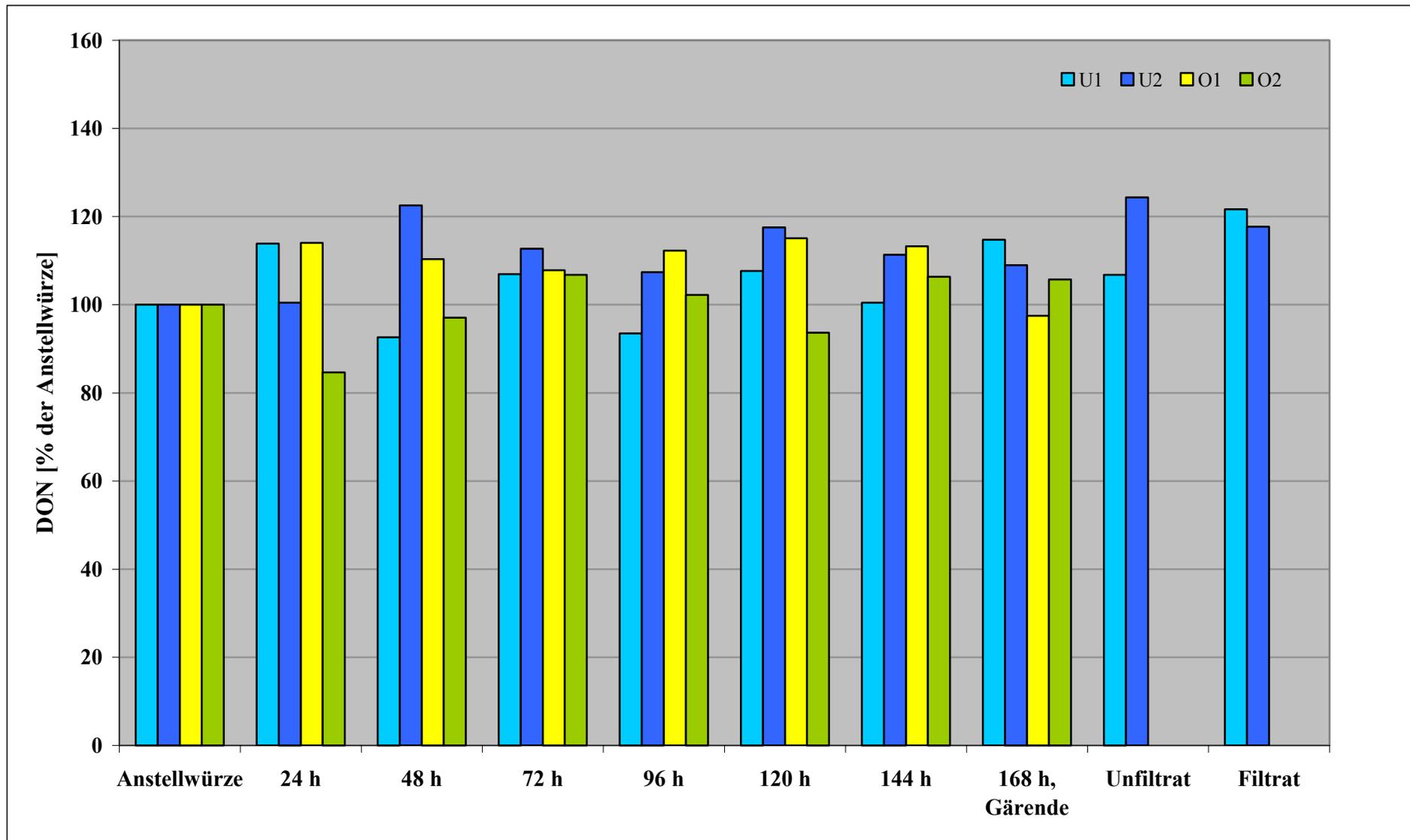


Abbildung 38: Bilanzierung der DON-Gärungen bei 9 °C

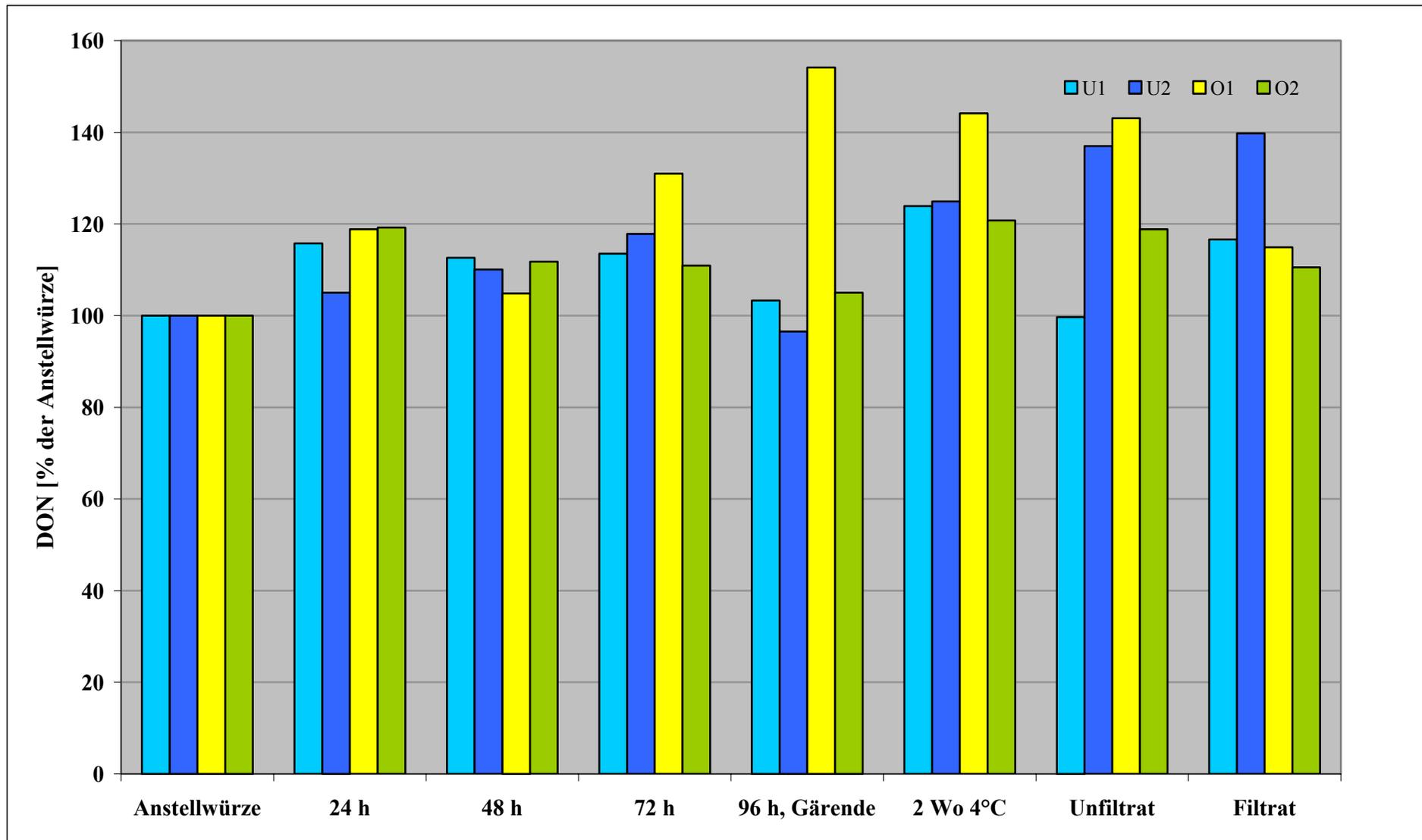


Abbildung 39: Bilanzierung der DON-Gärungen bei 15 °C

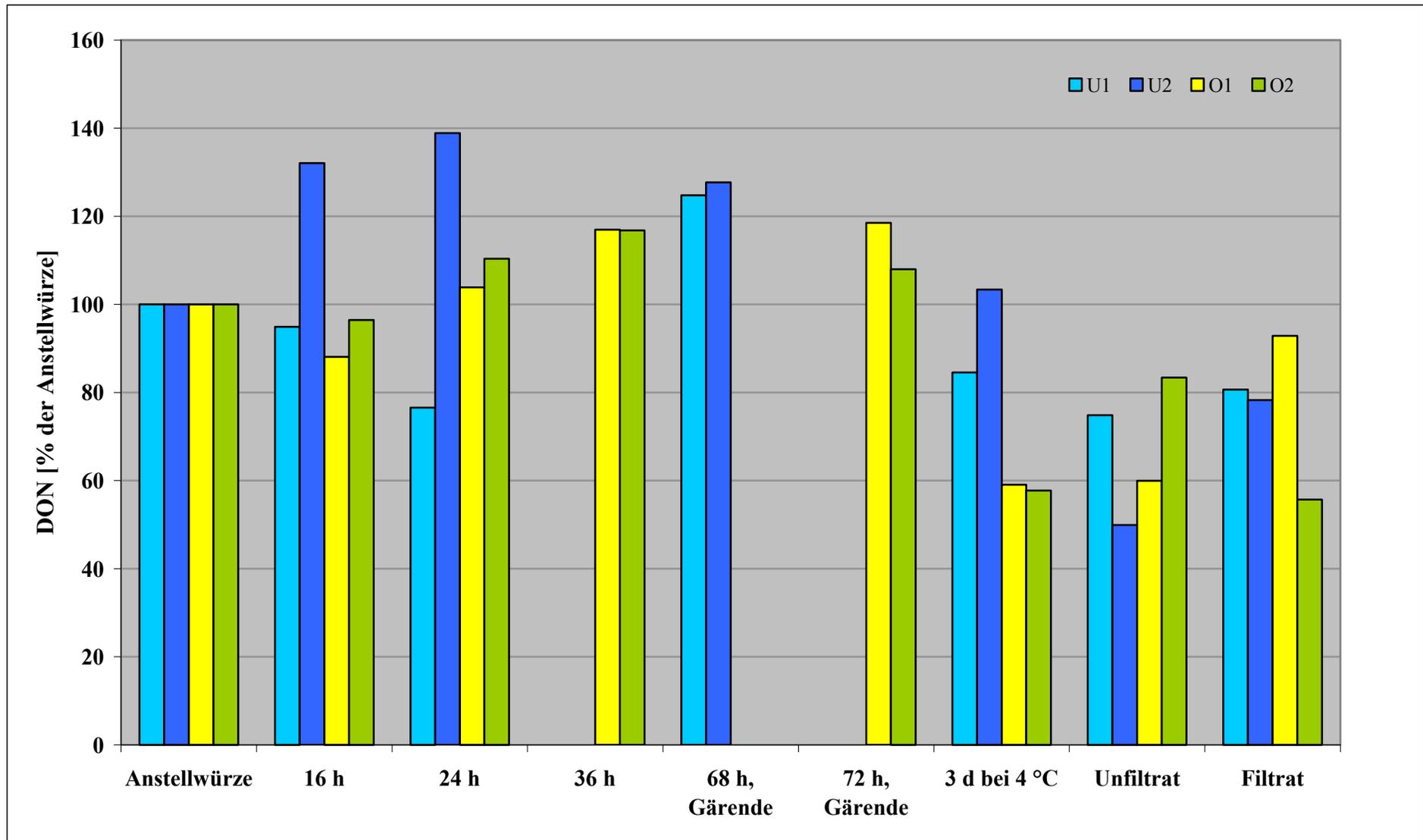


Abbildung 40: Bilanzierung der DON-Gärungen bei 19 °C unter Druck

3.2 Ochratoxin A (OTA) während der Bierbereitung

3.2.1 Untersuchungen zur Nachweisbarkeit von Ochratoxin A während des Maischprozesses

Das Verhalten von Ochratoxin A während des Brauprozesses wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen überprüft. Dabei handelt es sich allerdings um Untersuchungen mit relativ praxisfremden Maischmethoden [1] bzw. geringer Anzahl an Proben [2]. NIP et al. [3] haben zwar auch die Hefe vermessen, allerdings wurde die Gärung nicht verfolgt und SCOTT et al. [4] sowie BAXTER [5] verfolgten die Gärung nur bei einer Gärtemperatur. Mit den hier durchgeführten Versuchsreihen wurde deshalb der OTA-Verlauf anhand eines praxisgerechten Maischverfahrens sowie bei Anwendung verschiedener Gärverfahren und Temperaturen verfolgt.

3.2.1.1 Screening von Rohware, Malz und Bier auf Ochratoxin A

Um einen Überblick zum Vorkommen von Ochratoxin A in Rohware, Malz und Bier im Projektzeitraum 1997/98 zu erlangen, wurden laufend Praxisproben auf Ochratoxin A untersucht. Gleichzeitig sollte dieses Screening zur Beschaffung und Auswahl geeigneten Probenmaterials für die geplanten Versuche dienen. Wie Tabelle 11 zeigt, war in keiner der elf zur Verfügung stehenden Gerstenproben und nur in einer von 57 Malzproben OTA quantitativ nachzuweisen. Vier weitere Malzmuster waren zwar positiv, wurden jedoch unter der Bestimmungsgrenze detektiert. Dagegen konnten von 47 Bieren sieben positiv gewertet werden, wovon vier auch quantifizierbar waren. Eigene Infektionsversuche mit Penicilliensporensuspensionen auf Gerste erbrachten ebenfalls kein brauchbares Versuchsmaterial, weshalb alle nachfolgenden Untersuchungen auf künstliche Kontamination von Maische beschränkt werden mußten.

1 Chu, F. S.; Chang, C. C.; Ashoor, S. H.; Prentice, N.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 29 (1975) Nr. 3, S. 313-316

2 Krogh, P.; Hald, B.; Gjertsen, P.; Myken, F.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 28 (1974) Nr. 1, S. 31-34

3 Nip, W. K.; Chang, F. C.; Chu, F. S.; Prentice, N.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 30 (1975) Nr. 6, S. 1048-1049

4 Scott, P.M.; Kanhere, S. R.; Lawrence, G. A.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 12 (1995) Nr. 1, S. 31-40

5 Baxter, E. D.: WBC Session IV, 024, July 2000

Tabelle 11: Screening von Praxisproben auf Ochratoxin A (OTA)

Probenmaterial	Gesamt / nicht nachweisbar / < Bestimmungsgrenze / positiv	Meßwerte [ppb]
Gerste	11 / 9 / 2 / 0	—
Malz	57 / 52 / 4 / 1	0,4 ¹
Bier	47 / 40 / 3 / 4	0,3 / 0,5 / 0,9 / 1,3

¹ = Gerstenmalz

3.2.1.2 Nachweis von Ochratoxin A in Kongreßmaische

Zunächst wurde Wasser auf eine Konzentration von 10 ppb OTA kontaminiert und nach dem modifizierten Kongreßmaisverfahren weiterverarbeitet (vgl. 2.2.3). Dabei konnte keinerlei Reduktion der Substanz beobachtet werden. Aufbauend darauf wurde getestet, wie sich Ochratoxin A im Beisein von unbelastetem Praxisschrot unter gleichen Bedingungen verhält. Wie aus der nachfolgenden Abbildung 41 hervorgeht, konnten unmittelbar nach Zugabe des Toxins zur Maische nur noch 25 % der Ausgangsmenge detektiert werden. Eine weitere Reduzierung um 8,3 % erfolgte nach Einhaltung der 30minütigen Eiweißrast. Mit Anheben der Temperatur auf 70 °C und anschließender Verzuckerungsrast konnte zwar ein leichter Anstieg der OTA-Konzentration festgestellt werden, mehr als 21,8 % der Anfangskonzentration waren jedoch nicht mehr detektierbar.

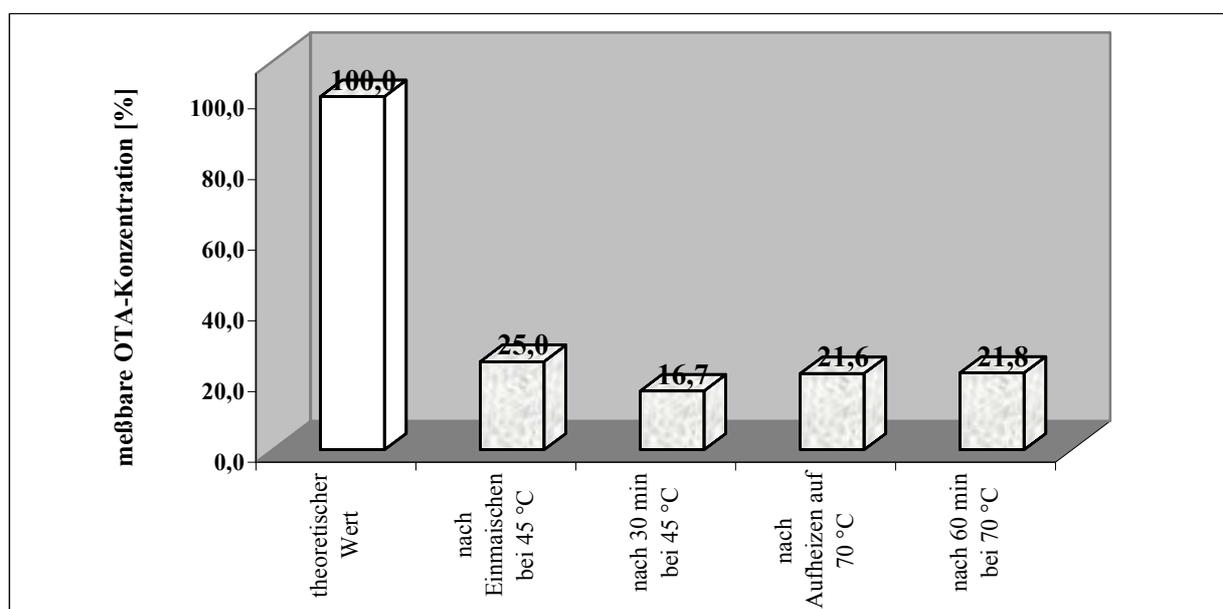


Abbildung 41: Verlauf der OTA-Konzentration in einer künstlich kontaminierten Kongreßmaische

3.2.1.3 Nachweis von Ochratoxin A bei der Würzebereitung mit einem praxisgerechten Infusionsmaischverfahren

Anhand des Kleinmaischverfahrens aus 2.2.4 wurden aus unbelastetem Malz mit vorher auf 10 ppb OTA kontaminiertem Brauwasser Würzen hergestellt, deren Stammwürzegehalte für Sud 1 12,0 GG-% und für Sud 2 12,3 GG-% betragen.

Die in Abbildung 42 zusammengefaßten Ergebnisse der Bilanzierungen bestätigen das Resultat aus 3.2.1.2. Auch hier konnten sofort nach Einmaischen und Homogenisieren nur noch ca. 28 % und 40 % der eingesetzten Menge detektiert werden. Bei Sud 1 fiel auf, daß die OTA-Konzentration während der Rasten etwas abnahm um während des anschließenden Aufheizens wieder anzusteigen.

Wurden nach dem Abläutern in der Vorderwürze nur 33,1 % bzw. 22,9 % der zugesetzten Toxinmenge nachgewiesen, so konnten nach Auswaschen der Treber mit den Nachgüssen diese Werte verdoppelt werden. Von der Kochung unbeeinflusst wurden deshalb in den Ausschlagwürzen 59,7 % und 46,0 % des Ausgangswertes an OTA nachgewiesen. Werden hierzu die OTA-Mengen addiert, die nach Aufschluß und Extraktion der Treber ermittelt wurden, so errechnet sich ein gesamtachweisbarer Anteil von 89,3 % bzw. 55,3 %. Bemerkenswert ist, daß die Werte aus Sud 2 vom Einmaischen bis nach dem Aufheizen auf 78 °C meist höher, in der Vorderwürze aber um 10,2 %, in Pfannevoll- und Ausschlagwürze um 16,7 % und 13,7 % sowie in den Treber sogar um 20,3 % niedriger als in Sud 1 waren. Da die Nachgüsse komplett abgeläutert wurden, entstanden keine OTA-Verluste durch Glattwasser.

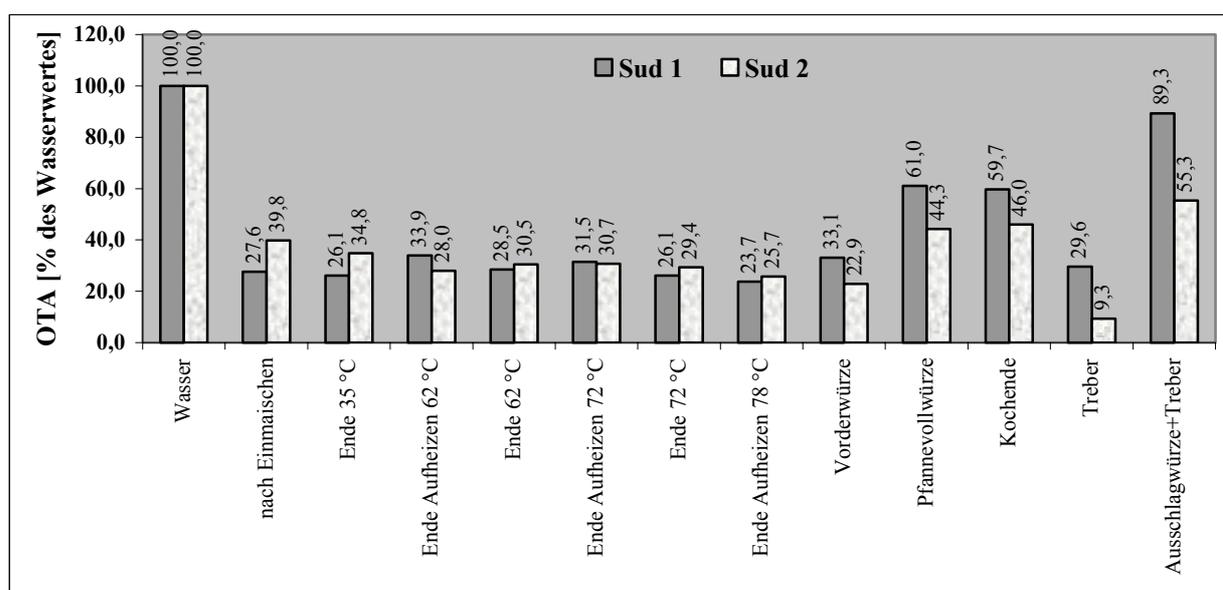


Abbildung 42: OTA-Bilanzierung in künstlich kontaminierten Maischen

3.2.1.4 Nachweis von Ochratoxin A in β -Glucan- und Pentosanlösung

Entsprechend den Untersuchungen zum Nachweis von Deoxynivalenol in β -Glucan- und Pentosanlösung in Kap. 3.1.1.9 wurde auch Ochratoxin A auf die Möglichkeit einer Maskierung durch diese Polysaccharide überprüft.

Hierfür wurden 35 mg bzw. 125 mg β -Glucan, entsprechend 1,0 % bzw. 3,5 % Malztrockensubstanz bei einem angenommenen Wassergehalt eines Malzes von 5 % und einem Schüttungsverhältnis von 1:4, in 15 ml bidest. Wasser durch kurzes Aufkochen gelöst und anschließend im Eisbad auf 45 °C abgekühlt. Anschließend wurden 75 ng OTA (5 ppb) zugegeben, eine Probe gezogen, der Rest in zwei Aliquote von 5 ml geteilt, wovon eines mit 1,4 μ l Ceremix 2X L versetzt wurde, und 30 min inkubiert. Flüssigkeitsverluste wurden durch bidest. Wasser ausgeglichen, so daß keine Aufkonzentrierung stattfand.

Mit 35 mg β -Glucan konnten bereits unmittelbar nach Zugabe von Ochratoxin A nur noch 70 % der Menge gefunden werden. Im Gegensatz zu Deoxynivalenol verringerte sich dieser Wert bei 30minütiger Inkubation ohne Enzym auf 58,8 %, mit Enzym auf 64,4 % (Abbildung 43). Mit 125 mg β -Glucan konnten gleich zu Beginn zwar lediglich 56 % detektiert werden, allerdings erhöhten sich die Werte bei Inkubation mit und ohne Enzym nach 30 min auf 64,4 % (Abbildung 44).

Offensichtlich wird OTA also von β -Glucan maskiert. Es ist auch verständlich, daß eine höhere Glucan-Konzentration mehr OTA bindet, wie es auch zu Anfang der Fall ist. Nicht erklärt werden kann das anschließende Absinken der Werte bei niedriger und das Ansteigen bei hoher Glucan-Konzentration. Zudem hat Ceremix 2X L, nicht wie bei DON, wenn überhaupt, so nur einen sehr geringen Einfluß.

Vergleichende Untersuchungen mit 0,2 g Pentosan in 30 ml bidest. Wasser und 10 ppb OTA erbrachten zwar sofort nach Toxinzugabe eine Absenkung der wiederfindbaren Menge auf 24,6 %, nach Inkubation ohne Enzym, mit 0,2 mg / 8 ml 1,4-D-Xylanase und 1 μ l / 8 ml Ultraflo L (vgl. 3.1.1.8) wurden jedoch wieder 100 %, 91,6 % und 100 % detektiert (Abbildung 45). Das Enzympräparat Ultraflo L, das auch Xylanase und Pentosanase enthält, hatte somit keinen Einfluß auf die Freisetzung. Unklar bleibt, warum es zu Beginn zu einer Maskierung kommt, wenn diese im weiteren Verlauf offensichtlich wieder unwirksam wird und weshalb in folge dessen im Versuch mit Xylanase nicht 100 % gefunden wurden.

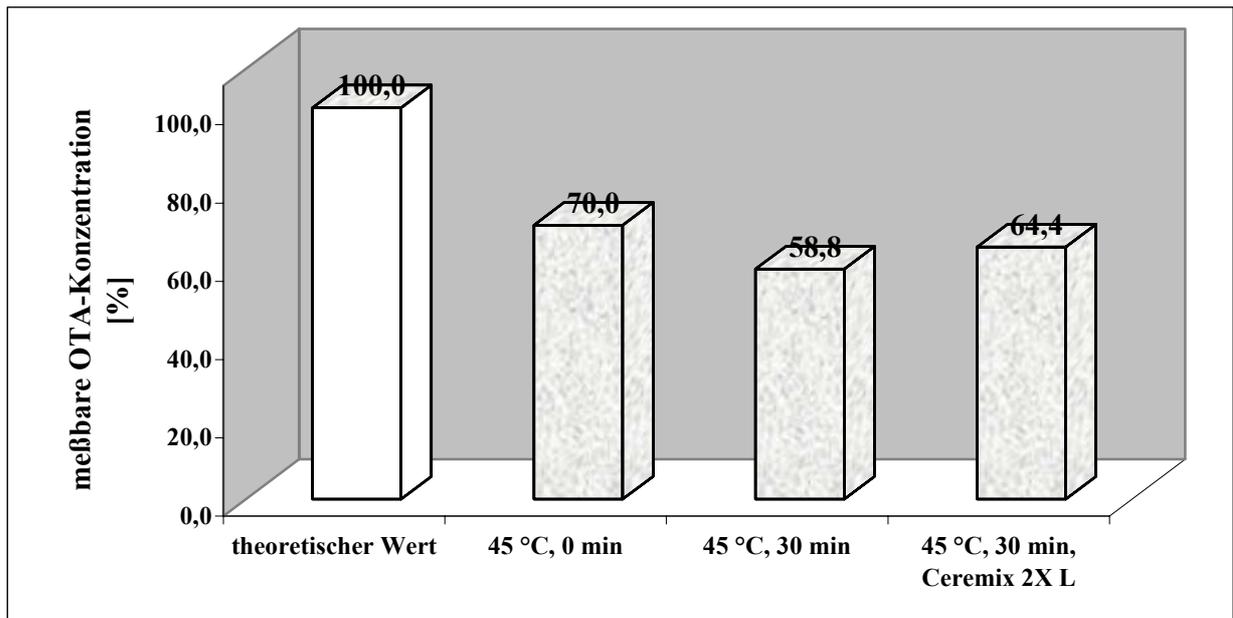


Abbildung 43: OTA-Bestimmung in β -Glucanlösung (35 mg / 15 ml Wasser)

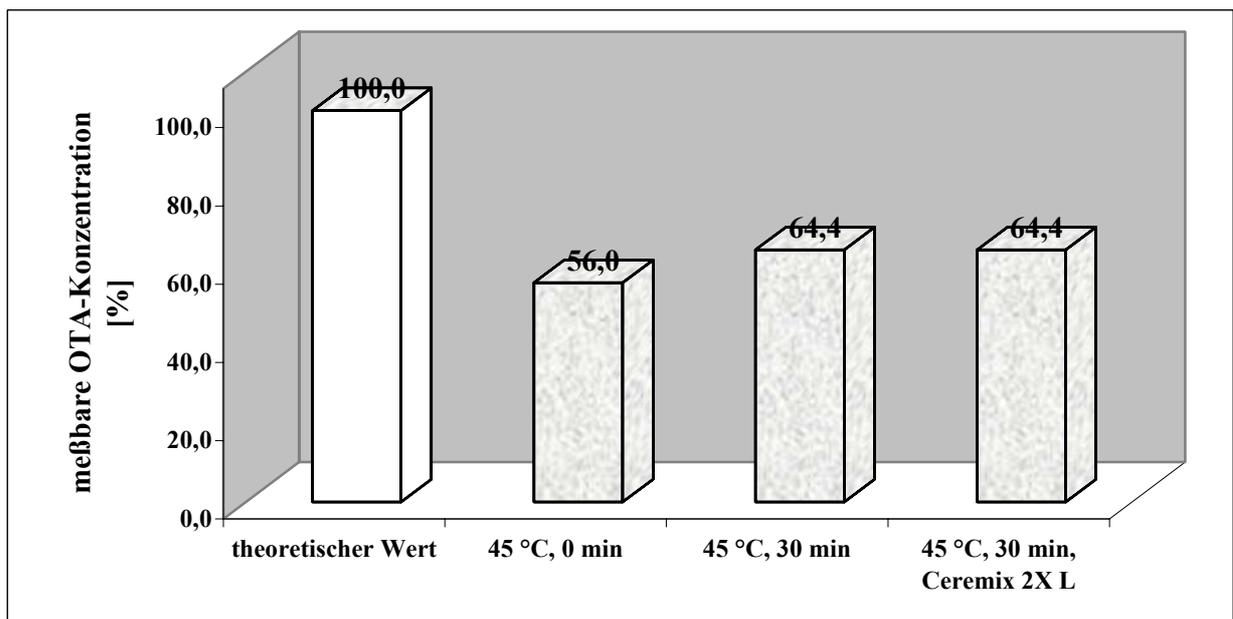


Abbildung 44: OTA-Bestimmung in β -Glucanlösung (125 mg / 15 ml Wasser)

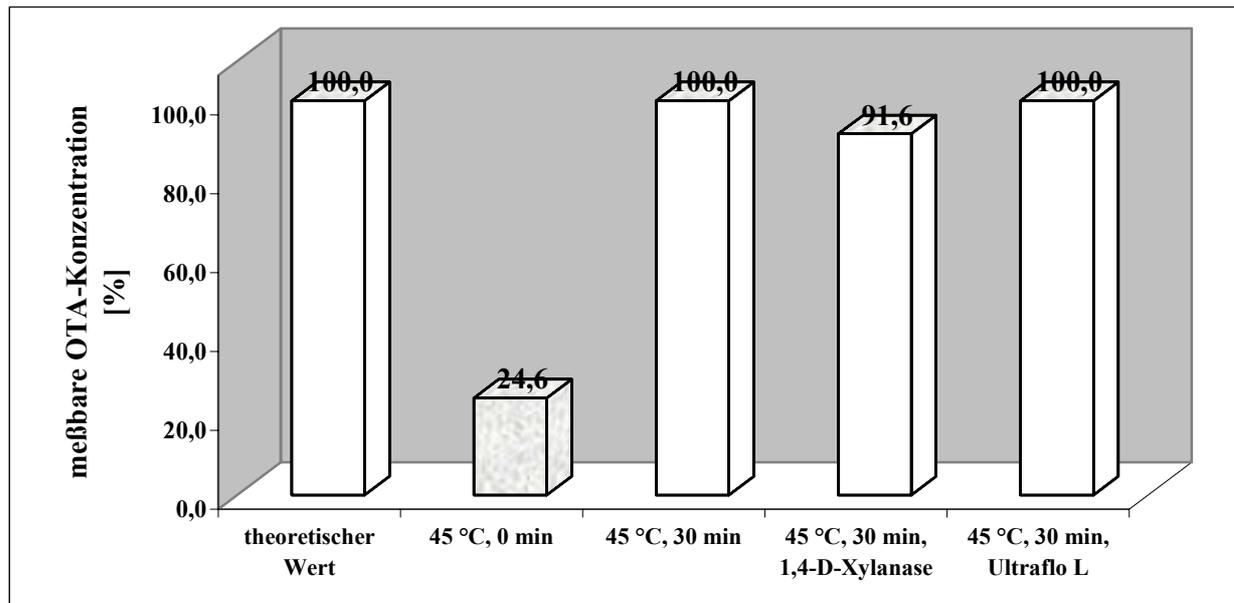


Abbildung 45: OTA-Bestimmung in Pentosanlösung (200 mg / 30 ml Wasser)

3.2.2 Verhalten von Ochratoxin A während der Gärung

3.2.2.1 Vergärung von Würze mit unter- und obergäriger Hefe unter Zusatz von Ochratoxin A-Reinsubstanz

Als Grundlage für alle weiteren Untersuchungen wurden zunächst Gärversuche mit dem untergärigen Hefestamm 128 und dem obergärigen Hefestamm 141 durchgeführt, wobei einer toxinfreien Würze Ochratoxin A als Reinsubstanz in einer Konzentration von 200 ppb zugesetzt wurde. Für die Bilanzierung bedeutet dies, daß pro 40 ml-Probenansatz 8 µg OTA enthalten waren.

Bei der Analyse der Würzeproben wurde festgestellt, daß sofort nach Zugabe der Hefe zur Würze (nach Homogenisierung) unter Berücksichtigung der Wiederfindung (Hefe 128: 63 %, Hefe 141: 66 %) nur noch ca. 53 % (128) und 56 % (141) OTA detektiert werden konnten. Über die gesamte Versuchsdauer schwankten die Toxingehalte zwar unwesentlich, im Endeffekt blieben die Konzentrationen jedoch nahezu unverändert. So wurden für die untergärige Hefe zu Beginn der Gärung 65,9 ppb, am Ende nach 190,5 Stunden 63,9 ppb gemessen. Für die obergärige Hefe waren die Werte entsprechend 74,3 ppb und 66,3 ppb, wobei hier die Gärdauer bei lediglich 128 Stunden lag. Auffallend sind in beiden Versuchen die mehrmaligen Einbrüche in den Würzekurven, die mit Meßfehlern nicht erklärt werden können.

Analog zu den Würzen wurden auch die Hefen untersucht, wozu diese über ein Membranfilter abfiltriert, mit 1 N Salzsäure in einen Porzellantiegel gespült und mittels Seesand und Mörser aufgeschlossen wurden. Die Analyse der Extrakte erbrachte durchweg positive Werte im Bereich von 2 ppb bis 41 ppb für die 128er Hefe und zwischen 10 ppb und 180 ppb für die 141er Hefe. Wohl aufgrund des manuellen Aufschlusses und damit einhergehenden unterschiedlichen prozentualen Anteilen an zerstörten Hefezellen in den einzelnen Proben, zeigten sich jedoch teilweise erhebliche Schwankungen der DON-Konzentrationen im Verlauf der Gärungen, weshalb die Ergebnisse in erster Linie qualitativ zu bewerten sind. Die Bilanzierung von Ochratoxin A in Würze und Hefe macht deutlich, daß die OTA-Defizite in den Würzen nicht mit den in den Hefen gefundenen Mengen erklärt werden können. Daß bereits gleich zu Beginn, unmittelbar nach der Hefegabe, im Extrakt der 128er Hefe 5 ng und im Extrakt der 141er Hefe 2 ng OTA detektiert wurden, deutet auf eine Adsorption des Toxins an den Agglutinationsschleim der Hefen hin.

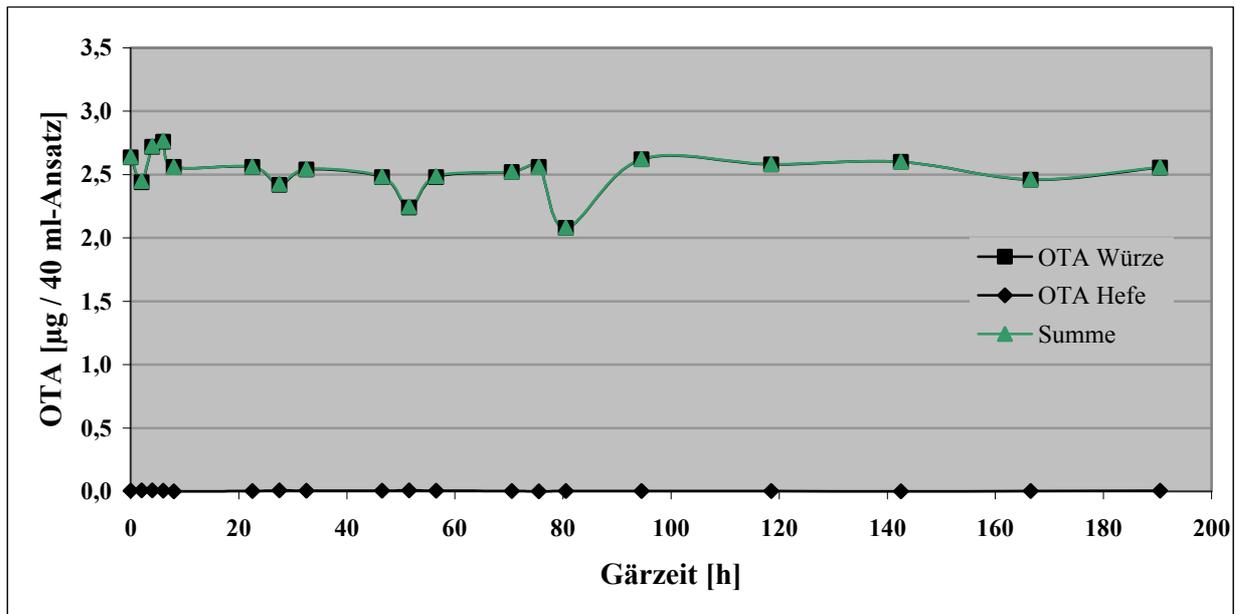


Abbildung 46: OTA-Bilanzierung bei Vergärung künstlich kontaminierter Würze mit Hefestamm 128

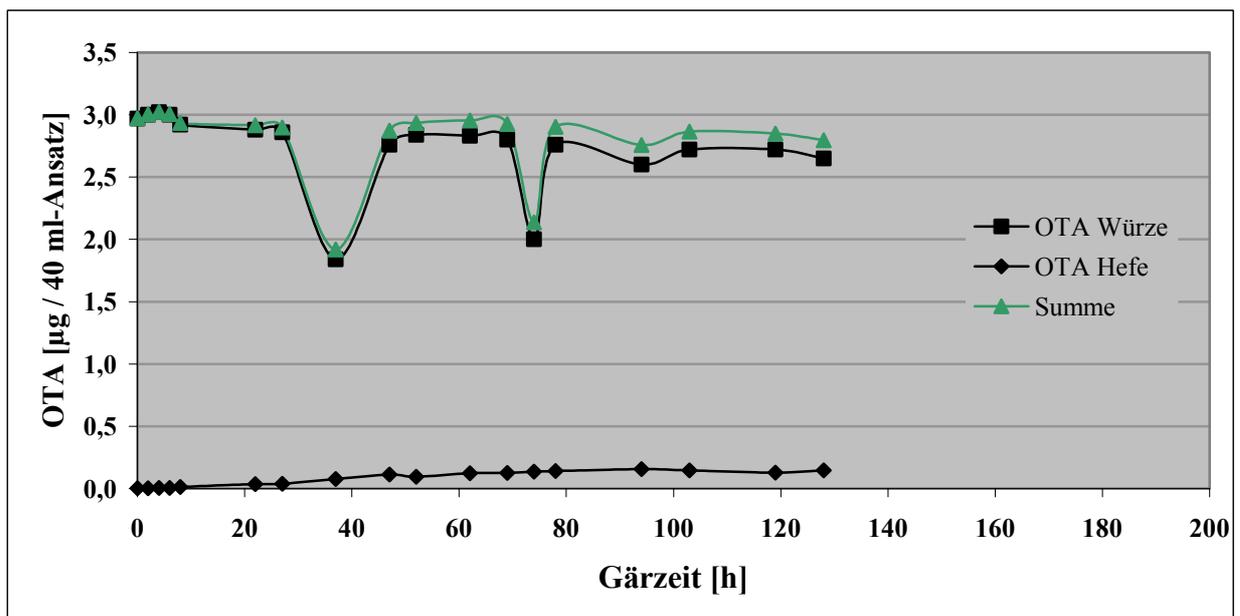


Abbildung 47: OTA-Bilanzierung bei Vergärung künstlich kontaminierter Würze mit Hefestamm 141

3.2.2.2 Anlagerung von Ochratoxin A an die Hefe

In 3.2.2.1 wurde festgestellt, daß sofort nach Zugabe der Hefe zur Würze, auch unter Berücksichtigung der in diesem Fall sehr niedrigen Wiederfindung, nicht mehr die gesamte zugesetzte OTA-Menge detektiert werden konnte. Eine Überprüfung dieses Sachverhalts bestätigte obige Resultate. In Abbildung 48 ist der Verlauf der Ochratoxin A-Konzentration einer mit 200 ppb künstlich kontaminierten Würze dargestellt. Besonders zu beachten sind hierbei die beiden Meßwerte zu Beginn der Gärung. Die beiden Proben wurden nicht erst tiefgekühlt, sondern sofort nach der Entnahme zentrifugiert und extrahiert. Während in der hefefreien Würze ein Wert von 152,5 ppb detektiert wurde, waren es unmittelbar nach Hefezugabe und – homogenisierung nur noch 92,4 ppb. Aufgrund der sehr kurzen Zeit, nach der 39 % der Substanz nicht mehr nachgewiesen werden konnten, ist ein Transport von OTA in die Hefezellen sehr unwahrscheinlich. Vielmehr scheint sich die Theorie der, zumindest anfänglichen, Adsorption zu bestätigen. Ansonsten gleicht der weitere Verlauf den Resultaten aus 3.2.2.1.

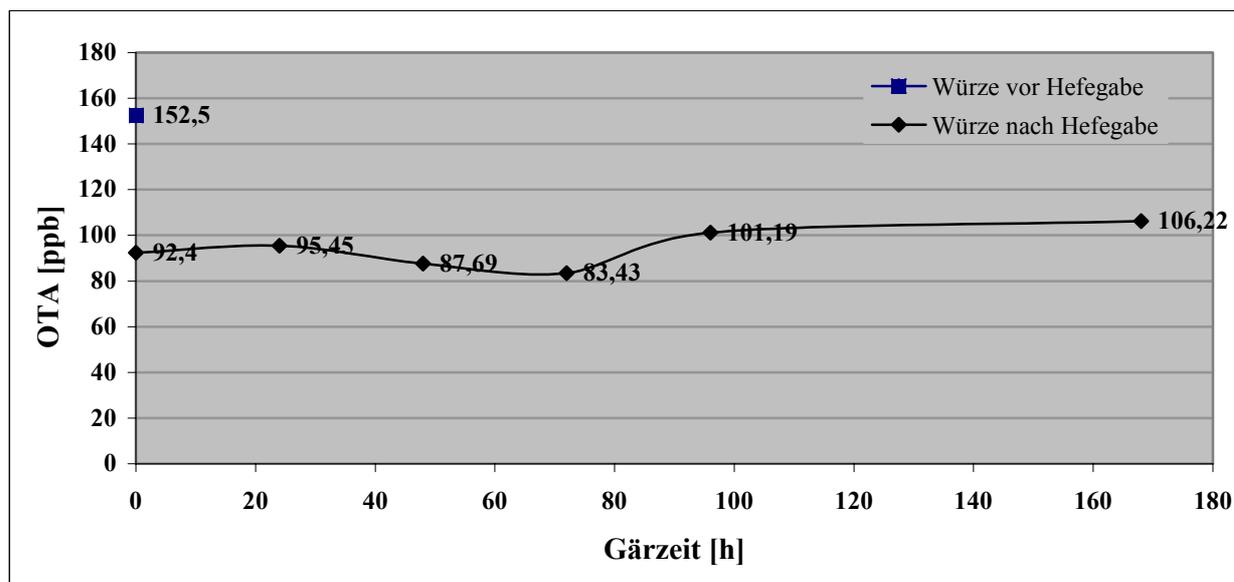


Abbildung 48: OTA-Konzentrationsverlauf bei Vergärung künstlich kontaminierter Würze

3.2.2.3 Vergleich verschiedener Hefen bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze

Wie in Kap. 3.2.1.1 bereits dargestellt, ist es nicht gelungen, geeignetes natürlich kontaminiertes Malz zu beziehen bzw. durch Beimpfen von Getreide mit entsprechenden Sporensuspensionen selbst herzustellen, weshalb Material entsprechend künstlich kontaminiert werden mußte. Da nicht auszuschließen war, daß ein Teil des OTA in natürlich kontaminierten Würzen nicht frei und somit nicht detektierbar vorliegt, schien die Zugabe von OTA-Reinsubstanz zu unbelasteten Würzen zum Zwecke von praxisnahen Gärversuchen nicht sehr sinnvoll. Es wurden deshalb eigene Würzen hergestellt, wobei die Kontamination mit OTA im Hauptguß, vor dem Einmaischen erfolgte. Dadurch war gewährleistet, daß OTA, ähnlich wie bei natürlich kontaminierten Maischen, mit Maischeinhaltsstoffen reagieren konnte.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde deshalb die angefallene Würze von Sud 1 aus Kap. 3.2.1.3 eingesetzt. Diese wurde mit vier untergärigen (St. 34/70, 120, 128, 168) und vier obergärigen (St. 68, 177, 184, 211) Bierhefen bei Gärtemperaturen von 8 °C und 15 °C im Mikromaßstab vergoren (20 ml Würze / Probenahmezeitpunkt; Hefegabe 15 Mio Zellen/ml).

Primär war festzustellen, daß es zum einen während der Gärung bei allen Versuchsansätzen zu einer Abnahme der OTA-Konzentration kam. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus 3.2.2.1 und 3.2.2.2 und bestätigt die Vermutung, daß Untersuchungen an künstlich kontaminierten Würzen und an Würzen, die mittels künstlich kontaminierter Maischen hergestellt wurden, nicht zu vergleichen sind. Erstere sind deshalb für praxisorientierte Aussagen nicht geeignet. Zum anderen hatte sich herausgestellt, daß bei Vergärung von „praxisnah“ kontaminierten Würzen innerhalb der ersten 24 Gärstunden ähnliche Schwankungen im Toxinverlauf auftreten, wie dies bereits bei den Untersuchungen zu Deoxynivalenol ersichtlich war (vgl. 3.1.2.1).

Im Einzelnen fand mit den untergärigen Hefen bei 8 °C eine schnellere und weitgehendere Abnahme von OTA in der Würze statt (vgl. Abbildung 49 und Abbildung 50). Von den zu Beginn gemessenen 4,045 ppb in der Würze konnten bereits nach 24 Stunden nur noch zwischen 2,219 ppb (St. 34/70) und 2,641 ppb (St. 120) ermittelt werden. War die Differenz vom niedrigsten zum höchsten gefundenen Wert mit 0,442 ppb hier noch relativ gering, kam es während der nächsten fünf Gärtage zu einer erheblichen Spreizung der Meßwerte. So wurden für St 34/70 nur noch 1,289 ppb, für St. 128 jedoch 2,686 ppb verzeichnet. Das ergibt eine maximale Differenz von 1,397 ppb. Die größte Abnahme in diesem Zeitraum bewirkte St. 34/70, während die Konzentration in der St. 128-Würze nahezu unverändert blieb.

Bei einer Gärtemperatur von 15 °C waren die Konzentrationsabnahmen nach 24 Stunden Gärdauer erheblich geringer. Mit St. 34/70 wurde wiederum der niedrigste (3,262 ppb), mit St 168 der höchste (3,883 ppb) Wert, entsprechend einer Differenz von 0,621 ppb, ermittelt. Nach 144 Stunden ergab sich eine etwas geringere Differenz von 0,543 ppb, wobei der niedrigste Wert mit 2,547 ppb (St. 34/70) in etwa auf dem Niveau des höchsten Wertes der 8 °C-Gärung lag.

Betrachtet man die OTA-Konzentrationsverläufe der Versuche mit obergärigen Hefen, so ergibt sich während der ersten 24 Stunden bei 8 °C eine geringere Schwankungsbreite (vgl. Abbildung 51). Die Meßwerte lagen hier bei 2,023 ppb (St.184), 2,210 ppb (St. 68), 2,407 ppb (St.211) und 2,582 ppb (St. 177). Die maximale Differenz betrug damit 0,559 ppb und verringerte sich bis zum Ende der Gärung auf 0,212 ppb mit der geringsten gemessenen Konzentration von 1,953 ppb (St. 211). Dem gegenüber steht bei 15 °C nach 24 Stunden eine Schwankungsbreite von 0,901 ppb, wobei die Hefestämme 68 (1,974 ppb), 177 (2,405 ppb) und 184 (2,430 ppb) auf dem Niveau der 8 °C-Gärung lagen (vgl. Abbildung 52). Lediglich St. 211 zeigte eine höhere OTA-Konzentration von 2,875 ppb, welche bis zum Ende noch etwas zunahm (2,994 ppb). Die anderen drei Stämme reduzierten die meßbare Konzentration im weiteren Verlauf der Gärung und lagen schließlich mit 1,436 ppb (St. 177), 1,629 ppb (St. 68) und 2,021 ppb (St. 184) unter den Werten bei 8 °C.

Insgesamt war in Bezug auf die Absenkung einer meßbaren OTA-Konzentration kein eklatanter Unterschied zwischen unter- und obergärigen Hefen festzustellen. Allerdings zeigten sich bei den entsprechenden klassischen Gärtemperaturen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hefen einer Rasse. So wurden mit Stamm 34/70 bei 8 °C und mit Stamm 177 bei 15 °C die höchsten OTA-Abnahmen erzielt.

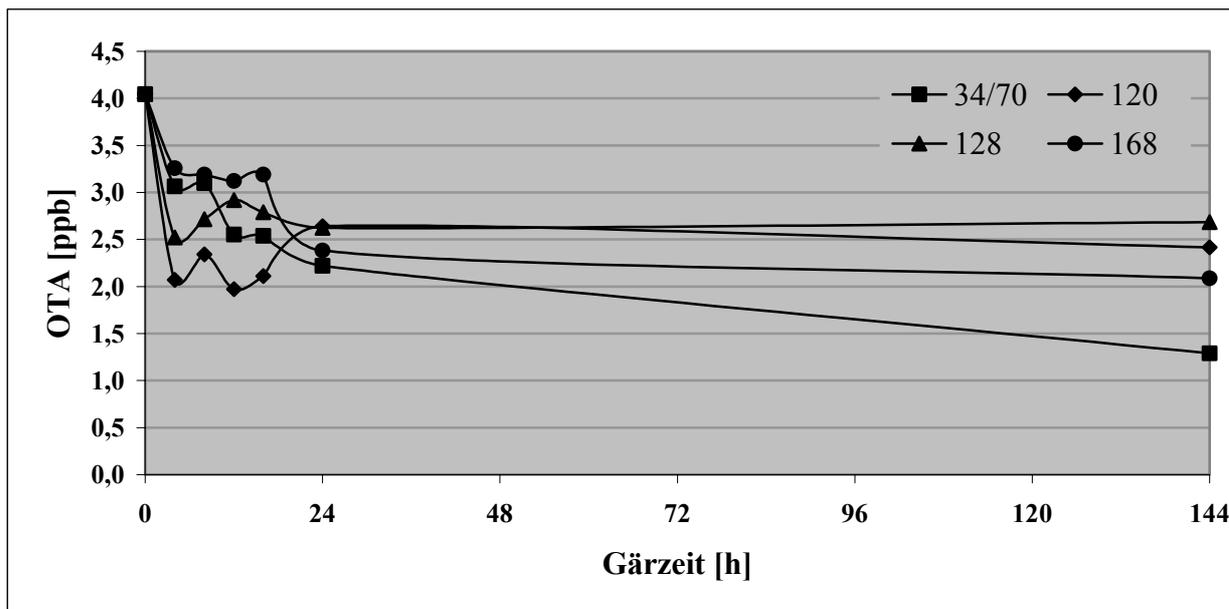


Abbildung 49: OTA-Konzentrationsverläufe bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze mit untergärigen Hefen bei 8 °C

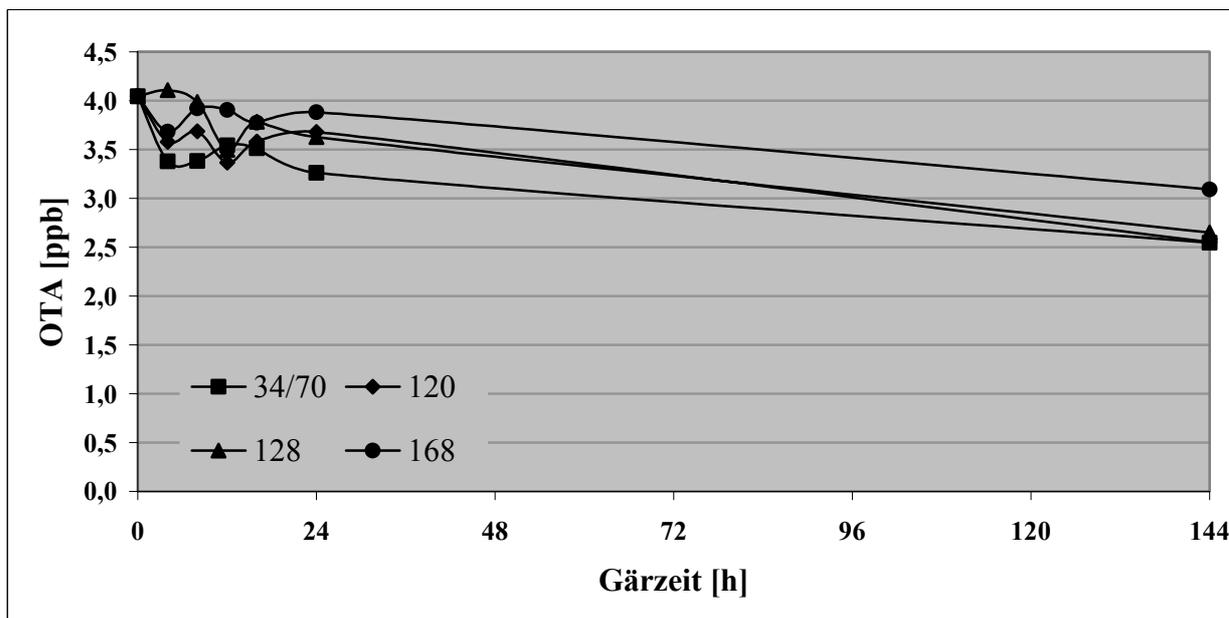


Abbildung 50: OTA-Konzentrationsverläufe bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze mit untergärigen Hefen bei 15 °C

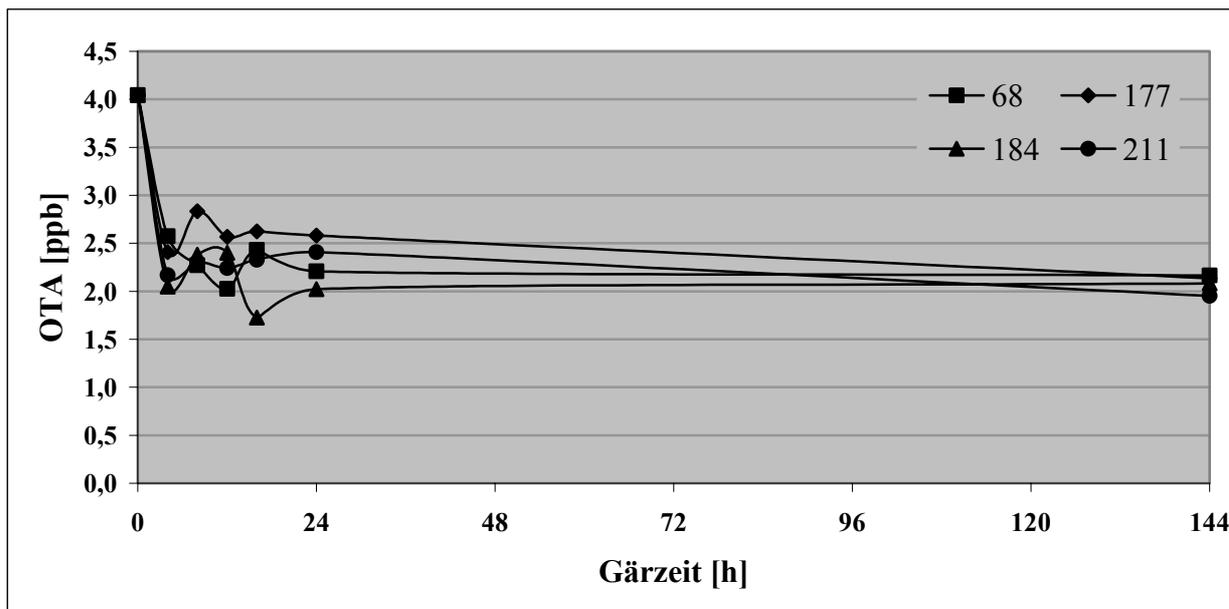


Abbildung 51: OTA-Konzentrationsverläufe bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze mit obergärigen Hefen bei 8 °C

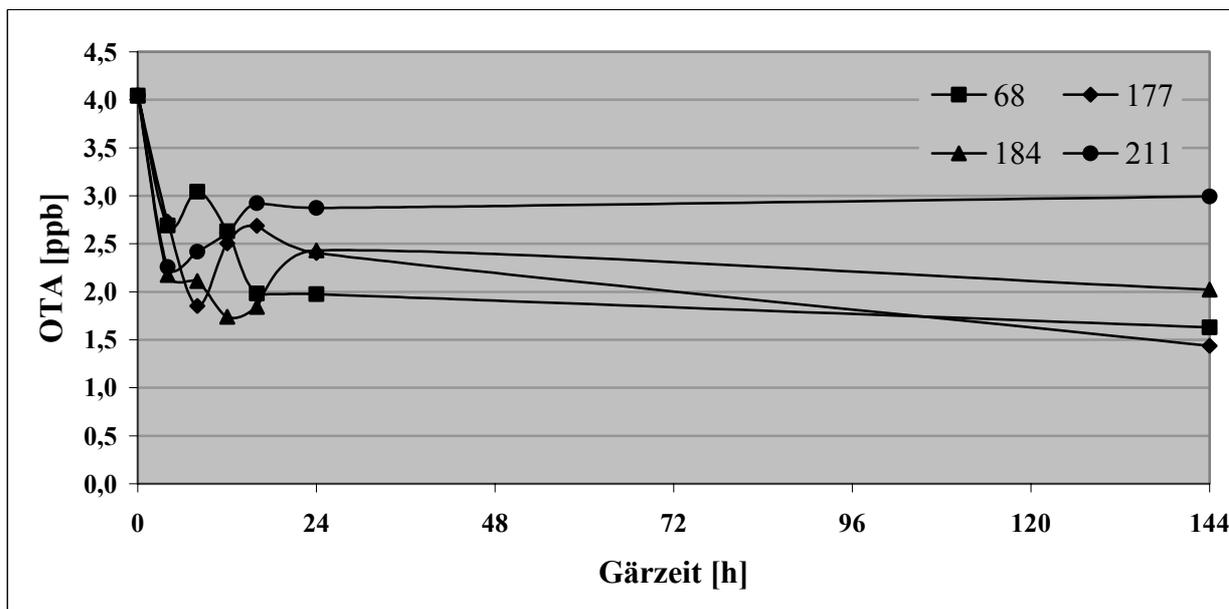


Abbildung 52: OTA-Konzentrationsverläufe bei Vergärung praxisnah kontaminierter Würze mit obergärigen Hefen bei 15 °C

3.2.2.4 Analyse von Ochratoxin A in Hefe und Waschpuffer

Ähnlich den Untersuchungen mit Deoxynivalenol wurden Hefen nach Vergärung entsprechend kontaminierter Würze auf ihren Gehalt an Ochratoxin A untersucht (vgl. 3.1.2.3.2).

Auch hier wurden die Hefen aus den Gärproben der kontaminierten Würzen zunächst abzentrifugiert, die überstehenden Jungbiere abdekantiert und die Zentrifugenröhrchen mit der Öffnung nach unten aufgestellt bis noch anhaftende Bierreste vollständig abgelaufen waren. Um den Agglutinationsschleim der Hefen von diesen zu trennen, wurden die Zellen durch Aufschlämmen der Pellets mit 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer und nochmaliges Zentrifugieren abgewaschen und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Das gereinigte Pellet wurde daraufhin ein zweites Mal im gleichen Puffer gelöst und mittels French-Press bei einem Druck von 2580 psi aufgeschlossen. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach 2.2.8.2.

Für die Untersuchung wurden die Proben nach vier Stunden, nach 24 Stunden und nach sechs Tagen Gärzeit folgender unter- und obergäriger Hefen aus 3.2.2.3 weiterverarbeitet:

Hefestamm	34/70	Gärtemperatur	8 °C
	120		8 °C
	128		8 °C
	168		8 °C
	68		15 °C
	177		15 °C
	184		15 °C
	211		15 °C

Die Analyse der untergärigen Hefen erbrachte für die Stämme 34/70, 128 und 168 nur in den Proben nach sechs Tagen Gärzeit positive Ergebnisse. In Stamm 120 wurde zu keinem Zeitpunkt OTA detektiert. In allen entsprechenden Waschpufferfraktionen konnte ab einer Gärzeit von 24 Stunden OTA bestimmt werden. Aus Tabelle 12 und Tabelle 13 ist jedoch ersichtlich, daß die Extraktion von OTA aus Hefe relativ schwierig ist, weshalb bei den Doppelbestimmungen entweder nur eine Probe positiv oder aber die gefundenen Werte sehr unterschiedlich waren. Ähnliche Resultate erbrachte auch die Analyse der obergärigen Hefen und deren Waschpufferfraktionen (vgl. Tabelle 14 und Tabelle 15). Wenngleich keine genaue Quantifizierung möglich war, so konnte doch eine qualitative Aussage getroffen werden: bis auf Hefestamm 120, in dessen Extrakten das Toxin zu keinem der untersuchten Zeitpunkte

nachgewiesen werden konnte, waren alle Hefen nur in den Extrakten des sechsten Gärtages OTA-positiv. Die getesteten Waschpufferfraktionen waren meist schon ab den Proben nach 24 Stunden Gärzeit positiv, was die vermutete Adsorption an den Agglutinationsschleim zu bestätigen scheint. Entgegen aller Erwartung konnte jedoch in keinem der Waschpuffer bereits nach vier Gärstunden OTA detektiert werden, obwohl entsprechende Konzentrationsabnahmen in den Würzen zu verzeichnen waren.

Tabelle 12: OTA-Bestimmung in untergärigen Hefen

Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
34/70	4 h I	—		120	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	—			24 h I	—
	24 h II	—			24 h II	—
	6 Tage I	—			6 Tage I	—
	6 Tage II	6,34			6 Tage II	—
Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
128	4 h I	—		168	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	—			24 h I	—
	24 h II	—			24 h II	—
	6 Tage I	1,97			6 Tage I	—
	6 Tage II	—			6 Tage II	3,37

Tabelle 13: OTA-Bestimmung in den Waschpuffern untergäriger Hefen

Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
34/70	4 h I	—		120	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	8,92			24 h I	10,75
	24 h II	—			24 h II	17,15
	6 Tage I	3,01			6 Tage I	3,76
	6 Tage II	9,38			6 Tage II	19,67
Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
128	4 h I	—		168	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	9,34			24 h I	—
	24 h II	18,08			24 h II	—
	6 Tage I	190,72			6 Tage I	2,79
	6 Tage II	118,47			6 Tage II	33,43

Tabelle 14: OTA-Bestimmung in obergärigen Hefen

Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
68	4 h I	—		177	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	—			24 h I	—
	24 h II	—			24 h II	—
	6 Tage I	5,28			6 Tage I	—
	6 Tage II	—			6 Tage II	2,66
Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
184	4 h I	—		211	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	—			24 h I	—
	24 h II	—			24 h II	—
	6 Tage I	—			6 Tage I	—
	6 Tage II	4,53			6 Tage II	3,11

Tabelle 15: OTA-Bestimmung in den Waschpuffern obergäriger Hefen

Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
68	4 h I	—		177	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	5,48			24 h I	1,82
	24 h II	7,88			24 h II	2,60
	6 Tage I	4,51			6 Tage I	—
	6 Tage II	8,37			6 Tage II	5,32
Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]		Hefestamm	Probe	OTA [ng / g Hefe]
184	4 h I	—		211	4 h I	—
	4 h II	—			4 h II	—
	24 h I	4,38			24 h I	6,44
	24 h II	4,24			24 h II	6,56
	6 Tage I	39,63			6 Tage I	26,63
	6 Tage II	22,13			6 Tage II	26,11

3.2.2.5 Verschleppung von Ochratoxin A durch Weiterführung kontaminierter Hefe

Entsprechend den Untersuchungen bei Deoxynivalenol sollte auch für Ochratoxin A, vor allem in Anbetracht der Ergebnisse aus 3.2.2.4, überprüft werden, ob eine Verschleppung dieses Toxins durch Weiterführung von Hefe, die bereits zur Vergärung kontaminierter Würze eingesetzt war, möglich ist. Dazu wurde Würze von Sud 1 und Sud 2 aus 3.2.1.3 mit Hefestamm 34/70 bei 9 °C und einer Anstellhefemenge von 15 Mio Zellen/ml vergärt. Die hierbei gewonnenen Erntehefen wurden zentrifugiert und die überstehenden Jungbiere abdekantiert. Anhaftende Bierreste konnten vollständig ablaufen. Anschließend wurden beide Hefechargen zur Vergärung OTA-freier Würze unter oben beschriebenen identischen Bedingungen eingesetzt. Dabei wurden unmittelbar nach Zugabe der Hefe sowie alle 24 Stunden Proben gezogen und nach 2.2.8.2 aufbereitet.

Nach Analyse des Probenmaterials konnte zu keinem Zeitpunkt beider Gärungen Ochratoxin A im Rahmen der Nachweisgrenze detektiert werden. Es ist deshalb davon auszugehen, daß OTA, selbst wenn es an den Agglutinationsschleim der Hefe adsorbiert in eine Würze gelangt, dort nicht wieder in Lösung geht. Aufgrund dessen bewirken Bierhefen

sicherlich einen gewissen Reinigungseffekt bezüglich Ochratoxin A in der Würze, insbesondere wenn durch Hefepropagation die Hefen nur jeweils einmal geführt und dann verworfen werden.

3.2.2.6 Vergleich unterschiedlicher Gärverfahren bis zum fertigen Bier

Bei diesen letzten Versuchsreihen zum Problemkreis Ochratoxin A bei der Bierbereitung wurden die meßbaren OTA-Gehalte von Würzen vom Anstellen der Hefe über Gärung, Reifung und Lagerung bis hin zum fertigen Bier bilanziert. Die Würzen waren dabei praxisnah kontaminiert (vgl. 3.2.2.3), da sie durch Vermaischen von OTA-freiem Weizenmalz unter Zusatz von Ochratoxin A zum Einmaischwasser bereitet wurden (vgl. 2.2.5).

Untersucht wurden dabei wiederum die Konzentrationsverläufe bei kalter (8-10 °C) und warmer (14-15 °C) Gärführung sowie bei Druckgärung (18-20 °C).

Die Ausschlagwürzen wurden auch hier in vier gleiche Volumina geteilt, so daß bei jeder Gärtemperatur wieder eine untergärige (U = St. 34/70) und eine obergärige (O = St. 68) Hefe im Parallelversuch geführt werden konnte (vgl. 2.2.6). Dabei wurden identische Gärparameter wie in Kap. 3.1.2.6 beschrieben, angesetzt.

In den Anstellwürzen wurden OTA-Konzentrationen von 4,56 ppb (9 °C), 4,61 ppb (15 °C) und 3,50 ppb (19 °C / Druck) gemessen. Dies entspricht in der Bilanz 63,3 %, 65,9 % und 58,3 % der eingesetzten Mengen, die in der Würze wiedergefunden wurden. Im Anschluß an die Gärungen erfolgten ebenso 14 / 3 Tage Reifung (drucklose Gärung / Druckgärung) bei 4 °C sowie 14 Tage Lagerung bei 0 °C. Filtriert wurde, aufgrund der bei einigen Versuchen mit DON aufgetretenen unerklärlichen Konzentrationsanstiege im Filtrat, mit Kieselgur über Faltenfilter. Mit Hefestamm 68 wurde bei 9 °C wegen der Erfahrungen mit DON-belasteter Würze (vgl. 3.1.2.6) kein Gärversuch durchgeführt. Aufgrund der technischen Gegebenheiten konnten bei den Druckgärungen während der Phase mit Druckbeaufschlagung wiederum keine Proben gezogen werden.

Anhand der Extraktabnahmen kann auch hier gezeigt werden, daß die Parallelversuche bezüglich des Gärverlaufes identisch waren und keinerlei Gärstörungen aufgetreten sind (Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55).

Der OTA-Verlauf bei Vergärung mit Hefestamm 34/70 bei 9 °C zeigt, wie erwartet, nach 24 Stunden Gärzeit bereits einen deutlichen Konzentrationsabfall. Allerdings weisen die beiden

Parallelversuche mit gemessenen 31 % und 58 %, ausgehend vom Wert der Anstellwürze, auch eine erhebliche Differenz auf. Während der weiteren Gärung steigt die meßbare Toxinmenge bei Versuch 1 laufend bis auf 65 % an, in Versuch 2 bleibt sie, bis auf einige leichte Schwankungen, mit 58 % im Filtrat konstant (vgl. Abbildung 56).

Die Gärversuche bei 15 °C erbrachten ein etwas überraschendes Ergebnis. So lag nach 24 Stunden Gärzeit jeweils einer der beiden Parallelversuche von unter- und obergäriger Hefe mit 89 % (U1) und 92 % (O1) unter dem Anfangswert, während die beiden anderen mit 110 % (U2) und 112 % (O2) darüber lagen. Die Konzentrationen von U1 und U2 fielen bis zur 48. Stunde auf 61 % und 63 % ab um dann bis zum Ende der Gärung auf 73 % und 79 % wieder anzusteigen und dieses Niveau über Reifung und Lagerung bis ins Filtrat zu halten. O1 dagegen fiel bis zur 72. Stunde langsam und gleichmäßig auf 81 % ab und änderte sich bis ins Filtrat nicht mehr. Die OTA-Konzentration von O2 blieb über die gesamte Gärung auf dem anfänglich hohen Niveau und nahm erst während Reifung und Lagerung bis zu einem Wert von 81 % der Ausgangsmenge ab (vgl. Abbildung 57).

Die Vergärung OTA-kontaminierter Würze bei 19 °C und unter Druck zeigte für die obergärige Hefe deutlich schlechtere Meßwerte gegenüber der untergärigen (vgl. Abbildung 58). Die prozentual berechneten Toxinmengen lagen beide nach anfänglichen Abnahmen auf ca. 80 %, nach 24 und 36 Stunden Gärzeit bei ca. 130 % bzw. 120 %. Erst nach Druckbeaufschlagung konnten am Ende der Gärung für beide Ansätze wieder etwa 100 % verzeichnet werden, um während der Reifung abermals auf durchschnittlich 120 % anzusteigen. Erstaunlicherweise konnte durch die Filtration ein Rückgang auf ca. 90 % für beide Biere erzielt werden. Die beiden untergärigen Ansätze verzeichneten nach 16 Stunden Abnahmen auf 61 % (U1) und 76 % (U2). Nach 24 Stunden, vor Druckbeaufschlagung, und nach 72 Stunden, nach Druckbeaufschlagung, wurden beide noch mit ca. 80 % gemessen. Im Gegensatz zu den obergärigen Bieren kam es während Reifung und Lagerung zu einer leichten Abnahme auf durchschnittlich ca. 65 %, um bei der Filtration nochmals auf 60 % (U1) und 52 % (U2) abzusinken.

Ein Vergleich aller Gärversuche bezüglich der Minimierung von meßbarem Ochratoxin A zeigt, daß für den untergärigen Hefestamm 34/70 die klassische Gärung bei 9 °C am besten geeignet ist. Der obergärige Hefestamm 68 scheint OTA grundsätzlich schlechter zu „verarbeiten“, wobei einer drucklosen Gärung bei 15 °C gegenüber einer Druckgärung bei 19 °C der Vorzug zu geben ist (vgl. Abbildung 59). Warum die Parallelversuche zum Teil deutlich differierten, konnte auch hier nicht geklärt werden, jedoch wurden derartige Beobachtungen für OTA auch bereits bei Versuchen im Auftrag des Deutschen Brauerbundes gemacht, wie Herr BOSCH anläßlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium im Mai 2000

mitteilte [1]. Auf die Gärleistung bzw. die Gäraktivität hatte Ochratoxin A offensichtlich keinen Einfluß.

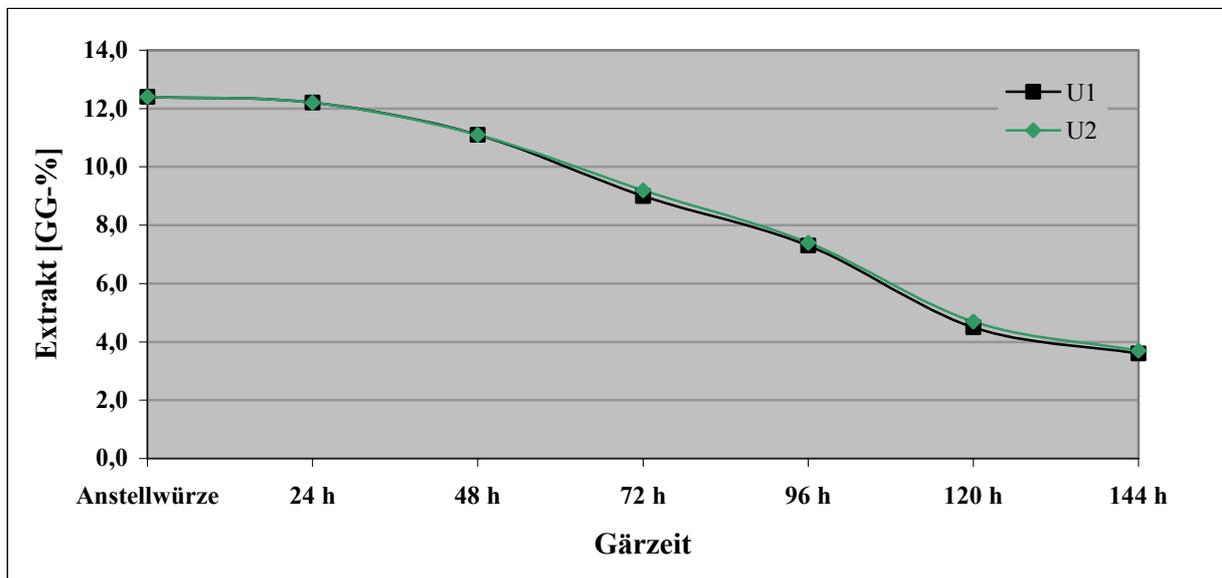


Abbildung 53: Extraktabnahmen der OTA-Gärungen bei 9 °C

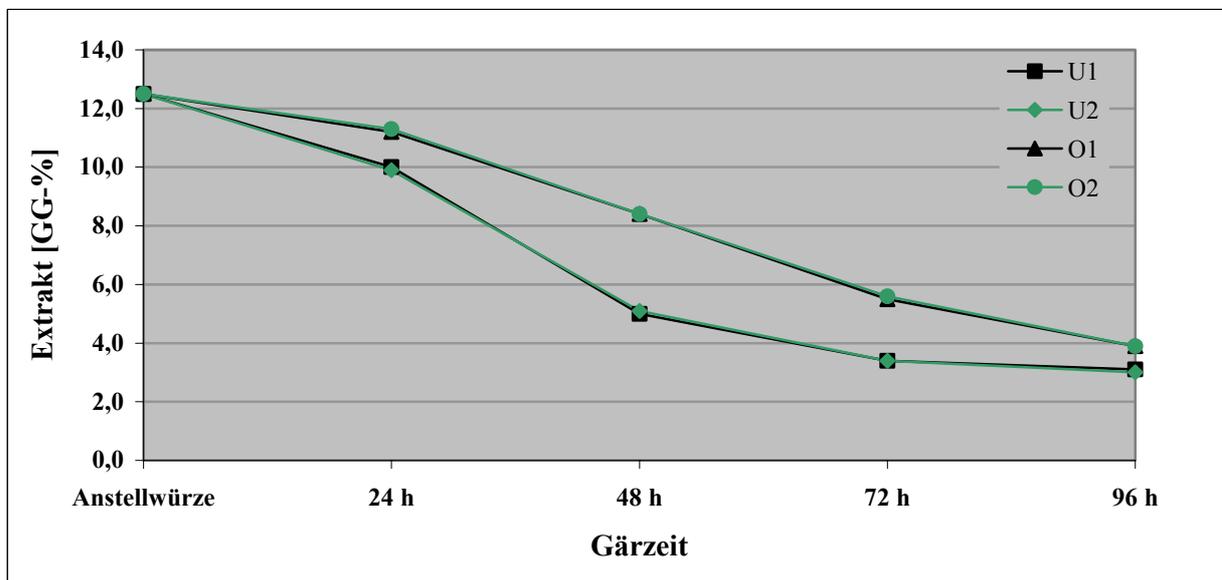


Abbildung 54: Extraktabnahmen der OTA-Gärungen bei 15 °C

1 Bosch, H.: Offizielle Mitteilung anlässlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium. Deutscher Brauerbund, Mai 2000

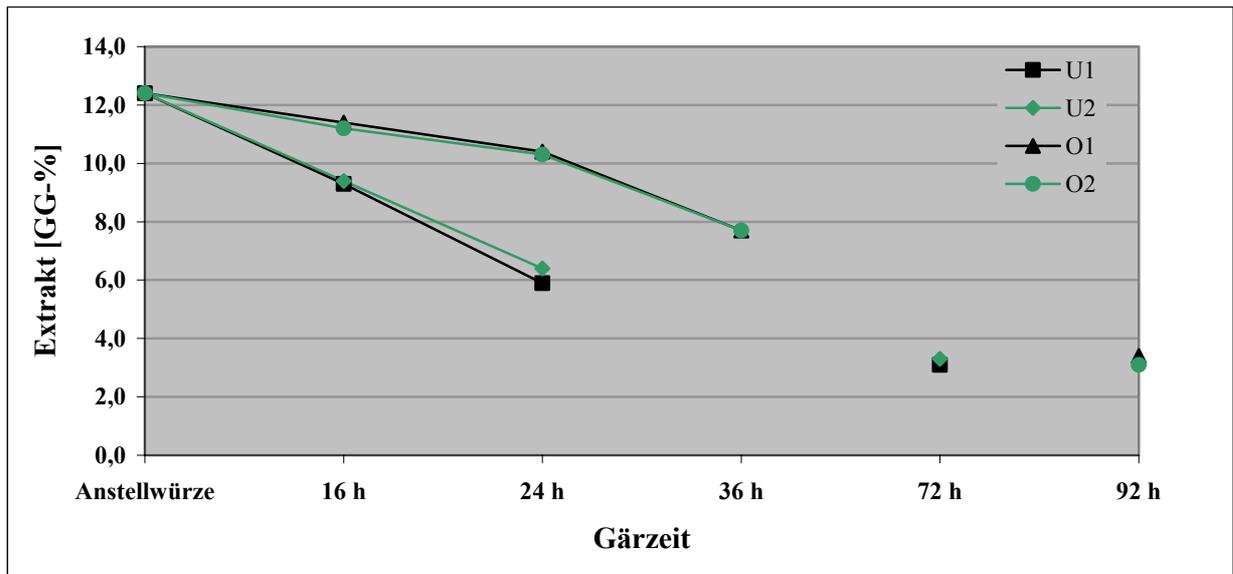


Abbildung 55: Extraktabnahmen der OTA-Gärungen bei 19 °C unter Druck

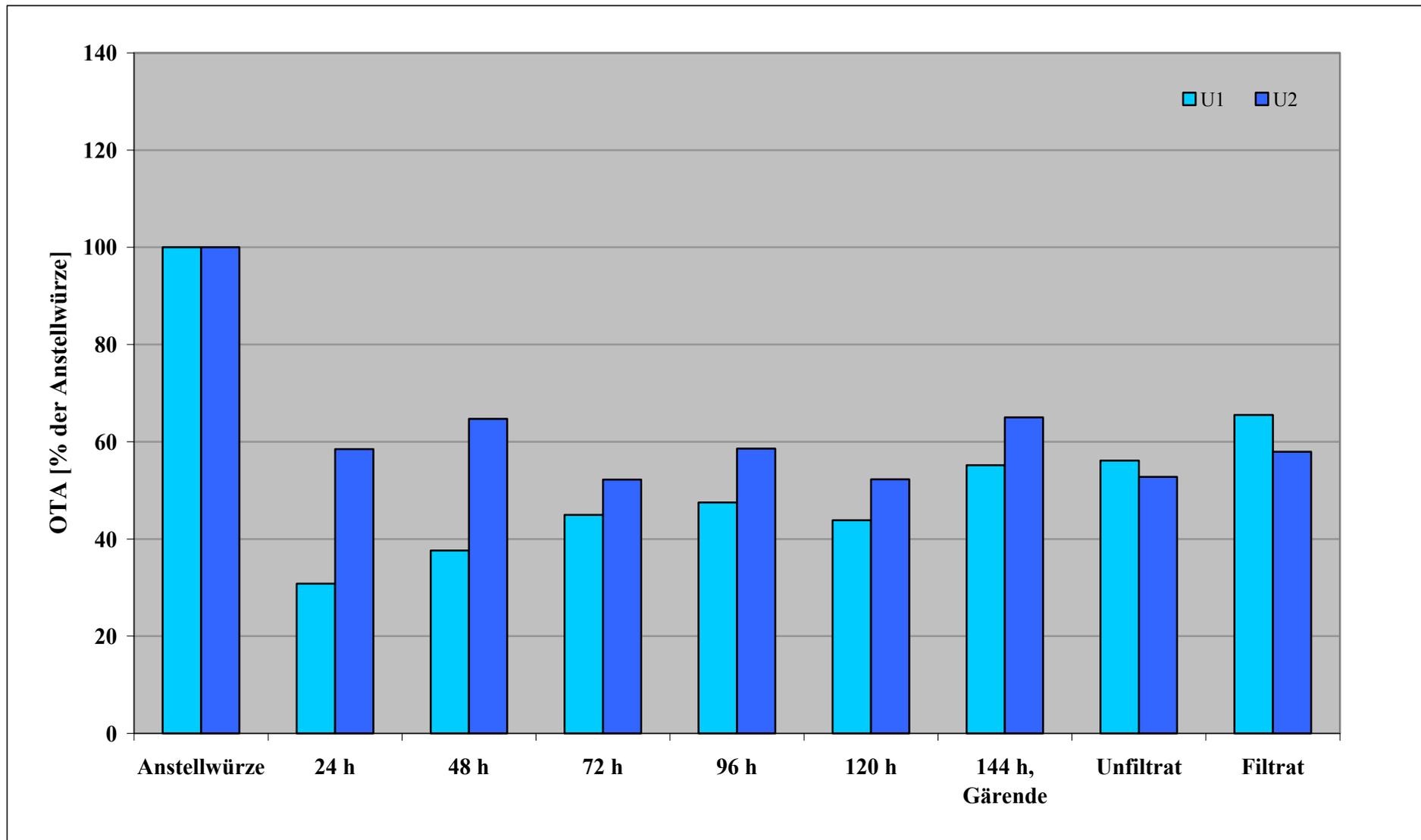


Abbildung 56: Bilanzierung der OTA-Gärungen bei 9 °C

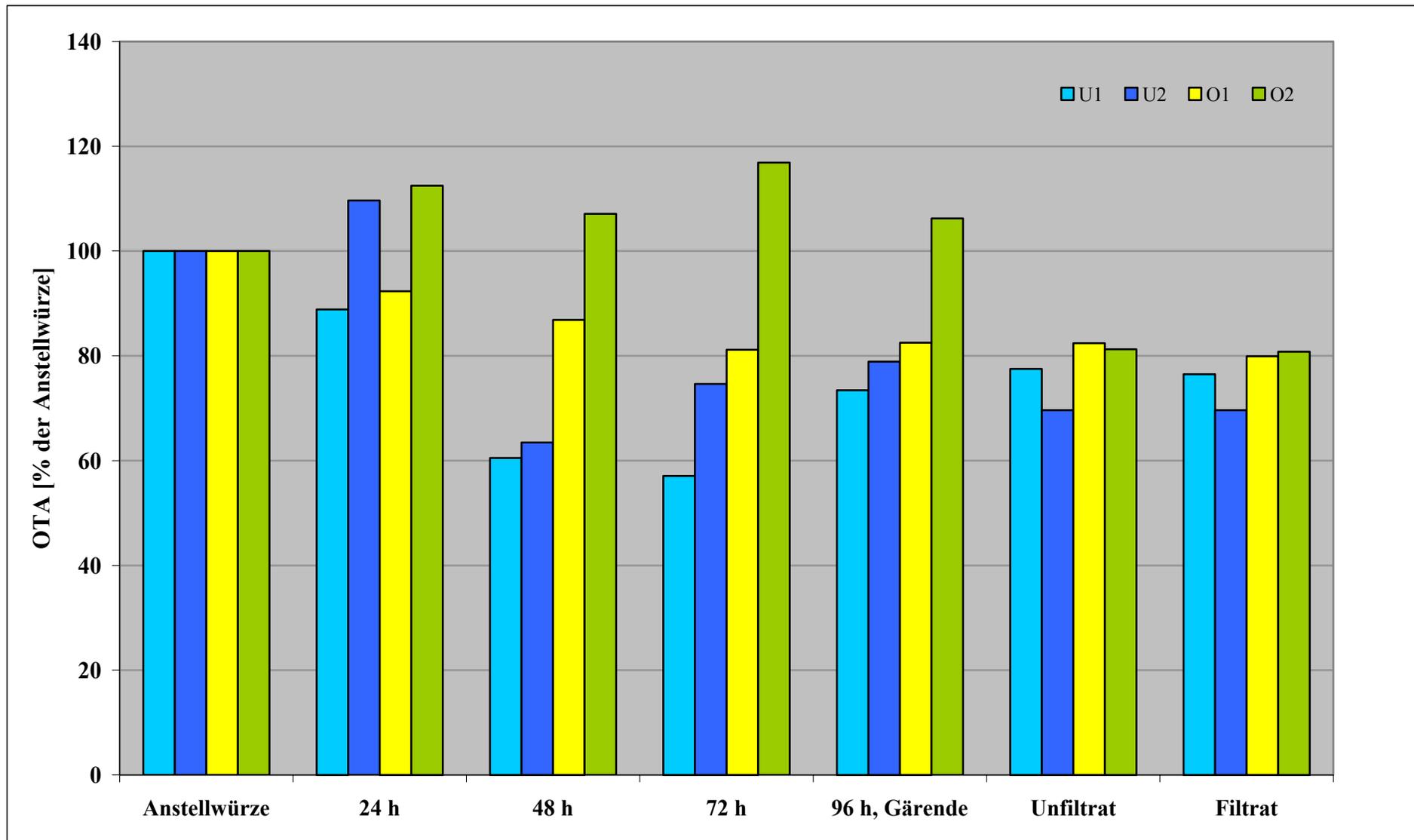


Abbildung 57: Bilanzierung der OTA-Gärungen bei 15 °C

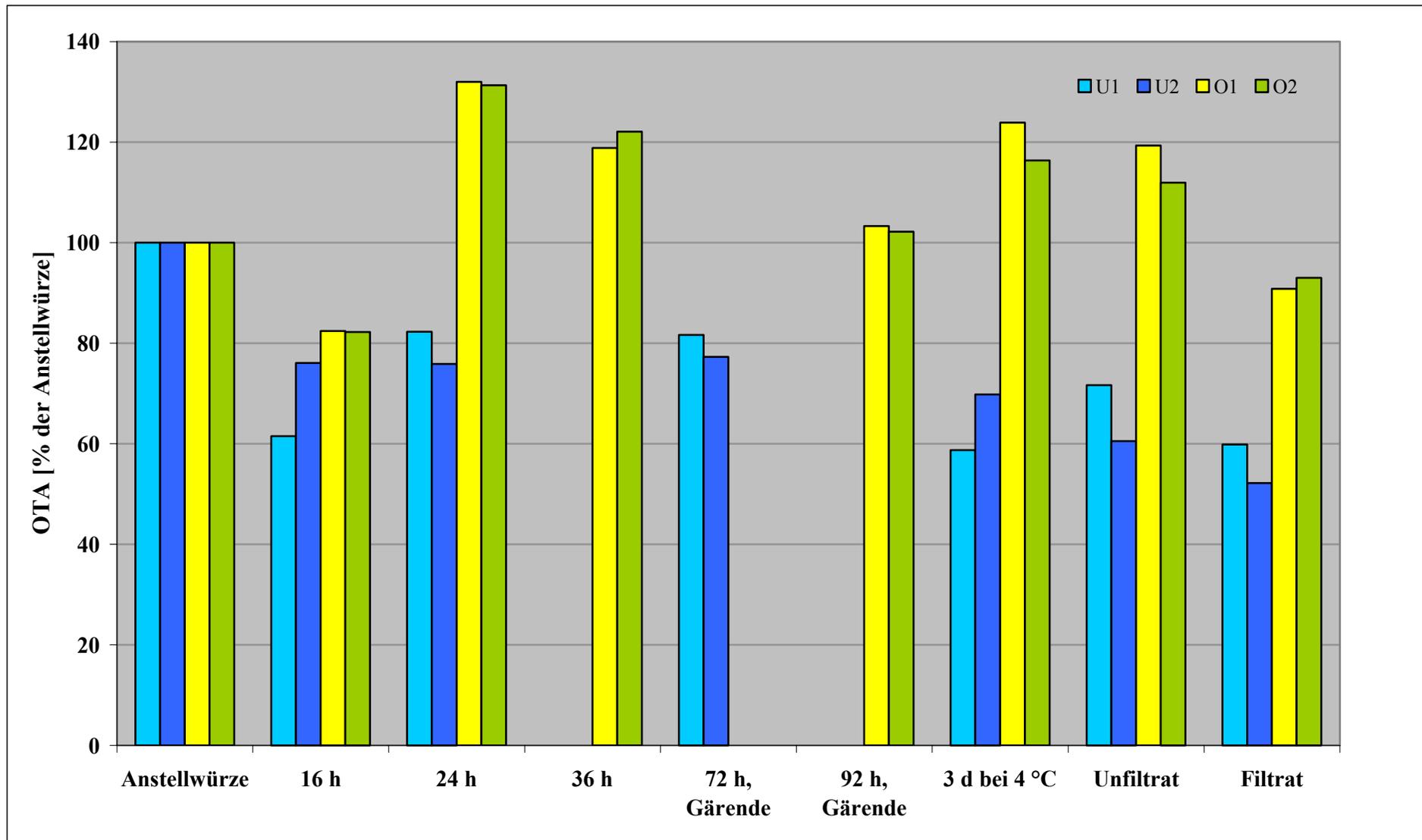


Abbildung 58: Bilanzierung der OTA-Gärungen bei 19 °C unter Druck

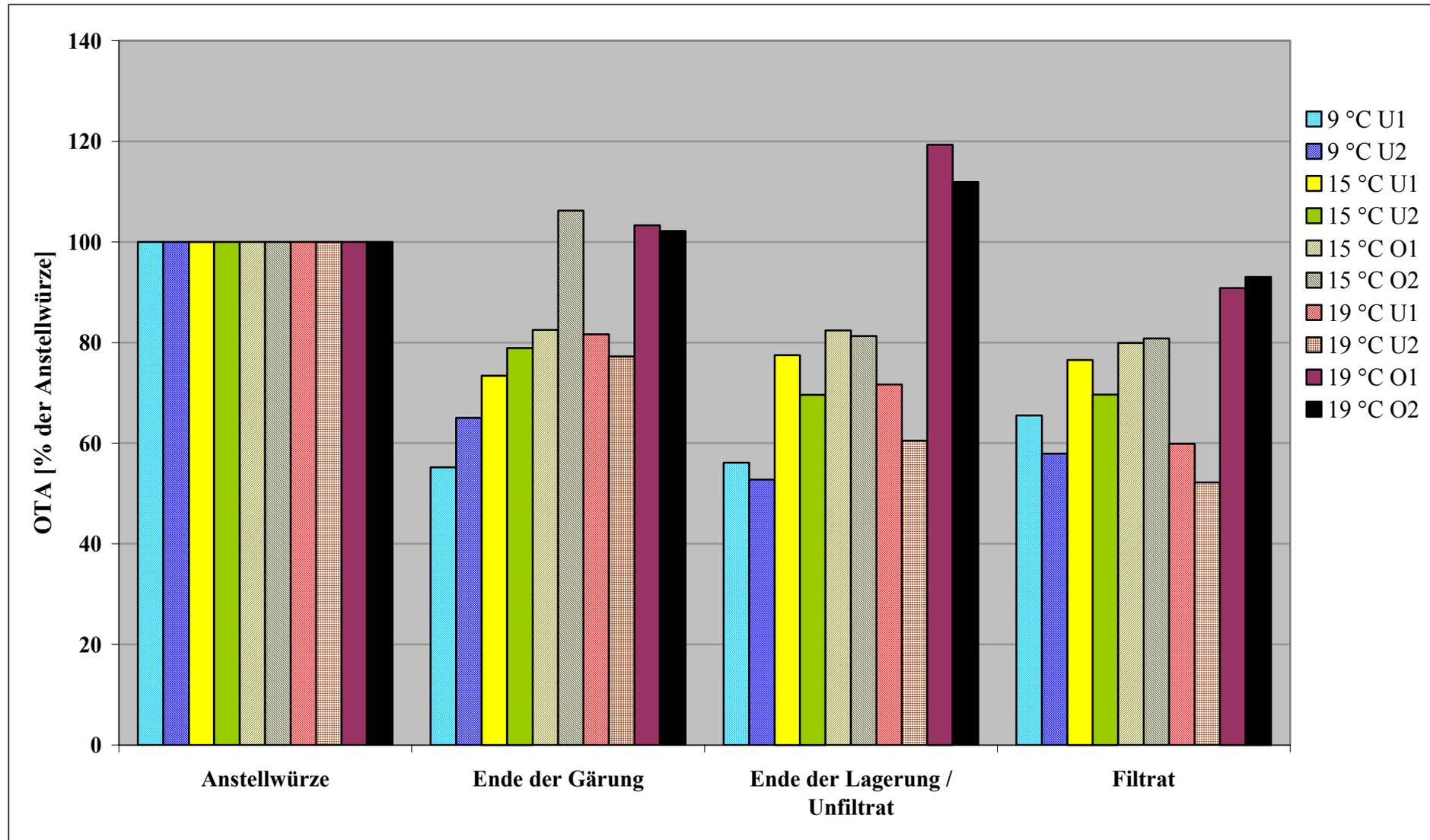


Abbildung 59: Vergleich aller Gärversuche mit OTA-kontaminierten Würzen

4 Diskussion

4.1 Maskierung von Deoxynivalenol

Parallel zu den in dieser Arbeit angestellten Versuchen bezüglich Maischen und Gärung wurde ein Screening von Gersten- und Weizenrohwaren sowie Malzen und Bieren im Zeitraum 1997/98 auf die Trichothecene Nivalenol, Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol und Zearalenon durchgeführt. Über Herkunft und Sorte können leider keine Angaben gemacht werden, allerdings handelt es sich zum größten Teil um Proben aus den Erntejahren 1996 und 1997. Für die letzten drei Toxine wurden dabei in allen Proben negative Ergebnisse verzeichnet. Die vorrangige Stellung von DON als das am meisten verbreitete *Fusarium*-Toxin [1,2,3] in Getreide konnte bei diesen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Für Weizen war allerdings auch die Anzahl der Proben mit vier Stück zu gering. Nur zwei Gerstenmuster waren positiv (2 %), wobei jedoch in beiden sowohl NIV als auch DON in relativ geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Daß es während des Mälzens zu einer Zunahme der DON-Konzentration kommen kann, zeigten BÖHM-SCHRAML [4] und BECK et al. [5]. Abnahmen wurden von FLANNIGAN et al. [6] und SCHWARZ et al. [7] beobachtet. Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, daß mit dem Wachstum von Fusarien nicht zwangsläufig eine Toxinexkretion einher gehen muß. Es ist deshalb aufgrund einer Analyse der Rohware nicht auf den zu erwartenden Toxingehalt im fertigen Malz zu schließen, geschweige denn auf ein mögliches Gushingpotential, wie in vielen Brauereien leider immer noch angenommen wird. Abhilfe können hier bisher nur Kleinmälzungsversuche schaffen.

Von den 128 untersuchten Malzproben war nur ein Gerstenmalz NIV-positiv, vier Gersten- und 17 Weizenmalze waren jedoch mit durchschnittlich 31,5 ppb bzw. 385,3 ppb DON-positiv. Dies scheint zu bestätigen, daß Weizen aufgrund der offenen Spelzen anfälliger

1 Tanaka, T.; Hasegawa, A.; Yamamoto, S.; Lee, U.-S.; Sugiura, Y.; Ueno, Y.: – In: J. Agric. Food Chem. 36 (1988), S. 979-983

2 Ellner, F. M.: – In: 21. Mykotoxin-Workshop - Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: BgVV, 1999, S. 1-4

3 Ehlig, G.; Cockburn, A.; Snowdon, P.; Buschhaus, H.: – In: 20. Mykotoxin-Workshop - Proceedings, Detmold, 8.-10. Juni 1998. Hrsg.: Wolff, J. u.a. Detmold: Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, 1998, S. 121-125

4 Böhm-Schraml, M. C.; Diss., Technische Universität München, 1995, S.149

5 Beck, R.; Süß, A.; Lepschy, J.; Palant, J.: – In: Brauwelt 46 (1992), S. 2388-2403

6 Flannigan, B.; Day, S. W.; Douglas, P. E.; McFarlane, E. B.: - In: Toxicogenic fungi – their toxins and health hazard. Eds.: Kurato, H. et al. Amsterdam: Elsevier, 1984

7 Schwarz, P. B.; Casper, H., H.; Beattie, S.: - In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

gegenüber einer *Fusarium*-Kontamination ist als Gerste. Auffällig ist der um einen Faktor 12 höhere durchschnittliche Toxinwert der positiven Weizenmalzproben.

Die 60 untersuchten Biere waren durchweg NIV-negativ und nur in zwei von 7 Proben, die DON enthielten, konnte dies im Rahmen der Bestimmungsgrenze mit 147 ppb und 310 ppb auch quantifiziert werden. Diese Werte lagen allerdings im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen [1,2,3,4] außergewöhnlich hoch. Geht man von einem Verdünnungsfaktor 1/6 von Malz zum fertigen Bier aus und läßt eine eventuelle Freisetzung von DON beim Maischen außer Acht, so ergeben sich Malzwerte von 882 ppb und 1860 ppb.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Nachweis von DON beim Maischen wurde gezeigt, daß eine dem Hauptguß zugesetzte Menge des Toxins unmittelbar nach Zugabe und Homogenisierung von unbelastetem Malz nur noch zu ca. 55 % detektiert werden konnte. Dies änderte sich bis zum Ende der Verzuckerungsrast bei 72 °C, wo 75 % gefunden wurden, nur unwesentlich. In der Vorderwürze wurden wieder nur 39 % der theoretischen Menge ermittelt. Dieser Wert blieb dann über die Kochung der Würze bis zur Ausschlagwürze konstant. Da aufgrund dieser Beobachtung kein DON durch die Nachgüsse ausgewaschen wurde und auch in den resultierenden Treber das Toxin nicht nachzuweisen war, ist anzunehmen, daß es in einer mit der hier angewandten Extraktionsmethode nicht erfassbaren Form adsorptiv an Maischeinhaltsstoffe gebunden wurde. Hierfür spricht auch die sehr kurze Zeit gleich zu Beginn des Maischens, in der die Konzentration in der Flüssigkeit absinkt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde eine Maische aus natürlich kontaminiertem Malz bilanziert, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus oben beschriebenem Versuch mit künstlicher Kontamination zu überprüfen. Um dabei eine eventuelle Freisetzung von DON, wie sie bereits von NIESSEN [5] beschrieben wurde, weitestgehend zu fördern, wurde ein Dreimaischverfahren eingesetzt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von NIESSEN, der bereits zu Maischbeginn (mit immunchemischer Analytik) eine wesentliche DON-Zunahme verzeichnete, wurden hier nur ca. 39 % der eingebrachten Menge ermittelt. Im weiteren Verlauf kam es dann zwar zu einem Anstieg bis zum Ende der dritten Teilmaischekochung, insgesamt waren aber nur etwa 112 % zu finden. Die DON-Mengenverluste in der Vorderwürze dürften auf Toxin-

1 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

2 Molto, G.; Samar, M. M.; Resnik, S.; Martinez, E. J.; Pacin, A.: – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 17 (2000) Nr. 9, S. 809-813

3 Ruprich, J. ; Ostry, V. : – In: Cent. Eur. J. public Health 3(4) (1995), S. 224-229

4 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Weber, D.: – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 10 (1993) Nr. 4, S. 381-389

5 Niessen, L. M.: Diss., Technische Universität München, 1993, S. 147-153

Reste im Treberkuchen zurückzuführen sein, die Abnahme auf unter 50 % gegenüber der erwarteten DON-Konzentration in der Ausschlagwürze konnte jedoch nicht geklärt werden. Insgesamt hat sich gezeigt, daß sich die Ergebnisse bezüglich Eiweißrast und Maltoserast nicht vergleichen lassen.

Anhand von Kochversuchen mit Deoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol in Brauwasser wurde gezeigt, daß unter diesen Bedingungen beide Toxine zu 42% bzw. 47 % zerstört werden. Dies widerspricht den eigenen Untersuchungen und den oben genannten von NIESSEN bezüglich der Thermostabilität von DON und legt die Vermutung nahe, daß Würzeinhaltsstoffe einen gewissen Schutz des Toxins gegenüber thermischer Belastung bewirken. Die Ergebnisse von SCHWARZ et al. [1], denen zufolge 15-AcDON weniger temperaturstabil zu sein scheint als DON, fanden keine Bestätigung. Gleichzeitig mit der Abnahme der 15-AcDON-Konzentration wurde allerdings die zunehmende Bildung von DON und das vorübergehende Auftreten einer unbekannt Substanz, deren Retentionszeit zwischen denjenigen von DON und 15-AcDON liegt, festgestellt. Es ist deshalb anzunehmen, daß unter Hitzeeinwirkung eine Derivatisierung von 15-AcDON zu DON über eine dritte Substanz erfolgt.

Um eine wahrscheinliche enzymatische Freisetzung von DON während des Maischens nachzuvollziehen, wurden verschiedene belastete Malze und aus solchen hergestellte Kongreßwürzen mit in Frage kommenden Enzymen inkubiert. Dabei wurden lediglich nach Behandlung mit β -Glucosidase Substanzen erhalten, die sich nach DC-Auftrennung und Anfärbung wie Trichothecene verhielten bzw. eine 12,13-Epoxygruppe, welche für die Färbung verantwortlich ist, aufwiesen. Allerdings konnten beide Verbindungen weder aufgrund ihrer Retentionszeit noch durch DAD-Spektrenvergleich einem bekannten Trichothecen zugeordnet werden. Warum es mit keinem der getesteten Enzyme zu einer Freisetzung von DON kam, dürfte zweierlei Gründe haben: Malzproben wurden in Puffern mit vom Enzymhersteller empfohlenem pH-Wert und Temperatur inkubiert, womit sich die Bedingungen ganz wesentlich von denen in Würze unterscheiden. Würzen wiederum wurden die Enzyme bei entsprechender Temperatur direkt zugesetzt, wodurch aber meist der pH-Wert nicht ideal war.

1 Schwarz, P. B.; Casper, H., H.; Beattie, S.: - In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

Aufgrund der negativen Ergebnisse mit Laborenzymen wurde erneut auf Versuche unter natürlichen Bedingungen zurückgegriffen. Dazu wurden Malzproben nach den Kriterien „Überschäumvolumen beim Gushing-Test“ und „Anzahl relevanter roter Körner in 200 g Malz“ ausgewählt und auf ihren Gehalt an DON untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß das Gushing-Potential eines Malzes in keinem Zusammenhang mit dessen DON-Gehalt steht und deshalb nur der Umkehrschluß zulässig ist, daß bei einer DON-Kontamination des Malzes auch eine Kontamination des Getreides mit Fusarien stattgefunden haben muß, weshalb die Möglichkeit eines erhöhten Gushing-Risikos besteht. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Untersuchungen von MUNAR und SEBREE [1] sowie SCHWARZ et al. [2]. Letztere fanden einen Korrelationskoeffizienten von 0,77 zwischen Gushing-Potential und DON-Konzentration eines Malzes. Desweiteren konnten anhand der Ergebnisse immer noch kursierende Gerüchte widerlegt werden, wonach von der Anzahl an relevanten roten Körnern auf eine Mykotoxinbelastung bzw. auf die Höhe einer Toxinkonzentration geschlossen werden kann.

Sicherlich zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Arbeit zählen diejenigen, welche zum Verlauf von DON-Konzentrationen in modifizierten Kongreßmaischen erzielt wurden. Hintergrund für diesen Versuchsaufbau war die Tatsache, daß im Projektzeitraum stets zu geringe Mengen an brauchbaren Malzen zur Verfügung standen, um Maischversuche im größeren Umfang mehrfach durchführen zu können. Im Verlauf der Testreihe hatte sich aber gezeigt, daß hiermit sehr viel genauere Aussagen über eine DON-Kontamination in Würze möglich sind, als dies nach alleiniger Analyse des entsprechenden Malzes möglich wäre. Zudem ist der Aufwand aufgrund automatischer Maischbäder nicht sehr viel höher. Die Maischversuche mit 14 Praxismalzen ergaben für 50 % der Proben unmittelbar nach dem Einmaischen höhere, für die andere Hälfte niedrigere Werte als durch Berechnung anhand der Malzanalysen erwartet. Dies bestätigt sowohl die eigenen Ergebnisse des Maischens mit natürlich belasteten Malzen als auch die oben diskutierten Resultate von NIESSEN. Auch im weiteren Verlauf wurden bei den einzelnen Malzproben teilweise erhebliche Schwankungen mit zeitweisen Abnahmen festgestellt, woraus deutlich wird, daß die Interaktionen von DON mit Maischeinhaltsstoffen sehr komplex sind und der Verlauf der Konzentration malzspezifisch ist. Entscheidend ist jedoch, daß am Ende des Maischprozesses für 12 der 14 Muster höhere Werte festgestellt wurden, als durch die Malzwerte berechnet. Dies entspricht wiederum

1 Munar, M. J.; Seabee, B.: – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55(3) (1997), S. 119-122

2 Schwarz, P. B.; Beattie, S.; Casper, H. H.: – In: J. Inst. Brew., Vol. 102 March-April (1996), S. 93-96

eindeutig den Ergebnissen von NIESSEN [1], während zwei Malze, mit den eigenen Erfahrungen übereinstimmend, auch hier niedrigere Werte erbrachten. Wie aus Abbildung 9 zu ersehen, konnte zwar kein brauchbarer mathematischer Zusammenhang zwischen der im Malz detektierten DON-Konzentration und der prozentualen Zunahme des daraus errechneten Würzewertes erstellt werden, aber es ist bereits eine relativ gute Abschätzung möglich. Werden sowohl der Malz- als auch der Kongreßwürzewert ermittelt, so erhält man unter Berücksichtigung der Verdampfungsziffer der jeweiligen Brauerei ein annäherndes Ergebnis der maximal meßbaren DON-Konzentration in einer Ausschlagwürze.

Die Kongreßmaischeanalysen offenbarten bei den meisten Malzproben „Toxinressourcen“, die sehr wahrscheinlich aufgrund der, möglicherweise gleichzeitigen, Wirkung verschiedener Enzyme freigesetzt wurden, was durch die Schwankungen in den Konzentrationsverläufen noch unterstrichen wird. Bei den im folgenden diskutierten Versuchsreihen wurden aus diesem Grund sog. technische Enzympräparate, die für den Einsatz in Maischen und Würzen entwickelt wurden, getestet. Maischversuche mit DON-belasteter Weizenrohware, um die malzeigenen Enzyme weitestgehend vernachlässigen zu können, und vier verschiedenen Enzympräparaten sowie einem Vergleichsversuch ohne Enzym erbrachten die höchsten meßbaren Toxinkonzentrationen jeweils nach 30 min bei 45 °C. Das ließ zunächst an eine Bindung von Deoxynivalenol an Proteine denken. Da jedoch die Präparate, die die höchsten Freisetzungen erzielten, beide β -Glucanase enthalten und der Abbau von β -Glucan bei isothermer Maische von 45 °C nach NARZISS [2] einen identischen Kurvenverlauf zeigt, war eine Bindung an diese Substanz mehr als wahrscheinlich. Durch Inkubationsversuche wurde diese Vermutung eindeutig bestätigt. Deoxynivalenol, das einer β -Glucanlösung zugesetzt wurde, konnte unmittelbar nach Zugabe nur noch zu ca. 34 % detektiert werden. Nach 30 min bei 45 °C ohne β -Glucanase wurden lediglich 42 % gemessen, mit dem Enzym jedoch über 99 %. Damit war die Möglichkeit einer Bindung von Deoxynivalenol an β -Glucan eindeutig bewiesen. Da die Maskierung sehr schnell erfolgte, dürften für Bindungen mit β -Glucan nur die drei OH-Gruppen von DON und demzufolge Wasserstoffbrückenbindungen in Frage kommen. Von β -Glucan ist bekannt, daß durch derartige Bindungen innerhalb einer Kette dessen Stabilität erhöht wird [3]. Gleichartige Untersuchungen mit Pentosanlösung zeigten zwar durch mangelnde Detektierbarkeit von ca. 10 % bis 17 % eine Bindung, allerdings

1 Niessen, L. M.: Diss., Technische Universität München, 1993, S. 147-153

2 Narziss, L.: Die Bierbrauerei, Band II, Die Technologie der Würzebereitung. Stuttgart: Enke, 1985, S. 139

3 Belitz, H. D.; Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin: Springer, 1992, S. 265

konnte durch Xylanase und das technische Enzym Beerzym keine Wiederfreisetzung erzielt werden.

Abschließende Maischversuche mit einem DON-belasteten Weizenmalz, das unterschiedlich fein geschrotet wurde, zeigten nach 30 min maischen bei 45 °C mit zunehmender Feinheit geringere DON-Konzentrationen. Daraus kann gefolgert werden, daß mit zunehmender Feinheit des Schrotes dessen Oberfläche zunimmt und somit mehr β -Glucan als Reaktionspartner freiliegt. Allerdings müßte DON dann zuerst an anderer Stelle freigesetzt werden, um hier wieder gebunden werden zu können. Eine andere Möglichkeit wäre, daß in größerem Schrot β -Glucan für den Abbau durch β -Glucanase zwar schlechter zugänglich ist, daß aber in dickeren Maischen auch ein besserer Schutz und damit eine höhere Wirksamkeit der Enzyme (gefolgt von höheren Konzentrationen an freiem DON) vorhanden ist, wie dies bei High-Gravity-Maischen beobachtet wurde.

4.2 Verhalten von Deoxynivalenol während der Gärung

Die in der Literatur bisher beschriebenen Untersuchungen zum Verhalten von DON in Bierwürze bei Vergärung durch *Saccharomyces cerevisiae* gingen, was die Art der Kontamination betrifft, von unterschiedlichen Voraussetzungen aus. So verwendeten SCOTT et al. [1] Würze, der sie Deoxynivalenol künstlich zusetzten, während SCHWARZ et al. [2] Würzen aus natürlich kontaminierten Malzen herstellten. Die Daten von JUNKERSFELD [3] stammen aus deutschen Brauereien und beschreiben somit die Situation in der Praxis. Die Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen zum Vergleich von künstlich und natürlich kontaminierten Würzen haben gezeigt, daß das Verhalten von zugesetztem DON nicht dem bei natürlichem Vorkommen entspricht. Künstlich kontaminierte Würzen zeigen zwar ebenso wie natürlich kontaminierte in den ersten 24 Gärstunden erhebliche DON-Schwankungen, allerdings liegen die Werte stets unter dem Wert der Anstellwürze. Natürlich kontaminierte Würzen hingegen lassen in diesem Zeitraum immer höhere Konzentrationen, die in diesem Fall bis zu 563 % der Ausgangskonzentration erreichten, messen. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die Verwendung künstlich kontaminierter Würzen für Versuche zum Konzentrationsverlauf von DON bei Vergärung mit *Saccharomyces cerevisiae* nicht geeignet. Die Konzentrationsverläufe

1 Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: – In: Mycotoxin Research, Vol. 8 (1992) Nr. 2, S. 58-66

2 Schwarz, P. B.; Casper, H. H.; Beattie, S.: – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

3 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

von DON sind in den beobachteten ersten 24 Stunden einer Regelkurve sehr ähnlich. Es wäre deshalb denkbar, daß das frei vorliegende Toxin bei nachträglich kontaminierter Würze in die Hefezellen diffundiert, wodurch die Konzentration in der Würze absinkt. Durch die zunehmende Konzentration im Zellplasma wird die verstärkte Expression von sog. ABC-Transportersystemen (ATP-Binding-Cassette) induziert, die DON aktiv aus den Zellen ausschleusen und bei einer bestimmten Minimumkonzentration wieder inaktiv werden. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Von ABC-Transportersystemen ist bekannt, daß sie in den Zellmembranen sowohl von Pro- als auch von Eukaryonten (auch in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen [1]) vorkommen und in der Lage sind, Aminosäuren, Zucker, Polysaccharide, Peptide, Proteine und anorganische Ionen unter ATP-Verbrauch gegen ein Konzentrationsgefälle zu transportieren [2]. Für maskiertes DON sind dreierlei Vorgänge vorstellbar. Zum einen könnte es durch Enzyme der Hefe extrazellulär von der maskierenden Substanz abgetrennt werden und anschließend der oben beschriebene Mechanismus in Gang kommen. Zum zweiten könnte es passiv in die Zelle hinein diffundieren, intrazellulär gespalten und nach Ausbildung der Transportsysteme ausgeschleust werden. Zum dritten kann maskiertes DON möglicherweise von solchen Membranproteinen in die Zellen importiert werden (evtl. durch eine für den Stoffwechsel benötigte Substanz getarnt), da sowohl Import- als auch Exportsysteme bekannt sind und Transportproteine nachgewiesen wurden, die eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen transportieren (z. B. P-Glykoprotein in menschlichem Gewebe [3]). Nach Abtrennung der maskierenden Substanz, die sehr wahrscheinlich im Stoffwechsel aufgezehrt wird, wird das freie Toxin wieder ausgeschleust, wodurch es zu einem Konzentrationsanstieg in der Würze kommt.

Eine große Versuchsreihe zur Vergärung von natürlich kontaminierter Würze mit unter- und obergärigen Hefestämmen und verschiedenen, zum Teil forcierten, Gärverfahren bestätigte die Beobachtung, daß in den ersten 24 Gärstunden gegenüber der Anstellwürze sehr viel höhere DON-Konzentrationen gemessen werden können. Da dies für alle verwendeten Hefestämmen und alle Gärverfahren der Fall war, ist davon auszugehen, daß in Würze grundsätzlich mehr DON enthalten ist, als bisher angenommen. Da bei keiner der bislang veröffentlichten Untersuchungen dieser offensichtlich wichtige Abschnitt einer genaueren

1 Kunze, G.: In: www.ipk-gatersleben.de/agruppen/ipkdeheg.htm, 28.11.2000

2 Deckwer, W.-D.; Pühler, A.; Schmid, R. D.: Römpf Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 1999, S. 2

3 Fromm, M. F.: In: pharmakologie.pharmacol.uni-mainz.de/Heft24/P-GLYK.html, 28.11.2000

Betrachtung unterzogen wurde, stellen diese Ergebnisse eine völlig neue Erkenntnis dar. Als Konsequenz muß dieses Problem deshalb aus toxikologischer Sicht einer kritischen Betrachtung unterzogen werden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, daß die hohen meßbaren Konzentrationen nur von kurzer Dauer waren und die Werte gegen Ende der Gärung bei allen Versuchen auf dem Niveau der Anstellwürze oder darunter lagen. Insgesamt hatte die Gärtemperatur nur geringen Einfluß auf den DON-Verlauf; insbesondere die Konzentrationen in den Jungbieren differierten nur unwesentlich. Die Konvektion durch das Rühren der Würze hatte vor allem in den ersten Gärstunden Einfluß auf die gemessene DON-Konzentration, was sehr viel niedrigere Höchstwerte belegte. Bezüglich des Extraktabbaus verliefen die einzelnen Gärungen normal, wenngleich mit Hefestamm 34/70 bei einer maximalen Gärtemperatur von 14 °C gegen Ende etwas schleppend. Damit konnten die Beobachtungen von BOEIRA et al. [1] und WHITEHEAD et al. [2] bestätigt werden, wonach in dem hier behandelten Konzentrationsbereich von DON keine Schädigung der Hefen stattfindet. Unklar ist immer noch, in welcher Form DON maskiert in Würze vorliegt und bei der Gärung, offensichtlich im Zusammenhang mit dem Hefewachstum, freigesetzt wird. Andererseits können die Konzentrationsabnahmen von DON im weiteren Gärverlauf nicht mit Metabolisierungen durch die Hefe erklärt werden, da BÖSWALD et al. [3] zeigten, daß dieses Toxin, im Gegensatz zu Zearalenon, von technologisch relevanten Hefestämmen nicht metabolisiert wird.

Da es in mittelständischen und kleineren Brauereien ohne eigene Hefepropagation immer noch üblich ist, eine Hefe mehrmals zu führen, konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, daß es dadurch zu einer Verschleppung von Deoxynivalenol aus einer kontaminierten Würze in eine DON-freie Würze kommt. Nach eingehender Literaturrecherche sind die hierzu in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die ersten dieser Art. Eine aus DON-belastetem Weizenmalz hergestellte Würze wurde zunächst mit einer obergärigen Hefe vergoren. Neben einer gegenüber obigen Ergebnissen vergleichsweise niedrigen DON-Konzentration im Jungbier konnte auch bei dieser Gärung ein normaler Verlauf von Extrakt- und pH-Wertabnahme festgestellt werden. Eine unbelastete Würze zeigte bei Vergärung mit der gewonnenen, „kontaminierten“ Erntehefe im Vergleich zur Gärung mit Reinzuchthefer des selben Stammes ein praktisch identisches Verhalten. Entscheidend ist jedoch, daß in der Würze mit weitergeführter Hefe zu keinem Zeitpunkt Deoxynivalenol nachgewiesen werden konnte.

1 Boeira, L. S.; Bryce, J. H.; Stewart, G. G.; Flannigan, B.: – In: J. Inst. Brew., Vol. 105 (1999) Nr. 6, S. 376-381

2 Whitehead, M. P.; Flannigan, B.: – In: J. Inst. Brew., Vol. 95 (1989), S. 411-413

3 Böswald, C.; Engelhardt, G.; Vogel, H.; Wallnöfer, P. R.: – In: Natural Toxins 3 (1995), S. 138-144

Damit wurde eindeutig belegt, daß eine Verschleppung von DON durch die Hefe praktisch ausgeschlossen werden kann.

Entgegen aller Erwartung konnten bei einer Analyse des Zellsaftes der Hefe, die in kontaminierter Würze geführt wurde, in keiner der Proben DON oder dessen Derivate nachgewiesen werden. Aufgrund der Aufschlußmethode, die auf dem Platzen der Hefezellen durch sehr hohe Scher- oder Dehnkräfte beruht, darf jedoch davon ausgegangen werden, daß die Inhaltsstoffe des Zellplasmas nicht verändert wurden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von SCHWARZ et al. [1], die bei Vergärung vier verschiedener natürlich DON-kontaminierter Würzen nur in einer Erntehefe DON tatsächlich nachweisen konnten. Puffer, der vor dem Aufschluß zum Waschen der Hefeproben diente, um eventuell anhaftenden Agglutinationsschleim zu entfernen, wurde anschließend separat untersucht, jedoch konnte auch hier DON nicht detektiert werden.

Die Analyse der Zuckerzusammensetzung einer DON-kontaminierten sowie einer unbelasteten Würze erbrachte für die belastete Würze ca. 15 % weniger vergärbare Kohlenhydrate bei gleicher Stammwürze, was auf enzymatischen Abbau und Verwertung durch die infizierenden Fusarien zurückzuführen sein dürfte. Ein Vergleich des Abbaus der verwertbaren Kohlenhydrate bei Vergärung der belasteten Würze mit Reinzuchthefer sowie der unbelasteten Würze mit Reinzuchthefer und weitergeführter Hefe aus dem belasteten Sud zeigte hinsichtlich der Gärgeschwindigkeit keine Unterschiede. Die beiden letzteren unterschieden sich allerdings im Verlauf der Maltose. Mit Reinzuchthefer erfolgte der Abbau fast linear, während mit weitergeführter Hefe eine anfängliche Verzögerung um ca. zwölf Stunden zu verzeichnen war. Anschließend wurde der Zucker jedoch umso rascher verwertet. Die gleichzeitig durchgeführte Aminosäurebilanzierung zeigte in kontaminierter Würze höhere Werte für alle Aminosäuren, außer Glutamin. Die Ursache hierfür liegt sicherlich in einem vermehrten Abbau von Weizenprotein durch die proteolytischen Enzyme der Fusarien während Wachstum und Vermälzung. Das gleiche Verhältnis wie für die Anstellwürzen wurde auch in den beiden Jungbieren ermittelt, wenngleich hier die einzelnen Werte doch deutlich differierten. Der Abbau der einzelnen Aminosäuren erfolgte in unbelasteter Würze um ca. acht Stunden schneller, was sich aber auf den Gärverlauf, wie gezeigt, nicht auswirkte. Nicht erklärt werden können die in beiden Würzen auftretenden kurzzeitigen und teilweise erheblichen Anstiege. Beide Hefen zeigten am Ende der Gärung Aminosäureverluste, wobei die Erntehefe

1 Schwarz, P. B. ; Casper, H. H.; Beattie, S.: – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995), S. 121-127

aus der kontaminierten Würze gegenüber der Erntehefe aus der unbelasteten Würze einen um 22 % geringeren Gesamtgehalt aufwies.

Die abschließenden Gärversuche im 15 l-Maßstab mit einer unter- und einer obergärigen Hefe bei 9 °C, 15 °C und 19 °C unter Druck bestätigten im wesentlichen die in dieser Arbeit bereits diskutierten Ergebnisse zum Verhalten von Deoxynivalenol während der Gärung. Unabhängig von Hefestamm oder Gärtemperatur verliefen die Extraktabnahmen in allen Ansätzen normal. Die Gäraktivität der Hefen wird somit von DON in praxisüblichen Konzentrationen nicht beeinflusst. Alle Ansätze zeigten zum Ende der Gärung hin die Tendenz zu einem leichten Anstieg der meßbaren DON-Konzentration. Nach Lagerung und Filtration konnte lediglich für die Druckgärungen eine Abnahme des Toxins unter die Werte der Anstellwürzen ermittelt werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Praxiswerten von JUNKERSFELD [1], wonach alle gemessenen Biere niedrigere Werte als die entsprechenden Würzen aufwiesen. Ungewöhnlich war, daß in sechs der zehn Biere nach der Filtration höhere Werte gefunden wurden als vorher. Derlei Phänomene konnten aber auch schon bei der Bestimmung anderer Bierinhaltsstoffe, insbesondere bei Polyphenolen, beobachtet werden. Ebenfalls keine Erklärung konnte für den Umstand gefunden werden, daß bei allen drei Versuchsreihen die DON-Konzentrationsverläufe der Parallelansätze zum Teil deutlich voneinander abwichen. Herr BOSCH vom Deutschen Brauerbund teilte jedoch mit, daß derartige Beobachtungen auch schon bei Versuchen des Verbandes mit OTA-belasteten Würzen gemacht wurden [2].

4.3 Nachweisbarkeit von Ochratoxin A während des Maischprozesses

Ebenso wie für Deoxynivalenol wurden Praxisproben auch auf Ochratoxin A untersucht. Von 11 Gerstenproben waren zwei positiv, die Werte lagen aber unterhalb der Bestimmungsgrenze.

1 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

2 Bosch, H.: Offizielle Mitteilung anlässlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium. Deutscher Brauerbund, Mai 2000

Über ähnliche Ergebnisse wurde von mehreren Autoren bereits berichtet [1,2,3]. In einer aktuellen deutschen Studie [4] über den Zeitraum 1995 – 1998 konnte dagegen in 19 von 22 Proben OTA nachgewiesen werden. Dies dürfte aber vor allem auf die sehr viel niedrigere Nachweisgrenze von 0,01 ppb zurückzuführen sein, da für die gefundenen Konzentrationen ein Medianwert von 0,100 ppb ermittelt wurde. Die selbe Studie berichtet, daß von 250 untersuchten Pils-, Export-, Weizen- und Starkbierproben über 70 % positiv waren. LEGARDA et al. [5] und JØRGENSEN [6] berichteten ähnliches. In der vorliegenden Arbeit waren von 47 untersuchten Bieren bei einer Bestimmungsgrenze von 0,1 ppb nur sieben positiv und davon 4 auswertbar, wobei relativ hohe Werte von 0,3 ppb bis 1,3 ppb gefunden wurden. EL-DESSOUKI [7] fand 1992 vor allem in Starkbieren noch höhere Werte bis 1,53 ppb. Von den 57 untersuchten Malzproben enthielten fünf, davon eine quantifizierbar, OTA. TRESSL et al. [8] fanden in 85 Malzmustern von 1982 und 1983 nur eine belastet, wobei darauf hingewiesen sei, daß die Nachweisgrenze von 5 ppb für heutige Verhältnisse mindestens um einen Faktor 50 zu hoch ist und die Ergebnisse deshalb nicht mehr als repräsentativ betrachtet werden können.

Da während des Erstellungszeitraumes dieser Arbeit weder genügend geeignetes natürlich kontaminiertes Versuchsmaterial zur Verfügung stand noch selber durch Beimpfen von Gerste mit Sporensuspension hergestellt werden konnte, mußten die Untersuchungen auf künstliche Kontamination mit OTA-Reinsubstanz beschränkt werden. Es konnte gezeigt werden, daß Ochratoxin A in Wasser nach Einmischen von unbelastetem Malzschrot nur noch zu einem Viertel nachweisbar ist. Bei weiterer Behandlung mit dem modifizierten Kongreßmaisverfahren kam es zu einer zusätzlichen Reduzierung. Wie bei Deoxynivalenol bereits diskutiert, ist aufgrund der kurzen Zeitspanne, in der das Toxin nicht mehr erfaßt werden konnte, von einer adsorptiven Bindung auszugehen, die mittels des eingesetzten Extraktionsverfahrens nicht gelöst werden kann. Ein Vergleichsansatz ohne Malzschrot zeigte, daß OTA durch die moderaten Temperaturen während des Maischens nicht beeinträchtigt wird.

1 Scudamore, K. A.; Patel, S.; Breeze, V.: – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 16 (1999) Nr. 7, S. 281-290

2 Trucksess, M. W.; Giler, J.; Young, K.; White, K. D.; Page, S. W.: - In: J. AOAC International, Vol. 82 (1999) Nr. 1, S. 85-89

3 Jørgensen, K.; Rasmussen, G.; Thorup, I.: - In: Food Additives and Contaminants, Vol. 13 (1996) Nr. 1, S. 95-104

4 Wolff, J.; Bresch, H.; Cholmakow-Bodechtel, C.; Engel, G.; Erhardt, S.; Gareis, M.; Majerus, P.; Rosner, H.; Scheuer, R.: Forschungsverbund Produkt- und Ernährungsforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Deutschland, 1999, S. 27-30

5 Legarda, T. M., Burdaspal, P.A.: – In: Alimentaria, Vol. 291 (1998), S. 115-122

6 Jørgensen, K.: – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 15 (1998), S. 550-554

7 El-Dessouki, S.: – In : Deutsche Lebensmittel Rundschau, 88. Jahrgang, 11 (1992), S. 354-355

8 Tressl, R.; Hommel, E.; Helak, B.: – In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 8 (1989), S. 331-335

Zwei im 5 l-Maßstab durchgeführte Maischversuche unter Anwendung eines praxisgerechten Infusionsmaischverfahrens bestätigten obige Beobachtungen, sowohl was die Wiederfindung nach dem Einmaischen als auch den Verlauf bis zur Vorderwürze betrifft. Durch Auswaschen der Treber mit den Nachgüssen konnte hier in der Pfannevollwürze jedoch in beiden Ansätzen der OTA-Gehalt verdoppelt werden. Während der Würzekochung kam es zu keinerlei Verlusten und in beiden Treberpartien konnte das Toxin in erheblichem Maße nachgewiesen werden. Die Differenzen zwischen den Werten der einzelnen Meßpunkte sind auf die Verwendung zweier unterschiedlicher Malze zurückzuführen. Insgesamt konnten am Ende der Würzebereitung 55 % und 89 % des eingesetzten Ochratoxins wieder nachgewiesen werden. Bezüglich der OTA-Ausbeute in den Würzen und Treber sowie der Temperaturstabilität werden diese Ergebnisse von BAXTER [1] mit natürlich kontaminiertem Malz in vollem Umfang bestätigt. KROGH et al. [2] ermittelten sowohl für kristallin zugesetztes OTA als auch für natürlich kontaminiertes Malz nur noch 11 % bis 19 % Wiederfindung in der Würze. Die Werte von CHU et al. [3] lagen im Bereich der eigenen Resultate. NIP et al. [4] erfaßten 28 % und 39 % einer eingesetzten Menge radioaktiv markierten OTAs in den Trebern. Über die Maskierung des Toxins beim Einmaischen bzw. über eine Freisetzung aus natürlich kontaminiertem Malz sind bisher keine Daten aus der Literatur verfügbar. Eigene Versuche, aufbauend auf den Ergebnissen der gezeigten DON-Maskierung, hatten zwar in zwei β -Glucanlösungen unterschiedlicher Konzentrationen ca. 40 %ige Verluste bei der Nachweisbarkeit von OTA zur Folge, eine Wiederfreisetzung durch β -Glucanase fand aber nicht statt. Etwas irritierend waren die Resultate bei OTA-Zugabe in Pentosanlösung. Konnten unmittelbar nach Homogenisierung des Toxins nur noch 24 % detektiert werden, war nach 30 min bei 45 °C sowohl mit als auch ohne Enzyme, abgesehen von Xylanase mit 91 %, was sehr wahrscheinlich auf einer Meßungenauigkeit beruht, wieder die komplette Menge nachzuweisen. Eine Erklärung hierfür gibt es bisher nicht. Eine mögliche Maskierung von OTA durch Proteine konnte mangels geeigneten Probenmaterials nicht dargestellt werden. Die künstliche Kontamination von Maische schien jedoch für derartige Versuche ungeeignet, da bereits für DON ein unterschiedliches Freisetzungsverhalten von künstlich und natürlich kontaminierten Maischen gezeigt wurde (vgl. Abbildung 3 u. Abbildung 5).

1 Baxter, E. D.: WBC Session IV, 024, July 2000

2 Krogh, P.; Hald, B.; Gjertsen, P.; Myken, F.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 28 (1974) Nr. 1, S. 31-34

3 Chu, F. S.; Chang, C. C.; Ashoor, S. H.; Prentice, N.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 29 (1975) Nr. 3, S. 313-316

4 Nip, W. K.; Chang, F. C.; Chu, F. S.; Prentice, N.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 30 (1975) Nr. 6, S. 1048-1049

4.4 Verhalten von Ochratoxin A während der Gärung

Da zum Nachweis einer OTA-Konzentration während der Vergärung von Bierwürze mit *Saccharomyces cerevisiae* bisher keine Daten aus der Literatur zur Verfügung standen, wurde zu Beginn dieser Untersuchungsreihe einer unbelasteten Würze das Toxin als Reinsubstanz zugesetzt und mit einer unter- und einer obergärigen Hefe vergoren. Bei Betrachtung der Werte zu Gärbeginn fiel auf, daß, selbst unter Berücksichtigung der relativ schlechten Wiederfindungsraten der Extraktionen, nur mehr etwa die Hälfte der eingesetzten OTA-Mengen meßbar war. Im weiteren Verlauf blieb das Niveau der Konzentrationen nahezu unverändert. Es kam zum Gärende hin zu keinen wesentlichen OTA-Abnahmen. Die Gärungen verliefen bezüglich der Extraktabnahme jedoch normal. Keine Erklärung konnte für die mehrmaligen Einbrüche in den OTA-Konzentrationskurven gefunden werden. Extraktions- oder Meßfehler wurden durch Überprüfung der fraglichen Proben ausgeschlossen, zumal diese erniedrigten Werte bei beiden Gärungen und zudem zu unterschiedlichen Zeiten auftraten. Aufschluß und Extraktion der Hefen erbrachten in allen Proben durchweg positive Ergebnisse, deren Schwankungsbreiten allerdings sehr groß waren und keinen linearen Verlauf erkennen ließen. Dies ist sehr wahrscheinlich in dem manuellen Aufschluß mittels Seesand und Mörser begründet. Es konnte aber hinsichtlich einer qualitativen Aussage festgestellt werden, daß die OTA-Defizite in den Würzen nicht mit den in den Hefen gefundenen Mengen erklärt werden können. Die Tatsache, daß bereits in den ersten Hefeproben, also sofort nach dem Anstellen, OTA detektiert wurde, deutete auf eine Anlagerung des Toxins an die Hefe hin. In einem expliziten Versuch konnte dies bestätigt werden. Von einer als freies OTA in einer Würze vorhandenen Konzentration waren unmittelbar nach Hefezugabe und Homogenisierung nur noch 61 % nachweisbar. Aufgrund der kurzen Zeitspanne von ca. einer Minute von der Hefegabe bis zu Probenahme und Extraktion ist ein Transport, ob aktiv oder passiv, in die Hefezelle nahezu auszuschließen. Vielmehr scheint sich das Toxin an den Agglutinationsschleim der Hefen anzulagern.

Da nicht auszuschließen war, daß in natürlich kontaminierten Würzen OTA auch maskiert und somit nicht detektierbar vorliegt, wurden für die hier diskutierten Gärversuche die Würzen aus einem oben beschriebenen Sud nach dem Infusionsmaisverfahren verwendet. Dadurch war sichergestellt, daß das Toxin, ähnlich wie bei natürlich kontaminierten Maischen, mit Maischeinhaltsstoffen reagieren konnte. Anhand von jeweils vier unter- und vier obergärigen Hefestämmen und zwei verschiedenen Gärtemperaturen konnte bis auf Stamm 128

bei 15 °C in allen Ansätzen innerhalb der ersten Stunden eine meist deutliche Abnahme der OTA-Konzentration gezeigt werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden belegen die erfaßten Daten, ähnlich wie bei Deoxynivalenol, zum Teil erhebliche Schwankungen, weshalb eine Regelung der OTA-Diffusion in die Hefezellen mittels ABC-Transportern und entsprechenden Vorgängen auch hier in Erwägung zu ziehen ist. Dafür würde auch sprechen, daß der Stoffwechsel untergäriger Hefestämme bei höherer Temperatur forciert ist und dadurch die Expression der Transportproteine in den Zellmembranen schneller erfolgt, weshalb der anfängliche Konzentrationsabfall und die folgenden Schwankungen von OTA in der Würze geringer ausfallen als bei niedriger Temperatur. Am Ende der Gärungen lagen die Konzentrationen in allen Ansätzen unter den Werten der Anstellwürzen, wenngleich die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen einer Heferasse bei den jeweils klassischen Gärtemperaturen größer sind als bei den weniger üblichen Temperaturen. Ersteres stimmt mit allen bisher veröffentlichten und oben genannten Untersuchungen von KROGH et al., CHU et al., NIP et al. und BAXTER überein, zu letzterem gab es bisher keine Daten. Auch die Praxiswerte aus deutschen Brauereien von JUNKERSFELD [1] belegen dies eindeutig. Aufgrund dieser Beobachtungen sind für Untersuchungen zum Verlauf von OTA während der Gärung auf jeden Fall natürlich kontaminierte, mindestens aber maischekontaminierte Würzen, nachträglich kontaminierten Würzen vorzuziehen.

Die Analyse von Hefeproben der Gärstadien nach 4 und 24 Stunden sowie 6 Tagen bestätigte die vormals erwähnte schlechte Extrahierbarkeit von Hefe hinsichtlich OTA, obwohl der Aufschluß hier mit dem French-Press-Verfahren durchgeführt wurde. Bei Doppelbestimmung konnte, wenn überhaupt, nur jeweils ein Wert gefunden werden. Der Waschpuffer, mit dessen Hilfe wiederum vor Extraktion der Hefen deren Agglutinationsschleim entfernt wurde, erbrachte zwar etwas bessere Ergebnisse bezüglich des Nachweises, allerdings differierten hier die Werte einer Doppelbestimmung meist erheblich. Es konnte aber gezeigt werden, daß in den Hefeaufschlüssen erst nach sechs Gärtagen OTA zu finden ist, während in fast allen Waschpufferfraktionen bereits nach 24 Stunden positive Nachweise möglich waren. Diese Beobachtung bestätigt einerseits die vermutete Adsorption des Toxins an die Hefe, andererseits ist aber unklar, warum dann nicht schon in den Fraktionen nach vier Gärstunden OTA gefunden wurde, wenngleich in den Würzen entsprechende erhebliche Konzentrationsabnahmen zu verzeichnen waren. Unter Umständen wäre eine

1 Junkersfeld, L.: Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999

Maskierung denkbar, wie GOLL et al. [1] sie nach Applikation von kristallinem OTA an Gerstenzellkulturen durch Assoziation vor allem an deren Proteinfraction beobachteten. OTA war dadurch mit der Routineanalytik nicht mehr erfaßbar und wurde erst im Magen-Darm-Trakt von Ratten wieder bioverfügbar. Auch NIP et al. [2] konnten mittels radioaktiver Markierung sowohl in Erntehefe als auch in Gelägerhefe Ochratoxin A nachweisen, wobei dieses aber nach dünn-schichtchromatographischer Quantifizierung nur 52-95 % der entsprechenden Radioaktivitätsmessung ausmachte. Offensichtlich wurde OTA metabolisiert.

In Anlehnung an die Untersuchungen zu DON wurde auch OTA hinsichtlich des Aspekts einer möglichen Verschleppung durch weitergeführte Hefe betrachtet. Hierzu wurden die kontaminierten Würzen aus den Infusionsmaischversuchen vergoren und die Erntehefepartien anschließend ein zweites Mal in unbelasteter Würze geführt. Da nach Analyse der Proben verschiedener Gärstadien zu keinem Zeitpunkt Ochratoxin A im Rahmen der Nachweisgrenze erfaßt werden konnte, ist eine Verschleppung offensichtlich nicht möglich. Dies ist umso erstaunlicher, wenn man in Betracht zieht, daß OTA sowohl in der Hefe als auch vor allem im Agglutinationsschleim gefunden wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen kann deshalb festgestellt werden, daß Hefen während der Gärung einen gewissen Reinigungseffekt auf mit Ochratoxin A kontaminierte Würzen ausüben und diese sozusagen zum Teil nachträglich sanieren. Dies dürfte umso mehr der Fall sein, wenn durch Hefepropagation immer frische Hefe zur Verfügung steht und diese nach einmaliger Führung verworfen wird. Ob OTA dabei allein durch Adsorption an den Agglutinationsschleim, Assoziation an Bestandteile bzw. verschiedene Fraktionen der Zelle, Metabolisierung oder möglicherweise durch eine Kombination dieser Überlegungen in dem entsprechenden Maße aus der Würze entfernt wird oder zumindest nicht mehr nachweisbar ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Als letzte Versuchsreihe dieser Arbeit wurden drei praxisnah, d. h. in der Maische kontaminierte Würzen hergestellt und unter identischen Bedingungen wie für Deoxynivalenol beschrieben, vergoren. Damit konnten alle bisher diskutierten Beobachtungen weitgehend bestätigt werden. Die Gärungen verliefen anhand des Extraktabbaus wiederum alle völlig normal und die Parallelansätze absolut identisch. Der untergärige Hefestamm 34/70 erbrachte bei allen drei Gärverfahren, 9 °C, 15 °C und 19 °C unter Druck, sowohl am Gärende als auch

1 Goll, M.; Bokern, M.; Harms, H.: – In: 19. Mykotoxin-Workshop - Proceedings, München, 2.-4. Juni 1997. Hrsg.: Märklbauer, E. u.a. München, 1997, S. 127-131

2 Nip, W. K.; Chang, F. C.; Chu, F. S.; Prentice, N.: – In: Appl. Microbiol., Vol. 30 (1975) Nr. 6, S. 1048-1049

im fertigen Bier niedrigere Konzentrationen als in den Anstellwürzen. Auch hier konnte, wie bereits mit DON festgestellt, im 9 °C-Bier ein leichter Anstieg während der Filtration beobachtet werden, obwohl über Faltenfilter mit Kieselgur filtriert wurde. Für den obergärigen Hefestamm 68 wurden bei 15 °C in einer von zwei parallelen Gärungen höhere, in der anderen niedrigere Konzentrationen bis zum Gärende gemessen. Nach Reifung und Lagerung lagen auch diese beiden unter dem Anfangsniveau. Bei 19 °C Druckgärung zeigten beide Parallelansätze nahezu identische, aber erhöhte Werte bis ins Unfiltrat, und erst durch Filtration fielen die Konzentrationen unter die Ausgangswerte. Vergleicht man nur die Ergebnisse der fertigen Biere mit den Daten aus der Literatur, so sind diese mit allen bisherigen Untersuchungen konform. Zum Problem der zum Teil deutlich differierenden Parallelansätze kann hier nur noch einmal Herr BOSCH vom Deutschen Brauerbund zitiert werden, der anlässlich einer Sitzung des Forschungsbegleitenden Gremiums der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft mitteilte, daß derartige Beobachtungen auch bereits bei Untersuchungen seines Verbandes gemacht wurden und auch dort nicht erklärt werden konnten. Der Vergleich aller Gärversuche zeigt, daß hinsichtlich der detektierbaren OTA-Konzentration im Bier für den untergärigen Stamm 34/70 die klassische Gärung bei 9 °C am besten geeignet ist. Der obergärige Stamm 68 scheint die Nachweisbarkeit von OTA offensichtlich etwas weniger beeinflussen zu können, wobei einer drucklosen Gärung auf jeden Fall der Vorzug zu geben ist. Auf die Gärleistung hatte die OTA-Belastung der Würze auch hier keinen Einfluß.

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwar viele Fragestellungen gelöst werden, gleichzeitig ergaben sich aber auch viele neue Probleme und Fragen. So gibt es neben den gezeigten sicherlich noch weitere Möglichkeiten der Maskierung von DON wie auch von OTA. Durch eine Fraktionierung von Malz in die verschiedenen Stoffgruppen Kohlenhydrate, Proteine und Lipide sowie eine anschließende weitere Auftrennung sind sicherlich noch vertiefende Erkenntnisse zu gewinnen. Dazu bedarf es aber einer wahrscheinlich sehr aufwändigen Anpassung und Optimierung der Methoden an die jeweilige Stoffklasse. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem DON und OTA könnte evtl. geklärt werden, warum unmittelbar nach Zugabe von geschrotetem Malz zu kontaminiertem Wasser ein erheblicher Teil nicht mehr nachweisbar ist und warum DON, möglicherweise auch OTA, beim Kochen in Würze stabiler ist als in Wasser. Durch Auftrennung der Maischeinhaltsstoffe könnte es einerseits möglich sein, die Ursache für die Schwankungen der Toxinkonzentration während des Maischens natürlich kontaminierter Malze nach dem modifizierten Kongreßmaisverfahren zu definieren und andererseits herauszufinden, warum einige wenige Malze in den Würzen geringere DON-Konzentrationen zeigen als errechnet und nicht mehr. Im Bereich der Gärung wurde eine ganze Reihe von Fragen aufgeworfen, für deren Bearbeitung die Verwendung von radioaktiv markierten Toxinen sehr vielversprechend erscheint. So wäre es wichtig zu wissen, durch welche Würzeinhaltsstoffe DON bzw. OTA maskiert und von der Hefe freigesetzt werden können sowie den Verbleib des nicht mehr nachweisbaren Anteils der Toxine nach Gärung und Lagerung zu eruieren. Mit biochemischen bzw. molekularbiologischen Methoden müßte der Vermutung nachgegangen werden, wie die Toxine in die Hefezellen gelangen und ob wirklich Regelsysteme auf Basis von ABC-Transportern in den Zellen etabliert sind.

6 Zusammenfassung

Anhand eines Screenings von Gersten- und Weizenrohwaren sowie Malzen und Bieren im Zeitraum 1997/98 konnte bestätigt werden, daß Weizen aufgrund der fehlenden Spelzen offensichtlich anfälliger gegen *Fusarium*-Infektionen ist als Gerste. Dies resultierte in sehr viel mehr und höher mit DON kontaminierten Malzen. In den untersuchten Bieren war das Toxin nur vereinzelt festzustellen. Dies galt für OTA bei allen untersuchten Produktgruppen, ebenso wie für NIV. Andere Mykotoxine konnten nicht nachgewiesen werden. Es wurde aber deutlich, daß weder zwischen dem Gushing-Potential eines Malzes und dessen DON-Gehalt noch zwischen der Anzahl an relevanten roten Körnern und dem DON-Gehalt ein Zusammenhang besteht.

Bei der Durchführung von Maischversuchen zeigte sich, daß sowohl DON- als auch OTA-Reinsubstanz nach Zugabe von unbelastetem Malzschrot nur noch zu einem Viertel bis zur Hälfte der eingesetzten Menge nachgewiesen werden können. Aufgrund der Geschwindigkeit, mit der diese Verluste eintreten, ist von einer Maskierung beider Toxine durch Adsorptionsreaktionen an Maischeinhaltsstoffe auszugehen. Untersuchungen von natürlich DON-kontaminierten Malzen beim Vermaischn mittels eines modifizierten Kongreßmaisverfahrens ergaben, daß der Verlauf einer DON-Konzentration während dieses Prozesses malzspezifisch ist. Die Toxinzunahmen, welche in fast 90 % der Fälle zu beobachten waren, sind in erster Linie von der Höhe der Konzentration im Malz abhängig. Durch die Analyse einer entsprechend hergestellten Kongreßwürze kann unter Berücksichtigung der Verdampfungsziffer der jeweiligen Brauerei die zu erwartende maximale DON-Konzentration einer Ausschlagwürze sehr gut bestimmt werden. Die Würzekochung überstehen beide Toxine unbeschadet, was wohl auf einen gewissen Schutz durch Würzeinhaltsstoffe zurückzuführen ist, da beim Kochen von DON in Brauwasser eine teilweise Zerstörung der Substanz herbeigeführt werden konnte. Im Gegensatz zu DON nimmt die meßbare OTA-Menge während des Maischens ab. Ausbeuten von 40-60 % in der Würze werden erreicht, wobei Literaturdaten bestätigen, daß künstlich und natürlich kontaminierte Maischen gleichzusetzen sind. Nicht unerhebliche Mengen des Toxins können mit den Trebern ausgeschieden werden, während dies für DON nur in geringem Maß zutrifft.

Enzymatische Aufschlüsse DON-belasteten Materials mit sog. technischen Enzympräparaten zeigten eine Freisetzung des Toxins bei Einwirkung von β -Glucanase. Durch entsprechende Versuche mit β -Glucanlösung konnte sowohl die sehr rasche Maskierung bei Zugabe von DON als auch die nahezu 100 %ige Demaskierung bestätigt werden. In Pentosanlösung wurde das Toxin zwar gebunden, verblieb jedoch nach Inkubation mit Enzymen in diesem Zustand. OTA konnte mit β -Glucanlösung zwar gebunden aber nicht wieder

freigesetzt werden. In Pentosanlösung fand anfänglich eine weitgehende Maskierung statt, die sich jedoch auch ohne Enzyminkubation nach 30 min wieder vollständig löste.

Bei Gärversuchen mit DON-belasteten Würzen wurde festgestellt, daß diese offensichtlich weitaus höhere Konzentrationen des Toxins enthalten können, als nach Analyse der Ausschlagwürzen angenommen. Untersuchungen an nachträglich kontaminierten Würzen scheinen deshalb aus praktischer Sicht nicht sinnvoll. Bei Vergärung natürlich kontaminierter Würzen lagen gegen Ende der Gärungen die Jungbiere bezüglich des DON-Gehaltes im Durchschnitt auf dem Niveau der Anstellwürzen, wobei sowohl Tendenzen zu höheren als auch zu niedrigeren Werten beobachtet wurden. Die Parameter Hefestamm und Gärtemperatur zeigten keinen wesentlichen Einfluß. Die Konvektion bei der Rührgärung bewirkte in den ersten Gärstunden sehr viel niedrigere maximal meßbare Toxinkonzentrationen und druckvergozene Biere zeigten nach Reifung und Lagerung erheblich niedrigere Werte als dies bei drucklos geführten Gärungen der Fall war.

Die Gegenwart von DON hatte auch auf den Verlauf von Zucker- und Aminosäurespektren keine entscheidenden Einflüsse, was durch einwandfreie Gärverläufe bei allen durchgeführten Versuchen bestätigt wurde. In der Hefe bzw. deren Agglutinationsschleim konnte zu keinem Zeitpunkt DON nachgewiesen werden und auch eine Verschleppung des Toxins durch Weiterführen von Erntehefe kann aufgrund der Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen werden.

Auch mit OTA wurde festgestellt, daß nachträglich kontaminierte Würzen für Untersuchungen ungeeignet sind, da es hier, im Gegensatz zu maische- oder natürlich kontaminierten Würzen, zu keinerlei Toxinabnahmen während der Gärung kommt. Allerdings konnte damit eine Maskierung der Substanz allein durch die Zugabe von Hefe beobachtet werden, was eine Adsorption an den Agglutinationsschleim nahelegt. Gärversuche mit verschiedenen unter- und obergärigen Hefestämmen bei unterschiedlichen Temperaturen führten zu dem Schluß, daß OTA den Gärverlauf bzw. die Gäraktivität der Hefen in natürlich vorkommenden Konzentrationen nicht beeinflußt und es in fast jedem Fall zu einer Abnahme der Toxinkonzentration kommt. Eine Ausnahme stellt die Druckgärung mit einem obergärigen Stamm dar, bei der diese Abnahmen nicht zu verzeichnen waren.

Die Analyse von Hefeproben und deren Agglutinationsschleim erbrachte bei letzterem im Gärverlauf früher positive Resultate als in den Hefen, was die Vermutung einer Anlagerung unterstreicht. Anhand der Werte aus diesen Analysen können jedoch die Toxinverluste in den Würzen nicht erklärt werden. Aus praktischer Sicht ist aber hervorzuheben, daß auch für OTA

eine Verschleppung durch Weiterführung von Erntehefe aufgrund der ermittelten Resultate auszuschließen ist.

7 Literaturverzeichnis

Bamburg, J. R.: Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins. – In: Progress in molecular and subcellular biology. Vol. 8. Hrsg.: F. E. Hahn. Berlin: Springer, 1983.

Bamburg, J. R.: Chemical and biochemical studies of trichothecene mycotoxins. – In: Mycotoxins and other fungal related food problems. Washington D.C.: Advances in Chemistry Series 149 (1976).

Baxter, E. D.: The behaviour of ochratoxin A in brewing. WBC Session IV, 024, July 2000.

Beck, R.; Süß, A.; Lepschy, J.; Palant, J.: Untersuchungen zur Kenntnis der Mikrobiologie von Braugerste und Brauweizen. – In: Brauwelt 46 (1992).

Belitz, H. D.; Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin: Springer, 1992, 966 S.

Bock, B.: Zusammensetzung des Kohlenhydratspektrums während der Gärung unter Berücksichtigung der Hefeweiterführung – Verwendung von toxinhaltigem und toxfreiem Weizenmalz. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1998.

Boeira, L. S.; Bryce, J. H.; Stewart, G. G.; Flannigan, B.: Inhibitory effect of Fusarium mycotoxins on growth of brewing yeasts. 2. Deoxynivalenol and nivalenol. – In: J. Inst. Brew., Vol. 105 (1999) Nr. 6.

Böhm-Schraml, M. C.: Fusarienwachstum und Toxinbildung während der Mälzung – Entwicklung von Selektivnährböden zum Nachweis toxinbildender Fusarien. Diss., Technische Universität München, 1995.

Böswald, C.; Engelhardt, G.; Vogel, H.; Wallnöfer, P. R.: Metabolism of the Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. – In: Natural Toxins 3 (1995).

Bosch, H.: Offizielle Mitteilung anlässlich der Berichterstattung vor dem Forschungsbegleitenden Gremium. Deutscher Brauerbund, Mai 2000.

Boudra, H.; Bars Le, P.; Bars Le, J.: Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. – In: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 61 (1995) Nr. 3.

Bubien, J. K.; Lundeen, G.; Templeton, C.; Woods, W. T.: Effects on the circulatory system. – In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989.

Cerutti, G.; Vecchio, A.; Finoli, C.; Trezzi, A.: Indices of quality for beer. Part 3: Mycotoxins. – In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 11 (1987).

Chu, F. S.; Chang, C. C.; Ashoor, S. H.; Prentice, N.: Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. – In: Appl. Microbiol., Vol. 29 (1975) Nr. 3.

Deckwer, W.-D.; Pühler, A.; Schmid, R. D.: Römpp Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 1999, 878 S.

Donhauser, S.; Wagner, D.: Zucker- und Endvergärungsgradbestimmung mittels HPLC. – In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 43 (1990).

Donhauser, S.; Wagner D.; Meier, G.: Bestimmung der Aminosäuren in Malzen und Würzen mittels der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). – In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 11 (1986).

Donhauser, S.; Weideneder, A.; Winnewisser, W.; Geiger, E.: Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier. – In: Brauwelt 32 (1990).

Drawert, F. (Hrsg.): Brautechnische Analysenmethoden. Band I. 2. Aufl. neubearbeitet und ergänzt. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK, 1984, 278 S.

Ehlig, G.; Cockburn, A.; Snowdon, P.; Buschhaus, H.: Die Bedeutung des Fusarium Toxins Deoxynivalenol (DON) für die Gesundheit von Mensch und Tier. – In: 20. Mykotoxin-Workshop – Proceedings, Detmold, 8.-10. Juni 1998. Hrsg.: Wolff, J. u.a. Detmold: Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, 1998.

El-Dessouki, S.: Ochratoxin A in Bier. – In: Deutsche Lebensmittel Rundschau, 88. Jahrgang, 11 (1992).

Ellner, F. M.: 1998 – Ein Jahr für Fusariumtoxine. – In: 21. Mykotoxin-Workshop – Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: BgVV, 1999.

Engelhardt, G.: Mykotoxine – Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. – In: www.lfe.bayern.de/lebensmittel/mykotox.html, 14.09.1999.

Engelhardt, G.: Ochratoxin A: Bildung, Vorkommen und Wirkung. – In: www.lfe.bayern.de/aktuell/1997/ochratoxina2.html, 18.01.2000.

Ferreira, N. P.; Pitout, M. J.: The biogenesis of ochratoxin. – In: J. S. Afr. Chem. Inst. XXII (1969).

Feuerstein, G.; Lorenzana, R. M.: Effects of trichothecene mycotoxins on the nervous system. – In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiologic effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989.

Fischbach, H.; Rodericks, J. H.: Current efforts of the Food and Drug Administration to control mycotoxins in food. – In: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56 (1973).

Flannigan, B.; Day, S. W.; Douglas, P. E.; McFarlane, E. B.: Growth of mycotoxin producing fungi associated with malting of barley. – In: Toxigenic fungi – their toxins and health hazard. Eds.: Kurato, H. et al. Amsterdam: Elsevier, 1984.

Fromm, M. F.: Die Bedeutung von P-Glykoprotein als intestinale Absorptionsbarriere und als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke für Pharmakokinetik und Gewebekonzentrationen von Arzneimitteln. – In: pharmakologie.pharmacol.uni-mainz.de/Heft24/P-GLYK.html, 28.11.2000.

Gjertsen, P.; Myken, F.; Krogh, P.; Hald, B.: Malting and brewing experiments with ochratoxin A and citrinin. – In: European Brewery Convention – Proceedings of the 14th Congress, Salzburg 1973. Amsterdam: Elsevier, 1974, 518 S.

Goll, M.; Bokern, M.; Harms, H.: Bioverfügbarkeit von Ochratoxin A unterschiedlicher Herkunft. – In: 19. Mykotoxin-Workshop – Proceedings, München, 2.-4. Juni 1997. Hrsg.: Märtilbauer, E. u.a. München, 1997.

Helmstadt, J.: Untersuchung des Aminosäuregehaltes in Würze und Hefe – Verwendung von toxinhaltigem und toxfreiem Weizenmalz. Studienarbeit, Technische Universität München, 1998.

Ishii, K.; Ando, Y.; Ueno, Y.: Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. 9. Isolation of vomiting factors from moldy corn infected with *Fusarium* species. – In: Chem. Pharmacol. Bull. 23 (1975).

Jørgensen, K.: Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 15 (1998).

Jørgensen, K.; Rasmussen, G.; Thorup, I.: Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 13 (1996) Nr. 1.

Joffe, A. Z.: Alimentary Toxic Aleucia. – In: Microbial Toxins, Vol. 7. Algal and fungal toxins. New York: Academic Press, 1971.

Joffe, A. Z.: *Fusarium* species: their biology and toxicology. 1. Aufl. New York: Wiley & Sons, 1986.

Junkersfeld, L.: Untersuchungen auf Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Projekt R 345, Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft, 1999.

- Koch, C.: Bundesministerium für Gesundheit sucht Grenzwert für Fusariengift in Weizenmehl und Brot. – In: DEMETER Bayern, Rundbrief Nr. 44, 2000.
- Krogh, P.; Hald, B.; Gjertsen, P.; Myken, F.: Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. – In: Appl. Microbiol., Vol. 28 (1974) Nr. 1.
- Kunze, G.: Arbeitsgruppe Hefegenetik – Forschungsgebiet. – In: www.ipkgatersleben.de/agruppen/ipkdeheg.htm, 28.11.2000.
- Lauren, D. R.; Agnew, M. P.: Multitoxin Screening Method for *Fusarium* Mycotoxins in Grains. – In: J. Agric. Food Chem. 39 (1991).
- Legarda, T. M., Burdaspal, P.A.: Ochratoxin A in beers manufactured in Spain and other European countries. – In: Alimentaria, Vol. 291 (1998).
- Leibetseder, J.: Die Bedeutung der Mykotoxine für Mensch und Tier. – In: Ernährung/Nutrition Vol. 13 (1989) Nr. 12.
- Leyk, W.: Untersuchungen zur Bedeutung von Mykotoxinen in der Schweinehaltung. – In: 21. Mykotoxin-Workshop – Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), 1999.
- Marasas, W. F. O.; Nelson, P. E.: Mycotoxicology – Introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man. 1. Aufl. University Park and London: The Pennsylvania State University Press, 1987.
- Matsuoka, Y.; Kubota, K.: Studies on mechanisms of Diarrhea induced by fusarenon X, a trichothecene mycotoxin from *Fusarium* species: fusarenon X induced Diarrhea is not mediated by cyclic nucleotides. – In: Toxicol. Appl. Pharmacol. 91 (1987).
- Milanez, T. V.; Leitao, M. F. F.: The effect of cooking on ochratoxin A content of beans, variety “Carioca”. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 13 (1996) Nr. 1.
- Molto, G.; Samar, M. M.; Resnik, S.; Martinez, E. J.; Pacin, A.: Occurrence of trichothecenes in Argentinian beer: a preliminary exposure assessment. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 17 (2000) Nr. 9.
- Munar, M. J.; Sebree, B.: Gushing – a malter's view. – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55(3) (1997).
- Narziss, L. (Hrsg.): Die Bierbrauerei. Band II, Die Technologie der Würzebereitung. 6. Aufl. neu bearbeitet. Stuttgart: Enke, 1985, 385 S.

Niessen, L. M.: Entwicklung und Anwendung immunochemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger Fusarium-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren. Diss., Technische Universität München, 1993.

Niessen, L.; Böhm-Schraml, M.; Vogel, H.; Donhauser, S.: Deoxynivalenol in commercial beer – screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. – In: Mycotoxin Research, Vol. 9 (1993) Nr. 2.

Niessen, L.; Donhauser, S.; Weideneder, A.; Geiger, E.; Vogel, H.: Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malzen. – In: Brauwelt 131 (1991).

Nip, W. K.; Chang, F. C.; Chu, F. S.; Prentice, N.: Fate of ochratoxin A in brewing. – In: Appl. Microbiol., Vol. 30 (1975) Nr. 6.

N. N.: Bodenbearbeitung mindert Fusarienbefall. – In: Ernährungsdienst, 08.12.1999.

N. N.: RIDASCREEN Ochratoxin A – Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A. Arbeitsanleitung. Darmstadt: R-Biopharm GmbH, 1996, 22 S.

Obara, T.; Masuda, E.; Takemoto, T.; Tatsuno, T.: Immunosuppressive effect of a trichothecene mycotoxin, fusarenon X, FSN. – In: Toxigenic fungi – their toxins and health hazard. 1. Aufl. Hrsg.: H. Kurata et al. Amsterdam: Elsevier, 1984.

Pang, V. F.; Schiefer, H. B.; Beasley, V. R.: Effects on the integumentary system. – In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiological effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989.

Payen, J.; Girard, Th.; Gaillardin, M.; Lafont, P.: Sur la présence de mycotoxines dans des bières. – In: Microbiologie-Aliments-Nutrition, Vol 1 (1983).

Ruckriegel, R.: Untersuchungen zum Verhalten des Fusarien-Toxins Deoxynivalenol während der Gärung unter Berücksichtigung der Hefeweiterführung. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1998.

Ruhland, M.: Biosynthese des ¹⁴C-markierten Mykotoxins Ochratoxin A und dessen Metabolismus in Pflanzenzellkulturen. Diss., Technische Universität München, 1994.

Ruprich, J.; Ostry, V.: Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial ELISA tests and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic. – In: Cent. Eur. J. public Health 3(4) (1995).

Sacher, B.: Über den Einfluß von Sorte, Umwelt, agronomischen Maßnahmen und Mälzungstechnologie auf die wertbestimmenden Eigenschaften von Winterweizenmalzen. Diss., Technische Universität München, 1997.

Sacher, B.: Persönliche Mitteilung. Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München.

Schwarz, P. B.; Casper, H., H.; Beattie, S.: Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. – In: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(3) (1995).

Schwarz, P. B.; Beattie, S.; Casper, H. H.: Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. – In: J. Inst. Brew., Vol. 102 March-April (1996).

Scott, De B.: Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. – In: Mycopath. Mycol. 25 (1965).

Scott, P. M.; Kanhere, S. R.: Determination of ochratoxin A in beer. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 12 (1995) Nr. 4.

Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Weber, D.: Analysis of Canadian and imported Beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography–mass spectrometry. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 10 (1993) Nr. 4.

Scott, P. M.; Kanhere, S. R.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. – In: Mycotoxin Research, Vol. 8 (1992) Nr. 2.

Scott, P.M.; Kanhere, S. R.; Lawrence, G. A.; Daley, E. F.; Farber, J. M.: Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 12 (1995) Nr. 1.

Scudamore, K. A.; Patel, S.; Breeze, V.: Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 16 (1999) Nr. 7.

Shim, W.-B.; Kim, J.-Ch.; Seo, J.-A.; Lee, Y.-W.: Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. – In: Food Additives and Contaminants, Vol. 14 (1997) Nr. 1.

Smith, J. E.; Lewis, C. W.; Anderson, J. G.; Solomons, G. L.: Mycotoxins in human nutrition and health. Glasgow: Department of Bioscience & Biotechnology, University of Strathclyde, 1994, EUR 16048 EN, 300 S.

Takitani, S.; Asabe, Y.; Kato, T.; Suzuki, M.; Ueno, Y.: Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. – In: Journal of Chromatography 172 (1979).

Tamm, C.; Breitenstein, W.: The biosynthesis of trichothecene mycotoxins. – In: The biosynthesis of mycotoxins – a study in secondary metabolism. Ed.: P. S. Steyn. New York: Academic Press, 1980.

Tanaka, T.; Hasegawa, A.; Yamamoto, S.; Lee, U.-S.; Sugiura, Y.; Ueno, Y.: Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. survey of 19 countries. – In: J. Agric. Food Chem. 36 (1988).

Taschan, H.; Puchtinger, G.: Ochratoxin A-Gehalt in Malz- und Bierproben. – In: 21. Mykotoxin-Workshop – Proceedings, Jena, 7.-9. Juni 1999. Hrsg.: Rosner, H. u.a. Jena: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), 1999.

Taylor, M. J.; Pang, V. F.; Beasley, V. R.: The immunotoxicity of trichothecene mycotoxins. – In: Trichothecene mycotoxins: pathophysiological effects. Band 2. 1. Aufl. Hrsg.: V. R. Beasley. Boca Raton: CRC Press, 1989.

Tressl, R.; Hommel, E.; Helak, B.: Bestimmung von Ochratoxin A in Gerste, Malz und Bier durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Fluoreszenzdetektion. – In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 8 (1989).

Trucksess, M. W.; Giler, J.; Young, K.; White, K. D.; Page, S. W.: Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee – 1997. – In: J. AOAC International, Vol. 82 (1999) Nr. 1.

Whitehead, M. P.; Flannigan, B.: The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. – In: J. Inst. Brew., Vol. 95 (1989).

Wolff, J.; Bresch, H.; Cholmakow-Bodechtel, C.; Engel, G.; Erhardt, S.; Gareis, M.; Majerus, P.; Rosner, H.; Scheuer, R.: Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht. Forschungsverbund Produkt- und Ernährungsforschung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Deutschland, 1999, 276 S.

Yoshizawa, T.: Red-Mold Diseases and natural occurrence in Japan. – In: Trichothecenes – chemical, biological and toxicological aspects. 1. Aufl. Hrsg.: Y. Ueno. Amsterdam: Elsevier, 1983.

Zwicklbauer, T.: Untersuchungen zum Verhalten von Fusarien-Toxinen während der Gärung unter Berücksichtigung von Gärverfahren und Hefestämmen. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1997.

8 Anhang

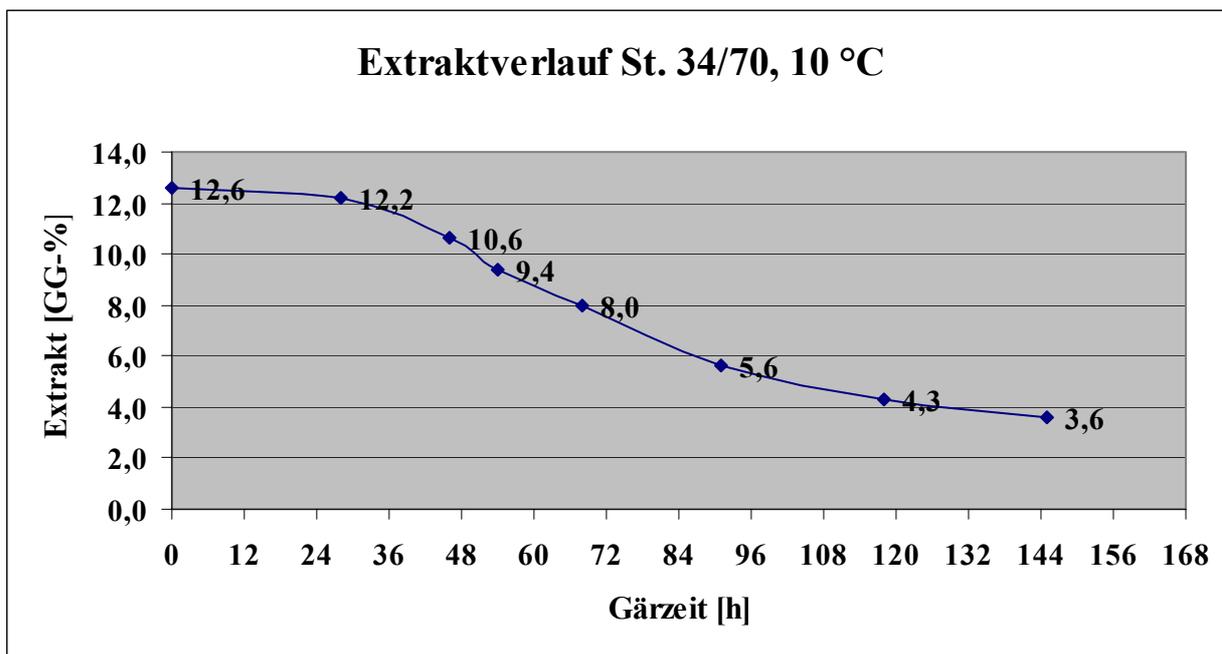


Abbildung 60: Extraktverlauf zu Abbildung 17

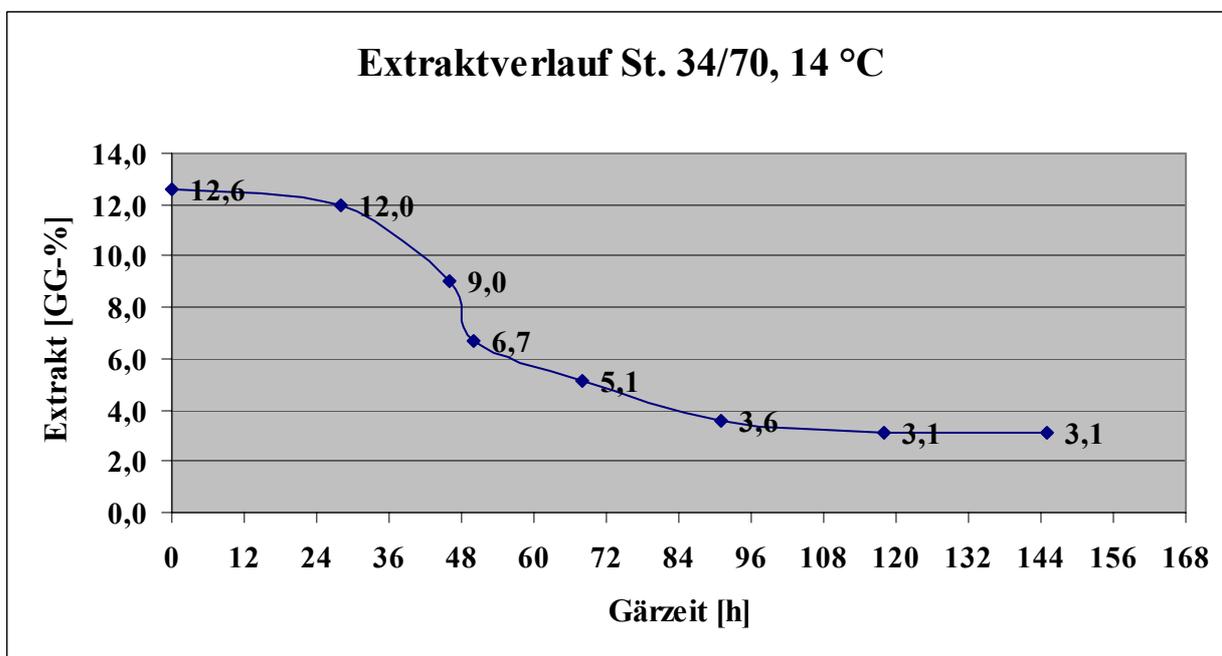


Abbildung 61: Extraktverlauf zu Abbildung 18

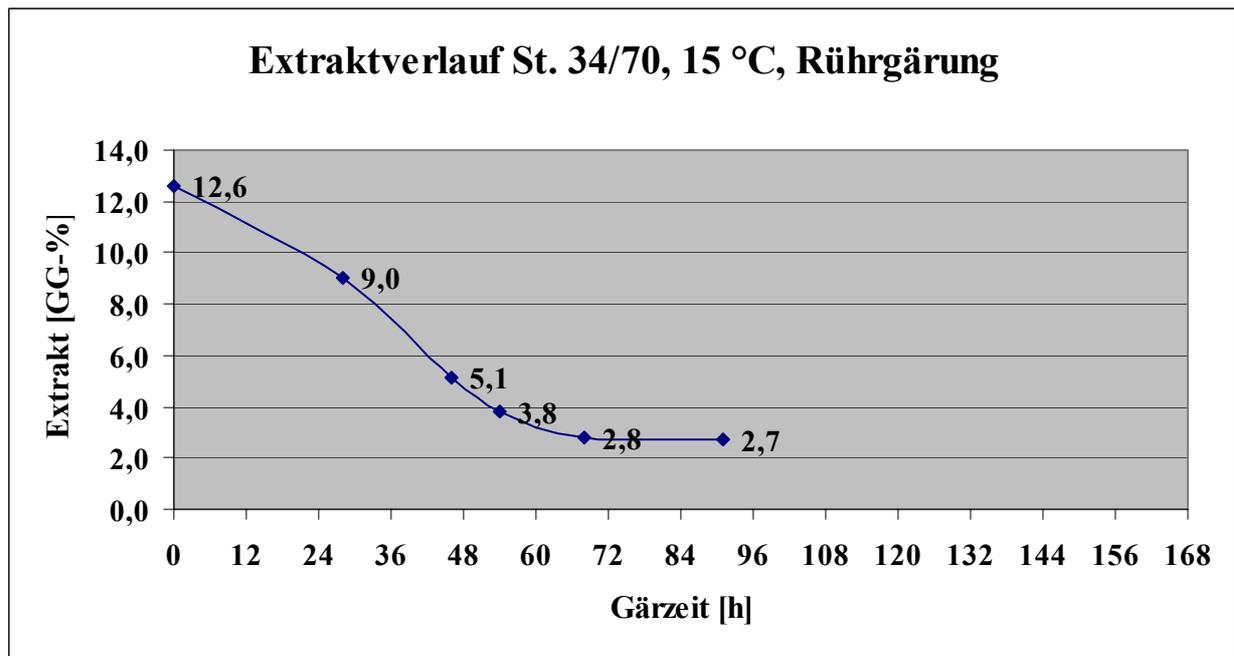


Abbildung 62: Extraktverlauf zu Abbildung 19

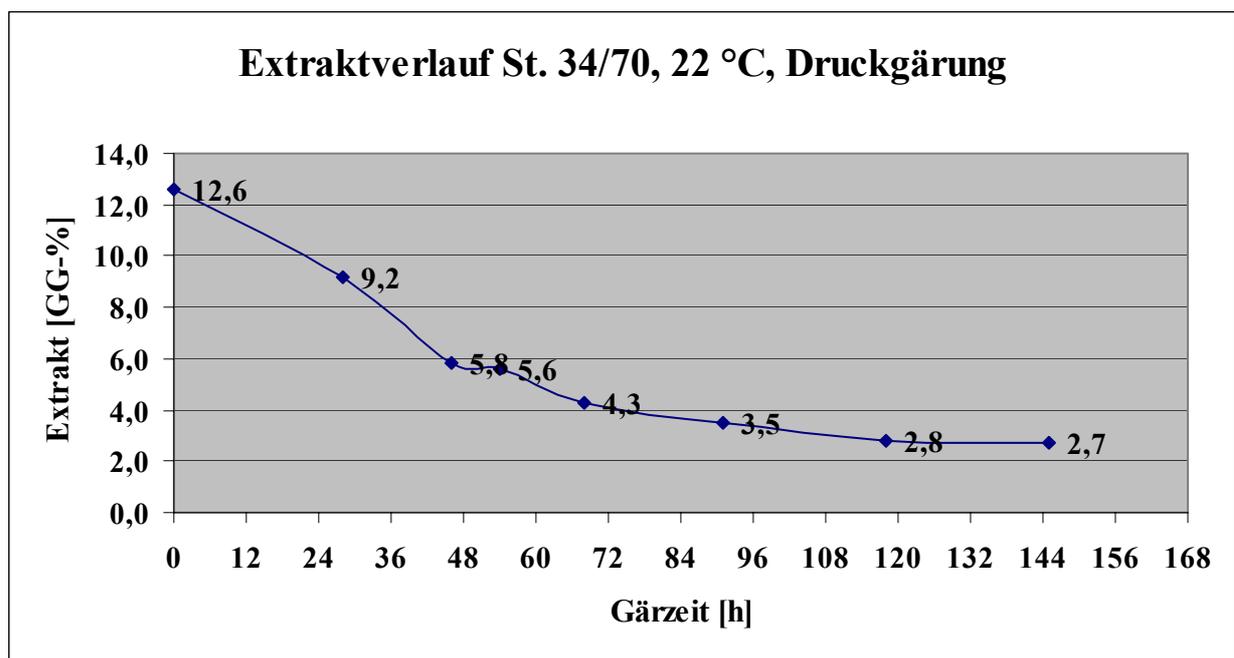


Abbildung 63: Extraktverlauf zu Abbildung 20

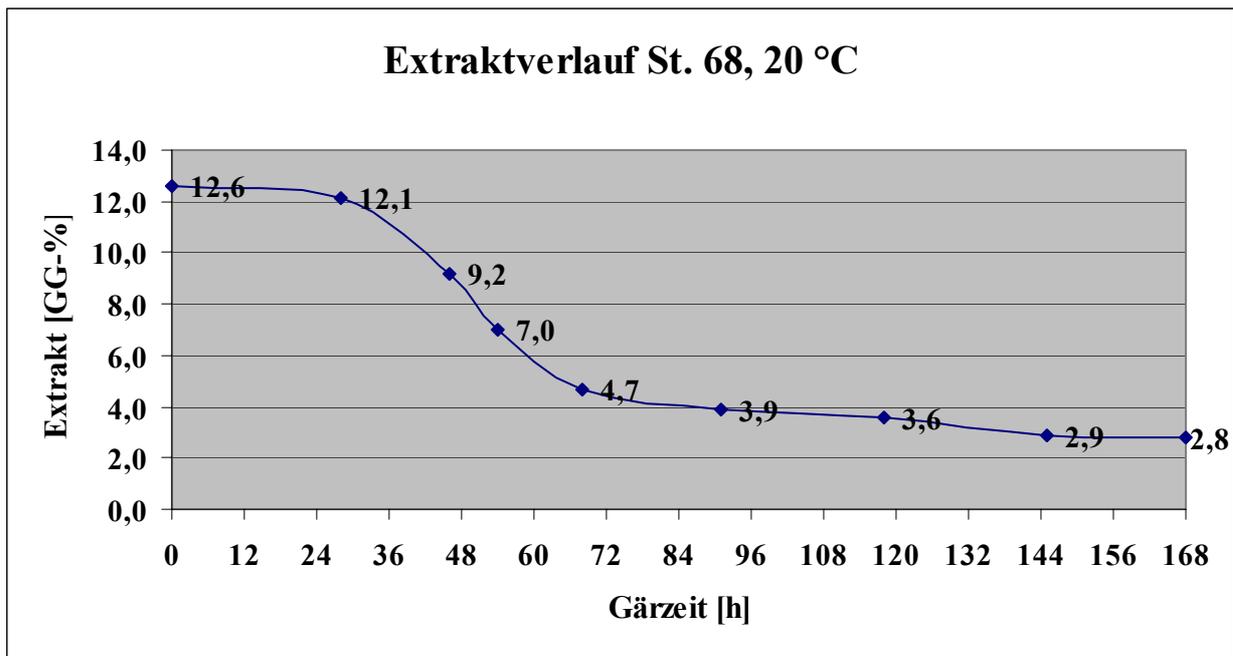


Abbildung 64: Extraktverlauf zu Abbildung 21

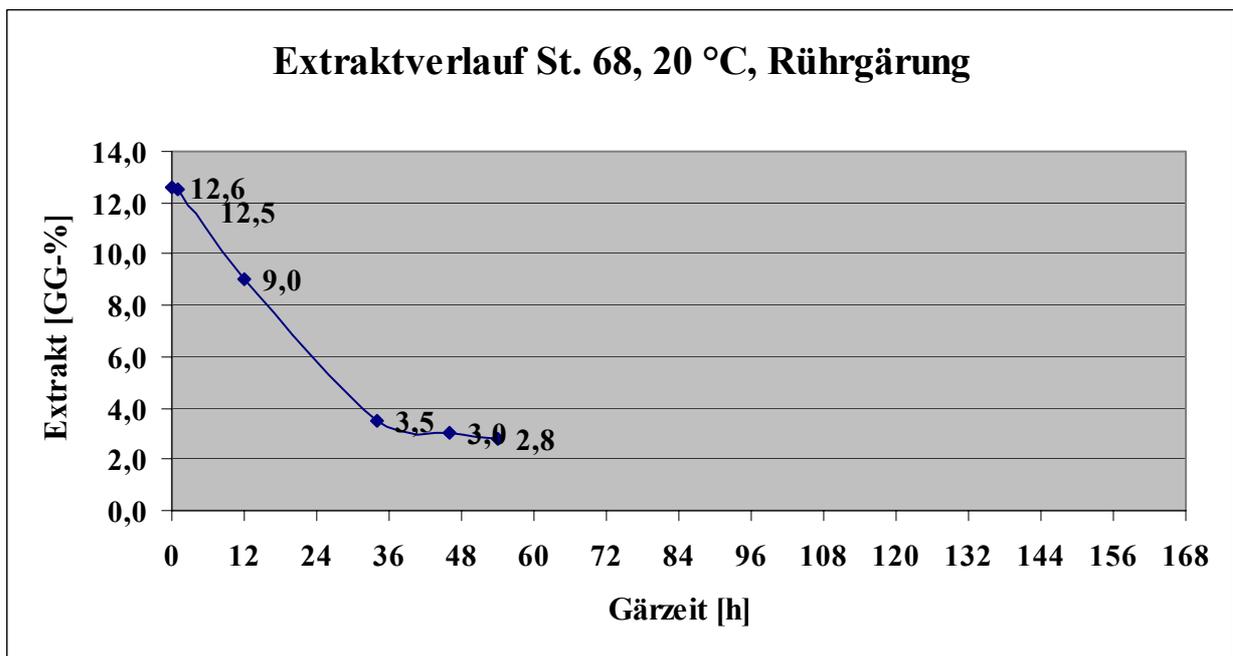


Abbildung 65: Extraktverlauf zu Abbildung 22

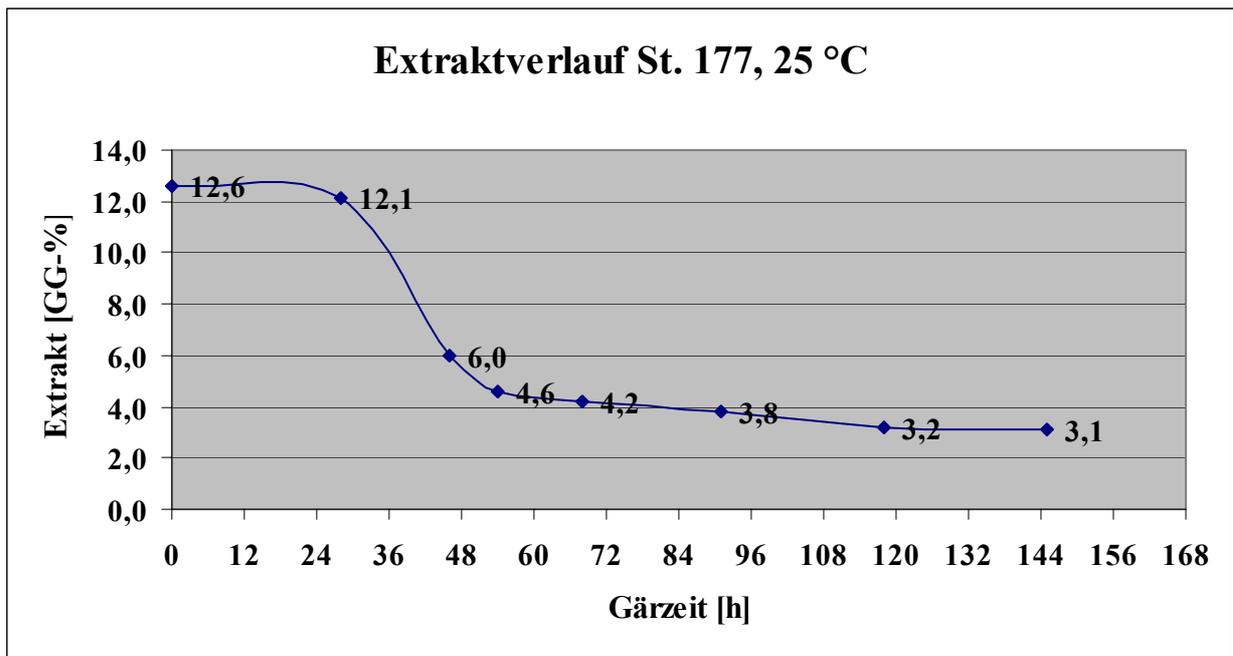


Abbildung 66: Extraktverlauf zu Abbildung 23

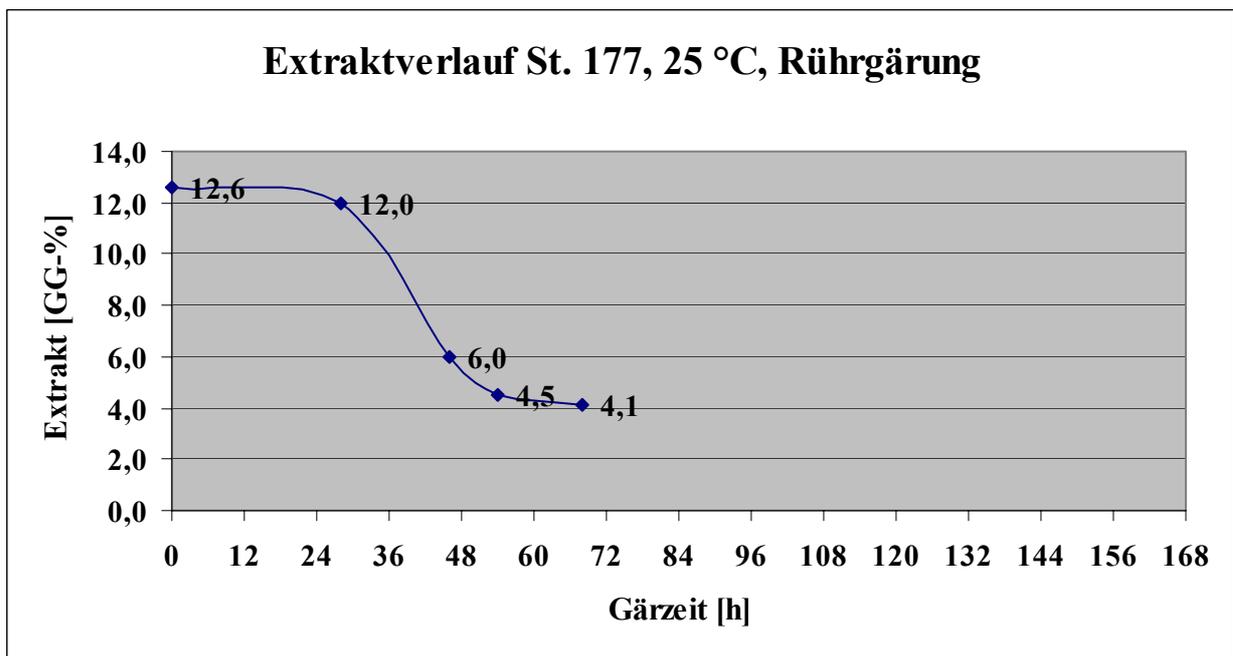


Abbildung 67: Extraktverlauf zu Abbildung 24