

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Natalia Merkulow

aus Leninabad

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2001

**Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck
auf Schimmelpilze
und die Synthese des Mycotoxins Patulin**

Gutachter: Prof. Dr. Horst Ludwig
Prof. Dr. Bernhard Tauscher

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf Konidiosporen der Schimmelpilze *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* und *Penicillium expansum* sowie auf die Syntheserate des Mycotoxins Patulin durch *Penicillium expansum*.

Die Hochdruckinaktivierung von Konidiosporen verläuft in den meisten Fällen zweiphasig. Diese Inaktivierungskurven können in guter Näherung durch eine Überlagerung zweier Reaktionen 1. Ordnung beschrieben werden. Bei tiefen Temperaturen (4 °C) werden die Sporen vollständig abgetötet, während bei höheren Temperaturen (25-55 °C) bei einem kleinen Teil der Sporen Druckresistenz auftreten kann. Behandlungstemperaturen oberhalb der optimalen Wachstumstemperatur führen immer zu druckresistenten Fraktionen von Sporen. Eine Druckerhöhung reduziert den Anteil der stabilen Fraktion.

Die Geschwindigkeit der Inaktivierung von *C. herbarum* erhöht sich bei pH-Werten < 3,4 und > 10. Saccharoselösungen (bis 60 %) schützen die Sporen vor einer Hochdruckinaktivierung, der protektive Effekt wächst mit steigender Saccharosekonzentration.

Konidiosporen von *C. herbarum* und *P. expansum* wurden in Apfel- und Brokkolisaft hochdruckinaktiviert. Es konnte in keinem Fall ein Einfluß des pH-Wertes oder des Zuckergehaltes nachgewiesen werden. Eine gegenseitige Kompensation dieser Effekte kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die Freisetzung von Patulin durch *P. expansum* wurde in Apfelsaft untersucht. Das Analyseverfahren mittels HPLC wurde neu entwickelt. Durch diese Methode läßt sich Patulin vollständig von 5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF), einem in Apfelsaft vorkommenden Zersetzungsprodukt von Kohlenhydraten, trennen. Die Wiederfindungsrate beträgt bei Patulin > 96 %, bei 5-HMF ~ 80 %. Die Nachweisgrenze beider Substanzen ist 2 µg/l.

Die Syntheserate von Patulin ist abhängig von dem Verkeimungsgrad des Apfelsaftes. Bei 10³ Keimen/ml Saft wird mehr Patulin freigesetzt als bei 10⁶ Keimen/ml. Druckbehandlungen können in Abhängigkeit von Druckhöhe und Temperatur die Patulinsynthese fördern oder hemmen. Die höchste Patulinkonzentration von 122,1 mg/l wurde nach einer Druckbehandlung bei 40 °C mit 350 MPa gemessen.

Eine Zugabe von Cystein reduziert die Toxizität von Patulin. Diese Adduktbildung wird durch Druck gefördert. Die Aktivierungsenergien und die Aktivierungsvolumina dieser Reaktion wurden im Druckbereich von 0,1 bis 500 MPa bei 4 °C, 25 und 40 °C bestimmt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Mikroorganismen - ein "altes" Problem.....	1
1.2 Hochdruck - eine Alternative zu hohen Temperaturen?	2
1.3 Aufgabenstellung	4
2 Druck	5
2.1 Druckerzeugung.....	5
2.2 Chemisch-Physikalische Grundlagen	7
2.2.1 Die Temperaturabhängigkeit des chemischen Gleichgewichtes	7
2.2.2 Die Druckabhängigkeit des chemischen Gleichgewichtes.....	8
2.2.3 Der Einfluß von Druck auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtsbildung	9
2.2.4 Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit.....	9
2.3 Proteine und Mikroorganismen unter Druck.....	10
3 Schimmelpilze	11
3.1 Morphologie	11
3.2 Untersuchte Schimmelpilze.....	13
3.2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
3.2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	13
3.2.3 <i>Cladosporium herbarum</i>	14
3.2.4 <i>Penicillium expansum</i>	15
3.3 Mycotoxine.....	15
3.3.1 Allgemeines	15
3.3.2 Patulin.....	16
4 Material und Methoden	19
4.1 Die Hochdruckbehandlung.....	19
4.2 Aufzucht und Vorbereitung der Schimmelpilze	21
4.2.1 Nährmedien.....	21
4.2.2 Zuchtbedingungen.....	22
4.2.3 Probenvorbereitung	22
4.2.4 Keimzahlbestimmung.....	23
4.3 Vorbereitung der Medien	23
4.3.1 Pufferlösungen	23
4.3.2 Apfel- und Brokkolisaft.....	25
4.3.3 Lagerversuche	26
4.4 HPLC	27
4.4.1 Laufmittel	27
4.4.2 Eichung	27
4.4.3 Patulinproduktion von <i>Penicillium expansum</i> in Apfelsaft.....	28
4.4.4 Patulin-Cystein Adduktbildung	29
4.5 Verwendete Chemikalien	30

5 Ergebnisse	31
5.1 Hochdruckinaktivierung von Schimmelpilzsporen in Modellösungen.....	31
5.1.1 <i>Cladosporium herbarum</i>	32
5.1.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	41
5.1.3 <i>Botrytis cinerea</i>	43
5.1.4 <i>Penicillium expansum</i>	45
5.2 Hochdruckinaktivierung in Apfel- und Brokkolisaft.....	46
5.2.1 <i>Cladosporium herbarum</i>	46
5.2.2 <i>Penicillium expansum</i>	49
5.2.3 Lagerversuche.....	51
5.3 Patulin unter Hochdruck	54
5.3.1 Eine neue Methode zur simultanen Bestimmung von 5-HMF und Patulin.....	54
5.3.2 Auswirkungen von Hochdruck auf Patulin und 5-HMF	60
5.4 Patulin in Apfelsaft	61
5.4.1 Vorversuche.....	61
5.4.2 Freisetzung von Patulin durch <i>Penicillium expansum</i> in Apfelsaft	65
5.5 Adduktbildung von Patulin mit Cystein.....	75
6 Diskussion	81
6.1 Schimmelpilzsporen unter Hochdruck.....	81
6.2 Patulin und hoher hydrostatischer Druck.....	89
7 Ausblick	97
8 Anhang	98
8.1 Ergänzungen zum Ergebnisteil.....	98
8.2 Meßwerte.....	104
Literaturverzeichnis	129

1 EINLEITUNG

1.1 Mikroorganismen – ein „altes“ Problem

Als Entdecker der mikrobiellen Welt gilt Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). Der niederländische Leinenhändler, der nie eine Universität besucht hatte, entwickelte ein Mikroskop, mit dem er eine bis über 300fache Vergrößerung erzielen konnte. Durch dieses entdeckte er Bakterien, rote Blutkörperchen sowie histologische Strukturen. Später folgte eine Zeit kontroverser Debatten um die Herkunft dieser Kleinstlebewesen, bei der die Mehrzahl der Wissenschaftler die These der „spontanen Entstehung“ vertrat. Diese Theorie wurde weitgehend durch die Arbeiten von Lazzaro Spallanzani (1729-1799) widerlegt, der die Verbreitung von Mikroorganismen durch die Luft nachweisen konnte. Den Grundstein für die moderne Mikrobiologie legten die Arbeiten von Louis Pasteur (1822-1895) und Robert Koch (1843-1910).

Je größer das Wissen um die Mikroorganismen und deren Auswirkungen auf die Gesundheit wurde, desto zwingender wurde keimfreies Arbeiten im medizinischen Bereich. So führte 1847 der Ungar Ignaz Semmelweis (1818-1865) Chlorwasserwaschungen zur Verhütung von Kindbettfieber ein und Joseph Lister (1827-1912) desinfizierte ab 1867 medizinische Instrumente mit Karbolsäure (Phenol aus Steinkohlenteer).

Heute gibt es verschiedene Verfahren, um Mikroorganismen abzutöten oder eine nachträgliche Kontamination mit diesen zu vermeiden. Der Einsatz chemischer Substanzen wie Ethylenoxid oder das Bestrahlen von Produkten ist stark limitiert und beschränkt sich hauptsächlich auf medizinisch-biologische Einmalprodukte. Die Sterilfiltration ist auf niedermolekulare, temperaturempfindliche Produkte begrenzt und auch hier nur bedingt einsetzbar, da Viren diese Filter passieren können. Die Heißluftsterilisation, bei der vorwiegend medizinische Geräte 90 min auf 170 °C erhitzt werden, kommt hauptsächlich in der Klinik und im naturwissenschaftlichen Labor zum Einsatz. Wasserdampfautoklaven arbeiten mit feuchter Hitze bei 121 °C und einem bar Überdruck mit Behandlungszeiten von 20 min, die sich aber bei großen Volumina verlängern können.

Lebensmittel können ebenfalls auf verschiedene Arten konserviert werden. Das Einsalzen, Pökeln und Trocknen führt zu Wasserentzug und Eiweißdenaturierung. Räuchern vermindert den Wassergehalt der Lebensmittel um 10-40 %, wobei gleichzeitig bakteriostatisch wirkende Substanzen wie z.B. Phenole in das Produkt eindringen. Einzuckern, Einlegen in Alkohol so-

wie Säuern mit Genußsäuren (Wein-, Essig-, Milchsäure) verhindern das Wachstum von Mikroorganismen. Das Sterilisieren (Erhitzen auf über 100 °C) eignet sich vor allem für feste Lebensmittel, deren Konsistenz durch hohe Temperaturen nicht sehr verändert wird (Fleisch, Fisch, Gemüse) sowie für Konserven. Das Pasteurisieren (Erhitzen auf Temperaturen unter 100 °C) wird hauptsächlich bei flüssigen Produkten wie Milch und Fruchtsäften eingesetzt. Außerdem können Konservierungsstoffe (z.B. Benzoe- oder Sorbinsäure), deren Art und Menge gesetzlich geregelt sind und auf der Verpackung angegeben werden müssen, den Lebensmitteln zugesetzt werden.

Der wichtigste Faktor bei der Dekontamination und Konservierung ist die Temperatur. Es gibt allerdings noch einen weiteren Faktor, der ebenfalls ein Absterben von Mikroorganismen verursacht: den Druck.

1.2 Hochdruck – eine Alternative zu hohen Temperaturen?

Das Fundament der Hochdruckforschung wurde vor einem Jahrhundert von Hite gelegt. Hite konnte 1899 durch Abtöten von Milchsäurebakterien die Haltbarkeit der Milch erhöhen (Hite 1899) und wendete diese Technik 1914 zum Inaktivieren von Mikroorganismen in Obst und Gemüse an (Hite 1914). Ein weiterer Pionier auf dem Hochdruckgebiet ist Percy Bridgman, der 1914 Eiweiß durch Druck zum Koagulieren bei Raumtemperatur brachte (Bridgman 1914). Für die Entwicklung einer Hochdruckapparatur erhielt Bridgman 1946 den Nobelpreis für Physik.

Es folgten mannigfaltige Untersuchungen über die Wirkung von hohem Druck auf Bakterien (ZoBell und Johnson 1949, Ludwig u.a. 1990), Schimmelpilze (Eicher u.a. 1998), Viren (Ludwig 1991), Hefen (Rosin und Zimmerman 1977), Proteine (Heremans 1982), Enzyme (Kunugi 1992), Lipide (Buchheim u.a. 1996) sowie auf chemische Reaktionen (Tauscher 1995) und Lebensmittel (Cheftel 1992, Tonello u.a. 1994). Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß im Prinzip alle Arten von Mikroorganismen durch Druck inaktiviert werden können. Der begrenzende Faktor für die industrielle Anwendung der Hochdrucksterilisation war in der Vergangenheit das Fehlen geeigneter Apparaturen. Seitdem die ersten Hochdruckprodukte in Japan erhältlich sind, machte die technische Entwicklung entscheidende Fortschritte, so daß heute Hochdruckapparaturen gebaut werden, die mit großen Volumina arbeiten und kommerziell sinnvoll eingesetzt werden können.

Aber werden heute noch neue Verfahren zur Entkeimung und Konservierung gebraucht? Welche Vorteile bietet die Hochdrucktechnologie?

Der rasante technische Fortschritt im letzten Jahrhundert führte zu einer Umstrukturierung der Lebens- sowie der Ernährungsgewohnheiten. Das traditionelle Zubereiten und Konservieren von Lebensmitteln im Kreis der Familie gerät immer mehr in Vergessenheit. Diese Entwicklung führt zwangsläufig zu einem steigenden Bedarf an Lebensmitteln, deren Zubereitung und Konservierung die Qualität des Frischproduktes möglichst wenig reduziert.

Die thermischen Behandlungsmethoden werden dieser Erwartung nicht immer gerecht. Dagegen kann die Hochdrucksterilisierung zumindest in einigen Bereichen deutliche Vorteile bieten. So wird durch die Hochdruckbehandlung Geschmack und Geruch kaum verändert, der Nährwert und der Vitamingehalt bleiben weitgehend erhalten (Ogawa u.a. 1990, Hayashi u. Hayashida 1989, Simpson 1998). Die Hochdrucktechnologie bietet also die Möglichkeit, die Qualität eines konservierten Produktes zu erhöhen.

Die Einführung neuer Technologien ist in Europa seit 1997 durch die „Novel Foods“-Verordnung geregelt (Verordnung Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes, in Kraft getreten am 15.05.1997). Darunter fällt auch die Hochdrucksterilisation, was die Einführung dieses neuen Verfahrens in Europa aufgrund vieler Richtlinien und Vorgaben wesentlich erschwert. Allerdings ist Vorsicht bei neuen Herstellungsmethoden zum Schutz des Verbrauchers angebracht. Besitzt beispielsweise konservierte Ware die gleichen sensorischen Eigenschaften wie das Rohprodukt, kann es natürlich auch andere Eigenschaften des Rohproduktes beibehalten haben. Verträgt folglich ein Konsument Kernobst oder Nüsse nur im erhitzten Zustand, muß auf jeder Packung druckbehandelten Apfelsaftes vermerkt sein, ob das allergieauslösende Potential des frischen Apfels erhalten blieb.

Der mögliche Einsatz der Hochdrucktechnologie ist nicht nur auf die Sterilisation von Lebensmitteln begrenzt. So kann die Hochdrucksterilisation zur Entkeimung von Kosmetika (Vardag u.a. 1999) oder Medikamenten eingesetzt werden (Mentrup u.a. 1988, Karbstein u.a. 1992), zur Inaktivierung von Viren bei der Herstellung von Impfstoffen (Butz und Ludwig 1992, Shigehisa u.a. 1996) oder auch zum schonenden Tauen und Einfrieren (Massaux u.a. 1999, Fuchigami und Teramoto 1999).

1.3 Aufgabenstellung

Untersuchungen über den Einfluß von hohem hydrostatischem Druck auf Mikroorganismen bilden einen Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Ludwig. In der Vergangenheit wurden Auswirkungen von Druck auf Enzyme und Proteine, aerobe und anaerobe Bakterien, Hefen oder Bakteriophagen erforscht (Butz 1987, Ludwig u.a. 1992, Schreck 1998, van Almsick 1998, Butz und Ludwig 1991, Groß 1994). Außerdem werden seit einiger Zeit Untersuchungen über das Verhalten von Schimmelpilzen unter hohem Druck durchgeführt (van Almsick 1998, Merkulow 1997, Eicher 2000).

Schimmelpilze sind zusammen mit Bakterien für das Verderben von Lebensmitteln, aber auch von anderen Produkten wie Arzneistoffen oder Kosmetika verantwortlich. Vor dem Hintergrund einer potentiellen Anwendung der Hochdrucksterilisation zur Entkeimung von Konsumgütern sind daher umfassende Untersuchungen über die Druckempfindlichkeit von Mikroorganismen sowie das Erstellen kinetischer Daten unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen umfassende Untersuchungen über das Verhalten der Konidiosporen von Schimmelpilzen unter Druck erstellt werden. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, eine Anzahl verschiedener Pilze zu untersuchen, um eine potentielle Systematik in ihrem Verhalten erkennen zu können. Die Hochdruckversuche sollen zunächst in Modellösungen durchgeführt werden, wobei Parameter wie Druckhöhe, Temperatur oder pH-Wert der Lösung auf ihren Einfluß hinsichtlich der Inaktivierung dokumentiert werden können. An diese Versuche sollen sich Hochdruckexperimente in Lebensmitteln anschließen, um zu überprüfen, inwieweit sich die Ergebnisse der Hochdruckinaktivierung in den Modellösungen auf reale Systeme übertragen lassen.

Einen weiteren Kernpunkt der Forschung sollen Untersuchungen über die Freisetzung des Mycotoxins *Patulin* durch *Penicillium expansum* bilden. Dieser Pilz wird hauptsächlich auf Äpfeln und deren Folgeprodukten gefunden. Eine mögliche Kontamination von Apfelprodukten durch *Patulin* stellt ein tiefgreifendes Problem für die Lebensmittelindustrie dar. Die Auswirkungen einer Druckbehandlung der Sporen auf die Syntheserate von Patulin sollen in Abhängigkeit von der Druckhöhe, Behandlungstemperatur oder Behandlungsdauer erforscht werden. Die Patulinbestimmung kann dabei durch chromatographische Verfahren wie beispielsweise die HPLC erfolgen.

2 DRUCK

2.1 Druckerzeugung

Die Erzeugung und Übertragung von hohem hydrostatischem Druck auf eine Probe ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Eine Kraft F wird durch einen Stempel mit der Basisfläche A auf ein druckübertragendes Medium M ausgeübt. Die von außen auf das Medium wirkende Kraft wird von diesem in einen Druck vom Betrag F/A umgesetzt. Dieser Druck wird unmittelbar und ohne einen Druckgradienten auf die Probe übertragen (a). Die Druckerzeugung kann auch außerhalb des Probenbehälters stattfinden und der Druck durch Leitungen auf die Probe übertragen werden (b).

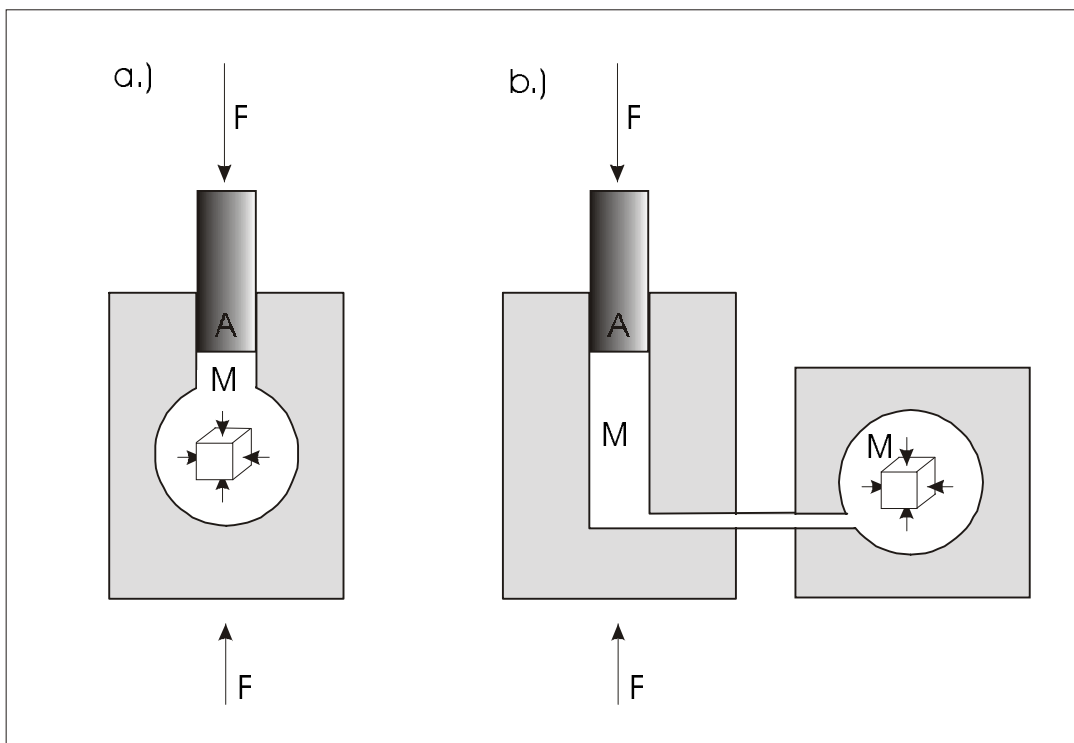


Abbildung 2.1: Druckaufbaumethoden nach Ludwig, 1995.

Ist die Probe flüssig, kann diese selbst als druckübertragendes Medium fungieren. Befindet sich die Probe in einer Verpackung, sollte dieses Behältnis über eine entsprechende Flexibilität verfügen.

Das druckübertragende Medium sollte die folgenden Eigenschaften besitzen:

- Es sollte chemisch inert sein gegenüber allen Materialien, mit denen es in Berührung kommt.
- Es sollte eine geringe Viskosität besitzen, um einen homogenen Druckaufbau und Druckverteilung zu gewährleisten.
- Es sollte über eine geringe Kompressibilität verfügen, um ein sicheres Arbeiten zu ermöglichen. Das schließt Gase als druckübertragendes Medium weitgehend aus.
- Es sollte gewährleistet sein, daß das Medium unter hohem Druck nicht fest wird. Der Gefrierpunkt sollte also möglichst niedrig sein.

Alle diese Voraussetzungen werden beispielsweise von Wasser erfüllt, das noch bei hohen Drücken flüssig bleibt, geringe Kompressibilität besitzt und dessen Viskosität nur wenig druckabhängig ist. Der Nachteil von Wasser als druckübertragendes Medium liegt in der starken Beanspruchung von Pumpenbestandteilen, wie z.B. von Dichtungen. Dieser Nachteil kann allerdings durch das Beimengen organischer Bestandteile wie Glykol relativ einfach kompensiert werden.

Andere geeignete Flüssigkeiten sind Mineralöle und ihre Mischungen mit Kerosin sowie Silikonöle.

Beim Komprimieren und Entspannen kommt es innerhalb des Mediums und somit auch in der Probe zu Temperaturveränderungen. Das Ausmaß der Temperaturveränderung wird durch den thermischen Ausdehnungskoeffizienten bestimmt. Der maximale Temperatureffekt wird bei einer adiabatischen Kompression erreicht:

$$\left(\frac{\partial T}{\partial p} \right)_{\text{ad.}} = \frac{\alpha T}{\rho C_p} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Hierbei ist T die absolute Temperatur, p der Druck, α der thermische Ausdehnungskoeffizient, ρ die Dichte und C_p die Wärmekapazität bei konstantem Druck.

Die Temperaturerhöhung bei der adiabatischen Kompression von Wasser wurde von Makita ausführlich dokumentiert (Makita 1992). Danach ist die Temperaturerhöhung abhängig von der Ausgangstemperatur, so daß die Temperaturerhöhung bei einer Ausgangstemperatur von 10 °C etwa 2 K pro 100 MPa beträgt und bei 70 °C etwa der doppelte Wert erreicht wird.

Andere Medien erfahren i.d.R. wesentlich größere Temperaturschwankungen. So beträgt die Temperaturerhöhung von n-Hexan bei einer Ausgangstemperatur von 18 °C etwa 40 K pro 100 MPa.

2.2 Chemisch-Physikalische Grundlagen

Chemische Reaktionen verlaufen in Richtung des Minimums der Freien Enthalpie. Dort stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten ein. Die Lage des Gleichgewichtes ist abhängig von äußeren Faktoren wie Druck und Temperatur und kann von diesen beeinflusst werden (Prinzip von Le Chatelier).

2.2.1 Die Temperaturabhängigkeit des chemischen Gleichgewichtes

Die Freie Standardreaktionsenthalpie ist gegeben durch:

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K \quad \text{Gleichung 2.2}$$

nach Umformung:

$$\ln K = - \frac{\Delta G^{\circ}}{RT} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Dabei bedeutet ΔG° die Freie Standardreaktionsenthalpie, R ist die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und K die Gleichgewichtskonstante.

Da hier der Einfluß der Temperatur auf die Gleichgewichtskonstante untersucht werden soll, wird Gleichung 2.3 nach der Temperatur abgeleitet:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = - \frac{1}{R} \frac{\partial \left(\frac{\Delta G^{\circ}}{T} \right)_p}{\partial T} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

mit

$$\frac{\partial \left(\frac{\Delta G^{\circ}}{T} \right)_p}{\partial T} = - \frac{\Delta H}{T^2} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

erhält man:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H}{R T^2} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Nach Gleichung 2.6 folgt:

- Bei exothermen Reaktionen ($\Delta H < 0$) wird das Gleichgewicht bei einer Temperaturerhöhung auf die Seite der Edukte verschoben,
- Bei endothermen Reaktionen ($\Delta H > 0$) wird das Gleichgewicht bei einer Temperaturerhöhung auf die Seite der Produkte verschoben.

2.2.2 Die Druckabhängigkeit des chemischen Gleichgewichtes

Der Einfluß von Druckänderungen auf die Gleichgewichtskonstante wird durch Ableiten von Gleichung 2.3 nach dem Druck ermittelt:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{1}{R T} \frac{\partial (\Delta G^\circ)}{\partial p} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

$$\text{mit} \quad \frac{\partial (\Delta G^\circ)}{\partial p} = \Delta V \quad \text{Gleichung 2.8}$$

erhält man:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V}{R T} \quad \text{Gleichung 2.9}$$

Hierbei ist ΔV das Reaktionsvolumen, d.h. die Differenz der partiellen molaren Volumina zwischen Produkten und Edukten.

Nach Gleichung 2.9 folgt:

- Bei Vorgängen mit negativen Reaktionsvolumina wird die Produktbildung mit steigendem Druck begünstigt.
- Bei Vorgängen mit positiven Reaktionsvolumina wird die Eduktbildung mit steigendem Druck begünstigt.

Das Reaktionsvolumen für die Solvolyse von Wasser beträgt beispielsweise $-22 \text{ cm}^3/\text{mol}$, die Ionenbildung wird somit durch steigenden Druck gefördert.

2.2.3 Der Einfluß von Druck auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtsbildung

Druckveränderungen beeinflussen nicht nur die Lage des Gleichgewichtes einer chemischen Reaktion, sondern auch die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung. Die Druckabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k wird durch das Aktivierungsvolumen (ΔV^\ddagger) beschrieben, das die Volumenänderung auf dem Weg zum Übergangszustand angibt.

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{R T} \quad \text{Gleichung 2.10}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion wird somit bei einem negativen Aktivierungsvolumen mit steigendem Druck beschleunigt.

2.2.4 Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Nach Arrhenius können bei einem Zusammenstoß nur diejenigen Teilchen reagieren, deren Energie einen bestimmten Grenzwert übersteigt. Dieser Grenzwert ist die Aktivierungsenergie E_a . Bei steigenden Temperaturen wächst i.d.R. der Anteil der Teilchen mit ausreichender Energie, die Reaktionsgeschwindigkeit wird größer.

Arrhenius Gleichung (A ist der "präexponentielle Faktor"):

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad \text{Gleichung 2.11}$$

nach logarithmieren erhält man:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R T} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

oder:

$$\ln k = -\frac{E_a}{R T} + \text{const} \quad \text{Gleichung 2.13}$$

Wird $\ln k$ gegen $1/T$ aufgetragen, erhält man eine Gerade mit der Steigung $-E_a/R$.

2.3 Auswirkungen von Druck auf Biomoleküle und Mikroorganismen

Proteine sind Kondensationsprodukte von Aminosäuren. Sie bilden das Grundgerüst für Enzyme, Ionenkanäle und zahlreiche Hormone. Der Aufbau der Proteine wird unterteilt in die Primärstruktur (Aminosäuresequenz), Sekundärstruktur (Faltblatt- oder Helixform, bedingt durch Wasserstoffbrücken), Tertiärstruktur (aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen und Disulfidbrücken) und die Quartärstruktur (Aggregation mehrerer Polypeptidketten).

Proteine können durch hohen Druck denaturiert werden. Die Struktur unterscheidet sich dabei von Proteinen, die mit hohen Temperaturen denaturiert wurden. Während bei hohen Temperaturen alle Strukturen bis zur Aminosäuresequenz zerstört werden können, wird bei hohem Druck die Primärstruktur und bis etwa 700 MPa auch die Sekundärstruktur aufrechterhalten (Weber und Drickamer 1983). Die Auswirkungen von Druck auf Proteine wurden zusammenfassend von Gross und Jaenicke beschrieben (1994).

Das Verhalten von Enzymen und der DNA unter Druck wurde untersucht und u.a. von den folgenden Autoren beschrieben: Knorr u.a. 1992, Balny 1999, Heremans 1982, Hedén 1964. Der Einfluß von Druck auf Lipide und Membranen wird in den folgenden Artikeln beschrieben: Buchheim u.a. 1996, MacDonald 1992, Winter 1996.

Schimmelpilze können durch Druck inaktiviert werden. Die erforderliche Druckhöhe ist dabei vor allem von der Gattung des Pilzes abhängig, wobei die vegetativen Zellen druckempfindlicher als die Dauerformen (Sporen) sind (van Almsick 1998). Ferner üben weitere Faktoren wie die Temperatur, der pH-Wert oder das Medium einen großen Einfluß auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit aus (Eicher u.a. 1998). Im allgemeinen läßt sich feststellen, daß mit steigender Hitzeresistenz der Pilzsporen auch die Druckresistenz zunimmt (Ogawa u.a. 1990).

Der genaue Mechanismus der Hochdruckinaktivierung von Schimmelpilzen ist nicht bekannt. Die Denaturierung von Enzymen und membrangebundenen Proteinen oder eine Schädigung der Zellmembran, wie es bei Bakterien diskutiert wird, könnte eine Rolle spielen (Timson und Short 1965, Cheftel 1992, Ludwig u.a. 1999, Casadei und Mackey 1999).

3 SCHIMMELPILZE

Pilze nehmen eine Sonderstellung im Reich der Flora und Fauna ein. Die Unfähigkeit, sich fortzubewegen sowie den Besitz einer Zellwand haben sie mit den Pflanzen gemeinsam. Sie sind jedoch aufgrund fehlender Pigmente nicht fähig, Photosynthese zu betreiben und somit auf organisch gebundenen Kohlenstoff angewiesen. Zusammen mit den Bakterien erhalten Schimmelpilze die Fruchtbarkeit des Bodens, wo sie Pflanzen- und Tierreste in niedermolekulare Verbindungen spalten. Der Besitz eines echten Zellkerns unterscheidet die Schimmelpilze (Eukaryonten) von den Bakterien, die zu den Prokaryonten zählen.

3.1 Morphologie

In der Wachstumsphase eines Schimmelpilzes wird das Mycel gebildet. Zunächst entstehen durch Auskeimen von Sporen Hyphen, das sind fadenförmige, weiße oder farblose Zellen, die mit bloßem Auge nur sehr schwer zu erkennen sind. Eine Hyphe erreicht dabei im Durchschnitt eine Größe von 2-10 μm . Die Hyphen können durch Septen in einzelne Zellen gegliedert oder auch völlig unseptiert sein. Durch schnelles Wachstum mit zahlreichen Verzweigungen entsteht - oft innerhalb weniger Stunden - das Mycel. Die einzelnen Hyphen sind mit Cytoplasma gefüllt, das besonders in den Spitzenbereichen reich an Enzymen ist, da hauptsächlich hier das Wachstum stattfindet. Die Zellwand enthält zur Stabilisierung Chitin, 1,4-glycosidisch verknüpftes N-Acetylglucosamin.

Die nicht vegetativen Zellen der Schimmelpilze werden Sporen genannt. Diese können sowohl auf sexuelle (z.B. Ascosporen) wie auch auf asexuelle (z.B. Konidiosporen) Art gebildet werden. Schimmelpilze, die beide Arten von Sporen bilden können, werden als "perfekt" bezeichnet. "Nicht perfekte" Pilze dagegen können sich nur auf ungeschlechtlichem Weg vermehren. Für die Verbreitung der Pilze sind hauptsächlich asexuell entstandene Konidiosporen verantwortlich.

Die Sporen enthalten, wie andere Eukaryonten, einen Zellkern, Ribosomen sowie Mitochondrien und verfügen über Phospholipide oder Polysaccharide als Energiereserve. Die Zellmembran, die aus einer Phospholipidschicht besteht, wird von der Zellwand umschlossen. Diese Zellwand besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, die vor allem aus Glucose, Man-

nose oder N-Acetylglucosamin aufgebaut sind. Außerdem finden sich dort kleinere Mengen an Proteinen und Lipiden.

Der Lebenszyklus eines Schimmelpilzes kann nach Reiß in sechs Phasen unterteilt werden (1986):

1. *Anlaufphase*: Aktivierung des Stoffwechsels, Vergrößerung der Zellen.
2. *Beschleunigungsphase*: Wachstumsrate wird größer
3. *Exponentielle Wachstumsphase*: Vermehrungsgeschwindigkeit nimmt exponentiell zu.
4. *Verzögerungsphase*: Vermehrungsrate sinkt z.B. aufgrund von Nährstoffmangel o.ä.
5. *Stationäre Phase*: Gleichgewicht zwischen Neubildung und Absterben der Zellen.
6. *Absterbephase*: Es sterben mehr Zellen ab als gebildet werden.

Die Bildung der Sporen setzt bereits in der Beschleunigungsphase ein, erreicht aber ihren Höhepunkt in der stationären Phase. Nur vegetative Zellen unterliegen diesem Zyklus, die gebildeten Sporen sind aufgrund ihrer dicken Zellwand viel widerstandsfähiger. Sie beginnen erst dann mit der Auskeimung, wenn sie auf eine günstige Umgebung treffen.

Schimmelpilze sind sehr anspruchslos. Dieser Eigenschaft verdanken sie ihre weltweite Verbreitung. Sie wachsen in Temperaturbereichen von etwa 5-50 °C, können aber auch extremere Temperaturen überleben. Der pH des Substrates spielt ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle, so daß die meisten Schimmelpilze bei pH 2-10 wachsen können. Die als Nährstoffe dienenden Kohlenstoffverbindungen müssen nicht unbedingt pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sein, Schimmelpilze können auch Produkte wie Papier, Kunststoffe oder Farben zersetzen.

3.2 Untersuchte Schimmelpilze

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konidiosporen der Schimmelpilze *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* und *Penicillium expansum* untersucht. Im Folgenden werden diese Organismen kurz dargestellt.

3.2.1 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus ist ein thermotoleranter Pilz mit einem Wachstumsoptimum von 37-43 °C. Er ist weit verbreitet und wurde aus Brot, Pfeffer und Weintrauben isoliert. Substrate, in denen es zu einer Selbsterhitzung kommen kann, werden besonders häufig von *A. fumigatus* befallen. Das ist beispielsweise in Bioabfällen der Fall, in denen die Schimmelpilzflora bis zu 80 % aus *A. fumigatus* bestehen kann (Reiß 1995). Auch die Blumenerde von Zimmerpflanzen ist sehr oft betroffen, wo der Pilz in bis zu 67 % der Topferde nachgewiesen werden konnte (Reiß 1986).

Die Konidiophoren (Mycelstränge) enden in einem Vesikel (Bläschen), auf dem nach allen Seiten die konidienbildenden Phialiden wachsen. Das Konidienköpfchen enthält sehr zahlreich Sporen, die dunkelgrau bis schwarz gefärbt sind. *A. fumigatus* wächst hauptsächlich saprophytisch, indem er faulende Substrate spaltet, er kann aber auch eine parasitäre Form annehmen. Das parasitäre Wachstum ist durch ein verdicktes, reichlich septiertes Mycel ohne Sporenbildung gekennzeichnet.

A. fumigatus ist außerordentlich pathogen. Vorgeschädigte Atmungsorgane werden bevorzugt von diesem Pilz befallen. Hier keimen die Konidien aus und können Aspergillome bilden, Mycelansammlungen mit einem Durchmesser von bis zu 5 cm, die zu Bluthusten und zum Tod führen können (Reiß 1986). *A. fumigatus* kann eine Reihe giftiger Substanzen wie *Endotoxin*, *Fumigellin*, *Fumigotoxin* und *Gliotoxin* synthetisieren (Eichner und Müllbacher 1984, Fischer u.a. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Stamm verwendet, der keines dieser Toxine produziert.

3.2.2 *Botrytis cinerea*

B. cinerea ist das Konidienstadium des perfekten Pilzes *Sclerotinia fuckeliana*. Es wird auch vermutet, daß *B. cinerea* eher ein Sammelbegriff für eine Anzahl ähnlicher, aber gene-

tisch unterschiedlicher Arten ist, so daß einige Autoren von "einem *Botrytis* des *cinerea*-Typs" sprechen (Webster 1983).

Die Konidiosporen werden an den Enden der Phialiden gebildet, die aus einer keimenden Konidie entstehen und zu Büscheln wachsen. Das Wachstum erfolgt auf geeigneten Substraten sehr rasch, die Konidien sind dunkelgrau. Die Sklerotien bestehen aus einer Zusammenlagerung von Hyphen und dienen als Dauerorgane. Diese können etwa 10 mm lang und 5 mm breit werden. Die Keimung erfolgt über die Bildung von Mycel oder von Konidien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Konidien untersucht.

B. cinerea wird auf allen Arten von absterbendem Pflanzenmaterial gefunden. Er ist der Erreger einer Reihe von Krankheiten, die als "Grauschimmel" bezeichnet werden und Salat, Tomaten, Beeren oder Koniferenkeimlinge befallen können. In Norwegen ist *B. cinerea* als Trockenfäuleerreger für weit verbreitete Apfelbaumkrankheiten verantwortlich (Tronsmo 1991). *B. cinerea* kann leicht Resistenzen gegenüber häufig genutzten Fungiziden entwickeln. Dieses Problem tritt auch bei der Züchtung und Lagerung von Erdbeeren auf (Ntirampemba 1998), von denen in Frankreich 20-50 % mit *B. cinerea* infiziert sind (Guinebretiere 2000).

3.2.3 *Cladosporium herbarum*

C. herbarum ist ein sehr weit verbreiteter Schimmelpilz mit dunkelgrauen, leicht grünlichen Sporen. Er wird in zahlreichen Lebensmitteln wie Brot, Obst, Kaffeebohnen oder Fleisch gefunden. Als xerophiler Pilz kann er bei Temperaturen von -7 °C wachsen und noch tiefere Temperaturen überleben. Tiefgefrorene Lebensmittel wie z.B. Fleisch, das mit *C. herbarum* kontaminiert ist, können nach dem Auftauen sehr schnell verderben. *C. herbarum* besitzt das Enzym "Invertase", das ihm das Wachstum auf Substraten mit sehr hohem Zuckergehalt und niedriger Wasseraktivität ermöglicht. Aus diesem Grund können Produkte wie Rohrzucker oder Maissirup befallen werden. Ferner wird *C. herbarum* aus Papier, Wolle, Sandstein oder Kunststoffen, v.a. Polyurethan, isoliert (Reiß 1986).

Die Schimmelpilzpopulation der Außenluft besteht zum größten Teil aus *C. herbarum*. Während farblose Sporen durch UV-Strahlen des Sonnenlichtes schnell abgetötet werden, werden pigmentierte Sporen wie die von *C. herbarum* nicht angegriffen, so daß diese in den verschiedensten Regionen der Erde zahlreich zu finden sind.

C. herbarum besitzt zusammen mit *Alternaria alternata* eine der stärksten allergieauslösenden Potentiale weltweit. Die allergieauslösenden Stoffe wie Enzym-, Lipo- oder Glykoproteine sind auf der Konidienoberfläche lokalisiert. Breitenbach u.a. (1997) gehen davon

aus, daß Enolasen die bedeutendsten Allergene sind. Als Symptome treten Niesen, Schnupfen, Erbrechen, Durchfall oder allergisches Asthma auf.

3.2.4 *Penicillium expansum*

P. expansum ist ein weitverbreiteter Schimmelpilz, der aus vielen Substraten isoliert werden kann. Er wächst u.a. auf Brot, Fleisch (Tauchmann u.a. 1971), Rohwurst (Alperden 1973), Beeren, Gemüse und Obst (Buchanan u.a. 1974, Frank u.a. 1977), vor allem aber befallt er Äpfel (Harwig u.a. 1973, Wilson und Nuovo 1973).

P. expansum kommt hauptsächlich in den gemäßigten Breiten vor, das Wachstumsoptimum liegt bei etwa 25 °C, Mycelwachstum kann aber bis zu -3 °C beobachtet werden. Der Pilz wächst sehr schnell unter Bildung zahlreicher grün-blauer Sporen.

Der Pilz kann zwei verschiedene Mycotoxine bilden, *Patulin* und *Citrinin*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Stamm verwendet, der nur Patulin produziert. Im folgenden Kapitel wird ausführlich auf Mycotoxine eingegangen.

3.3 Mycotoxine

3.3.1 Allgemeines

Mycotoxine sind Stoffwechselprodukte von Pilzen, die für Menschen und Tiere giftig sind. Das Vorkommen von Mycotoxinen in landwirtschaftlichen Produkten ist ein weltweites Problem. Bereits im Mittelalter forderte eine Krankheit, die *Ergotismus* genannt wird, viele Opfer (Mantle und Penny 1981). Vor allem nach feuchten, warmen Wintern war das Getreide durch den Schimmelpilz *Claviceps purpurea* befallen, dessen Metabolite Alkaloide gleicher Basisstruktur waren und zu Krämpfen, Halluzinationen und dem Absterben der Extremitäten führen konnten. Nach dem 2. Weltkrieg trat in Rußland die Krankheit "Alimentary Toxic Aleukia" auf, die Blut- und Hautkrankheiten auslöste. Die Ursache waren *Fusarium*-Spezies, die überwintertes Getreide u.a. mit *T2-Toxin*, *Zearalenon* oder *Fusarin C* verseucht hatten. Jedoch erst die Verendung von über 100 000 Truthähnen im Jahre 1960, die mit *Aflatoxin* verseuchtes Erdnußmehl gefressen hatten, führte zu einer intensiven weltweiten Erforschung der Mycotoxine.

Heute sind etwa 100 Mycotoxine bekannt, die von über 200 Pilzarten gebildet werden können. Die wichtigsten Gattungen sind dabei *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium*.

Stoffwechselprozesse, die in allen Schimmelpilzen ablaufen, lassen sich unterteilen in einen Primär- und einen Sekundärstoffwechsel. Die Primärmetabolite erfüllen lebensnotwendige Aufgaben innerhalb der Zelle, das sind z.B. Aminosäuren oder Vitamine. Die Metabolite des Sekundärstoffwechsels, zu denen die Mycotoxine zählen, können dagegen in Abhängigkeit von der Pilzart variieren. Ihre Aufgaben sind nicht auf die Einzelzelle beschränkt, sondern meist für den ganzen Organismus lebensnotwendig. Der Sekundärstoffwechsel wird beim Übergang von der Wachstumsphase in die stationäre Phase aktiviert. Dieser Vorgang wird äußerlich von der Sporenbildung begleitet.

Die Biosynthese der Mycotoxine kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, wobei Essigsäure in den meisten Fällen eine entscheidende Rolle spielt.

Auf dem Polyketidweg werden durch Kondensation von Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA (ähnlich der Fettsäuresynthese) u.a. *Aflatoxin*, *Patulin* und *Ochratoxin* gebildet. Die *Trichotecene* werden wie Terpene und Steroide über Essigsäure und Mevalonsäure synthetisiert. Einige Toxine entstehen aus Aminosäuren, wie z.B. *Cyclopiazonsäure* aus Tryptophan.

Die toxische Wirkung der Mycotoxine beruht bei subletalen Mengen hauptsächlich auf der Hemmung des Immunsystems (Sharma u.a. 1993). Die Lymphozyten-Aktivität wird herabgesetzt, die Produktion von Immunglobulinen und Makrophagen behindert (Corrier 1991). Dadurch kann das Entstehen von Infektionskrankheiten gefördert werden (Kolb 1984). Ferner greifen viele Toxine Leberzellen an, verursachen Hautirritationen, sind nephrotoxisch oder sie sind Nervengifte (Reiß 1970).

3.3.2 Patulin

Zwölf Jahre nach der Entdeckung des *Penicillins* durch Alexander Fleming (1929) beschrieb Glister (1941) eine Substanz, die sowohl gegen gram-positive als auch gram-negative Bakterien wirksam war. Kurze Zeit später wurde diese Substanz aus *Penicillium claviforme* isoliert und *Claviformin* genannt (Chain u.a. 1942). Die Isolierung aus *P. patulum* führte zu dem Namen *Patulin*, aus *P. expansum* zu *Expansin* und aus *Aspergillus clavatus* zu *Clavacin* (Mislivec 1981). Weitere Synonyme für *Patulin* sind: *Claviformin*, *Clavatin*, *3,4-Lacton*, *My-*

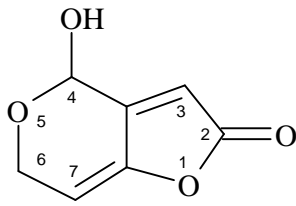


Abb. 3.1: Patulin

coin C, *Mycoin C3*, *Penicidin* und *Terinin* (IARC Monographs 1986). Der systematische IUPAC-Name für *Patulin* ist 4-Hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyran-2(6*H*)-on.

Das zunächst als ein vielversprechendes Antibiotikum eingestufte *Patulin* erwies sich für therapeutische Zwecke als viel zu giftig (Chain u.a. 1942). Die Struktur des *Patulins* wurde 1949 von Woodward und Singh beschrieben und dessen Synthese 1950.

Patulin übt einen toxischen Effekt auf Bakterien und Pilze aus (Reiß 1973), hemmt das Wachstum von Pflanzen und ist hochgiftig für Menschen und Tiere (Leistner 1971). Auf Viren scheint *Patulin* allerdings keine Wirkung zu haben (Frank 1970). *Patulin* erhöht den Blutzuckerspiegel (Frank 1970) sowie die Gefäßpermeabilität, was zu Ödemen führen kann (Broom 1944, Freerksen 1951). Die DNA-Synthese in Leukozyten wird gestört und deren Aktivität verringert (Sharma 1993), das Immunglobulin-Niveau wird gesenkt (Escoula 1988). *Patulin* reagiert mit Sulfhydryl-Gruppen von Enzymen (Geiger und Conn 1945, Pohland 1970), so wird beispielsweise die Plasmamembranfunktion durch die toxische Wirkung auf die Na⁺-K⁺-ATPase gestört (Phillips und Hayes 1977) und die RNA-Polymerase inaktiviert (Arafat u.a. 1985). Die Proteinsynthese wird gehemmt aufgrund der Abnahme der Permeabilität der Plasmamembran für Aminosäuren (Arafat 1995). *Patulin* kann außerdem vernetzend auf Proteine wie Cystein, Lysin oder Histidin wirken (Fliege und Metzler 1999). Die Toxizität von *Patulin* kann durch die Zugabe von SH-haltigen Verbindungen wie Cystein oder Gluthation entscheidend reduziert werden (Lindroth und Wright 1990).

Die Einstufung von *Patulin* als Cancerogen ist umstritten. Dickens beschrieb eine krebserregende Wirkung bei subcutaner Injektion von *Patulin* bei Ratten (1961) und Kolb berichtete von Sarkombildungen bei chronischer Aufnahme von *Patulin* (1984). Andere Autoren konnten nach oraler Verabreichung von *Patulin* keine Tumorbildung bei Versuchstieren feststellen (Müller 1987). Nach Schlatter ist *Patulin* sicher kein starkes Carcinogen, ein krebserregendes Potential kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (1990).

Patulin ist eine weiße, geruchlose Substanz mit einem Schmelzpunkt von 105-108 °C, die von einigen Vertretern der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* sowie von *Byssochlamys nivea* synthetisiert werden kann (IARC Monographs 1986). Die Biosynthese beginnt mit einer Kopf-Schwanz-Kondensation aus Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA zu 6-Methylsalicylsäure und

verläuft über m-Kresol, m-Hydroxy-Benzylalkohol, Gentisylalkohol, Gentisylaldehyd zu *Patulin* (Tanenbaum und Bassett 1958, Scott u.a. 1973, Reiß 1978).

Patulin wird aus zahlreichen Lebensmitteln wie Fleisch, Gemüse und Obst isoliert (Tauchmann u.a. 1971, Buchanan u.a. 1974, Frank u.a. 1977), jedoch sind Äpfel und deren Folgeprodukte, die mit *Penicilium expansum* befallen sind, am häufigsten kontaminiert (Brian u.a. 1956, Wilson und Nuovo 1973, Ciegler u.a. 1977, Paster u.a. 1995). In Orangensaft wird *Patulin* rasch inaktiviert, was auf den Gehalt an SH-haltigen Verbindungen zurückgeführt werden kann (Scott 1968), in Apfel- und Traubensaft ist *Patulin* jedoch stabil (Pohland 1970, Buchanan 1974). Bei der Herstellung von Fruchtsäften wird *Patulin* durch das Pasteurisieren nur um maximal 20 % reduziert (Stray 1978), so kann der *Patulingehalt* in Fruchtsäften als Indikator für die Qualität der Ausgangsprodukte angesehen werden. Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation dürfen Fruchtsäfte maximal 50 µg/l *Patulin* enthalten.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Die Hochdruckbehandlung

Die Hochdruckapparatur wurde von der Firma "Dunze Hochdrucktechnik" (Bad Homburg) angefertigt und ist für Drücke bis zu 700 MPa ausgelegt.

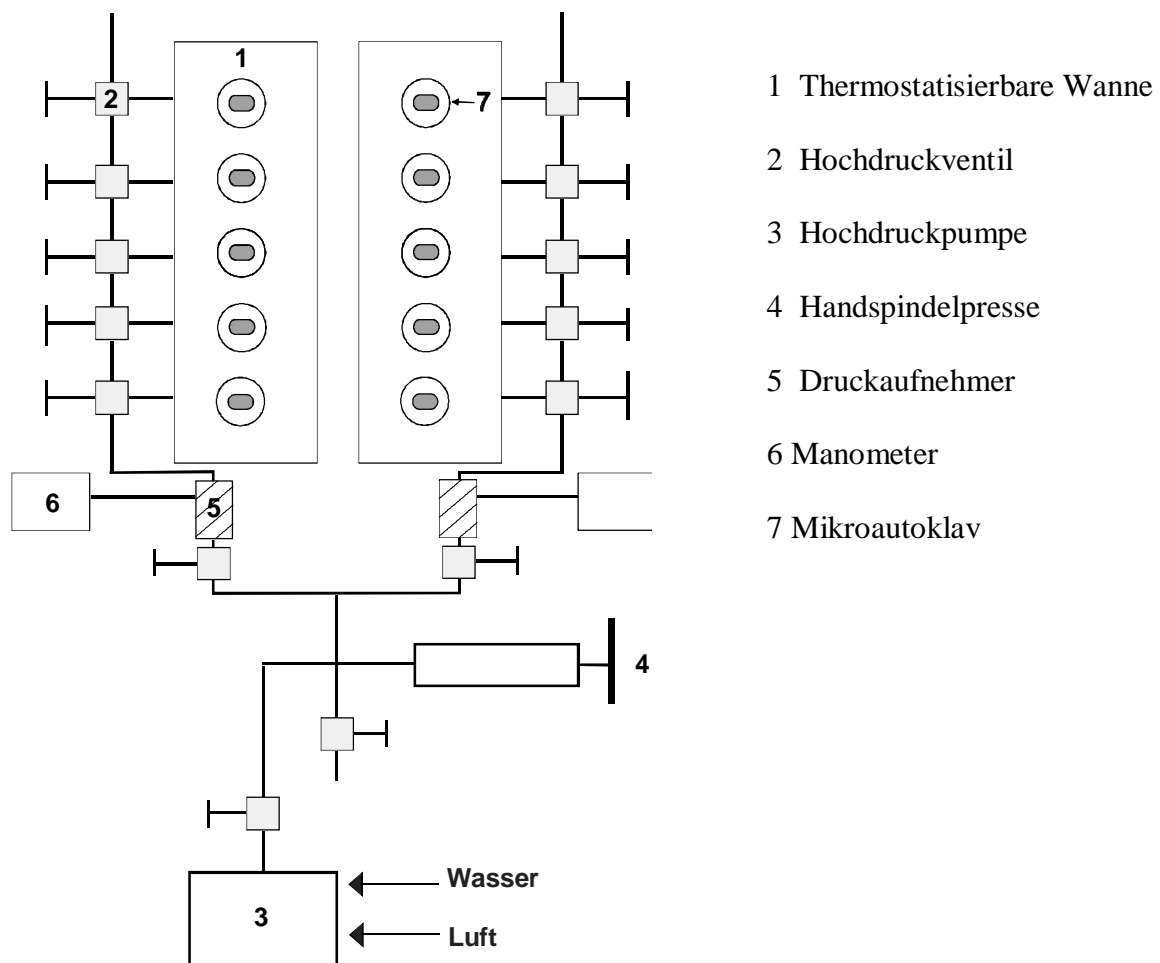


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Hochdruckapparatur

Die Hochdruckbehandlung der Proben erfolgt in Mikroautoklaven, von denen jeweils fünf in zwei getrennt thermostatisierbaren Kammern in Reihe angeordnet sind. Zur Thermostatisierung werden die Haake-Kryostaten D 8 und F 3 verwendet, die mit Wasser betrieben werden.

Zwischen den einzelnen Mikroautoklaven einer Kammer sind absperrbare Ventile angebracht. Diese ermöglichen es, die Proben unterschiedlich lange dem Druck auszusetzen und eine Kinetik zu erstellen.

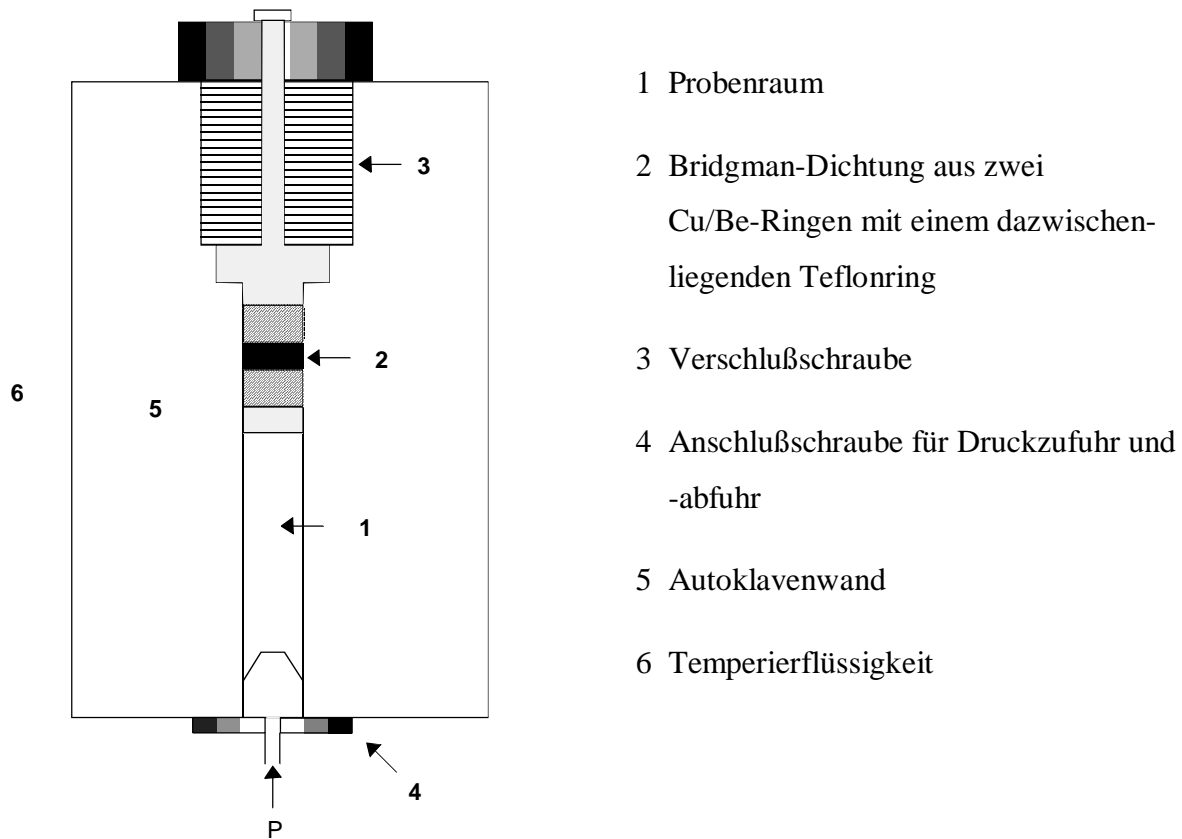


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung eines Mikroautoklaven

Der Druckaufbau erfolgt über eine druckluftbetriebene Hydraulikpumpe der Firma Wepuko, Metzingen, Typ P 160-5-1-100. Durch einen Vordruck der Preßluft von 0,7 MPa und einer Verstärkung von 1:1000 mittels eines Differentialkolbens läßt sich ein Maximaldruck von 700 MPa erzeugen. Das Druckmedium ist ein Gemisch aus Wasser/Glykol (9:1), das durch eine Vordruckpumpe der Firma Yamada, Typ NDP-5-FPT/VT, Hengelo, Niederlande, der Hochdruckpumpe zugeführt wird. Die Feineinstellung des Druckes erfolgte mit einer speziell angefertigten Handspindelpresse der Firma aad, Bad Homburg. Das Manometer ist ein Produkt der Firma Dunze, Typ S402-70-1, Bad Homburg.

Die Druckbehandlung der Sporensuspensionen bzw. der Reaktionsgemische erfolgte in Polyethylenschläuchen mit einem Durchmesser von 8 mm der Firma Kronlab, Typ Laboflex PE 8.0 NA 10.0, Sinsheim. Der Schlauch wurde an beiden Enden mit Silikonstopfen der Fir-

ma Migge, 5×9×20 mm, Heidelberg, verschlossen. Das maximale Fassungsvermögen der Schläuche war 4 ml.

Vor der Druckbehandlung wurden die Proben ca. 5 min in der Hochdruckanlage temperiert. Der Druckaufbau erzeugte in der Probe einen Temperaturanstieg (10-15 °C bei 500 MPa), der jedoch relativ schnell durch die Thermostatisierflüssigkeit ausgeglichen wurde. Die druckbehandelten Proben wurden sofort weiterverarbeitet. War das nicht möglich, wurden diese bei 5 °C gelagert.

4.2 Aufzucht und Vorbereitung der Schimmelpilze

4.2.1 Nährmedien

Zur Aufzucht der Schimmelpilze wurde Kartoffel-Dextrose-Agar verwendet, zur Auswertung der Hochdruckversuche der Malzextrakt-Pepton-Agar.

<u>Kartoffel-Dextrose-Agar</u>	Glucose	20 g
	Agar	15 g
	Kartoffelsuspension	1000 ml

Kartoffelsuspension: 200 g Kartoffeln werden geschält, kleingeschnitten und eine Stunde in etwa 500 ml Wasser gekocht, danach mit einem Pürrierstab zerkleinert und auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt.

<u>Malzextrakt-Pepton-Agar</u>	Malzextrakt	10 g
	Sojapepton	3 g
	Agar	15 g
	Wasser	1000 g

Die vorbereiteten Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden etwa 15 ml des flüssigen Agars in Polycarbonat-Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. Nach dem vollständigen Erstarren des Agars (etwa 60 min) wurden die Agarplatten mit offenem Deckel ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet (Entfernen des Kondenswassers) und bis zur weiteren Verwendung gut verpackt bei 5 °C gelagert.

Bei der Hochdruckbehandlung der Sporen in Broccolisaft wurden nach dem Dampfsterilisieren 50 ml einer 0,1 % igen Chloramphenicol-Lösung (m/m) durch Sterilfiltrieren dem flüssigen Malzextrakt-Pepton-Agar (1 Liter) zugesetzt. Dieses Vorgehen sollte das Wachstum von Bakterien auf den Agarplatten verhindern.

Bei Hochdruckversuchen mit *Aspergillus fumigatus* wurden Malzextrakt-Pepton-Agar 0,05 g Bengal Rosa hinzugefügt, um das Wuchern der Kolonien zu vermeiden und die Auswertung zu erleichtern. Die Zahl der Kolonien wurde durch dieses Verfahren nicht reduziert.

4.2.2 Zuchtbedingungen

Die verwendeten Stämme *Aspergillus fumigatus* (DSM 790), *Botrytis cinerea* (DSM 877), *Cladosporium herbarum* (DSM 63422) und *Penicillium expansum* (DSM 1994) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, erhalten. Den auf Agar wachsenden Kulturen wurden mit einer sterilen Impföse Sporen entnommen und auf Kartoffel-Dextrose-Agar ausgestrichen. Nach einer etwa zweiwöchigen Inkubation bei 24 °C (37 °C bei *A. fumigatus*) wurden die Sporen geerntet (siehe 4.2.3). Die auf diesem Wege gewonnenen Stammsuspensionen wurden bei 5 °C gelagert und für die Zucht von Kulturen für die Hochdruckversuche verwendet. Die maximale Haltbarkeit der Stammsuspensionen betrug zwei bis vier Monate.

4.2.3 Probenvorbereitung

Aus den Stammsuspensionen wurden neue Kulturen gezüchtet, deren Sporen für die Hochdruckversuche verwendet wurden. Hierfür wurden je 100 µl der Stammsuspensionen auf Kartoffel-Dextrose Agar verteilt und 10-14 Tage bei 24 °C (37 °C bei *A. fumigatus*) inkubiert. Nach 1-2 Tagen wurde weißes Mycel auf den Platten erkennbar, nach 2-3 Tagen reiften die ersten Sporen. Zum Erntezeitpunkt waren die Agarplatten komplett mit Sporen bedeckt.

Zur Herstellung der Sporensuspension wurden 1-2 Agarplatten aus den Petrischalen entfernt und in ein Becherglas gegeben. Dort wurden die Böden mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % m/m NaCl) bedeckt und die Sporen durch Schaben mit einem Drigalsky-Spatel von der Oberfläche gelöst. Die Kochsalzlösung enthielt 0,1 % Polysorbat 80, das ein Zusammenklumpen der Sporen verhindern sollte. Die Suspension wurde durch Watte filtriert, um Mycelfragmente und Agarreste zu entfernen und zwei mal zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde jeweils die überstehende Lösung abdekantiert und durch frische Kochsalzlösung

ersetzt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die gereinigten Sporen in etwa 10 ml Kochsalzlösung suspendiert. Die auf diese Weise hergestellten Suspensionen enthielten 10^7 - 10^9 Sporen / ml.

Bei Hochdruckbehandlungen in anderen Lösungen wurde nach dem Zentrifugieren der Sporen und Abdekantieren der Kochsalzlösung mit der entsprechenden Menge des gewünschten Mediums aufgefüllt.

4.2.4 Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl sowie der Zahl der lebensfähigen Keime nach der Druckbehandlung wurde das "Spatelverfahren" eingesetzt. Bei hohen Keimzahlen mußte die Sporensuspension verdünnt werden. Dies geschah mit dezimalen Verdünnungsreihen, wobei je 0,5 ml der Suspension in 4,5 ml isotonischer Kochsalzlösung (mit 0,1 % Polysorbat 80) gegeben wurde. Mit je 100 µl der entsprechend verdünnten Suspension wurden pro Verdünnungsstufe drei bis fünf Agarplatten beimpft.

Die Agarplatten wurden bei 24 °C (37 °C bei *A. fumigatus*) 3-5 Tage bebrütet. Zur Auswertung der Versuche wurden alle Platten mit maximal 200 Kolonien gezählt (mit einem Koloniezählgerät der Firma WTW, Typ BZG28, Weinheim). Die Nachweisgrenze lag für drei Platten bei 3,33 Keime/ml, für fünf Platten bei 2 Keimen/ml.

4.3 Vorbereitung der Medien

4.3.1 Pufferlösungen

Tris-Puffer

- Stammlösungen: a. 1 molare Salzsäure
 b. Tris (0,05 mol/l) in Wasser

x ml Lösung a werden mit y ml Lösung b vermischt.

pH-Wert	x ml Lösung a	y ml Lösung b
7	4,67	95,33
8	2,87	97,13
9	0,55	99,45

MES-Puffer

- Stammlösungen:
- a. 1 molare Natronlauge
 - b. NaCl (1 mol/l) in Wasser

1,192 g 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) werden mit x ml Lösung a und y ml Lösung b vermischt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

pH-Wert	x ml Lösung a	y ml Lösung b
5,2	0,50	9,50
6,0	2,07	7,93
7,0	4,38	5,62

Glycin-Puffer

- Stammlösungen:
- a. Glycin (0,1 mol/l) und NaCl (0,1 mol/l) in Wasser
 - b. 0,1 molare Salzsäure
 - c. 0,1 molare Natronlauge

Stammlösung a wird in Abhängigkeit von dem pH-Wert mit Lösung b oder c gemischt. Die Mengenangaben der Mischung in ml sind in der folgenden Tabelle angegeben:

pH-Wert	x ml Lösung a	x ml Lösung b/c
1,2	11,1	88,9 (b)
2,0	50,7	49,3 (b)
3,0	81,0	19,0 (b)
3,4	90,3	9,7 (b)
10,0	62,5	37,5 (c)
11,0	51,2	48,8 (c)
12,0	46,0	54,0 (c)
12,8	21,4	78,6 (c)

4.3.2 Apfel- und Brokkolisaft

Zur Herstellung der Säfte wurden die Äpfel (Jona Gold und Rubinette, 1:1) und Brokkoli gewaschen, getrocknet, zerkleinert und mit einer handelsüblichen Küchenmaschine gepreßt. Der Saft wurde zur Entfernung von Schwebeteilchen unter Wasserstrahlvakuum filtriert und sofort portionsweise eingefroren. Die Säfte wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn aufgetaut und sofort verwendet.

Nährwertgehalt* der Säfte in g oder mg je 100 ml Saft:

Inhaltsstoff	Apfelsaft	Brokkolisaft
pH-Wert	3,28	6,59
Wasser (g)	86,69	94,96
Trockensubstanz (g)	13,31	5,04
Asche (g)	0,35	0,74
Titrierbare Gesamtsäure (g)	0,55	0,02
Gesamt Vit. C (mg), davon	5,20	24,50
L-Ascorbinsäure	0,00	0,90
l-Dehydroascorbinsäure	5,20	23,60
Gesamtzucker (g), davon	12,36	2,58
Fruktose (g)	6,20	1,15
Glucose (g)	0,84	1,30
Saccharose (g)	5,32	0,13

* Die Nährwert-Bestimmung der Säfte erfolgte durch die Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE), Karlsruhe.

Keimzahlbestimmung nach dem Auftauen:

Broccolisaft: etwa 250 Keime/ml, davon 95 % Bakterien und 5 % Pilze.

Apfelsaft: etwa 100 Keime/ml, davon 90 % Bakterien und 10 % Pilze.

Nach einer 10minütigen Druckbehandlung bei 25 °C und 200 MPa konnten in Apfelsaft keine Keime nachgewiesen werden. Das Wachstum der überlebenden Bakterien in Brokkolisaft wurde durch Zugabe von Chloramphenicol unterdrückt.

4.3.3 Lagerversuche

Für die Lagerversuche wurde zunächst eine Sporensuspension (*C. herbarum* und *P. expansum*) wie unter 4.2.3 beschrieben hergestellt, der Überstand abzentrifugiert und die Sporen in Apfelsaft oder isotonischer Kochsalzlösung suspendiert. Pro Versuchsreihe wurden 8 Proben abgefüllt, druckbehandelt und bei 5 °C eingelagert. Zur Auswertung der Versuche wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen, d.h. nach je 2, 4, 8 und 16 Wochen wurden 2 Proben ausgewertet. Jeder Probe wurden 3×100 µl entnommen und auf 3 Agarplatten verteilt. Die Agarböden wurden 3-5 Tage bei 24 °C inkubiert.

Druckbehandlung:

<i>C. herbarum</i>	Sterilitätstest	4 °C / 400 MPa / 1 h
	Lagerversuche	40 °C / 200 MPa / 1 h
<i>P. expansum</i>	Sterilitätstest	4 °C / 400 MPa / 1 h
	Lagerversuche	40 °C / 350 MPa / 1 h

4.4 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die Messungen wurden an einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, Griesheim, Typ LC-10AS mit einem 7125 Rheodyne Injektor und einem Detektor der Firma LATEK, Heidelberg, Typ SPD-2A, durchgeführt.

Die analytische Säule mit 150 mm Länge und 4,6 mm im Durchmesser wurde von der Firma Phenomenex, Aschaffenburg, bezogen. Die Säule ist gepackt mit C 18 (polar endcapped, 125 Å Porengröße, 5 µm im Durchmesser).

4.4.1 Laufmittel

Als Laufmittel wurden Wasser-Lösungsmittel-Gemische in unterschiedlichen Anteilen verwendet:

- Wasser, pH 4, angesäuert mit Ameisensäure
- Wasser:Acetonitril, 99:1 9:1 8:2 7:3
- Wasser:Methanol 9:1 7:3 6:4 1:1 4:6
- Phosphatpuffer (0,2 molar, pH 2,1):Methanol 7:3

Alle verwendeten Laufmittel waren filtriert (0,22 µm Membranfilter) und entgast.

4.4.2 Eichung

Patulin

Die Auswertung der Versuche erfolgte über einen externen Standard. Die Patulinkonzentration wurde photometrisch über den molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt (nach Hagenauer-Hener u.a. 1995): 5 mg Patulin wurden in 50 ml Ethanol gelöst. 5 ml dieser Lösung wurden in einen 100 ml Meßkolben gegeben und mit Ethanol auf 100 ml aufgefüllt, so daß eine Standardlösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml erhalten wurde. Die Extinktion E der Standardlösung wurde bei 275 nm in einer Quarzküvette gegen Ethanol bestimmt.

$$\text{Patulin-Konzentration: } c[\mu\text{g/ml}] = \frac{1000 \cdot E \cdot M}{\epsilon \cdot d}$$

$$M = 154 \text{ g/mol}; \epsilon = 144600 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm}); d = 1 \text{ cm}$$

Für die Erstellung einer Eichkurve wurden 10 ml der Standardlösung bei 40 °C im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 10 ml des Laufmittels aufgenommen. Die Eichkurve wurde aus Verdünnungen dieser Lösung erstellt.

5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)

250 mg 5-HMF wurden in einem Meßkolben auf 250 ml mit Essigsäureethylester aufgefüllt. 5 ml dieser Lösung wurden in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit Essigsäureethylester aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung wurde bei 40 °C im Vakuum abrotiert, mit 10 ml des Laufmittels aufgefüllt ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) und wie die Patulinlösung verdünnt. Die Lösungen von Patulin und 5-HMF in den organischen Lösungsmitteln wurden bei -22 °C gelagert.

4.4.3 Patulinproduktion von *Penicillium expansum* in Apfelsaft

Patulinproduktion

Für die Versuche zur Patulinfreisetzung von *P. expansum* wurde frisch gepreßter und gefroren gelagerter Apfelsaft verwendet (siehe auch 4.3.2). Die Sporensuspension wurde wie unter 4.2.3 beschrieben vorbereitet und dem Apfelsaft entweder direkt oder nach erfolgter Hochdruckbehandlung zugesetzt. Je nach Versuchsplanung wurden die Proben bei verschiedenen Temperaturen gelagert und in regelmäßigem Abstand auf ihren Patulingehalt untersucht.

Verkeimung des Apfelsaftes

1. Versuchsreihe: Ausgangssuspension mit $1,1 \cdot 10^8$ Keime/ml.

- a) 60 μl der Suspension werden zu etwa 6 ml Saft gegeben, Keimzahl $\sim 10^6$ Keime/ml.
- b) Ausgangssuspension wird 1:100 verdünnt, sonst wie beschrieben, $\sim 10^4$ Keime/ml.
- c) Druckbehandlung: 40 °C / 350 MPa / 30 min, Keimzahl etwa 100 Keime/ml. Davon werden 500 μl zu 7 ml Saft gegeben, ~ 7 Keime/ml Saft.

2. Versuchsreihe: Ausgangssuspension $1,4 \cdot 10^8$ Keime/ml.

- a) 100 μl der Ausgangssuspension werden zu 10 ml Apfelsaft gegeben, Keimzahl (KZ) des Saftes $\sim 1,4 \cdot 10^6$ Keime/ml.
- b) Ausgangssuspension wird 1:1000 verdünnt, davon werden 100 μl zu 10 ml Saft gegeben, KZ $\sim 1,4 \cdot 10^3$ Keime/ml.
- c) Druckbehandlung: 25 °C / 100 MPa / 6 h, Weiterverarbeitung wie unter b) beschrieben, KZ $\sim 1,4 \cdot 10^3$ Keime/ml.

- d) Druckbehandlung: 25 °C / 350 MPa / 20 min, 900 µl der Sporensuspension werden zu 10 ml Saft gegeben, KZ ~ $2,8 \cdot 10^3$ Keime/ml Saft.
- e) Druckbehandlung: 4 °C / 350 MPa / 8 min, 900 µl der Sporensuspension werden zu 10 ml Saft gegeben, KZ ~ $3,9 \cdot 10^3$ Keime/ml Saft.
- f) Druckbehandlung: 40 °C / 350 MPa / 3 min, 900 µl der Sporensuspension werden zu 10 ml Saft gegeben, KZ ~ $3,2 \cdot 10^3$ Keime/ml Saft.
- g) Druckbehandlung: 40 °C / 350 MPa / 30 min, KZ ~ 75 Keime/ml. 900 µl der Sporensuspension werden zu 10 ml Saft gegeben, KZ ~ 7 Keime/ml Saft.

Extraktion

Die Apfelsaftproben wurden filtriert, um das Pilzmycel zu entfernen und drei mal mit Essigsäureethylester extrahiert (jeweils etwa die gleiche Menge wie das Filtrat). Die vereinten Fraktionen wurden bei 40 °C im Vakuum abrotiert und mit dem Laufmittel aufgefüllt (entweder auf das gleiche Volumen, das nach dem Filtrieren erhalten worden war oder auf eine definierte, vor Versuchsbeginn festgelegte, Menge). Diese Lösung wurde sterilfiltriert (0,22 µm Filter) und 20 µl wurden in die HPLC injiziert. Die Wiederfindungsrate betrug > 96 % bei Patulin und etwa 80 % bei 5-HMF.

Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Phosphatpuffer (0,2 molar, pH 2,1) : Methanol im Verhältnis 7 : 3 mit einer Fließrate von 0,5 ml/min verwendet. Die Messungen wurden bei 275 nm durchgeführt.

4.4.4 Patulin-Cystein-Adduktbildung

5 mg Patulin wurden in 50 ml Ethanol gelöst und bei -22 °C gelagert (siehe auch 4.4.2). Für die Versuche wurden 10 ml dieser Lösung bei 40 °C im Vakuum abrotiert und in 20 ml Wasser (angesäuert auf pH 4 mit Phosphorsäure) aufgenommen. Die entstandene Lösung hatte eine Konzentration von 50 mg Patulin/l.

100 mg Cystein wurden in 100 ml Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Membranfilter sterilfiltriert und anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Molverhältnis Patulin:Cystein betrug 1:25. 20 µl dieser Reaktionslösung wurden entweder direkt oder nach einer Hochdruckbehandlung in die HPLC injiziert. Die Menge der Patulin-Cystein-Addukte wurde durch die Reduktion von Patulin zurückgerechnet. Als Laufmittel wurde eine

Mischung aus Phosphatpuffer (0,2 molar, pH 2,1) : Methanol im Verhältnis 7 : 3 (m/m) mit einer Fließrate von 0,5 ml/min verwendet. Die Messungen wurden bei 275 nm durchgeführt.

4.5 Verwendete Chemikalien

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Fluka, Buchs (Schweiz).

2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris), Fluka, Buchs (Schweiz).

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd, Sigma-Aldrich, Steinheim.

Acetonitril (für die HPLC), Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

Agar-Agar, Applichem, Darmstadt.

Apfelsaft, 100 %, Solevita, Lidl.

Bengal Rosa, Aldrich, Steinheim.

Chloramphenicol, Eu-Rho-Pharma GmbH, Kamen-Heeren.

D(+)-Glucose, Fluka, Buchs (Schweiz).

Essigsäureethylester (für die HPLC), Fluka, Buchs (Schweiz).

Ethanol (für die HPLC), Sigma-Aldrich, Steinheim.

H₃PO₄ 85 % (p.a.), Bernd Kraft GmbH, Duisburg.

Malzextrakt, Fluka, Buchs (Schweiz).

Methanol (für die HPLC), J.T.Baker, Deventer (Niederlande).

NaH₂PO₄ · H₂O (p.a.), GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg.

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt.

Patulin, Sigma-Aldrich, Steinheim.

Polysorbat 80, ICI, Middlesbrough (GB).

Sojapepton, Fluka, Buchs (Schweiz).

5 ERGEBNISSE

5.1 Hochdruckinaktivierung von Schimmelpilzsporen in Modellösungen

Der Verlauf einer Hochdruckinaktivierung von Schimmelpilzsporen läßt sich in guter Näherung durch eine Reaktion erster Ordnung (einphasige Kinetik) oder durch eine Kombination zweier Reaktionen erster Ordnung (zweiphasige Kinetik) beschreiben. Der schematische Verlauf einer zweiphasigen Inaktivierung wird in Abbildung 5.1 gezeigt. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung wird dabei in "Dezimalen Reduktionszeiten", D-Werten, angegeben. Die D-Werte geben eine Zeitspanne in Minuten an, die für eine Reduktion der Keimzahl um eine Zehnerpotenz benötigt wird. Dabei wird der labileren ersten Fraktion eine Dezimale Reduktionszeit D_1 , der stabileren zweiten Fraktion ein Wert D_2 zugeordnet. Die Gesamtzahl der Keime ist die Summe aus N_1 und N_2 . Da N_2 immer einen winzigen Anteil an der Gesamtpopulation einnimmt, kann $N_1 \approx N_{\text{gesamt}}$ angenommen werden.

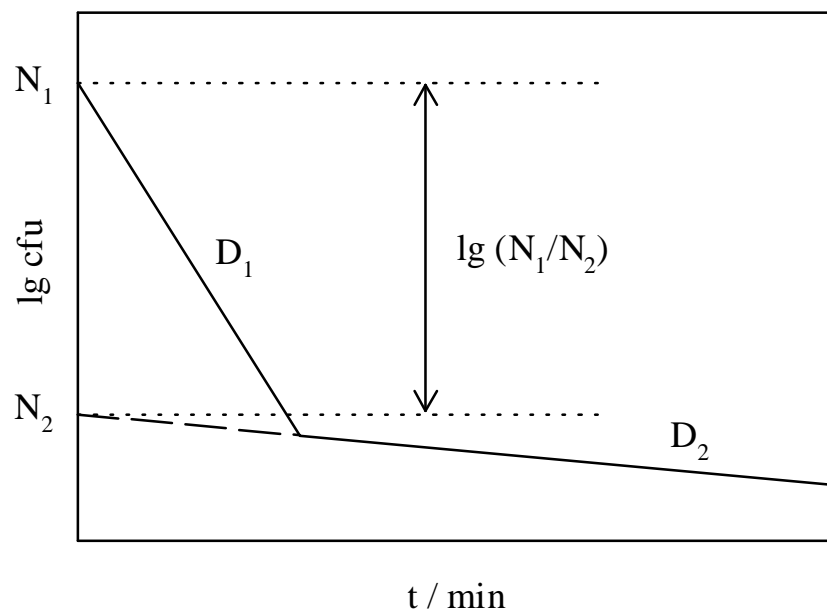


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung einer zweiphasigen Inaktivierung

Der Einfluß von hohem hydrostatischem Druck auf Schimmelpilzsporen wurde in isotoni-scher Kochsalzlösung, in Pufferlösungen und hochosmolalen Medien untersucht. Es wurden Konidiosporen der Schimmelpilze *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* sowie von *Penicillium expansum* verwendet.

5.1.1 *Cladosporium herbarum*

Die Druckempfindlichkeit der Konidiosporen von *C. herbarum* wurde bei 4 °C, 25 und 40 °C untersucht und ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

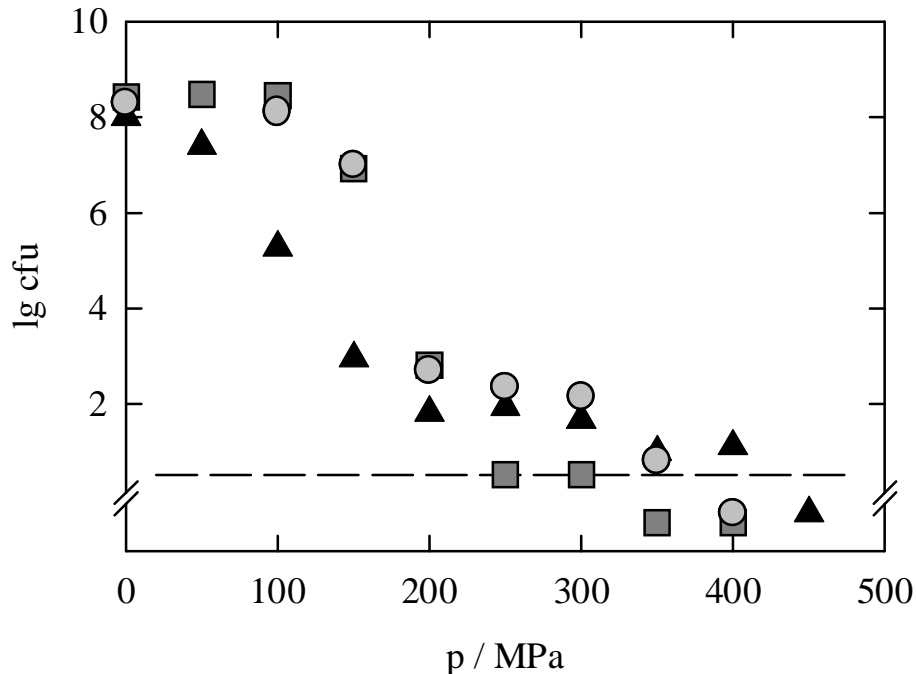


Abbildung 5.2 Barotoleranz der Konidiosporen von *C. herbarum* bei ■ 4, ○ 25, ▲ 40 °C und 30 Minuten in isotonischer Kochsalzlösung; ---- markiert die Nachweisgrenze.

Bei 4 und 25 °C beginnt die Inaktivierung bei Drücken über 100 MPa. Die Absterberate wird bis 200 MPa stetig größer. Bei 200 MPa scheint eine Druckhöhe erreicht zu werden, ab der sich die Inaktivierungsrate bei allen drei Temperaturen deutlich verlangsamt. Bei 4 °C und 30 min Behandlungsdauer können erst bei 350 MPa keine lebensfähigen Keime mehr nachgewiesen werden. Bei 25 °C ist sogar das Auftreten einer resistenten Fraktion zu beobachten, die im Druckbereich von 200-300 MPa stabil ist und erst bei 350 MPa leicht reduziert wird. Die Nachweisgrenze wird bei 25 °C bei Drücken von 400 MPa unterschritten.

Bei 40 °C wird die Keimzahl bereits bei 50 MPa reduziert. Der Inaktivierungseffekt wird in diesem Fall allerdings nur auf die hohe Temperatur zurückgeführt, der Druck scheint noch keinen Einfluß auf die Inaktivierung auszuüben (siehe auch Abbildung 5.4). Bei 100 MPa kann ein synergistischer Effekt zwischen Druck und Temperatur beobachtet werden, so daß in 30 Minuten eine Reduktion über 3 Zehnerpotenzen erfolgt. Wie schon die Barotoleranz bei 25 °C zeigte, tritt auch bei 40 °C eine stabile Fraktion von Sporen auf, die in einem Druckbereich von 200-400 MPa nicht weiter reduziert werden kann. Dieser Effekt wird bei 40 °C erst

bei 450 MPa überwunden. Die außergewöhnliche Stabilität der Sporen im Druckbereich von 200-400 MPa wurde eingehend untersucht und wird weiter unten ausführlich beschrieben (Abbildungen 5.6-5.9).

Die Kinetik der Hochdruckinaktivierung wurde zunächst bei 200 MPa und drei verschiedenen Temperaturen untersucht und wird in Abbildung 5.3 gezeigt.

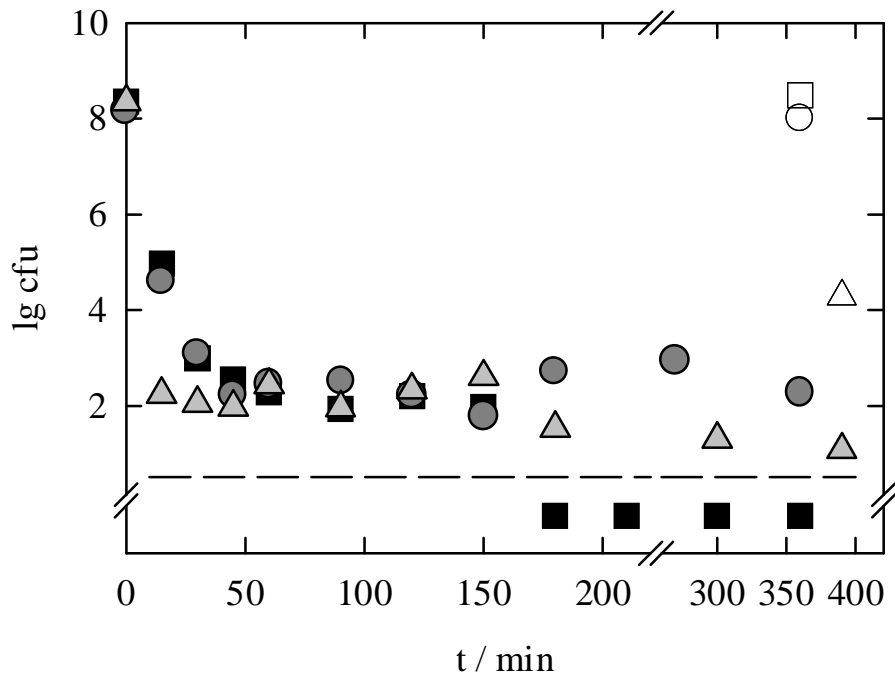


Abbildung 5.3 Kinetik der Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei ■ 4, ● 25, ▲ 40 °C und 200 MPa in isotonischer Kochsalzlösung; offene Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Die Hochdruckinaktivierung bei 4 °C und 200 MPa führt zunächst zu einem raschen Absterben der Sporen mit einem D_1 -Wert von ca. 6 min. Bei einer Keimzahl von etwa 100 Keimen/ml, die nach ca. 40 min erreicht wird, verlangsamt sich die Inaktivierung und verläuft weiter mit einem D_2 -Wert von etwa 60 min. Bei 25 °C wird die erste Fraktion ebenso schnell reduziert wie bei 4 °C ($D_1 \approx 6$ min), die zweite Fraktion wird allerdings innerhalb von 6 h nicht weiter inaktiviert. Hochdruckversuche bei 40 °C zeigen ebenfalls eine stabile zweite Fraktion, wobei hier die erste Fraktion mit einem D_1 -Wert von $< 2,5$ min labiler ist als bei 4 und 25 °C. Druckresistente Sporen, die bei konstantem Druck nicht inaktiviert werden können, werden als "stabile Fraktion" bezeichnet.

Wie aus Abbildung 5.3 deutlich hervorgeht (Kontrollwert bei 40 °C), werden die Konidiosporen bei 40 °C bereits bei Atmosphärendruck abgetötet. In Abbildung 5.4 ist die Inakti-

vierung der Sporen bei 40 °C unter Atmosphärendruck im Vergleich zu der bei 200 MPa dargestellt.

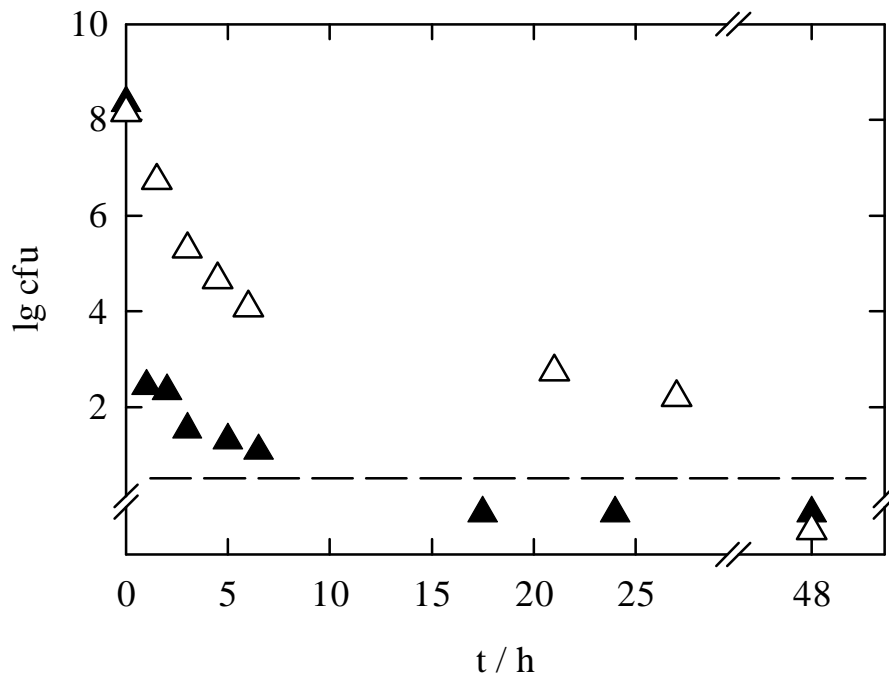


Abbildung 5.4 Inaktivierung der Konidiosporen von *C. herbarum* bei 40 °C mit \triangle 0.1 und \blacktriangle 200 MPa in isotonischer Kochsalzlösung; ---- markiert die Nachweisgrenze.

Die Inaktivierung der Konidiosporen bei Atmosphärendruck erfolgt mehrphasig. Mindestens drei unterschiedlich druckresistente Fraktionen sind erkennbar mit den Dezimalen Reduktionszeiten von $D_1 \approx 60$ min, $D_2 \approx 150$ min und $D_3 \approx 670$ min. Bei 200 MPa folgt der schnellen Reduktion der Sporenzahl während der ersten Minuten eine sehr langsame Abnahme in den folgenden Stunden ($D_2 \approx 400$ min). Vermutlich wird nur die erste Fraktion durch Druck inaktiviert. Die zweite Fraktion scheint aus druckresistenten Keimen zusammengesetzt zu sein, die nur durch die hohe Temperatur langsam abgetötet werden.

Um weitere Informationen über die stabile Fraktion zu erhalten, wurde ferner untersucht, inwieweit die Wachstumstemperatur einen Einfluß auf die Stabilität der Sporen gegenüber Hochdruck ausübt.

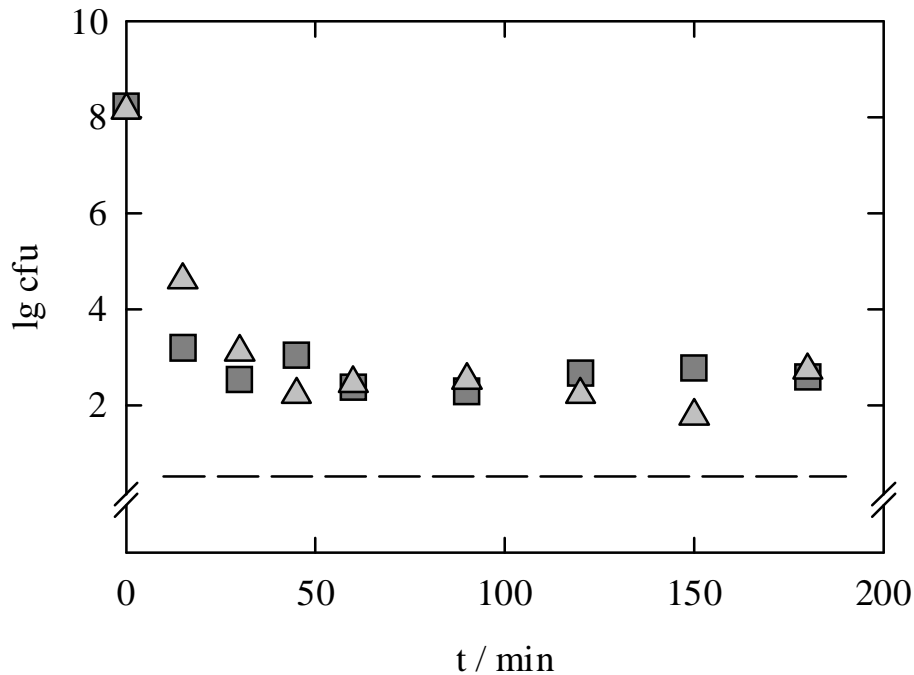


Abbildung 5.5 Inaktivierung der Konidiosporen von *C. herbarum* bei 25 °C und 200 MPa, ---- markiert die Nachweisgrenze.
 △ Sporenalter 1 Woche, Zucht bei 24 °C
 ■ Sporenalter 10 Wochen, Zucht bei 5 °C

C. herbarum wurde bei einer Umgebungstemperatur von 5 °C gezüchtet. Da bei so niedrigen Temperaturen die Wachstumsrate von Pilzen wesentlich geringer ist als bei Raumtemperatur, wurden die Sporen erst nach 10 Wochen Wachstum geerntet. Zu diesem Zeitpunkt waren die beimpften Agarplatten komplett bewachsen und zeigten äußerlich keinen Unterschied zu den Kulturen, die bei 24 °C bebrütet worden waren. Wie aus Abbildung 5.5 hervorgeht, scheint die Zuchttemperatur ebenso wenig wie die Aufzucht-dauer eine Auswirkung auf die Druckinaktivierung bei 25 °C und 200 MPa auszuüben.

Das Auftreten von stabilen Fraktionen wurde eingehender erforscht. Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit die Ausgangskeimzahl einen Einfluß auf die Größe der stabilen Fraktion ausübt. Abbildung 5.6 zeigt die Kinetik der Inaktivierung bei 40 °C und 200 MPa mit verschiedenen Ausgangskeimzahlen.

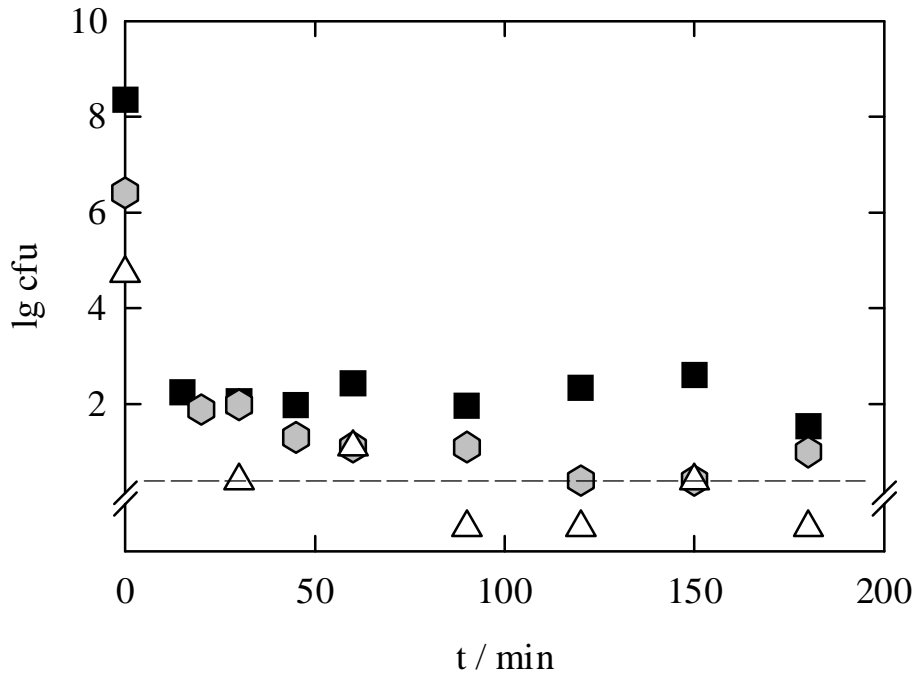


Abbildung 5.6 Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 40 °C und 200 MPa in isotonischer Kochsalzlösung mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen (△ ◻ ■); ---- markiert die Nachweisgrenze.

Die Reduzierung der Ausgangskeimzahl bei 40 °C führt zu einer Verringerung der stabilen Fraktion. Allgemein läßt sich hier feststellen, daß der Anteil der stabilen Fraktion an der Gesamtpopulation vermutlich gleich ist und die Höhe der stabilen Fraktion bei gegebener Temperatur nur von der Ausgangskeimzahl abhängig ist.

Als nächstes sollte geklärt werden, ob das Auftreten von stabilen Fraktionen durch eine Druckerhöhung vermieden werden kann. Dazu wurden die Sporen bei 4, 25 und 40 °C mit Drücken bis zu 400 MPa behandelt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 5.7 bis 5.10 gezeigt.

Wie aus Abbildung 5.7 hervorgeht, führt bei 4 °C eine Druckerhöhung auf 300 MPa zu einer Steigerung der Inaktivierungsrate. Der D-Wert sinkt von 6 min bei 200 MPa auf < 1 min bei 300 MPa. Auch der zweiphasige Kurvenverlauf, der bei 200 MPa gemessen worden war (Abbildung 5.3), ist bei 300 MPa nicht mehr erkennbar. Bei einer Druckhöhe von 400 MPa sind nach 5 min keine Keime mehr nachweisbar. Der D-Wert liegt hier ebenfalls bei < 1 min.

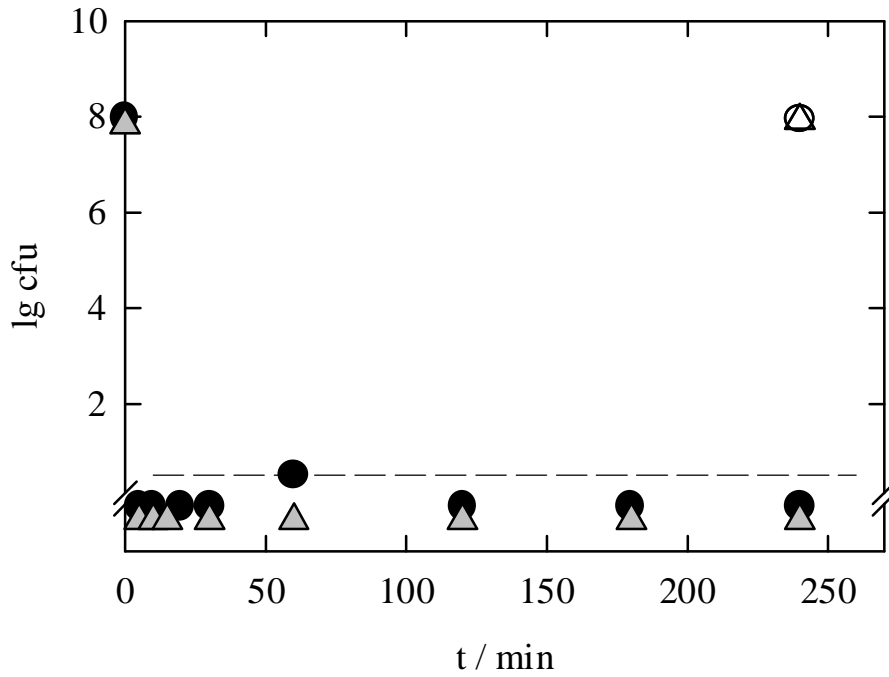


Abbildung 5.7 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 4 °C mit ● 300 und ▲ 400 MPa in isotoni-scher Kochsalzlösung; offene Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

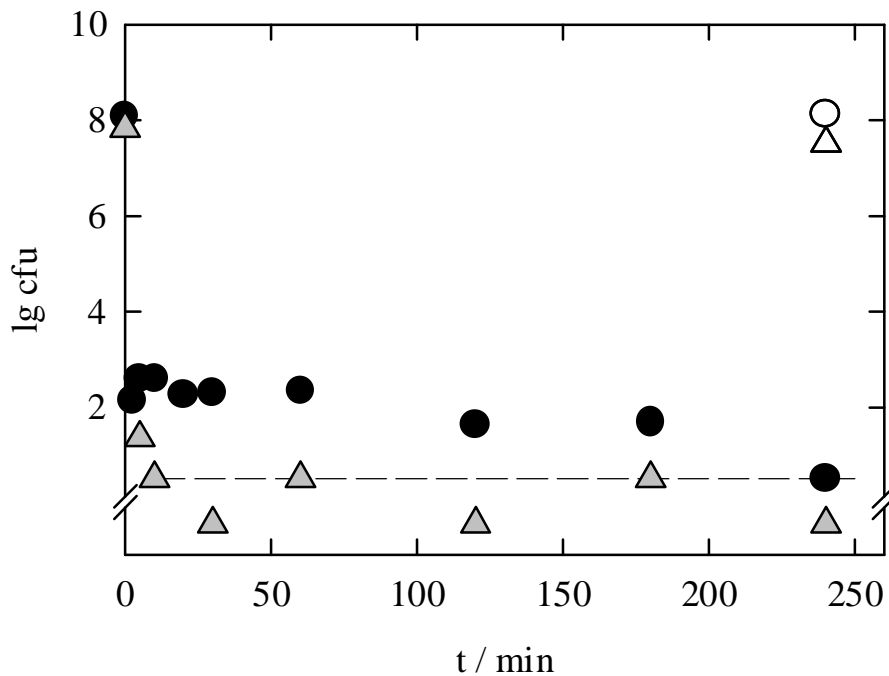


Abbildung 5.8 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 25 °C mit ● 300 und ▲ 400 MPa in isotoni-scher Kochsalzlösung; offene Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Bei 25 °C führt eine Druckerhöhung auf 300 MPa im Gegensatz zu 4 °C nur zu einer schnelleren Inaktivierung der ersten Fraktion (Abbildung 5.8). Der D_1 -Wert verringert sich dabei von 6 min bei 200 MPa auf < 0.5 min bei 300 MPa. Die zweite Fraktion scheint von der Druckerhöhung nur nach längeren Behandlungszeiten geringfügig beeinflusst zu werden. Hier kann eine leichte Verringerung der Keimzahl nach 4 h beobachtet werden. Bei 400 MPa scheint der Anteil der zweiten Fraktion verringert zu werden, die stabile Fraktion ist aber dennoch weiter existent.

Die Auswirkungen einer Druckerhöhung bei 40 °C sind vergleichbar mit denen bei 25 °C. Abbildung 5.9 zeigt die Kinetik der Hochdruckinaktivierung bei 40 °C sowie 250 und 300 MPa. Im Vergleich zu 200 MPa ist keine Verbesserung der Inaktivierung erkennbar, der Anteil der stabilen Fraktion ist unverändert.

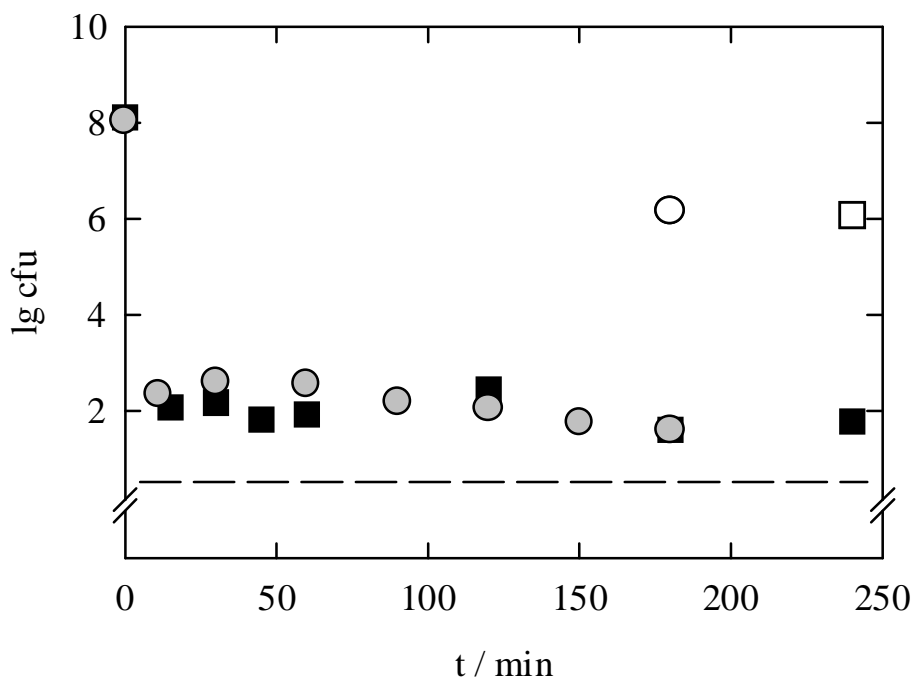


Abbildung 5.9 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 40 °C mit ■ 250 und ● 300 MPa in isotonischer Kochsalzlösung; offene Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Eine Druckerhöhung auf 350 MPa (Abbildung 5.10) scheint zu einer Reduzierung der stabilen Fraktion nach einer Behandlungszeit von 4 bis 5 Stunden zu führen. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese geringfügige Inaktivierung nur die Folge des Temperatureffektes ist, so daß die Sporen nur aufgrund ihrer Sensibilität gegenüber höheren Temperaturen abgetötet werden. Bei 40 °C und 400 MPa scheint sich die Stabilität der zweiten Fraktion verringert zu haben. Es wird vermutet, daß nur der Anteil der druckstabilen Fraktion kleiner geworden ist,

die Druckresistenz der Sporen scheint bei 400 MPa jedoch immer noch nicht vollständig überwunden werden zu können.

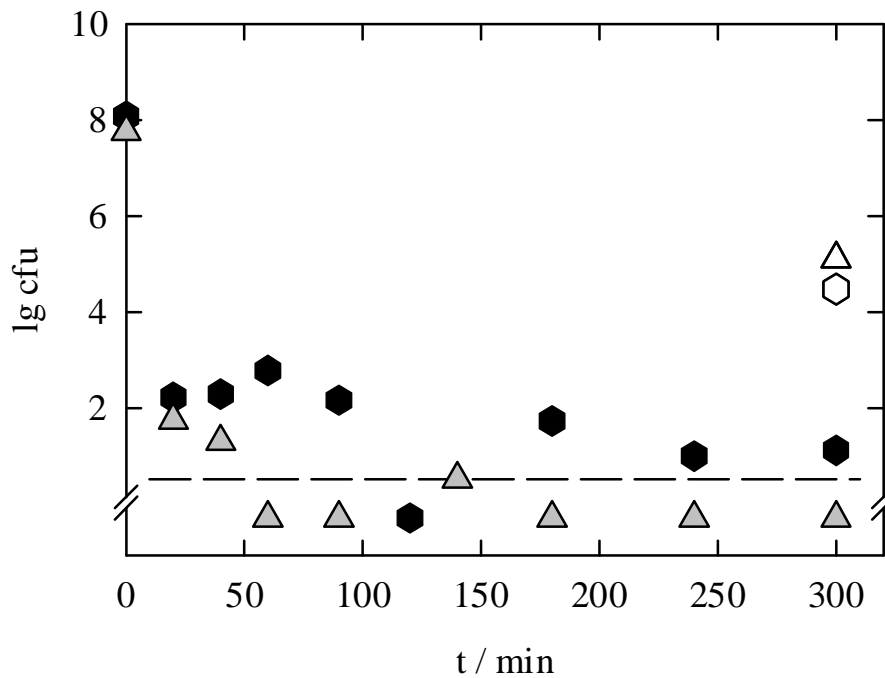


Abbildung 5.10 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 40 °C mit ● 350 oder △ 400 MPa in isoton. Kochsalzlösung; offene Symbole sind Kontrollen, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß Konidiosporen von *Penicillium expansum* und *Eurotium repens* durch hochosmolale Medien wie Saccharose- oder Kochsalzlösungen vor einer Hochdruckinaktivierung geschützt werden können (Merkulow 1997, van Almsick 1998). Um die Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Einfluß von Saccharose auf die Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen untersucht. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 5.11 dargestellt. Die Druckresistenz der Sporen erhöht sich mit steigender Saccharosekonzentration. In Lösungen mit einem 60 %igen Saccharoseanteil ist der baroprotektive Effekt am größten.

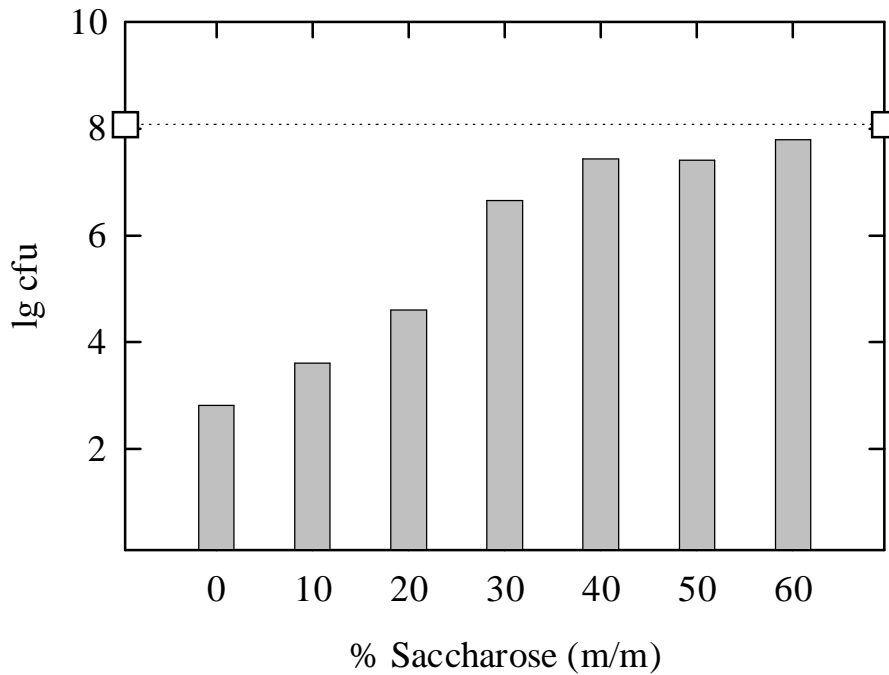


Abbildung 5.11 Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 25 °C, 200 MPa und 30 min in Saccharoselösungen unterschiedlicher Konzentration; □....□ ist die Ausgangskeimzahl; ---- markiert die Nachweisgrenze.

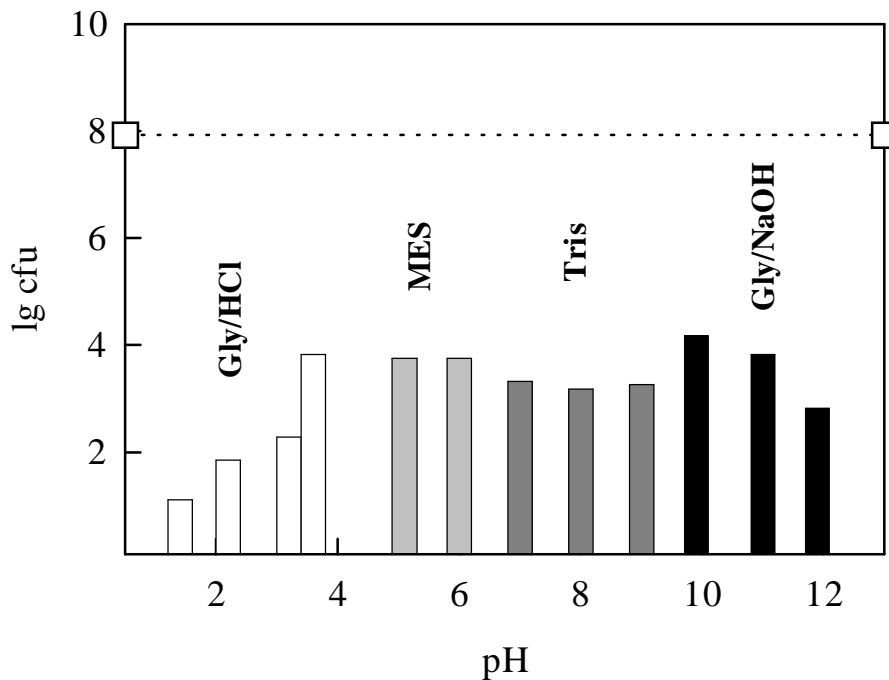


Abbildung 5.12 Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 25 °C und 200 MPa in 15 min; □....□ markiert die Ausgangskeimzahl.

Die Hochdruckinaktivierung der Sporen wurde in Abhängigkeit vom pH Wert getestet. Dazu wurden vier verschiedene Pufferlösungen verwendet, die einen Bereich von pH 1,2 - 11,9 umfaßten. Wie aus Abbildung 5.12 hervorgeht, sind leichte Unterschiede der Stabilität der Sporen zwischen den einzelnen Lösungen erkennbar. Werden die Lösungsmittelleffekte vernachlässigt, läßt sich allgemein feststellen, daß die Inaktivierung der Sporen bei pH-Werten $< 3,4$ und > 10 schneller verläuft.

5.1.2 *Aspergillus fumigatus*

Konidiosporen von *A. fumigatus* sind äußerst druckstabil. Sie weisen die höchste Resistenz aller in dieser Arbeit untersuchten Schimmelpilze auf. Die Druckinaktivierung beginnt bei 25 °C erst bei Drücken über 200 MPa (Abbildung 5.13). Die Inaktivierungsrate nimmt mit steigendem Druck zu. Bei 450 MPa können nach 30 min keine lebensfähigen Keime mehr nachgewiesen werden. Die Kinetik der Inaktivierung wurde bei 400 MPa und verschiedenen Temperaturen untersucht und wird in den folgenden Abbildungen dargestellt.

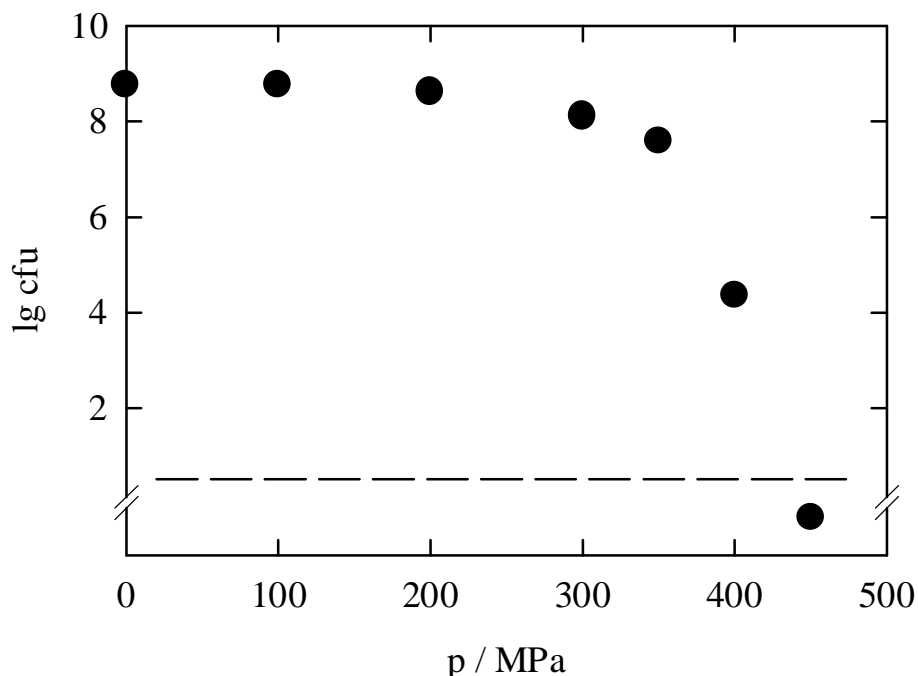


Abbildung 5.13 Barotoleranz von *A. fumigatus* Konidiosporen bei 25 °C und 30 min in isotonischer Kochsalzlösung; ---- markiert die Nachweisgrenze.

Die Kinetik der Inaktivierung bei 4 und 25 °C wird in Abbildung 5.14 gezeigt. Bei 4 °C und 400 MPa erfolgt eine rasche Reduzierung der Keimzahl mit einem D-Wert von etwa 3 min. Trotz der schnellen Inaktivierung in den ersten Minuten können unter diesen Bedingungen selbst nach 3 Stunden Behandlungsdauer noch Keime nachgewiesen werden. Wird die Hochdruckinaktivierung bei 25 °C durchgeführt, steigt die Druckresistenz der Sporen. Hier wird ein zweiphasiger Kurvenverlauf mit $D_1 \approx 8$ min und $D_2 \approx 150$ min gefunden.

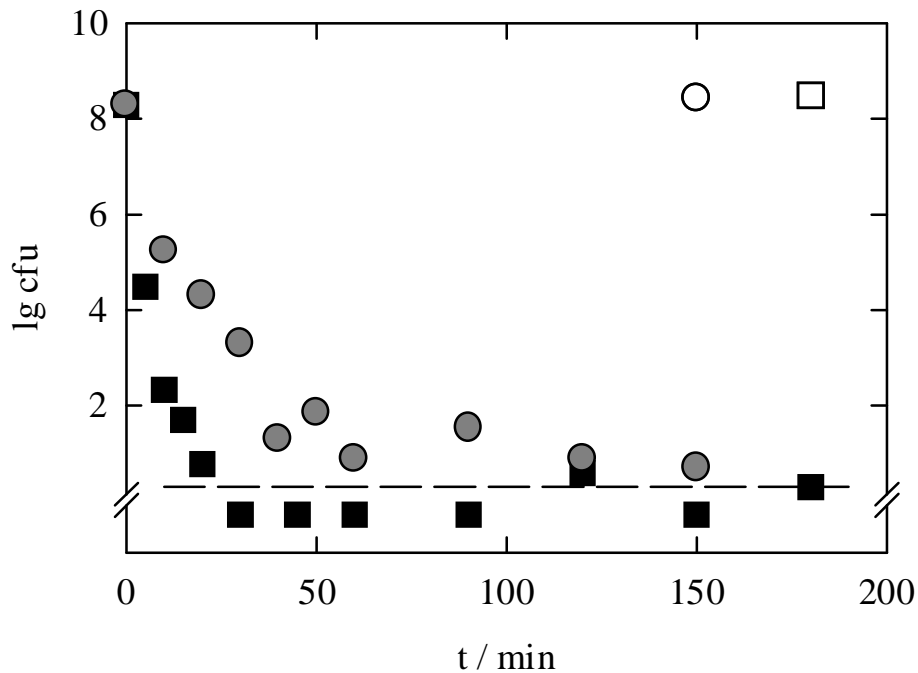


Abbildung 5.14 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *A. fumigatus* Konidiosporen bei 400 MPa mit ■ 4 und ● 25 °C; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Wird der Inaktivierungsverlauf bei 40 °C und 400 MPa verfolgt, findet man eine Kinetik erster Ordnung mit $D \approx 7$ min (Abbildung 5.15). Wie schon bei 4 °C, werden auch bei 40 °C noch nach einigen Stunden Behandlungsdauer lebensfähige Keime gefunden. *A. fumigatus* ist der einzige untersuchte Schimmelpilz, der bei 40 °C keine stabile Fraktion ausbildet. Bei allen anderen Schimmelpilzsporen wurden bei 40 °C stabile Fraktion gefunden. *A. fumigatus* unterscheidet sich von den anderen Pilzen darin, daß sein Wachstumsoptimum nicht bei 24 °C, sondern bei 37 °C liegt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Kinetik der Inaktivierung bei 55 °C erstellt. Eine Anhebung der Temperatur auf 55 °C hat einen zweiphasigen Kurvenverlauf mit einer stabilen Fraktion zur Folge ($D_1 \approx 5$ min).

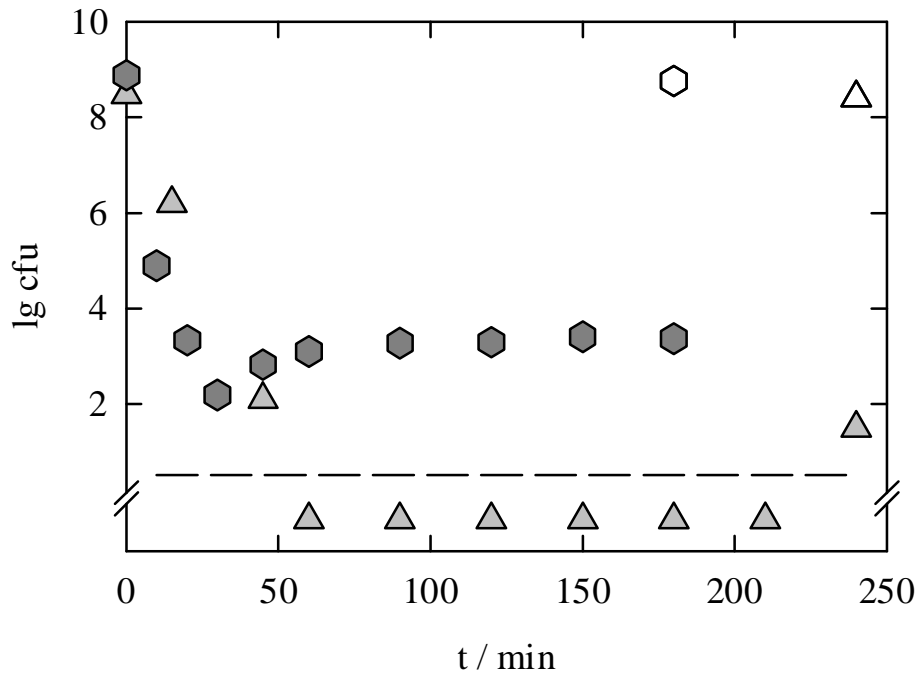


Abbildung 5.15 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *A. fumigatus* Konidiosporen bei 400 MPa mit \triangle 40 und \hexagon 55 °C; offene Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Allgemein kann festgestellt werden, daß das Auftreten von stabilen Fraktionen bei der Inaktivierung von Konidiosporen immer dann beobachtet werden kann, wenn die Druckbehandlung bei Temperaturen von 15-20 °C über der optimalen Wachstumstemperatur erfolgt. Bei Temperaturen im Bereich des Wachstumsoptimums können in einigen Fällen stabile Fraktion beobachtet werden, bei niedrigen Temperaturen scheint keine Druckresistenz aufzutreten.

5.1.3 *Botrytis cinerea*

Die Hochdruckinaktivierung von *B. cinerea* beginnt bei einem Grenzdruck von 150 MPa. Die Inaktivierungsrate wird kontinuierlich größer bis die Nachweisgrenze bei 300 MPa und 30 min Behandlungsdauer unterschritten wird (Abbildung 5.16). Die Kinetik der Hochdruckinaktivierung wurde bei 4, 25 und 40 °C und einem Druck von 200 MPa untersucht.

Die Hochdruckinaktivierung der Sporen verläuft bei allen drei Temperaturen zweiphasig (Abbildung 5.17). Bei 4 °C wird die erste Fraktion mit $D_1 \approx 9$ min am langsamsten inaktiviert. Die zweite Fraktion hat eine dezimale Reduktionszeit von etwa 45 min. Bei 25 °C ($D_1 \approx 6$ min) und 40 °C ($D_1 < 4$ min) verbleibt nach einer schnellen Inaktivierung in den ersten Mi-

nuten eine druckresistente Fraktion. Der Anteil der stabilen Fraktion an der Gesamtpopulation ist bei 25 °C mit $\lg(N_2/N_1) = -5,2$ geringfügig höher als bei 40 °C mit $\lg(N_2/N_1) = -5,6$.

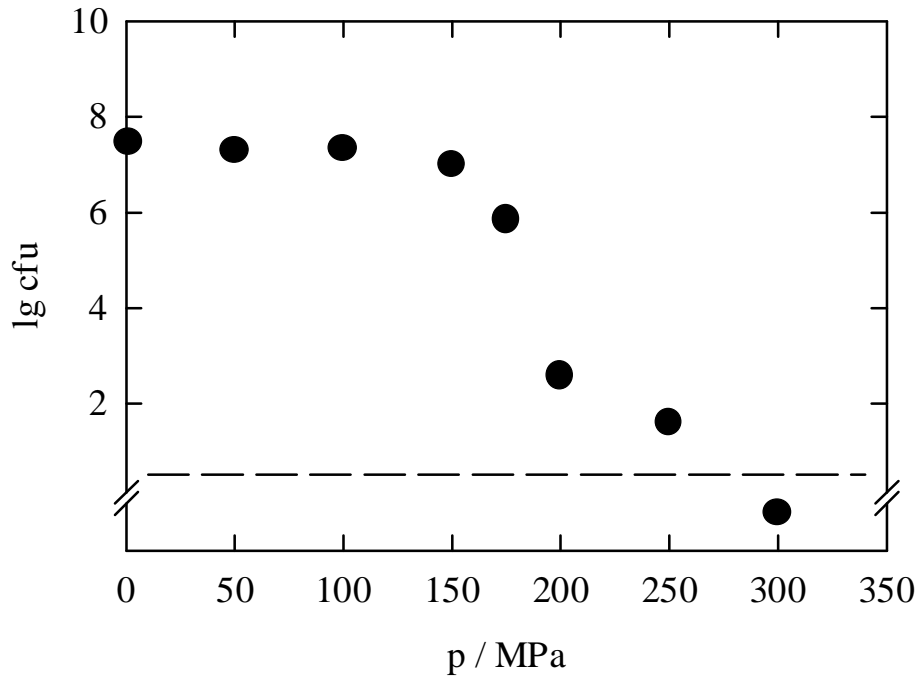


Abbildung 5.16 Barotoleranz von *B. cinerea* Konidiosporen bei 25 °C und 30 min in isotonischer Kochsalzlösung; ---- markiert die Nachweisgrenze.

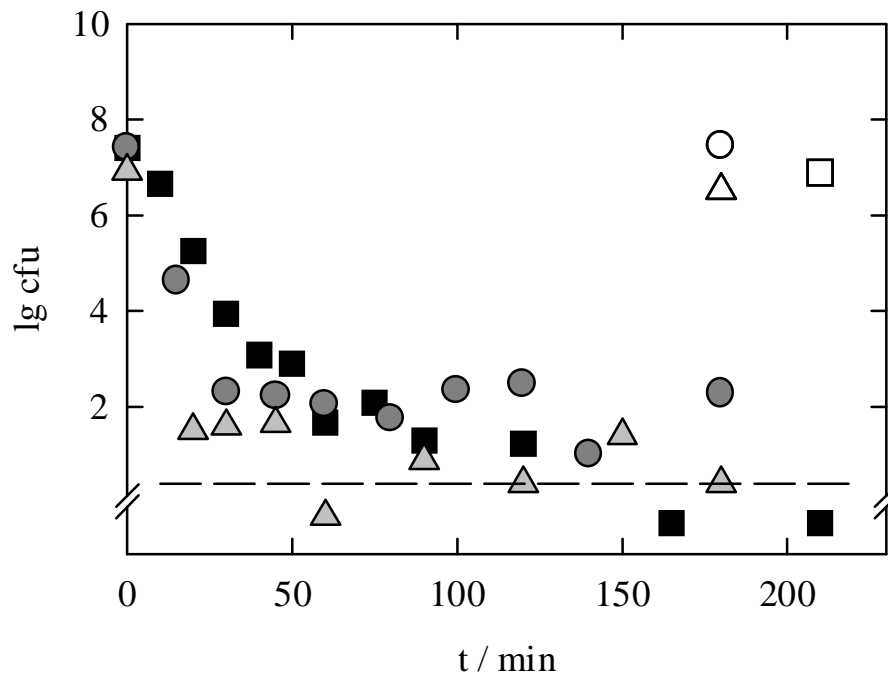


Abbildung 5.17 Kinetik der Inaktivierung von *B. cinerea* bei 200 MPa sowie ■ 4, ● 25 und ▲ 40 °C in isotonischer Kochsalzlösung; die offenen Symbole sind Kontrollwerte; --- markiert die Nachweisgrenze.

5.1.4 *Penicillium expansum*

Die Hochdruckinaktivierung von *P. expansum* Konidiosporen (Merkulow 1997) beginnt bei Drücken über 200 MPa und ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Die Inaktivierungsrate wird mit zunehmendem Druck kontinuierlich größer bis die Nachweisgrenze bei 375 MPa unterschritten wird.

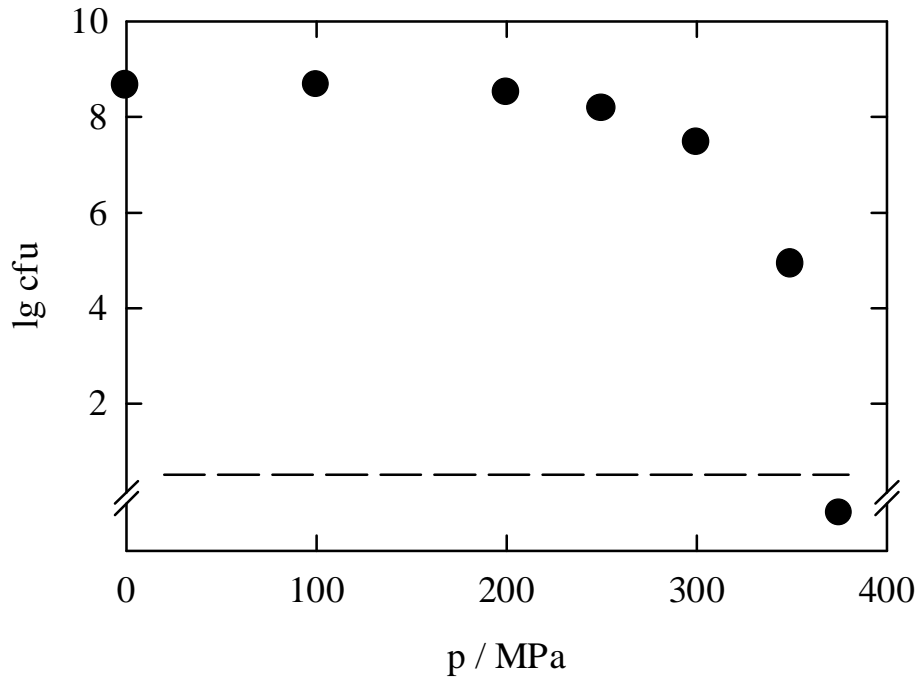


Abbildung 5.18 Barotoleranz von *P. expansum* Konidiosporen bei 25 °C und 30 min in isotonischer Kochsalzlösung; ---- markiert die Nachweisgrenze.

Die Kinetik der Inaktivierung wurde bei 350 MPa mit 4 °C, 25 oder 40 °C untersucht und wird in Abbildung 5.19 gezeigt. Bei 4 °C folgt diese einem Zeitgesetz erster Ordnung mit einem D-Wert von ca. 1 min. Bei höheren Temperaturen wird ein zweiphasiger Inaktivierungsverlauf gefunden. Bei 25 °C erfolgt die langsamste Inaktivierung der ersten Fraktion mit $D_1 \approx 7$ min, die zweite Fraktion wird mit $D_2 \approx 30$ min abgebaut. Bei 40 °C folgt auf eine sehr schnelle Reduktion der ersten Fraktion mit $D_1 < 0,8$ min eine druckresistente Fraktion, die unter den gegebenen Bedingungen nicht weiter inaktiviert werden kann. Der Anteil der stabilen Fraktion an der Gesamtpopulation beträgt hier $\lg(N_2/N_1) = -6.8$.

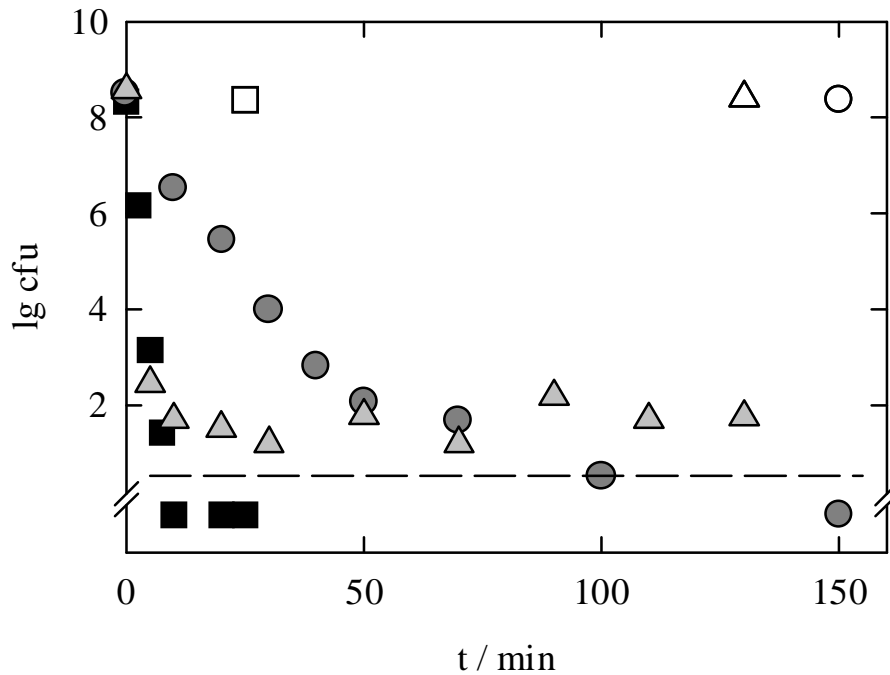


Abbildung 5.19 Kinetik der Inaktivierung von *P. expansum* Konidiosporen bei 350 MPa sowie ■ 4, ● 25 und ▲ 40 °C in isotonischer Kochsalzlösung; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, --- markiert die Nachweisgrenze.

5.2 Hochdruckinaktivierung in Apfel- und Brokkolisaft

Nachdem zahlreiche kinetische Daten zur Hochdruckinaktivierung von Schimmelpilzsporen in Modellösungen aufgestellt worden waren, sollte nun herausgefunden werden, ob und inwieweit sich die Ergebnisse auf "reale" Lebensmittelsysteme übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden Hochdruckversuche mit den Pilzen *C. herbarum* und *P. expansum* in Apfel- und Brokkolisaft durchgeführt und mit den Ergebnissen in isotonischer Kochsalzlösung verglichen.

5.2.1 *Cladosporium herbarum*

Konidiosporen von *C. herbarum* wurden bei 4 °C, 25 und 40 °C mit 200 MPa in Apfel- und Brokkolisaft druckbehandelt. Die Ergebnisse werden mit dem in isotonischer Kochsalzlösung verglichen und in den folgenden Schaubildern gezeigt.

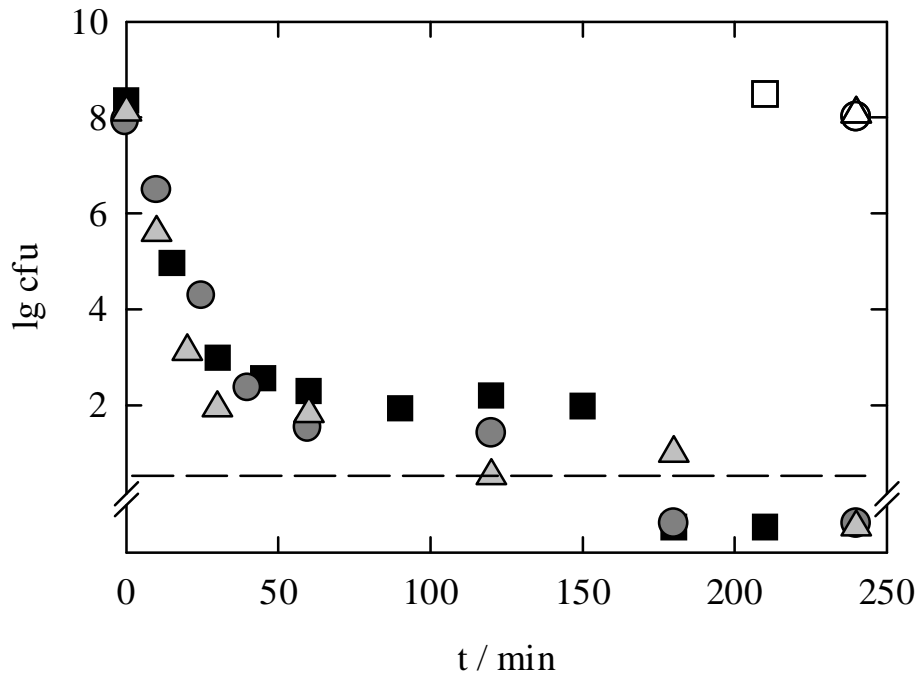


Abbildung 5.20 Kinetik der Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 4 °C und 200 MPa in ■ isotonischer Kochsalzlösung, ● Apfel- und ▲ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

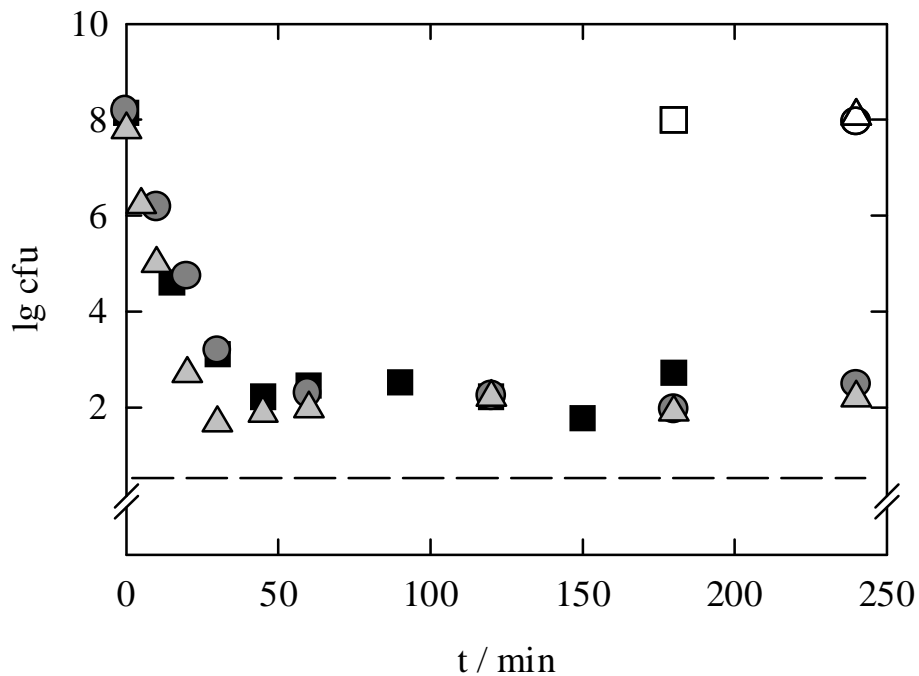


Abbildung 5.21 Kinetik der Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 25 °C und 200 MPa in ■ isotonischer Kochsalzlösung, ● Apfel- und ▲ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

In Abbildung 5.20 ist die Kinetik der Hochdruckinaktivierung bei 4 °C in den drei verschiedenen Medien dargestellt. Es lassen sich keine größeren Unterschiede bei der Hochdruckinaktivierung zwischen der isotonischen Kochsalzlösung und den beiden Säften erkennen. Der zweiphasige Inaktivierungsverlauf, der in isotonischer Kochsalzlösung gefunden wurde, scheint nur von der Behandlungstemperatur und nicht vom Medium abhängig zu sein.

Abbildung 5.21 präsentiert den Inaktivierungsverlauf bei 25 °C. Auch hier sind keine größeren Unterschiede zwischen den drei Medien erkennbar. Die Inaktivierung der ersten Fraktion erfolgt in Brokkolisaft mit einem D_1 -Wert von ca. 4 min etwas schneller als in Apfelsaft oder Kochsalzlösung mit jeweils etwa 6 min. Die zweite Fraktion ist unabhängig von dem Behandlungsmedium in allen Fällen druckresistent (Apfelsaft: $\lg(N_2/N_1) = -5,4$, Brokkolisaft = $-5,8$, NaCl = $-5,5$).

Das Ergebnis der Hochdruckinaktivierung bei 40 °C wird in Abbildung 5.22 gezeigt. Auch bei 40 °C ist kein größerer Unterschied der Drucktoleranz innerhalb der drei Medien sichtbar. Nach einer raschen Inaktivierung während der ersten Minuten verbleibt wiederum eine druckresistente Fraktion. Der Anteil der stabilen Fraktion (N_2) gemessen an der Ausgangskeimzahl (N_1) scheint bei der Druckbehandlung in Apfelsaft am höchsten zu sein (Apfelsaft: $\lg(N_2/N_1) = -5,7$, Brokkolisaft = $-6,2$, NaCl = $-6,1$).

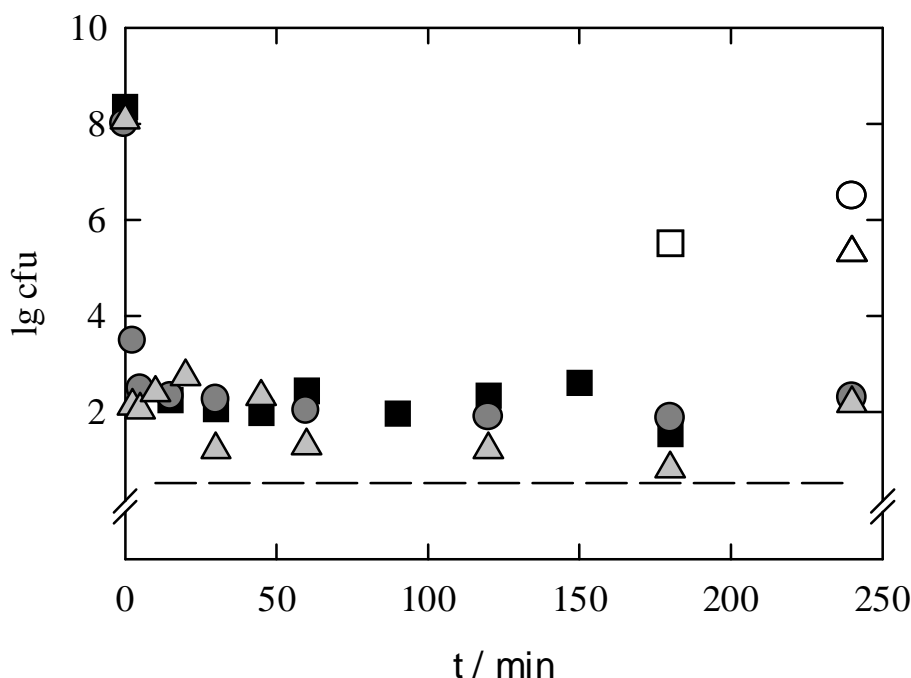


Abbildung 5.22 Kinetik der Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen bei 40 °C und 200 MPa in ■ isotonischer Kochsalzlösung, ● Apfel- und ▲ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

5.2.2 *Penicillium expansum*

Konidiosporen von *P. expansum* wurden bei 4 °C, 25 und 40 °C einem Druck von 350 MPa in Apfel- und Brokkolisaft ausgesetzt. Die Ergebnisse wurden mit denen in isotoni-scher Kochsalzlösung verglichen und sind jeweils in einem Diagramm zu sehen.

Der kinetische Verlauf der Hochdruckinaktivierung bei 4 °C in den drei verschiedenen Medien ist in Abbildung 5.23 dargestellt. Die Inaktivierung folgt ebenso wie bei *C. herbarum* einem Zeitgesetz erster Ordnung mit Dezimalen Reduktionszeit von 1 min oder weniger.

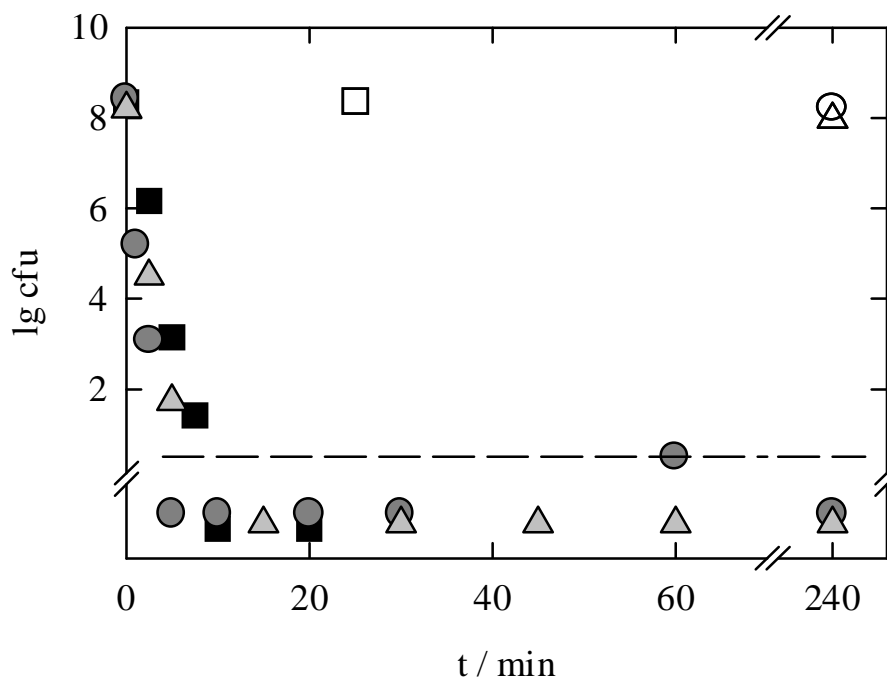


Abbildung 5.23 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *P. expansum* Konidiosporen bei 4 °C und 350 MPa in ■ isotoni-scher Kochsalzlösung, ● Apfel- und ▲ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Eine Erhöhung der Temperatur auf 25 °C führt zu einem zweiphasigen Inaktivierungsver-lauf (Abbildung 5.24). Hier sind leichte Unterschiede zwischen den einzelnen Medien erkenn-bar. Die erste Fraktion wird in isotoni-scher Kochsalzlösung am langsamsten inaktiviert ($D_1 \approx 7$ min), die zweite Fraktion dagegen schneller als in den Säften ($D_2 \approx 30$ min). Die Druckbe-handlung in Apfel- und Brokkolisaft erfolgt in den ersten Minuten sehr schnell ($D_1 \approx 3$ min), verlangsamt sich dann aber erheblich im Vergleich zu der Inaktivierung in Kochsalzlösung ($D_{2\text{Apfelsaft}} \approx 150$, $D_{2\text{Brokkolisaft}} \approx 130$ min).

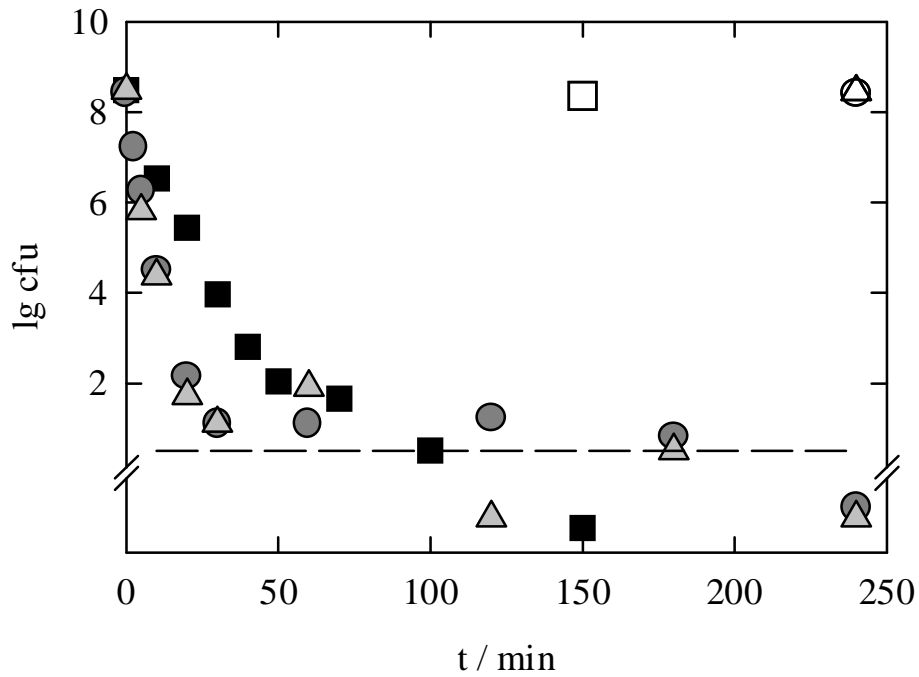


Abbildung 5.24 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *P. expansum* Konidiosporen bei 25 °C und 350 MPa in ■ isotonischer Kochsalzlösung, ● Apfel- und △ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

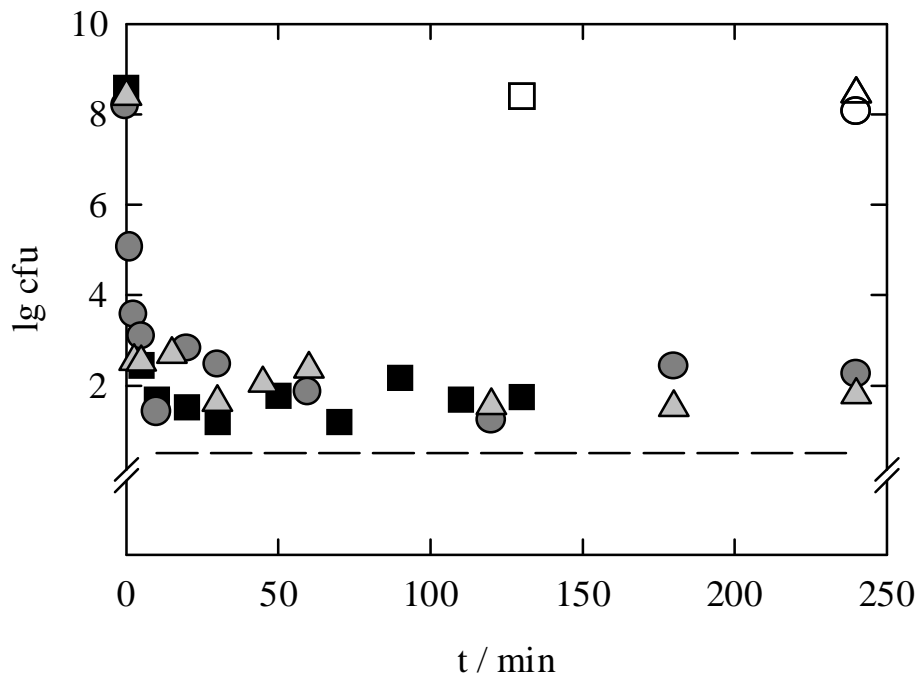


Abbildung 5.25 Kinetik der Hochdruckinaktivierung von *P. expansum* Konidiosporen bei 40 °C und 350 MPa in ■ isotonischer Kochsalzlösung, ● Apfel- und △ Brokkolisaft; die offenen Symbole sind Kontrollwerte, ---- markiert die Nachweisgrenze.

Wird die Inaktivierung bei 40 °C durchgeführt, sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Säften und der Kochsalzlösung sichtbar (Abbildung 5.25). Die erste Fraktion wird in allen drei Medien sehr schnell inaktiviert ($D_1 < 0,8$ min), die zweite Fraktion behält auch in den Säften ihre Stabilität bei. Der Anteil der stabilen Fraktion verglichen mit der Ausgangs-keimzahl scheint in Apfelsaft am höchsten zu sein (Apfelsaft: $\lg(N_2/N_1) = -5,9$, Brokkolisaft = $-6,4$, NaCl = $-6,8$). Dieses Verhalten konnte auch schon bei der Inaktivierung von *C. herbarum* in Apfelsaft bei 40 °C beobachtet werden.

5.2.3 Lagerversuche

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Schimmelpilzsporen mit hohem hydrostatischem Druck abgetötet werden können, wurden verkeimte und anschließend druckbehandelte Proben bei 5 °C eingelagert und deren Keimzahl regelmäßig bestimmt. Zunächst sollte geprüft werden, ob verkeimte, drucksterilisierte Apfelsaftproben über einen Zeitraum von 16 Wochen steril bleiben. Ferner wurde untersucht, ob Sporen, die eine Druckbehandlung überleben könnten, bei 5 °C auskeimen und sich vermehren. Diese Versuche erfolgten sowohl in Apfelsaft als auch in isotonischer Kochsalzlösung. Für die Verkeimung wurden druckresistente Sporen der stabilen Fraktion verwendet. Die Lagerversuche wurden mit den Schimmelpilzen *Cladosporium herbarum* und *Penicillium expansum* durchgeführt.

Sterilitätstests

Für die Sterilitätstests wurde Apfelsaft wie unter 4.3.3 beschrieben verkeimt und druckbehandelt. Dazu wurden 2 Versuchsreihen parallel durchgeführt. Die Keimzahlbestimmung nach der Druckbehandlung erfolgte nur einmal (+ steht für mindestens 1 Keim je Platte).

Tabelle 5.1 *Cladosporium herbarum*

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	$10^{7.85}$	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
2. Probe			- - -	+ + +	+ + +	- - -

Tabelle 5.2 *Penicillium expansum*

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	10 ^{8.11}	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
2. Probe			- - -	+ - -	- - -	- - -

Wie aus den Tabellen 5.1 und 5.2 zu erkennen ist, waren im Falle von *C. herbarum* 2 der insgesamt 9 Proben verkeimt, bei *P. expansum* 1 von 9 Proben. Eventuell waren die Druckbedingungen bei *C. herbarum* nicht geeignet, um sterile Proben zu erhalten, drastischere Bedingungen scheinen hier angemessen. Bei *P. expansum* ist der einzige gefundene Keim vermutlich eine Verunreinigung, so daß man hier davon ausgehen kann, daß die druckbehandelten Proben über einen Zeitraum von 16 Wochen steril bleiben.

Lagerversuche in isotonischer Kochsalzlösung und Apfelsaft

Proben von *C. herbarum* und *P. expansum* wurden unter Bedingungen, die zu einer druckresistenten Fraktion führen, hohem hydrostatischem Druck ausgesetzt. Dieses erforderte bei *C. herbarum* einen Druck von 200 MPa bei 40 °C und 60 min Behandlungsdauer, bei *P. expansum* 350 MPa, 40 °C und 60 min. Die druckbehandelten Proben wurden nach 2, 4, 8 und 16 Wochen Lagerung bei 5 °C untersucht. Nach vier Wochen waren bei allen Proben Mycelfragmente innerhalb der Proben bemerkbar, die Keimzahl wurde stetig größer.

Druckbehandelte Sporen der stabilen Fraktion können sich demzufolge auch bei Kühlschranktemperatur vermehren. Das erfolgt nicht nur in Apfelsaft, sondern ebenso in isotonischer Kochsalzlösung. Die genauen Ergebnisse sind in den Tabellen 5.3 bis 5.6 beschrieben.

Allgemein läßt sich feststellen, daß die Auskeimung der Sporen in Apfelsaft etwas schneller verläuft als in isotonischer Kochsalzlösung. Sporen der druckresistenten Fraktion von *P. expansum* scheinen im Vergleich zu *C. herbarum* schneller auskeimen und sich vermehren zu können.

Tabelle 5.3 *Cladosporium herbarum* in isotonischer Kochsalzlösung

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	$10^{7.85}$	96	-	129	~500	> 1000
		98	-	144	~500	> 1000
		87	1	> 1000	~500	> 1000
2. Probe			34	10	60	> 1000
			11	3	72	> 1000
			18	12	84	> 1000

Tabelle 5.4 *Cladosporium herbarum* in Apfelsaft

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	$10^{7.85}$	2	1	1	~350	> 1000
		4	-	2	~350	> 1000
		1	1	26	~350	> 1000
2. Probe			30	> 1000	~500	> 1000
			25	> 1000	~500	> 1000
			39	> 1000	~500	> 1000

Tabelle 5.5 *Penicillium expansum* in isotonischer Kochsalzlösung

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	$10^{8.11}$	1	24	> 1000	> 1000	> 1000
		1	9	> 1000	> 1000	> 1000
		-	4	> 1000	> 1000	> 1000
2. Probe			38	~300	> 1000	> 1000
			51	~300	> 1000	> 1000
			66	~300	> 1000	> 1000

Tabelle 5.6 *Penicillium expansum* in Apfelsaft

	Ausgangs- keimzahl	Keime nach Druckbe- handlung	2 Wochen bei 5 °C	4 Wochen bei 5 °C	8 Wochen bei 5 °C	16 Wochen bei 5 °C
1. Probe	$10^{8.11}$	1	-	> 1000	> 1000	> 1000
		-	1	> 1000	> 1000	> 1000
		-	6	> 1000	> 1000	> 1000
2. Probe			30	> 1000	> 1000	> 1000
			22	> 1000	> 1000	> 1000
			16	> 1000	> 1000	> 1000

5.3 Patulin unter Hochdruck

Die Auswirkungen hohen hydrostatischen Drucks auf Schimmelpilzsporen wurden durch das Erfassen zahlreicher kinetischer Daten umfassend beschrieben. Der Einfluß von pH-Wert und Medienzusammensetzung wurde untersucht, wie auch von Apfel- und Brokkolisaft. Abgesehen von der Inaktivierung der Sporen durch Hochdruck, ist das Verhalten von Schimmelpilzmetaboliten unter Druck von großem Interesse. Hierzu zählt ein pathogenes Stoffwechselprodukt des Pilzes *Penicillium expansum*, das Mycotoxin Patulin. Da *P. expansum* und somit auch Patulin hauptsächlich in Äpfeln und deren Folgeprodukten zu finden sind, wurden die Untersuchungen in wäßrigen Lösungen oder in Apfelsaft durchgeführt. Zwei Punkte waren hierbei von Interesse. Einerseits stellte sich die Frage, wie druckstabil bereits in Lösung vorhandenes Patulin ist. Andererseits sollte geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Syntheserate des Patulins durch eine Druckbehandlung beeinflusst werden kann.

Die Patulinbestimmung sollte mittels HPLC erfolgen. Allerdings enthält Apfelsaft eine Patulinvortäuschende Substanz, 5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF). 5-HMF ist in vielen hitzebehandelten Lebensmitteln vorhanden, da es ein Folgeprodukt der Maillard-Reaktion sowie der Hydrolyse von Zucker ist. Außerdem kann sich 5-HMF während der Lagerung von Lebensmitteln akkumulieren und dient somit als ein Indikator für die Qualität von Lebensmitteln. Aus diesem Grund mußte bei der Auswertung über HPLC ein Verfahren eingesetzt werden, mit dem sich Patulin und 5-HMF gut trennen lassen. Hierfür schien sich eine von Gökmen und Acar (1999) veröffentlichte Methode zur Patulinbestimmung mittels HPLC zu eignen. Bei der Reproduzierung traten allerdings Schwierigkeiten auf, so daß eine neue Methode zur simultanen Bestimmung von Patulin und 5-HMF entwickelt werden mußte:

5.3.1 Eine neue Methode zur simultanen Bestimmung von 5-Hydroxymethylfuraldehyd und Patulin

Gökmen und Acar (1999) verwendeten zur Patulinbestimmung als mobile Phase ein Wasser : Acetonitril-Gemisch im Verhältnis von 99:1 mit einer C18-Säule als stationäre Phase. Aufgrund des hohen Wasseranteils des Laufmittels sollte mit einer neuartigen C18 Aqua-Säule der Firma Phenomenex gearbeitet werden, die ohne Qualitätsminderung mit 100 % Wasser betrieben werden kann. Die Bestimmung von Patulin und 5-HMF wurde zunächst nach der Methode von Gökmen und Acar mit der C18 Aqua-Säule durchgeführt. Die Tren-

nung beider Substanzen gelang sehr gut, die von den Autoren beschriebene Nachweisgrenze von $< 5 \mu\text{g/l}$ für Patulin und $< 10 \mu\text{g/l}$ für 5-HMF wurde jedoch um etwa das Hundertfache überschritten.

Modifizierungen des Laufmittels und der analytischen Säule

Zunächst mußte ausgeschlossen werden, daß der Grund für das Versagen des Verfahrens die neuartige C18 Aqua-Säule war. Deshalb wurde eine Versuchsreihe gestartet, bei der die C18 Aqua-Säule und eine herkömmliche C18 Säule miteinander verglichen werden sollten. Als mobile Phase dienten Wasser : Acetonitril-Mischungen in den Verhältnissen 99:1, 90:10 (beschrieben von Rovira u.a. 1993) und 35:65 (von der Firma Phenomenex vorgeschlagene Laufmittelkombination zur Lagerung der Aqua-Säule). Die Ergebnisse waren jedoch aufgrund viel zu hoher Nachweisgrenzen nicht erfolgversprechend. Während der Experimente konnte aber beobachtet werden, daß die Nachweisgrenze sank, wenn das Lösungsmittel der Patulin-Proben Methanol enthielt (es wurden verschiedene Lösungsmittel für Patulin getestet). Aus diesem Grund wurden verschiedene Wasser/Methanol-Kombinationen als Laufmittel getestet.

Als stationäre Phase wurden wieder beide C18 Säulen verwendet mit den Laufmittelkombinationen Wasser : Methanol in den Verhältnissen 9:1 und 1:1. Das Wechseln der mobilen Phase hatte eine drastische Senkung der Nachweisgrenze zur Folge. Diese reduzierte sich für beide verwendeten Säulen von etwa $200 \mu\text{g/l}$ auf unter $10 \mu\text{g/l}$, wobei Wasser : Methanol im Verhältnis 1:1 als Laufmittel besser geeignet erschien als im Verhältnis 9:1. Nachdem die Nachweisgrenze für Patulin zufriedenstellend niedrig war, wurde an einer Verbesserung der Trennung von Patulin und 5-HMF gearbeitet.

Bei Verwenden der herkömmlichen C18 Säule mit einem Laufmittelgemisch von Wasser : Methanol im Verhältnis 1:1 konnten Patulin und 5-HMF nicht getrennt werden (Abbildung 5.26). Wurde die C18 Aqua-Säule eingesetzt, konnte eine Trennung beider Substanzen beobachtet werden, die zwar für die geplanten Experimente nicht ausreichend war, aber zumindest erfolgversprechend erschien (Abbildung 5.27).

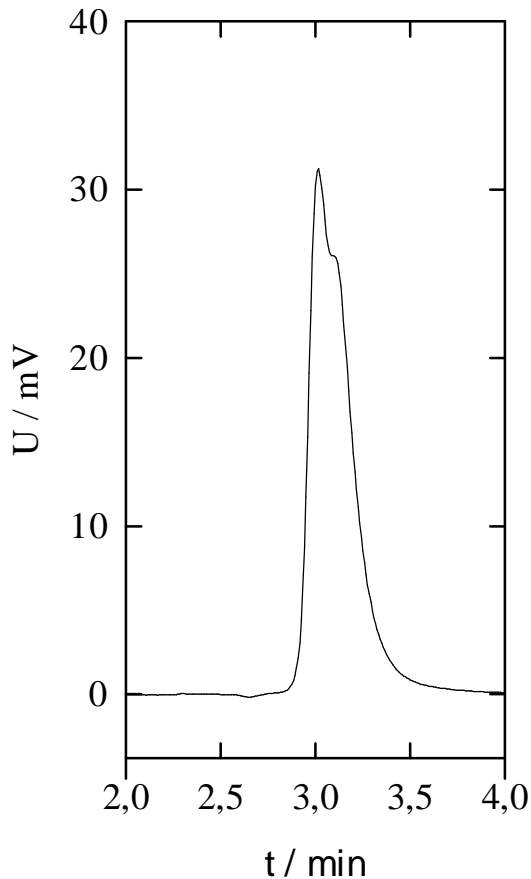


Abbildung 5.26

C18-Säule mit Wasser : MeOH 1:1,
 Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$
 $c_{\text{5-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

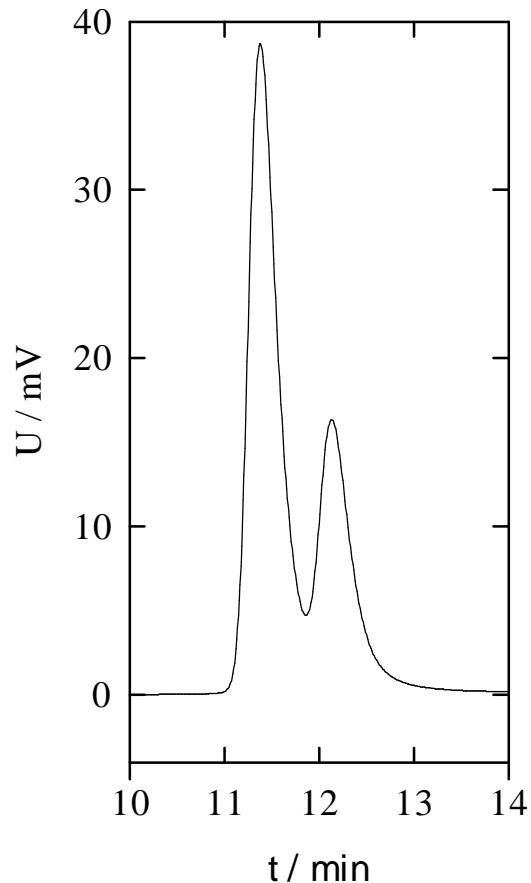


Abbildung 5.27

Aqua C18 Säule mit Wasser : MeOH
 1:1; Fließgeschw. 0,2 ml/min
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$
 $c_{\text{5-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

Für weitere Untersuchungen wurde nur die C18 Aqua-Säule verwendet, da diese für die Trennung der beiden Substanzen geeigneter erschien als die herkömmliche C18-Säule.

Als nächsten Schritt zur Verbesserung der Trennleistung wurde die Zusammensetzung des Laufmittels variiert. Es wurden zunächst verschiedene Wasser : Methanol-Kombinationen untersucht, um herauszufinden, bei welcher Zusammensetzung die Nachweisgrenze für Patulin am niedrigsten liegt. Untersucht wurde Wasser : Methanol in den Verhältnissen 9:1, 7:3, 6:4, 1:1 und 4:6. Die Chromatogramme sind im Anhang zu finden, Abbildungen 8.1-8.5. Die beste Detektion von Patulin wurde bei einer Laufmittelzusammensetzung von Wasser : Methanol im Verhältnis 6:4 und 4:6 erzielt. Auch ein Verhältnis von 1:1 lieferte gute Ergebnisse, höhere Wasseranteile ($> 60\%$, v/v) führten zu steigenden Nachweisgrenzen. Die Trennleistung bei der Chromatographie von Patulin und 5-HMF war allerdings bei einem

Verhältnis von 1:1 besser als bei 4:6 und 6:4 (Siehe auch Anhang, Abb. 8.6-8.8). Um die Trennwirkung zu erhöhen, wurde der pH-Wert des Laufmittels gesenkt.* Es wurden die Laufmittelkombinationen Wasser : Methanol von 7:3, 6:4 und 1:1 mit einem pH-Wert von < 4 (eingestellt mit Phosphatpuffer) getestet. Das beste Resultat wurde bei einem Verhältnis von 7:3 erzielt (Anhang, Abb. 8.9-8.11). Durch ein weiteres Absenken des pH-Wertes auf 2,4 konnte die Nachweisgrenze schließlich noch weiter gesenkt werden.

Für alle weiteren Versuche wurde ein Verfahren verwendet, bei dem eine C18 Aqua-Säule als stationäre Phase und ein Gemisch aus Wasser : Methanol im Verhältnis 7:3, pH 2,4, als mobile Phase eingesetzt wurde. Die Fließrate betrug 0,5 ml/min. Die Trennleistung dieses Verfahrens ist in Abbildung 5.28 dargestellt.

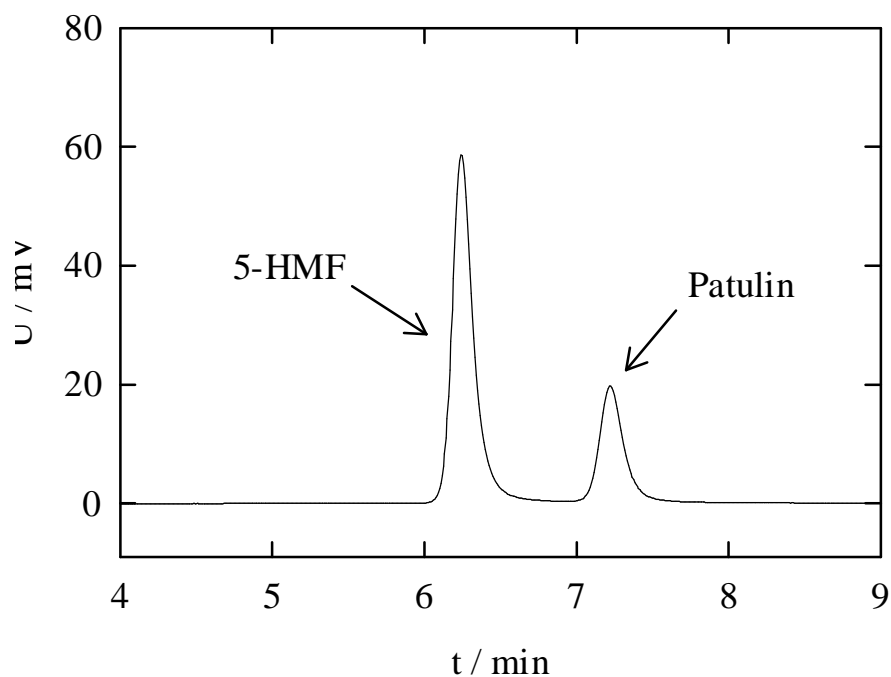


Abbildung 5.28 Trennung von 5-HMF ($c = 4 \text{ mg/l}$) und Patulin ($c = 2 \text{ mg/l}$)

* Nach Beratung durch Dr. Harald Müller, Kundendienst der Firma Phenomenex, Aschaffenburg.

Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Geräte wurden Eichgeraden für Patulin und 5-HMF erstellt. Abbildung 5.29 zeigt diese für Patulin. Es wurden die Konzentrationen 0,05, 0,25, 0,5, 1 und 5 mg/l vermessen. Der Regressionskoeffizient beträgt 0,999973.

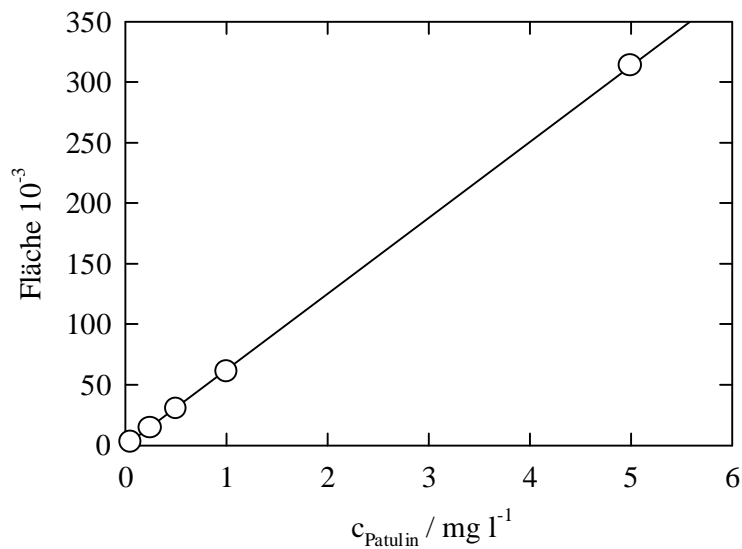


Abbildung 5.29 Eichgerade für Patulin

Die Nachweisgrenze von Patulin liegt bei $2 \mu\text{g/l}$. Das Chromatogramm einer Patulinlösung dieser Konzentration wird in Abbildung 5.30 gezeigt.

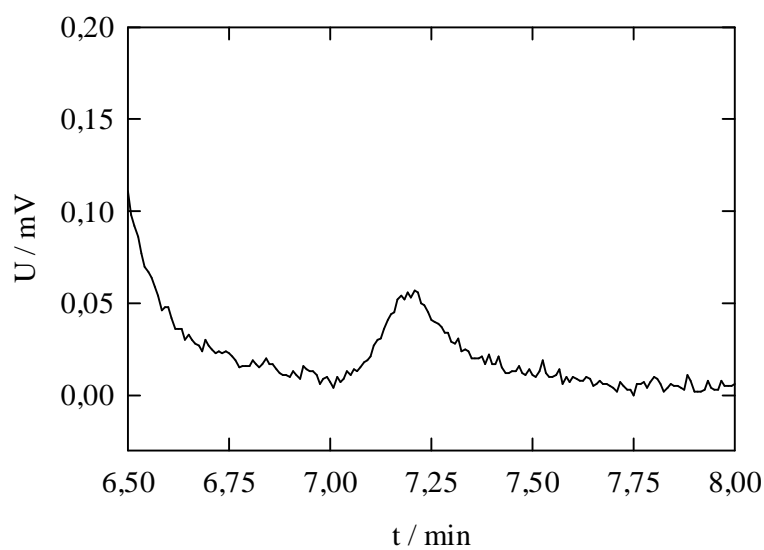


Abbildung 5.30 Chromatogramm von Patulin in einer Konzentration von $2 \mu\text{g/l}$.

Eine Eichgerade für 5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF) wurde vermessen und ist in Abbildung 5.31 dargestellt. Es wurden die Konzentrationen 0,05, 0,25, 0,5, 2,5 und 5 mg/l verwendet. Der Regressionskoeffizient beträgt 0,999688.

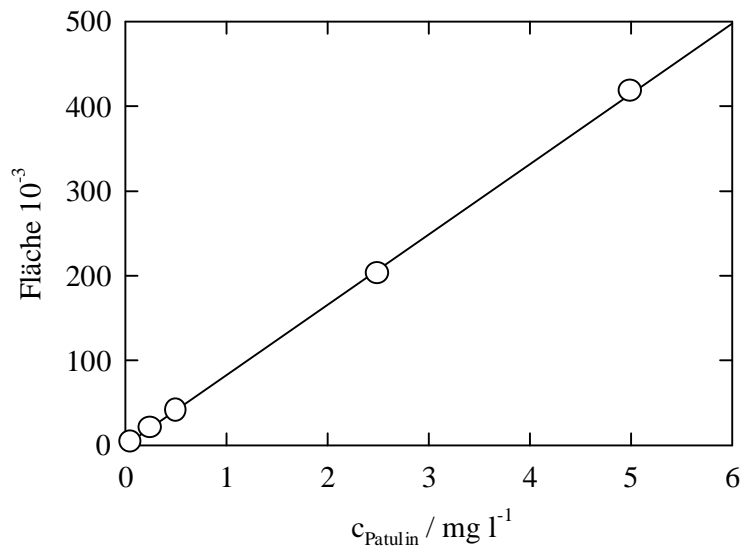


Abbildung 5.31 Eichgerade für 5-Hydroxymethylfuraldehyd

Die Nachweisgrenze für 5-HMF liegt mit 1-2 $\mu\text{g/l}$ ebenfalls sehr niedrig. Abbildung 5.32 zeigt ein Chromatogramm von 5-HMF bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/l}$

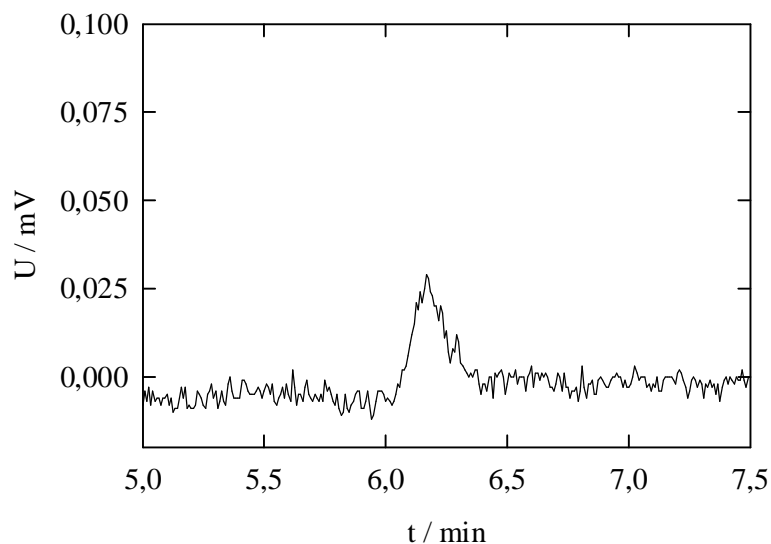


Abbildung 5.32 Chromatogramm von 5-HMF in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/l}$

Stabilität von Patulin in der mobilen Phase

Die Stabilität des Patulins in der mobilen Phase mußte vor dem Beginn der Experimente untersucht werden, um eine Zersetzung durch das Laufmittel während der Chromatographie auszuschließen zu können. Wie aus Abbildung 5.33 zu erkennen ist, können nach einer 8 tägigen Lagerung des Patulins bei Raumtemperatur noch 98 % des Patulingehaltes nachgewiesen werden, nach 4 Wochen sind es noch 74 %. Eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch die Zerstörung des Patulins durch das Laufmittel während der Chromatographie kann somit vernachlässigt werden.

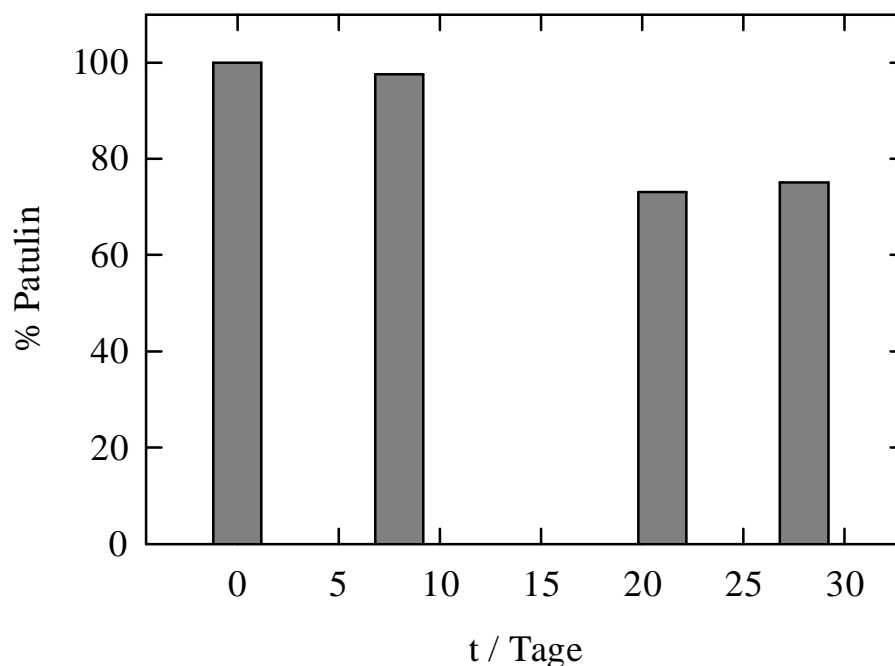


Abbildung 5.33 Abbau von Patulin durch das Laufmittel (Wasser:Methanol, 7:3, pH 2,4) bei Raumtemperatur.

5.3.2 Auswirkungen von Hochdruck auf Patulin und 5-HMF

Es wurde untersucht, ob Patulin und 5-Hydroxymethylfuraldehyd empfindlich auf hohen hydrostatischen Druck reagieren. Zu diesem Zweck wurden wäßrige Lösungen beider Substanzen in den Konzentrationen 2 mg/l bei Patulin und 4 mg/l bei 5-HMF bei 4 °C, 25 oder 40 °C und 500 MPa einer 60 minütigen Druckbehandlung unterzogen. Es konnte kein Abbau der beiden Substanzen unter Druck beobachtet werden.

Nachdem festgestellt worden war, daß Patulin druckstabil ist, stellte sich die Frage, ob die Sporen bereits Patulin enthalten und dieses unter Druck freisetzen oder synthetisieren können. Zunächst wurden die Sporen auf das Vorhandensein von Patulin untersucht. Dazu wurde eine wäßrige Sporensuspension von *P. expansum* den folgenden Behandlungen unterzogen:

- Die Sporensuspension wurde bei 4 °C und 400 MPa in 30 min sterilisiert.
- Die Sporensuspension wurde 60 min bei 70 °C pasteurisiert.
- Die Sporensuspension wurde 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

Sämtliche Behandlungen sollten die Zellwand zerstören, was ein Austreten der intrazellulären Bestandteile in das umgebende Medium zur Folge hat. Nach den Druck oder Temperatur Behandlungen wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert, der Überstand steriltfiltriert und chromatographiert. Das Ergebnis war nach allen Behandlungen gleich - es konnte in keinem Fall Patulin nachgewiesen werden. Die Sporen scheinen somit kein Patulin zu enthalten.

Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Sporen bei einer Druckbehandlung Patulin freisetzen oder synthetisieren können. Die wäßrige Sporensuspension wurde aus diesem Grund den folgenden Behandlungen unterzogen:

- 4 °C und 60 min bei 100, 300 oder 500 MPa.
- 25 °C und 60 min bei 100, 300 oder 500 MPa.
- 40 °C und 60 oder 150 min bei 100, 300 oder 500 MPa.

Nach den Druckbehandlungen konnte in keinem Fall Patulin nachgewiesen werden.

5.4 Patulin in Apfelsaft

5.4.1 Vorversuche

Vor Beginn der Untersuchungen zur Patulinproduktion von *Penicillium expansum* in Apfelsaft, wurde zunächst reiner Apfelsaft wie unter 4.4.3 beschrieben extrahiert und chromatographiert. Für diese Versuche wurden gekaufter Saft, frisch gepreßter sowie frisch gepreßter und anschließend autoklavierter Apfelsaft (121 °C, 20 min, 1 bar Überdruck) verwendet.

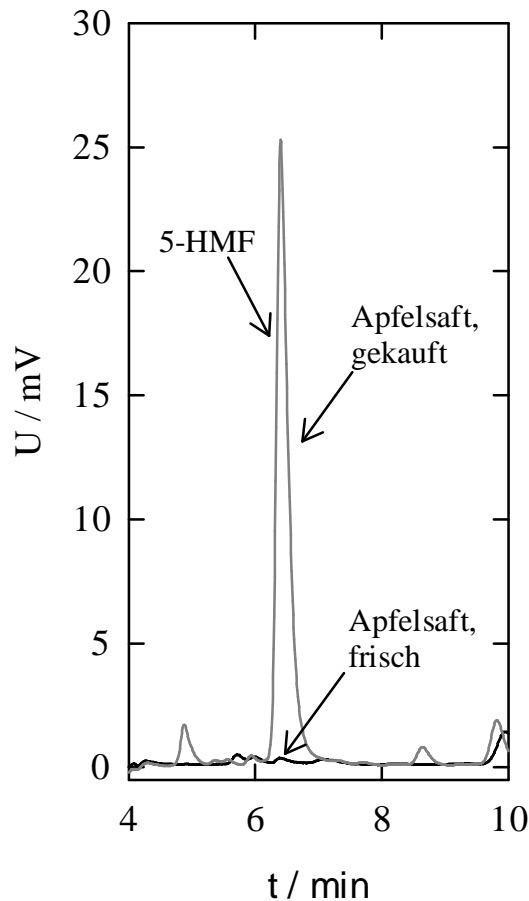


Abbildung 5.34

Apfelsaftextrakte
 frischer Saft: $C_{5\text{-HMF}} = 0,03 \text{ mg/l}$
 gekaufter Saft: $C_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

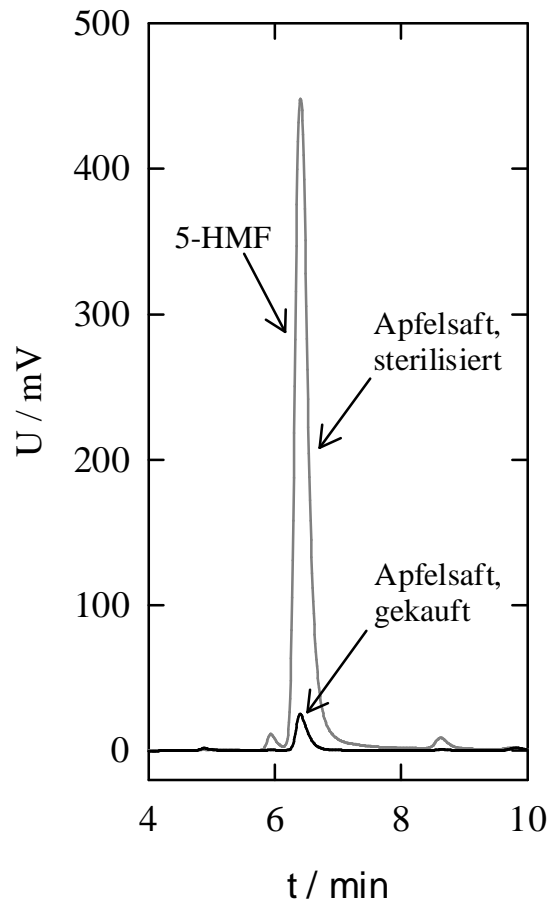


Abbildung 5.35

Apfelsaftextrakte
 gekaufter Saft: $C_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$
 sterilisierter Saft: $C_{5\text{-HMF}} = 85 \text{ mg/l}$

Die Chromatogramme des frischen und des gekauften Saftes sind in Abbildung 5.34 dargestellt, die des gekauften und des autoklavierten Saftes in Abbildung 5.35. Patulin konnte in keinem der drei untersuchten Säfte nachgewiesen werden. Gravierende Unterschiede zeigten sich im Gehalt von 5-Hydroxymethylfuraldehyd. Während im frisch gepreßten Saft nur 0,03 mg/l 5-HMF gefunden werden konnten, lag der Wert bei gekauftem Saft bei 4 mg/l und bei frischem, autoklaviertem Apfelsaft sogar bei 85 mg/l. Kommerzieller Apfelsaft sollte nach einem Vorschlag der Weltgesundheitsorganisation (WHO) einen Wert von 5-10 mg/l nicht überschreiten.

Nach dem Erstellen der Chromatogramme stellte sich die Frage, ob die detektierte Substanz bei 6,2 min tatsächlich nur 5-HMF zugerechnet werden kann, oder ob sich eventuell

noch andere Inhaltsstoffe von Apfelsaft darunter verbergen. Um diese Frage zu klären, wurde gekauftem Apfelsaft eine definierte Menge Patulin und 5-HMF zugesetzt. Der so präparierte Apfelsaft wurde extrahiert und das daraus hervorgegangene Chromatogramm ist in Abbildung 5.36 zu sehen. Zu einem besseren Vergleich wurde der Abbildung das Chromatogramm des reinen Saftes zugefügt.

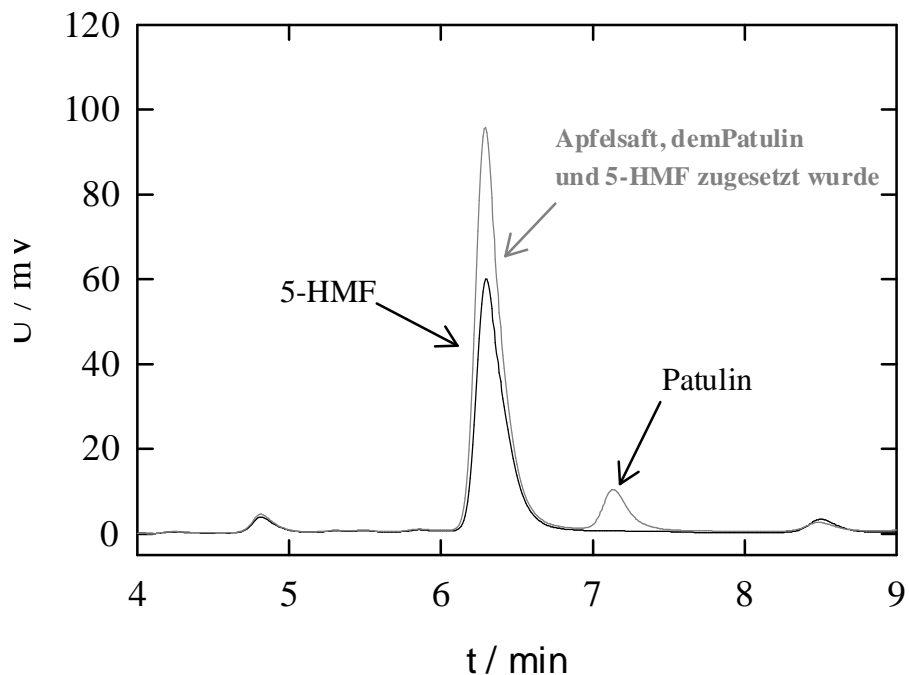


Abbildung 5.36 Vergleich von purem gekauftem Apfelsaft mit gekauftem Saft, dem Patulin ($c = 2 \text{ mg/l}$) und 5-HMF ($c = 4 \text{ mg/l}$) zugesetzt wurde.

Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß der Peak bei 6,2 min tatsächlich nur 5-HMF ist. Es deutet nichts darauf hin, daß eine oder mehrere anderer Substanzen sich darunter verbergen.

Diese Annahme sollte noch durch einen anderen Versuch untermauert werden. Dazu wurden von einer 5-HMF haltigen Lösung zwei Chromatogramme bei Wellenlängen von 275 und 350 nm erstellt. Die jeweils detektierte Peakfläche wurde in Verhältnis zueinander gesetzt, wobei bei 350 nm 0,3 % der bei 275 nm detektierten Fläche berechnet wurde (Anhang, Abb. 8.12). Die gleichen Versuchsbedingungen wurden bei Apfelsaft wiederholt. Das Ergebnis dieses Experimentes führte ebenfalls zu einem Wert von 0,3 % (Anhang, Abb. 8.13). Demzufolge läßt sich annehmen, daß bei 6,2 min keine anderen Substanzen die Detektion von 5-HMF in Apfelsaft behindern.

Als nächstes wurde die Wiederfindung von Patulin und 5-HMF in Apfelsaft untersucht. Dazu wurde frischem Apfelsaft eine definierte Menge beider Substanzen zugesetzt. Der Apfelsaft wurde extrahiert, das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, mit Laufmittel aufgenommen, sterilfiltriert und chromatographiert. Drei der erhaltenen Chromatogramme werden in Abbildung 5.37 gezeigt.

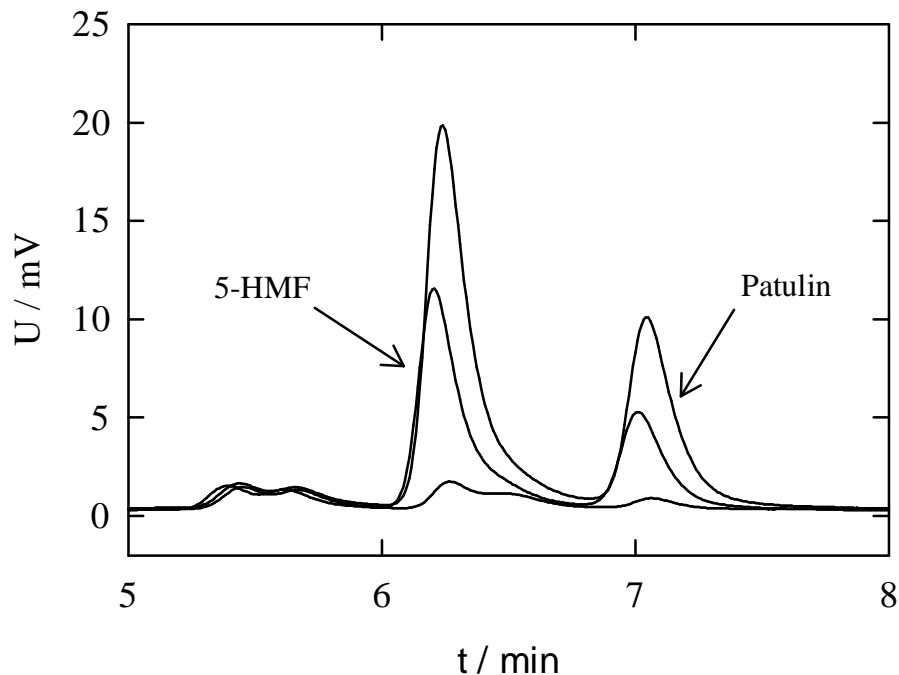


Abbildung 5.37 Apfelsaft, dem unterschiedliche Mengen 5-HMF und Patulin zugefügt wurden.

c_{Patulin} : 2 mg/l 1 mg/l 0,1 mg/l
 $c_{\text{5-HMF}}$: 4 mg/l 2 mg/l 0,2 mg/l

Die Wiederfindung von Patulin in Apfelsaft ist mit Werten von über 96 % hervorragend. Bei 5-HMF wurde eine Wiederfindungsrate von etwa 80 % beobachtet. Dementsprechend liegen alle für 5-HMF in Apfelsaft berechneten Werte ca. 20 % zu tief. Um Mißverständnissen und Diskrepanzen zwischen den dargestellten Chromatogrammen und berechneten Werten vorzubeugen, wurden die Werte für 5-HMF nicht nach oben korrigiert, sondern so wiedergegeben, wie sie aus den Chromatogrammen berechnet worden waren.

Die Stabilität von Patulin und 5-HMF in wäßriger Lösung unter Hochdruck wurde unter 5.3.2 beschrieben. Abschließend wurde auch die Stabilität in Apfelsaft untersucht. Die Druckstabilität von Patulin und 5-HMF konnte auch für Apfelsaft bestätigt werden.

5.4.2 Freisetzung von Patulin durch *Penicillium expansum* in Apfelsaft

Die Patulinproduktion durch *Penicillium expansum* wurde in Apfelsaft untersucht. Zunächst sollte die Freisetzungsrate bei 24 °C in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Pilzes bestimmt werden. Außerdem stellte sich die Frage, inwieweit druckbehandelte Sporen Patulin synthetisieren können. Dazu wurde frischer Apfelsaft mit Sporen von *P. expansum* verkeimt. Die Keimzahl wurde auf 10^6 und 10^4 Keime/(ml Saft) festgelegt (siehe auch 4.4.3, 1. Versuchsreihe). Ferner wurden Sporen unter Bedingungen, die zu einer stabilen Fraktion führen, druckbehandelt (350 MPa, 40 °C, 30 min) und anschließend dem Apfelsaft zugesetzt. Die Keimzahl betrug hier etwa 7 Keime/(ml Saft). Zur Auswertung der Versuche wurde nach dem Extrahieren und Abrotieren des Lösungsmittels mit der gleichen Menge des Laufmittels aufgefüllt, wie sie nach dem Filtrieren des verkeimten Saftes erhalten worden war. Die Menge an freigesetztem Patulin wurde zusammen mit 5-HMF bestimmt.

In Abbildung 5.38 ist die Produktion von Patulin durch *P. expansum* in Apfelsaft dargestellt. Erstaunlicherweise besteht ein großer Unterschied der Patulinproduktion in Abhängigkeit von der Ausgangskeimzahl (10^4 und 10^6 Keime/ml Saft), die Syntheserate bei 10^4 Keimen/ml und bei der stabilen Fraktion ist jedoch gleich.

Bereits am zweiten Tag nach der Verkeimung des Saftes konnte bei einer Ausgangskeimzahl von 10^6 Keimen/ml ein Patulingehalt von 2,9 mg/l festgestellt werden. Nach einem Anstieg der Konzentration auf einen maximalen Wert von 122 mg/l nach 13 Tagen, wurde eine kontinuierliche Reduktion von Patulin beobachtet. Am 112. Tag wurde eine Patulinkonzentration von 8,1 mg/l gemessen.

Bei einer Ausgangskeimzahl von 10^4 Keimen/ml wurde erst am dritten Tag nach der Verkeimung des Saftes Patulin in einer Höhe von 3,5 mg/l detektiert. Nach einem ebenfalls stetigen Anstieg des Patulingehaltes wurde hier allerdings der Maximalwert von 144 mg/l nach etwa 20-30 Tagen erreicht. Ab etwa 40 Tagen ist die Patulinmenge rückläufig und erreicht am 112. Tag einen Wert von 18 mg/l. Nach einer Verkeimung des Saftes mit Sporen der stabilen Fraktion konnte trotz wesentlich geringerer Keimzahlen ein fast analoger Kurvenverlauf beobachtet werden: ein stetiger Anstieg von Patulin mit einem Maximalwert von 142 mg/l nach 27 Tagen, dann abnehmende Patulinwerte.

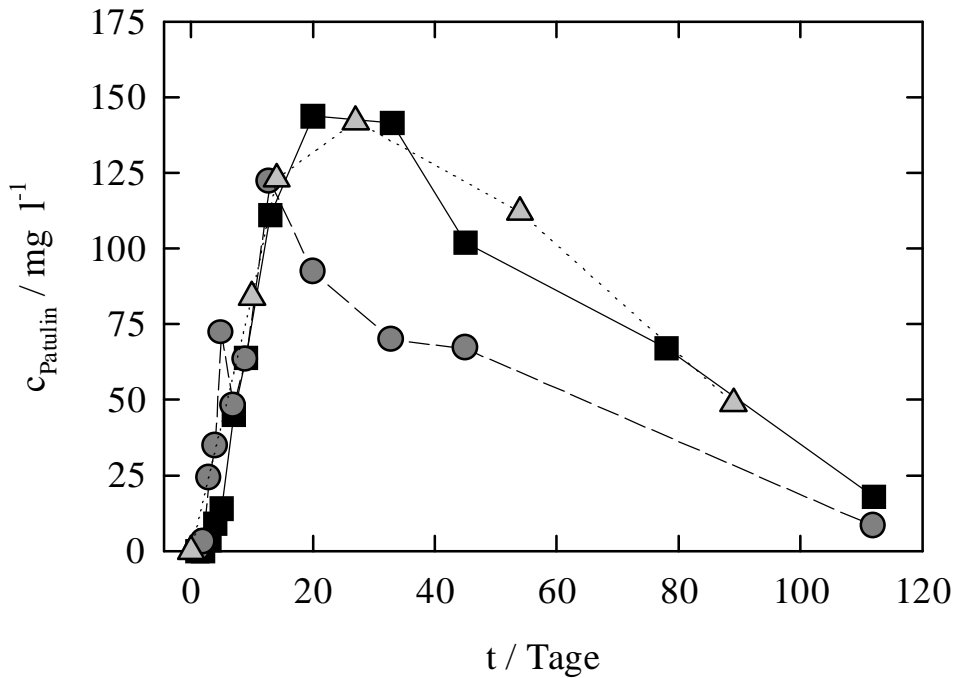


Abbildung 5.38 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft mit den Keimzahlen ● 10⁶, ■ 10⁴ und △ der stabilen Fraktion.

Patulin konnte in Apfelsaft nur dann detektiert werden, wenn bereits Sporen auf der Myceloberfläche erkennbar waren. Die Patulinproduktion scheint somit an die Sporenproduktion gekoppelt zu sein. So ist auch der Unterschied in der Patulinproduktion zwischen den Ausgangskeimzahlen 10⁴ und 10⁶ zu erklären. Bei einer höheren Keimzahl befinden sich mehr (zugegebene) Sporen an der Oberfläche, die Keimung erfolgt rascher, ebenso die Sporenproduktion. Aus diesem Grund konnte hier schon nach zwei Tagen Patulin isoliert werden, während bei 10⁴ Keimen/ml die ersten Sporen erst nach drei Tagen bemerkbar waren, ebenso die Patulinproduktion.

Gleichzeitig mit der Patulinkonzentration wurde auch der Gehalt an 5-HMF bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.39 dargestellt. Die Konzentration an 5-HMF scheint in allen drei Fällen ähnlich hoch zu sein. Große Unterschiede wurden hier auch nicht erwartet, da die Bildung von 5-HMF vermutlich in keinem Zusammenhang mit der Patulinproduktion steht. Zunächst erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg von < 1 mg/l nach zwei Tagen zu einem Maximalwert von ca. 16-18 mg/l nach etwa 80-90 Tagen. Danach scheint sich der Gehalt an 5-HMF etwas zu reduzieren.

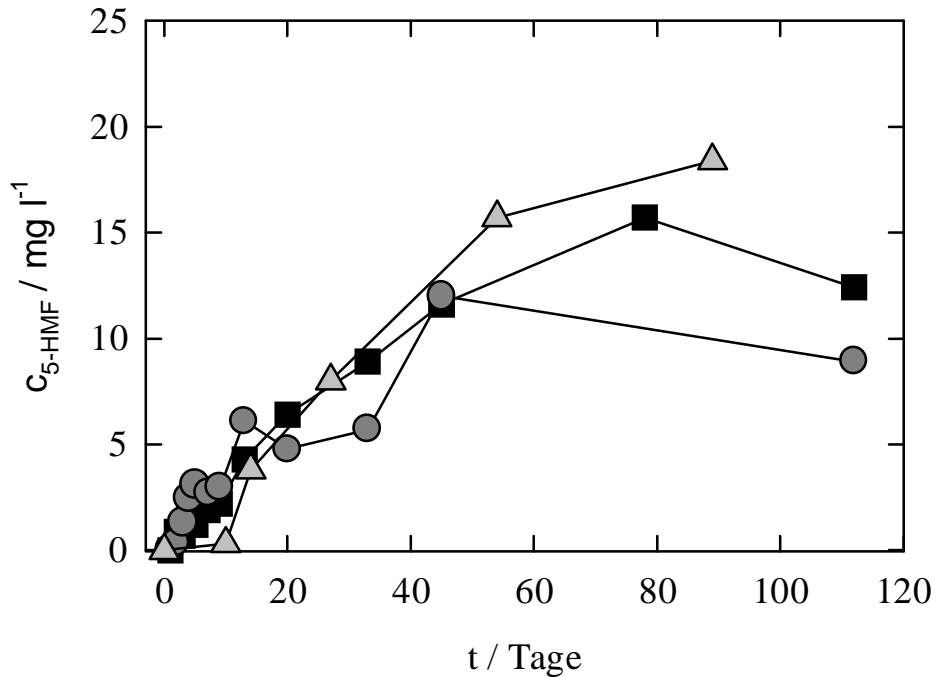


Abbildung 5.39 Gehalt an 5-HMF bei 24 °C in Apfelsaft mit den Keimzahlen \bullet 10^6 , \blacksquare 10^4 und \triangle der stabilen Fraktion.

Nach dem Vorliegen der oben beschriebenen Resultate wurde eine neue Versuchsreihe gestartet, die einerseits die Ergebnisse der 1. Versuchsreihe bestätigen, andererseits noch auf andere Hochdruckbehandlungen ausgeweitet werden sollte (siehe auch 4.4.3, 2. Versuchsreihe). Die Versuchsbedingungen wurden leicht modifiziert. So wurden 10 ml Apfelsaft für die Patulinproduktion des Pilzes vorgelegt und nach dem Extrahieren und Abrotieren der Extrakte wurde mit dem Laufmittel immer auf einen Wert von 10 ml aufgefüllt. Dieses Verfahren sollte die Ergebnisse nivellieren und so Vergleiche erleichtern. Durch das neue Verfahren wurden geringere Patulinwerte erhalten.

Die Untersuchungen über die Patulinproduktion in Apfelsaft wurden auf drei verschiedene Temperaturen ausgedehnt. Die Apfelsaftproben wurden bei 5, 24 und 30 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen auf ihren Patulingehalt untersucht.

Die Bedingungen für die Hochdruckbehandlung bei den verschiedenen Temperaturen wurden so gewählt, daß die resultierende Keimzahl des Saftes etwa 10^3 Keime/ml Saft betrug. Ohne Druckbehandlung oder bei subletalem Druck wurde die Suspension entsprechend verdünnt.

Druckbehandlung und Keimzahl (Keime / ml Apfelsaft):

1. Keine Druckbehandlung; Keimzahl = $1,4 \times 10^6$.
2. Keine Druckbehandlung; Keimzahl = $1,4 \times 10^3$.
3. 25 °C / 100 MPa / 6 h Keimzahl = $1,2 \times 10^3$.
4. 25 °C / 350 MPa / 20 min Keimzahl = $2,8 \times 10^3$.
5. 4 °C / 350 MPa / 8 min Keimzahl = $3,9 \times 10^3$.
6. 40 °C / 350 MPa / 3 min Keimzahl = $3,2 \times 10^3$.
7. 40 °C / 350 MPa / 30 min Keimzahl = 7.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Versuche bei 24 °C Inkubationstemperatur dargestellt (Abbildungen 5.40-5.45). In Abbildung 5.40 wird die Patulinproduktion von *P. expansum* in Abhängigkeit von der Ausgangskeimzahl gezeigt. Auch hier ist deutlich zu erkennen, daß der Patulingehalt des Saftes bei geringeren Ausgangskeimzahlen höhere Werte erreicht als bei stärkerer Verkeimung.

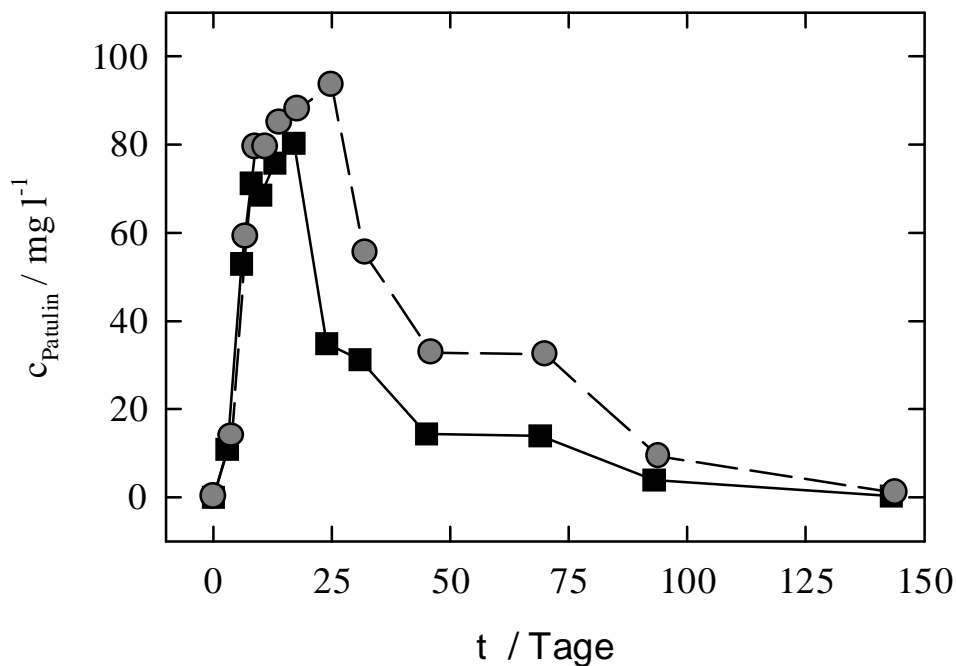


Abbildung 5.40 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft mit ■ 10^6 und ● 10^3 Keimen/(ml Saft).

Bei 10^6 Keimen/ml ist die Maximalkonzentration an Patulin nach 17 Tagen mit einem Wert von 80,3 mg/l erreicht. Danach kann eine stetige Abnahme beobachtet werden. Nach 93

Tagen werden noch 4 mg/l Patulin gefunden, nach 143 Tagen 0,3 mg/l. Bei einer Ausgangs-keimzahl von 10^3 Keimen/ml wird die höchste Patulinmenge erst nach 25 Tagen in einer Höhe von 93,4 mg/l gemessen. Danach wird auch hier eine Abnahme an Patulin beobachtet, wobei die Rate vergleichbar mit der der höheren Ausgangskeimzahl ist. Nach 144 Tagen konnten noch 1 mg/l Patulin gemessen werden.

Die Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung der Sporen auf die Patulinproduktion bei 25 °C werden in Abbildung 5.41 gezeigt. Zum einen wurde die Sporensuspension bei 350 MPa einer 20 minütigen Druckbehandlung unterzogen, um eine Keimzahl von 10^3 Keimen/(ml Apfelsaft) zu erhalten. Zum anderen wurde die Sporensuspension bei 100 MPa sechs Stunden unter Hochdruck gehalten, um den Einfluß einer subletalen Druckbehandlung auf die Patulinproduktion zu untersuchen. Anschließend wurde die Suspension auf einen Wert von 10^3 Keimen/(ml Saft) verdünnt.

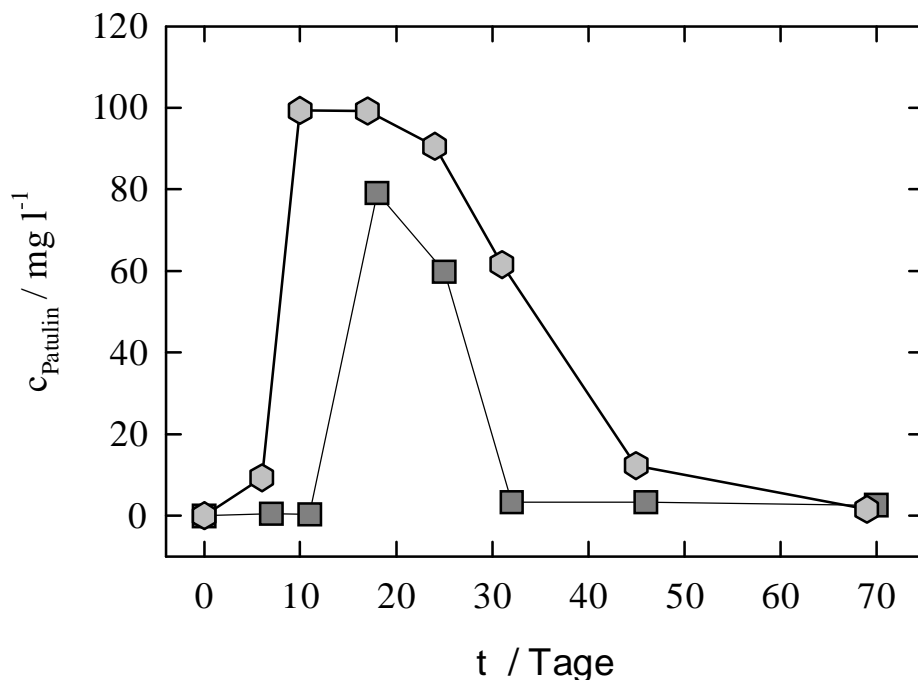


Abbildung 5.41 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft nach den Druckbehandlungen: ■ 25 °C/350 MPa/20 min und ◈ 25 °C/100 MPa/6 h.

Eine subletale Druckbehandlung bei 25 °C scheint die Patulinproduktion zu stimulieren. Die Patulinsynthese setzt jedoch verzögert ein. Im Vergleich zu Sporen ohne Druckbehandlung (59,2 mg/l Patulin nach 7 Tagen) wurden hier nach 6 Tagen nur 9,3 mg/l Patulin gemessen. Doch schon 4 Tage später wurde ein sprunghafter Anstieg des Patulingehaltes auf einen Wert von 99,3 mg/l vermerkt. Dieses hohe Niveau wurde eine Woche beibehalten, gefolgt

von einer Patulinreduktion auf 1,6 mg/l nach 69 Tagen. Ein vergleichbarer Wert wurde bei Sporen ohne Druckbehandlung erst nach 144 Tagen erreicht. Es läßt sich zusammenfassen, daß subletaler Druck zunächst die Patulinsynthese verzögert, dann jedoch die Patulinfreisetzung erhöht, um anschließend zu einer verstärkten Patulinreduktion zu führen.

Die Druckbehandlung bei 350 MPa führt zu einem ganz anderen Ergebnis. Die Patulinsynthese setzt erst sehr stark verzögert ein, nach 11 Tagen konnten nur 0,4 mg/l Patulin gefunden werden. Dann folgt wieder ein sprunghafter Anstieg auf 79,1 mg/l nach 18 Tagen, gefolgt von einem ebenso raschen Abbau auf 3,3 mg/l nach 32 Tagen. Letal wirkende Drücke bei 25 °C scheinen die Patulinfreisetzung sehr stark zu verzögern, die Abbaugeschwindigkeit wird stark erhöht.

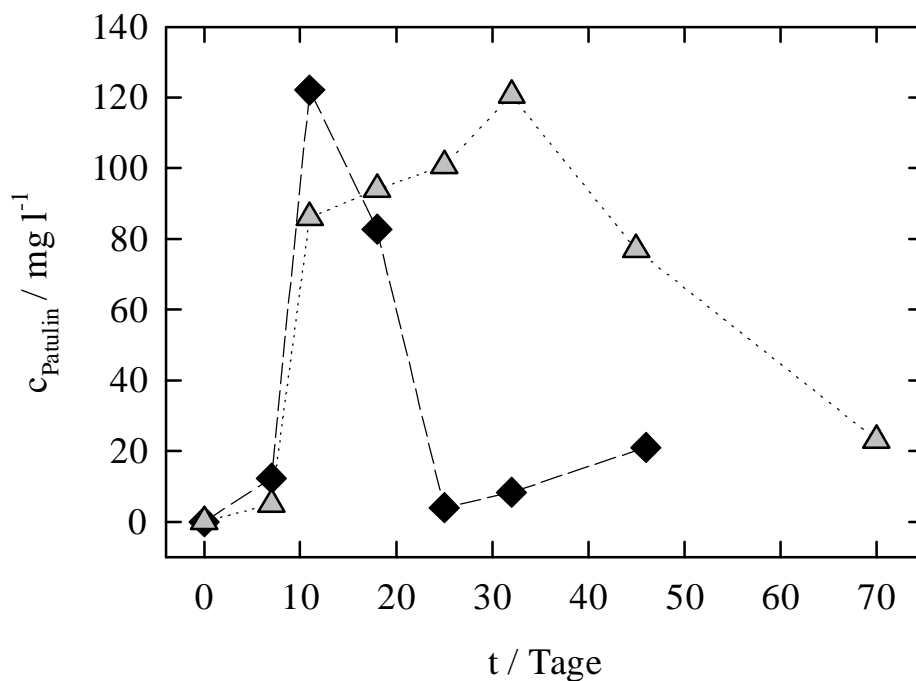


Abbildung 5.42 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft nach den Druckbehandlungen: ◆ 40 °C/350 MPa/3 min und ▲ 40 °C/350 MPa/30 min (stabile Fraktion).

Abbildung 5.42 zeigt die Ergebnisse von Druckbehandlung bei 40 °C und 350 MPa. Nach einer Behandlungsdauer von 3 min wurde nach der Zugabe von Apfelsaft eine Keimzahl von etwa 10³ Keimen/ml erzielt. Die 30 minütige Druckbehandlung führte zu einer stabilen Fraktion, die eine Keimzahl von 7 Keimen/(ml Saft) zur Folge hatte.

Bereits eine 3minütige Hochdruckbehandlung der Sporen bei 40 °C hat weitreichende Konsequenzen auf die Patulinproduktion. Wie schon bei 25 °C beobachtet werden konnte, setzt auch hier die Patulinsynthese erst verzögert ein. Nach 7 Tagen wurden 12,3 mg/l Patulin

gefunden. Dann jedoch erfolgt nach nur vier weiteren Tagen ein sprunghafter Anstieg auf 122,1 mg/l, die höchste Patulinmenge, die während dieser Versuchsreihe gemessen wurde. Anschließend konnte wiederum eine starke Abnahme von Patulin beobachtet werden. Ansteigende Werte während des Patulinabbaus von 3,9 mg/l nach 25 Tagen auf 21 mg/l nach 46 Tagen konnten nur hier beobachtet werden, so daß ein Fehler bei der Probenpräparation sehr wahrscheinlich scheint. Es wird vermutet, daß nach erfolgter Abnahme des Patulingehaltes keine weitere Patulinsynthese durch den Pilz erfolgt.

Die Patulinsynthese von Sporen der stabilen Fraktion setzt ebenfalls erst leicht verzögert ein. Dann folgt allerdings ein langsamer Anstieg des Patulingehaltes auf einen sehr hohen Wert von 120,6 mg/l nach 32 Tagen. Dem langsamen Anstieg folgt ein langsamer Abbau des Patulins, der bis zu einem Gehalt von 23,1 mg/l nach 70 Tagen verfolgt wurde.

Nach einer Druckbehandlung der Sporen bei 40 °C hängt die Patulinsynthese sehr stark von der Behandlungsdauer ab. Kurze Zeiten führen nach einer Verzögerungsphase zu erhöhter Patulinproduktion, danach zu einem raschen Abbau. Längere Behandlungszeiten, die in der Entstehung einer stabilen Fraktion münden, haben eine verlängerte Synthesedauer zur Folge mit einer verlangsamteten Reduktionsrate.

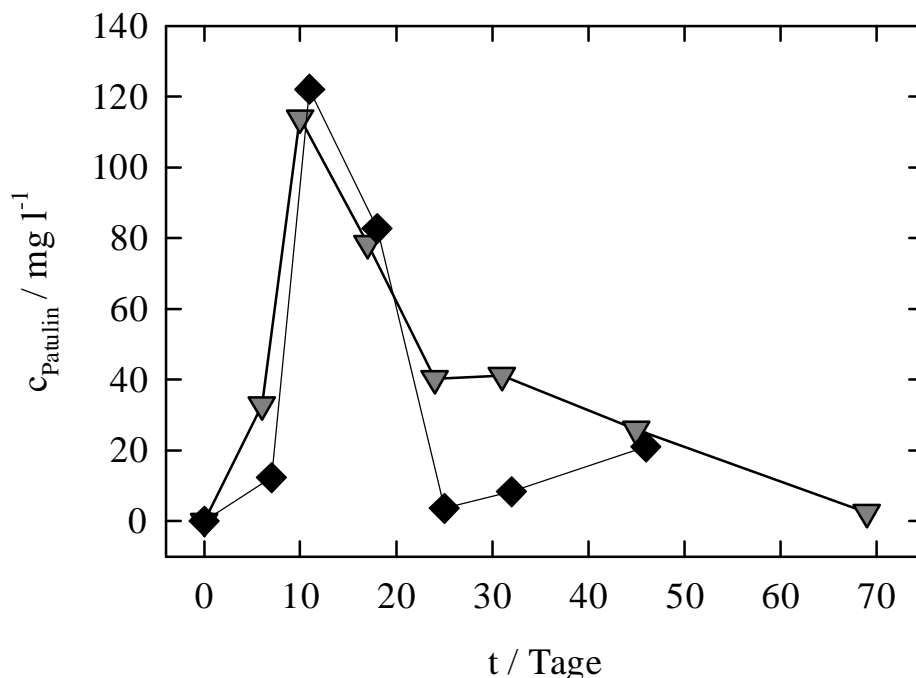


Abbildung 5.43 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft nach den Druckbehandlungen: ◆ 40 °C/350 MPa/3 min und ▼ 4 °C/350 MPa/8 min.

In Abbildung 5.43 wird die Patulinproduktion nach einer Druckbehandlung der Sporen bei 4 °C, 350 MPa und 8 min gezeigt. Einem schnellen Anstieg der Syntheserate auf einen Wert von 114 mg/l nach 10 Tagen folgt ein Patulinabbau auf einen Wert von 2,5 mg/l nach 69 Tagen. Der Kurvenlauf der Patulinsynthese ist vergleichbar mit dem bei 40 °C, 350 MPa und 3 min.

Nach dem Auswerten der Versuche stellte sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen (1. Versuchsreihe: Abb. 5.38; 2. Versuchsreihe: Abb. 5.40-5.43) miteinander übereinstimmen. Durch die modifizierten Versuchsbedingungen sind zwar Unterschiede in der Höhe des Patulingehaltes zu erwarten, die Kurvenform der Patulinfreisetzung sollte sich aber nicht verändern. Als erstes wurden die Ergebnisse der Patulinfreisetzung mit der Ausgangskeimzahl 10^6 Keime/ml aus beiden Versuchsreihen miteinander verglichen und werden in Abbildung 5.44 gezeigt.

Ferner wurden die Kurvenverläufe der Patulinproduktion ausgehend von Sporen der stabilen Fraktion (40 °C, 350 MPa, 30 min) auf ihre Übereinstimmung untersucht. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen werden in Abbildung 5.45 gezeigt.

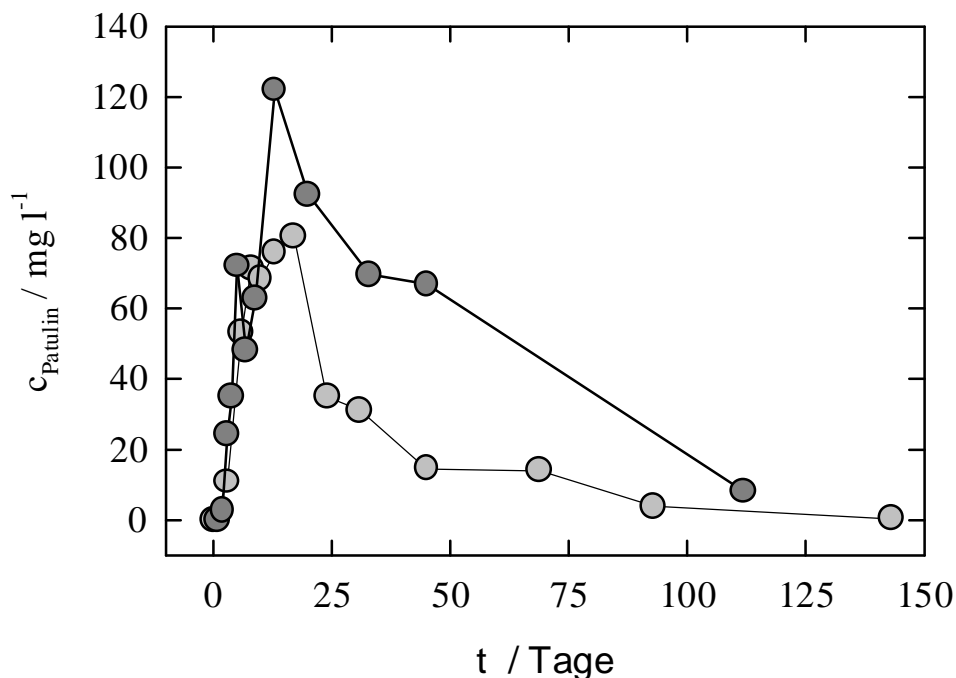


Abbildung 5.44 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft mit Keimzahlen von 10^6 Keimen/(ml Apfelsaft)
 ● 1. Versuchsreihe; ○ 2. Versuchsreihe

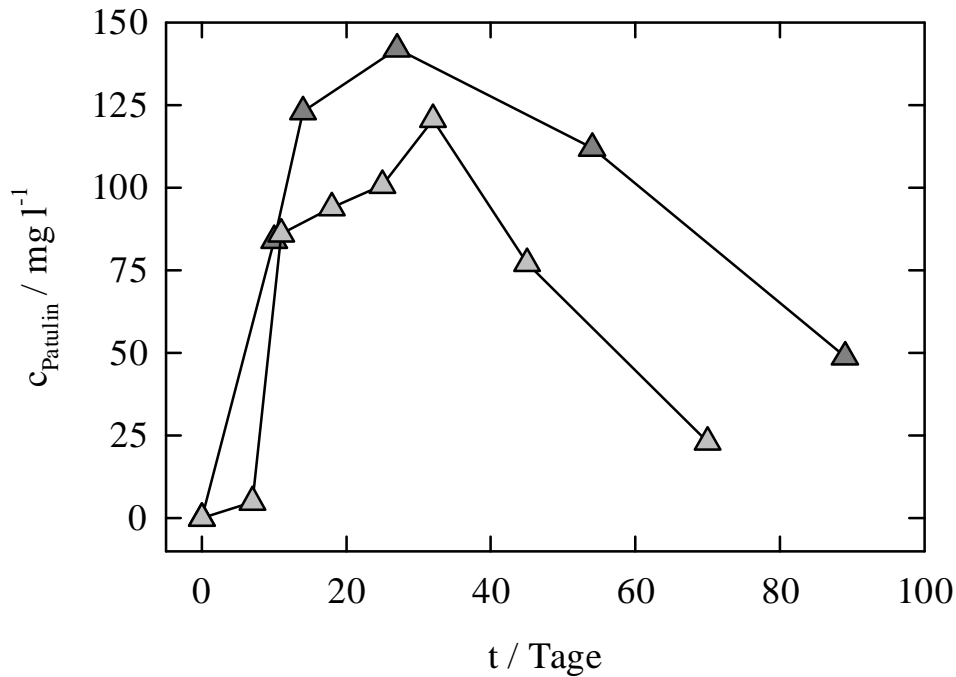


Abbildung 5.45 Produktion von Patulin durch *P. expansum* bei 24 °C in Apfelsaft mit Keimen der stabilen Fraktion.
 ▲ 1. Versuchsreihe; △ 2. Versuchsreihe

Die Abbildungen 5.44 und 5.45 zeigen deutliche Parallelen zwischen beiden Versuchsreihen. Bei einer Ausgangskeimzahl von 10^6 Keimen/ml ist bei beiden Versuchen ein rasches Ansteigen der Patulinkonzentration erkennbar, ein Maximum nach etwa 15 Tagen, gefolgt von einem langsameren Abbau. Auch die Patulinfreisetzung durch Sporen der stabilen Fraktion verläuft sehr ähnlich. In beiden Fällen ist ein etwas langsamerer Anstieg der Patulinwerte sichtbar mit Erreichen des Maximums nach etwa 30 Tagen. Der Abbau des Patulins erfolgt ebenfalls verhältnismäßig langsam.

Alle ermittelten Ergebnisse zur Patulinfreisetzung zeigen nach Durchlaufen eines Maximums eine Reduktion des Patulingehaltes. Es stellte sich hier die Frage, inwieweit der Pilz selbst für diese Abnahme verantwortlich ist. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde frischem Apfelsaft eine definierte Menge Patulin zugesetzt. Die Probe wurde bei 24 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen auf Patulin untersucht. In Abbildung 5.46 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt.

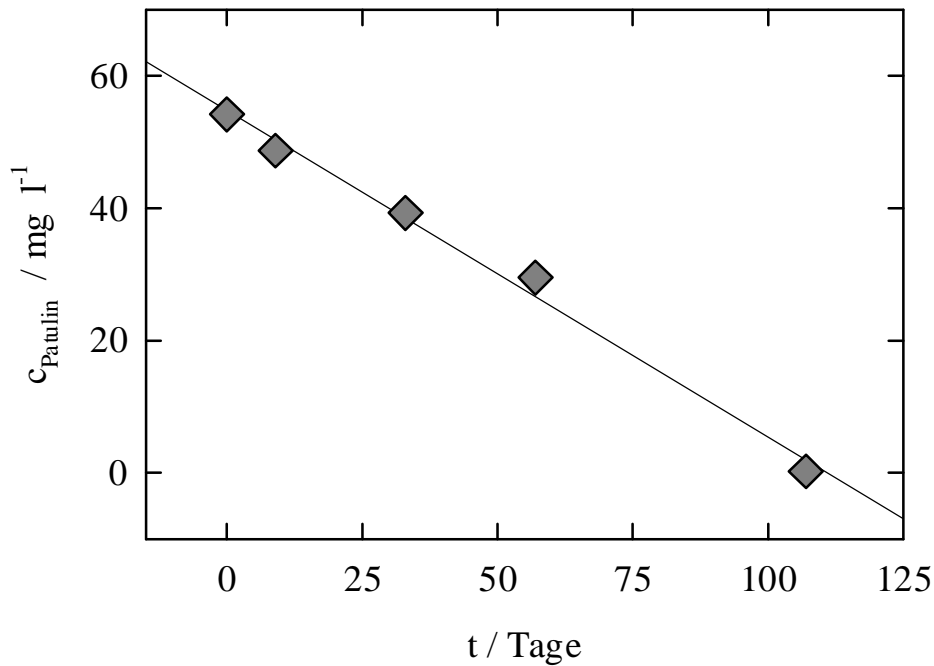


Abbildung 5.46 Abnahme von Patulin in frischem Apfelsaft bei 24 °C.

In frisch gepresstem Apfelsaft erfolgt eine stetige Reduktion des Patulingehaltes. Der Ausgangswert lag hier bei 54,2 mg/l, nach 107 Tagen wurde ein Patulingehalt von 0,24 mg/l ermittelt. Die daraus berechnete Regressionsgerade ist $f(x) = -0,49x + 54,7$ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,992. Das bedeutet, daß an jedem Tag eine Verringerung des Patulingehaltes um etwa 0,5 mg/l erfolgt. Eine lineare Reduktion des Patulingehaltes in diesem Umfang konnte aber in keinem der weiter oben beschriebenen Experimente nachgewiesen werden. Die Reduktionsrate ist vielmehr von Faktoren wie Druck und Temperatur, bei denen die Sporen behandelt worden waren, abhängig. Dementsprechend scheint also auch der Pilz selbst einen Einfluß auf die Abnahme des Patulingehaltes auszuüben. Es ist anzunehmen, daß die Reduktion des Patulins durch diese beiden Faktoren bestimmt wird, wobei die Vorbehandlung der Sporen entscheidend scheint.

Das genaue "Schicksal" des Patulin konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Es ist unklar, ob Patulin tatsächlich abgebaut wird oder nur durch z. B. Konjugation an Zuckermoleküle der Detektion entgeht (siehe auch Kapitel 6, Diskussion).

Die Patulinproduktion von *P. expansum* in Apfelsaft wurde außerdem bei Inkubationstemperaturen von 5 °C und 30 °C untersucht. Die Probenpräparation erfolgte analog den Versuchen bei 24 °C (Keimzahl immer $\sim 10^3$ Keime/ml Saft: reiner Saft als Kontrolle; unbehandelte Sporen, 25 °C/100 MPa/6 h; 25 °C/350 MPa/20 min; 4 °C/350 MPa/4 min; 40 °C/350 MPa/3 min).

Eine Erhöhung der Lagertemperatur von 24 auf 30 °C hat weitreichende Auswirkungen auf die Fähigkeit des Pilzes, Patulin zu synthetisieren. Sporen, die keiner Druckbehandlung unterzogen worden waren, sowie bei 4 °C druckbehandelte Sporen, keimten am schnellsten aus. Hier wurde bereits nach vier Tagen Inkubation bei 30 °C Mycel auf der Oberfläche des Saftes sichtbar. Die Druckbehandlungen der Sporen bei 25 und 40 °C führte zu einem verzögerten Anwachsen des Pilzes auf Apfelsaft, so daß hier das Mycelwachstum erst nach elf Tagen beobachtet werden konnte. Der Mycelkuchen auf der Oberfläche der Saftproben hatte gelbliche Verfärbungen und eine schleimige Konsistenz, während bei einer Lagertemperatur von 24 °C nur weißes "flauschiges" Mycel beobachtet worden war. Während der gesamten Versuchsphase (50 Tage) konnte keine Sporenbildung beobachtet werden. Die Untersuchung des Saftes zeigte, daß keine Patulinsynthese stattgefunden hatte. Die Bildung von Sporen steht somit in direktem Zusammenhang mit der Patulinsynthese.

Die Lagerung der Proben bei 5 °C führte zu einer stark verzögerten Sporenkeimung. Nur bei unbehandelten Sporen konnte nach elf Tagen Mycelwachstum beobachtet werden. Alle anderen Saftproben (bis auf die Kontrolle) wiesen erst nach etwa 40 Tagen Mycel auf. Das Mycel war weiß, insgesamt waren die Mycelfragmente kleiner als bei 24 °C Inkubationstemperatur. Sporenbildung konnte nur bei denjenigen Proben beobachtet werden, die bei 4 °C druckbehandelt worden waren (nach 48 Tagen). Hier wurde ein Patulingehalt von 10 mg/l ermittelt. Alle anderen Apfelsaftproben enthielten keine Sporen und kein Patulin.

Auch diese Versuche zeigten deutlich, daß die Patulinsynthese in direktem Zusammenhang mit der Sporenbildung steht. Es konnte gezeigt werden, daß druckbehandelte Sporen wesentlich langsamer auskeimen als unbehandelte. Dieses Verhalten konnte schon bei einer Inkubationstemperatur von 24 °C beobachtet werden, zeigte sich hier aber wesentlich deutlicher. Sporenbildung ist bei niedrigen Temperaturen nicht ausgeschlossen, scheint aber, wenn überhaupt, nur sehr langsam zu erfolgen.

5.5 Adduktbildung von Patulin mit Cystein

Patulin bildet Addukte mit SH-haltigen Verbindungen wie Cystein oder Glutathion. Die entstehenden Verbindungen sind dabei weitgehend ungiftig (siehe auch Kapitel 6, Diskussion). Hier bietet sich also eine Möglichkeit, Patulin-haltige Lösungen durch die Zugabe von Cystein zu entgiften. Die Patulin-Cystein-Adduktbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit

untersucht. Dabei wurden kinetische Daten der Reaktion in Abhängigkeit von der Druckhöhe und der Temperatur gesammelt und anschließend die Aktivierungsenergien sowie die Aktivierungsvolumina berechnet.

Das Molverhältnis zwischen Cystein und Patulin betrug 25:1, um einen Einfluß der Cysteinkonzentration auf die Adduktbildung auszuschließen. Die Reaktion erfolgte in Wasser, das zuvor mit Phosphorsäure auf pH 4 angesäuert worden war.

Zunächst wurde die Adduktbildung zwischen Patulin und Cystein bei Atmosphärendruck und drei verschiedenen Temperaturen verfolgt (4, 25 und 40 °C). Dazu wurde das Verhältnis zwischen einer Patulinkonzentration zum Zeitpunkt t und der Ausgangskonzentration berechnet und anschließend der natürliche Logarithmus gebildet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.47 dargestellt. Die lineare Verlauf der Adduktbildung weist auf eine Reaktion, die nach einem Zeitgesetz "pseudo erster Ordnung" verläuft. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist demzufolge unabhängig von der quasi konstanten Cysteinkonzentration und wird nur durch die Patulinmenge bestimmt.

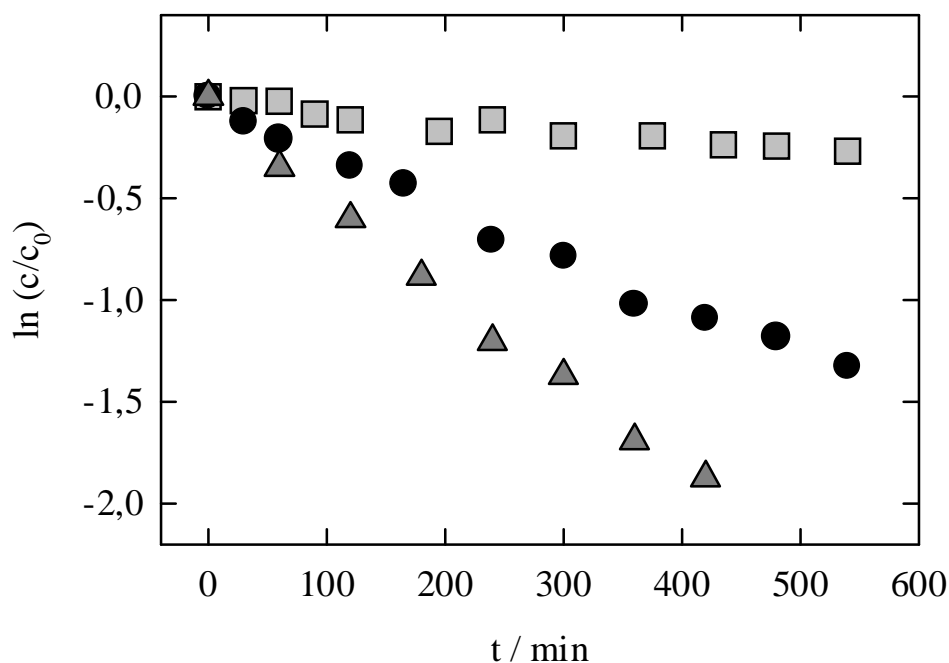


Abbildung 5.47 Abnahme an Patulin während der Reaktion mit Cystein bei \square 4, \bullet 25 und \blacktriangle 40 °C und Atmosphärendruck.

Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion wurden in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet und sind in Tabelle 5.7 dargestellt. Daraus läßt sich deutlich erkennen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur größer wird.

Tabelle 5.7 Geschwindigkeitskonstanten bei 0,1 MPa und 4 °C, 25 und 40 °C

Temperatur	4 °C	25 °C	40 °C
Geschwindigkeitskonstanten [min^{-1}]	$4,59 \cdot 10^{-4} \pm 4,9 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-3} \pm 7,2 \cdot 10^{-5}$	$4,46 \cdot 10^{-3} \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$

Nach der Temperaturabhängigkeit der Adduktbildung wurde deren Druckabhängigkeit untersucht. Dabei wurde eine maximale Druckhöhe von 500 MPa verwendet. Abbildung 5.48 zeigt die Adduktbildung in 30 min bei 4 °C, 25 und 40 °C im Druckbereich von 0,1-500 MPa.

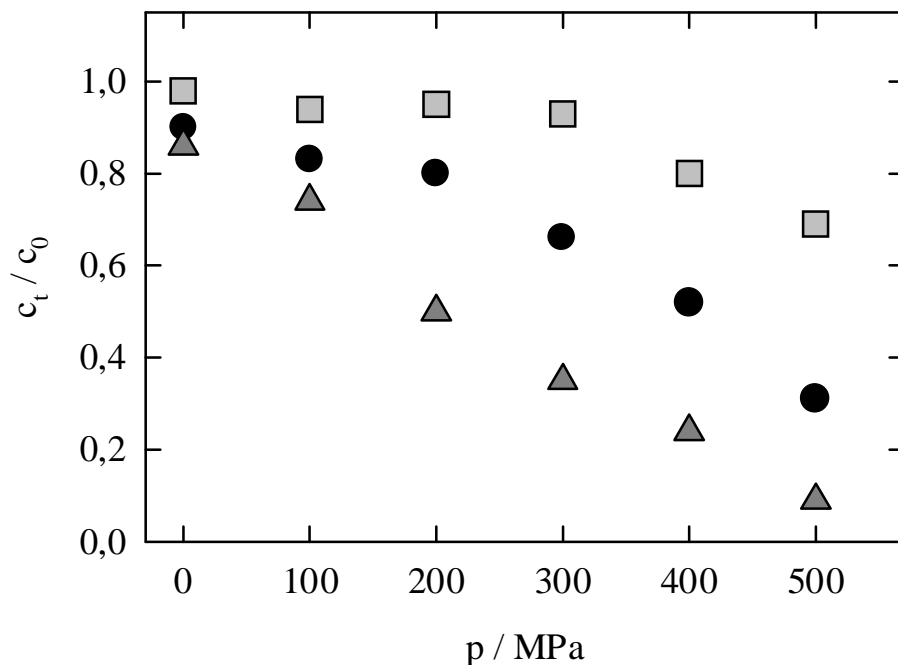


Abbildung 5.48 Abnahme an Patulin während der Reaktion mit Cystein bei \square 4, \bullet 25 und \blacktriangle 40 °C und 0,1 bis 500 MPa in 30 min.

Die Patulin-Cystein-Adduktbildung wird durch Druck gefördert. Das Ausmaß der Reaktion wird durch die Druckhöhe und die Temperatur festgelegt. Während bei niedrigen Temperaturen die Reaktion erst bei Drücken über 300 MPa beschleunigt wird, wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen bereits bei Drücken von 100 MPa erhöht.

Nachdem feststand, daß die Adduktbildung durch hohen Druck ebenso wie durch hohe Temperaturen beschleunigt werden kann, sollten kinetische Daten gesammelt werden, um die Aktivierungsenergie und das Aktivierungsvolumen bestimmen zu können. Dazu wurden Mes-

sungen bei 4, 25 und 40 °C mit Drücken von 0,1-500 MPa durchgeführt. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten und die dazugehörigen Meßwerte sind im Anhang zu finden. Hier wird exemplarisch nur die Bestimmung der Aktivierungsenergie bei 400 MPa und die des Aktivierungsvolumens bei 40 °C gezeigt. Die Berechnung der Aktivierungsenergie und des Aktivierungsvolumens erfolgte unter Erfassung aller berechneten Geschwindigkeitskonstanten (1-3 Werte pro Meßpunkt).

Die Aktivierungsenergien wurden für Drücke von 0,1, 400 und 500 MPa bestimmt. Abbildung 5.49 zeigt die Ergebnisse der Messungen bei 400 MPa und 4 °C, 25 und 40 °C.

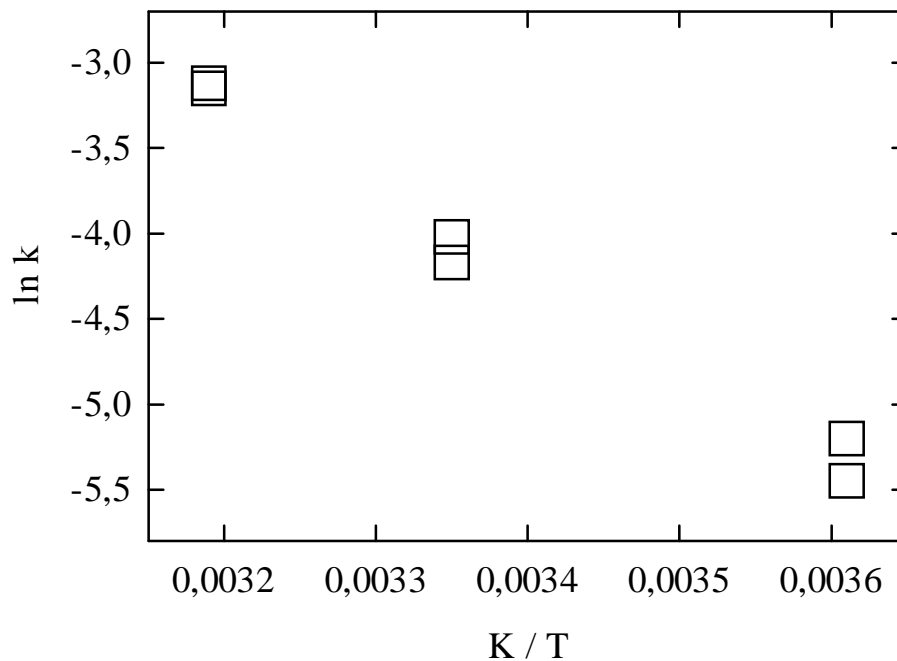


Abbildung 5.49 Bestimmung der Aktivierungsenergie bei 400 MPa

Die berechneten Aktivierungsenergien der Adduktbildung werden in Tabelle 5.8 gezeigt. Die Aktivierungsenergie sinkt mit zunehmendem Druck. Während bei Atmosphärendruck eine Energieschwelle von knapp 50 kJ/mol überschritten werden muß, sind es bei 500 MPa nur noch etwa 40 kJ/mol, 20 % weniger.

Tabelle 5.8 Aktivierungsenergien bei verschiedenen Drücken

Druck	0,1 MPa	400 MPa	500 MPa
Aktivierungsenergie [kJ/mol]	49,5 ± 4,4	43,1 ± 2,5	40,3 ± 2,2

Das Aktivierungsvolumen wurde für 4 °C, 25 und 40 °C mit Drücken von 0,1-500 MPa bestimmt. Abbildung 5.50 zeigt exemplarisch die Berechnung bei 40 °C.

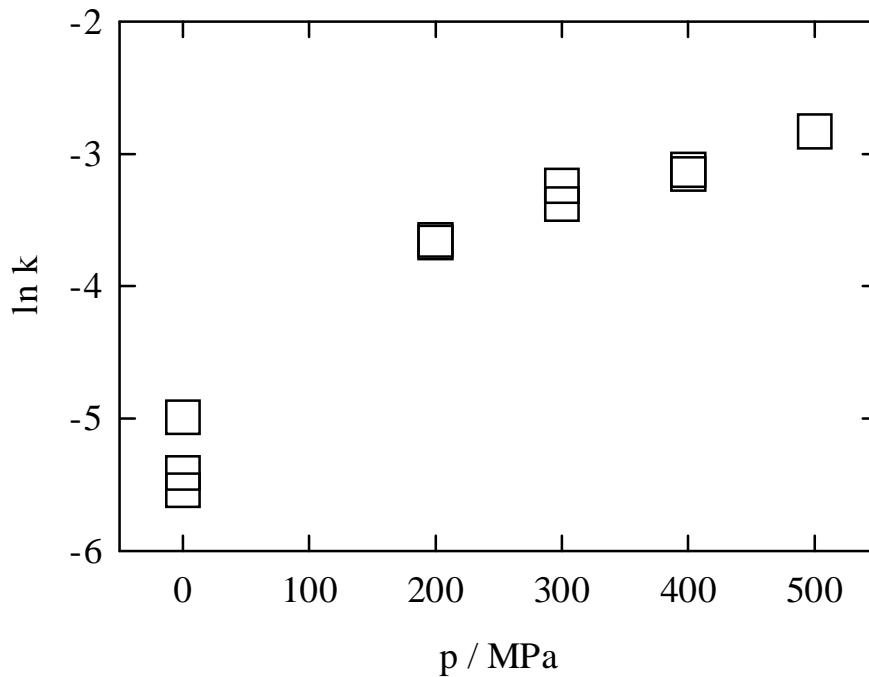


Abbildung 5.50 Bestimmung des Aktivierungsvolumens bei 40 °C.

Der absolute Wert des Aktivierungsvolumens scheint unter Hochdruck kleiner zu sein als in niedrigen Druckbereichen. So wurde bei 40 °C für den Druckbereich von 200-500 MPa ein Aktivierungsvolumen von $-6,3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ berechnet, für kleinere Drücke ein Wert von $-21,6 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Die Ergebnisse bei 4 und 25 °C sind vergleichbar. Die berechneten Werte für das Aktivierungsvolumen sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Tabelle 5.9 Aktivierungsvolumina bei 4 °C, 25 und 40 °C

Temperatur	4 °C	25 °C	40 °C
Aktivierungs- volumen [cm^3/mol]	$-10,3 \pm 5,0$ (400-500 MPa)	$-5,6 \pm 1,8$ (300-500 MPa)	$-6,3 \pm 0,6$ (200-500 MPa)
	$< -14,3 \pm 1,0$ ($< 400 \text{ MPa}$)	$< -15,0 \pm 1,3$ ($< 300 \text{ MPa}$)	$< -21,6 \pm 2,9$ ($< 200 \text{ MPa}$)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Adduktbildung zwischen Cystein und Patulin durch Druck- oder Temperaturerhöhung beschleunigt werden kann. Die Aktivierungsenergien liegen zwischen 40 und 50 kJ/mol, die Aktivierungsvolumina bei höheren Drücken zwischen -6 und -10 cm³/mol, bei niedrigen zwischen -14 und -22 cm³/mol. Ein Grund für die Druckabhängigkeit der Werte könnte darin liegen, daß unter Druck andere Produkte favorisiert gebildet werden als bei Atmosphärendruck. Dieses Thema wird ausführlich im folgenden Kapitel diskutiert.

6 DISKUSSION

6.1 Schimmelpilzsporen unter Hochdruck

Der Einfluß von hohem hydrostatischem Druck auf Konidiosporen der Schimmelpilze *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* und *Penicillium expansum* wurde untersucht. Es wurde zunächst die Druckempfindlichkeit dieser Pilze getestet, um anschließend die Kinetik der Inaktivierung bei verschiedenen Temperaturen erstellen zu können. Nach dem Erfassen der kinetischen Daten wurde *C. herbarum* exemplarisch ausgewählt, um eingehender sein Verhalten in Abhängigkeit von der Druckhöhe, der Temperatur, der Ausgangskeimzahl, dem pH-Wert oder der Osmolalität des Mediums zu untersuchen. Darauf folgten Hochdruckexperimente in Apfel- und Brokkolisaft mit Konidiosporen der Pilze *C. herbarum* und *P. expansum*. Außerdem wurden Säfte und eine Kochsalzlösung verkeimt, unterschiedlich druckbehandelt, bei 5 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen auf den Verkeimungsgrad untersucht.

Inaktivierung in Abhängigkeit von Druck und Temperatur

Die Empfindlichkeit der untersuchten Schimmelpilze gegenüber hohem hydrostatischem Druck ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei 25 °C und einer 30 minütigen Behandlungsdauer wird bei *B. cinerea* und *C. herbarum* ein Grenzdruck von 150 MPa gefunden. Der Grenzdruck gibt die minimale Druckhöhe an, bei der eine Reduzierung der Keimzahl erfolgt. Für die Inaktivierung der Konidiosporen von *P. expansum* wird ein deutlich höherer Grenzdruck von 250 MPa beobachtet, bei *A. fumigatus* klettert dieser sogar auf 300 MPa. Die Inaktivierungsrate steigt nach Erreichen eines spezifischen Grenzdruckes kontinuierlich an, bis schließlich die Nachweisgrenze unterschritten wird. Eine Ausnahme bildet *C. herbarum*. Hier kann bei 25 °C in einem Druckbereich von 200-350 MPa keine deutliche Steigerung der Inaktivierungsrate beobachtet werden. Wird eine Behandlungstemperatur von 40 °C verwendet, weitet sich die Druckresistenz auf einen Bereich von 200-400 MPa aus.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht möglich, einen allgemeingültigen Grenzdruck für Konidiosporen festzulegen. Der Grenzdruck muß demzufolge für jede Gattung von Schimmelpilzen separat bestimmt werden. Dabei spielt auch die Temperatur eine entscheidende Rolle. Hier können bei bestimmten Druck/Temperatur-Kombinationen synergistische Effekte auftreten, die eine deutliche Verbesserung der Inaktivierung nach sich ziehen (Abbildung 5.2).

Die Kinetik der Inaktivierung wurde bei 4, 25 und 40 °C durchgeführt, mit *A. fumigatus* zusätzlich bei 55 °C. Dabei wurde bei *A. fumigatus* eine Druckhöhe von 400 MPa eingesetzt, bei *B. cinerea* und *C. herbarum* 200 MPa und bei *P. expansum* 350 MPa. Um einen besseren Überblick zu ermöglichen, wurden die Dezimalen Reduktionszeiten (D-Werte) der einzelnen Untersuchungen in Tabelle 6.1 zusammengestellt.

Tabelle 6.1 Dezimale Reduktionszeiten (s. Fr. = stabile Fraktion)

	4 °C	25 °C	40 °C	55 °C
<i>A. fumigatus</i>	D ~ 3 min	D ₁ ~ 8 min D ₂ ~ 150 min	D ~ 7 min	D ₁ ~ 5 min D ₂ ~ s. Fr.
<i>B. cinerea</i>	D ₁ ~ 9 min D ₂ ~ 44 min	D ₁ ~ 6 min D ₂ ~ s. Fr.	D ₁ < 4 min D ₂ ~ s. Fr.	
<i>C. herbarum</i>	D ₁ ~ 6 min D ₂ ~ 70 min	D ₁ ~ 6 min D ₂ ~ s. Fr.	D ₁ < 2,5 min D ₂ ~ s. Fr.	
<i>P. expansum</i>	D ~ 1 min	D ₁ ~ 7 min D ₂ ~ 28 min	D ₁ < 0,8 min D ₂ ~ s. Fr.	

Die Hochdruckinaktivierung von Bakterien scheint bei Raumtemperatur am ineffektivsten zu sein, so daß eine Temperaturerhöhung oder -erniedrigung die Inaktivierungsrate wesentlich beschleunigen kann (ZoBell und Cobet 1962, Schreck 1998). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Eicher (2000) bei der Hochdruckbehandlung von Sporen der Schimmelpilze *Aspergillus flavus* und *Eurotium repens*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Annahme nicht bestätigt werden. Nur bei zwei von vier untersuchten Pilzen (*A. fumigatus* und *P. expansum*) ist die Inaktivierungsrate bei Raumtemperatur tatsächlich am geringsten.

Die Kinetik der Inaktivierung verläuft fast immer zweiphasig. Ein Reaktionsverlauf erster Ordnung konnte nur bei *A. fumigatus* und *P. expansum* bei einer Behandlungstemperatur von 4 °C beobachtet werden, sowie bei 40 °C im Falle von *A. fumigatus*. Die Dezimalen Reduktionszeiten der einphasigen Inaktivierungen liegen bei maximal 7 min. Bei derart schnellen Reduktionsraten ist es aber durchaus möglich, daß ein potentiell zweiphasiger Reaktionsverlauf unentdeckt bleibt. Demzufolge ist es denkbar, daß die Hochdruckinaktivierung der Koni-

diosporen immer zweiphasig verläuft, dieses aber nur bei langsam verlaufenden Inaktivierungen detektierbar ist.

Das Auftreten zweiphasiger Inaktivierungskurven wird nicht nur bei der Druckbehandlung von Schimmelpilzsporen beobachtet. Bakterien zeigen dieses Phänomen sowohl bei der Hitzeinaktivierung (Moats 1971, Dabbah u.a. 1971) als auch bei Druckbehandlungen (Ludwig u.a. 1992, Smelt u.a. 1997). Van Almsick (1997) erklärt dieses Verhalten bei vegetativen Zellen von *Escherichia coli* durch deren inhomogenes Alter. Er konnte nachweisen, daß bei dem Auftreten zweiphasiger Hochdruckinaktivierungen sich ein Teil der Bakterien noch in der exponentiellen Wachstumsphase befand, während andere bereits die stationäre Phase erreicht hatten.

Auch Schimmelpilzkulturen enthalten Sporen unterschiedlichen Alters. Eicher beschrieb 1996, daß die Stabilität von Ascosporen durch den Alterungsprozess steigt, da der Wassergehalt innerhalb der Spore sinkt. Eine Stabilitätssteigerung mit zunehmendem Alter konnte bei *C. herbarum* nicht beobachtet werden (Abb. 5.4). Allerdings wurden in diesem Fall zwei Kulturen im Alter von einer und zehn Wochen verglichen, die bei unterschiedlichen Temperaturen aufwuchsen (5 und 24 °C). Dennoch scheint der Grund für das Auftreten zweier Fraktionen nicht das unterschiedliche Alter der Sporen zu sein, denn das Verhältnis der beiden Fraktionen müßte unabhängig von der Behandlungstemperatur konstant sein, was offensichtlich nicht der Fall ist. Ferner ist es nicht plausibel, weshalb dann genau zwei Fraktionen entstehen sollten. Konsequenterweise müßte es dann mehrere Fraktionen geben.

Die Ursache für das Auftreten zweiphasiger Inaktivierungskurven könnte durch zwei unterschiedliche Inaktivierungsmechanismen erklärt werden. Die Abhängigkeit des Inaktivierungsmechanismus von der Druckhöhe wird von Ludwig u.a. (1999) in Erwägung gezogen. Eicher (2000) vermutet die Existenz zweier Mechanismen in Abhängigkeit von der Temperatur unter Beteiligung von "Heat Shock Proteinen". Das Vorhandensein zweier Inaktivierungsmechanismen scheint zum jetzigen Zeitpunkt der wahrscheinlichste Erklärungsansatz zu sein. Die Existenz einphasiger Inaktivierungen jedoch würde durch dieses Modell nicht ausreichend erklärt werden. So ist es wiederum sinnvoll anzunehmen, daß die Hochdruckinaktivierung zweiphasig verläuft, aber bei hohen Inaktivierungsraten nicht mehr detektiert werden kann.

Bei allen untersuchten Pilzen wurden im Rahmen dieser Arbeit druckresistente Fraktionen gefunden, wobei deren Auftreten durch die Behandlungstemperatur bestimmt wird. In keinem Falle konnte eine stabile Fraktion bei 4 °C detektiert werden, bei 25 °C wurde diese bei

B. cinerea und *C. herbarum* gefunden. Bei einer Behandlungstemperatur von 40 °C konnte nur bei *A. fumigatus* keine Druckresistenz beobachtet werden, jedoch bei 55 °C. Das Auftreten druckresistenter Fraktionen konnte auch bei den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *Eurotium repens* beobachtet werden (Eicher 2000). Im Falle von *A. flavus* verlief die Kinetik der Inaktivierung bei 4 °C, 25 und 45 °C zweiphasig mit einer stabilen Fraktion bei 45 °C. Die Ergebnisse der Hochdruckinaktivierung von *E. repens* zeigen ein etwas anderes Bild. Hier wurde bei einer Behandlungstemperatur von 4 °C eine stabile Fraktion beobachtet, bei 25 °C verlief die Inaktivierung zweiphasig und bei 45 °C einphasig. Dieser Unterschied kann jedoch darauf zurückgeführt werden, daß im Falle von *E. repens* Ascosporen eingesetzt worden waren, so daß ein direkter Vergleich mit der Inaktivierung von Konidiosporen nicht sinnvoll erscheint.

Eine Systematik bei dem Auftreten druckresistenter Fraktionen von Konidiosporen läßt sich jedoch erkennen. Wird die Druckinaktivierung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt, kann Druckresistenz vermieden werden, so daß eine vollständige Abtötung der Sporen erfolgen kann. Bei Raumtemperatur kann Drucktoleranz vorkommen, das Auftreten ist gattungsspezifisch. Erfolgt die Inaktivierung bei höheren Temperaturen, scheint die Druckresistenz immer dann aufzutreten, wenn die Behandlungstemperatur die optimale Wachstumstemperatur übersteigt. Demzufolge kann bei *A. fumigatus* mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C eine stabile Fraktion bei 55 °C beobachtet werden, während bei den restlichen Pilzen, die ein Wachstumsoptimum von 24 °C aufweisen, diese bei 40 °C auftritt.

Es konnte gezeigt werden, daß der Anteil der resistenten Fraktion, gemessen an der Gesamtpopulation, bei konstantem Druck immer gleich ist (Abb. 5.5). Eine Verringerung der Ausgangskeimzahl führt zu einer Reduzierung der Keime innerhalb der stabilen Fraktion. Eine Unabhängigkeit des Inaktivierungsverlaufes von der Ausgangskeimzahl konnte ebenso bei der Druckbehandlung der Bakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden (Scigalla 1994, Sojka 1996).

Das Auftreten von Drucktoleranz scheint ein physiologisches und kein genetisches Merkmal zu sein. Die meisten Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß erhöhte Resistenz von Mikroorganismen durch wiederholtes Anzüchten nicht gesteigert, also vererbt, werden kann. Dies gilt sowohl für Bakterien (Metrick u.a. 1989, Sojka und Ludwig 1995) als auch für Pilze (Eicher 2000). Nur Hauben u.a. (1997) kommen zu einem anderen Resultat. Hier konnte die Druckresistenz eines *E. coli* Stammes durch wiederholtes Anzüchten erhöht werden.

Die Druckresistenz der stabilen Fraktion kann überwunden werden. Durch eine Druckerhöhung kann der Anteil der stabilen Fraktion an der Gesamtpopulation gesenkt werden

(Abb. 5.6-5.9). Bei einer ausreichend großen Drucksteigerung scheint es wahrscheinlich, das Auftreten stabiler Fraktionen vollständig unterdrücken zu können. Außerdem konnte für Konidiosporen von *P. expansum* gezeigt werden, daß Sporen der stabilen Fraktion bei einer Temperaturänderung (40 °C → 25 °C) inaktiviert werden können, nämlich mit einer für diese Temperatur charakteristischen Reduktionszeit (Merkulow 1997).

Die genaue Ursache für das Auftreten von Druckresistenz ist unklar. Die Freisetzung von "Heat Shock Proteinen" (HSP) wurde in der Vergangenheit als eine Möglichkeit diskutiert. HSP können bei Mikroorganismen eine erhöhte Toleranz gegenüber hohen Temperaturen oder hohem Druck bewirken, wobei die maximale Syntheserate der Proteine bei Hefen bei etwa 40 °C liegt (Pfeffer und Schulz-Harder 1985, Gailit 1989, Iwahashi u.a. 1991). Bei Raumtemperatur verrichten HSP "normale" Zellfunktionen. Wird die Umgebungstemperatur erhöht, kann die Syntheserate der Proteine in kürzester Zeit gesteigert werden. HSP können sich an Polypeptide anlagern und diese stabilisieren oder als "Chaperone" fungieren, die denaturierte Proteine aus der Zelle entfernen (Earnshaw u.a. 1995). Die Beteiligung von HSP als stabilisierendes Agens kann möglicherweise das Auftreten resistenter Fraktionen bei 40 °C plausibel machen, das Auftreten bei 25 °C allerdings weniger. Denn bei Raumtemperatur sollte die Syntheserate der HSP nicht gesteigert werden, somit sollte auch keine schützende Funktion erkennbar sein. Demzufolge scheint es unwahrscheinlich, daß HSP für das Auftreten stabiler Fraktionen die alleinige Verantwortung tragen, ihre Beteiligung kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Wie bereits beschrieben wurde, kann mit dem Auftreten einer Druckresistenz bei Inaktivierungstemperaturen oberhalb der Wachstumstemperatur gerechnet werden. Die Wachstumstemperatur hat aber u.a. einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Fettsäuren innerhalb der Membranphospholipide. So liegt die Vermutung nahe, daß Phospholipide eine Schlüsselrolle bei dem Entstehen von Drucktoleranz spielen könnten. Unter Druck vollziehen sich kristalline Veränderung innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran, was u.U. auch zum Zelltod führen kann (Cheftel 1992). Außerdem wurde von Dipalmitoylphosphatidylcholin eine druckinduzierte Gelphase berichtet, die bei Drücken über 100 MPa und Temperaturen über 30 °C zu finden ist (Kaneshina u.a. 1996). Ferner wurde in Modellsystemen eine stabilisierende Wirkung von Lipiden auf druckinduzierte Änderungen von Polypeptiden diskutiert (Heremans 1992, Carrier u.a. 1990).

So könnte das Auftreten von druckresistenten Fraktionen eventuell auf die Zusammensetzung der Phospholipide und deren Druck/Temperatur-abhängige Modifikation zurückgeführt werden. Hypothetisch wäre es denkbar, daß innerhalb einer Schimmelpilzpopulation immer

eine druckresistente Fraktion von Sporen zu finden ist, deren Ursache zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden kann. Dabei ist deren "Auftreten" nur von der Phospholipidzusammensetzung und der dazugehörigen Druck/Temperatur-Stabilität, also des Phasendiagramms, abhängig. Nach dieser Theorie müßten sich die Lipide unter Druck bei 4 °C, wo bei Konidiosporen keine Druckresistenz vorkommt, immer in einer anderen Phase (Modifikation) befinden als bei hohen Temperaturen (40 oder 55 °C). Bei Raumtemperatur könnte das entscheidende Kriterium für einen Phasenübergang die Druckhöhe sein. Bei 25 °C Behandlungstemperatur wurde das Auftreten von Drucktoleranz bis 250 MPa beobachtet: *B. cinerea* - 200 MPa; *C. herbarum* - 200 MPa; *Penicillium digitatum* - 250 MPa (Sternberger 2001). Höhere Drücke scheinen keine Resistenz bei Raumtemperatur zu verursachen: *P. expansum* - 350 MPa; *A. fumigatus* - 400 MPa; *Aspergillus flavus* - 300 MPa (Eicher 2000).

Der Einfluß von Zuckergehalt und pH-Wert auf die Inaktivierung

Die Inaktivierung von *C. herbarum* Konidiosporen wurde in Abhängigkeit von dem Zuckergehalt der Inaktivierungslösung (0-60 %, m/m; Abbildung 5.10) sowie von dem pH-Wert (pH 1,2-12,5; Abbildung 5.11) untersucht.

Der protektive Effekt hochosmolaler Medien auf die Inaktivierung von Mikroorganismen ist bekannt. Dabei können die Keime sowohl vor dem Abtöten durch hohe Temperaturen als auch durch hohen Druck geschützt werden. Nach der Zugabe von Salzen konnte eine erhöhte Temperaturreistenz bei Staphylokokken und Laktobazillen beobachtet werden (Tuncan und Martin 1990, Vrchlabsky und Leistner 1971), ebenso bei Ascosporen der Schimmelpilze *Talaromyces flavus* und *Neosartorya fischeri* (Beuchat 1986, Conner und Beuchat 1987). Eine schützende Wirkung hochosmolaler Medien gegenüber der Inaktivierung durch hohen Druck wurde bei Bakterien, Hefen und Schimmelpilzsporen beobachtet (Oxen und Knorr 1993, Paulou u.a. 1997, van Almsick 1997). Diese Ergebnisse konnten durch Experimente mit Konidiosporen des Pilzes *C. herbarum* bestätigt werden. Die Schutzwirkung gegenüber einer Hochdruckinaktivierung nimmt mit steigender Saccharosekonzentration zu. Der maximale Schutzeffekt wird bei einer 60%igen Saccharoselösung beobachtet (Abbildung 5.10). Untersuchungen an *P. expansum* Konidiosporen in Kochsalz und Saccharose enthaltenden Lösungen zeigten, daß der Schutzeffekt in beiden Fällen gleich groß ist, wenn die Molalität der einzelnen Komponenten miteinander verglichen wird (Merkulow 1997). Die Schutzfunktion ist demnach nur auf die Anzahl gelöster Teilchen und nicht auf deren chemische Beschaffenheit zurückzuführen.

Der Schutzeffekt hochosmolaler Medien kann vermutlich auf den erniedrigten Wassergehalt der Sporen zurückgeführt werden (Beuchat u.a. 1981). Es wird angenommen, daß eine Verringerung des intrazellulär gebundenen Wassers eine stabilisierende Wirkung auf Proteine ausübt. In Abwesenheit von Wasser lagern sich die Peptide aufgrund von Dipol-Wechselwirkungen zu größeren Komplexen zusammen, was eine erhöhte Stabilität der Zelle bewirkt (Earnshaw u.a. 1995).

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Hochdruckinaktivierung von *C. herbarum* wurde in einem pH-Bereich von 1,2-11,9 untersucht (Abbildung 5.11). Dabei konnte festgestellt werden, daß die Empfindlichkeit der Sporen gegenüber Hochdruck bei pH-Werten $< 3,4$ und > 10 zunimmt. Diese Angaben können allerdings nur als Orientierungspunkte angesehen werden, da der genaue pH-Wert des Glycin/HCl- und des Glycin/NaOH-Puffers unter Druck nicht bekannt ist.

Unter Druckeinfluß können sich solvatisierte Ionen bilden, da durch den höheren Ordnungsgrad der Moleküle ein Raumgewinn erzielt werden kann. Dieser Vorgang bewirkt das Absinken des pH-Wertes. Bei reinem Wasser kann beispielsweise eine Verringerung des pH-Wertes von etwa 0,4 Einheiten pro 100 MPa beobachtet werden (Kitamura und Itoh 1987). Demzufolge läßt sich vermuten, daß *C. herbarum* Konidiosporen erst bei pH-Werten < 3 druckempfindlicher reagieren. Die druckabhängige pH-Verschiebung in MES- und Tris-Puffer ist vernachlässigbar, da in pH-Bereichen um den Neutralpunkt kein Einfluß auf die Hochdruckinaktivierung beobachtet werden kann.

Bei der Hochdruckbehandlung von Hefen und Schimmelpilzen konnte bisher kein Einfluß des pH-Wertes auf die Inaktivierungsrate beobachtet werden. Diese Resultate wurden bei der Druckbehandlung von *Saccharomyces bayanus* und *Mucor plumbeus*, sowie bei Ascosporen des Pilzes *Byssoschlamys nivea* erzielt (Ogawa u.a. 1989, Butz u.a. 1996). Dagegen wurde bei der Hochdruckinaktivierung des Bakteriums *Listeria monocytogenes* eine erhöhte Inaktivierungsrate bei niedrigen pH-Werten beschrieben (Mackey u.a. 1995).

Druckinaktivierung von Konidiosporen in Apfel- und Brokkolisaft

Sporen der Schimmelpilze *C. herbarum* und *P. expansum* wurden bei drei verschiedenen Temperaturen in Apfel- und Brokkolisaft druckinaktiviert. Die erhaltenen kinetischen Daten wurden mit denen in isotonischer Kochsalzlösung verglichen. Dabei läßt sich feststellen, daß die Kinetik der Inaktivierung im allgemeinen unabhängig von dem Inaktivierungsmedium verläuft. Die einzige Ausnahme ist die Inaktivierung bei 25 °C von *P. expansum* in isotoni-

scher Kochsalzlösung. Hier wurden Dezimale Reduktionszeiten von $D_1 \sim 7$ min und $D_2 \sim 28$ min gefunden, während die Inaktivierung in den Säften $D_1 \sim 3$ min und $D_2 \sim 130$ oder 150 min führte. Konidiosporen von *Aspergillus flavus* zeigten in isotonischer Kochsalzlösung bei 4 °C und 25 °C Behandlungstemperatur die höchste Stabilität (Eicher 2000). Allgemein läßt sich feststellen, daß die Inaktivierungsrate nur geringfügig durch das Medium beeinflußt wird. Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, als die untersuchten Medien hinsichtlich ihrer Komponenten erhebliche Unterschiede aufweisen. So wurde bei Apfelsaft ein pH-Wert von 3,28 und ein Zuckeranteil von 12,4 g pro 100 g Saft gemessen, während bei Brokkolisaft mit einem pH-Wert von 6,59 ein Zuckergehalt von 2,58 g je 100 g Saft ermittelt worden war. Demzufolge sollte die Druckempfindlichkeit der Sporen in Apfelsaft aufgrund des hohen Zuckeranteils am geringsten sein. Da dies offensichtlich nicht der Fall ist, könnte der Grund hierfür der niedrige pH-Wert des Apfelsaftes sein. Eine druckinduzierte pH-Verschiebung könnte den protektiven Effekt des Zuckers kompensieren.

Druckresistente Konidiosporen können selbst bei einer Umgebungstemperatur von 5 °C auskeimen. Nach einer vierwöchigen Lagerung verkeimter Proben von Apfelsaft und Kochsalzlösung konnte eine hohe Vermehrungsrate registriert werden. Dagegen scheinen Proben, die unter Bedingungen behandelt wurden, die zum Abtöten aller vorhandenen Keime führen, eine 16 wöchige Lagerung bei 5 °C unverändert zu überstehen. Die Verkeimung zweier *C. herbarum* Proben während der Lagerung wird auf unzureichende Behandlungsbedingungen zurückgeführt. Analoge Versuche mit Konidiosporen von *Aspergillus flavus* und Ascosporen von *Eurotium repens* zeigten, daß innerhalb der Versuchsphase von 16 Wochen alle druckbehandelten und bei 5 °C eingelagerten Proben steril blieben (Eicher 2000).

6.2 Patulin und hoher hydrostatischer Druck

Die Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf das Mycotoxin Patulin wurden in wäßrigen Lösungen und in Apfelsaft untersucht. Konidiosporen des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* wurden in Apfelsaft Druckbehandlungen unter Variation der Druckhöhe, der Temperatur sowie der Behandlungsdauer unterzogen. Die daraus resultierende veränderte Syntheserate des Patulins wurde zusammen mit dem Gehalt an 5-Hydroxymethylfuraldehyd bestimmt. Ferner wurde die Reaktion von Patulin mit Cystein unter Atmosphären- und unter Hochdruck bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Aktivierungsenergien und die Reaktionsvolumina dieser Umsetzung wurden berechnet.

Die patulinvortäuschende Substanz 5-Hydroxymethylfuraldehyd wird im folgenden kurz beschrieben.

5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF)

5-HMF wird in Säften, Milch, Honig, Karamel, klinischen Infusionen oder auch in Zigarettenrauch gefunden (Surh u.a. 1994). In hitzesterilisierten Fruchtsäften wurden Konzentrationen bis zu 300 mg/l gefunden, Brotkruste kann bis zu 70 g/kg enthalten (Lang u.a. 1970). 5-HMF ist ein Folgeprodukt der Maillard-Reaktion, einer Umsetzung reduzierender Zucker mit Aminen, Aminosäuren oder Proteinen (Ledl 1991). Außerdem entsteht es bei dem Erhitzen von Kohlehydraten, insbesondere in sauren pH-Bereichen (Lang u.a. 1970, Hewala u.a. 1993). Der Geschmacksschwellenwert von 5-HMF liegt bei 2 mg/l (Lang u.a. 1970).

Bei der Lagerung hitzebehandelter Lebensmittel kann es zu einer Akkumulation von 5-HMF kommen. Die entstehende Menge ist dabei abhängig von Faktoren wie Aufbewahrungszeit oder -temperatur und kann als ein Qualitätsmerkmal gelagerter Produkte angesehen werden (Roig u.a. 1992).

In hohen Konzentrationen ist 5-HMF gesundheitsschädlich. Nässberger (1990) berichtet von Beeinträchtigungen des Immunsystems durch 5-HMF. Zhang u.a. (1993) beschreiben, daß 5-HMF bei Ratten in Konzentrationen bis 300 mg/kg das Entstehen von Darmkrebs initiieren und fördern kann. Surh und Mitarbeiter (1994) vermuten, daß 5-HMF durch Sulfotransferasen der Leber zu 5-Sulfooxymethylfuraldehyd metabolisiert werden kann und durch die Magensäure zu 5-Chloromethylfuraldehyd, das als starkes, Leberkrebs erzeugendes Carcinogen beschrieben wird.

Eine neue Methode zur simultanen Bestimmung von Patulin und 5-HMF mittels HPLC

Die Patulinbestimmung erfolgte mittels HPLC. Da in Apfelsaft die patulinvortäuschende Substanz 5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF) vorkommt, mußte ein Verfahren verwendet werden, das eine Trennung von Patulin und 5-HMF ermöglicht.

Es gibt zahlreiche Publikationen, die die Bestimmung von Patulin per HPLC beschreiben. Als stationäre Phase wurden u.a. C18-Säulen mit einer Laufmittelkombination aus Wasser/Acetonitril verwendet, die zu einer Nachweisgrenze von 24 µg/l führten (Zegota u.a. 1988) oder es wurde ein Gradient aus Wasser/Essigsäure/Methanol eingesetzt, der eine Nachweisgrenze von 9 µg/l zur Folge hatte (Bartolomé u.a. 1994). Ferner wurden Partisil-ODS-Säulen mit Wasser und einer Nachweisgrenze von 1 µg/l beschrieben (Stray 1978) sowie Sphrerisorb-ODS-Säulen mit Wasser/THF und einer Nachweisgrenze von 2 µg/l oder Wasser/Aceton mit der Nachweisgrenze 5 µg/l (Rovira u.a. 1993, Mortimer u.a. 1985). Die Bestimmung von 5-HMF mit HPLC erfolgte meist mit C18-Säulen und einem Laufmittel aus Wasser und Acetonitril. Bei diesen Verfahren wurden Nachweisgrenzen von 50 µg/l erreicht (Lee u.a. 1986, Roig u.a. 1992).

Die simultane Detektion beider Substanzen wurde von Gökmen und Acar (1996, 1999) berichtet. Die Autoren verwendeten eine C18-Säule mit Wasser/Acetonitril und erreichten bei Patulin eine Nachweisgrenze von 5 µg/l und 10 µg/l bei 5-HMF. Das beschriebene Verfahren konnte jedoch nicht reproduziert werden, die Nachweisgrenzen lagen bei unseren Versuchen um einen Faktor von 100 zu hoch. Der Grund für das Fehlschlagen der Methode ist nicht bekannt. Eventuell könnten chargenbedingte Abweichungen des Säulenmaterials die Analyse behindern.

Das im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Verfahren zur Bestimmung von Patulin und 5-HMF ermöglicht eine sehr einfache und rasche Bestimmung beider Substanzen in Apfelsaft. Dabei wird C 18 als stationäre Phase eingesetzt mit einem Laufmittel aus Phosphatpuffer/Methanol im Verhältnis 7:3 (v/v) und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min; die Detektion erfolgt bei 275 nm. Nach der Extraktion des Saftes mit Essigsäureethylester ist keine weitere Aufreinigung mehr erforderlich. Die Wiederfindung von Patulin (> 96 %) und 5-HMF (80 %) ist in Apfelsaft mit den Angaben anderer Autoren vergleichbar (Roig u.a. 1992, Gökmen und Acar 1999). Die Nachweisgrenzen liegen für beide Substanzen extrem niedrig. Eine Nachweisgrenze von 2 µg/l für 5-HMF wurde - soweit bekannt - noch nicht beschrieben, die niedrigste lag bisher bei 10 µg/l (Gökmen und Acar 1999). Die hier erreichte Nachweis-

grenze für Patulin mit ebenfalls 2 µg/l wurde nur von Stray (1978) mit einem Wert von 1 µg/l unterschritten, hier allerdings ohne die Möglichkeit zur Trennung von 5-HMF.

Das neue Verfahren kann sehr vielseitig eingesetzt werden, da niedrigste Substanzmengen ebenso gut erfaßt werden können wie sehr hohe Konzentrationen von Patulin und 5-HMF. Diese Methode wurde bei allen folgenden Versuchen zur Bestimmung von Patulin und 5-HMF eingesetzt.

Die Auswirkungen von Hochdruck auf die Synthese von Patulin durch *P. expansum*

Die Hochdrucksterilisation von Lebensmitteln ist eine neue Möglichkeit der Konservierung. Dieses Verfahren kann die sensorischen Eigenschaften des frischen Produktes weitgehend erhalten. Allerdings war es bisher nicht bekannt, inwieweit eine Druckbehandlung die Synthese von Mycotoxinen durch Schimmelpilzsporen beeinflussen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konidiosporen des Pilzes *Penicillium expansum* unterschiedlichen Druck/Temperatur Behandlungen ausgesetzt. Die druckbehandelten Sporen wurden in Apfelsaft bei 5, 24 und 30 °C bebrütet und auf den Patulingehalt untersucht. Bei 5 °C Umgebungstemperatur wurde nur in wenigen Proben Patulin nachgewiesen, bei 30 °C konnte kein Patulin gefunden werden. Bei 24 °C Umgebungstemperatur wurde festgestellt, daß die Patulinproduktion abhängig von der Ausgangskeimzahl des Saftes ist. Eine geringere Verkeimung des Apfelsaftes hat eine Steigerung der Syntheserate zur Folge (Abbildung 5.40). Subletale Druckbehandlungen bei 25 °C erhöhen die Patulinsynthese, letale führen dagegen zu einer Verringerung (Abbildung 5.41). Bei 40 °C behandelte Sporen der druckresistenten Fraktion setzen eine stark erhöhte Menge Patulin frei, dagegen führen kürzere Behandlungszeiten nach einer Steigerung der Patulinproduktion zu einem raschen Abbau des Patulins (Abbildung 5.42). Das Ergebnis einer Druckbehandlung bei 4 °C ist vergleichbar mit dem bei 40 °C (Abbildung 5.43). In frischem Apfelsaft wird Patulin auch in Abwesenheit des Pilzes abgebaut. Der durchschnittliche Wert liegt pro Tag bei 0,5 mg/l.

Die Syntheserate von Mycotoxinen ist von äußerlichen Faktoren wie Temperatur, Medienzusammensetzung oder Wassergehalt des Substrates abhängig. Eine Veränderung der äußeren Bedingungen kann die Synthese von Patulin fördern oder hemmen. Die Patulinproduktion steht allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Wachstumsrate des Pilzes. Faktoren, die das Wachstum anregen können, müssen nicht zwangsläufig eine höhere Patulinsynthese bewirken, eine Hemmung der Patulinproduktion ist ebenso möglich (Podgórska 1992, Florianowicz 1998).

Die Umgebungstemperatur beeinflusst maßgeblich die Patulinproduktion eines Pilzes. Dabei kann der optimale Temperaturbereich bei verschiedenen Pilzstämmen einer Gattung sehr unterschiedlich sein. Frank u.a. konnten 1976 bei Kernobst eine Patulinproduktion durch *P. expansum* noch bei 1 °C messen. Bei weiteren Untersuchungen mit anderen Stämmen wurde die Patulinproduktion auf Obst und Gemüse in einem Temperaturbereich von 15 bis 37 °C beschrieben (Frank u.a. 1977). Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß der verwendete *P. expansum* Stamm bis 4 °C Patulin produzieren kann, eventuell auch bei tieferen Temperaturen. Die maximale Temperatur für die Patulinsynthese liegt unter 30 °C.

Die Zusammensetzung des Mediums ist ein weiterer wichtiger Faktor der Patulinsynthese. Wird Fructose als C-Quelle verwendet, führt dies zu einer Steigerung der Syntheserate im Vergleich zu anderen Kohlehydraten (Podgórska 1992a). Eine Untersuchung von Glucose- und Fructosehaltigen Nährmedien zeigte, daß das Pilzwachstum in beiden Fällen gleich ist, die Patulinmenge allerdings 2-3 mal höhere Werte in Anwesenheit von Fructose erreicht (Podgórska 1992b). Ferner üben der pH-Wert des Mediums und der Wassergehalt einen Einfluß auf die Syntheserate aus. Patulin ist im neutralen und alkalischen Bereich instabil, die biologische Aktivität liegt im pH-Bereich von 3-6,3 (Chain u.a. 1942, Engel u.a. 1975). Die maximale Syntheserate durch *P. expansum* wird bei pH 6 erzielt (Podgórska 1992a). Die Synthese von Mycotoxinen erfordert meist einen höheren Wassergehalt als das Pilzwachstum (Northolt und Bullerman 1982). Während *P. expansum* bei 20 °C noch bei einem a_w -Wert von 0,84 wachsen kann, benötigt dieser zur Patulinsynthese einen minimalen a_w von 0,95 (Reiß 1986).

Die Patulinsynthese kann auch durch die Anwesenheit von Konservierungsmitteln beeinflusst werden. Geringe Mengen Benzoe-, Sorbin- oder Ameisensäure stimulieren die Patulinproduktion, da vermutlich die Aktivität einiger Enzyme verringert wird, Acetyl-CoA akkumuliert und zu Patulin umgesetzt wird (Podgórska 1992b). Wurde Schwefeldioxid zur Konservierung eingesetzt, konnte keine Steigerung der Patulinfreisetzung beobachtet werden.

Die Bestrahlung von Schimmelpilzen kann die Mycotoxinsynthese fördern. Reiß berichtet (1986), daß Gammastrahlen (1,5 kGy) die Patulinproduktion durch *P. expansum* um 25 % erhöhen. Patulin selbst scheint allerdings in Apfelsaftkonzentrat durch ionisierende Strahlen bis 2,5 kGy linear (Zegota u.a. 1988a), durch γ -Strahlen exponential abgebaut zu werden (Zegota u.a. 1988b).

Viele Faktoren beeinflussen die Mycotoxinproduktion. Demzufolge ist das Ergebnis nicht überraschend, daß Hochdruckbehandlungen ebenfalls große Auswirkungen auf die Synthese-

rate von Patulin haben. Aber nicht nur Druckbehandlung und Temperatur erzielen veränderte Syntheseraten, auch die Verkeimungsintensität des Saftes hat einen Einfluß auf die Menge des freigesetzten Patulins. Es konnte festgestellt werden, daß die Patulinproduktion stimuliert wird, wenn die Ausgangskeimzahl des Saftes von 10^6 auf 10^3 Keime/(ml Saft) reduziert wird. Während bei 10^6 Keimen/ml die Maximalmenge an Patulin von 80,3 mg/l nach 17 Tagen gemessen werden konnte, wurde diese bei 10^3 Keimen/ml erst nach 25 Tagen mit einem Wert von 93,4 mg/l erreicht.

Die genaue Ursache für die Abhängigkeit der Patulinproduktion von der Keimzahl ist unklar. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, daß der Pilz aufgrund der hohen Sporenkonzentration sich selbst als "Konkurrent" betrachtet. Denn es ist bekannt, daß die Toxinproduktion durch die Anwesenheit anderer Schimmelpilze reduziert wird. So ist beispielsweise die Syntheserate von Aflatoxin durch *Aspergillus flavus* in einer Mischkultur mit *A. niger* wesentlich geringer als in einer Monokultur (Northolt und Bullerman 1982). Patulin hemmt ferner die Auskeimung von Pilzen, wobei es in seiner Wirkung sehr unspezifisch ist. In höheren Konzentrationen wird sogar die Keimung von *P. expansum* blockiert (Reiß 1973). Demzufolge könnten aufgrund der hohen Keimzahl bereits ausgekeimte Sporen durch die Toxinproduktion die Auskeimung anderer behindern und so die letztlich geringere Syntheserate verursachen. Eine weitere mögliche Ursache könnte die Akkumulation von toxischen Sekundärmetaboliten des Pilzes wie z.B. Dihydroxybenzoesäurederivaten sein (Frisvad und Filtenborg 1989), die ab einer bestimmten Konzentration das Wachstum des Pilzes oder die Patulinsynthese hemmen könnten. Bei einer höheren Ausgangskeimzahl wäre diese Situation folglich früher erreicht als bei geringeren Verkeimungen.

Die Druckbehandlung von *P. expansum* Konidiosporen führt zu einer verzögerten Patulinsynthese. Während bei 24 °C Umgebungstemperatur unbehandelte Sporen nach 6-7 Tagen Wachstum in Apfelsaft über 50 mg/l Patulin freisetzen, sind es bei druckbehandelten Sporen 0-12 mg/l, nach einer Druckbehandlung bei 4 °C wird mit 33 mg/l der Maximalwert gemessen. Demzufolge läßt sich annehmen, daß Sporen, die eine Hochdruckbehandlung überstehen, durch Druck subletal geschädigt werden, was einen verlangsamten Zellstoffwechsel zur Folge hat. Dieses bedingt eine verzögerte Auskeimung, Sporenbildung und Toxinproduktion. Ferner könnte aufgrund einer Druckbehandlung Acetyl-CoA vermehrt für die Fettsäuresynthese eingesetzt werden, so daß die Patulinproduktion erst verzögert einsetzen kann.

Wird die Hochdruckbehandlung bei 25 °C unter Bedingungen durchgeführt, die keine Inaktivierung der Sporen bewirken, scheint die Patulinproduktion nur geringfügig beeinflusst zu

werden. Die Synthese setzt verzögert ein und bei längeren Inkubationszeiten (> 40 Tage) kann ein höherer Patulingehalt im Vergleich zu Sporen ohne Druckbehandlung festgestellt werden. Eine subletale Druckbehandlung scheint demzufolge weniger einen Einfluß auf die Syntheserate des Patulin auszuüben, als vielmehr auf die Abbaugeschwindigkeit des Patulins.

Druckinaktivierungen der Sporen bei 4 und 40 °C stimulieren die Patulinproduktion. Hier werden Maximalwerte von über 110 mg/l erreicht, wogegen ohne Druck bei einer Ausgangskeimzahl von 10^3 Keimen/ml 81 mg/l Patulin nicht überschritten werden. Inaktivierungen bei 25 °C führen zu keiner erhöhten Patulinproduktion. Sporen der druckresistenten Fraktion (Druckbehandlung bei 40 °C, 350 MPa, 30 min) produzieren ebenfalls sehr hohe Mengen Patulin. Der Höchstwert von 120,6 mg/l wird hier allerdings erst nach 32 Tagen erreicht. Die Reduktionsrate ist sehr langsam, nach 45 Tagen können noch 77 mg/l gemessen werden, nach 70 Tagen 23 mg/l. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Patulinproduktion von Sporen, die ebenfalls bei 40 °C druckbehandelt worden waren mit einer resultierenden Keimzahl von 10^3 Keimen/ml, so läßt sich feststellen, daß die Menge an freigesetztem Patulin gleich ist. Aufgrund der sehr geringen Verkeimung des Saftes von 7 Keimen/ml wird der Maximalwert bei Sporen der stabilen Fraktion später erreicht. Die Abbaugeschwindigkeit des Patulins ist jedoch sehr verschieden. Eventuell werden durch die geringere Verkeimung der druckresistenten Fraktion weniger Stoffwechselprodukte in das umgebende Medium abgegeben, so daß die Patulinreduktion langsamer verläuft.

Untersuchungen über die Stabilität von Patulin in frischem Apfelsaft ergaben (Abbildung 5.46), daß Patulin linear abgebaut wird. Dabei erfolgt jeden Tag eine Abnahme von etwa 0,5 mg/l. Im Gegensatz dazu scheint Patulin in kommerziellem Apfelsaft stabil zu sein (Pohland und Allen 1970). Scott und Somers (1968) führen diese Stabilität auf die Abwesenheit von Sulfhydryl-Gruppen zurück, mit denen Patulin reagieren kann. Die Reduktion des Patulins in frischem Apfelsaft muß nicht zwangsläufig eine tatsächliche Zerstörung des Moleküls bedeuten. Es besteht die Möglichkeit, daß Mycotoxine durch Konjugation mit Zuckermolekülen der Detektion entgehen, ohne ihre physiologische Wirkung einzubüßen (Karlovsky 1999).

Der Abbau des Patulins erfolgt allerdings nicht nur durch den Saft. Die unterschiedlichen Reduktionsgeschwindigkeiten sind abhängig von der Vorbehandlung der Sporen. Demnach muß der Pilzstamm direkt in den Inaktivierungsprozess des Patulins involviert sein. Diese These wird auch von Engel und Mitarbeitern (1975) vertreten.

Auswirkungen von Hochdruck auf die Adduktbildung von Patulin mit Cystein

Der Patulingehalt in Lebensmitteln kann auf unterschiedliche Arten reduziert werden. So können Konservierungsstoffe Patulin abbauen, wobei Schwefeldioxid als besonders effektiv beschrieben wird (Pohland und Allen 1970, Podgórska 1992b). Patulin kann durch Bestrahlung inaktiviert werden, allerdings ist dieses Verfahren bei Lebensmittel nicht zugelassen (Zegota 1988a,b). Das Filtern durch Aktivkohle kann den Patulingehalt in Apfelprodukten deutlich herabsetzen (Sands u.a. 1976, Huebner u.a. 2000), ebenso scheint Patulin durch hohe Konzentrationen Ascorbinsäure abgebaut zu werden, der Mechanismus ist hierbei nicht bekannt (Brackett und Marth 1979).

Patulin ist stabil in Apfel- und Traubensaft, in Orangensaft oder Fleischprodukten wird es abgebaut. Die Reduzierung des Patulingehaltes erfolgt durch Reaktionen mit Sulfhydrylhaltigen Verbindungen (Scott und Somers 1968, Alperden u.a. 1973). Die Reaktion von Patulin mit SH-haltigen Substanzen wie Cystein oder Glutathion kann zu verschiedenen Reaktionsprodukten führen. Ciegler u.a. (1976) konnten bei der Umsetzung von Patulin mit Cystein in wäßriger Lösung mindestens 6 verschiedene Reaktionsprodukte detektieren, Lindroth und Wright (1978) gehen von mindestens 7 verschiedenen Addukten aus. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von dem pH-Wert des Mediums und verläuft im sauren Bereich langsamer als im neutralen (Lieu und Bullerman 1978). Aber nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch der Reaktionsmechanismus der Adduktbildung scheinen durch den pH-Wert beeinflußt zu werden (Hofmann u.a. 1971). Ciegler und Mitarbeiter (1976) äußern die Vermutung, daß während der Adduktbildung ein Molekül Patulin mit mehr als einem Molekül Cystein reagiert. Krivobok u.a. (1994) gehen davon aus, daß die Reaktion hauptsächlich folgende Produkte liefert: Reaktion an Position 4 unter Wasserabspaltung und eine Addition an Position 7 (1,4-Addition von R-SH; R-S an C7, H an C3).

Die Umsetzung von Patulin mit Cystein vermindert drastisch die Toxizität patulinhaltiger Produkte. Die entstehenden Addukte sind praktisch ungiftig (Hofman u.a. 1971), die relative Toxizität wird im Vergleich zu Patulin mit 1/500 angegeben (Lindroth und Wright 1990), allerdings konnte eine leicht teratogene Wirkung gegenüber Hühnerembryonen beobachtet werden (Ciegler u.a. 1976). Patulin-Cystein-Addukte sind stabil, es gilt als äußerst unwahrscheinlich, daß diese im Säugetierorganismus zu freiem Patulin metabolisiert werden können (Lindroth und Wright 1978, 1990).

Die Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf die Adduktbildung von Patulin mit Cystein wurden in wäßriger Lösung untersucht. Aus den kinetischen Daten wurden die Aktivierungsenergien und die Aktivierungsvolumina berechnet. Die Adduktbildung wird

durch Druck gefördert. Die Aktivierungsenergie sinkt von 49,5 kJ/mol bei Atmosphärendruck auf 40,3 kJ/mol bei 500 MPa. Das Aktivierungsvolumen der Umsetzung ist negativ, der absolute Wert ist nicht nur abhängig von der Temperatur, sondern ebenso von der Druckhöhe. Die berechneten Werte werden im folgenden gezeigt (analog Tabelle 5.5):

Temperatur	4 °C	25 °C	40 °C
Reaktionsvolumen [cm ³ /mol]	-10,3 ± 5,0 (400-500 MPa)	-5,6 ± 1,8 (300-500 MPa)	-6,3 ± 0,6 (200-500 MPa)
	< -14,3 ± 1,0 (< 400 MPa)	< -15,0 ± 1,3 (< 300 MPa)	< -21,6 ± 2,9 (< 200 MPa)

Die Aktivierungsvolumina sind unter Hochdruck kleiner als bei Atmosphärendruck. Bei 40 °C wurde im Druckbereich von 200-500 MPa ein Wert von -6,3 cm³/mol berechnet, bei Drücken unter 200 MPa -21,6 cm³/mol. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Adduktbildung und die Produktzusammensetzung vom Umgebungsdruck abhängig sind. Die berechneten Aktivierungsvolumina sind Mittelwerte, die sich aus den Komponenten der einzelnen Reaktionen zusammensetzen. Unter Hochdruck werden vermutlich andere Addukte bevorzugt gebildet als unter Normaldruck, zumindest scheint sich hier das Verhältnis der einzelnen Komponenten zu verschieben. Eventuell werden unter Druck bevorzugt Produkte gebildet, die aus einem Molekül Patulin und zwei oder mehreren Molekülen Cystein bestehen.

Patulinhaltige Lebensmittel können durch die Zugabe von Cystein entgiftet werden. Diese Reaktion läßt sich durch Druck beschleunigen. Dennoch muß darauf geachtet werden, daß derartige Entgiftungsmaßnahmen bei der Lebensmittelherstellung und -konservierung die Ausnahme bleiben, denn als oberste Prämisse sollte die Vermeidung von Kontaminationen der Lebensmittel bei der Produktion angesehen werden.

7 AUSBLICK

Es wurden zahlreiche kinetische Daten von Konidiosporen erfaßt, die deren Verhalten unter hohem hydrostatischem Druck in wäßrigen Lösungen umfassend beschreiben. Dabei wurde festgestellt, daß bei Inaktivierungen bei höheren Temperaturen Druckresistenz auftreten kann. Druckbehandlungen von Ascosporen des Pilzes *Eurotium repens* führten zu Druckresistenz bei niedrigen Temperaturen (Eicher 2000). Da das Auftreten von Druckresistenz von entscheidender Bedeutung für die Hochdrucksterilisation ist, wären weitere Untersuchungen mit Ascosporen sinnvoll, um eine mögliche Systematik bei dem Auftreten von Druckresistenz erkennen zu können.

Auch ist die Ursache für das Auftreten von Druckresistenz noch nicht bekannt. Vermutungen, daß die Zusammensetzung der Fettsäuren innerhalb der Phospholipiddoppelschicht das Auftreten von Druckresistenz bedingt, sollten bestätigt oder widerlegt werden.

Hochdruckinaktivierungen von Konidiosporen in Fruchtsäften verliefen im Rahmen dieser Arbeit vergleichbar mit denen in Modellösungen. Weitere Untersuchungen sowohl in anderen Lebensmitteln als auch mit anderen Sporenarten erscheinen sinnvoll, um den Einfluß des Mediums auf die Hochdruckbehandlung ausreichend erfassen zu können. Hierbei sollte besonders auf die Auswirkungen von Zuckergehalt und pH-Wert des Mediums geachtet werden.

Die Synthese von Mycotoxinen kann durch äußere Faktoren sehr stark beeinflußt werden. Es konnte gezeigt werden, daß Hochdruckbehandlungen die Syntheserate von Patulin durch *Penicillium expansum* fördern oder hemmen können. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erscheinen sehr sinnvoll. So sollte geklärt werden, inwieweit die erhaltenen Ergebnisse auf andere Pilzarten und deren Toxine übertragbar sind. Untersuchungen mit Aflatoxin-, Citrinin-, Ochratoxin- oder Zearalenon-bildenden Pilzarten wären geeignet, da diese in zahlreichen Lebensmitteln zu finden sind.

8 ANHANG

8.1 Ergänzungen zum Ergebnisteil

Im folgenden sind Chromatogramme (HPLC) von Patulin und 5-HMF dargestellt.

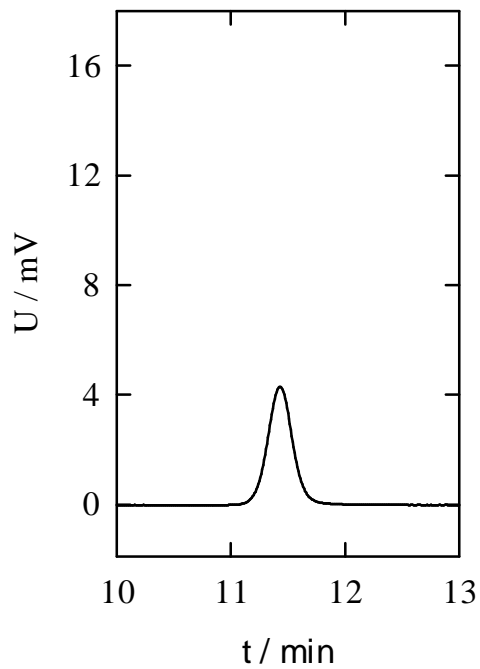


Abb. 8.1: C18-Säule (Aqua)
*LM: H₂O : MeOH, 9:1
FG: 0,1 ml/min; c_{Patulin} = 2 mg/l

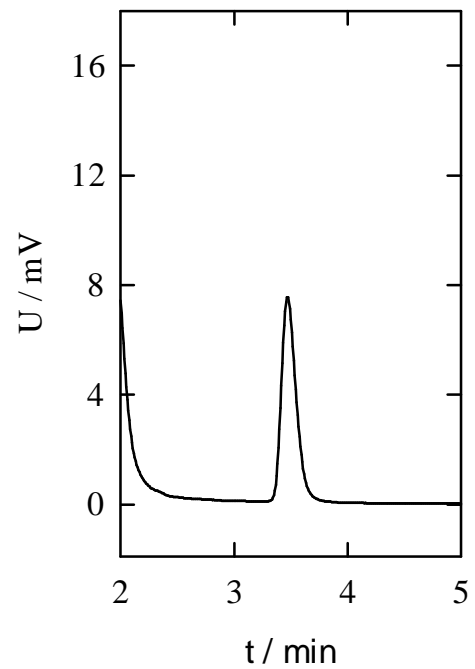


Abb. 8.2: C18-Säule (Aqua)
LM: H₂O : MeOH, 7:3
FG: 1 ml/min; c_{Patulin} = 2 mg/l

* LM = Laufmittel; FG = Fließgeschwindigkeit

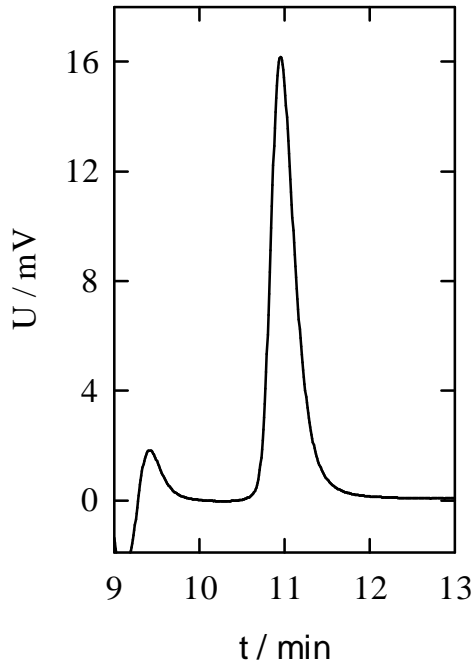


Abb. 8.3: C18-Säule (Aqua)
 LM: H₂O : MeOH 6:4,
 FG: 0,2 ml/min; c_{Patulin} = 2 mg/l

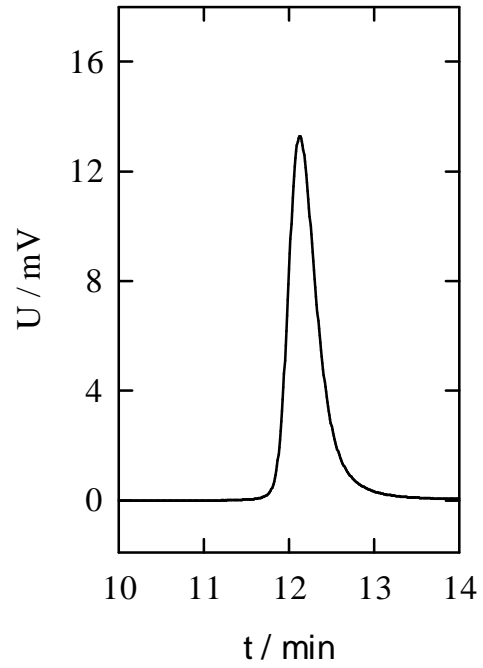


Abb. 8.4: C18-Säule (Aqua)
 LM: H₂O : MeOH 1:1,
 FG: 0,2 ml/min; c_{Patulin} = 2 mg/l

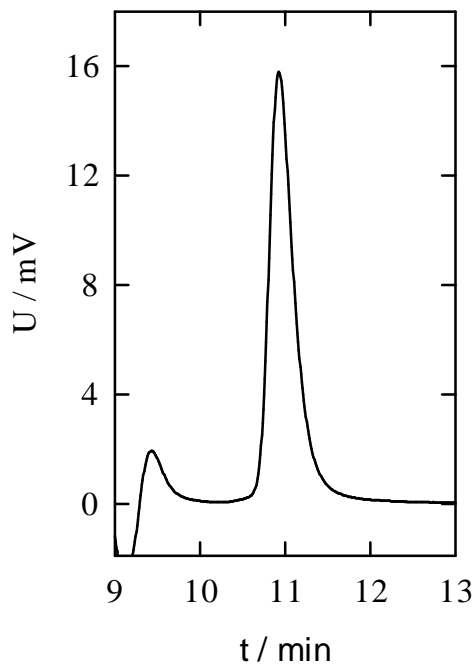


Abb. 8.5: C18-Säule (Aqua)
 LM: H₂O : MeOH, 4:6
 FG: 0,2 ml/min; c_{Patulin} = 2 mg/l

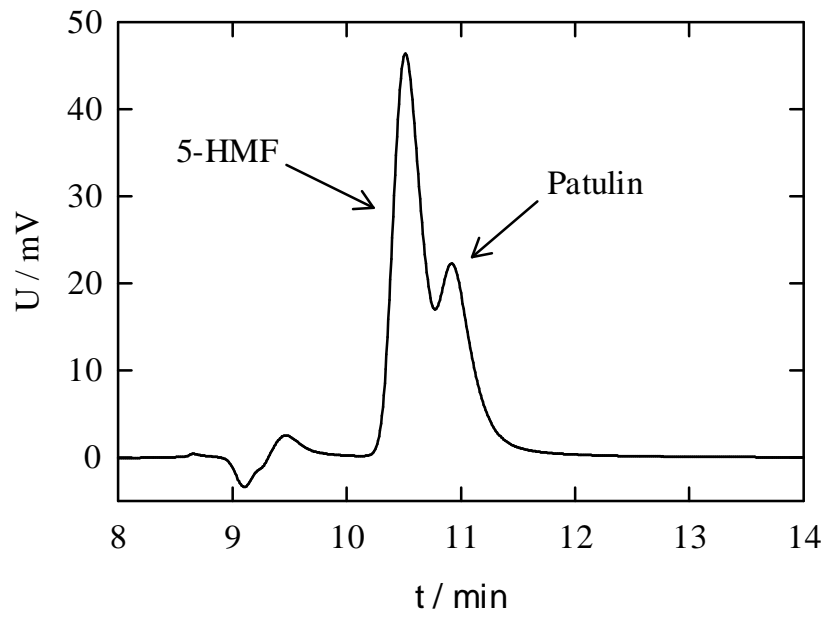


Abb. 8.6

C18-Säule (Aqua);
 LM: H₂O : MeOH 6:4, FG: 0,2 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

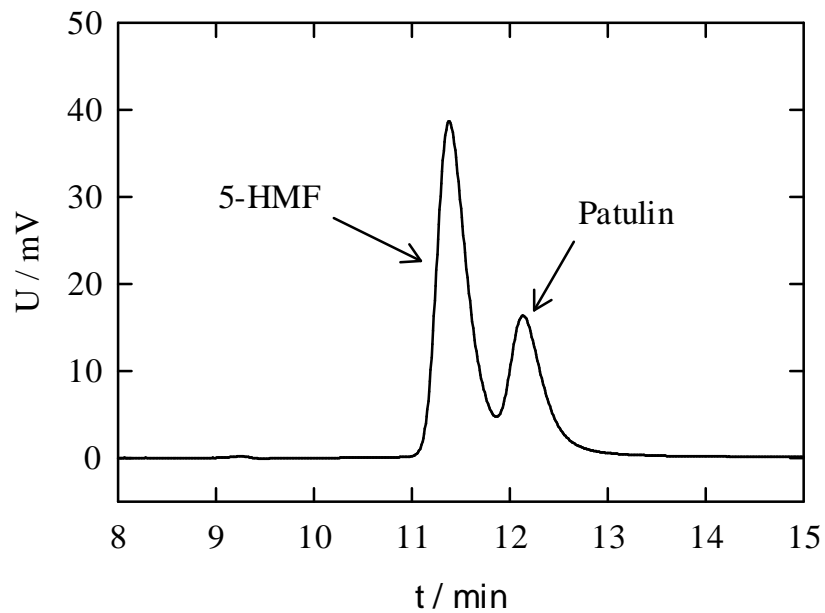


Abb. 8.7

C18-Säule (Aqua);
 LM: H₂O : MeOH 1:1, FG: 0,2 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

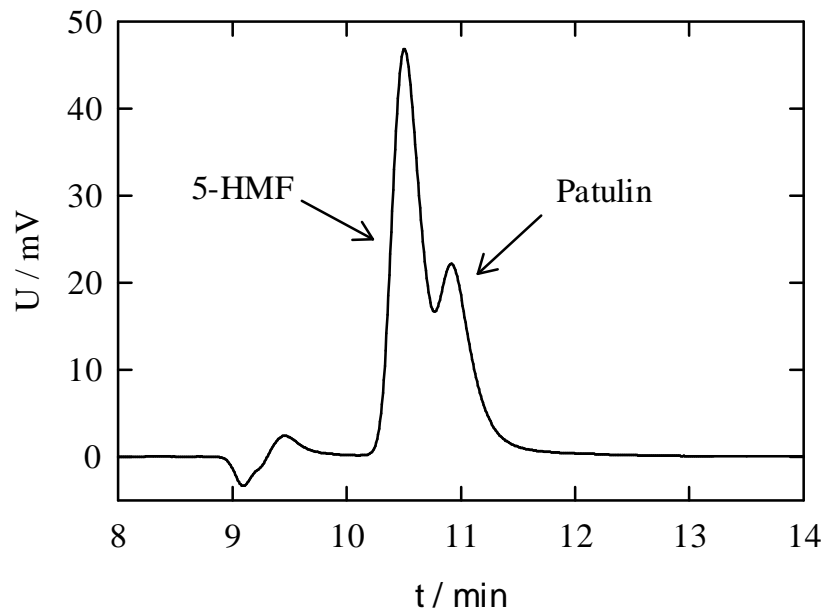


Abb. 8.8 C18-Säule (Aqua);
 LM: H₂O : MeOH 4:6, FG: 0,2 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

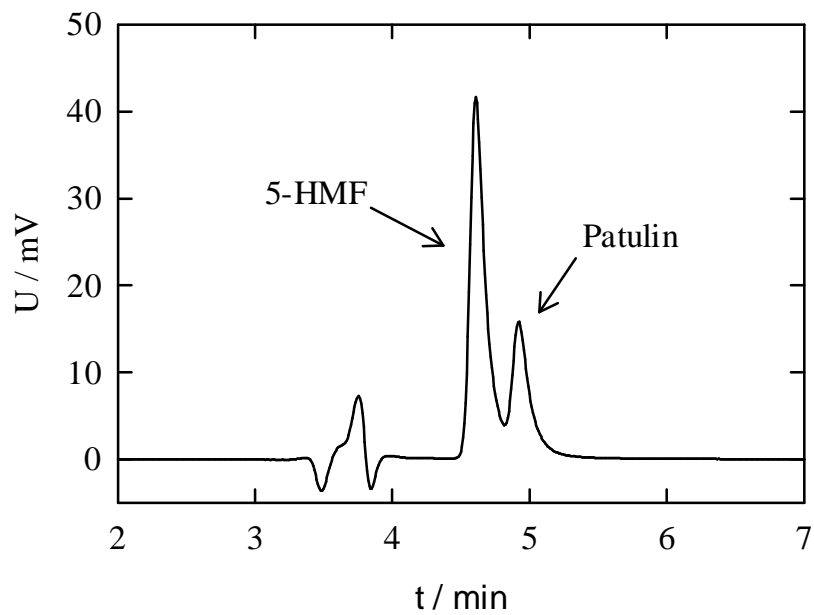


Abb. 8.9 C18-Säule (Aqua);
 LM: Phosphatpuffer : MeOH 1:1, pH < 4, FG: 0,5 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

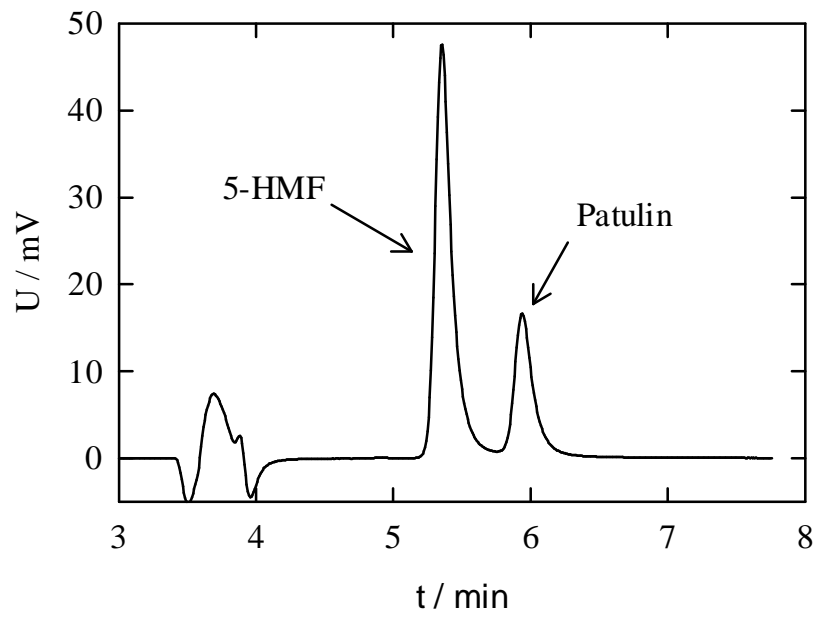


Abb. 8.10

C18-Säule (Aqua);
 LM: Phosphatpuffer : MeOH 6:4, pH < 4, FG: 0,5 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

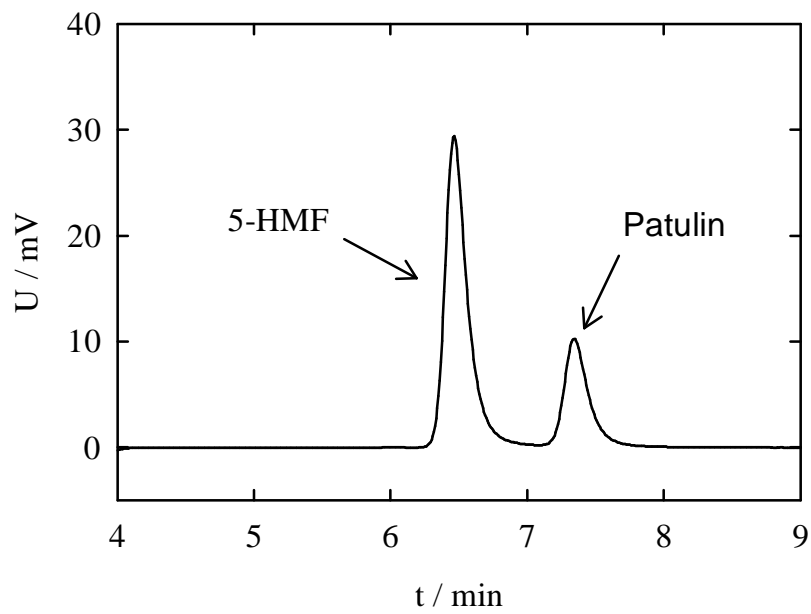


Abb. 8.11

C18-Säule (Aqua);
 LM: Phosphatpuffer : MeOH 7:3, pH < 4, FG: 0,5 ml/min;
 $c_{\text{Patulin}} = 2 \text{ mg/l}$, $c_{5\text{-HMF}} = 4 \text{ mg/l}$

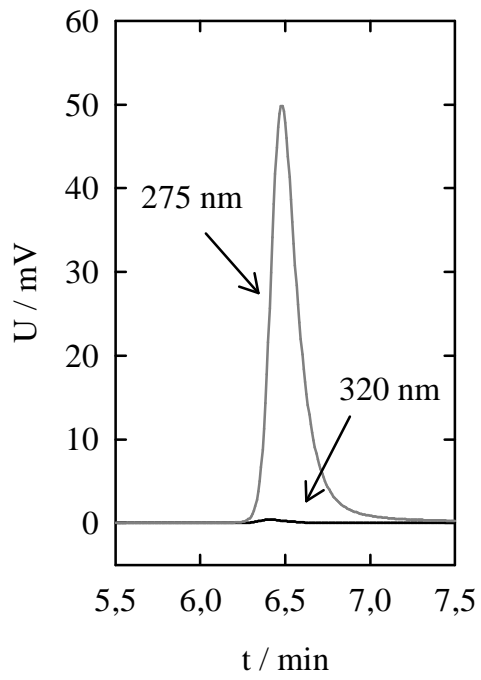


Abb. 8.12: 5-HMF, gelöst im LM,
 $\lambda = 275 \text{ nm}$ und 320 nm

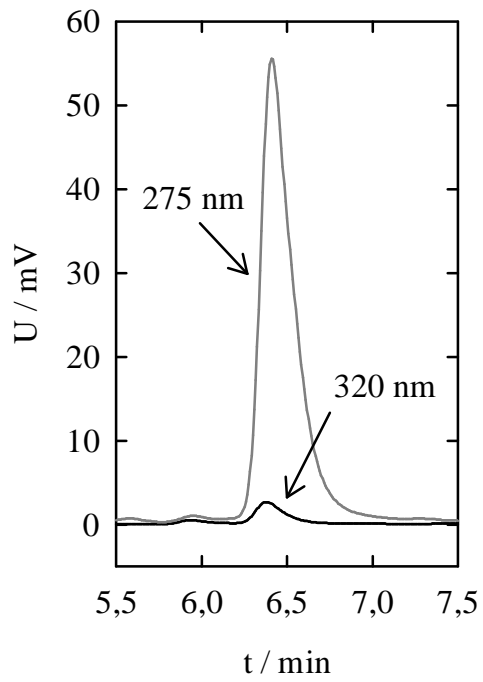


Abb. 8.13: 5-HMF in Apfelsaft,
 $\lambda = 275 \text{ nm}$ und 320 nm

8.2 Meßwerte

Die folgenden Tabellen enthalten die Meßwerte zu den unter Kapitel 5 dargestellten Diagrammen. Die Tabellen haben die gleiche Numerierung wie die dazugehörenden Diagramme. Die erstgenannten Werte werden in den Abbildungen (Kap.5) gezeigt, alle anderen sind Ergebnisse weiterer Versuche. Einige Abbildungen in Kapitel 5 sind Chromatogramme, daher treten Numerierungslücken auf.

Meßwerte zu 5.2

Barotoleranz von *C. herbarum* bei 4 °C und 30 min in isotonischer NaCl-Lsg.

p / MPa	lg cfu	p / MPa	lg cfu
0,1	8,43	0,1	8,15
50	8,48	50	8,28
100	8,45	100	8,28
150	6,92	150	7,18
200	2,82	200	3,00
250	0,52	250	u.d.N.
300	0,52	300	0,52
350	u.d.N. [#]	350	u.d.N.
400	u.d.N.	400	u.d.N.

Barotoleranz von *C. herbarum* bei 25 °C

p / MPa	lg cfu	p / MPa	lg cfu
0,1	8,30	0,1	8,11
100	8,11	200	3,22
150	7,00	250	2,65
200	2,68	300	2,73
250	2,35	350	u.d.N.
300	2,15	400	u.d.N.
350	0,82		
400	u.d.N.		

[#] u.d.N. = unter der Nachweisgrenze

Barotoleranz von *C. herbarum* bei 40 °C

p / MPa	lg cfu	lg cfu	lg cfu
0,1	8,01	7,97	8,11
50	7,41	-	-
100	5,28	4,72	-
150	2,96	1,82	4,5
200	1,82	2,54	1,82
250	1,94	2,53	1,80
300	1,67	0,82	0,52
350	1,00	0,52	u.d.N.
400	1,12	1,12	1,95
450	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.

Meßwerte zu 5.3

Kinetik von *C. herbarum* bei 4 °C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	lg cfu	lg cfu
0	8,36	8,12	7,97
10	-	-	3,25
15	4,97	4,86	-
20	-	-	2,95
30	2,99	2,84	2,87
45	2,56	1,65	-
60	2,29	2,72	1,90
90	1,94	1,48	-
120	2,20	1,52	1,52
150	1,98	1,11	-
180	u.d.N.	u.d.N.	1,12
210	u.d.N.		u.d.N.
300	u.d.N.		0,52
360	u.d.N.		
Kontrolle	8,49	7,90	8,06

Kinetik von *C. herbarum* bei 25 °C

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,15	0	8,20
15	4,61	10	5,51
30	3,11	20	3,61
45	2,22	30	3,75
60	2,45	45	2,80
90	2,52	60	3,01
120	2,22	90	1,70
150	1,78	120	2,59
180	2,73		
270	2,96		
360	2,28		
Kontrolle	8,00	Kontrolle	7,90

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,36	0	8,15
15	2,24	15	1,93
30	2,06	30	1,48
45	1,98	45	1,65
60	2,44	60	1,11
90	1,97	90	0,88
120	2,34	120	0,88
150	2,61	150	1,69
180	1,54	180	1,40
300	1,31		
390	1,09		
Kontrolle	4,29	Kontrolle	7,37

Meßwerte zu 5.4

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 0,1 oder 200 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / h	lg cfu (0,1 MPa)	t / h	lg cfu (200 MPa)
0	8,15	0,0	8,36
1,5	6,73	1,0	2,44
3,0	5,30	2,0	2,340
4,5	4,67	3,00	1,54
6,0	4,08	5,0	1,31
21,0	2,74	6,5	1,09
27,0	2,21	17,5	u.d.N.
48,0	u.d.N.	24,0	u.d.N.
		48,0	u.d.N.

Meßwerte zu 5.5

Kinetik von *C. herbarum* bei 25°C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lsg. mit Sporen unterschiedlichen Alters

t / min	lg cfu (1 Woche)	lg cfu (10 Wochen)
0	8,23	8,15
15	3,20	4,61
30	2,54	3,11
45	3,04	2,22
60	2,38	2,45
90	2,29	2,52
120	2,67	2,22
150	2,78	1,78
180	2,59	2,73

Meßwerte zu 5.6

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lsg. mit unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen

t / min	lg cfu	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,36	4,73	0	6,41
15	2,24	-	20	1,89
30	2,06	0,40	30	1,99
45	1,98	-	45	1,30
60	2,44	1,10	60	1,10
90	1,97	u.d.N.	90	1,10
120	2,34	u.d.N.	120	0,40
150	2,61	0,40	150	0,40
180	1,54	u.d.N.	180	1,00

Meßwerte zu 5.7

Kinetik von *C. herbarum* bei 4 °C und 300 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,97	0	7,99
5	u.d.N.	5	u.d.N.
10	u.d.N.	12	u.d.N.
20	u.d.N.	15	u.d.N.
30	u.d.N.	30	0,52
60	0,52	60	u.d.N.
120	u.d.N.	120	u.d.N.
180	u.d.N.	180	u.d.N.
240	u.d.N.	240	u.d.N.
Kontrolle	7,94	Kontrolle	7,95

Kinetik von *C. herbarum* bei 4 °C und 400 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,83	0	8,08
5	u.d.N.	2,5	u.d.N.
10	u.d.N.	5	u.d.N.
15	u.d.N.	15	0,52
30	u.d.N.	30	0,52
60	u.d.N.	60	u.d.N.
120	u.d.N.	120	u.d.N.
180	u.d.N.	180	u.d.N.
240	u.d.N.		
Kontrolle	7,92	Kontrolle	8,15

Meßwerte zu 5.8

Kinetik von *C. herbarum* bei 25 °C und 300 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,08	0	7,99
2,5	2,15	5	3,18
5	2,59	10	1,70
10	2,59	15	1,74
20	2,26	30	1,97
30	2,31	60	1,60
60	2,35	120	0,52
120	1,64	180	u.d.N.
180	1,70	240	0,82
240	0,52		
Kontrolle	8,11	Kontrolle	8,08

Kinetik von *C. herbarum* bei 25 °C und 400 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,83	0	8,08
5	1,37	5	1,75
10	0,52	15	u.d.N.
30	u.d.N.	30	1,22
60	0,52	60	u.d.N.
120	u.d.N.	120	0,52
180	0,52	180	u.d.N.
240	u.d.N.		
Kontrolle	7,52	Kontrolle	8,04

Meßwerte zu 5.9

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 250 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,11	0	7,86
15	2,07	15	2,17
30	2,17	30	2,10
45	1,82	60	0,40
60	1,92	90	2,04
120	2,44	120	1,18
180	1,60	150	1,93
240	1,78		
Kontrolle	5,08	Kontrolle	6,04

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 300 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,04	0	8,08
11	2,34	15	1,99
30	2,60	30	2,49
60	2,56	60	2,40
90	2,18	90	2,25
120	2,05	120	0,52
150	1,75	180	2,47
180	1,60	240	1,12
		300	1,56
Kontrolle	6,15	Kontrolle	5,11

Meßwerte zu 5.10

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 350 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,08	0	8,04
20	2,22	15	2,29
40	2,29	30	1,82
60	2,78	60	2,22
90	2,16	90	1,56
120	u.d.N.	120	1,12
180	1,73	150	0,52
240	1,00	180	u.d.N.
300	1,12		
Kontrolle	5,11	Kontrolle	6,04

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 400 MPa in isotonischer NaCl-Lsg.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,76	0	8,04
20	1,75	30	1,75
40	1,30	60	1,75
60	u.d.N.	120	u.d.N.
90	0,52	150	u.d.N.
140	u.d.N.	180	u.d.N.
180	u.d.N.		
240	u.d.N.		
300	u.d.N.		
Kontrolle	4,48	Kontrolle	6,18

Meßwerte zu 5.11

Inaktivierung von *C. herbarum* bei 25°C, 200 MPa und 30 min in Saccharoselösungen

C _{Saccharose} / %	lg cfu	lg cfu
0	2,82	1,90
10	3,61	3,18
20	4,60	3,90
30	6,66	7,11
40	7,43	7,87
50	7,41	7,74
60	7,80	7,54
Ausgangskeimzahl	8,08	7,95

Meßwerte zu 5.12

Inaktivierung von *C. herbarum* bei 25°C, 200 MPa in 15 min in Abhängigkeit vom pH-Wert.

pH-Wert	lg cfu	lg cfu
1,2	1,12	2,41
2,0	1,85	2,30
3,0	2,28	3,23
3,4	3,85	3,52
5,1	3,75	4,02
6,0	3,76	3,72
7,0	3,32	3,52
8,0	3,18	3,61
9,0	3,26	2,90
9,9	4,17	3,4
11,0	3,82	-
11,9	2,82	3,18
12,5	u.d.N.	u.d.N.
Ausgangskeimzahl	7,92	7,76

Meßwerte zu 5.13

Barotoleranz von *A. fumigatus* bei 25 °C und 30 min in isotonomer NaCl-Lsg.

p / MPa	lg cfu	p / MPa	lg cfu
0,1	8,76	0,1	9,04
100	8,77	50	8,95
200	8,61	100	9,00
300	8,11	150	8,98
350	7,58	200	~ 9
400	4,38	250	~ 9
450	u.d.N.	300	~ 7
		350	~ 5
		400	3,65

Meßwerte zu 5.14

Kinetik von *A. fumigatus* bei 4 °C und 400 MPa in isotonomer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,30	0	8,76
5	4,49	10	u.d.N.
10	2,34	20	1,18
15	1,70	30	u.d.N.
20	0,78	45	1,00
30	u.d.N.	60	u.d.N.
45	u.d.N.	90	1,60
60	u.d.N.	120	u.d.N.
90	u.d.N.	150	u.d.N.
120	0,60		
150	u.d.N.		
180	0,30		
Kontrolle	8,49	Kontrolle	8,67

Kinetik von *A. fumigatus* bei 25 °C und 400 MPa in isotonomer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,30	0	8,76
10	5,23	10	6,04
20	4,30	20	4,48
30	3,30	30	4,41
40	1,30	60	3,18
50	1,86	90	u.d.N.
60	0,88	120	u.d.N.
90	1,54	150	u.d.N.
120	0,88		
150	0,70		
Kontrolle	8,43	Kontrolle	8,67

Meßwerte zu 5.15

Kinetik von *A. fumigatus* bei 40 °C und 400 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,48	0	8,76
15	6,20	10	7,40
45	2,10	20	5,43
60	u.d.N.	30	2,60
90	u.d.N.	45	2,88
120	u.d.N.	60	1,00
150	u.d.N.	90	u.d.N.
180	u.d.N.	120	2,39
210	u.d.N.	150	1,60
240	1,50		
Kontrolle	8,41	Kontrolle	8,81

Kinetik von *A. fumigatus* bei 55 °C und 400 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,88	0	8,70
10	4,90	15	3,43
20	3,34	30	2,01
30	2,19	45	2,18
45	2,83	60	> 3
60	3,10	100	1,9
90	3,28	150	2,07
120	3,30	180	> 3
150	3,41		
180	3,37		
Kontrolle	8,76	Kontrolle	8,70

Meßwerte zu 5.16

Barotoleranz von *B. cinerea* bei 25 °C und 30 min in isotonischer NaCl-Lsg.

p / MPa	lg cfu	p / MPa	lg cfu
0,1	7,48	0,1	7,47
50	7,34	50	7,38
100	7,34	100	7,43
150	6,99	150	7,04
175	5,85	175	5,28
200	2,59	200	1,36
250	1,60	225	1,95
300	u.d.N.	250	1,00
		275	1,60

Meßwerte zu 5.17

Kinetik von *B. cinerea* bei 4 °C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,40	0	7,31
10	6,66	10	6,14
20	5,26	20	4,37
30	3,94	30	3,15
40	3,08	40	2,70
50	2,90	50	1,00
60	1,67	60	1,30
75	2,08		
90	1,30		
120	1,23		
165	u.d.N.		
210	u.d.N.		
Kontrolle	7,30	Kontrolle	7,29

Kinetik von *B. cinerea* bei 25 °C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,41	0	7,25
15	4,63	10	6,24
30	2,30	20	4,41
45	2,22	30	2,43
60	2,05	45	1,00
80	1,76	60	1,43
100	2,34	75	1,83
120	2,48		
140	1,00		
180	2,29		
Kontrolle	7,45	Kontrolle	7,27

Kinetik von *B. cinerea* bei 40°C und 200 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	6,92	0	7,04
20	1,51	2,5	3,26
30	1,60	5	1,52
45	1,65	10	1,23
60	u.d.N.	15	1,48
90	0,88	20	1,83
120	0,40	30	u.d.N.
150	1,40	45	1,48
180	0,40	60	2,05
Kontrolle	6,52	Kontrolle	6,98

Meßwerte zu 5.18

Barotoleranz von *P. expansum* bei 25 °C und 30 min in isotonischer NaCl-Lsg. (Werte wurden übernommen aus: Merkulow 1997, Diplomarbeit)

p / MPa	lg cfu
0,1	8,66
100	8,69
200	8,51
250	8,19
300	7,48
350	4,94
375	u.d.N.

Meßwerte zu 5.19

Kinetik von *P. expansum* bei 4 und 40 °C mit 350 MPa in isotonischer NaCl-Lösung (Werte wurden übernommen aus: Merkulow 1997, Diplomarbeit)

t / min	lg cfu (4 °C)	t / min	lg cfu (40 °C)
0	8,34	0	8,58
2,5	6,17	5	2,45
5	3,15	10	1,70
7,5	1,43	20	1,52
10	u.d.N.	30	1,20
		50	1,78
		70	1,20
		90	2,18
		110	1,70
		130	1,75
Kontrolle	8,38	Kontrolle	8,41

Kinetik von *P. expansum* bei 25 °C mit 350 MPa in isotonischer NaCl-Lösung

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,49	0	8,53
10	6,54	10	5,69
20	5,45	20	4,66
30	3,97	30	1,95
40	2,81	45	1,36
50	2,05	60	1,36
70	1,67	90	u.d.N.
100	0,52	120	u.d.N.
150	u.d.N.		
Kontrolle	8,36	Kontrolle	8,58

Meßwerte zu 5.20

Kinetik von *C. herbarum* bei 4 °C und 200 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.3 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,93	0	7,40
10	6,48	10	6,08
25	4,26	20	5,11
40	2,35	30	3,07
60	1,54	60	2,41
120	1,4	120	2,19
180	u.d.N.	180	1,54
240	u.d.N.		
Kontrolle	8,02	Kontrolle	7,60

Kinetik von *C. herbarum* bei 4 °C und 200 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,11	0	8,23
10	5,60	5	7,08
20	3,12	10	5,43
30	1,94	20	2,15
60	1,82	30	1,88
120	0,52	45	0,52
180	1,00	60	u.d.N.
240	u.d.N.	120	u.d.N.
		180	u.d.N.
		240	u.d.N.
Kontrolle	8,08	Kontrolle	8,18

Meßwerte zu 5.21

Kinetik von *C. herbarum* bei 25 °C und 200 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.3 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,18	0	7,60
10	6,18	3	7,40
20	4,72	10	5,68
30	3,18	20	3,04
60	2,29	30	3,08
120	2,24	60	3,00
180	1,95	120	2,70
240	2,48	180	2,64
Kontrolle	7,95	Kontrolle	7,48

Kinetik von *C. herbarum* bei 25 °C und 200 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,80	0	7,88
5	6,23	10	4,65
10	5,00	20	1,70
20	2,70	30	u.d.N.
30	1,67	60	0,70
45	1,88	90	1,74
60	1,97	120	1,30
120	2,21	180	0,70
180	1,90		
240	2,20		
Kontrolle	8,08	Kontrolle	7,91

Meßwerte zu 5.22

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 200 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.3 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	7,99	0	7,40
2,5	3,49	5	3,57
5	2,49	10	3,14
15	2,32	20	3,05
30	2,25	30	2,96
60	2,03	60	2,20
120	1,88	120	2,11
180	1,87	180	2,50
240	2,29		
Kontrolle	6,49	Kontrolle	7,20

Kinetik von *C. herbarum* bei 40 °C und 200 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,08	0	8,11
2,5	2,12	2,5	2,67
5	2,04	5	1,12
10	2,40	10	1,56
20	2,74	20	1,90
30	1,22	30	1,85
45	2,32	60	1,80
60	1,30	120	u.d.N.
120	1,22	180	0,52
180	0,82		
240	2,18		
Kontrolle	5,32	Kontrolle	5,60

Meßwerte zu 5.23

Kinetik von *P. expansum* bei 4 °C und 350 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.19 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,43	0	8,38
1	5,20	5	1,18
2,5	3,10	10	u.d.N.
5	u.d.N.	15	u.d.N.
10	u.d.N.	30	u.d.N.
20	u.d.N.	60	0,70
30	u.d.N.	120	u.d.N.
60	0,52	180	1,0
120	u.d.N.	240	0,70
180	u.d.N.		
240	u.d.N.		
Kontrolle	8,23	Kontrolle	8,41

Kinetik von *P. expansum* bei 4 °C und 350 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,20	0	8,32
2,5	4,5	5	1,30
5	1,73	10	u.d.N.
15	u.d.N.	20	u.d.N.
30	u.d.N.	30	u.d.N.
60	u.d.N.	60	u.d.N.
120	u.d.N.	120	u.d.N.
180	u.d.N.	180	u.d.N.
240	u.d.N.	240	u.d.N.
Kontrolle	7,97	Kontrolle	7,95

Meßwerte zu 5.24

Kinetik von *P. expansum* bei 25 °C und 350 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.19 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,43	0	8,40
2,5	7,23	15	3,48
5	6,26	30	1,81
10	4,51	45	1,90
20	2,15	30	1,00
30	1,12	90	u.d.N.
60	1,12	120	0,70
120	1,22	180	1,00
180	0,82	240	u.d.N.
240	u.d.N.		
Kontrolle	8,41	Kontrolle	8,40

Kinetik von *P. expansum* bei 25 °C und 350 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,48	0	8,20
5	5,82	5	5,54
10	4,38	10	4,10
20	1,73	20	1,48
30	1,12	30	u.d.N.
60	1,92	60	u.d.N.
120	u.d.N.	120	u.d.N.
180	0,52	180	u.d.N.
240	u.d.N.	240	u.d.N.
Kontrolle	8,45	Kontrolle	8,08

Meßwerte zu 5.25

Kinetik von *P. expansum* bei 40 °C und 350 MPa in Apfelsaft. Die Meßwerte für die Inaktivierung in isoton.NaCl-Lsg. sind bei den Werten zu Abbildung 5.19 zu finden.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,18	0	8,36
1	5,06	2,5	2,68
2,5	3,59	10	2,49
5	3,08	20	3,69
10	1,43	30	2,91
20	2,83	60	3,26
30	2,46	120	3,18
60	1,85	180	2,95
120	1,22	240	2,88
180	2,41		
240	2,26		
Kontrolle	8,04	Kontrolle	8,32

Kinetik von *P. expansum* bei 40 °C und 350 MPa in Brokkolisaft.

t / min	lg cfu	t / min	lg cfu
0	8,40	0	8,62
2,5	2,54	5	1,74
5	2,52	10	2,34
15	2,70	20	2,68
30	1,64	30	2,28
45	2,05	60	2,48
60	2,37	120	1,95
120	1,56	180	0,70
180	1,52	240	0,70
240	1,80		
Kontrolle	8,45	Kontrolle	8,64

Meßwerte zu 5.29

Eichgerade für Patulin

$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche	$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche	$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche
0,05	2741	0,005	193	0,05	2765
0,25	14771	0,01	531	0,10	5912
0,50	30346	0,05	2602	0,50	31655
1,00	60736	0,10	5795	1,00	66499
5,00	313948	0,50	29792	2,00	134667
		1,00	63424		
		2,00	131788		

Meßwerte zu 5.31

Eichgerade für 5-HMF

$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche	$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche	$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$	Fläche
0,05	3935	0,005	294	0,08	5757
0,25	20325	0,01	673	0,20	15270
0,50	40646	0,05	3123	0,80	65281
2,50	201509	0,10	6009	2,00	160510
5,00	417886	0,50	31941	8,00	667744
		1,00	53470		
		2,00	136727		
		4,00	250273		

Meßwerte zu 5.33

Abbau durch das Laufmittel bei Raumtemperatur

t / Tage	Patulin / %
0	100
8	97,6
21	73,1
28	75,0

Meßwerte zu 5.38

Produktion von Patulin bei 24 °C in Apfelsaft bei 10^4 , 10^6 Keimen/ml und der stabilen Fraktion

t / Tage	$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$ (10^4 Keime/ml)	$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$ (10^6 Keime/ml)	t / Tage	$c_{\text{Patulin}} / \text{mg l}^{-1}$ (stabile Fr.)
1	0	0	0	0
2	0	2,9	10	84,0
3	3,5	24,3	14	123,0
4	9,1	34,9	27	142,0
5	14,0	72,1	54	112,0
7	45,1	48,1	89	48,8
9	63,8	62,9		
13	111,0	121,9		
20	143,8	92,3		
33	141,6	69,70		
45	101,9	66,9		
78	67,0			
112	18,0	8,1		

Meßwerte zu 5.39

Gehalt an 5-HMF in Apfelsaft bei 24 °C bei der Verkeimung 10^4 , 10^6 Keimen/ml und der stabilen Fraktion

t / Tage	$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$ (10^4 Keime/ml)	$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$ (10^6 Keime/ml)	t / Tage	$c_{5\text{-HMF}} / \text{mg l}^{-1}$ (10^4 Keime/ml)
1	0	0,045	0	0
2	0,88	0,315	10	0,30
3	0,70	1,33	14	3,80
4	1,77	2,45	27	8,01
5	1,20	3,10	54	15,70
7	1,90	2,68	89	18,40
9	2,20	2,95		
13	4,30	6,12		
20	6,40	4,80		
33	8,90	5,70		
45	11,60	12,00		
78	15,70			
112	12,40	8,90		

Meßwerte zu 5.40Produktion von Patulin in Apfelsaft bei 24 °C von 10³ und 10⁶ Keimen/ml

t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (10 ³ Keime/ml)	t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (10 ⁶ Keime/ml)
0	0	0	0
4	14,0	3	10,9
7	59,2	6	52,9
9	79,5	8	71,2
11	79,4	10	68,5
14	84,9	13	75,8
18	88,2	17	80,3
25	93,4	24	34,9
32	55,3	31	31,2
46	32,8	45	14,4
70	32,5	69	14,0
94	9,2	93	3,9
144	1,0	143	0,3

Meßwerte zu 5.41

Produktion von Patulin in Apfelsaft bei 24 °C von druckbehandelten Sporen

t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (25°C/350MPa/20min)	t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (25°C/100MPa/6h)
0	0	0	0
7	0,5	6	9,3
11	0,4	10	99,3
18	79,1	17	99,2
25	59,8	24	90,6
32	3,3	31	61,6
46	3,3	45	12,3
70	2,6	69	1,6

Meßwerte zu 5.42

Produktion von Patulin in Apfelsaft bei 24 °C von druckbehandelten Sporen

t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (stabile Fraktion)	t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (40°C/350MPa/3min)
0	0	0	0
7	4,9	7	12,3
11	86,0	11	122,1
18	94,0	18	82,7
25	100,7	25	3,9
32	120,6	32	8,3
45	77,0	46	21,0
70	23,1		

Meßwerte zu 5.43

Produktion von Patulin in Apfelsaft bei 24 °C von druckbehandelten Sporen

t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (4°C/350MPa/8min)	t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹ (40°C/350MPa/3min)
0	0	0	0
6	32,9	7	12,3
10	114,0	11	122,1
17	78,5	18	82,7
24	40,2	25	3,9
31	41,2	32	8,3
45	25,9	46	21,0
69	2,5		

Meßwerte zu 5.45

Abnahme von Patulin in frischem Apfelsaft bei 24 °C

t / Tage	c _{Patulin} / mg l ⁻¹
0	54,2
9	48,7
33	39,3
57	29,5
107	0,24

Patulin-Cystein Adduktbildung

Im folgenden werden die berechneten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion dargestellt (Tabelle 8.1). Daran schließen sich die gemessenen Werte für die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten an.

Tabelle 8.1

Geschwindigkeitskonstanten der Patulin-Cystein Adduktbildung (Kap. 5.5) bei 4, 25 u. 40 °C in einem Druckbereich von 0,1 bis 500 MPa, die Fehler geben die Standardabweichung an.

	4 °C	25 °C	40 °C
0.1 MPa	$k = 4,59 \cdot 10^{-4} \pm 4,88 \cdot 10^{-5}$ $k = 3,62 \cdot 10^{-4} \pm 1,50 \cdot 10^{-5}$	$k = 2,45 \cdot 10^{-3} \pm 7,2 \cdot 10^{-5}$ $k = 2,46 \cdot 10^{-3} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}$	$k = 4,46 \cdot 10^{-3} \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$ $k = 6,8 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$ $k = 3,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,9 \cdot 10^{-4}$
200 MPa			$k = 2,55 \cdot 10^{-2} \pm 1,7 \cdot 10^{-2}$ $k = 2,61 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-4}$
300 MPa		$k = 1,86 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$ $k = 1,44 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$ $k = 1,2 \cdot 10^{-2} \pm 8,8 \cdot 10^{-4}$	$k = 3,9 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-2}$ $k = 3,4 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-2}$
400 MPa	$k = 4,3 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$ $k = 5,65 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$k = 1,55 \cdot 10^{-2} \pm 8,2 \cdot 10^{-4}$ $k = 1,8 \cdot 10^{-2} \pm 4,9 \cdot 10^{-4}$	$k = 4,4 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$ $k = 4,3 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$
500 MPa	$k = 7,61 \cdot 10^{-3} \pm 1,7 \cdot 10^{-3}$	$k = 2,53 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$ $k = 2,3 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$k = 5,92 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3}$

Meßwerte zu 5.48

Patulinmenge während der Adduktbildung bei 0,1 MPa und 4 °C. Die Angabe erfolgt durch den natürlichen Logarithmus des Verhältnisses der Patulinkonzentration an einem Zeitpunkt t zu der Anfangskonzentration (t=0).

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
30	-0,020	60	-0,038
60	-0,023	120	-0,006
90	-0,086	180	-0,006
120	-0,114	240	-0,031
195	-0,170	300	-0,131
240	-0,116	360	-0,110
300	-0,194		
375	-0,194		
435	-0,236		
480	-0,243		
540	-0,269		
k = 4,59·10 ⁻⁴ ± 4,88·10 ⁻⁵		k = 3,62·10 ⁻⁴ ± 1,50·10 ⁻⁵	

Patulinmenge während der Adduktbildung bei 0,1 MPa und 25 °C.

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
30	-0,128	15	0,030
60	-0,209	30	-0,134
90	-0,264	45	-0,169
120	-0,343	60	-0,235
165	-0,435	75	-0,141
240	-0,705	90	-0,190
300	-0,783	105	-0,228
360	-1,018	120	-0,235
420	-1,090	270	-0,596
480	-1,183	330	-0,884
540	1,324		
k = 2,45·10 ⁻³ ± 7,2·10 ⁻⁵		k = 2,46·10 ⁻³ ± 1,9·10 ⁻⁵	

Patulinmenge während der Adduktbildung bei 0,1 MPa und 40 °C.

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0	0	0
60	-0,347	15	-0,140	30	-0,154
120	-0,600	30	-0,336	60	-0,300
180	-0,884	45	-0,370	90	-0,397
240	-1,202	60	-0,480	120	-0,509
300	-1,371	75	-0,581	150	-0,658
360	-1,691	90	-0,681	180	-0,670
420	-1,873	120	-0,861	210	-0,847
		150	-1,081		
		180	-1,274		
k = 4,46 · 10 ⁻³ ± 1,3 · 10 ⁻⁴		k = 6,8 · 10 ⁻³ ± 2 · 10 ⁻⁴		k = 3,9 · 10 ⁻³ ± 1,9 · 10 ⁻⁴	

Meßwerte zu 5.49

Patulinmenge während der Adduktbildung bei 4 °C, 25 und 40 °C in 30 min und unterschiedlichen Druckhöhen. Für die gemittelten Werte der Barotoleranz wurden alle vorhandenen Meßwerte (Werte der Barotoleranz und alle vorhandenen 30-min-Werte der Kinetik, S. 127-129) verwendet und daraus der Mittelwert berechnet.

Barotoleranz bei 4 °C

p / MPa	c _t / c ₀	c _t / c ₀	c _t / c ₀ (gemittelt)
0,1	0,98	0,98	0,98
100	1,01	0,93	0,94
200	0,97	0,94	0,95
300	0,94	0,92	0,93
400	0,81	0,76	0,80
500	0,71	0,58	0,69

Barotoleranz bei 25°C

p / MPa	c _t / c ₀	c _t / c ₀	c _t / c ₀	c _t / c ₀ (gemittelt)
0,1	0,90	0,90	0,90	0,90
100	0,85	0,85	0,79	0,83
200	0,76	0,89	0,75	0,80
300	0,61	0,86	0,57	0,66
400	0,48	0,67	0,34	0,52
500	0,28	0,17	0,17	0,31

Barotoleranz bei 40°C

p / MPa	c _t / c ₀	c _t / c ₀	c _t / c ₀ (gemittelt)
0,1	0,86	0,86	0,86
100	0,70	0,78	0,74
200	0,54	0,70	0,50
300	0,37	0,50	0,35
400	0,20	0,46	0,24
500	0,09	0,05	0,09

Weitere Meßwerte der Adduktbildung

Kinetik der Adduktbildung bei 4 °C und 400 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,177	10	-0,128
20	-0,170	20	-0,181
30	-0,177	30	-0,241
40	-0,317		
k = 4,3 · 10 ⁻³ ± 2 · 10 ⁻³		k = 5,65 · 10 ⁻³ ± 2 · 10 ⁻⁴	

Kinetik der Adduktbildung bei 4 °C und 500 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0
10	-0,136
20	-0,225
30	-0,243
40	-0,368
k = 7,61 · 10 ⁻³ ± 1,7 · 10 ⁻³	

Kinetik der Adduktbildung bei 25 °C und 300 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0	0	0
10	-0,145	10	-0,231	10	-0,190
20	-0,207	20	-0,529	20	-0,307
30	-0,345	30	-0,522	30	-0,440
40	-0,500				
k = 1,2 · 10 ⁻² ± 8,8 · 10 ⁻⁴		k = 1,86 · 10 ⁻² ± 4 · 10 ⁻³		k = 1,44 · 10 ⁻² ± 1 · 10 ⁻³	

Kinetik der Adduktbildung bei 25 °C und 400 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,190	10	-0,175
20	-0,324	20	-0,367
30	-0,473		
k = 1,55·10 ⁻² ± 8,2·10 ⁻⁴		k = 1,8 ·10 ⁻² ± 4,9·10 ⁻⁴	

Kinetik der Adduktbildung bei 25 °C und 500 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,403	10	-0,361
20	-0,558	20	-0,594
30	-0,793	30	-0,810
		40	-0,914
k = 2,53·10 ⁻² ± 3·10 ⁻³		k = 2,3·10 ⁻² ± 2·10 ⁻³	

Kinetik der Adduktbildung bei 40 °C und 200 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,247	10	-0,386
20	-0,511	40	-1,108
30	-0,783	50	-1,300
k = 2,61·10 ⁻² ± 4·10 ⁻⁴		k = 2,55·10 ⁻² ± 1,7·10 ⁻²	

Kinetik der Adduktbildung bei 40 °C und 300 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,454	10	-0,429
20	-0,754	20	-0,802
30	-1,008	30	-1,170
40	-1,421		
k = 3,4 ·10 ⁻² ± 2·10 ⁻²		k = 3,9·10 ⁻² ± 1·10 ⁻²	

Kinetik der Adduktbildung bei 40 °C und 400 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)	t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0	0	0
10	-0,634	10	-0,640
20	-1,162	20	-1,103
30	-1,374	30	-1,311
40	-1,799		
k = 4,3·10 ⁻² ± 4·10 ⁻³		k = 4,4·10 ⁻² ± 6·10 ⁻³	

Kinetik der Adduktbildung bei 40 °C und 500 MPa

t / min	ln (c _t /c ₀)
0	0
10	-0,896
20	-1,405
30	-1,779
40	-2,520
k = 5,92·10 ⁻² ± 5·10 ⁻³	

LITERATURVERZEICHNIS

- Alperden I., Mintzlaff H.-J., Tauchmann F. und Leistner L. (1973) Untersuchungen über die Bildung des Mycotoxins Patulin in Rohwurst, *Die Fleischwirtschaft*, 4, 566-568.
- Arafat W. und Musa M.N. (1995) Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 87/2, 177-186.
- Arafat W., Kern D. und Dirheimer G. (1985) Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetase by the mycotoxin patulin, *Chemico-Biological Interactions*, 56, 333-349.
- Balny C. (1999) High pressure enzyme kinetics, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, ed. by Ludwig H., Springer-Verlag, 261-266.
- Bartolomé B., Bengoechea M.L., Pérez-Illarbe F.J., Hernández T., Estrella I. und Gómez-Cordovés C. (1994) Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *Journal of chromatography A*, 664, 39-43.
- Beuchat L.R. (1981) Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of colony formation by heated spores and vegetative cells of molds, *Applied and Environmental Microbiology*, 41/2, 472-477.
- Beuchat L.R. (1986) Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products, *Journal of Food Science*, 51, 1506-1510.
- Brackett R.E. und Marth E.H. (1979) Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice, *Journal of Food Protection*, 42/11, 864-866.
- Breitenbach M., Achatz G., Oberkofler H., Simon B., Unger A., Lechenauer E., Kandler D., Ebner C. und Kraft D. (1995) Molecular characterisation of allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternans*, *International Archives of Allergy and Immunology*, 107, 458-459.
- Brian P.W., Elson G.W. und Lowe D. (1956) Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*, *Nature*, 178, 263-264.
- Bridgeman P.W. (1914) The coagulation of albumen by pressure, *Journal of Biological Chemistry*, 19, 511-512.
- Broom W.A., Bülbring E., Chapman C.J., Hampton J.W., Thomson A.M., Ungar J., Wien R. und Woolfe G. (1944) The pharmacology of patulin, *British Journal of Experimental Pathology*, 25, 195-207.
- Buchanan J.R., Sommer N.F., Fortlage R.J., Maxie E.C., Mitchell F.G. und Hsieh D.P. (1974) Patulin from *Penicillium expansum* in stone fruits and pears, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99/3, 262-265.

- Buchheim W., Schütt M. und Frede E. (1996) High pressure effects on emulsified fats. In: High Pressure Bioscience and Biotechnology, ed. by Hayashi R. and Balny C., Elsevier Science B.V., 331-336.
- Butz P. (1987) Biochemische Systeme unter hohem hydrostatischem Druck, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Butz P. und Ludwig H (1991) Hochdruckinaktivierung von Hefen und Schimmelpilzen, *Pharmazeutische Industrie*, 52, 487-491.
- Butz P. und Ludwig H. (1992) Influence of high pressure on a lipid coated virus. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 61-65.
- Butz P., Funtenberger S., Haberditzl T. und Tauscher B. (1996) High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 29/(5&6), 404-410.
- Carrier D., Mantsch H.H. und Wong P.T. (1990) Protective effect of lipidic surfaces against pressure-induced conformational changes of poly(L-lysine), *Biochemistry*, 1990, 254-258.
- Chain E., Florey H.W. und Jennings M.A. (1942) An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*, *British Journal of Experimental Pathology*, 23, 202-205.
- Cheftel J.C. (1992) Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 195-209.
- Ciegler A., Beckwith A.C. und Jackson L.K. (1976) Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine, *Applied and Environmental Microbiology*, 31/5, 664-667.
- Ciegler A., Vesonder R.F. und Jackson L.K. (1977) Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 33/4, 1004-1006.
- Connor D.E. und Beuchat L.R. (1987) Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium, *International Journal of Food Microbiology*, 4, 303-310.
- Corrier D.E. (1991) Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30, 73-87.
- Dabbah R., Moats W.A. und Edwards V.M. (1971) Heat survivor curves of food-borne bacteria suspended in commercially sterilized whole milk, *Journal of Dairy Science*, 54/12, 1772-1779.
- Dickens F. und Jones H.E. (1961) Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances, *British Journal of Cancer*, 15, 85-100.

- Earnshaw R.G., Appleyard J. und Hurst R.M. (1995) Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure, *International Journal of Food Microbiology*, 28, 197-219.
- Eicher R. (1996) Isolierung und Hochdruckbehandlung von Ascosporen des Schimmelpilzes *Eurotium repens*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Eicher R. (2000) Hochdruckinaktivierung und Aktivierung von Schimmelpilzsporen, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Engel G., Reimerdes E.H., Lembke A., Klostermeyer H. und Behnert J. (1975) Untersuchung zur Bildung von Mycotoxinen und deren quantitative Bestimmung, *Milchwissenschaft*, 30/3, 129-134.
- Eicher R., Merkulow N., van Almsick G. und Ludwig H. (1998) High pressure inactivation kinetics of moulds. In: High Pressure Biology and Medicine, ed. by Bennett P.B., Demchenko I. and Marquis R.E., University of Rochester Press, New York, 65-75.
- Escoula L., Thomsen M., Bourdiol D., Pipy B., Peuriere S. und Roubinet F. (1988) Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immuno system of mice and rabbits, *International Journal of Immunopharmacology*, 10/8, 983-989.
- Fischer G., Müller T., Ostrowski R. und Dott W. (1999) Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities, *Chemosphere*, 38/8, 1745-1755.
- Fleming A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226-235.
- Fliege R. und Metzler M. (1999) The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and α -amino-groups, *Chemico-Biological Interactions*, 123, 85-103.
- Florianowicz T. (1998) *Penicillium expansum* growth and production of patulin in the presence of benzoic acid and its derivatives, *Acta Microbiologica Polonica*, 47/1, 45-53.
- Frank H.K., Orth R. und Hermann R. (1976) Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, I. Kernobst und daraus hergestellte Produkte, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 162, 149-157.
- Frank H.K., Orth R. und Figge A. (1977) Patulin in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, 2. Verschiedene Obstarten, Gemüse und daraus hergestellte Produkte, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 163, 111-114.
- Frank H.K. (1970) Toxinbildende Schimmelpilze, *Confructa*, 15/2, 68-71.
- Freerksen E. und Bönicke R. (1951) Die Inaktivierung des Patulins in vivo, *Zeitschrift für Hygiene*, 132, 274-291.

- Frisvad J.C. und Filtenborg O. (1989) Terverticillate *Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production, *Mycologia*, 81/6, 837-861.
- Fuchigami M. und Teramoto A. (1999) Texture and structure of high-pressure-frozen food gels, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, ed. by Ludwig H., Springer-Verlag, 493-496.
- Gailit J. (1989) Identification of proteins whose synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is induced by DNA damage and heat shock, *International Journal of Radiation and Biology*, 57/5, 981-992.
- Geiger W.B. und Conn J.E. (1945) The mechanism of the antibiotic action of clavacin and penicillic acid, *Journal of the American Chemical Society*, 67, 112-116.
- Glister G.A. (1941) A new antibacterial agent produced by a mould, *Nature*, 148, 470.
- Gökmen V. und Acar J. (1996) Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice, *Journal of Chromatography A*, 730, 53-58.
- Gökmen V. und Acar J. (1999) Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 847, 69-74.
- Groß M. and Jaenicke R. (1994) Proteins under pressure, *European Journal of Biochemistry*, 221, 617-630.
- Groß P. (1994) Die Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck auf den Bakteriophagen T4, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Guinebretiere M.H., Nguyen-The C., Morrison N., Reich M. und Nicot P. (2000) Isolation and characterisation of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits, *Journal of Food Protection*, 63/3, 386-394.
- Harwig J., Chen J.-K. und Kennedy B.P.C. (1973) Occurrence of patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada, *Canadian Institute for Food Science and Technology*, 6/1, 22-25.
- Hauben K.J., Bartlett D., Soontjens C.C., Cornelis K., Wuytack E.Y. und Michiels C.W. (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure, *Applied and Environmental Microbiology*, 63/3, 945-950.
- Hayashi R. und Hayashida A. (1989) Increased amylase digestibility of pressure-treated starches, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2935-2939.
- Hedén C.-G. (1964) Effects of high hydrostatic pressure on microbial systems, *Bacteriological Reviews*, 28/1, 14-29.
- Heremans K. (1982) High pressure effects on proteins and other biomolecules, *Annual Reviews in Biophysics and Bioengineering*, 11, 1-21.

- Heremans K. (1992) From living systems to biomolecules. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny R., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 37-44.
- Hewala I.I., Zoweil A.M. und Onsi S.M. (1993) Detection and determination of interfering 5-hydroxymethylfurfural in the analysis of caramel-coloured pharmaceutical syrups, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 18, 49-53.
- Hite B.H. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk, *Bulletin of the West Virginia University of Agriculture Experiment Station Morgantown*, 58.
- Hite B.H. (1914) The effects on pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables, *Bulletin of the West Virginia University of Agriculture Experiment Station Morgantown*, 146, 1.
- Hofmann K., Mintzlaff H.-J., Alperden I. und Leistner L. (1971) Untersuchung über die Inaktivierung des Mykotoxins Patulin durch Sulfhydrylgruppen, *Die Fleischwirtschaft*, 10, 1534-1539.
- Huebner H.J., Mayura K., Pallaroni L., Ake C.L., Lemke S.L., Herrera P. und Phillips T.D. (2000) Development and characterization of a carbon-based composite material for reducing patulin levels in apple juice, *Journal of Food Protection*, 63/1, 106-110.
- IARC Monographs, 1986, 40, 83-98.
- Iwahashi H., Kaul S.C., Obuchi K. und Komatsu Y. (1991) Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast, *FEMS Microbiology Letters*, 80, 325-328.
- Kaneshina S., Maruyama S. und Matsuki H. (1996) Effect of pressure on the phase behaviour of ester- and ether-linked phospholipid bilayer membranes. In: High Pressure Bioscience and Biotechnology, ed. by Hayashi R. and Balny C., Elsevier Science B.V., 175-180.
- Karbstein H., Schubert H., Scigalla W. und Ludwig H. (1992) Sterilisation of emulsions by means of high pressure. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny R., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 345-347.
- Kitamura Y. und Itoh T. (1987) Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. Prediction of pressure dependence of pH and pOH, *Journal of Solution Chemistry*, 16/9, 715-725.
- Knorr D., Böttcher A., Dörnenburg H., Eshtiaghi M., Oxen P., Richwin A. and Seyderhelm I. (1992) High pressure effects on microorganisms, enzyme activity and food functionality, In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 211-218.
- Koch C.E., Thurm V. und Paul P. (1979) Zur hygienischen Bedeutung von Patulin in Lebensmitteln, *Die Nahrung*, 23/2, 125-130.

- Kolb E. (1984) Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus und zum Stoffwechsel von Mykotoxinen, *Zeitschrift für die Gesamte Innere Medizin und ihre Grenzgebiete*, 39/15, 353-358.
- Krivobok S., Seigle-Murandi F., Steiman R., Benoit-Guyod J.-L. und Bartoli M.-H. (1994) Antitumoral activity of patulin and patulin-cysteine adducts, *Die Pharmazie*, 49, 277-279.
- Kunugi S. (1992) Effect of pressure on activity and specificity of some hydrolytic enzymes. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 129-136.
- Lang K., Kieckebusch W., Bässler K.H., Griem W. und Czok G. (1970) Untersuchungen über die Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 10/2, 97-101.
- Ledl F. (1991) Der Abbau von reduzierenden Zuckern und Aminen bei der Maillard-Reaktion, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 30, 4-17.
- Lee H.S., Rouseff R.L. und Nagy S. (1986) HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices, *Journal of Food Science*, 51/4, 1075-1076.
- Lieu F.Y. und Bullerman L.B. (1978) Binding of patulin and penicillic acid to glutathione and cysteine and toxicity of the resulting adducts, *Milchwissenschaft*, 33/1, 16-20.
- Lindroth S. und von Wright A. (1978) Comparison of the toxicities of patulin and patulin adducts formed with cysteine, *Applied and Environmental Microbiology*, 35/6, 1003-1007.
- Lindroth S. und von Wright A. (1990) Detoxification of patulin by adduct formation with cysteine, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10/4-5, 254-259.
- Ludwig H. (1991) Inaktivierung von Mikroorganismen und Viren durch hydrostatischen Druck, *Pharmazeutische Zeitung*, 5/6, 223-224.
- Ludwig H. (1995) Allgemeine Prinzipien bei der Erzeugung und Anwendung von hohem hydrostatischem Druck, Hochschulkurs: Hochdruckpasteurisierung, Heidelberg, 1995.
- Ludwig H., Bieler C., Hallbauer K. und Scigalla W. (1992) Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 25-31.
- Ludwig H., Butz P. und Weber-Kühn H. (1990) Bakterien unter Druck, *Deutsche Apotheker Zeitung*, 130, 2774-2776.
- Ludwig H., van Almsick G. und Schreck C. (1999) The effect of hydrostatic pressure on the survival of microorganisms. In: Structure and functions of biological systems under extreme conditions. Pressure and temperature effects, ed. by Taniguchi Y., Stanley H.E. und Ludwig H., Springer Verlag, Heidelberg, in Druck.

- Macdonald A.G. (1992) Effects of high hydrostatic pressure on natural and artificial membranes. In: High Pressure and Biotechnology, ed. by Balny C., Hayashi R., Heremans K. and Masson P., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 224, 67-71.
- Mackey B.M., Forestière K. und Isaacs N. (1995) Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure, *Food Biotechnology*, 9/(1&2), 1-11.
- Makita T. (1992) Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology, *Fluid Phase Equilibria*, 76, 87-95.
- Mantle P.G. und Penny R.H.C. (1981) Tremorgenic mycotoxins and neurological disorders - a review, *The Veterinary Annual*, 21, 51-62.
- Massaux C., Béra F., Steyer B., Sindic M. und Deroanne C. (1999) High hydrostatic pressure freezing and thawing of pork meat: quality preservation, processing times and high pressure treatment advantages, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, ed. by Ludwig H., Springer-Verlag, 285-288.
- Mentrup E., Butz P., Stricker H. und Ludwig H. (1988) Hochdrucksterilisation von Liposomen, *Pharmazeutische Industrie*, 50, 363-366.
- Merkulow N. (1997) Hochdruckinaktivierung des Schimmelpilzes *Penicillium expansum*, Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Metrick C., Hoover D.G. und Farkas D.F. (1989) Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*, *Journal of Food Science*, 54, 1547-1549.
- Mislivec P.B. (1981) Toxic species of *Penicillium* common in food, *Journal of Food Protection*, 44/9, 723-726.
- Moats W.A. (1971) Kinetic of thermal death of bacteria, *Journal of Bacteriology*, 105/1, 165-171.
- Mortimer D.N., Parker I., Shepherd M.J. und Gilbert J. (1985) A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin, *Food Additives and Contaminants*, 2/3, 165-170.
- Müller T. (1987) Cancerogene und genotoxische Wirkung von Mycotoxinen, *Die Nahrung*, 31, 117-125.
- Nässberger L. (1990) Influence of 5-hydroxymethylfurfural on the overall metabolism of human blood cells, *Human and Experimental Toxicology*, 9, 211-214.
- Northolt M.D. und Bullerman L.B. (1982) Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions, *Journal of Food Protection*, 45/6, 519-526.

- Ntirampemba G., Langlois B.E., Archbold D.D., Hamilton-Kemp T.R. und Barth M.M. (1998) Microbial populations of *Botrytis cinerea*-inoculated strawberry fruit exposed to four volatile compounds, *Journal of Food Protection*, 61/10, 1352-1357.
- Ogawa H., Fukuhisa K., Kubo Y. und Fukumoto H. (1990) Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in satsuma mandarin juice: Effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54/5, 1219-1225.
- Oxen P. und Knorr D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 26, 220-223.
- Palou E., Lopez-Malo A., Barbosa-Canovas G.V., Welti-Chanes J. und Swanson B.G. (1997) High hydrostatic pressure as a hurdle for *Zygosaccharomyces bailii* inactivation, *Journal of Food Science*, 62/4, 855-857.
- Pfeffer U. und Schulz-Harder B. (1985) Occurrence of "stress"-proteins in yeast after heat-shock, acrylonitrile treatment and during the stationary growth phase, *Zeitschrift für Naturforschung*, 40c, 26-28.
- Phillips T.D. und Hayes A.W. (1977) Effects of patulin on adenosine triphosphatase activities in the mouse, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 42, 175-187.
- Podgórska E. (1992a) Effect of *Penicillium expansum* culture conditions on patulin production, *Acta Microbiologica Polonica*, 41/1, 89-95.
- Podgórska E. (1992b) Effect of preservatives on patulin production by *Penicillium expansum*, *Acta Microbiologica Polonica*, 41/1, 97-107.
- Pohland A.E. und Allen R. (1970) Stability studies with patulin, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 53/4, 688-691.
- Reiß J. (1973) Influence of the mycotoxins patulin and diacetoxyscirpenol on fungi, *Journal of the General Applied Microbiology*, 19, 415-420.
- Reiß J. (1978) Biosynthesewege wichtiger Mykotoxine, *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 18/10, 747-757.
- Reiß J. (1986) Schimmelpilze, Springer Verlag.
- Reiß J. (1995) Moulds in containers with biological wastes, *Microbiological Research*, 150, 93-98.
- Roig M.G., Bello J.F., Kennedy J.F., Rivera Z.S. und Lloyd L.L. (1992) A reversed-phase HPLC method for measurement of 5-hydroxymethylfurfuraldehyde and furfuraldehyde in processed juices, *Bioseparation*, 3, 177-184.
- Rosin M.P. und Zimmerman A.M. (1977) The induction of cytoplasmic petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure, *Journal of Cell Science*, 26, 373-385.

- Rovira R., Ribera F., Sanchis V. und Canela R. (1993) Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 214-216.
- Sanchez Y. und Linnquist S.L. (1990) HSP required for induced thermotolerance, *Science*, 248, 1112-1115.
- Sands D.C., McIntyre J.L. und Walton G.S. (1976) Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider, *Applied and Environmental Microbiology*, 32/3, 388-391.
- Schlatter C. (1990) Past and future in mycotoxin research, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10/3, 138-144.
- Schreck C. (1998) Der Einfluß der morphologischen Form von vegetativen, aeroben Bakterien auf ihre Resistenz gegenüber hohen hydrostatischen Drücken und Veränderungen in ihrer Ultrastruktur nach der Druckbehandlung, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Scigalla W. (1994) Charakterisierung physikalisch-chemischer Reduktionsparameter aerober Mikroorganismen zur Entwicklung und Validierung eines Hochdrucksterilisationsverfahrens, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Scott A.I., Zamir L., Phillips G.T. und Yalpani M. (1973) The biosynthesis of patulin, *Bioorganic Chemistry*, 2, 124-139.
- Scott P.M. und Somers E. (1968) Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16/3, 483-485.
- Sharma R.P. (1993) Immunotoxicity of mycotoxins, *Journal of Dairy Science*, 76, 892-897.
- Shigehisa T., Nakagami T., Ohno H., Otake T., Mori H., Kawahata T., Morimoto M. und Ueba N. (1996) Inactivation of HIV in blood plasma by high hydrostatic pressure. In: High pressure Bioscience and Biotechnology, ed. by Hayashi R., and Balny C., Elsevier Science B.V., 13, 273-278.
- Simpson B.K. (1998) High pressure processing of fresh seafoods. In: Process-induced Chemical Changes in Food, ed. by Shaihi, Plenum Press, New York, 67-80.
- Smelt J.P., Courrier W., Cupperes H.G., Wouters P.C. und Rijke A.G. (1997) Inactivation kinetics of microorganisms by high pressure. In: High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology, ed. by Heremans K., Leuven University Press, 273-276.
- Sojka B. (1996) Die Auswirkungen hohen hydrostatischen Druckes auf die Inaktivierung und auf Stoffwechselforgänge während der Auskeimung von Bakteriensporen, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Sojka B. und Ludwig H. (1995) Pressure sensitivity of *Bacillus subtilis* spores that survived previous high pressure treatments, *Pharmazeutische Industrie*, 57, 251-252.

- Stray H. (1978) High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61/6, 1359-1362.
- Surh Y.-J., Liem A., Miller J.A. und Tannenbaum S.R. (1994) 5-Sulfooxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural, *Carcinogenesis*, 15/10, 2375-2377.
- Sutton P., Newcombe N.R., Waring P. und Müllbacher A. (1994) In vivo suppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi, *Infection and Immunity*, 62/4, 1192-1198.
- Tanenbaum S.W. und Bassett E.W. (1958) The biosynthesis of patulin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 28, 21-31.
- Tauscher B. (1995) Pasteurisation of food by hydrostatic high pressure: Chemical aspects, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung*, 200, 3-13.
- Timson W.J. und Short A.J. (1965) Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure, *Biotechnology and Bioengineering*, 7, 139-159.
- Tonello C., Wurtz P., Largeteau A., Jolibert F., Deschamps A., Ducastaing A. und Demazeau G. (1994) Recent developments in the use of high hydrostatic pressures in food processing. *High Pressure Research*, 12, 205-213.
- Tronsmo A. (1991) Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*, *Biological Control*, 1, 59-62.
- Tuncan E.U und Martin S.E. (1990) Combined effects of salts and temperature on the thermal destruction of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Food Science*, 55/3, 833-836.
- Van Almsick G. (1998) Hochdruckinaktivierung anaerober Bakterien und eines Pilzes, Dissertation, Universität Heidelberg.
- Vardag T., Schmidt R. und Jager M. (1999) High pressure and preservatives for cosmetics - new data and first practical experiences, *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, ed. by Ludwig H., Springer-Verlag, 534-536.
- Vrchlabsky I. und Leistner I. (1971) Hitzeresistenz von Laktobazillen bei unterschiedlichen a_w -Werten, *Die Fleischwirtschaft*, 51/9, 1368-1370.
- Weber G. und Drickamer H.G. (1983) The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules, *Quarterly Review of Biophysics*, 16, 89-112.
- Webster J. (1983) *Pilze*, Springer-Verlag.
- Wilson D.M. und Nuovo G.J. (1973) Patulin production in apples decayed by *Penicillium expansum*, *Applied Microbiology*, 26/1, 124-125.
- Winter R. (1996) High pressure effects on the structure and mesophase behaviour of supramolecular lipid aggregates and model membrane systems. In: *High pressure Bio-*

science and Biotechnology, ed. by Hayashi R. and Balny C., Elsevier Science B.V., 13, 21-28.

Zegota H., Zegota A. und Bachman S. (1988a) Effect of irradiation on the patulin content and chemical composition of apple juice concentrate, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 187, 235-238.

Zegota H., Zegota A. und Bachman S. (1988b) Effect of irradiation and storage on patulin disappearance and some chemical constituents of apple juice concentrate, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 187, 321-324.

Zhang X.-M., Chan C.C., Stamp D., Minkin S., Archer M.C. und Bruce W.R. (1993) Initiation and promotion of colonic aberrant crypti foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose, *Carcinogenesis*, 14/4, 773-775.

ZoBell C.E. und Johnson F.H. (1949) The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria, *Journal of Bacteriology*, 57, 179-189.

ZoBell C.E. und Cobet A.B. (1962) Growth, reproduction, and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressure, *Journal of Bacteriology*, 84, 1228-1236.

Hiermit erkläre ich an Eides statt,
daß ich die vorliegende Arbeit selbständig
und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.