

<b>Zeitschrift:</b>	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
<b>Herausgeber:</b>	Bundesamt für Gesundheit
<b>Band:</b>	73 (1982)
<b>Heft:</b>	1
<b>Artikel:</b>	Chitinhalt als Indikator für Schimmelpilzkontaminationen in Lebensmitteln = The chitin content of foods as an index of mold contamination
<b>Autor:</b>	Stadler, D. / Blaser, P. / Schmidt-Lorenz, W.
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-983445">https://doi.org/10.5169/seals-983445</a>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 27.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Chitingehalt als Indikator für Schimmelpilzkontaminationen in Lebensmitteln

The Chitin Content of Foods as an Index of Mold Contamination

D. Stadler, P. Blaser und W. Schmidt-Lorenz

Institut für Lebensmittelwissenschaft, ETH-Z, Zürich

### Einleitung

In Lebensmitteln, die mit Schimmelpilzen kontaminiert sind, ist stets mit dem Vorhandensein von Mykotoxinen zu rechnen. Nur bei weitgehender Abwesenheit von Schimmelpilzen sind Lebensmittel gesundheitlich unbedenklich. Dem quantitativen Nachweis von Schimmelpilzen in Lebensmitteln kommt daher eine wichtige und nicht zu unterschätzende Indikatorfunktion für eine potentielle Mykotoxinkontamination zu (13).

In der Praxis werden zum quantitativen Schimmelpilznachweis vor allem kulturelle, seltener direktemikroskopische Methoden angewandt. Beide Verfahren sind relativ aufwendig und zeitraubend.

Fast alle Schimmelpilze enthalten Chitin in ihren Zellwänden (17), die übrigen Mikroorganismen sowie Pflanzen und Tiere mit Ausnahme der Insekten aber nicht. Daher wurde bereits mehrfach der Chitingehalt als einfacher und rasch zu bestimmender Indikator für die Verschimmelung von Lebensmitteln vorgeschlagen. So wurde von *Golubchuk* et al. (14), *Nandi* (18) und *Cochran* und *Vercellotti* (7) der Chitingehalt bei Weizen oder Weizenmehl bestimmt, von *Donald* und *Mirocha* (11) bei Weizen und Sojabohnen, von *Ride* und *Drysdale* (20) bei Tomaten, von *Jarvis* (16) bei Tomatensaft und -purée und von *Stahmann* et al. (23) für Kartoffeln, Erbsen und Weizen. Allerdings wurden dabei sehr unterschiedliche und schwer vergleichbare Parameter für den Grad der Verschimmelung wie Mould Count, Howard Mould Count, Koloniezahlen u. a. angewandt. Daher ist eine eindeutige Aussage über die Korrelation zwischen Chitin- und Schimmelpilzgehalt sowie über die Eignung des Chitingehaltes als Indikator für Schimmelpilzkontaminationen in Lebensmitteln bisher kaum möglich.

Der besondere Vorteil chemisch-analytischer Chitinbestimmungen gegenüber kulturellen Pilzzählungen könnte vor allem darin liegen, daß damit auch durch technologische Maßnahmen letal- und subletalgeschädigte Pilzelemente erfaßt werden. Für die Anwendung in der Praxis ist aber zu fordern, daß mit der Chitinbestimmung eine Pilzkontamination nachweisbar ist, die deutlich unterhalb der

bisherigen Nachweisgrenze der direktmikroskopischen Nachweismethoden, d. h. unter  $10^5$  Schimmelpilzfragmenten/g Lebensmittel liegt.

In all den obenerwähnten Verfahren zur Bestimmung des Chitingehaltes in Lebensmitteln wird mittels starker Säure oder Alkali das vorhandene Chitin zu Glucosamin hydrolysiert und nach Reinigung des Hydrolysates der Glucosamin gehalt nach Farbreaktion photometrisch oder im Aminosäureanalysator bestimmt. Die Verfahren sind relativ störanfällig und arbeitsaufwendig und daher für Routinebestimmungen wenig geeignet. Arbeitsaufwendig ist dabei vor allem die notwendige Reinigung der Hydrolysate über Kationenaustauscher. Nach *Cochran* und *Vercellotti* (7) und *Aidoo* et al. (1) kann aber die Reinigung durch wesentlich einfachere Filtrationen ersetzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine kritische Prüfung, ob und inwieweit sich die Bestimmung des Chitingehaltes in unterschiedlich stark verschimmelten Produkten bei Anwendung der von *Cochran* und *Vercellotti* (7) vorgeschlagenen, vereinfachten Reinigung der Hydrolysate als Indikator für den Schimmelpilzgehalt eignet. Zu diesem Zweck wurde bei verschiedenen normal und massiv verschimmelten Lebensmitteln (Weizenmehl, Mandelpulver und Maisgrieß) mit den von *Ride* und *Drysdale* (21), *Swift* (24) und *Benson* (5) vorgeschlagenen Methoden sowie dem Aminosäureanalysator der Chitingehalt bestimmt und mit den kulturell sowie direktmikroskopisch bestimmten Pilzzahlen verglichen.

## Material und Methoden

### Normal und massiv kontaminierte Lebensmittel

Zur Untersuchung gelangten handelsübliches Weizenmehl, Maisgrieß und Mandelpulver mit normaler Schimmelpilzflora. Zwecks zusätzlicher, massiver Kontamination wurden je 10 g der einzelnen Lebensmittel nach Zugabe von 10 ml dest. Wasser bei + 25 °C bebrütet, bis eine Schimmelpilzkoloniezahl von annähernd  $10^9$  kolonienbildenden Einheiten (KBE) pro g erreicht war. Von diesen massiv verschimmelten Produkten wurden 10 g zu 90 g normal kontaminierten Lebensmitteln gegeben, gut durchmischt und weitere dezimale Verdünnungsstufen hergestellt, so daß Konzentrationen von 1, 10, und 100 mg stark verschimmelten Materials pro g normal verschimmeltem Ausgangsmaterial resultierten.

### Schimmelpilzkulturen

*Aspergillus flavus* var. *columnaris* ZT\* 8387 und *A. niger* ZT 8359 wurden in 100 ml Malzextrakt-Bouillon (3%) als Standkulturen (+ 25 °C/4 Tage) in 500-ml-Erlenmeyerkolben kultiviert. Das Myzel wurde abfiltriert und die Trockenmasse

\* ZT = Zürich, Technische Hochschule

bestimmt. Von parallel unter gleichen Bedingungen bebrüteten Standkulturen beider Pilze wurde die Myzelmasse während 5 Minuten im Stomacher (Lab Blender 400) homogenisiert, wie weiter unten angegeben die Zahl der koloniebildenden Einheiten pro ml Flüssigkeitskultur bestimmt und auf die Trockenmasse umgerechnet.

### *Direktmikroskopische Schimmelpilzzählung*

Lebensmittelproben (10 g) wurden in 90 ml Verdünnungslösung (8,5 g NaCl, 1 g Pepton gelöst in 1000 ml dest. Wasser) während einer Minute im Stomacher homogenisiert. Davon wurden Breedausstriche auf Objektträger angelegt (0,01 ml/cm<sup>2</sup>), getrocknet und hitzefixiert. Nach modifizierter Pianesefärbung nach *Blaser* (6) wurden die Schimmelpilzsporen und Hyphenfragmente pro Mikroskopgesichtsfeld ausgezählt und, wie von *Push* et al. (19) angegeben, die Zahl der Sporen und Hyphenfragmente pro Gramm Lebensmittel bestimmt.

### *Kulturelle Schimmelpilzzählung*

Nach Anlage von dezimalen Verdünnungsstufen aus dem Homogenisat wurde in zwei Parallelen jeweils 0,1 ml nach dem Oberflächenverfahren auf Malzextrakt-Agar mit Antibiotikazusatz (3% Malzextrakt, 1,5% Agar, 50 ppm Chlortetracyclin, 50 ppm Chloramphenicol) ausplattiert und nach 4 Tagen Bebrütung bei + 25 °C die KBE ausgezählt.

### *Chitinanalyse*

#### *Alkalihydrolyse und Kolorimetrie nach Ride und Drysdale (21)*

Die Methode wurde ohne Abänderung übernommen: Mandelpulver (1 g) wurde in 5 ml Aceton aufgeschlämmt und nach Zentrifugation (1500 g/10 min/ + 2 °C) vorhandene Fette entfernt. Darauf wurde mit konz. KOH während 60 min bei + 130 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Das dabei abgespaltene Glucosamin wurde mit Natriumnitrit im sauren Milieu desaminiert und der entstandene Aldehyd kolorimetrisch mit 3-Methyl-2-Benzothiazolon-Hydrochlorid (MBTH) bestimmt.

#### *Säurehydrolyse nach Cochran und Vercellotti (7)*

Zu jeweils 2 Gramm der Lebensmittelproben wurden 5 ml 8 n HCl zugegeben, die vorhandene Luft durch Stickstoffgas verdrängt und während 120 min bei + 95 °C hydrolysiert.

Das Hydrolysat wurde über einen Faltenfilter gereinigt und bei reduziertem Druck im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde wie nachstehend angegeben weiterbehandelt.

#### *Kolorimetrie nach Benson 5)*

Nach Aufschlämung des Hydrolysenrückstandes in 20 ml Boratpuffer (1,12 m H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 0,56 m KOH) erfolgte die Reinigung nach Vorschlag wie von *Co-*

chran und Vercellotti (7) angegeben über eine Filternutsche mit Celite 545 als Filterhilfsmittel. Entsprechend den Angaben von Benson (5) wurde der Glucosamin-gehalt nach Farbreaktion mit Ehrlichsreagenz (2,67% G/V p-Dimethylamino-benzaldehyd gelöst in abs. Ethanol und konz. HCl im Verhältnis 1 : 1) bestimmt.

#### *Kolorimetrie nach Swift (24) mit eigener Modifikation*

Anstelle einer Reinigung über einen Kationenaustauscher des in 10 ml dest. Wasser aufgeschlämmten Hydrolysates wurde eine Membranfiltration (0,1  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt. Dem Filtrat wurden 2 ml für die kolorimetrische Bestimmung entnommen, mit 1 ml Acetylacetonreagenz (2% Acetylaceton gelöst in 0,5 m Natriumkarbonat) versetzt und während 45 min bei + 90 °C im Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol (70 Vol.-%) und 1 ml Ehrlichsreagenz wurde die Probe 30 min bei + 40 °C im Wasserbad belassen und darauf das vorhandene Glucosamin bei 515 nm photometrisch (Beckman Acta V) bestimmt. Mit Glucosamin-HCl als Standardlösung wurde unter gleichen Bedingungen eine Eichkurve ermittelt.

#### *Automatischer Aminosäurenanalysator nach Amadò und Arrigoni (28)*

Das Hydrolysat wurde in Natriumcitrat-Puffer (0,1 m / pH 2,2) aufgeschlämmt, über eine Filternutsche (Porengröße: 5  $\mu\text{m}$ ) gereinigt und im automatischen Aminosäurenanalysator (Liquimat III, Kontron AG, Standardkolonne von 0,4 x 30 cm) getrennt. Die Stärke der Farbreaktion mit Ninhydrin wurde bei 570 nm gemessen und daraus der Glucosamingehalt durch Vergleich mit einer Standardlösung\* berechnet. Das gewählte Programm eignete sich speziell für die quantitative Bestimmung von Hexosaminen nebst Aminosäuren.

## **Resultate**

#### *Quantitative Chitin- und Schimmelpilzbestimmungen in verschimmelten Lebensmitteln*

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß aus der abgestuften Zugabe von massiv zu normal kontaminierten Lebensmitteln eine deutliche Zunahme der Schimmelpilzzahlen resultierte. Eine Florenanalyse des massiv verschimmelten Weizenmehls (Zugabe von 100 mg stark verschimmeltem Weizenmehl pro Gramm normal kontaminiertem Mehl) ergab bei Gesamtschimmelpilzkoloniezahlen von  $2,3 \cdot 10^7$  KBE/g etwa  $2 \cdot 10^7$  KBE/g von *Aspergillus flavus* und  $2 \cdot 10^6$  KBE/g von *Absidia corymbifera*. Die stark verschimmelte Maisprobe wies  $4 \cdot 10^7$  KBE/g (*Aspergillus clavatus*  $1 \cdot 10^7$  KBE/g, *A. flavus*  $2 \cdot 10^7$  KBE/g und *Mucor* sp.  $1 \cdot 10^7$

\* Aminosäurenstandardlösung mit Hydroxyprolin und Hydroxylysin/Calbiochem 893002 (Konzentration aller Aminosäuren und von Glucosamin und Galactosamin: 100 nmol/ml, Ausnahme: Hydroxyprolin mit 200 nmol/ml).

KBE/g) auf. Bei der massiv kontaminierten Mandelpulverprobe konnten  $1,2 \cdot 10^7$  KBE/g (*Mucor pusillus*  $6 \cdot 10^6$  KBE/g, *Penicillium* sp.  $6 \cdot 10^6$  KBE/g) festgestellt werden.

Bei den Chitinanalysen mit den Verfahren nach *Ride* und *Drysdale* (21), *Swift* (24) und *Benson* (5) war keine Korrelation zwischen den Glucosaminwerten von stark und sehr schwach verschimmelten Lebensmitteln nachweisbar (Tabelle 1). Beim Mandelpulver zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den sauer oder alkalisch hydrolysierten Proben. Die Glucosaminwerte bei der Säurehydrolyse nach kolorimetrischer Bestimmung nach *Swift* (24) und *Benson* (5) waren rund zwei- bis dreimal höher als nach Bestimmung mit dem Aminosäurenanalysator, die bei dem am stärksten verschimmelten Weizenmehl ( $2,3 \cdot 10^7$  KBE/g) einen Glucosamingehalt von  $166 \mu\text{g}/\text{g}$  ergab (Abb. 1). Bei Maisgrieß mit einer Koloniezahl von  $4 \cdot 10^7$  KBE/g wurden  $160 \mu\text{g}$  Glucosamin pro Gramm und bei Mandelpulver mit  $1,4 \cdot 10^7$  KBE/g  $80 \mu\text{g}$  Glucosamin pro Gramm bestimmt. Bei den schwächer kontaminierten Proben lag der Glucosamingehalt jeweils unterhalb der Nachweisgrenze des Aminosäurenanalysators (80 bis  $100 \mu\text{g}/\text{g}$ ).

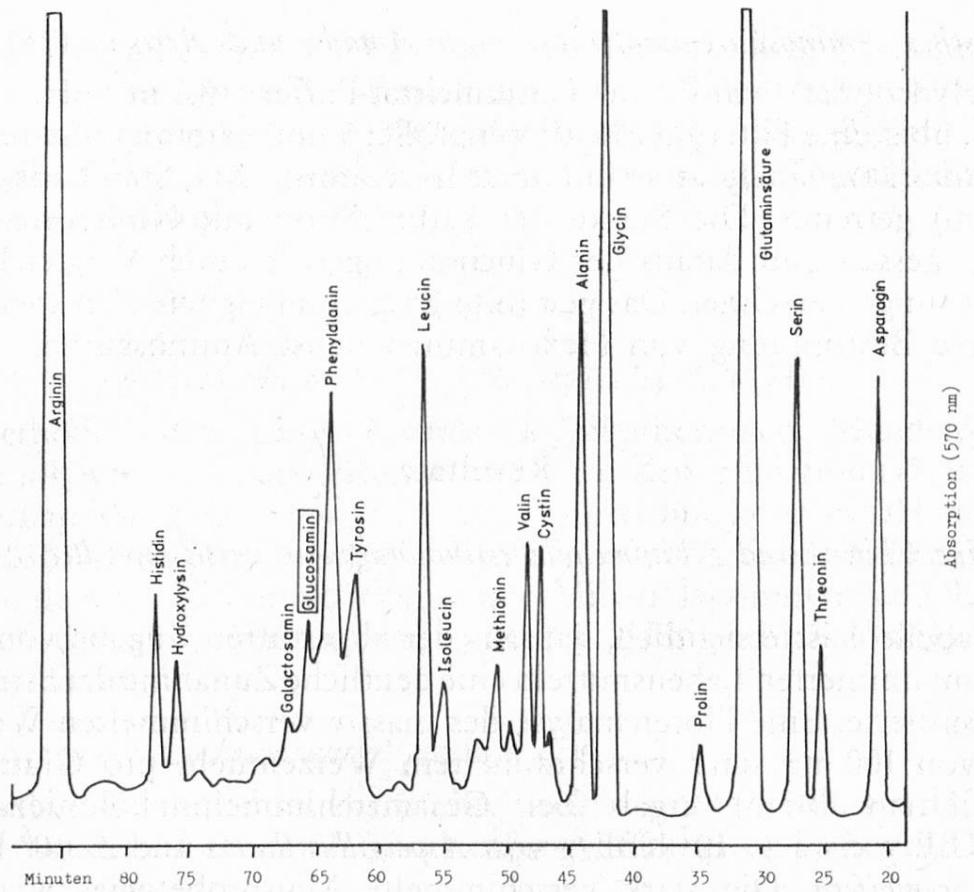


Abb. 1. Aminosäurenspektrum von stark verschimmeltem Weizenmehl, aufgenommen mit Aminosäurenanalysator nach Säurehydrolyse nach *Cochran* und *Vercellotti* (7)

Direktmikroskopischer Schimmelpilznachweis:  $7 \cdot 10^7$  Sporen/g und  $9 \cdot 10^5$  Hyphenfragmente/g

Kultureller Schimmelpilznachweis:  $2,3 \cdot 10^7$  KBE/g, davon *Aspergillus flavus* mit  $2 \cdot 10^7$  KBE/g und *Absidia corymbifera* mit  $2 \cdot 10^6$  KBE/g

Tabelle 1. Chitingehalte (als Glucosamin) in unterschiedlich stark mit Schimmelpilzen kontaminierten Produkten im Vergleich zu den nachweisbaren Schimmelpilzzahlen (KBE und mikroskopische Gesamtgehalte an Sporen und Hyphenfragmenten)

Normal und massiv kontaminierte Lebensmittel <sup>1</sup>	Chitingehalte (als Glucosamin $\mu\text{g/g}$ )				Schimmelpilzgehalte pro g		
	Alkalihydrolyse + Kolorimetrie nach <i>Ride</i> und <i>Drysdale</i> (21)	Säurehydrolyse nach <i>Cochran</i> und <i>Vercellotti</i> (7)			Koloniezählungen (KBE)	Direktmikroskopische Gesamtshimmelpilzzählungen nach <i>Blaser</i> (6)	
		Kolorimetrie nach <i>Swift</i> (24)	Kolorimetrie nach <i>Benson</i> (5)	Autom. Aminosäuren-analysator		Sporen	Hyphenfragmente
Weizenmehl		410	439	n. n.	$2,4 \cdot 10^3$	n. n.	n. n.
+ 1 (mg/g)		462	527	n. n.	$3,5 \cdot 10^5$	$5,9 \cdot 10^5$	n. n.
+ 10 (mg/g)		432	530	n. n.	$2,4 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	selten
+ 100 (mg/g)		357	537	166	$2,3 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$
Maisgrieß		307		n. n.	$2,5 \cdot 10^2$	n. n.	n. n.
+ 1 (mg/g)		402		n. n.	$1,8 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$	n. n.
+ 10 (mg/g)		372		n. n.	$1,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$
+ 100 (mg/g)		372		160	$4,0 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
Mandelpulver	114	462		n. n.	$2,5 \cdot 10^2$	n. n.	n. n.
+ 1 (mg/g)	234	757		n. n.	$8 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^5$	n. n.
+ 10 (mg/g)	102	542		80	$1,4 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	n. n.
+ 100 (mg/g)	90	441		250	$1,2 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$

<sup>1</sup> Zugabe von massiv verschimmeltem Produkt in mg pro g normal verschimmeltem Lebensmittel.  
n. n. = nicht nachweisbar

## Chitingehalt von Schimmelpilzmyzel

Die Analysen des Myzels von *Aspergillus flavus* var. *columnaris* und *A. niger* (Abb. 2 sowie Tabelle 2) mit dem Aminosäurenanalysator ergab Glucosamin-werte von 26,3 bzw. 46,3 mg/g Trockenmasse. Die Koloniezahlen nach 5 min langer Homogenisation des Myzels im Stomacher wurden bei *A. flavus* var. *columnaris* mit  $1,3 \cdot 10^{10}$  KBE/g (Abb. 2) und bei *A. niger* mit  $1,7 \cdot 10^{10}$  KBE/g Trockenmasse bestimmt.

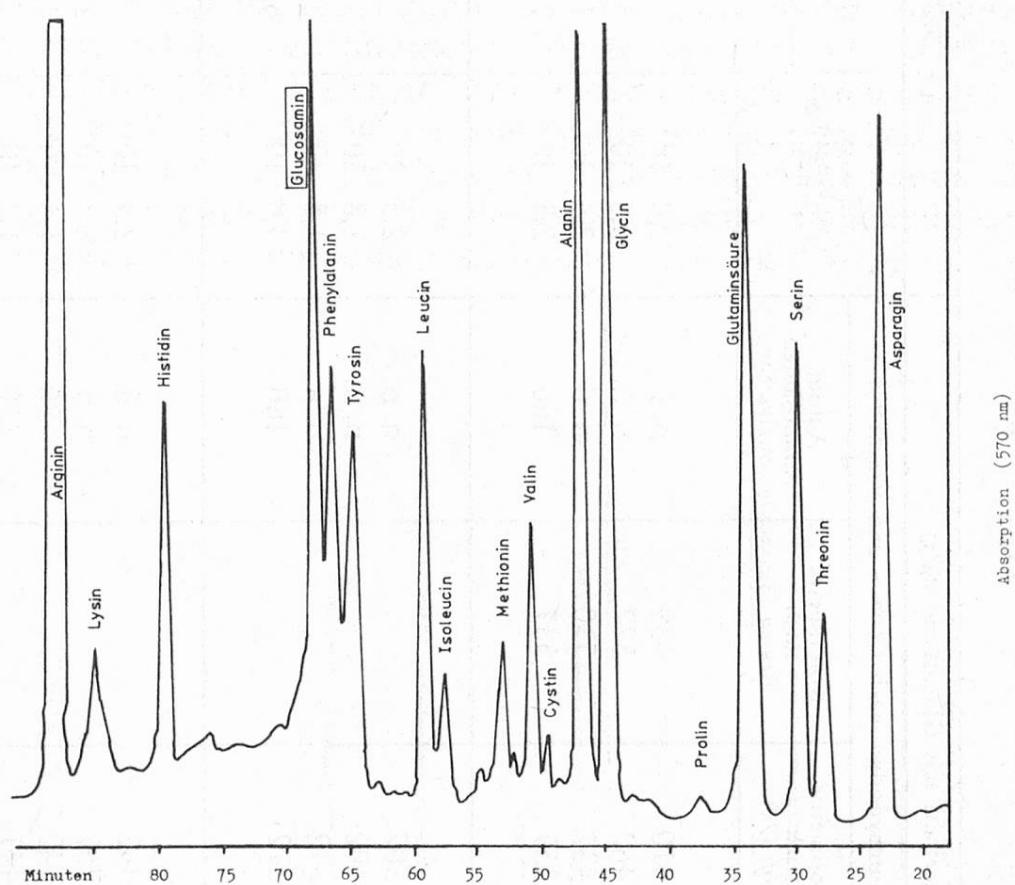


Abb. 2. Aminosäuren-Spektrum von *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, aufgenommen mit Aminosäurenanalysator nach Säurehydrolyse nach Cochran und Vercellotti (7) Standkultur in Malzextrakt-Bouillon gewachsen bei  $+25^{\circ}\text{C}/4$  d Koloniezahl:  $1,3 \cdot 10^{10}$  KBE/g Trockenmasse

## Diskussion

### Glucosaminanalyse nach Swift (24) und Benson (5)

Die mit den beiden Analysenmethoden nach *Swift* (24) und *Benson* (5) bestimmten hohen Glucosaminwerte, die nicht mit dem Verschimmelungsgrad der Lebensmittel korrelierten, sind wahrscheinlich durch unspezifische Farbreaktio-

Tabelle 2. Gehalt von Chitin (als Glucosamin) verschiedener Schimmelpilzreinkulturen. Angaben aus der Literatur im Vergleich mit eigenen Werten

Chitin als Glucos- amin (mg/g Trok- kenmasse)	Schimmelpilzart	Wachstumsform	Literatur
46,3	Aspergillus niger	Myzel	Eigene Werte
26,3	<i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>		
30–50	Allgemein	?	<i>Foster und Webber</i> (12)
580	Allomyces macrogynus	?	<i>Aronson</i> (3)
114,5	Aspergillus oryzae	Myzel	<i>Arima und Uozumi</i> (2)
84	<i>Mucor rouxii</i>	Hefen	<i>Bartnicki-Garcia</i> (4)
94		Hyphen	
180		Sporangiophoren	
21		Sporen	
80	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>lyco-persici</i>	Myzel	<i>Ride und Drysdale</i> (20)
37	<i>Mycosphaerella pinodes</i>	Myzel	<i>Ride und Drysdale</i> (21)
33,5	<i>Asochyta pisi</i>		
36	<i>Botrytis fabae</i>		
67,5	<i>Fusarium oxysporum</i>		
27,5	<i>Verticillium alboatrum</i>		
1,8	<i>Coridus versicolor</i>	Myzel	<i>Swift</i> (24)
26		Sporophoren	
43	<i>Aspergillus versicolor</i>	Myzel	<i>Jarvis</i> (16)
15	<i>A. terreus</i>		
29	<i>Rhizopus nigricans</i>		
25	<i>Geotrichum</i> sp.		
40,8	<i>Aspergillus niger</i>	Myzel	<i>Cochran und Vercellotti</i> (7)
84,9	<i>Penicillium citrinum</i>		
77,5	<i>Cladosporium cladosporoides</i>		
113,5	<i>Fusarium moniliforme</i>		

nen bedingt. *Conzález* und *Sánchez* (8) sowie *Dische* (9) haben die Entwicklung von roter Farbe bei Mischungen von nichtstickstoffhaltigen Monosacchariden und Aminokomponenten mit Ehrlichsreagenz beschrieben. Erklärt wurde dies

durch Interaktionen zwischen Monosacchariden und Aminosäuren bzw. Aminen zu Glycosylaminen, gefolgt von einer Amadori-Umwandlung zu Aminozuckern, die durch Dehydratation und Kondensation chromogene Substanzen bilden können. Um das Glucosamin sicher nachweisen zu können, müssen offenbar alle störenden chromogenen Substanzen entfernt werden. Die Reinigung der Hydrolysat über einen Kationenaustauscher kann also im Gegensatz zu den Angaben von *Cochran* und *Vercellotti* (7) sowie *Aidoo* et al. (1) nicht durch die von diesen Autoren vorgeschlagenen einfachen Filtrationen ersetzt werden.

### *Glucosaminanalyse nach Ride und Drysdale (21)*

Die nach Bestimmung der Methode nach *Ride* und *Drysdale* (21) ermittelten, ebenfalls offenbar zu hohen Glucosaminwerte sind wahrscheinlich auf unspezifische Farbreaktionen des MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolon-Hydrochlorid) zurückzuführen. So berichteten bereits *Isuji* et al. (26) bei einzelnen Monosacchariden und Aminosäuren von Interferenzen mit Glucosaminen. *Aidoo* et al. (1), die ebenfalls die Methoden von *Swift* (24) und *Ride* und *Drysdale* (21) sowie weitere Chitinanalyseverfahren bei mit *Aspergillus oryzae* fermentiertem Koji verglichen, konnten zwar eine gewisse Korrelation zwischen Pilzwachstum und Glucosamingehalt nachweisen, dies aber erst bei sehr massivem Schimmelpilzgehalt, da bereits mit  $2,5 \cdot 10^6$  Sporen pro Gramm Koji angeimpft und erst nach 40 h Bebrütung eine deutliche Zunahme des Glucosamingehaltes feststellbar war. Ähnliche Resultate erhielt *Thaler* (25), der bei Mais erst ab einer Koloniezahl von  $10^6$  KBE/g einen erhöhten Chitingehalt feststellen konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Untersuchung von stärker kontaminierten Lebensmitteln verzichtet, da eine derart massive Verschimmelung ( $> 10^7$  KBE/g) bereits von Auge gut sichtbar ist und somit jeglichen Chitinnachweis überflüssig macht.

### *Glucosaminanalysen mittels Aminosäurenanalysator*

Nach Angaben von *Cochran* und *Vercellotti* (7) sollten die Hydrolysenbedingungen von 120 min bei 95 °C nicht überschritten werden, da sonst das Glucosamin zu stark zerstört würde. Diese für Proteinhydrolysen ungewöhnlich milden Bedingungen bewirken aber eine unvollständige Proteinhydrolyse. Dies hat instabile Grundlinien bei den Aminosäurespektren zur Folge und erschwert damit die quantitative Bestimmung des Glucosamins. Eine Verlängerung der Hydrolysenzeit auf 4 bis 8 h ergab zwar bessere Auftrennung der Aminosäuren, die gemessenen Glucosaminkonzentrationen veränderten sich aber kaum. Hydrolysenzeiten von 10 und mehr Stunden bei Beibehaltung der übrigen Bedingungen wären wahrscheinlich zweckmässiger als die von *Cochran* und *Vercellotti* (7) angewandten Hydrolysenbedingungen. Dabei ist allerdings mit gewissen Glucosaminverlusten zu rechnen.

Da Schimmelpilze in Lebensmitteln unter Nesterbildung meist ziemlich inhomogen verteilt sind, müßten außerdem wesentlich größere Probemengen von 10 bis 25 g untersucht werden.

Die Auftrennung der Lebensmittelhydrolysate im Aminosäurenanalysator ergab bei den massiv verschimmelten Proben (1,2 bis  $4,0 \cdot 10^7$  KBE/g) relativ niedrige Glucosaminwerte von 80 bis 166  $\mu\text{g}/\text{g}$ , die praktisch in der Nähe der Nachweisgrenze lagen. *Cochran* und *Vercellotti* (7) beschrieben aber Glucosaminnachweisgrenzen von 18 bis 54  $\mu\text{g}/\text{g}$  Trockenmasse.

Bei der Analyse des Myzels von *Aspergillus flavus* var. *columnaris* wurde ein Glucosaminwert von 26,3 mg/g Trockenmasse und bei *A. niger* von 46,3 mg/g Trockenmasse bestimmt. Diese Zahlen stehen in guter Übereinstimmung mit zahlreichen Literaturangaben (Tabelle 2). Die gesamte Myzel- und Konidienmasse von *A. flavus* var. *columnaris* und *A. niger* ergab nach 5 Minuten langer Homogenisation im Stomacher Koloniezahlen von annähernd 1 bis  $2 \cdot 10^{10}$  KBE/g. Damit wäre bei Koloniezahlen von 1,2 bis  $4,0 \cdot 10^7$  KBE/g, wie sie bei den massiv verschimmelten Proben vorliegen, mit Glucosaminkonzentrationen von nahezu 100  $\mu\text{g}/\text{g}$ , d. h. also im Bereich der unteren Nachweisgrenze des Aminosäurenanalysators zu rechnen. Da bei niedrigen Koloniezahlen unter  $10^6$  und darunter der Glucosamin- bzw. Chitinhalt weit unter der Nachweisgrenze der angewandten Methode liegt, ist die Chitinanalyse mittels Aminosäurenanalysators ausschließlich bei Reinkulturen oder bei fermentierten Lebensmitteln mit sehr hohen Schimmelpilzgehalten, nicht aber zur Bestimmung der Höhe der Schimmelpilzkontamination bei Lebensmitteln geeignet.

### *Zusätzlich zu beachtende Aspekte*

Unabhängig von den überprüften Chitinanalysenverfahren sind noch weitere Gründe zu nennen, die den Chitinhalt als Indikator für Schimmelpilzkontaminationen in Lebensmitteln in Frage stellen:

- Die Chitinhalte verschimmelter Lebensmittel können je nach Art und Wachstumsstadium der vorhandenen Schimmelpilze stark variieren (4, 12, 16, 22).
- Durch den Befall von Lebensmitteln mit Schadinsekten kann ein erhöhter Schimmelpilzgehalt vorgetäuscht werden (10).
- Ebenfalls muß nach *Hughes* (15) und *Stahmann* et al. (23) bei Pflanzen allgemein nach *Wrench* (27) insbesondere bei Weizenmehl mit hohen Glucosaminkonzentrationen gerechnet werden.

### *Dank*

Dem Bundesamt für Gesundheitswesen Bern sind wir für die finanzielle und administrative Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu grossem Dank verpflichtet. Besonderer Dank gebührt auch *Eva Arrigoni* und *R. Amado* für die Durchführung der Aminosäurenanalysen.

## Zusammenfassung

Bei unterschiedlich stark verschimmeltem Weizenmehl, Mandelpulver und Maisgrieß wurde der Schimmelpilzgehalt kulturell und direktemikroskopisch bestimmt und mit den nach verschiedenen Glucosaminbestimmungsmethoden ermittelten Chitingehalten verglichen. Dabei war keine Korrelation zwischen Verschimmelungsgrad und Chitingehalt nachweisbar. Einzig bei Glucosaminbestimmungen mit dem Aminosäurenalysator waren erst bei sehr massiver Verschimmelung von über  $10^7$  KBE/g Glucosamingehalte im Bereich der Nachweisgrenze von etwa 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  erfassbar. Übereinstimmend damit wurden bei Reinkulturen von *Aspergillus flavus* var. *columnaris* und *A. niger* nur relativ niedrige Glucosamingehalte von 26 bzw. 46 mg/g Trockenmasse bestimmt.

Aufgrund dieser Befunde ist der Chitingehalt nur bei ganz massiv, nicht aber bei weniger stark verschimmelten Lebensmitteln als Indikator für eine Schimmelpilzkontamination geeignet.

## Résumé

La teneur en moisissures (nombre de colonies et comptage au microscope) a été déterminée sur des échantillons de farine de blé, de poudre d'amande et de semoule de maïs présentant différents degrés de moisissement. En outre, les teneurs en chitine ont également été comparées, après avoir été déterminées par différentes méthodes basées sur la détermination de la glucosamine. Une corrélation entre le degré de moisissement et la teneur en chitine n'a pas été trouvée. Par contre, la détermination de la glucosamine avec l'analysateur d'acides aminés a donné un taux de glucosamine d'environ 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  proche du seuil de perception lorsque le produit à analyser présentait une forte teneur en moisissures (plus de  $10^7$  colonies/g). Conformément à ceci les cultures pures d'*Aspergillus flavus* var. *columnaris* et d'*A. niger* ont donné des taux relativement faibles de glucosamine de l'ordre de 26 resp. 46 mg/g matière sèche.

Au vu de ces résultats, les taux de chitine ne servent d'indicateurs d'une contamination par des moisissures que lorsque les produits alimentaires sont fortement contaminés par ces dernières. Pour les produits présentant un degré de moisissement moins important, le parallèle n'est pas possible.

## Summary

The total mould contents (colony and microscopic count) of highly moulded wheat flour, almond powder and corn groats were determined and compared with the chitin contents determined by means of different methods of glucosamine determination. No correlation was found between the extent of moulding and the contents of chitin with the different compared methods. However, after glucosamine determinations in the amino acid analyzer, the contents of glucosamine within the limit at approximately 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  were only found with massive mould contamination of  $10^7$  CFU/g. In pure cultures of *Aspergillus flavus* var. *columnaris* and *A. niger*, relatively low values of glucosamine, ranging between 26 and 46 mg/g dry weight, were found.

It can therefore be stated that chitin contents can only be used as indicator for a mould contamination in highly moulded foods, but not in foods containing lower mould counts.

## Literatur

1. Aidoo, K. E., Hendry, R. and Wood, B. J. B.: Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 6–9 (1981).
2. Arima, K. and Uozumi, T.: A new method for estimation of the mycelial weight in koji. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 119–123 (1967).
3. Aronson, J. M.: The cell wall. In: *The fungi*, Vol. 1, ed. G. C. Ainsworth and A. S. Sussman, p. 49. Academic Press, New York 1965.
4. Bartnicki-Garcia, S.: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 87–108 (1968).
5. Benson, R. L.: Assay for 2-amino-2-deoxy-D-glucose in the presence of other primary amines. *Carb. Res.* **42**, 192–196 (1975).
6. Blaser, P.: Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Erfassung des Schimmelbefalls bei Lebensmitteln, 1. Mitteilung: Selektive Pilzfärbungen für den direktemikroskopischen Schimmelpilznachweis. *Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. B* **166**, 45–62 (1978).
7. Cochran, T. W. and Vercellotti, J. R.: Hexosamine biosynthesis and accumulation by fungi in liquid and solid media. *Carb. Res.* **61**, 529–543 (1978).
8. Conzáles, G. F. and Sánchez, A. G.: Reactions of aminosugars with betadikarbonyl compounds. *Adv. Carb. Chem.* **20**, 303–355 (1965).
9. Dische, Z.: Color reactions of hexosamines. In: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. 1, ed. R. L. Wfistler and M. L. Wolfrom p. 507–512. Academic Press, London 1962.
10. Doering, U. und Bielig, H. J.: Identifizierung von Insektenfragmenten, Färbung in Kakao und Zimt. *Giordan.* **74**, 362–363 (1974).
11. Donald, W. W. and Mirocha, C. J.: Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed. *Cereal Chem.* **54**, 466–477 (1977).
12. Foster, A. B. and Webber, J. M.: Chitin. *Adv. Carb. Chem.* **15**, 371–393 (1960).
13. Frank, H. K.: Aflatoxine, Bildungsbedingungen, Eigenschaften und Bedeutung für die Lebensmittelwissenschaft, S. 15. B. Behr's Verlag, Hamburg 1974.
14. Golubchuk, M., Cuendet, L. S. and Geddes, W. F.: Grain storage studies, XXX. Chitin content of wheat as an index of mold contamination and wheat deterioration. *Cereal Chem.* **37**, 405–411 (1960).
15. Hughes, R. E.: The amino sugar content of plant tissues. *Experientia* **21**, 312–313 (1965).
16. Jarvis, B.: A chemical method for the estimation of mould in tomato products. *J. Food Technol.* **12**, 581–591 (1977).
17. Müller, E. und Löffler, W.: Mykologie, 3. Auflage, S. 84. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1977.
18. Nandi, B.: Glucosamin analysis of fungus-infected wheat as a method to determine the effect of antifungal compounds in grain preservation. *Cereal Chem.* **55**, 121–126 (1978).
19. Push, D. J., Busza, F. F., Moats, W. A. and Schulze, A. E.: Direct microscopic count. In: *Compendium of methods for the biological examination of foods*, ed. M. L. Speck, p. 701. American Public Health Association, Washington 1976.
20. Ride, J. P. and Drysdale, R. B.: A chemical method for estimating *Fusarium f. lycopersici* in infected tomato plants. *Physiol. Plant. Path.* **1**, 409–420 (1971).
21. Ride, J. P. and Drysdale, R. B.: A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant. Path.* **2**, 7–15 (1972).
22. Sharma, P. D., Fisher, P. J. and Webster, J.: Critique of chitin assay technique for estimation of fungal biomass. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **69**, 479–483 (1977).

23. *Stahman, M. A., Abramson, P. and Wu, L.-C.*: A chromatographic method for estimating fungal growth by glucosamine analysis of diseased tissues. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **168**, 267–276 (1975).
24. *Swift, M. J.*: The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 321–332 (1973).
25. *Thaler, M.*: Persönliche Mitteilung. Universität Hohenheim, Inst. f. Tierernährung 1981.
26. *Tsuji, A., Kinoshita, T. and Hoshino, M.*: Analytical chemical studies on aminosugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 1505–1510 (1969).
27. *Wrench, P. M.*: The presence of hexosamine-containing glycoproteins in wheat flour. *Sci. Food Agric.* **17**, 403–407 (1966).
28. *Amadò, R. und Arrigoni, E.*: Unveröffentlicht, Institut für Lebensmittelwissenschaften ETH-Zürich.

D. Stadler

Dr. P. Blaser

Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz

Labor für Lebensmittelkrobiologie ETH-Z

Universitätsstraße 2 LFO

CH-8092 Zürich