

Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene

Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

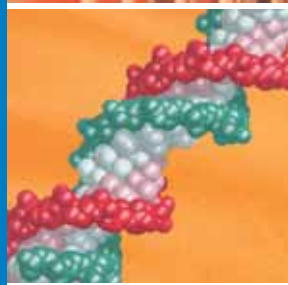
Band/Volume 97 · 6/2006



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Swiss Confederation

Eidgenössisches Departement des Innern EDI
Département fédéral de l'intérieur DFI
Federal Department of Home Affairs FDHA
Bundesamt für Gesundheit BAG
Office fédéral de la santé publique OFSP
Federal Office of Public Health FOPH



Abonnement

Schweiz jährlich Fr. 62.– (Ausland Fr. 66.–), Einzelheft Fr. 16.– (Ausland Fr. 17.–)

Erscheint sechsmal pro Jahr.

Suisse fr. 62.– par année (étranger fr. 66.–), Prix d'un fascicule fr. 16.– (étranger fr. 17.–)

Paraît six fois par année.

Für Mitglieder der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie und der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene ist der Abonnementspreis im Mitgliederbeitrag inbegriffen.

Le prix de l'abonnement est compris dans la cotisation des membres de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale et de la Société suisse d'hygiène des denrées alimentaires.

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit, Bern

Editeur: Office fédéral de la santé publique, Berne

Vertrieb: BBL, Verkauf Bundespublikationen, CH-3003 Bern

Diffusion: OFCL, Diffusion publications, CH-3003 Berne

Art. Nr. 311.000.6/06 1500 12.06 148404

www.bbl.admin.ch/bundespublikationen

© BAG OFSP UFSP SFOPH

ISSN 1424-1307

Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene

Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Band/Volume 97 · 6/2006

Wissenschaftlicher Beirat
Comité de rédaction

Dr. Jacques Olivier Bosset, Payerne
Dr. Vincent Dudler, Bern
Dr. Koni Grob, Zürich
Dr. Christopher Hohl, Basel
Dr. Bernard Klein, Epalinges
Thomas M. Lüthi, Wädenswil
Dr. Robert Sieber, Bern
Prof. Dr. Martin Sievers, Wädenswil
Prof. Dr. Michael Teuber, Zürich

Redaktion
Rédaction

Dr. Irène Studer-Rohr
Institut für Lebensmittel-
und Ernährungswissenschaften
ETH Zentrum
CH-8092 Zürich
Tel. 044 632 32 87
Fax 044 632 11 23
E-Mail: irene.studer@ilw.agrl.ethz.ch

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie
und der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene
Organe officiel de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale et de la Société
suisse d'hygiène des denrées alimentaires

Editorial

- Renato Amadò, Roger Stephan und Michael Beer:*
Eine lange Ära geht zu Ende ... 375
-

Originalarbeiten – Travaux originaux

- Andreas Baumgartner, Thomas Bischofsberger, Marco Dalla Torre, Hans Emch, Jean-Louis Gafner, J. Hummerjohann, Rolf Meyer, Christoph Müller, Peter Scheffeldt, Urs Spahr, Roger Stephan und Urs Wäspi: Leitfaden zum zweckmässigen Vorgehen beim präanalytischen Teil von mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der Lebensmittelproduktion* 377
- Andreas Baumgartner, Thomas Bischofsberger, Marco Dalla Torre, Hans Emch, Jean-Louis Gafner, J. Hummerjohann, Rolf Meyer, Christoph Müller, Peter Scheffeldt, Urs Spahr, Roger Stephan et Urs Wäspi: Guide pour le traitement approprié de la partie pré-analytique des analyses micro-biologiques dans le domaine de la production de denrées alimentaires* 393
- Pius Eberhard und Robert Sieber: Behandlung der Milch mit gepulsten elektrischen Feldern – eine Alternative zur Wärmebehandlung* 407
- Jürg Maurer, Walter Schaeren, René Badertscher, Ueli Bütikofer, Marius Collomb und Robert Sieber: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von Schafmilch schweizerischer Herkunft* 433
- Max Haldimann, Annabelle Blanc and Vincent Dudler: Mercury concentration in perch and whitefish from Swiss lakes* 454
- Karin Nowack, Katharina Wüthrich und Bernadette Oehen: Entwicklung der GVO-Verunreinigungen in biologischen und konventionellen Lebens- und Futtermitteln im Zeitraum von 2000 bis 2005* 466
- Franziska Bärtschi, Lorenz Mural, Konrad Rieder, Urs Kämpfer und Johann Schaller: Bestimmung von Lysozym in Käse mittels LC-MS* 478
- Hanna Schneider, Nadine Gerber, Barbara Friedli-Wunderli, Caspar Wenk and Renato Amadò: Quantitative Determination of Tryptophan in Wheat Flour, Milk Powder and Meat by High Performance Liquid chromatography* 489
- Adrian Auckenthaler and Annette Affolter: Sampling Strategy for Karst Waters* 499

Informationen – Informations

Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie (SGLUC)	515
Société suisse de chimie alimentaire et environnementale (SSCAE)	516
Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH)	517
Société suisse de l'hygiène des denrées alimentaires (SSHDA)	518

Editorial

- Renato Amadò, Roger Stephan and Michael Beer:*
Eine lange Ära geht zu Ende ... 375
-

Original Papers

- Andreas Baumgartner, Thomas Bischofsberger, Marco Dalla Torre, Hans Emch, Jean-Louis Gafner, J. Hummerjohann, Rolf Meyer, Christoph Müller, Peter Scheffeldt, Urs Spahr, Roger Stephan and Urs Wäspi: Guidelines for the appropriate procedure of the pre-analytical part of the microbiological analyses in the field of food production* 377
- Pius Eberhard and Robert Sieber: Treatment of milk with pulsed electric fields – an alternative heat treatment* 407
- Jürg Maurer, Walter Schaeren, René Badertscher, Ueli Bütikofer, Marius Collomb and Robert Sieber: Composition of Swiss ewes milk* 433
- Max Haldimann, Annabelle Blanc and Vincent Dudler: Mercury concentration in perch and whitefish from Swiss lakes* 454
- Karin Nowack, Katharina Wüthrich and Bernadette Oehen: GMO contamination in organic and conventional food and feedstuff in the course of the years 2000 to 2005* 466
- Franziska Bärtschi, Lorenz Mural, Konrad Rieder, Urs Kämpfer and Johann Schaller: Determination of lysozyme in cheese by LC-MS* 478
- Hanna Schneider, Nadine Gerber, Barbara Friedli-Wunderli, Caspar Wenk and Renato Amadò: Quantitative Determination of Tryptophan in Wheat Flour, Milk Powder and Meat by High Performance Liquid chromatography* 489
- Adrian Auckenthaler and Annette Affolter: Sampling strategy for Karst Waters* 499
-

Information

- Swiss Society of Food and Environmental Chemistry 515
- Swiss Society of Food Hygiene 517

Eine lange Ära geht zu Ende ...

Liebe Leserin, Lieber Leser

Sie halten mit dem Heft 6/2006 die letzte Nummer der Zeitschrift «Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene» in Ihren Händen.

Ausgangslage: Die «Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene» besitzen eine lange Tradition (2006: 97. Jahrgang) und wurden sowohl inhaltlich als auch finanziell wesentlich vom Bundesamt für Gesundheit (BAG) und vom Bundesamt für Bauten und Logistik (BBL) getragen. Die «Mitteilungen» waren auch das offizielle Publikationsorgan der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH) und der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie (SGLUC). Beide Gesellschaften haben jeweils die Beiträge der Arbeits- bzw. des wissenschaftlichen Teils der Jahrestagung in dieser Zeitschrift publiziert. Aufgrund des Sparauftrages des BAG und veränderter Begebenheiten (z.B. wird der Jahresbericht des BAG nicht mehr in den «Mitteilungen» publiziert) hat das BAG auf das Jahr 2007 die finanzielle Unterstützung eingestellt.

Diese Rahmenbedingungen haben dazu geführt, dass sich je ein Vertreter des BAG, der SGLUC und der SGLH mit der Redaktorin der «Mitteilungen» mehrfach zusammengesetzt und verschiedenste Szenarien geprüft haben. Alle Szenarien führten aber zum Schluss, dass es keine für die beiden Gesellschaften finanziell vernünftig tragbare Alternative gibt. Obwohl von allen Seiten bedauert wird, dass eine Zeitschrift mit einer fast 100-jährigen Tradition aufgegeben wird, herrscht Konsens darüber, dass eine Fortführung der «Mitteilungen» weder in gedruckter noch in elektronischer Form unter den gegebenen Umständen nicht sinnvoll ist. Es wurde daher beschlossen, dass die Mitteilungen ab dem Jahr 2007 nicht mehr erscheinen. Es sind zurzeit Bestrebungen der SGLUC im Gange, den Namen der Zeitschrift vom BAG zu übernehmen und weiterhin die Tagungsbände der Jahresversammlungen unter dem alten Markenzeichen zu veröffentlichen.

Mit der Einstellung des Erscheinens der «Mitteilungen» verlieren wir nicht einfach nur eine Zeitschrift, sondern auch eine Plattform, um z.B. Studien mit Datenerhebungen zur spezifischen Situation in der Schweiz zu veröffentlichen. Leider wurde aber auch dies in den vergangenen Jahren immer weniger genutzt. Die Anzahl eingereichter Manuskripte aus Universitäten und Hochschulen, Forschungseinrichtungen des Bundes und der Industrie, kantonalen Laboratorien und auch aus dem BAG hat in den letzten Jahren stark abgenommen. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass es sich bei den «Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und

Hygiene» nicht um ein «high ranked international journal» handelte – was ja auch nie Ziel war – es damit aber auch nicht möglich war, mit einem dort publizierten Artikel grosse Meriten zu erwerben.

Lassen Sie uns diese neue Situation als Chance im Sinne des Mottos: «Der Tradition verbunden für den Wandel der Zeit offen» sehen.

Präsident SGLUC
Prof. Dr. R. Amadò

Präsident SGLH
Prof. Dr. R. Stephan

Bundesamt für Gesundheit
Dr. Michael Beer

Zürich und Bern, Mai 2007

Leitfaden zum zweckmässigen Vorgehen beim präanalytischen Teil von mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der Lebensmittelproduktion

Guide pour le traitement approprié de la partie pré-analytique des analyses microbiologiques dans le domaine de la production de denrées alimentaires

*A. Baumgartner¹, T. Bischofsberger², M. Dalla Torre³, H. Emch⁴, J.-L. Gafner⁵, J. Hummerjohann⁵, R. Meyer⁶, Ch. Müller⁷, P. Scheffeldt⁴, U. Spahr¹, R. Stephan⁸, U. Wäspi⁹

¹ Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern

² UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee

³ Sälimrain 32, 4500 Solothurn

⁴ SAS, 3003 Bern

⁵ Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux

⁶ NESTEC SA., 1350 Orbe

⁷ Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau

⁸ Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich

⁹ COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln

*Autoren in alphabetischer Reihenfolge

Vorwort

Der Text dieser Richtlinie wurde von Mitgliedern einer Expertengruppe des Bundes, des Kantonalen Vollzugs und der Privatwirtschaft, unter der Leitung der SAS erarbeitet.

Der Geltungsbereich umfasst den präanalytischen Teil folgender Proben: Lebensmittel, Futtermittel, Umweltproben im Bereich der Produktion und des Umgangs mit Lebensmitteln, Umweltproben im Bereich der Primärproduktion sowie Fäces tierischen Ursprungs.

Dass die zur Probenerhebung eingesetzte Person entsprechend geschult sein und die Abläufe sowie die kritischen Punkte ihrer Tätigkeit kennen muss, wird als Voraussetzung angesehen und ist nicht Bestandteil dieser Richtlinie.

Gewisse Hinweise zu präanalytischen Fragen werden in einem «Guidance Document» neusten Datums der EU vermittelt (1). Der vorliegende Leitfaden gibt zu dieser Thematik jedoch einen umfassenderen Überblick und berücksichtigt auch Aspekte nationaler Prägung.

Das Dokument richtet sich vor allem an leitende Begutachter und Fachexperten als Hilfe bei der Überwachung von Prüfstellen sowie an die betroffenen Laboratorien selbst.

Préface

Le texte de cette directive a été rédigé par un groupe d'experts de la Confédération, des laboratoires cantonaux et du secteur privé qui a travaillé sous la direction du SAS.

Le domaine d'application couvre la partie pré-analytique des échantillons suivants: denrées alimentaires, aliments pour animaux, échantillons de l'environnement dans le secteur de la production et de l'utilisation de denrées alimentaires, échantillons de l'environnement dans le secteur de la production primaire et des fèces d'animaux.

Le fait que les personnes engagées pour l'échantillonnage soient formées dans leur domaine, qu'elles connaissent les déroulements et les points critiques de leur activité, est une exigence préliminaire et ne fait pas partie de ce guide.

Certaines indications concernant les questions pré-analytiques sont fournies dans l'UE dans un récent «Guidance document» (1). Le présent guide donne toutefois un aperçu plus vaste à cette thématique et prend aussi en considération les caractéristiques nationales.

Le document s'adresse surtout à des auditeurs et experts principaux comme aide lors de la surveillance des laboratoires d'essai, ainsi qu'aux laboratoires concernés.

Inhaltsverzeichnis/Table des matières

1. Einleitung	381
2. Probenahme	381
2.1 Probenahmepläne	381
2.1.1 Rechtliche Aspekte	381
2.1.2 Technische Aspekte	382
2.1.2.1 Allgemeines	382
2.1.2.2 Klassenpläne	383
2.1.2.3 Kenngrößen der Klassenpläne	383
2.1.2.4 Festlegen eines Probenahmeplans	384
2.1.2.5 Beispiele für Probenahmepläne	384
2.1.2.6 Abweichen von Probenahmeplänen	385
2.2 Geräte und Hilfsmittel	385
2.3 Probenahmetechnik	385
2.3.1 Zielsetzung der Bemusterung	386
2.3.2 Einzelne Probenahmetechniken	386
2.3.3 Probenahmemengen	386
2.3.4 Probenstabilisierung	387
2.3.5 Kennzeichnung und Probenahme-Rapport	387
3. Transport, Versand, Empfang und Lagerung von Proben	388
3.1 Rechtliche Aspekte	388
3.2 Bestehende technische Leitlinien	388
3.3 Probentransport	388
3.3.1 Allgemeine Anforderungen	388
3.3.2 Anforderungen an die Ausrüstung von Fahrzeugen zum Probetransport	389
3.4 Probenversand	389
3.5 Probeneingang und erste Beurteilung	390
3.6 Probenlagerung	390
4. Vorbereitung zur Analyse	391
4.1 Probensplitting	391
4.2 Entnahme des Untersuchungsgutes	391
4.3 Herstellung der Ausgangssuspension	392
5. Literatur	405

1. Introduction	393
2. Prise d'échantillon	393
2.1 Plans d'échantillonnage	393
2.1.1 Aspects légaux	393
2.1.2 Aspects techniques	395
2.1.2.1 Généralités	395
2.1.2.2 Plans d'organisation par classes	395
2.1.2.3 Paramètres des plans de classes	395
2.1.2.4 Élaboration d'un plan d'échantillonnage	396
2.1.2.5 Exemples de plans d'échantillonnage	396
2.1.2.6 Déviation de plans d'échantillonnage	397
2.2 Appareils et accessoires	397
2.3 Technique d'échantillonnage	397
2.3.1 Objectifs de la prise d'échantillons	398
2.3.2 Techniques d'échantillonnage isolées	398
2.3.3 Quantité de matériel à prélever	398
2.3.4 Stabilisation de l'échantillon	399
2.3.5 Désignation et rapport d'échantillonnage	399
3. Transport, expédition, réception et entreposage des échantillons	400
3.1 Aspects juridiques	400
3.2 Lignes directrices techniques existantes	400
3.3 Transport d'échantillons	400
3.3.1 Exigences générales	400
3.3.2 Exigences concernant l'équipement des véhicules transportant les échantillons	401
3.4 Expédition des échantillons	401
3.5 Réception des échantillons et première évaluation	402
3.6 Entreposage des échantillons	402
4. Préparation pour l'analyse	403
4.1 Fractionnement des échantillons	403
4.2 Prélèvement de la prise d'essai	403
4.3 Confection de la suspension de base	404
5. Bibliographie	405

1. Einleitung

Die Validierung und die Abschätzung der Messunsicherheit mikrobiologischer Untersuchungsmethoden wurde in den letzten Jahren stark vorangetrieben. In diesem Kontext entstand im Jahre 2005 ein entsprechender Leitfaden im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie, allerdings ohne Berücksichtigung des präanalytischen Teils. Zusammen mit einem immer grösser werdenden Angebot an Proficiency Testings (Laborvergleichsstudien) und Referenzmaterialien sollte dies zu einer vertrauenswürdigen, rückführbaren Analytik führen.

Trotzdem sind immer wieder grosse Unterschiede zwischen den Resultaten verschiedener Laboratorien oder Abweichungen von Sollwerten von Referenzmaterialien festzustellen. Ein Schwachpunkt bildet der präanalytische Teil. Die grösste und meist unterschätzte Fehlerquelle ist dabei der Probenahmeprozess. Die oft sehr komplexen Vorgänge der Probenahme vor Ort bis zur Entnahme des Untersuchungsgutes im Labor, werden dem Labor nicht ausreichend bekannt gegeben oder es fehlen die nötigen Kenntnisse der Faktoren und deren Einfluss auf die Probe und die zu untersuchenden Merkmale. Auch fehlt weitgehend eine Normalisierung. Es ist unabdingbar, dass die Proben welche zur Untersuchung gelangen, so erhoben, transportiert und zur Analyse vorbereitet wurden, dass sie nach wie vor repräsentativ für die Gesamtheit des zu untersuchenden Materials (Warenlos) sind.

Die Art der Probenahme, insbesondere die Probenmenge, ist wesentlich beeinflusst durch die Ziele der Untersuchung. Je nach dem, ob es sich um amtliche Untersuchungen nach einem Stichprobenplan, um epidemiologische Untersuchungen oder um ein Monitoring handelt, können sich unterschiedliche Vorgehensweisen aufdrängen.

Der präanalytische Teil der Analyse kann in folgende 3 Schritte unterteilt werden.

- Probenahme
- Transport und Lagerung
- Vorbereitung zur Analyse

2. Probenahme

Grundsätzlich ist so vorzugehen, dass die Proben bezüglich ihres mikrobiellen Status möglichst unverändert bleiben. Proben für mikrobiologische Untersuchungen sollten nur durch entsprechend instruierte Personen erhoben werden.

2.1 Probenahmepläne

2.1.1 Rechtliche Aspekte

Die Anforderungen an die Probenerhebung durch die kantonalen Behörden der Lebensmittelkontrolle (Kantonale Laboratorien) sind in der Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung geregelt (2). Viele der dort festgelegten Vorgehensweisen beschreiben eine «Gute Probenahmepraxis», die auch für Institutionen, die der Verordnung nicht unterworfen sind, fachlich richtungweisend

sind. In Artikel 78 «Probenahme» wird festgelegt, dass in der Regel Einzelproben entnommen werden. Artikel 79 «Stichprobenpläne» räumt den Kontrollbehörden jedoch die Möglichkeit ein, aus einem Warenlos mehrere Proben nach einem Stichprobenplan zu erheben. Dieser Weg kann beschriftet werden, wenn der Verdacht besteht, dass ein Warenlos den Anforderungen der Lebensmittelgesetzgebung nicht oder nur teilweise entspricht oder wenn das Untersuchungsziel mit Einzelproben nicht erreicht werden kann. Der im Kontext von Stichprobenplänen sehr wichtige Begriff des «Warenloses» ist in der Verordnung des EDI über die Kennzeichnung und Anpreisung von Lebensmitteln (LKV) definiert (3). Demgemäss gilt ein Warenlos als eine Gesamtheit von Produktions- oder Verkaufseinheiten eines Lebensmittels, das unter praktisch gleichen Umständen erzeugt, hergestellt oder verpackt wurde. Praktisch hilfreich, und darum an dieser Stelle erwähnt, ist auch die Umschreibung des Begriffes «Warenlos» in der zwischenzeitlich ausser Kraft gesetzten Probenerhebungsverordnung (PEV) (4). Gemäss der ehemaligen PEV sind Warenlose bestimmbar und abgrenzbare Gesamtheiten von Produkten (z.B. Importlose, Fabrikationschargen, Lagerbestände), die aufgrund ihrer Kennzeichnung (Chargennummer, Fabrikationsdatum usw.), ihrer Herkunft, ihrer Rohstoffe oder des Zeitpunktes und der Art der des Inverkehrbringens zusammengehören.

In der Vergangenheit haben die kantonalen Laboratorien bei mikrobiologischen Untersuchungen fast ausschliesslich mit Einzelstichproben gearbeitet. Dieses Vorgehen beruhte auf der Überlegung, mit den verfügbaren Mitteln ein Maximum von Warenlosen überprüfen zu können. Dies machte auch darum Sinn, weil die Kontrolltätigkeit zu einem grossen Teil in den Bereichen Gastronomie und Detailhandel erfolgt. Kamen Probenahmepläne zum Einsatz, so haben die kantonalen Laboratorien diese ohne Zutun der Bundesbehörden festgelegt. In grossen Unternehmungen der Lebensmittelbranche, insbesondere in solchen, die im internationalen Handel tätig sind, kommen Probenahmepläne im Rahmen der Selbstkontrolle häufiger zur Anwendung.

Das Bestreben der Schweizerischen Bundesbehörden im Handel mit Lebensmitteln tierischer Herkunft mit der Europäischen Union (EU) Äquivalenz zu erlangen, hatte zur Folge, dass die nationale Gesetzgebung angepasst werden musste. Unter anderem wurden in die Hygieneverordnung in grösserem Umfang mikrobiologische Kriterien der EU übernommen und damit eigene Grenz- und Toleranzwerte eliminiert, ersetzt oder modifiziert. Ein Teil dieser Kriterien ist nun zwingend an Probenahmepläne gekoppelt (5).

2.1.2 Technische Aspekte

2.1.2.1 Allgemeines

Um eine ausreichende hygienische Qualität von Lebensmitteln zu erreichen, genügt das Befolgen einer guten Herstellungspraxis (GHP) und das Durchführen sporadischer, mikrobiologischer Untersuchungen nicht. Vielmehr sind produk-

tionsspezifische Gefahren zu identifizieren, daraus erwachsende Risiken abzuschätzen und Massnahmen zu deren Beherrschung festzulegen. In der Regel geschieht dies mit dem sogenannten Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System. Die mikrobiologische Analytik nimmt im Gesamtkontext dieses Sicherheitssystems einen wichtigen Platz ein, sei es bei der Qualitätsüberprüfung von Rohstoffen oder bei Endproduktkontrollen (Verifikation). Es liegt auf der Hand, dass die Aussagekraft einer Analytik in Bezug auf eine Charge von der Anzahl untersuchter Proben abhängt. Je mehr Proben pro Einheit analysiert werden, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein allfällig vorhandener, unerwünschter Keim entdeckt wird. Wie viele Proben sinnvollerweise analysiert werden sollten, hängt z.B. vom Umfang eines zu beprobenden Warenloses, seiner Homogenität und der Häufigkeit der nachzuweisenden Parameter ab. Die entsprechend eingesetzten Untersuchungsschemata werden als Probenahmepläne bezeichnet. Wegweisend auf diesem Gebiet sind die Arbeiten und Empfehlungen der «International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)» (6).

2.1.2.2 Klassenpläne

2.1.2.2.1 2-Klassenplan

Im 2-Klassenplan kommen meistens Anwesenheits-/Abwesenheitstests zur Anwendung. Sie werden bei Untersuchungen auf pathogene Erreger, wie z.B. Salmonellen, eingesetzt.

2.1.2.2.2 3-Klassenplan

Bei 3-Klassenplänen gelangen auch quantitative Methoden zum Einsatz, wobei eine erlaubte und eine höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter zugrunde gelegt wird. Dabei darf nur eine bestimmte Anzahl Proben die höchstzulässige Keimzahl erreichen, nicht aber überschreiten.

2.1.2.3 Kenngrössen der Klassenpläne (7)

k: Klasse

n: Zahl der zu bemusternden und untersuchenden Proben pro Warenlos oder gemäss Hygieneverordnung des Eidgenössischen Departement des Innern (5) die Anzahl Probeinheiten der Stichprobe

m: erlaubte Keimzahl pro Gramm oder Milliliter

M: höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter

c: – (2-Klassenplan): höchste Zahl an Proben, bei denen «m» überschritten sein darf

– (3-Klassenplan): höchste Zahl an Proben, bei denen «m», nicht jedoch «M» überschritten sein darf

m: erlaubte Keimzahl pro Gramm oder Milliliter

M: höchstzulässige Keimzahl pro Gramm oder Milliliter

Probenahmepläne können sich auch auf andere Probenmengen, als 1 g oder 1 ml beziehen (z.B. auf 25 g). Im Vergleich mit der in der Schweiz rechtsgültigen Hygieneverordnung (5) entspricht «m» dem «Toleranzwert» und «M» dem «Grenzwert». Grenzwerte sind sogenannte Lebensmittelsicherheitskriterien, Toleranzwerte können mikrobiologische Hygienekriterien für genussfertige Endprodukte oder für Herstellungsprozesse sein.

2.1.2.4 Festlegen eines Probenahmeplans

Dem Festlegen eines Probenahmeplans gehen mikrobiologische, epidemiologische, medizinische und statistische Überlegungen voraus. So wird berücksichtigt, welche Gefährdung von einem zu kontrollierenden Lebensmittel ausgeht und wie sich die Zielgruppe der Konsumenten zusammensetzt. Ein zu beachtender Faktor ist auch die Gefährlichkeit eines auszuschliessenden Mikroorganismus. Je nach Risikostufe sind 5, 10, 15, 20, 30 oder 60 Parallelanalysen zu untersuchen. Auf weiterführende Erläuterungen zu diesem Punkt wird an dieser Stelle verzichtet und auf die umfangreiche Spezialliteratur verwiesen, insbesondere auf ein entsprechendes Standardwerk der ICMSF (6).

2.1.2.5 Beispiele für Probenahmepläne

Die nachfolgenden Pläne sind von der EU vorgeschrieben und ins schweizerische Recht übernommen worden (5). Für Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Lebensmittelkontrolle können die 3 nachfolgenden Beispiele auch als Einzelstichproben angewendet werden, sofern bei negativem Ergebnis einer Einzeluntersuchung keine Rückschlüsse auf das ganze Warenlos gezogen werden. Bei dem Beispiel unter 2.1.2.5.3 kann dabei eine Überschreitung von «m» nicht beanstandet werden, gibt aber einen Hinweis, dass Probleme bestehen könnten.

2.1.2.5.1 Genussfertige Lebensmittel, welche die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* erlauben

$$k=2/n=5/c=0/m=M=100 \text{ KBE pro Gramm}$$

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 5 Proben zu berücksichtigen. Weil nur «M» festgesetzt wurde und «c» Null ist, darf keine dieser Proben grössere Werte als 100 KBE *L. monocytogenes* pro Gramm aufweisen. Bei diesem Beispiel handelt es sich um einen 2-Klassenplan mit quantitativem Nachweisverfahren.

2.1.2.5.2 *Enterobacter sakazakii* in Kindernährmitteln

$$k=2/n=30/c=0/m=M=\text{nicht nachweisbar in 10 Gramm}$$

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 30 Proben zu berücksichtigen. Weil nur «M» festgesetzt wurde und «c» Null ist, darf in keiner der 30 Proben *E. sakazakii* nachweisbar sein. In diesem Fall handelt es sich um einen 2-Klassenplan kombiniert mit einem Anwesenheits-/Abwesenheitstest. Die hohe

Probenzahl von 30 («n») hängt damit zusammen, dass hochempfindliche Personen (Säuglinge) geschützt werden sollen.

2.1.2.5.3 Koagulase positive Staphylokokken in Rohmilchkäsen

$k=3/n=5/c=2/m=10000$ KBE pro Gramm/M=100000 KBE pro Gramm

Bei entsprechenden Untersuchungen sind pro Warenlos 5 Proben zu berücksichtigen. Zwei davon dürfen 10000 KBE pro Gramm («m») überschreiten, keine jedoch 100000 KBE pro Gramm («M»). Hier handelt es sich um einen 3-Klassenplan mit einem quantitativen Testverfahren.

2.1.2.6 Abweichen von Probenahmeplänen

Untersuchungen nach Probenahmeplänen können sich sehr aufwendig gestalten, vor allem wenn die Anzahl zu untersuchender Proben («n») hoch ist. Artikel 60 der Hygieneverordnung sieht darum vor, dass unter gewissen Bedingungen von den rechtlichen Anforderungen abgewichen werden darf (5). Unter anderem kann der Umfang der zu tätigen Analysen reduziert werden, wenn sich mittels einer Dokumentation belegen lässt, dass die Produktesicherheit durch das HACCP-System gewährleistet ist. Weiter dürfen alternative Untersuchungskonzepte zur Anwendung gelangen, wenn diese nachweislich eine vergleichbare Wirkung erzielen, wie die in der Verordnung vorgeschriebenen Probenahmepläne.

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel werden eingesetzt, um eine korrekte Probenahme zu ermöglichen oder zu erleichtern. Entnahmegерäte wie Löffel, Schöpfkellen, Sonden, Stecher, Bohrer, Pipetten, Messer, Scheren, Pinzetten, Schaber, Rührer usw. müssen sauber, steril und trocken sein. Sie sind in steriler, keimdichter Verpackung mitzuführen (8). Tupfer, Wattestäbchen und Ähnliches können, falls notwendig, mit definierten Mengen steriler Flüssigkeit angefeuchtet werden.

Probenbehälter aus Glas, Kunststoff oder Metall müssen steril und frei von Substanzen sein, welche einen hemmenden Einfluss auf den Analyten haben, oder zu ungewollter Verdünnung führen können. Sie müssen derart verschlossen werden können, dass keine Kontaminationen und Verluste von Probenmaterial auftreten.

2.3 Probenahmetechnik

Der mikrobielle Status eines Lebensmittels ändert sich bei Herstellung, Lagerung, Verpackung, Transport und Abgabe an den Konsumenten. Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht werden kann (9).

Aus diesem wichtigen Grundsatz folgen die einzelnen Empfehlungen zur Probenahmetechnik, die in diesem Kapitel beschrieben sind.

2.3.1 Zielsetzung der Bemusterung

Die Auswahl des Probenmaterials und des Zeitpunktes der Bemusterung ist also wesentlich von der Zielsetzung der Untersuchung abhängig: Geht es um die amtliche Lebensmittelkontrolle, um die privatwirtschaftliche Betriebsüberwachung im Rahmen der Selbstkontrolle, um ein Monitoring oder um die Aufklärung von Erkrankungsfällen? Daraus können unterschiedliche Probenahmepläne folgen (siehe Kap. 2.1).

2.3.2 Einzelne Probenahmetechniken

In der Regel ist eine aseptische Probenahme vorzusehen, aber bei zum direkten Verkauf bestimmter Ware kann es notwendig sein, betriebseigenes Besteck zu verwenden (z.B. Glacéportionierer), wenn man wissen will «wie der Konsument das Lebensmittel erhält».

Auf sämtliche Probenahmetechniken kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Neben Abschnitt 4 von Kapitel 56 des «alten» SLMB (8) und einschlägiger Fachliteratur (z.B. 10) wird besonders die Konsultation internationaler Normen empfohlen [z.B. ISO 17604:2003 (11), ISO 18593:2004 (12) und ISO/DIS 707 I IDF 50 (13)]. In diesen Normen sind Probenahme-Instrumente und ihre Verwendung (z.B. Käsebohrer), destruktive und nichtdestruktive Probenahmeverfahren sowie die Auswahl der Probenahmestellen (z.B. am Schlachtkörper) genau beschrieben.

Wichtige Grundprinzipien sind:

- Die mikrobiologische Probenahme erfolgt stets vor derjenigen für chemische oder andere Untersuchungen.
- Aseptische Probenahme: Probenkontaminationen durch defekte Packungen, unsachgemäße Öffnung, kontaminierte Probenahmewerkzeuge und Probenbehälter, durch die Hände oder aerogen bedingte Kontaminationen sind zu vermeiden.
- Während der Probenahme darf die vorhandene Keimzahl nicht verringert werden, z.B. durch unvollständiges Verdunsten lassen des Ethanols oder unvollständiges Erkalten lassen des Probenahmewerkzeuges nach dem Abflammen.
- Bei invasiven Methoden kann es je nach Fragestellung nötig sein, vor der eigentlichen Probenahme die Oberflächenschicht aseptisch zu entfernen.

2.3.3 Probenahmemengen

Die Probenmenge richtet sich nach dem Untersuchungsziel, sollte aber in der Regel mindestens 100 g betragen. Die Menge einer Oberflächenprobe (z.B. Käserinde) kann geringer als 100 g sein (13). In allen Fällen ist aber ein besonderes Augenmerk auf die Homogenität der Probe zu richten und entsprechend zu bemustern. Vorverpackte Ware sollte möglichst in Originalverpackung erhoben werden, aus loser Ware soll eine Mischprobe aus mehreren Portionen von jeweils 10–50 g hergestellt werden.

Bei nichtdestruktiven Verfahren ist in der Regel eine Probefläche von mindestens 100 cm² abzudecken.

Inhomogene Proben sind, wenn möglich, als Ganzes zu erheben (z.B. Cremeschnitte).

2.3.4 Probenstabilisierung

Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht werden kann.

In der Regel dürfen Proben für mikrobiologische Untersuchungszwecke keine Konservierungsstoffe zugesetzt werden. Werden diese trotzdem eingesetzt (z.B. vom Prüflabor verlangt), so muss sichergestellt sein, dass ihre Eigenschaften die nachfolgende Analyse nicht stören. Einsatz und Menge des Konservierungsstoffs müssen im Probenahme-Rapport notiert werden.

So sind z.B. bei Trinkwasser allfällige inhibitorische Mengen Chlor durch einen Zusatz von Natriumthiosulfat zu inaktivieren. Zu diesem Zweck wird den Probenflaschen vor dem Sterilisieren 0,1 ml Natriumthiosulfatlösung pro 100 ml Probenvolumen zugesetzt (9). Das Einfrieren von Probenmaterial bis zur Analyse ist nur dann zulässig, wenn durch vorausgehende repräsentative Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass keine signifikante Veränderung der nachzuweisenden Parameter stattfindet.

2.3.5 Kennzeichnung und Probenahme-Rapport

Jede Probe ist sofort nach ihrer Erhebung eindeutig und unverwechselbar zu kennzeichnen.

Der Probenahme-Rapport sollte folgende Einzelheiten enthalten:

- Ort, Datum und falls relevant, Zeit der Probenahme
- Probeninhaber
- Grund der Probenahme
- Probenehmende Person und ggf. Zeugen
- Genaue Probenbeschreibung (z.B. Eigenschaften, Verpackung, Identifizierungscode des Warenloses, Produzent, Datum der Herstellung, angegebene Haltbarkeit und Aufbewahrungsbedingungen, Kerntemperatur eines Vergleichsproduktes, erhobene Menge/Stückzahl)
- Insgesamt vorhandene Menge
- Anlässlich der Probenahme allfällig zugegebene Hilfsmittel, wie Konservierungsstoffe, Puffer, Nährmedien
- Relevante Anmerkungen zu den Probenahmeumständen (Temperatur, Feuchtigkeit, sensorischer Zustand des Untersuchungsgutes, präzise Angabe der Probenahmetechnik, aufgetauchte Probleme)
- Adresse, wohin die Proben überbracht oder gesendet werden sollen

3. Transport, Versand, Empfang und Lagerung von Proben

Das Ziel ist, die Proben so zu transportieren und zu lagern, dass das Untersuchungsergebnis möglichst nicht verfälscht wird. Sie sollen so rasch als möglich zur Untersuchung gebracht werden. Ausnahmen sind Haltbarkeitsbestimmungen, bei denen die Proben bis zur Analyse nach fixierten Zeitspannen unter definierten Bedingungen gelagert werden.

3.1 Rechtliche Aspekte

Die Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung hält in Artikel 85 «Transport» fest, dass Proben, zusammen mit dem Probenahmerapport, so aufbewahrt und transportiert werden müssen, dass das Untersuchungsergebnis nicht verfälscht wird (2).

3.2 Bestehende technische Leitlinien

Die Vollzugsverordnung legt lediglich die Grundanforderungen an den Transport von Proben fest. Einen Schritt weiter geht die Ausgabe 1985 von Kapitel 56 «Mikrobiologie» des Schweizerischen Lebensmittelbuches, wo zusätzlich folgende Anweisung gegeben wird (8):

«Leichtverderbliche und gekühlte Lebensmittel sind nicht bei über +5° C zu transportieren; sie dürfen nicht gefrieren.»

In der Ausgabe 2000 von Kapitel 56 «Mikrobiologie» wird der Transport nicht mehr direkt angesprochen und lediglich folgende Aussage gemacht:

«Proben sind derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobiologische Status nicht verfälscht werden kann» (9).

In der ISO-Norm 7218:1996 werden ebenfalls Anforderungen zu Transport, Empfangnahme und Lagerung von Proben festgehalten (14).

3.3 Probentransport

3.3.1 Allgemeine Anforderungen

Gewisse Prüfstellen erheben eigenständig Proben, so zum Beispiel betriebsinterne Laboratorien. Es sind auch Dienstleistungslaboratorien tätig, welche im Auftrag von Kunden integrale Aufträge von der Erhebung von Proben, über die Untersuchung bis hin zur Interpretation von Prüfergebnissen abwickeln. Beim Transport der Proben an den Ort der Untersuchung muss beachtet werden, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht wird. Verfälschungen können sich durch Absterben oder Vermehrung von Keimen ergeben. Es liegt in der Eigenverantwortung der Proben erhebenden Prüfstelle zu beurteilen, ob für den Transport Massnahmen wie Tiefkühlung oder Kühlung zu treffen sind. Beachtet werden müssen die Art der zu transportierenden Proben (Verderblichkeit), die Umgebungstemperatur sowie die Transportzeit. Ebenfalls zu beachten sind die in der Hygieneverordnung für gewisse Lebensmittelkategorien vorgeschriebenen Kühltemperaturen. So muss Hackfleisch

beispielsweise bei 2°C und pasteurisierte Milch bei 5°C gelagert werden (5). Abweichungen von diesen rechtlichen Vorgaben sind nur zulässig, wenn auf Grund einer Risikobeurteilung gezeigt wird, dass eine Verfälschung des mikrobiologischen Status ausgeschlossen werden kann.

3.3.2 Anforderungen an die Ausrüstung von Fahrzeugen zum Probetransport

Unter Umständen müssen Proben in weiter Umgebung erhoben werden, so dass der Einsatz eines Fahrzeuges nötig ist. Dieses muss nötigenfalls mit Kühleinrichtungen ausgerüstet sein, so dass die unter 3.3.1 festgehaltenen allgemeinen Anforderungen erfüllt sind. Ist ein solches Fahrzeug mit einem Kühlschrank ausgerüstet, so sollte die Kühlung auch gewährleistet sein, wenn das Fahrzeug stillsteht. Bevor die erste Probe in den Kühlschrank überführt wird, ist zu überprüfen, dass die benötigte Betriebstemperatur (in der Regel $\leq 5^\circ\text{C}$) erreicht ist. Werden an mehreren Standorten Proben erhoben, so ist die Temperatur der Kühleinrichtung jedesmal zu messen und festzuhalten. Es muss eine zur Temperaturmessung geeignete und kalibrierte Einrichtung (z.B. Infrarotthermometer, Temperaturlogger) eingesetzt werden.

Im Fahrzeug müssen die zur Probenahme geeigneten und sterilen Behältnisse und Instrumente vorhanden sein und ebenso die zur eindeutigen Kennzeichnung von Proben benötigten Utensilien.

Für den Fall, dass ein im Fahrzeug installierter Kühlschrank den Dienst versagt oder die benötigte Kühlleistung nicht erbringt, muss das entsprechende Vorgehen verbindlich geregelt sein.

In Fällen, wo nicht sicher beurteilt werden kann, ob in einer ungekühlten Probe eine Keimvermehrung erfolgen kann, sind vorsorglich alle zum bakteriologischen Untersuch erhobenen Proben bei $\leq 5^\circ\text{C}$ zu kühlen.

Wird Gefriergut erhoben, so ist sicherzustellen, dass dieses bis zum Eintreffen im Prüflabor gefroren bleibt. Dies kann beispielsweise durch eine im Fahrzeug eingebaute Tiefkühleinrichtung oder Mitführen ausreichender Mengen Trockeneis bewerkstelligt werden.

3.4 Probenversand

Häufig erhalten Laboratorien Proben von Kunden zugestellt, sei es durch Kurier oder per Post. Falls Mängel festgestellt werden, sollte dies den Kunden mitgeteilt werden. Proben sind derart zu versenden, dass der mikrobielle Status nicht verändert werden kann. Konkret heisst dies, dass Kontaminationen aus der Umwelt durch Verwendung entsprechender Probebehälter und geeignetem Verpackungsmaterial ausgeschlossen werden müssen. Falls nötig ist durch Massnahmen wie Kühllhaltung zu verhindern, dass in Proben ein Keimwachstum während des Versandes stattfinden kann.

3.5 Probeneingang und erste Beurteilung

Bei von der Prüfstelle in Empfang genommenen Proben ist, falls relevant, die Temperatur zu messen und protokollieren. Weiter ist festzuhalten, ob die Probenmenge ausreichend ist, die Probenbehälter intakt sind und Kontaminationen durch die Umwelt ausgeschlossen werden können. Falls hinsichtlich dieser Punkte Abweichungen festgestellt werden, ist Rücksprache mit dem Auftraggeber zu nehmen, das Ausführen der Analyse zu verweigern und neues Probenmaterial zu verlangen (15). Falls dies nicht möglich ist und trotzdem eine Analyse vorgenommen werden muss, darf der Prüfbericht nur unter Vorbehalt und Vermerk der beim Probeneingang festgestellten Mängel abgegeben werden (15).

Beim Eingang der Proben werden diese mit einer eindeutigen, laboreigenen Bezeichnung versehen. Das verwendete System muss so ausgelegt sein, dass jederzeit die Rückführbarkeit auf die ursprüngliche Bezeichnung der Probe durch den Auftraggeber oder Kunden gewährleistet ist. Die Bezeichnung muss auch sicherstellen, dass in den folgenden Untersuchungsschritten jegliche Verwechslung ausgeschlossen ist. Ebenso ist das Eingangsdatum und falls relevant die Eingangszeit zu protokollieren.

3.6 Probenlagerung

In Räumlichkeiten, wo Proben entgegengenommen, gelagert und weiterverteilt werden, sollten die Platzverhältnisse so ausgelegt sein, dass die zum Ausschluss von Verwechslungen benötigte Übersichtlichkeit gewährleistet ist. Die Innenluft darf (z.B. durch Lüftungen, Ventilatoren, Klimaanlage, anderes gelagertes Material) nicht derart beeinträchtigt werden, dass relevante Kontaminationen von Proben möglich sind oder ein anderer verfälschender Einfluss auf Analyse besteht. Dies gilt insbesondere für Proben aus dem Bereich der Primärproduktion. Unter Umständen ist eine Risikobeurteilung unter Einbezug von Keimzahlbestimmungen in der Innenluft vorzunehmen.

Proben sind bis zur Untersuchung sachgerecht zu lagern. Bei mikrobiell verderblicher Ware darf die Kühlkette nur so lange unterbrochen werden, als es für die Eingangskontrolle und Kodierung durch die Prüfstelle nötig ist.

Werden Proben aufgeteilt (beispielsweise für mikrobiologische und chemische Untersuchungen), so darf dabei der mikrobiologische Status nicht verändert werden (siehe 4.1).

Proben, in denen die Vermehrung von Bakterien erwartet werden muss, sollten möglichst innerhalb von 24 Stunden nach Eintreffen in der Prüfstelle untersucht werden. Bei längerer Lagerung unter Kühlung besteht die Gefahr, dass sich psychrotrophe Mikroorganismen vermehren oder gewisse Keimarten absterben.

Für den Fall einer Wiederhol- oder Zweitanalyse sind Proben so zu lagern, dass sie nicht durch andere Proben kontaminiert werden können und sich der mikrobielle Status nicht verändert. Dabei ist zu bedenken, dass sich manche Keime, wie z.B. Listerien auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren können.

4. Vorbereitung zur Analyse

Vielfach beginnt erst hier die «eigentliche Laborarbeit». Für die Beschreibung der einzelnen Schritte (Probensplitting, Entnahme des Untersuchungsgutes und Herstellung der Ausgangssuspension) gibt es viele Beispiele in der Literatur. An dieser Stelle werden in erster Linie folgende internationale Normen als Referenz verwendet: ISO/DIS 7218 (15), ISO 6887-1, -2, -3 & -4 (16), ISO/DIS 8261 (17).

4.1 Probensplitting

Werden von einer Probe mikrobiologische und chemische Analysen verlangt, so muss das notwendige Probensplitting zwingend unter aseptischen Bedingungen erfolgen, d.h. die Entnahme des Untersuchungsgutes für die mikrobiologische Analyse findet zuerst statt. Bis zum Splitting muss die Probe so gelagert werden, dass der mikrobielle Status nicht verfälscht wird. Entsprechendes gilt für Rückstellmuster.

Dabei ist zu beachten, dass die chemischen Analyten nicht verändert werden (z.B. Analyse auf flüchtige Verbindungen oder Malachitgrün).

4.2 Entnahme des Untersuchungsgutes

Von der Probe [«laboratory sample», ISO 7002 (18)], die ins Labor gesendet wird, wird in der Regel ein Teil in der Analyse eingesetzt. Dies wird im Folgenden «Untersuchungsgut» benannt [«test portion», ISO 7002 (18)].

Grundsätzlich werden aseptische Techniken verwendet.

Sofern keine speziellen anderen Anforderungen bestehen, werden tiefgekühlte Proben bei max. 37 °C so schnell wie möglich aufgetaut und untersucht (9).

Bei inhomogenen Proben sollte das Untersuchungsgut derart entnommen werden, dass die unterschiedlichen Komponenten wenn möglich entsprechend ihren Anteilen berücksichtigt werden (z.B. Weichkäse mit genussfertiger Rinde: 10 % Rinde und 90 % Teig). Es sind aber auch andere Anteilszusammensetzungen möglich, je nach Zielsetzung der Untersuchung. Daher muss grundsätzlich zwischen dem Auftraggeber und dem Labor eine Vereinbarung bestehen, welche Anteile der Probe untersucht werden sollen.

Manchmal ist es üblich, dass Proben gepoolt werden. So werden z.B. bei der bakteriologischen Untersuchung von Schlachtkörpern vor der Analyse die von den verschiedenen Stellen entnommenen Proben des zu beprobenden Schlachtkörpers entsprechend gepoolt und eine einzige Analyse durchgeführt (11).

Die Analyse von Poolproben kann allerdings problematisch werden, falls das Vorgehen nicht festgelegt ist oder keine Absprache mit dem Auftraggeber besteht. Für die Interpretation des Resultates ist es wichtig, dass ein genauer Beschrieb der Probenzusammensetzung vorliegt.

Von inhomogenen Proben werden nach Möglichkeit mindestens 40 g entnommen, von homogenen Proben mindestens 10 g oder 10 ml (je nach Angaben des spezifischen Probenvorbereitungs-Standards).

Werden qualitative Methoden verwendet, sollten in der Regel mindestens 25 g entnommen werden (5, 19).

4.3 Herstellung der Ausgangssuspension

Zur Herstellung der Ausgangssuspension ist in der Regel ein Homogenisierungsschritt (Ausnahme: homogene Flüssigkeiten) mit dem entnommenen Untersuchungsgut und ein Verdünnungsschritt mit einer Verdünnungslösung notwendig. Die daraus resultierende Ausgangssuspension ist meistens eine 1:10 Verdünnung (in der Regel 10 g oder ml homogenes Untersuchungsgut + 90 g oder ml Verdünnungslösung).

Die Ausgangssuspension wird entweder als Erstanreicherungsmedium verwendet (qualitative Verfahren) oder es werden aus ihr weitere dezimale Verdünnungen hergestellt (quantitative Verfahren).

Hinsichtlich Homogenisation und Verdünnung sind ebenfalls die relevanten Normen zu konsultieren (v.a. 15, 16, 17). Dabei ist besonders zu beachten, dass je nach Matrix und Untersuchungskeim unterschiedlich verfahren werden kann oder werden muss. Beispiele sind das Schmelzen von Butter (17), die Verwendung von Natriumcitrat bei der Verdünnung von Käse (17), oder die Verwendung spezieller Erstanreicherungsmedien beim Salmonellennachweis von Kakao und kakaohaltigen Produkten sowie sauren oder säuernden Produkten (20). Werden Lebensmittelzusätze untersucht, die inhibitorische Substanzen (z.B. Zwiebelpulver, Knoblauch, Origano, Pfeffer, bestimmte Teesorten und Kaffee) enthalten, so müssen grössere Verdünnungen (z.B. 1/100 für Zimt und Origano, 1/100 für Gewürznelken) verwendet werden oder K_2SO_4 zum gepuffertem Peptonwasser zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben werden (16, part 4).

1. Introduction

Ces dernières années, des études intensives se sont consacrées à la validation et l'estimation de l'incertitude de mesure dans le domaine des méthodes d'analyses microbiologiques. Dans ce contexte, un guide correspondant à ces chapitres a été publié en 2005 pour le domaine de la microbiologie alimentaire et de l'environnement, sans toutefois considérer la partie pré-analytique. Avec une offre croissante de tests d'aptitude (études comparatives de laboratoires) et de matériaux de référence, la réalisation d'une analytique fiable et de bonne traçabilité devrait être réalisable.

Malgré cela, on trouve toujours et encore de grandes divergences entre les résultats de différents laboratoires ou des écarts significatifs par rapport aux valeurs cibles des matériaux de référence. La partie pré-analytique demeure un point faible à cet égard. La plus grande source d'erreur, qui est dans la plupart des cas sous-estimée, réside dans le processus d'échantillonnage. Les étapes parfois très complexes entre la prise de l'échantillon sur place et la pesée de la prise d'essai au laboratoire, ne sont pas communiquées suffisamment en détail au laboratoire. Les facteurs et leur influence sur l'échantillon et les paramètres à analyser ne sont pas assez connus. Une normalisation fait aussi largement défaut. Il est indispensable que les échantillons à analyser soient prélevés, transportés et préparés à l'analyse de telle manière qu'ils soient constamment représentatifs de l'ensemble du matériel à tester (lot de marchandise).

Le type d'échantillonnage, en particulier la quantité d'échantillon, est essentiellement déterminé par les objectifs de l'analyse. Des procédés différents peuvent s'imposer selon qu'il s'agit d'analyses officielles exécutées selon un plan d'échantillonnage élémentaire, d'examens épidémiologiques ou d'un monitoring.

La partie pré-analytique des analyses peut se diviser selon les 3 étapes suivantes.

- Prise d'échantillon
- Transport et entreposage
- Préparation pour l'analyse

2. Prise d'échantillon

En principe il faut procéder de manière à ce que l'échantillon conserve son statut microbiologique autant que possible inchangé. Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ne devraient être prélevés que par des personnes formées de manière appropriée.

2.1 Plans d'échantillonnage

2.1.1 Aspects légaux

Les exigences liées au prélèvement des échantillons par les autorités cantonales (Laboratoires cantonaux) du contrôle des denrées alimentaires sont réglées dans l'Ordonnance du DFI pour l'exécution de la Loi sur les denrées alimentaires (2). De nombreuses marches à suivre mentionnées dans cette ordonnance décrivent une

«bonne pratique d'échantillonnage», indiquant des manières scientifiquement admissibles, valables également pour des institutions qui ne sont pas soumises à l'ordonnance. L'article 78 «Prélèvement des échantillons» mentionne qu'en règle générale, on prélève un échantillon élémentaire par marchandise. L'article 79 «Plans d'échantillonnage» mentionne que les organes de contrôle peuvent prélever plusieurs échantillons sur un lot de marchandises selon un plan d'échantillonnage. Cette démarche peut être suivie en particulier s'il y a lieu de supposer que le produit n'est pas conforme, en tout ou en partie, à la législation sur les denrées alimentaires, ou si le but de l'analyse ne peut pas être atteint par des prélèvements isolés. Dans le contexte des plans d'échantillonnage, la notion très importante de «lot de marchandise» est définie dans l'Ordonnance du DFI sur l'étiquetage et la publicité des denrées alimentaires (OEDAI) (3). Selon ce texte, par lot de marchandise on entend un ensemble d'unités de production ou de vente d'une denrée alimentaire produite, fabriquée ou conditionnée dans des circonstances pratiquement identiques. D'une bonne utilité pratique, la description de la notion «lot de marchandise» dans l'ordonnance sur le prélèvement d'échantillons de denrées alimentaires et d'objets usuels (OPE), entre-temps abrogée, est également mentionné dans le présent guide (4). Selon cette ordonnance passée, les lots de marchandise sont des ensembles déterminés et définissables de produits (p. ex. lots d'importation, charges de fabrication, stocks) qui vont ensemble sur la base de leur marquage (numéro de charge, date de fabrication etc.), de leur origine, de leurs matières premières ou du moment et de leur type de mise en circulation.

Par le passé, les laboratoires cantonaux ont effectué les analyses microbiologiques presque exclusivement dans des échantillons élémentaires uniques. Cette manière reposait sur la réflexion de pouvoir effectuer, avec les moyens disponibles, des analyses dans un maximum de lots de marchandises. C'était aussi logique, car les activités de contrôle s'effectuent en grande partie dans les domaines de la gastronomie et du commerce de détail. Si des plans d'échantillonnage étaient utilisés, les laboratoires cantonaux les avaient fixés sans l'aide des autorités fédérales. Dans les grandes entreprises alimentaires, en particulier celles qui sont actives dans le commerce international, on fait appel plus fréquemment aux plans d'échantillonnage dans le cadre de l'autocontrôle.

L'effort des autorités fédérales suisses vers une équivalence des lois, dans le commerce des denrées alimentaires d'origine animale avec l'Union européenne (UE), a entraîné que la législation nationale devait être adaptée. Parmi d'autres, les critères microbiologiques de l'UE ont été incorporés dans une plus large mesure dans l'ordonnance sur l'hygiène et ainsi nos propres valeurs de tolérance ou limite ont été éliminées, remplacées ou modifiées. Une partie de ces critères est maintenant couplée impérativement à des plans d'échantillonnage (5).

2.1.2 Aspects techniques

2.1.2.1 Généralités

Afin d'arriver à une qualité hygiénique suffisante des denrées alimentaires, il ne suffit pas de suivre les bonnes pratiques de fabrication (BPF), ni de mettre en oeuvre des analyses microbiologiques sporadiques. Il s'agit davantage d'identifier les dangers spécifiques aux produits, d'estimer les risques qui en découlent et de fixer les mesures pour les maîtriser. En règle générale, on se base sur un système appelé Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). L'analytique microbiologique occupe une place importante dans le contexte général de ce système de sécurité, que ce soit pour l'examen de la qualité des matières premières ou lors des contrôles de produits finis (vérifications). Pour une charge de marchandise, la valeur d'une analytique et des conclusions que l'on peut en tirer dépend clairement du nombre d'échantillons examinés. Plus il y a d'échantillons analysés par unité, plus la probabilité est grande de découvrir un possible micro-organisme indésirable. Le nombre d'échantillons devant être analysés dépend entre autres de la taille d'un lot de marchandise à tester, de son homogénéité et de la fréquence du paramètre à déterminer. Les schémas d'analyses proposés dans ce but sont appelés plans d'échantillonnage. Dans ce domaine, les travaux et recommandations de l'«International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)» donnent la direction à prendre (6).

2.1.2.2 Plans d'organisation par classes

2.1.2.2.1 Plan à 2 classes

Dans un plan à 2 classes, l'application concerne la plupart du temps les analyses de présence/absence. On les utilise dans la détection de pathogènes comme par exemple les salmonelles.

2.1.2.2.2 Plan à 3 classes

Dans les plans à 3 classes, on comprend aussi l'application de méthodes quantitatives, dans lesquelles on se base sur des nombres de micro-organismes acceptables ou un nombre limite exprimé par gramme ou par millilitre. Dans ces cas, seul un nombre donné d'échantillons peut atteindre la valeur limite sans la dépasser.

2.1.2.3 Paramètres des plans de classes (7)

k: classe

n: nombre d'échantillons à prélever et à analyser par lot de marchandise [ou conformément à l'ordonnance sur l'hygiène du DFI (5)] nombre d'unités d'échantillons élémentaires de l'échantillon)

m: Nombre de micro-organismes acceptables par gramme ou par millilitre

M: Nombre limite de micro-organismes permis par gramme ou par millilitre

- c: – (plan à 2 classes) : nombre le plus élevé d'échantillons, dans lesquels le «m» peut être dépassé
- (plan à 3 classes) : nombre le plus élevé d'échantillons, dans lesquels «m» peut être dépassé, mais dans lesquels le «M» ne peut pas être dépassé.

Des plans d'échantillonnage peuvent aussi se baser sur d'autres quantités d'échantillon que 1 g ou 1 ml (p. ex. 25 g). En comparaison avec l'ordonnance sur l'hygiène légale (5) en Suisse, le «m» se rapporte à la valeur de tolérance et le «M» à la valeur limite. Les valeurs limite sont des critères de sécurité alimentaire, les valeurs de tolérance pouvant être des critères microbiologiques d'hygiène pour les produits finis prêts à la consommation ou pour des processus de fabrication.

2.1.2.4 Élaboration d'un plan d'échantillonnage

Des réflexions microbiologiques, épidémiologiques, médicales et statistiques précèdent l'élaboration d'un plan d'échantillonnage. De cette manière, on prend en considération quelle menace provient des produits alimentaires à contrôler et quelle est la composition du groupe cible des consommateurs. Un facteur à considérer est aussi le degré du danger que représente un micro-organisme à exclure. Selon le degré de risque, 5, 10, 15, 20, 30 ou 60 analyses en parallèle doivent être effectuées. De plus amples explications ne sont pas fournies dans ce document, mais on se réfère à la vaste littérature spécialisée, en particulier au travail de normalisation correspondant de l'ICMSF (6).

2.1.2.5 Exemples de plans d'échantillonnage

Les plans suivants ont été prescrits par l'UE et incorporés au droit suisse (4). Dans le cadre du contrôle officiel des denrées alimentaires, les 3 exemples suivants peuvent aussi être appliqués comme échantillonnage élémentaire unique. Toutefois, le résultat négatif d'une analyse particulière ne permet de tirer aucune conclusion sur le lot entier de marchandise. Dans l'exemple cité sous 2.1.2.5.3, on ne peut pas contester un dépassement de «m», mais le résultat donne néanmoins une indication que des problèmes pourraient exister.

2.1.2.5.1 Denrées alimentaires prêtes à être consommées permettant le développement de *Listeria monocytogenes*

$$k=2/n=5/c=0/m=M=100 \text{ UFC/g}$$

Pour les analyses correspondantes, 5 échantillons doivent être pris en considération par lot de marchandise. Parce que seulement «m» a été déterminé et que «c» est zéro, aucun de ces échantillons ne doit contenir plus de 100 UFC/g de *L. monocytogenes*. Dans cet exemple, il s'agit d'un plan à 2 classes avec une méthode quantitative.

2.1.2.5.2 *Enterobacter sakazakii* dans des aliments pour nourrissons

$$k=2/n=30/c=0/m=M=\text{non détectable dans 10 grammes}$$

Pour les analyses correspondantes, 30 échantillons doivent être examinés par lot de marchandise. Parce que seulement «M» a été déterminé et que «c» est zéro,

E. sakazakii ne doit être détectable dans aucun des 30 échantillons. Dans ce cas, il s'agit d'un plan à 2 classes combiné avec un test d'absence ou de présence. Le nombre élevé d'échantillons de 30 («c») est en rapport avec les personnes très sensibles (nourrissons) qui doivent être protégées.

2.1.2.5.3 Staphylocoques à coagulase positive dans des fromages au lait cru
 $k=3/n=5/c=2/m=10000 \text{ UFC/g}/M=100000 \text{ UFC/g}$

Dans ces analyses, 5 échantillons sont à examiner par lot de marchandise. 2 d'entre eux peuvent dépasser 10000 UFC/g («m»), mais aucun ne doit dépasser 100000 UFC/g («M»). Il s'agit ici d'un plan à 3 classes avec une méthode quantitative.

2.1.2.6 Déviation de plans d'échantillonnage

Les analyses qui dépendent d'un plan d'échantillonnage peuvent s'avérer très laborieuses, en particulier si le nombre «n» d'échantillons à analyser est élevé. L'article 60 de l'ordonnance sur l'hygiène prévoit que dans des conditions données, il est permis de dévier des exigences légales (5). Ainsi le nombre d'analyses à effectuer peut être réduit, lorsque par une documentation établie, il est possible d'assurer la sécurité du produit au moyen du système HACCP. Des concepts analytiques alternatifs peuvent en outre être appliqués lorsqu'ils aboutissent à un effet démontrable comparable à ceux décrits dans les plans d'échantillonnage de l'ordonnance.

2.2 Appareils et accessoires

On utilise des appareils et des accessoires pour réaliser une prise d'échantillon correcte ou pour la faciliter. Les outils de prélèvement comme les cuillers, les louches, les sondes, les cylindres, les forets, les pipettes, les mesureurs, les cisailles, les brucelles, les grattoirs, les agitateurs, etc. doivent être propres, stériles et secs. Ils doivent être transportés dans des emballages stériles et étanches aux contaminations (8). Pour des examens quantitatifs, les écouvillons, les tiges de coton et analogues peuvent si nécessaire être humectés avec un volume restreint et défini de liquide stérile.

Les récipients d'échantillons en verre, en matière synthétique ou en métal doivent être stériles et libres de substances ayant un effet inhibiteur sur les analytes, ou pouvant provoquer une dilution indésirable. Ils doivent pouvoir se fermer de telle manière qu'aucune contamination ne puisse s'y produire et qu'aucune perte d'échantillon ne soit possible.

2.3 Technique d'échantillonnage

Le statut microbiologique d'un aliment change lors de la fabrication, de l'entreposage, de l'emballage, du transport et de la distribution au consommateur. Les échantillons doivent être prélevés et conservés de telle manière que l'état microbiologique ne puisse pas être faussé (9).

De ce principe important découlent les recommandations particulières de technique de prélèvement décrits dans ce chapitre.

2.3.1 Objectifs de la prise d'échantillons

Le choix du matériel même de l'échantillon et le moment de l'échantillonnage dépend donc fortement de l'objectif de l'analyse: s'agit-il du contrôle officiel des denrées alimentaires, de la surveillance d'exploitations privées dans le cadre d'un auto-contrôle, d'un monitoring ou d'une clarification lors de cas de maladie? Selon les cas, des plans d'échantillonnage différents sont mis en œuvre (voir Chap. 2.1).

2.3.2 Techniques d'échantillonnage isolées

Dans la règle, il faut prévoir un échantillonnage aseptique, mais dans le cas de vente directe de certaines marchandises, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser les ustensiles de l'exploitation (par exemple: louches à glaces), lorsque l'on veut savoir «comment le consommateur reçoit la denrée alimentaire».

Il n'est pas possible ici de mentionner toutes les techniques d'échantillonnage. Outre le paragraphe 4 du Chapitre 56 de l'«ancien» MSDA (8) et de la littérature spécialisée (p. ex. 10), la consultation des normes internationales est recommandée [p. ex. ISO 17604:2003 (11), ISO 18593:2004 (12) et ISO/DIS 707 I IDF 50 (13)]. Dans ces normes, on décrit exactement les instruments de prélèvement et leur application (p. ex. emporte-pièce pour fromages), les méthodes de prélèvements destructives et non-destructives, le choix de l'endroit de prélèvement (p. ex. sur carcasses à l'abattoir).

Les principes de base importants sont:

- la prise d'échantillon pour la microbiologie a lieu toujours avant celle destinée aux examens chimiques ou autres.
- prise d'échantillon aseptique: il faut éviter les contaminations de l'échantillon causées par un emballage défectueux, par une ouverture non-conforme et par des appareils de prélèvement et des récipients, ces derniers pouvant être souillés par les mains; de même, les contaminations aérogènes doivent être évitées.
- lors du prélèvement, le nombre de micro-organismes présents ne doit pas être diminué, p. ex. par l'évaporation incomplète d'éthanol, ou par la chaleur de l'outil de prélèvement insuffisamment refroidi après son passage à la flamme.
- lors de méthodes invasives, selon le problème posé, il peut s'avérer nécessaire d'écarter la couche superficielle aseptiquement avant le prélèvement effectif de l'échantillon.

2.3.3 Quantité de matériel à prélever

La quantité d'échantillon à prélever dépend du but de l'analyse, mais devrait être en règle générale au minimum de 100 g. La quantité d'échantillon de surface (p. ex. croûte de fromage) peut être inférieure à 100 g (13). Dans tous les cas, il faut considérer particulièrement l'homogénéité de l'échantillon et effectuer le prélèvement en conséquence. Des produits emballés devraient si possible être prélevés dans l'embal-

lage original; à partir d'une marchandise en vrac, il faut réaliser un échantillon mélangé de plusieurs portions de 10–50 g.

Dans le cas d'échantillonnages non-destructifs, il faut couvrir une surface d'échantillon de 100 cm² au minimum.

Dans la mesure du possible, il faut prélever des échantillons inhomogènes en entier (p. ex. millefeuilles).

2.3.4 Stabilisation de l'échantillon

Les échantillons doivent être prélevés et conservés d'une telle manière que l'état microbiologique ne puisse pas être faussé.

En règle générale, il n'est pas permis d'ajouter des agents conservateurs dans les échantillons destinés à l'analyse microbiologique. Si l'adjonction de ces substances est malgré tout exigée (p. ex. par le laboratoire), il faut alors s'assurer que leurs propriétés ne dérangent pas l'analyse à laquelle l'échantillon est destiné. L'utilisation et la quantité de l'agent conservateur ajouté doivent figurer dans le rapport d'échantillonnage.

Dans le cas de l'eau potable, les excès de chlore possiblement inhibiteurs doivent être inactivés par l'adjonction de thiosulfate de sodium. Dans ce but, on ajoute avant la stérilisation 0,1 ml de solution de thiosulfate de sodium par 100 ml de volume d'échantillon dans les flacons d'échantillons (9). La congélation de l'échantillon jusqu'au moment de l'analyse n'est permise que si des analyses ont montré au préalable et de manière représentative que le paramètre à déterminer n'était pas modifié de manière significative.

2.3.5 Désignation et rapport d'échantillonnage

Immédiatement après son prélèvement, chaque échantillon doit être identifié clairement et sans ambiguïté.

Le rapport d'échantillonnage doit comporter les points spécifiques suivants :

- lieu, date, et si nécessaire heure du prélèvement
- propriétaire
- motif de l'échantillonnage
- échantillonneur et éventuellement témoins présents
- description exacte de l'échantillon (p. ex. propriétés, emballage, code d'identification du lot de marchandise, producteur, date de fabrication, durée et conditions de conservation, température intérieure d'un produit comparable, quantité prélevée, nombre d'unités)
- quantité totale disponible
- tous les matériaux et ustensiles nécessaires à l'échantillonnage, tels les agents conservateurs, les tampons, les milieux de culture
- toute remarque importante concernant les conditions d'échantillonnage (température, humidité, état sensoriel de la marchandise à analyser, indications précises de la technique d'échantillonnage, problèmes survenus)
- adresse à laquelle les échantillons doivent être apportés ou envoyés

3. Transport, expédition, réception et entreposage des échantillons

L'objectif fixé est de transporter et d'entreposer les échantillons de telle manière que les résultats d'analyses ne soient si possible pas faussés. Ils doivent être analysés aussi rapidement que possible. Les déterminations de la durée de conservation sont une exception dans laquelle les échantillons sont stockés dans des conditions définies jusqu'au moment fixé pour leur analyse.

3.1 Aspects juridiques

L'ordonnance du DFI sur l'exécution de la loi sur les denrées alimentaires mentionne dans son article 85 «Transport» que l'échantillon accompagné de son rapport d'échantillonnage doit être conservé et transporté de telle manière que le résultat d'analyse ne soit pas faussé (2).

3.2 Lignes directrices techniques existantes

L'ordonnance d'exécution fixe seulement les exigences de base concernant le transport des échantillons. Le chapitre 56 du MSDA dans sa version de 1985 va plus loin en donnant en plus les instructions suivantes (8):

«Les denrées alimentaires facilement périssables et les produits réfrigérés ne doivent pas être transportés à plus de + 5 °C, ils ne doivent pas être congelés».

Dans son édition de 2000, le chapitre 56 «Microbiologie» ne mentionne plus le transport directement mais affirme seulement que:

«Les échantillons doivent être prélevés et conservés de telle manière que l'état microbiologique ne puisse pas être faussé» (9).

Dans la norme ISO 7218:1996 les exigences concernant le transport, la réception et l'entreposage des échantillons sont également prescrites (14).

3.3 Transport d'échantillons

3.3.1 Exigences générales

Certains laboratoires d'essai prélèvent des échantillons de manière autonome, ainsi par exemple les laboratoires d'entreprise. Certains laboratoires de service proposent également des contrats intégraux à leurs clients, incluant tous les travaux de l'échantillonnage aux analyses, et se terminant par l'interprétation des résultats. Lors du transport des échantillons jusqu'au lieu de l'analyse, il faut faire attention à ce que le statut microbiologique ne soit pas faussé. Les altérations peuvent se produire par disparition ou surtout par multiplication de micro-organismes. Le laboratoire d'essai qui reçoit l'échantillon a la responsabilité de juger si des mesures telles la réfrigération ou la congélation sont nécessaires pour le transport. Il faut prendre en considération le type d'échantillons à transporter (caractère périssable), la température ambiante ainsi que la durée du transport. Il faut aussi tenir compte des températures prescrites par l'ordonnance sur l'hygiène pour certaines catégories de denrées alimentaires. Ainsi la viande hachée doit, par exemple, être entreposée à 2 °C et

le lait pasteurisé à 5 °C (5). Des écarts à ces directives légales ne sont autorisés que s'il est démontré, sur la base d'une évaluation des risques, qu'une altération du statut microbiologique peut être exclue.

3.3.2 Exigences concernant l'équipement des véhicules transportant les échantillons

Dans certaines circonstances, les échantillons doivent être prélevés dans une localité éloignée, de sorte que l'utilisation d'un véhicule est nécessaire. Ce dernier doit être équipé au besoin d'installations frigorifiques, de sorte que les exigences générales retenues sous 3.3.1 soient réalisées. Si un tel véhicule est équipé d'un réfrigérateur, le refroidissement devrait être aussi garanti lorsque le véhicule s'arrête. Avant que le premier échantillon ne soit transféré dans le réfrigérateur, il faut vérifier que la température de fonctionnement nécessaire (généralement ≤ 5 °C) soit atteinte. Si des échantillons sont prélevés en plusieurs endroits, la température des installations réfrigérées doit être mesurée à chaque fois et documentée. La mesure de la température doit être effectuée à l'aide d'un instrument approprié étalonné (p. ex. thermomètre à infra-rouge ou logger de température).

Dans le véhicule, les récipients et instruments stériles appropriés à l'échantillonnage doivent être disponibles de même que les ustensiles nécessaires au marquage clair des échantillons.

Au cas où un réfrigérateur installé dans le véhicule tombe en panne ou ne fournit pas le refroidissement nécessaire, la procédure à suivre doit être obligatoirement réglée.

Lorsqu'il n'est pas possible de juger avec certitude qu'une multiplication du nombre de micro-organismes aura lieu dans certains produits alimentaires non refroidis, par précaution tous les échantillons destinés aux analyses bactériologiques seront refroidis à ≤ 5 °C.

Si l'échantillon de marchandise est congelé, il faut garantir que celui-ci reste congelé jusqu'à l'arrivée dans le laboratoire d'essai. Ceci peut être assuré par exemple par une installation de congélation dans le véhicule ou par des quantités suffisantes disponibles de neige carbonique.

3.4 Expédition des échantillons

Fréquemment, les laboratoires reçoivent des échantillons envoyés par des clients, que ce soit par service de courrier ou par poste. Si des lacunes sont constatées, il faudrait les communiquer aux clients. Les échantillons doivent être expédiés de telle manière que le statut microbiologique ne puisse pas être modifié. Concrètement, cela signifie que des contaminations de l'environnement doivent être exclues au moyen de récipients d'échantillons et de matériel d'emballage appropriés. Si nécessaire, des mesures comme une réfrigération peuvent empêcher qu'une croissance de germes se produise dans les échantillons pendant l'expédition.

3.5 Réception des échantillons et première évaluation

Si nécessaire, il faut mesurer et enregistrer la température dans les échantillons reçus par le laboratoire d'essai. Il faut en outre s'assurer que la quantité d'échantillon est suffisante, que les récipients d'échantillons sont intacts et que des contaminations par l'environnement peuvent être exclues. Si, pour ces points, des lacunes sont remarquées, il faut consulter le donneur d'ordre, renoncer à effectuer l'analyse et exiger un nouvel échantillon (15). Si ce n'est pas possible, et que malgré tout une analyse est effectuée, le rapport d'essai ne peut être délivré que sous réserve, avec la mention des manquements constatés à la réception de l'échantillon (15).

À leur réception, les échantillons sont marqués clairement avec l'identité propre au laboratoire. Le système utilisé doit être conçu de telle sorte qu'à tout moment la traçabilité soit garantie pour le donneur d'ordre ou le client sur l'appellation originale à l'échantillon. L'identification doit aussi garantir que toute erreur soit exclue dans les étapes d'analyses suivantes. La date de réception, de même que l'heure si c'est pertinent, doivent être enregistrées dans le procès-verbal.

3.6 Entreposage des échantillons

Dans les locaux où les échantillons reçus sont stockés et redistribués aux laboratoires, les places doivent être attribuées de telle sorte que la clarté nécessaire à l'exclusion des erreurs soit garantie. L'air à l'intérieur du local ne doit pas être entravé de manière à ce que des contaminations d'échantillons soient possibles ou qu'une autre influence puisse altérer le résultat d'analyse (p. ex. aération, ventilateurs, climatiseurs, autre matériel stocké). Cela vaut en particulier pour des échantillons du secteur de la production primaire. Si les circonstances s'y prêtent, une évaluation des risques incluant les dénombrements de micro-organismes dans l'air ambiant doit être entreprise.

Les échantillons doivent être stockés de façon satisfaisante jusqu'à l'analyse. Avec des marchandises facilement périssables, la chaîne frigorifique ne peut être interrompue que durant le temps nécessaire au laboratoire d'essai pour le contrôle à la réception et à l'enregistrement.

Si des échantillons sont fractionnés (par exemple pour des analyses microbiologiques et chimiques), il faut procéder de telle manière que le statut microbiologique ne soit pas modifié (voir 4.1).

Lorsqu'une augmentation des bactéries est attendue dans des échantillons, ils doivent être examinés si possible dans un délai de 24 heures après leur arrivée au laboratoire d'essai. Lors d'un stockage prolongé sous réfrigération, le danger existe que des micro-organismes psychrotrophes se multiplient et que certains types de micro-organismes meurent.

Dans l'éventualité d'une répétition d'analyse, les échantillons doivent être stockés de telle sorte qu'ils ne puissent ni être contaminés par d'autres échantillons, ni que leur statut microbien soit modifié. Il faut considérer que quelques micro-organismes, comme p. ex. des *Listeria*, peuvent aussi se multiplier aux températures du réfrigérateur.

4. Préparation pour l'analyse

Bien souvent, c'est ici que débute le travail effectif du laboratoire. Il existe de nombreux exemples dans la littérature concernant la description des étapes individuelles (fractionnement des échantillons, prélèvement de prise d'essai, confection de la suspension de base). Les normes internationales suivantes servent de références à ce sujet : ISO/DIS 7218 (15), ISO 6887-1, -2, -3 & -4 (16), ISO/DIS 8261 (17).

4.1 Fractionnement des échantillons

Si des analyses microbiologiques et chimiques sont demandés pour un même échantillon, il faut que le fractionnement nécessaire ait lieu impérativement dans des conditions aseptiques. Cela signifie que le prélèvement pour l'analyse microbiologique doit se faire en premier. Jusqu'au moment du fractionnement, l'échantillon doit être stocké de telle sorte que le statut microbien ne soit pas altéré. Ceci est aussi valable pour les échantillons de réserve.

Il faut aussi veiller à ce que les analytes chimiques ne soient pas modifiés (p. ex. analyse de composés volatiles ou de vert malachite).

4.2 Prélèvement de la prise d'essai

Seule une partie de l'échantillon [«laboratory sample», échantillon pour laboratoire, ISO 7002 (18)], envoyé au laboratoire est en règle générale utilisée dans l'analyse. Dans ce qui suit, cette fraction est appelée prise d'essai [«test portion», ISO 7002 (18)].

En principe, on applique des techniques aseptiques.

Pour autant qu'aucune autre spécification ne soit prescrite, les échantillons congelés sont dégelés à maximum 37 °C et analysés aussi rapidement que possible (9).

Avec des échantillons hétérogènes, la prise d'essai devrait être prélevée de telle manière que les différentes composantes soient présentes si possible conformément à leurs portions respectives (p. ex. fromages à pâte molle avec croûte consommable : 10 % de croûte et 90 % de pâte). D'autres compositions de parts sont aussi possibles, selon l'objectif de l'analyse. Pour cette raison, il faudrait définir, par convention entre le client et le laboratoire, quelles parts de l'échantillon doivent être examinées.

Il est parfois d'usage que des échantillons soient mis en commun ou «poolés». Ainsi p.ex. les examens bactériologiques de carcasses d'animaux se déroulent sur des prélèvements effectués sur différentes parties de la carcasse, qui sont ensuite rassemblées en un seul échantillon poolé, dans lequel l'analyse est effectuée (11).

L'analyse de tels échantillons poolés peut poser problème lorsque la démarche n'est pas précisée ou qu'il n'y a pas eu d'accord avec le client. Pour l'interprétation du résultat, il est important qu'une description de la composition de l'échantillon soit disponible.

Pour des échantillons hétérogènes, il faudrait si possible prélever au moins 40 g, pour les échantillons homogènes au moins 10 g ou 10 ml (selon les indications de la norme de préparation d'échantillon spécifique).

Pour des méthodes qualitatives, on devrait généralement prélever au moins 25 g (5, 19).

4.3 Confection de la suspension de base

En règle générale, pour réaliser une suspension de base, une étape de dilution et d'homogénéisation entre la prise d'essai et une solution est nécessaire (exception: liquides homogènes). La suspension de base initiale résultant de cette étape est la plupart du temps une dilution de 1:10 (généralement 10 g ou ml de prise d'essai homogène + 90 g ou ml de solution de dilution).

La suspension de base est utilisée soit en tant que milieu de pré-enrichissement (analyses qualitatives), soit comme point de départ des dilutions décimales suivantes (analyses quantitatives).

En ce qui concerne l'homogénéisation et la dilution, les normes correspondantes doivent également être consultées (15, 16, 17). Il faut considérer particulièrement que selon la matrice et le micro-organisme recherché, le processus peut ou doit même être différent. Les exemples sont la fonte du beurre (17), l'utilisation de citrate de sodium lors de la dilution des fromages (17) ou l'utilisation de milieux de pré-enrichissement spéciaux pour la détection de Salmonelles dans le cacao et des produits contenant du cacao, ou dans des produits acides ou acidifiants (20). Dans l'analyse des additifs de denrées alimentaires contenant des substances inhibitrices (p. ex. poudres d'oignon, d'ail, d'origan, de poivre et certaines variétés de thé ou de café), il faut réaliser des dilutions plus élevées (p. ex. 1/100 pour la cannelle et l'origan, 1/100 pour les clous de girofle), alternativement une adjonction de K_2SO_4 à l'eau peptonée tamponnée à une concentration finale de 0,5 % est admise (16, part 4).

Key words

Microbiology; pre-analytic; sampling; food-control; guideline

5. Literatur/Bibliographie

- 1 Europäische Union: Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) No 882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs, 2006 Union Européenne: Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) No 882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs, 2006
- 2 Das Eidgenössische Departement des Innern: Verordnung des EDI über den Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung vom 23. November 2005, Stand am 27. Dezember 2005 (SR 817.025.21). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern
Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur l'exécution de la législation sur les denrées alimentaires, état au 27 décembre 2005, (SR 817.025.21) Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne
- 3 Das Eidgenössische Departement des Innern: Verordnung des EDI über die Kennzeichnung und Anpreisung von Lebensmitteln vom 23. November 2005, Stand am 27. Dezember 2005 (LKV, SR 817.022.21). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern
Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI du 23 novembre 2005 sur l'étiquetage et la publicité des denrées alimentaires (OEDAL), état au 27 décembre 2005, (SR 817.022.21). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne
- 4 Der Schweizerische Bundesrat: Verordnung über die Probenerhebung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen vom 4. Juni 1984, Stand am 1. Juli 1995 (Probenerhebungsverordnung; PEV; SR 817.94; ausser Kraft gesetzt). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern
Conseil fédéral suisse: Ordonnance sur le prélèvement d'échantillons de denrées alimentaires et d'objets usuels (OPE), du 4 juin 1984, état au 1^{er} juillet 1995 (Ordonnance sur l'échantillonnage; SR 817.94; abrogé). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne
- 5 Das Eidgenössische Departement des Innern: Hygieneverordnung des EDI vom 23. November 2005, Stand am 15. November 2006 (HyV; SR 817.024.1). Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern
Département fédéral de l'intérieur: Ordonnance du DFI sur l'hygiène du 23 novembre 2005 (OHyg), état au 15 novembre 2006, (SR 817.024.1). Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne
- 6 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 – Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada (<http://www.foodscience.afisc.csiro.au/icmsf/icmsf2.pdf>)
- 7 *Pichhardt K*: Lebensmittelmikrobiologische Grundlagen für die Praxis. Kapitel 4, Stichprobenpläne- Produktklassifizierung, Seiten 235 bis 256. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998 (ISBN: 3-540-63380-4)
- 8 Bundesamt für Gesundheit: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56 «Mikrobiologie», Ausgabe 1985. Bundesamt für Logistik und Bauten
Office fédéral de la santé publique: Manuel suisse des denrées alimentaires, chapitre 56 «Microbiologie», Edition 1985. Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne
- 9 Bundesamt für Gesundheit: Kapitel 56 «Mikrobiologie», Neuauflage 2000, Überarbeitung 2004. In: Schweizerisches Lebensmittelbuch 2005. Bundesamt für Bauten und Logistik, 3003 Bern (http://www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Start.pdf).
Office fédéral de la santé publique: Chapitre 56 «Microbiologie» Nouvelle édition 2000, révisée en 2004 dans Manuel suisse des denrées alimentaires 2005. Office fédéral des constructions et de la logistique (OFCL), 3003 Berne.
(http://www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Start.pdf)
- 10 *Baumgart J. und Becker B.*: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland, Loseblatt-Ausgabe (1994, laufende Aktualisierungen)

- 11 ISO 17604:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis
- 12 ISO 18593:2004: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
- 13 ISO/DIS 707 | IDF 50: Milk and milk products – Guidance on sampling (in preparation)
- 14 ISO 7218:1996: Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations
- 15 ISO/DIS 7218: Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations (in preparation)
- 16 ISO 6887-1, -2, -3, -4: Microbiology of food and animal feeding stuffs: Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution (1999)
Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (2003)
Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products (2003)
Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (2003)
- 17 ISO 8261:2001: Milk and milk products: General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination
- 18 ISO 7002:1986: Agricultural food products – layout for a standard method of sampling from a lot
- 19 Europäische Union: Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel
Union Européenne: Règlement (CE) Nr. 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
- 20 ISO 6579:2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

Korrespondenzadresse: Andreas Baumgartner, Bundesamt für Gesundheit,
Sektion «Mikrobiologische und Biotechnologische Risiken», 3003 Bern, Schweiz,
Phone: 041 31 322 95 82, E-Mail: andreas.baumgartner@bag.admin.ch

Behandlung der Milch mit gepulsten elektrischen Feldern – eine Alternative zur Wärmebehandlung

Pius Eberhard und Robert Sieber

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Bern

Eingegangen am 29. Dezember 2006, akzeptiert am 22. März 2007

In roher Milch können Verderbniserreger und pathogene Mikroorganismen vorhanden sein. Um diese abzutöten sowie die für unerwünschte Reaktionen verantwortlichen Enzyme zu inaktivieren, wird die Milch verschiedenen Verfahren, vor allem Erhitzungsverfahren, unterworfen. Damit wird erreicht, dass die Haltbarkeit verlängert und die Gesundheit der Konsumenten nicht gefährdet wird. Da es aber bei den traditionellen Wärmebehandlungsverfahren wie Pasteurisierung, Ultrahoherhitzung und Sterilisierung zu teils bedeutenden Veränderungen des Geschmacks, des Aromas und auch der Nährstoffe kommen kann, wurden verschiedene alternative Verfahren evaluiert und sind teilweise zur Anwendung gelangt, die unter der Kategorie der nicht-thermischen oder «kalten», alternativen Erhitzungs- sowie chemischen Verfahren subsummiert werden können (1–5). Auch Kombinationen dieser erwähnten Verfahren untereinander wie auch mit den traditionellen Erhitzungsverfahren in Form der so genannten Hürdentechnologie sind durchaus möglich.

Unter den «kalten» Verfahren, die bei der Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt werden, existieren bereits kommerziell erhältliche Apparaturen für die Mikrofiltration, gepulste elektrische Felder, Hochdruckbehandlung, gepulstes Hochintensitäts-Licht, Bestrahlung und Baktofugation, während die Anwendung von gepulsten Magnetfeldern und Ultraschall erst auf Labor- oder Pilot-Plant-Stufe bearbeitet wird (2, 5). Unter den Vorteilen dieser Verfahren werden unter anderem eine minimale thermische Belastung mit einem geringen Verlust an Farbe, Flavor, Textur und Inhaltsstoffen sowie haltbare Lebensmittel mit Frischecharakter und erhöhter Lebensmittelsicherheit erwähnt (3).

Der vorliegende Bericht befasst sich mit der Beschreibung sowie den Einsatzmöglichkeiten von gepulsten elektrischen Feldern (PEF)¹ als alternativem Verfahren zur thermischen Milchbehandlung. Der Einsatz dieses Verfahrens bei Lebensmitteln wurde bereits in zahlreichen verschiedenen Übersichten beschrieben, von denen hier nur einige erwähnt werden (9–13). Dieses Forschungsthema wird in der Wissenschaft sehr intensiv bearbeitet und neuere Entwicklungen im Bereich der Anlagentechnik sowie einer ersten kommerziellen Anwendung des Verfahrens sind vorhanden.

Beschreibung des Verfahrens

Beim PEF-Verfahren wird ein Lebensmittel einem hohen elektrischen Feld (typischerweise 20 bis 80 kV/cm) ausgesetzt. Dabei kommen bei einer Vielzahl von Anwendungen nicht nur zwei, sondern auch drei und mehr Elektrodenysteme zum Einsatz. Dieses Verfahren beschränkt sich vorwiegend auf flüssige Lebensmittel, doch ist auch eine Behandlung fester Lebensmittel möglich, beispielsweise zum Zellaufschluss pflanzlicher und tierischer Zellen (14–16). Eine typische PEF-Anlage besteht aus einer Hochspannungsquelle (erzeugt eine hohe Spannung von mehreren kV) für die Ladung der Kondensatoren und einem Entladungsschalter, der die gespeicherte elektrische Energie von den Kondensatoren in Form eines elektrischen Feldes durch das flüssige Lebensmittel leitet (17). Dieses Feld pulsiert dabei mit Intervallen von Mikro- und Millisekunden. Dabei kann der Prozess statisch oder kontinuierlich durchgeführt werden. Als wichtigste Parameter sind die elektrische Feldintensität (E), die Pulsdauer (τ), die Behandlungszeit (t), die Temperatur des Lebensmittels (T) und der Typ der Mikroorganismen wie auch die Art der Enzyme zu erwähnen. Insgesamt handelt es sich bei PEF um ein nichtthermisches Verfahren, bei dem aber durchaus eine kleine Temperaturerhöhung möglich ist.

Wirkung von gepulsten elektrischen Feldern auf Mikroorganismen

Die Inaktivierung verschiedener Mikroorganismen durch gepulste elektrische Felder wurde an *E. coli* (18–23), Listerien (24–26), Yersinien (27), Salmonellen (28, 29), Staphylokokken (18) und Bazillen (30–35) untersucht. Neben der elektrischen Feldstärke, der Behandlungszeit, der Pulsbreite und der Frequenz spielen bei der Inaktivierung der Mikroorganismen auch Medium- (Leitfähigkeit, Zusammensetzung, pH- und a_w -Wert), Umwelt-bedingte (Temperatur) und mikrobielle (Stamm, Wachstumsphase) Parameter eine Rolle. Nach einer PEF-Behandlung bei variierendem pH-Wert, Wasseraktivität und Einlasstemperatur zeigte sich eine unterschiedliche Inaktivierung von *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (36). Wird die Einlass-

¹ Im Englischen werden neben pulsed electric field auch die Begriffe high voltage pulsed electric fields (HELP) (6) und high intensity pulsed electric field (HIPEF) (7) verwendet. In diesem Bericht wird nur von gepulsten elektrischen Feldern gesprochen, auch wird im Deutschen der Begriff Hochspannungspulsverfahren verwendet (8).

temperatur um 20 °C erhöht, wird die Inaktivierung² um bis zu log 3 erhöht. Ein pH-Wert von 4,0 scheint im Allgemeinen eine höhere Inaktivierung zur Folge zu haben als ein pH-Wert von 7,0, was auch für eine Wasseraktivität von 1,00 gegenüber 0,94 zutrifft (Tabelle 1). Zellen von *L. plantarum* sind in der Wachstumsphase gegenüber einer PEF-Behandlung empfindlicher als in der stationären Phase (37). Bei Rotaviren konnte dagegen keine Reduktion durch eine PEF-Behandlung während 145,6 µs bei 20 bis 29 kV/cm festgestellt werden. Da durch diese Behandlung die Nukleinsäuren intakt bleiben, womit Viren immer noch infektiös wirken können, müssten Viren mit anderen Verfahren inaktiviert werden (38).

Tabelle 1

Inaktivierung (log-Reduktion) von *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* in einem Medium bei Einlass-Temperaturen von 10 und 30 °C mit variierendem pH- und a_w -Wert nach einer PEF-Behandlung in einem Kulturmedium¹ (36)

	<i>E. coli</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	a_w 1,00	0,97	0,94	1,00	0,97	0,94
Einlass-Temp. 10 °C						
pH 4,0	3,5	3,0	1,8	1,6	1,2	0,7
pH 5,0	3,4	2,4	1,6	0,6	0,3	0,1
pH 6,0	1,4	0,9	1,3	0,4	1,1	0,3
pH 7,0	0,9	0,6	1,0	0,9	1,1	0,3
Einlass-Temp. 30 °C						
pH 4,0	5,7	3,4	3,9	3,8	2,1	0,4
pH 5,0	4,6	4,1	3,7	1,8	2,5	0,8
pH 6,0	3,6	1,9	2,5	2,1	3,0	2,2
pH 7,0	1,7	1,4	2,1	2,9	2,8	2,1

¹Die Wasseraktivität des Kulturmediums wurde mit 0, 150 oder 300 g Glycerin pro Liter auf eine solche von 1,00, 0,97 und 0,94 eingestellt.

Der Mechanismus, wie Mikroorganismen durch die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern inaktiviert werden, ist noch nicht restlos geklärt. Es wird vermutet, dass es sich dabei um eine physikalische Reaktion der Zelle handelt. Die Anwendung von elektrischen Feldern erzeugt ein Transmembranpotenzial an der Zellmembran. Wenn ein ausreichend starkes Potenzial induziert wurde, im Bereich von etwa 1 V, kommt es zum Verlust der Membranstabilität und schliesslich zum dielektrischen Bruch der Membran. Der Zellinhalt tritt aus und die Stoffwechsellaktivität versiegt (Abbildung 1). Dass beim Einwirken von gepulsten elektrischen Feldern morphologische Veränderungen bei Mikroorganismen stattfinden, konnten Calderón-Miranda et al. (39) und Dutreux et al. (40) mit Hilfe des Transmissions- oder Raster-Elektronenmikroskops an *Listeria innocua* (39) und *E. coli* (40) zeigen. Wurden *Listeria*-Zellen mit 32 Pulsen und elektrischen Feldintensitäten von 30, 40 und 50 kV/cm behandelt, verlor die Zellwand ihre glatte und gleichförmige

²Log-Reduktion = $\log N/N_0$, der Einfachheit halber wird im folgenden der Begriff Log-Reduktion beibehalten.

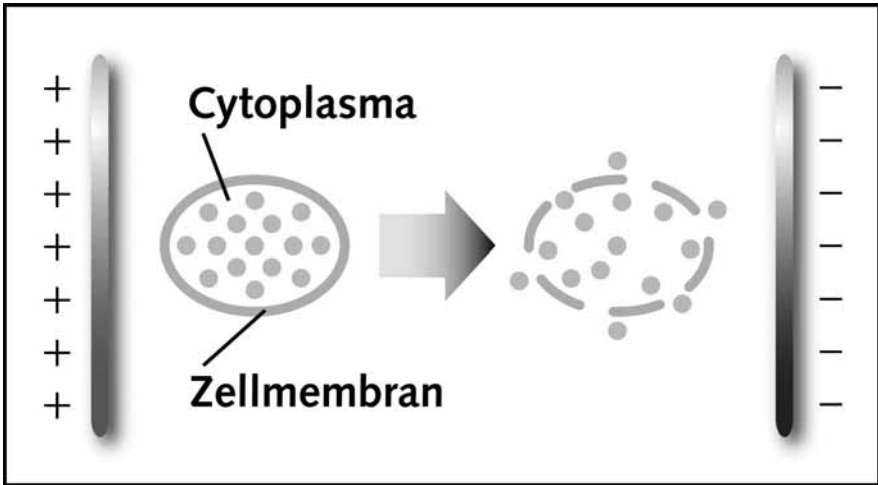


Abbildung 1 Wirkung von gepulsten elektrischen Feldern auf Zellen von Mikroorganismen

Oberfläche. Darüber hinaus wurde auch bei 40 und 50 kV/cm extrazelluläres Material in der Umgebung der Zelle beobachtet, was auf einen Bruch der Zellmembran zurückzuführen ist. Bei *E. coli*-Zellen war die Membran nach der PEF-Behandlung bei 41 kV/cm und 63 Pulsen gestört und rau. Die Inaktivierung dieser beiden Keime ist mit einer veränderten Membranpermeabilität zu erklären, diese scheint ein wichtiger Faktor in der Inaktivierung von Mikroorganismen zu sein (41). Durch die Membranpermeabilisierung steigt die Leitfähigkeit der Membran aufgrund der Poreninduktion an, die Erhöhung der Konduktivität kann als Erfolgsparameter herbeigezogen werden (42). Während *Russell et al.* (43) eine Alles-oder-nichts-Wirkung beobachtet haben, ist in anderen Arbeiten bei *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* und *Salmonella enterica* von subletalen Schädigungen berichtet worden (44–46), bevor die Zellen durch die PEF-Behandlung vollständig inaktiviert wurden. Mit Hilfe des Atomkraft- oder Rasterkraftmikroskops wurden in Magermilch nach der PEF-Behandlung kollabierte und/oder segmentierte Bakterien beobachtet (47).

Wirkung von gepulsten elektrischen Feldern auf Enzyme

Die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern auf verschiedene Enzyme wie alkalische Phosphatase (48–50), α -Amylase (49), Glukoseoxidase (49), Lipase (49, 51), Lysozym (49), Papain (52), Pepsin (49, 53), Peroxidase (49, 50), Polyphenoloxidase (49), Plasmin (54), Protease (55–57) zeigte kontroverse Resultate. Die

Enzyminaktivierung durch die PEF-Behandlung wird nach Yeom und Zhang (58) durch folgende Faktoren bestimmt: elektrische Parameter (elektrische Feldstärke, gesamte Behandlungsdauer oder Anzahl Pulse, Pulsdauer und Pulsbreite), Enzymstruktur, Behandlungstemperatur und Suspensionsmedium. Ein Einfluss der Temperatur auf Enzyme kann ausgeschlossen werden, da die Temperatur durch eine PEF-Behandlung einer Lösung mit niedriger elektrischer Leitfähigkeit und bei einer kurzen Pulsdauer nicht erhöht wird. Als Mechanismus der Enzyminaktivierung werden Änderungen in der Struktur der Enzyme diskutiert (49, 52, 54).

Enzyme reagieren unterschiedlich auf die Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern, wie die Untersuchungen von Ho und Mittal (49) zeigten. Dabei wurden acht verschiedene Enzymlösungen mit einer anfänglichen Spannung zwischen 4 und 26 kV sowie 30 Pulsen mit sofortigem Spannungswechsel behandelt. Der Elektrodenabstand betrug 0,3 cm, die Feldstärke 13 bis 87 kV/cm, die Pulsfrequenz 0,5 Hz und die Pulsdauer 2 μ s. Bei einer Behandlungstemperatur von 20 °C und einer Spannung von 26 kV reduzierte sich die Enzymaktivität der Lipase, der Glukoseoxidase und der hitzestabilen α -Amylase um 70 bis 85 %, der Peroxidase und der Polyphenoloxidase um 30 bis 40 % und der alkalischen Phosphatase nur um 5 %. Dagegen sank die Enzymaktivität des Lysozyms bei einer Spannung von 4 und bei 22 kV auf unter 50 %, während sie sich bei 15 kV nur um weniger als 20 % reduzierte und beim Pepsin gar erhöhte.

Anwendung auf Lebensmittel allgemein

Zu den verschiedenen Lebensmitteln, bei denen bereits in verschiedenen Forschungsarbeiten über die Anwendung der gepulsten elektrischen Felder berichtet wird, zählen Fruchtsäfte (59, 60) wie Apfelsaft (61, 62), Orangensaft (50, 63–67), Preiselbeerensaft (68), Gewürze (69) sowie Eier (70–73) und die Milch (siehe unten). In Frage kommen noch weitere Lebensmittel wie Tomatenkonzentrat, Ketchup, Fruchtpüree, Mayonnaise, Spaghettisaucen, Konfitüren, Joghurt, leicht alkoholhaltige Getränke, Wein, Suppen oder Gemüsejus, Honig (74). Neben der Inaktivierung von Mikroorganismen wird PEF auch als Zellaufschlussverfahren wie zur Fruchtsaftgewinnung, Zuckerextraktion, Trocknung pflanzlicher Produkte u.a. angewendet (16, 75–77). In den USA ist seit Ende 2005 das PEF-Verfahren zur Haltbarmachung von Bio-Fruchtsaft im Einsatz (78). Die Food Drug Administration (FDA) hat den Verkauf dieser Produkte freigegeben (5), nachdem sie bereits im Jahre 1995 einen letter of no objection für dieses Verfahren herausgegeben hat (zitiert nach 79).

Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern auf Milch und Milchprodukte

Die ersten Anwendungen mit elektrischen Feldern auf Milch gehen auf den Anfang des letzten Jahrhunderts zurück. Eine Anlage, um Milch mit elektrischem Strom zu verarbeiten, wurde von *Beattie* (80) sowie *Beattie und Lewis* (81) entwickelt. Mit 3 bis 4 kV konnte eine letale Wirkung auf Mikroorganismen gezeigt wer-

den, indem dabei die Temperatur der Milch erhöht wurde. Es handelte sich also um ein thermisches Verfahren, bei dem die Milch elektrisch auf 71 °C erhitzt wurde. Eine weitere Anwendung der Elektrizität zur Pasteurisierung von Milch war das «ElectroPure» Verfahren (82). 1935 hat sodann *Getchell* (83) eine elektrische Pasteurisationsanlage für Milch beschrieben, mit der über einen einfachen, flexiblen, ökonomischen, schnellen und zuverlässigen Arbeitsvorgang Milch vor dem Verderb geschützt werden kann.

Die erste Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern in der Lebensmittelverarbeitung wurde erstmals in den 60er Jahren an pflanzlichen Zellen und Mikroorganismen (84–86) beschrieben. Die Milch als Forschungsobjekt für gepulste elektrische Felder tauchte erstmals 1987 in einem Patent von *Dunn und Pearlman* (87) auf. Die Unfähigkeit jedoch, eine Anlage mit einer Vorrichtung zu entwickeln, welche die Temperatur der Milch kontrollieren kann, und die fehlenden Möglichkeiten, grosse Milchmengen zu behandeln, waren nach *Barbosa-Cánovas et al.* (88) die Punkte, welche die Weiterentwicklung dieses Verfahrens lange Zeit behinderten. Inzwischen haben intensive Forschungsanstrengungen Fortschritte auf diesem Gebiete gebracht (79, 89).

Mikroorganismen

Verschiedene Arbeiten mit Milch als flüssigem Medium wurden bereits unternommen, um den Einfluss einer Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern auf die Abtötung verschiedener einzelner Mikroorganismen abzuklären. Dabei wurde von Magermilch, Vollmilch, UHT-Milch und von simuliertem Milchultrafiltrat ausgegangen, die mit den zu untersuchenden Mikroorganismen inokuliert wurden. Neben der Abtötung der nativen Flora (90–93) kamen als Mikroorganismen *Bacillus (B.) subtilis* (94), *L. brevis* (50), *L. delbrueckii* (94), *L. rhamnosus* (79), *Pseudomonas (Ps.) fluorescens* (79, 91, 95–97) und *Saccharomyces cerevisiae* (19) (Tabelle 2) sowie als pathogene *B. cereus* (91), *E. coli* (19, 40, 79, 87, 98–103), Listerien (häufig wird in diesen Studien *Listeria innocua* als Ersatz des pathogenen *Listeria monocytogenes* verwendet) (40, 47, 95, 97, 104, 105), *Mycobacterium paratuberculosis* (106), Salmonellen (107–109) und *Staphylococcus aureus* (110–112) (Tabelle 3)³ zur Anwendung. Der Abtötungsgrad schwankte dabei in Abhängigkeit von den verwendeten Bakterien, der elektrischen Feldstärke, der Behandlungszeit, der Pulsdauer und der maximalen Temperatur des Mediums zwischen 0,2 und knapp 6 Log-Einheiten (Tabellen 2 und 3). So erreichten beispielsweise *Dutreux et al.* (40) in Magermilch mit 63 Pulsen bei *E. coli* eine Reduktion um 6 bis 7 und bei *Listeria innocua* um 4 Log-Einheiten. Bei einer kumulierten Behandlungszeit von mehr als

³Die beiden Tabellen 2 und 3 beschränken sich auf Resultate, die in wissenschaftlichen Zeitschriften allgemein zugänglich sind. Daneben existieren noch weitere Resultate zur PEF-Behandlung von Milch und Milchprodukten in Abstracts von Tagungen und anderen, schwer zugänglichen Berichten (siehe dazu 12).

Tabelle 2
Überblick über die letalen Wirkungen von gepulsten elektrischen Feldern auf verschiedene Mikroorganismen in Milch

Mikroorganismus	K ¹	Produkt ²	E (kV/cm)	Pulse	t (µs)	τ (µs)	T (°C)	Wirkung ³ (Dez. red.)	Lit.
Mikroorganismen		MM	80	50			52	1,3	(90)
Mikroorganismen	k	MM roh	35	64	188		52	1,0	(91)
<i>B. subtilis</i>		SMUF	16	50	200-300			4-5	(94)
<i>L. brevis</i>	s	UHT	22		300	15	45-50	6	(50)
<i>L. delbrueckii</i>		SMUF			200-300	40		4-5	(94)
<i>L. lactis</i>	k	MM-UHT	35	64	188		52	0,3	(91)
<i>L. rhamnosus</i>		M	21,6/32,5				40	5/5	(79)
<i>Ps. fluorescens</i>	s	UHT	22		300	15	45-50	4,2	(50)
<i>Ps. fluorescens</i>		MM roh	50	50	2			2,6	(95)
<i>Ps. fluorescens</i>	k	MM-UHT	35	64	188		52	2,2	(91)
<i>Ps. fluorescens</i>	k	MM steril.	31/33/34/36/37/38	10/20/30		2	16/20	1,0-1,9	(96)
<i>Ps. fluorescens</i>		M	21,6				40	5	(79)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		SMUF	25		400	20	8	3,5	(19)

E = elektrische Feldstärke, t = Behandlungszeit, τ = Pulsdauer, T = maximale Temperatur des Mediums

¹Typ der Kammer; s = statisch; k = kontinuierlich

²SMUF = sterilisiertes Magermilchultrafiltrat, MM = Magermilch

³angegeben als Dezimalreduktion

Tabelle 3

Überblick über die letalen Wirkungen von gepulsten elektrischen Feldern auf pathogene Mikroorganismen in Milch

MO	K ¹	Produkt ²	E ³ (kV/cm)	Pulse	t ³ (µs)	τ ³ (µs)	T ³ (°C)	Wirkung ⁴ (Dezimalred.)	Lit.
Coliforme und Aerobe	k	M roh	35	30	300	15	<30	0,19–1,18	(50)
<i>B. cereus</i> -Sporen	s	UHT	22,4			2	45–50	0	(100)
<i>B. cereus</i>	s	MM verdünnt	20	30			>30	1,2	(98)
<i>B. cereus</i>	k	MM UHT	35	64	188		52	3	(98)
<i>Byssochlamys nivea</i> -Sporen	s	UHT	22,4		300	15	45–50	0,2	(40)
<i>Cl. tyrobutyricum</i> -Sporen	s	UHT	22,4		300	15	45–50	0,2	(102)
<i>E. coli</i>	M	M	43	35		–	43	3	(103)
<i>E. coli</i>	SMUF	SMUF	70	8		2	20/33	2,5/2,5	(79)
<i>E. coli</i>	SMUF	SMUF	25		400	20	8	3	(79)
<i>E. coli</i>	s	UHT 1,5 % F.	22		300	15	45–50	>4	(101)
<i>E. coli</i>	s	SMUF	36	64		2	7/20	4/5	(104)
<i>E. coli</i>	s	MM	45	64			15	3	(40)
<i>E. coli</i>	k	MM	25	25		1,8		>2	(47)
<i>E. coli</i>	k	MM	41	10/20/35/63		2,5	37	2,3/2,9/3,4/4,0	(47)
<i>E. coli</i>	k	SMUF	12,5	1, 3, 5				2,6	(47)
<i>E. coli</i> O157:H7	k	MM	24		141	20		2,0	(105)
<i>E. coli</i>	s	MM/VM roh	21,6				40	5	(105)
<i>E. coli</i>	s	MM/VM roh	23				35	7	(105)
<i>E. coli</i>	s	Orangensaft-Milchgetränk	15		700	2,5	55	3,8	(106)
<i>Listeria innocua</i>	k	MM	30/40/50	32		2	22/28/34	1,9/2,1/2,5	(106)
<i>Listeria innocua</i>	k	MM	41	10/20/35/63		2,5	37	0,7/1,5/2,3/3,9	(87)
<i>Listeria innocua</i>	s	MM UHT	28–29	1,1/100 Hz	250			0,95/1,25	(107)
<i>Listeria innocua</i>	s	VM UHT	28–29	1,1/100 Hz	250			0,7/1,5–2	(108)
<i>Listeria innocua</i>	s	Rahm 20 % F.	29/38	1,1/100 Hz	250			1/2	(109)
<i>Listeria monocytogenes</i>	k	VM, 2 % F., MM	30		600	1,5	25	≈3	(110)
<i>Listeria monocytogenes</i>	k	VM	25/35		600	1,5		1,5/2,5	(111)
<i>Listeria monocytogenes</i>	k	VM	30		600	1,5	10/	3/2/3/3/4	(112)
							25/30/43/50		

MO	K ¹	Produkt ²	E ³ (kV/cm)	Pulse	t ³ (µs)	τ ³ (µs)	T ³ (°C)	Wirkung ⁴ (Dezimalred.)	Lit.
Mycobacterium paratuberculosis ATCC 19698	s	SM	30	2500			50	5,6	(48)
Mycobacterium paratuberculosis ATCC 43105	s	SM	30	2500			50	5,9	(48)
Salmonella dublin	k	MM-UHT	36,7	40			63	4	(50)
Salmonella dublin	k	MM-UHT	25		100	1	50	2	(113)
Salmonella enteritidis	k	MM roh	45/55	40-120 Hz			<50	0,2-1,4	(113)
Salmonella enteritidis	k	MM-UHT	47	60 Hz		0,5		1,2	(50)
Staphylococcus aureus	s/k	MM	35	250 Hz	450	3,7	<40	3,0/3,7	(51)
Staphylococcus aureus	SM	SM	35	100 Hz	240/2400	4		0,3/1,0	(115)
Staphylococcus aureus	MM	MM	25/35	50/150		4/8		0/4,5	(50)

¹Typ der Kammer; s=statisch; k=kontinuierlich

²F = Fett; M = Milch; MM = Magermilch; SM = sterilisierte Milch; SMUF = simuliertes Magermilchultrafiltrat; VM = Vollmilch

³E = elektrische Feldstärke; t = Behandlungszeit; τ = Pulsdauer; T = maximale Temperatur des Mediums

⁴anggegeben als Dezimalreduktion

300 μ s erzielten *Picart et al.* (47) mit *Listeria innocua* in Vollmilch eine Reduktion um 2,5 und bei 100 μ s um 0,5 Log-Einheiten. Eine Pulsdauer von 20 μ s zeigte in Magermilch eine signifikant stärkere Inaktivierung von *E. coli* als eine solche von 3, 5, 80, 200, 50, 1000 oder 1430 μ s, was ebenso für die Verwendung von bipolaren gegenüber monopolaren (1,96 vs 1,27 log kbE/ml) Pulsen zutrifft (103). Auch scheinen in Magermilch gram-positive Bakterien wie *Listeria innocua* widerstandsfähiger gegenüber einer PEF-Behandlung zu sein als gram-negative wie *Ps. fluorescens* (97).

Sobrino-Lopez et al. (111) haben in Milch die PEF-Variablen studiert, die zu der Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* beitragen. Dabei beeinflussten Polarität, Anzahl Pulse, Pulsbreite, elektrische Feldstärke und die Kombination Anzahl Pulse mit der Pulsbreite oder der elektrischen Feldstärke die Inaktivierung, wobei diese mit einer Gleichung zweiter Ordnung beschrieben werden kann. Der Fettgehalt der Milch spielte dabei keine Rolle.

Eine Pasteurisierung von inokulierter UHT-Milch (73 °C, 30 s) reduzierte die Anzahl von *Ps. fluorescens*, *Lc. lactis* und *B. cereus* um 4,0, 4,8 bzw. 2,9 Log-Einheiten und war damit bei den ersten beiden Keimen wirkungsvoller und beim dritten vergleichbar wie nach der PEF-Behandlung, während der die Temperatur auf 52 °C anstieg (91).

Enzyme

Zur Beurteilung von Erhitzungsverfahren werden verschiedene Enzyme wie alkalische Phosphatase (50, 113), Lipase (50, 51), Peroxidase (50, 79, 113), Plasmin (54) und Protease (17, 57, 56,) in der Milch als empfindliche Parameter herbeigezogen (Tabelle 4). In mit PEF-behandelter Milch zeigten die alkalische Phosphatase in einem Falle wie auch die Peroxidase nur geringe Verluste, jedoch die Lipase mehr als 60% (50). In einer anderen Studie (114) war jedoch die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase recht deutlich. Neben diesen beiden Enzymen wurde noch der Einfluss von PEF auf andere Enzyme untersucht (Tabelle 4). Die Aktivität von Plasmin, einem relativ hitzestabilen Enzym, das zu simuliertem Milchultrafiltrat in einer Konzentration von 100 μ g/ml gegeben wurde, reduzierte sich nach der Behandlung in einem gepulsten elektrischen Feld von 30 und 45 kV/cm und bei 50 Pulsen um 90% (54). Daraus muss geschlossen werden, dass es sich dabei um eine nichtthermische Wirkung handelt. Eine extrazelluläre Lipase aus *Ps. fluorescens* wurde in ein simuliertes Magermilchultrafiltrat gegeben und verschiedenen Behandlungsbedingungen von Erhitzung und hoch intensiv gepulsten elektrischen Feldern unterworfen. Dabei ergab sich im Batchmodus bei 80 Pulsen und bei einer elektrischen Feldintensität von 27,4 kV/cm eine maximale Lipasehemmung von 62%, während im kontinuierlichen Verfahren bei 3,5 Hz und 80 Pulsen bei 37,3 kV/cm nur eine Inaktivierung von 13% erreicht werden konnte. Im Vergleich dazu betrug der Inaktivierungsgrad bei der Pasteurisation von 63 °C während 30 Minuten 20% und von 75 °C während 15 s 5% (51). Nach den Untersuchungen von *Soliva-Fortuny et al.* (115) zur Inaktivierungskinetik einer Lipase von *Ps. fluorescens* ist die Inaktivierung der Enzyme von der Feldstärke und von der Behandlungszeit abhängig.

Tabelle 4
Einfluss von gepulsten elektrischen Feldern auf Enzyme in der Milch

Enzym	<i>K</i> ¹	Lösung ²	<i>E</i> ³ (kV/cm)	Pulse	<i>t</i> ³ (μ s)	τ ³ (μ s)	Inaktivierung (%)	Lit.	
Alkalische Phosphatase	k	SMUF	22	70		0,74	65	(79)	
	s	RM	18,8	70		0,4	59	(113)	
	s	RM	21,5	1–22			<5	(54)	
	s	RM	6,7–20	200		2	0	(17)	
	s	RM	10	200		40	74	(57)	
Lipase		RM	21,5	1–22			65	(56)	
	(<i>Ps. fluorescens</i>) s, k	SMUF	27,4/37,3	80/80			62/13	(56)	
	(<i>Ps. fluorescens</i>)	SMUF	27,4		314,5		62	(127)	
Peroxidase	k	RM	21,5	20			25	(6)	
	s	RM	20,6				≈10	(6)	
		RM	19	100		5	0	(6)	
Plasmin	k	SMUF	30, 45	50		2	90	(7)	
Protease (<i>Ps. fluorescens</i>)	k	MM	15	98		2	60	(8)	
	(<i>B. subtilis</i>)	SMUF	35,5	111 Hz			63	(12)	
	(<i>B. subtilis</i>)	k	MM	35,5	111 Hz		7	81	(12)
	(<i>B. subtilis</i>)	k	VM	35,5	111 Hz		7	57	(12)

¹ Typ der Kammer: s=statisch; k=kontinuierlich

² RM=Rohmilch; VM= Vollmilch; MM=Magermilch; SMUF=simuliertes Magermilchultrafiltrat

³ E=elektrische Feldstärke, τ =Pulsdauer, t=Behandlungszeit

Der Einfluss verschiedener PEF-Parameter auf die Enzymaktivität wurde mit einer Protease, die von *B. subtilis* stammte und in Milch inokuliert wurde, untersucht (56). Die Pulsdauer (4 und 7 μ s) hatte keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität, jedoch sank letztere linear mit erhöhter Behandlungszeit, Pulsfrequenz oder steigender Feldstärke. Bei den verwendeten Feldstärken unterschieden sich 19,7, 23,7 und 27,6 kV/cm nicht voneinander, wohl aber 31,6 und 35,5 kV/cm. Bei letzterer Feldstärke betrug die höchste Inaktivierung nach einer Behandlungszeit von 866 μ s bei 67 Hz 37,9%. Mit steigender Pulsfrequenz (67, 89 und 111 Hz) erhöhte sich bei gleicher Feldstärke von 35,5 kV/cm die Inaktivierung: war sie bei 67 Hz in Magermilch und Vollmilch mit 37,9% nicht verschieden, betrug sie bei 111 Hz 81,1 und 57,1%. Es scheint, dass dabei das Fett die Struktur des Enzyms stabiler macht (47).

Im Gegensatz zur Pasteurisation, bei der alkalische Phosphatase und Peroxydase als Indikatoren einer thermischen Behandlung herbeigezogen werden, hat sich noch kein Enzym als Indikator zur Beurteilung der PEF-Behandlung von Milch aufgedrängt.

Milchinhaltstoffe

Auch bei alternativen nichtthermischen Verfahren sind deren Auswirkungen auf die Inhaltsstoffe eines Lebensmittels, insbesondere auf Proteine und Vitamine, von Interesse. β -Laktoglobulin, behandelt in einem elektrischen Feld von 12,5 kV/cm mit bis zu 10 Pulsen und einer Zeit von 15 s, wurde bis zu 40% denaturiert. Doch

wurde die Mikrostruktur der Gele nur wenig beeinflusst (116). Dagegen zeigte dieses Protein in Phosphatpuffer nach einer PEF-Behandlung in einem elektrischen Feld von bis zu 30 kV/cm keine Entfaltung und aus indirekten Hinweisen mit dialysierter β -Laktoglobulinlösung wurde geschlossen, dass dieses Protein durch PEF nicht aggregiert (6). Molkenproteine zeigten praktisch keine oder nur geringe Verluste (50). Nach *Odrizola-Serrano et al.* (117) war der Gehalt der Molkenproteine Serumalbumin, β -Laktoglobulin und α -Laktalbumin in hoch-intensiv PEF-behandelter Milch vergleichbar mit den Werten für normal pasteurisierte Milch.

Nach *Grahl und Märkl* (50) betrug in Rohmilch, die mit PEF bei einem Energie-Input von 0 bis 400 kJ/l behandelt wurde, das maximale Ausmass der Verluste beim oxidationsempfindlichen Vitamin C 90%. Dagegen zeigte Vitamin A praktisch keine oder nur geringe Verluste. *Bendicho et al.* (118) unterwarfen Milch und simuliertes Magermilchultrafiltrat bei einer Feldstärke von 18,3, 22,6 und 27,1 kV/cm einer Behandlungszeit von bis zu 400 μ s. Bei Riboflavin, Thiamin, Cholecalciferol und Tocopherol ergaben sich keine Verluste. Bei der Ascorbinsäure waren in der Magermilch die Verluste geringer als 28% und im simulierten Milchultrafiltrat 39%. Nach einer Behandlungszeit von 400 μ s bei 22,6 kV/cm betrug die Verluste 6,6% und waren tiefer als nach einer üblichen Pasteurisation (63°C 30 min: 50,3%; 75°C 15 s: 13,3%). In Magermilch zeigten sich geringere Ascorbinsäureverluste als im simulierten Milchultrafiltrat, was mit einer schützenden Rolle des Kaseins erklärt wird.

Sensorische Tests zeigten keine signifikante Veränderung des Geschmacks von Milch, die mit dem PEF-Verfahren behandelt wurde (50).

Aufgrund dieser Befunde an Molkenproteinen und Vitaminen sowie den Resultaten der sensorischen Tests kann das PEF-Verfahren in Bezug auf die Inhaltsstoffe der Milch als schonend bezeichnet werden.

Milchprodukte

Joghurt wurde mit Fruchtmarmelade und Zuckersaft vermischt, mit milder Hitze (60°C, 30 s) und anschliessend mit PEF (30 kV/cm, 32 μ s gesamte Behandlungszeit) behandelt und bei 4 und 22°C gelagert. Mit diesem Behandlungsverfahren konnte eine Reduktion um log 2 bei den aeroben Bakterien sowie bei den Hefen und Schimmeln erreicht werden. Nach einer Lagerung bei 4°C während 90 Tagen wurden im PEF-behandelten Produkt von den Bakterien 1,2 und von den Hefen 0,4 log kbE/ml nachgewiesen. Bei der Hitzebehandlung allein resultierten dabei 7,5 bzw. 4,4 log kbE/ml, während in der Kontrolle 7,4 bzw. 4,2 log kbE/ml vorhanden waren. In Aussehen, Farbe, Textur, Flavor und Akzeptanz unterschieden sich die PEF-behandelten Produkte nicht signifikant von der Kontrolle (119).

PEF-behandelte Milch wurde zur Herstellung von Cheddar-Käse eingesetzt. Dabei zeigte ein daraus hergestellter Käse eine erhöhte Festigkeit und Rückverformbarkeit sowie veränderte sensorische Eigenschaften im Vergleich zu einem aus unbehandelter Milch, während Adhäsion und Kohäsion nicht beeinflusst wurden (120).

Kombination der PEF-Behandlung der Milch mit konventionellen Erhitzungsverfahren

Das PEF-Verfahren kann mit milder Hitze kombiniert werden und zwar auch gleichzeitig. Dies konnte an *E. coli* O157:H7 (121), an *E. coli* O157:H7 und *Salmonella enteritidis* in flüssigem Eigelb (122) und bei der Pasteurisierung von Apfelsaft (123) gezeigt werden. Dabei wurde insbesondere die Energieeffizienz des Verfahrens gesteigert. Auch können beide Verfahren kontinuierlich genutzt werden, insbesondere da auch bei der PEF-Anwendung eine geringe Erwärmung auftritt.

Mit der Kombination der PEF-Behandlung mit einem konventionellen Erhitzungsverfahren wie der Pasteurisierung wird eine verlängerte Haltbarkeit der Milch erreicht. In einer bei 72 °C während 15 s pasteurisierten Milch stieg die Anzahl von mesophilen Bakterien nach 44 Tagen auf den vorgegebenen Grenzwert von 10⁴ pro ml an. Wurde die pasteurisierte Milch am gleichen Tag oder 8 Tage später noch mit PEF bei einer maximalen Feldstärke von 35 kV/cm behandelt, so wurde diese Grenze im ersten Falle nach 60 Tagen und im zweiten Falle nach 78 Tagen erreicht. Nach 60 Tagen Lagerung bei 4 °C wurden verschiedene thermoresistente psychrotrophe Bakterien wie *Bacillus* spp. (nicht *B. cereus*), *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Microbacterium* spp., *Listeria* spp. (nicht aber *Listeria monocytogenes*) nachgewiesen (124). Wurde rohe Magermilch mit PEF bei 10, 20 oder 30 Pulsen behandelt, so wurde nach 14 Tagen Lagerung 7,2, 6,5 und 6,3 log kbE/ml gegenüber 7,6 log kbE/ml in der unbehandelten Milch gefunden. Wurde nun eine thermische Behandlung bei 73 oder 80 °C für 6 s vorgeschaltet, so lag nach 22 und 30 Tagen Lagerung bei 4 °C die Keimzahl bei 4,1 und 4,9 log kbE/ml (93). Die gleiche Arbeitsgruppe (92) unterwarf Magermilch nach der PEF-Behandlung bei 28, 32 und 36 kV/cm noch Erhitzungstemperaturen von 60 und 65 °C während 21 s. Dadurch erniedrigte sich die Gesamtkeimzahl zusätzlich um bis zu 1,5 Log-Einheiten. Eine PEF-Behandlung von mit *Salmonella enteritidis*-inokulierter UHT-Magermilch bei 47 kV/cm und einer nachfolgenden konventionellen Erhitzung bei 62 °C während 19 s führte zu einer Reduktion von 2,3 ± 0,4 log im Vergleich zu 1,2 ± 0,3 log nach der PEF-Behandlung (104). Auch bei Schokolademilch konnte mit der Kombination von PEF und nachfolgender Erhitzung auf 105 oder 112 °C die Haltbarkeit verlängert werden (125).

Kombination der PEF-Behandlung der Milch mit Nisin

Der Kombination von PEF mit anderen Verfahren kann zu einer weiteren Inaktivierung führen. Verminderte eine PEF-Behandlung von Magermilch bei 52 °C mit 80 kV/cm und 50 Pulsen die Anzahl der Mikroorganismen (Ausgangsgehalt 10⁷ bis 10⁸ kbE/ml) nur um 1,3 log, erhöhte sich bei einer gleichzeitigen Verwendung von Lysozym, Nisin oder einem Gemisch von Lysozym und Nisin die Reduktion auf 3,2, 5,7 und 7,0 log (90). In einer weiteren Studie wurde *Listeria innocua* in Magermilch (ungefähr 2,7 × 10⁷ kbE/ml) mit PEF (50 kV/cm, 32 Pulse und Temperatur 34 °C) und Nisin behandelt. Mit PEF allein wurde eine Reduktion von log 2,4 und

mit PEF und Nisin (10 oder 100 IU/ml) eine solche von log 3,4 und 3,8 erreicht, während sie mit Nisin allein (log 0,25 und 0,7) deutlich geringer ausfiel (104). Zu ähnlichen Resultaten kamen auch *Pol et al.* (126) mit *B. cereus* in verdünnter Milch: mit PEF allein eine Reduktion um etwa log 1,2 und mit PEF und Nisin eine solche um etwa log 2,7. Dagegen reduzierte die Kombination von PEF mit Essig- oder Propionsäure bei Feldintensitäten von 31 bis 38 kV/cm und einer Behandlungstemperatur von 16 und 20 °C die Anzahl von *Ps. fluorescens* nicht im Vergleich zur alleinigen Anwendung von PEF (96). Auch die Reihenfolge der Nisin-Zugabe vor, gleichzeitig oder nach der PEF-Behandlung von flüssigem Molkenproteinkonzentrat beeinflusste die Inaktivierungsrate von *Listeria innocua* unterschiedlich. Wurde Nisin vor der PEF-Behandlung zugegeben, wurde die grösste Wirkung erreicht (Tabelle 5). Erklärt wird dies dadurch, dass durch dieses Vorgehen Nisin-empfindliche Mikroorganismen durch die PEF-Behandlung stärker in Mitleidenschaft gezogen werden (127). Bei Nisin-unempfindlichen Mikroorganismen wie *E. coli* konnte ein solches Verhalten in simuliertem Milchultrafiltrat nicht beobachtet werden (102).

Tabelle 5
Einfluss der Nisin-Zugabe auf *Listeria innocua* in PEF-behandeltem Molkenprotein-
konzentrat (127)

<i>Nisinkonzentration</i> IU/ml	<i>Nisin</i> <i>allein</i>	<i>Nisin</i> <i>vor</i>	<i>Nisin gleichzeitig mit</i> <i>PEF-Behandlung</i> - <i>Log (N/N₀)</i>	<i>Nisin</i> <i>nach</i>	<i>PEF</i> <i>allein</i>
25	1,4	3,8	2,1	1,2	1,0
50	3,5	4,3	3,3	2,5	1,0

$N_0 = 2 \times 10^8$ kbE/ml

Wurde in simuliertem Milchultrafiltrat die Wasseraktivität auf 0,95 abgesenkt, darauf dieses Produkt einer PEF-Behandlung von 5 kV/cm unterworfen und Nisin in einer Menge von 1200 IU/ml hinzugefügt, wurde *E. coli* um 5 Log-Einheiten reduziert (99).

Sicherheitsüberlegungen

Bevor ein neues Verfahren in die Lebensmitteltechnologie eingeführt werden kann, muss Klarheit darüber bestehen, dass das behandelte Lebensmittel in mikrobiologischer und toxikologischer Hinsicht sicher ist. Dabei können die Richtlinien der International Commission on Microbiological Specifications on Foods (siehe dazu 128) wie auch die Ausführungen des amerikanischen National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (129) behilflich sein. In letzterem Dokument geht es um folgende Fragen: Welche Kriterien sind für die Beurteilung neuer Verfahren notwendig, welches ist aus Sicht der öffentlichen Gesundheit der für jedes Verfahren resistenteste Mikroorganismus und welche Daten sind erforderlich, um die Adäquanz der in Frage kommenden Technologie beurteilen zu können?

Mikroorganismen sind gegenüber einer PEF-Behandlung unterschiedlich empfindlich. Für ein sicheres Endprodukt müssen noch andere Verfahren zur Anwendung gelangen. Als weitere Fragen sind noch eingehend abzuklären, ob beispielsweise die bei der PEF-Behandlung freigesetzten Zellkomponenten sicher für den Verbraucher sind (130) oder ob die Korrosion der Elektroden zu einer Verunreinigung des Endproduktes führen kann (79, 131–133). Jedenfalls wies ein Traubensaft, der in Tris-Puffer und in Gegenwart von Cl⁻-Ionen PEF-behandelt wurde, im Ames-Mutagenitätstest eine mutagene Wirkung auf, was noch zu weiteren Abklärungen Anlass geben sollte (130). Was das Thema der Korrosion betrifft, fällt nach verschiedenen Arbeiten bei einer Anwendung geeigneter Schalttechnik und Impulsformen der Abtrag der Elemente Eisen, Chrom, Nickel und Mangan des Elektrodenmaterials so gering aus, dass die Werte der EU-Trinkwasserverordnung und anderer Vorschriften nicht überschritten werden (131–133). Dabei wurde nur Eisen, nicht aber die anderen drei Elemente, bei einer PEF-Behandlung von Kochsalz (durchschnittlich 6,7 Pulse entsprechend ~1 µs) in einer Konzentration von ungefähr 0,23 µg/l von der Elektrode gelöst (132).

Für pasteurisierte Milch oder für Verfahren, die Temperatur-Zeit-Relationen mit gleicher Wirkung aufweisen, wird vom Gesetzgeber (134) verlangt, dass der Phosphatsetest negativ und der Peroxydasetest positiv ist. Diese sind Indikatoren dafür, dass die Milch frei von pathogenen Keimen ist bzw. nicht übermässig erhitzt wurde. Bei der PEF-Behandlung von Rohmilch wurde die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase je nach Bedingungen zwischen 0 und 74 % reduziert, die Peroxidase ist noch aktiv (Tabelle 4).

Für kaltpasteurisierte Milch müssen also neue Kriterien herangezogen werden. Beim PEF-Verfahren kann nicht ein einfacher Verfahrensparameter wie bei der konventionellen Pasteurisation (Zeit/Temperatur) benutzt werden. Die Einsatzbedingungen sind sehr komplex (Stromstärke, Pulsfrequenz und -dauer, Art und Abstand der Elektrode usw.). Um die Sicherheit des Verfahrens zu gewährleisten, müssen direkte mikrobiologische Abtötungsraten oder alternative indirekte Indikatoren evaluiert werden.

Die PEF-Behandlung von Orangensaft führte bei 20 Versuchspersonen zu einer vergleichbaren Bioverfügbarkeit von Vitamin C wie der Verzehr von frisch ausgepresstem Orangensaft. So war in beiden Fällen die Vitamin-C-Konzentration im Plasma deutlich erhöht und diejenige des 8-Isoprostans als Biomarker für die Lipidperoxidation deutlich erniedrigt (135). In Bezug auf die Sicherheit sind nach *Lelieveld et al.* (136) vor der Anwendung dieses Verfahrens noch weitere Forschungsarbeiten erforderlich. Denn in einem Vergleich zwischen PEF- und hitzebehandeltem Tomatenpüree waren nach hochauflösendem ein- und zweidimensionalen Proton-NMR-Fingerprinting 600 von 2000 Peaks verschieden, was die Frage nach deren toxikologischer und/oder ernährungsphysiologischer Relevanz nach sich zieht und was zu weiteren Forschungsanstrengungen Anlass gibt.

Erwartungen der Konsumenten gegenüber der Behandlung von Lebensmitteln mit gepulsten elektrischen Feldern

Konsumentinnen und Konsumenten erwarten von der lebensmittelverarbeitenden Industrie Lebensmittel mit einer hohen Qualität. Dabei sollen diese einem schonenden Herstellungsverfahren unterworfen werden, so dass ein verarbeitetes Lebensmittel hygienisch und sicher ist, aber noch ähnliche Eigenschaften wie das frische Produkt aufweist. Der Einsatz von gepulsten elektrischen Feldern in der Lebensmitteltechnologie kann der Forderung nach einer schonenden Behandlung vollauf gerecht werden, da es sich um ein nichtthermisches Verfahren handelt und dabei keine chemischen Substanzen verwendet werden. Dies trifft bei Milch insbesondere für Konsum- wie auch für Käsereimilch zu. Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der pathogenen Keime gegenüber einer PEF-Behandlung der Milch (Tabelle 3) bleibt die Erfüllung der hygienischen Standards ungeklärt.

Perspektiven

Die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern in der Lebensmittelindustrie weist einige Vorteile auf (4). Es handelt sich um ein nichtthermisches Verfahren – dessen Wirkung nicht auf Temperaturerhöhung beruht –, was den Ansprüchen und den Vorstellungen der Konsumentinnen und Konsumenten nach Lebensmitteln mit Frischecharakter (geringe Veränderungen von Geschmacks- und Inhaltsstoffen) sowie geringer Hitzebelastung entsprechen dürfte, wobei auch Farbe und Aroma nicht signifikant verändert werden. Zudem weist das PEF-Verfahren das Potenzial zu einem verbesserten Energiewirkungsgrad auf, vor allem bei Produkten, bei denen eine Wärmerückgewinnung bei thermischer Haltbarmachung technisch schwierig ist, etwa bei hochviskosen Produkten oder Medien mit Partikeln (13). Ein kontinuierliches Verfahren ist möglich. Mit diesem Verfahren können jedoch Sporen, beispielsweise von *B. cereus*, *Byssochlamys nivea*, *Cl. tyrobutyricum* und Viren nicht inaktiviert werden. Dies sollte in Kombination mit anderen Verfahren wie der so genannten Hürdentechnik (Gegenwart von antimikrobiellen Verbindungen, erhöhte Wasseraktivität, pH, milde Hitzebehandlung in Form einer Pasteurisierung) möglich sein (137). Im Vergleich zu den vegetativen Mikroorganismen erweisen sich hingegen die Enzyme als resistenter (113). Dieses Verfahren ist nicht nur auf flüssige Produkte begrenzt, sondern wurde auch zur Verstärkung der Trocknungsvorgänge bei festen Lebensmitteln eingesetzt (76). Die Wirksamkeit dieses Verfahrens hängt nicht von der elektrischen Leitfähigkeit des Lebensmittels ab, jedoch ist die Einsetzbarkeit entsprechender Anlagen auf Produkte mit geeigneter Leitfähigkeit begrenzt. Als sehr deutlicher Vorteil, insbesondere für die Milchverarbeitung, erweist sich indes das Fehlen von Ablagerungen in den Anlagen (Fouling), da es in der Milch bei den angewandten Temperaturen zu keiner Denaturierung oder Koagulierung der Molkenproteine kommt. Damit sind längere Standzeiten möglich.

Vor bald zehn Jahren haben *de Jong und van Heesch* (138) erwähnt, dass eines der grösseren Probleme in der Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern die Anpassung an die industrielle Anwendung (up-scaling) darstellt, da das Volumen der bis anhin untersuchten Proben nur im Bereich von einigen Millilitern liegt. Denn die damaligen Studien bezogen sich meist auf Arbeiten im Labor- oder Pilot-Plant-Massstab. Mittlerweile stehen kommerziell nutzbare Prototypen mit 200 bis 5000 l/h zur Verfügung. Solche wurden unter anderem von *Mittal et al.* (139), *ScandiNova* (S) (140), dem Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik (5, 89, 141) und *Diversified Technologies* (USA) (142) realisiert, letzterer Prototyp ist an der *Ohio State University* (143) in Betrieb. In den Niederlanden wurde von *Stork Foods* eine Pilotanlage mit einem Durchsatz von 5000 l/h und einer mittleren Leistung von 75 kW entwickelt (144). Jedoch verlangt die Industrie solche Apparate von mindestens 10000 l/h (10). Aufgrund der derzeit noch anfallenden Kosten von 0,01 bis 0,02 €/l (141) ist das Verfahren jedoch noch auf Premiumprodukte oder thermisch labile Produkte begrenzt, was mit den Berechnungen von *Töpfl* (79) und *Clark* (5) übereinstimmt. Grossindustrielle Anlagen sind prinzipiell möglich, bedürfen jedoch einer geeigneten Anwendung eines Produkts, bei dem die Vorteile einer geringeren thermischen Belastung für den Konsumenten erkennbar und damit wirtschaftlich gerechtfertigt sind. Dazu sind noch mehr systematische Studien notwendig, um dieses Verfahren handelstauglich und wirtschaftlich rentabel zu machen (145, 145).

Zusammenfassung

Die Behandlung von Lebensmitteln mit gepulsten elektrischen Feldern wird als ein alternatives nicht-thermisches Verfahren beurteilt. Verschiedene Studien haben sich auch mit der Milch beschäftigt. Wie bei anderen Lebensmitteln hängt die Überlebensrate der Mikroorganismen in der Milch von den Anwendungsbedingungen wie Typ der Mikroorganismen, Behandlungsmedien, Verarbeitungsbedingungen und Ausrüstung ab. Auch die Enzyme der Milch werden in unterschiedlichem Masse inaktiviert, sind aber weniger empfindlich. Dabei ist die Inaktivierungsrate vom studierten Enzym, der Behandlungsintensität und den Behandlungsmedien abhängig. Mit diesem Verfahren gelingt es, ein Produkt mit organoleptischen Eigenschaften wie das Frischprodukt zu erhalten. Mit der Kombination von PEF und Pasteurisierung kann die Haltbarkeit von Milch bei Kühltemperaturen verlängert werden. Inzwischen existieren industrielle PEF-Anlagen als Prototypen.

Résumé «Traitement du lait par champs électriques pulsés – une alternative au traitement thermique»

Le traitement des denrées alimentaires par champs électriques pulsés (CEP) est considéré comme une alternative au traitement thermique. Différentes études ont porté sur le lait. A l'instar d'autres denrées alimentaires, le taux de survie des microorganismes dans le lait dépend des conditions d'applications, du type de

microorganismes, du produit, des conditions du procédé et des installations. De même, les enzymes du lait sont inactivés à différents degrés, mais sont moins sensibles aux CEP. Le taux d'inactivation dépend du type d'enzymes, de l'intensité du traitement ainsi que des produits. Ce procédé permet de préserver les propriétés organoleptiques des produits. En combinant le procédé par champs électriques pulsés à la pasteurisation, la conservabilité du lait réfrigéré peut être prolongée. Entre-temps, des prototypes d'installations industrielles CEP ont été mis au point.

Summary "Treatment of milk with pulsed electric fields – an alternative heat treatment"

The treatment of foodstuffs with pulsed electric fields is seen as an alternative non-thermal method. Various studies have also dealt with milk. As in other foods, the survival rate of micro-organisms in milk depends upon the application conditions as well as the type of micro-organism, product, processing conditions and equipment. The enzymes in milk are also inactivated to a varying degree but are less sensitive. Here the inactivation rate depends upon enzyme type, treatment intensity and product. This process succeeds in obtaining a product with organoleptic qualities similar to the fresh product. The keeping qualities of milk at cooling temperatures can be extended by combining PEF and pasteurisation. In the meantime, prototypes of industrial PEF installations have been developed.

Key words

milk, pulsed electric field, high-intensity pulsed electric field, food processing

Literatur

- 1 *Gallmann P.U. and Eberhard P.*: Alternative methods for heating milk and milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.* **284**, 24–28 (1993)
- 2 *Deeth H.C.*: Alternatives to heat treatment of milk and fluid milk products. *Int. Dairy Fed. Group D52*, 1–8 (1996)
- 3 *Dunne C.P. and Kluter R.A.*: Emerging non-thermal processing technologies: criteria for success. *Aust. J. Dairy Technol.* **56**, 109–112 (2001)
- 4 *Devlieghere F., Vermeiren L. and Debevere J.*: New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* **14**, 273–285 (2004)
- 5 *Clark J.P.*: Pulsed electric field processing. *Food Technol.* **60**, 66–67 (1) (2006)
- 6 *Barsotti L., Dumay E., Mu T.H., Diaz M.D.F. and Cheftel J.C.*: Effects of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 136–144 (2001)
- 7 *Qin B.L., Pothakamury U.R., Vega H., Martin O., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.*: Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technol.* **49**, 55–60 (12) (1995)
- 8 *Töpfl S., Jäger H. und Knorr D.*: Neues Verfahren zur Haltbarmachung von Milch. *Dt. Molk.-Ztg.* **127**, 24–28 (2) (2006)
- 9 *Bendicho S., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin O.*: Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Technol.* **13**, 195–204 (2002)

- 10 Góngora-Nieto M.M., Sepulveda D.R., Pedrow P., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **35**, 375–388 (2002)
- 11 Rastogi N.K.: Application of high-intensity pulsed electrical fields in food processing. *Food Rev. Int.* **19**, 229–251 (2003)
- 12 Sampedro F., Rodrigo M., Martínez A., Rodrigo D. and Barbosa-Cánovas G.V.: Quality and safety aspects of PEF application in milk and milk products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 25–47 (2005)
- 13 Toepfl S., Mathys A., Heinz V. and Knorr D.: Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev. Int.* **22**, 405–423 (2006)
- 14 Bazhal M.I., Lebovka N.I. and Vorobiev E.: Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. *J. Food Eng.* **50**, 129–139 (2001)
- 15 Praporscic I., Shynkaryk M.V., Lebovka N.I. and Vorobiev E.: Analysis of juice colour and dry matter content during pulsed electric field enhanced expression of soft plant tissues. *J. Food Eng.* **79**, 662–670 (2007)
- 16 Lebovka N.I., Praporscic I., Ghnimi S. and Vorobiev E.: Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *J. Food Eng.* **69**, 177–184 (2005)
- 17 Vega-Mercado H., Martín-Belloso O., Qin B.L., Chang F.J., Góngora-Nieto M.M., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Non-thermal food preservation: Pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 151–157 (1997)
- 18 Pothakamury U.R., Monsalve-Gonzalez A., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Res. Int.* **28**, 167–171 (1995)
- 19 Zhang Q.H., Qin B.L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.: Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Process. Preservat.* **19**, 103–118 (1995)
- 20 Liu X., Yousef A.E. and Chism G.W.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. *J. Food Safety* **16**, 287–299 (1997)
- 21 Fleischman G.J., Ravishankar S. and Balasubramaniam V.M.: The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiol.* **21**, 91–95 (2004)
- 22 Ravishankar S., Fleischman G.J. and Balasubramaniam V.M.: The inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiol.* **19**, 351–361 (2002)
- 23 Alvarez I., Virto R., Raso J. and Condon S.: Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* **4**, 195–202 (2003)
- 24 Wouters P.C., Dutreux N., Smelt J.P.P.M. and Lelieveld H.L.M.: Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5364–5371 (1999)
- 25 Alvarez I., Pagan R., Condon S. and Raso J.: The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 87–95 (2003)
- 26 Sepulveda D.R., Góngora-Nieto M.M., San-Martin M.F. and Barbosa-Cánovas G.V.: Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **38**, 167–172 (2005)
- 27 Alvarez I., Raso J., Sala F.J. and Condon S.: Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiol.* **20**, 691–700 (2003)
- 28 Alvarez I., Manas P., Condon S. and Raso J.: Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *J. Food Sci.* **68**, 2316–2320 (2003)

- 29 Alvarez I., Raso J., Palop A. and Sala F.J.: Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 143–146 (2000)
- 30 Pagan R., Esplugas S., Góngora-Nieto M.M., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Sci. Technol. Int.* **4**, 33–44 (1998)
- 31 Cho H.Y. and Yousef A.E.: Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 368–372 (1999)
- 32 Heinz V., Phillips S.T., Zenker M. and Knorr D.: Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions. *Food Biotechnol.* **13**, 155–168 (1999)
- 33 Rowan N.J., MacGregor S.J., Anderson J.G., Fouracre R.A. and Farish O.: Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 110–114 (2000)
- 34 Pol I.E., Mastwijk H.C., Bartels P.V. and Smid E.J.: Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 428–430 (2000)
- 35 Jin Z.T., Su Y., Tuhela L., Zhang Q.H., Sastry S.K. and Yousef A.E.: Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high voltage pulsed electric fields. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), *Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications*, 167–181. Technomic Publ. Co. Inc., Lancaster (2001)
- 36 Aronsson K. and Rönner U.: Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2**, 105–112 (2001)
- 37 Rodrigo D., Ruiz P., Barbosa-Cánovas G.V., Martínez A. and Rodrigo M.: Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 223–229 (2003)
- 38 Khadre M.A. and Yousef A.E.: Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field. *J. Food Prot.* **65**, 1441–1446 (2002)
- 39 Calderon-Miranda M.L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 31–38 (1999)
- 40 Dutreux N., Notermans S., Wjitzes T., Góngora-Nieto M.M., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **54**, 91–98 (2000)
- 41 Wouters P.C., Bos A.P. and Ueckert J.: Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3092–3101 (2001)
- 42 Vega-Mercado H., Pothakamury U.R., Chang F.J., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Res. Int.* **29**, 117–121 (1996)
- 43 Russell N.J., Colley M., Simpson R.K., Trivett A.J. and Evans R.I.: Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an “all-or-nothing” effect. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 133–136 (2000)
- 44 Yaqub S., Anderson J.G., MacGregor S.J. and Rowan N.J.: Use of a fluorescent viability stain to assess lethal and sublethal injury in food-borne bacteria exposed to high-intensity pulsed electric fields. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 246–251 (2004)
- 45 Wuytack E.Y., Phuong L.D.T., Aertsen A., Reyns K.M.F., Marquenie D., De Ketelaere B., Masschalck B., Van Opstal B.M.I., Diels A.M.J. and Michiels C.W.: Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different non-thermal treatments. *J. Food Prot.* **66**, 31–37 (2003)

- 46 Garcia D., Gomez N., Manas P., Condon S., Raso J. and Pagan R.: Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 94–104 (2005)
- 47 Picart L., Dumay E. and Chefel J.C.: Inactivation of *Listeria innocua* in dairy fluids by pulsed electric fields: influence of electric parameters and food composition. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **3**, 357–369 (2002)
- 48 Castro A.J., Swanson B.G., Barbosa-Cánovas G.V. and Zhang Q.H.: Pulsed electric field modification of milk alkaline phosphatase activity. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications, 65–82. Technomic Publ. Co Inc., Lancaster (2001)
- 49 Ho S.Y., Mittal G.S. and Cross J.D.: Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *J. Food Eng.* **31**, 69–84 (1997)
- 50 Grahl T. and Märkl H.: Killing microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 148–157 (1996)
- 51 Bendicho S., Estela C., Giner J., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin O.: Effects of high intensity pulsed electric field and thermal treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* **85**, 19–27 (2002)
- 52 Yeom H.W., Zhang Q.H. and Dunne C.P.: Inactivation of papain by pulsed electric fields in a continuous system. *Food Chem.* **67**, 53–59 (1999)
- 53 Vega-Mercado H., Powers J.R., Martin-Belloso O., Luedecke L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Change in susceptibility of proteins to proteolysis and the inactivation of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 when exposed to pulsed electric fields. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications, 105–120. Technomic Publ. Co Inc., Lancaster (2001)
- 54 Vega-Mercado H., Powers J.R., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Plasmin inactivation with pulsed electric fields. *J. Food Sci.* **60**, 1143–1146 (1995)
- 55 Bendicho S., Marselles-Fontanet A.R., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin-Belloso O.: High intensity pulsed electric fields and heat treatments applied to a protease from *Bacillus subtilis*. A comparison study of multiple systems. *J. Food Eng.* **69**, 317–323 (2005)
- 56 Bendicho S., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin O.: Reduction of protease activity in milk by continuous flow high-intensity pulsed electric field treatments. *J. Dairy Sci.* **86**, 697–703 (2003)
- 57 Bendicho S., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin O.: Reduction of protease activity in simulated milk ultrafiltrate by continuous flow high intensity pulsed electric field treatments. *J. Food Sci.* **68**, 952–957 (2003)
- 58 Yeom H.W. and Zhang Q.H.: Enzymatic inactivation by pulsed electric fields: A review. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications, 57–63. Technomic Publ. Co Inc., Lancaster (2001)
- 59 Raso J., Calderón M.L., Góngora M., Barbosa-Cánovas G. and Swanson B.G.: Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* **31**, 668–672 (1998)
- 60 Sizer C.E. and Balasubramaniam V.M.: New intervention processes for minimally processed juices. *Food Technol.* **53**, 64–67 (10) (1999)
- 61 Evrendilek G.A., Zhang Q.H. and Richter E.R.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *J. Food Prot.* **62**, 793–796 (1999)
- 62 Sen G.B., Masterson F. and Magee T.R.A.: Inactivation of *E. coli* K12 in apple juice by high voltage pulsed electric field. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 434–437 (2003)
- 63 Qiu X., Sharma S., Tuhela L., Jia M. and Zhang Q.H.: An integrated PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. *Transact. Am. Soc. Agric. Eng.* **41**, 1069–1074 (1998)

- 64 Jia M.Y., Zhang Q.H. and Min D.B.: Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.* **65**, 445–451 (1999)
- 65 Yeom H.W., Streaker C.B., Zhang Q.H. and Min D.B.: Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4597–4605 (2000)
- 66 Yeom H.W., Streaker C.B., Zhang Q.H. and Min D.B.: Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. *J. Food Sci.* **65**, 1359–1363 (2000)
- 67 Ayhan Z., Zhang Q.H. and Min D.B.: Effects of pulsed electric field processing and storage on the quality and stability of single-strength orange juice. *J. Food Prot.* **65**, 1623–1627 (2002)
- 68 Jin Z.T. and Zhang Q.H.: Pulsed electric field inactivation of microorganisms and preservation of quality of cranberry juice. *J. Food Process. Preservat.* **23**, 481–497 (1999)
- 69 Keith W.D.: Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spice. *Food Res. Int.* **30**, 185–191 (1997)
- 70 Calderon-Miranda M.L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 7–17 (1999)
- 71 Jeantet R., Baron F., Nau F., Roignant M. and Brule G.: High intensity pulsed electric fields applied to egg white: Effect of *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *J. Food Prot.* **62**, 1381–1386 (1999)
- 72 Fernandez-Diaz M.D., Barsotti L., Dumay E. and Cheftel J.C.: Effects of pulsed electric fields on ovalbumin solutions and dialyzed egg white. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2332–2339 (2000)
- 73 Góngora-Nieto M.M., Pedrow P.D., Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas G.: Energy analysis of liquid whole egg pasteurized by pulsed electric fields. *J. Food Eng.* **57**, 209–216 (2003)
- 74 Barsotti L. and Cheftel J.C.: Food processing by pulsed electric fields. 2 – Biological aspects. *Sci. Alim.* **19**, 3–33 (1999)
- 75 Ade-Omowaye B.I.O., Angersbach A., Taiwo K.A. and Knorr D.: Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 285–295 (2001)
- 76 Lebovka N.I., Shynkaryk N.V. and Vorobiev E.: Pulsed electric field enhanced drying of potato tissue. *J. Food Eng.* **78**, 606–613 (2007)
- 77 Praporscic I., Shynkaryk M.V., Lebovka N.I. and Vorobiev E.: Analysis of juice colour and dry matter content during pulsed electric field enhanced expression of soft plant tissues. *J. Food Eng.* **79**, 662–670 (2007)
- 78 Anonym: Genesis juice. <http://www.genesisjuicecorp.com/pef.html>. eingesehen am 2.2.2007
- 79 Töpfl S.: Pulsed electric fields (PEF) for permeabilization of cell membranes in food- and bio-processing – applications, process and equipment design and cost analysis. Diss. Universität Berlin 1–180 (2006)
- 80 Beattie J.M.: Report on the electrical treatment of milk to the city of Liverpool. Liverpool (1915), zitiert nach Bendicho S., Barbosa-Cánovas G.V. and Martin O.: Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends Food Sci. Tech.* **13**, 195–204 (2002)
- 81 Beattie J.M. and Lewis F.C.: The electric current (apart from the heat generated). A bacteriological agent in the sterilization of milk and other fluids. *J. Hyg.* **24**, 113–123 (1925)
- 82 Fetterman J.C.: The electrical conductivity method of processing milk. *Agric. Eng.* **4**, 407–408 (1928)
- 83 Getchell B.E.: Electric pasteurization of milk. *Agric. Eng.* **16**, 408–410 (1935)
- 84 Doevenspeck H.: Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. *Fleischwirtschaft* **13**, 968–987 (1961)

- 85 Hamilton W.A. and Sale A.J.H.: Effects of high electric fields on microorganisms. 2. Mechanism of action of lethal effect. *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 789–800 (1967)
- 86 Sale A.J.H. and Hamilton W.A.: Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 781–788 (1967)
- 87 Dunn J.E. and Pearlman J.S.: Methods and apparatus for extending the shelf life of fluid food products. US Patent 4 695 472 (1987)
- 88 Barbosa-Cánovas G.V., Pothakamury U.R., Palou E. and Swanson B.G.: Nonthermal preservation of foods. M. Dekker, New York (1997)
- 89 Toepfl S., Heinz V. and Knorr D.: Applications of pulsed electric field technology for the food industry. In: Raso J. and Heinz V. (editors), *Pulsed electric field technology for the food industry* 197–221. Springer, Berlin (2006)
- 90 Smith K., Mittal G.S. and Griffiths M.W.: Pasteurization of milk using pulsed electrical field and antimicrobials. *J. Food Sci.* **67**, 2304–2308 (2002)
- 91 Michalac S., Alvarez V., Ji T. and Zhang Q.H.: Inactivation of selected microorganisms and properties of pulsed electric field processed milk. *J. Food Process. Preservat.* **27**, 137–151 (2003)
- 92 Fernández-Molina J.J., Fernández-Gutiérrez S.A., Altunakar B., Bermúdez-Aguirre D., Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas G.V.: The combined effect of pulsed electric fields and conventional heating on the microbial quality and shelf life of skim milk. *J. Food Process. Preservat.* **29**, 390–406 (2005)
- 93 Fernández-Molina J.J., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Skim milk processing by combining pulsed electric fields and thermal treatments. *J. Food Process. Preservat.* **29**, 291–306 (2005)
- 94 Pothakamury U.R., Monsalve-Gonzalez A., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim.* **35**, 101–107 (1995)
- 95 Fernández-Molina J.J., Barkstrom E., Torstenson P., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens* in skim milk treated with pulsed electric fields (PEF). In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), *Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications*, 149–166. Technomic Publ. Co. Inc., Lancaster (2001)
- 96 Fernández-Molina J.J., Altunakar B., Bermúdez-Aguirre D., Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas G.V.: Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk by combinations of pulsed electric fields and organic acids. *J. Food Prot.* **68**, 1232–1235 (2005)
- 97 Fernández-Molina J.J., Bermúdez-Aguirre D., Altunakar B., Swanson B.G. and Barbosa-Cánovas G.V.: Inactivation of *Listeria innocua* and *Pseudomonas fluorescens* by pulsed electric fields in skim milk: Energy requirements. *J. Food Proc. Eng.* **29**, 561–573 (2006)
- 98 Martin O., Qin B.L., Chang F.J., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *J. Food Process Eng.* **20**, 317–336 (1997)
- 99 Terebiznik M., Jagus R., Cerrutti P., de Huerdo M.S. and Pilosof A.M.R.: Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *J. Food Prot.* **65**, 1253–1258 (2002)
- 100 Pothakamury U.R., Vega H., Zhang Q., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *J. Food Prot.* **59**, 1167–1171 (1996)
- 101 Rivas A., Sampedro F., Rodrigo D., Martínez A. and Rodrigo M.: Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 541–545 (2006)
- 102 Terebiznik M.R., Jagus R.J., Cerrutti P., de Huerdo M.S. and Pilosof A.M.R.: Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **63**, 741–746 (2000)

- 103 Evrendilek G.A. and Zhang Q.H.: Effects of pulse polarity and pulse delaying time on pulsed electric fields-induced pasteurization of *E. coli* O157:H7. *J. Food Eng.* **68**, 271–276 (2005)
- 104 Calderon-Miranda M.L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G.: Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 19–30 (1999)
- 105 Reina L.D., Jin Z.T., Zhang Q.H. and Yousef A.E.: Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *J. Food Prot.* **61**, 1203–1206 (1998)
- 106 Rowan N.J., MacGregor S.J., Anderson J.G., Cameron D. and Farish O.: Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2833–2836 (2001)
- 107 Sensoy I., Zhang Q.H. and Sastry S.K.: Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field. *J. Food Process Eng.* **20**, 367–381 (1997)
- 108 Flourey J., Grosset N., Leconte N., Pasco M., Madec M.N. and Jeantet R.: Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait* **86**, 43–57 (2006)
- 109 Flourey J., Grosset N., Lesne E. and Jeantet R.: Continuous processing of skim milk by a combination of pulsed electric fields and conventional heat treatments: does a synergetic effect on microbial inactivation exist? *Lait* **86**, 203–211 (2006)
- 110 Evrendilek G.A., Zhang Q.H. and Richter E.R.: Application of pulsed electric fields to skim milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosyst. Eng.* **87**, 137–144 (2004)
- 111 Sobrino-Lopez A. and Martin-Belloso O.: Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *J. Food Prot.* **69**, 345–353 (2006)
- 112 Sobrino-Lopez A., Raybaudi-Massilia R. and Martin-Belloso O.: High-intensity pulsed electric field variables affecting *Staphylococcus aureus* inoculated in milk. *J. Dairy Sci.* **89**, 3739–3748 (2006)
- 113 van Loey A., Verachtert B. and Hendrickx M.: Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 94–102 (2001)
- 114 Castro A.J., Swanson B.G., Barbosa-Cánovas G.V. and Dunker A.K.: Pulsed electric field denaturation of bovine alkaline phosphatase. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), *Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications*, 83–103. Technomic Publ. Co Inc., Lancaster (2001)
- 115 Soliva-Fortuny R., Bendicho-Porta S. and Martin-Belloso O.: Modeling high-intensity pulsed electric field inactivation of a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* **89**, 4096–4104 (2006)
- 116 Perez O.E. and Pilosof A.M.R.: Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Res. Int.* **37**, 102–110 (2004)
- 117 Odriozola-Serrano I., Bendicho-Porta S. and Martin-Belloso O.: Comparative study on shelf life of whole milk processed by high-intensity pulsed electric field or heat treatment. *J. Dairy Sci.* **89**, 905–911 (2006)
- 118 Bendicho S., Espachs A., Arantegui J. and Martin O.: Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *J. Dairy Res.* **69**, 113–123 (2002)
- 119 Yeom H.W., Evrendilek G.A., Jin Z.T. and Zhang Q.H.: Processing of yogurt-based products with pulsed electric fields: Microbial, sensory and physical evaluations. *J. Food Process. Preservat.* **28**, 161–178 (2004)
- 120 Sepulveda-Ahumada D.R., Ortegá-Rivas E. and Barbosa-Cánovas G.V.: Quality aspects of Cheddar cheese obtained with milk pasteurized by pulsed electric fields. *Food Bioprod. Process.* **78**, 65–71 (2000)
- 121 Evrendilek G.A. and Zhang Q.H.: Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Protect.* **66**, 755–759 (2003)

- 122 Amiali A., Ngadi M.O., Smith J.P. and Raghavan G.S.V.: Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J. Food Eng.* **79**, 689–694 (2007)
- 123 Heinz V., Toepfl S. and Knorr D.: Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **4**, 167–175 (2003)
- 124 Sepulveda D.R., Góngora-Nieto M.M., Guerrero J.A. and Barbosa-Cánovas G.V.: Production of extended-shelf life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. *J. Food Eng.* **67**, 81–86 (2005)
- 125 Evrendilek G.A., Dantzer W.R., Streaker C.B., Ratanatriwong P. and Zhang Q.H.: Shelf-life evaluations of liquid foods treated by pilot plant pulsed electric field system. *J. Food Process. Preservat.* **25**, 283–297 (2001)
- 126 Pol I.E., Mastwijk H.C., Slump R.A., Popa M.E. and Smid E.J.: Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *J. Food Prot.* **64**, 1012–1018 (2001)
- 127 Gallo L.I., Pilosof A.M.R. and Jagus R.J.: Effect of the sequence of nisin and pulsed electric fields treatments and mechanisms involved in the inactivation of *Listeria innocua* in whey. *J. Food Eng.* **79**, 188–193 (2007)
- 128 Stewart C.M., Tompkin R.B. and Cole M.B.: Food safety: new concepts for the new millennium. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **3**, 105–112 (2002)
- 129 National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *J. Food Prot.* **69**, 1190–1216 (2006)
- 130 Reyns K.M.F.A., Diels A.M.J. and Michiels C.W.: Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **93**, 165–173 (2004)
- 131 Morren J., Roodenburg B., und de Haan S.W.H.: Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **4**, 285–295 (2003)
- 132 Roodenburg B., Morren J., Berg H.E., and de Haan S.W.H.: Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system: Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **6**, 327–336 (2005)
- 133 Roodenburg B., Morren J., Berg H.E., and de Haan S.W.H.: Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system: Part II. The treatment of orange juice; related to legislation and treatment chamber lifetime. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **6**, 337–345 (2005)
- 134 Anonym: Hygieneverordnung vom 23. November 2005, SR 817.024.1.
<http://www.bk.admin.ch/ch/d/sr/8/817.024.1.de.pdf>, eingesehen 7. Dezember 2006
- 135 Sanchez-Moreno C., Cano M.P., De Ancos B., Plaza L., Olmedilla B., Granado F., Elez-Martinez P., Martin-Belloso O. and Martin A.: Pulsed electric fields-processed orange juice consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes in healthy humans. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 601–607 (2004)
- 136 Lelieveld H.L.M., Wouters P.C. and Leon A.E.: Pulsed electric field treatment of food and product safety assurance. In: Barbosa-Cánovas, G.V. and Zhang, Q.H. (editors), Pulsed electric fields in food processing. Fundamental aspects and applications, 259–264. Technomic Publ. Co Inc., Lancaster (2001)
- 137 Ross A.I., Griffiths M.W., Mittal G.S. and Deeth H.C.: Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 125–138 (2003)
- 138 de Jong P. and van Heesch E.J.M.: Effect of pulsed electric fields on the quality of food products. *Milchwissenschaft* **53**, 4–8 (1998)
- 139 Mittal G.S., Ho S.Y.W., Cross, J.D. and Griffiths M.W.: Method and apparatus for electrically treating foodstuffs for preservation. US Patent 6 093 432 (2000)

- 140 *Anonym*: A new line of solid state. Excellence in pulsed power. <http://www.sc-nova.com/>, eingesehen am 2.2.2007
- 141 *Braakman L.*: Breakthroug in pasteurisation – Pulsed electric fields. *Food Eng. Ingredients* 34–38 (3) (2003)
- 142 *Anonym*: Pulsed electric fields. http://www.divtecs.com/pef_06.htm, eingesehen am 2.2.2007
- 143 *Ramaswamy R., Jin T., Balasubramaniam V.M. and Zhang H.*: Pulsed electric food processing. Factsheet for food processors. Bull. Number FSE-2-05 (2006), <http://ohioline.osu.edu/fse-fact/0002.html>, eingesehen am 7. Dezember 2006
- 144 *Smit C.*: Industrial scale pulsed electric field. IFT Symposium, Las Vegas, July, 13th, 2004
- 145 *Takhistov P.*: Dimensionless analysis of the electric field-based food processes for scale-up and validation. *J. Food Eng.* 78, 746–754 (2007)
- 146 *Ho S. and Mittal G.S.*: High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization. *Food Rev. Int.* 16, 395–434 (2000)

Korrespondenzadresse: Dr. Pius Eberhard, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 3003 Bern, E-Mail: pius.eberhard@alp.admin.ch

Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von Schafmilch schweizerischer Herkunft

Jürg Maurer, Walter Schaeren, René Badertscher, Ueli Bütikofer, Marius Collomb und Robert Sieber

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Bern

Eingegangen am 20. Dezember 2006, akzeptiert am 22. März 2007

Die Zusammensetzung von Milch und Milchprodukten schweizerischer Herkunft ist in verschiedenen Publikationen der früheren Forschungsanstalt für Milchwirtschaft und der heutigen Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) niedergelegt: Milch (1), Joghurt (2), Rahm (3), Butter (4), Hart- (5), Halbhart- und Weichkäse (6), Quark und Hüttenkäse (7), Ziger (8), Glarner Kräuterkäse (9) und Ziegenmilch (10). Zudem sind diese Daten mit Ausnahme der Ziegenmilch in einer Übersicht zusammengefasst und stehen der Öffentlichkeit auf dem Netz zur Verfügung (11). Auch wurden sie in die schweizerische Nährwertdatenbank integriert, deren Schaffung aufgrund des gestiegenen Interesses der Konsumenten an Gesundheits- und Ernährungsfragen realisiert wurde (12). Daneben leistet diese Datenbank hilfreiche Dienste für die Ernährungsberatung und die Beurteilung des Ernährungszustandes der schweizerischen Bevölkerung. Neben der schweizerischen Nährwerttabelle bestehen im europäischen Raume noch weitere solcher Nachschlagwerke für Lebensmittel (13–16) wie auch speziell für Milch und Milchprodukte (17).

Über die Produktion wie auch die Verwertung von Schafmilch sind in der Milchstatistik nur wenige Angaben vorhanden. Im Jahre 2005 wurden in der Schweiz 8881 Milchschafe der Rassen Ostfriesisches Milchschaaf und Lacaune, 10892 Zuchtwidder, 229392 weibliche Zuchtschafe (über 1 Jahr alt) und 197185 Jungschafe unter 1 Jahr gehalten. Insgesamt wurden 3100 t Schafmilch produziert, was einer mittleren Milchleistung von 349 Liter pro Jahr und Tier entspricht. Daraus wurden unter anderem 143 t pasteurisierte Schafmilch, 197 t Schafmilchjoghurt

und 214 t Schafkäse hergestellt (18). Es zeigt sich, dass der grössere Teil der produzierten Milch in die Herstellung von Schafkäse geht.

Über die Zusammensetzung wie auch über einzelne Aspekte von Schafmilch schweizerischer Herkunft liegen nur wenige Angaben vor. So berichteten *Gerber und Baumgartner* (19) über die Zusammensetzung der Milch von drei Schafen, *Colomb et al.* (20) über die Fettsäurezusammensetzung von Schafmilch, die in unterschiedlichen Höhenlage produziert wurde, sowie *Eberhard und Bütikofer* (21) über die Möglichkeit, Schafmilch mit dem UHT-Verfahren zu behandeln. In der ausländischen Literatur finden sich verschiedene Arbeiten über die Zusammensetzung von Schafmilch (22–27) wie auch zu einzelnen Aspekten der Zusammensetzung wie Protein und Aminosäuren (28–31), Fett und Fettsäuren (32–35), Vitamine (36, 37), Mineralstoffe und Spurenelemente (24, 37–41) und die Bedeutung der Schafmilch in der Ernährung (22, 23, 42).

Für die vorliegende Arbeit wurde monatlich Schafmilch aus dem Emmental, Entlebuch und dem Kanton Aargau erhoben. In einer Stichprobe von 13 Milchschafbetrieben wurde neben verschiedenen anderen Parametern die Zusammensetzung analysiert, wobei die gleichen Nährstoffe wie in der vorangehenden Arbeit zu Ziegenmilch (10) in die Untersuchungen einbezogen wurden. Diese Untersuchung hatte zum Ziel, die Grundlage für eine umfassende Darstellung der Zusammensetzung der Milch zweier Schafrassen schweizerischer Herkunft zu liefern. Weitere Ergebnisse dieser Studie, über die an anderer Stelle berichtet wird, betreffen die Zellzahl, die Zahl an aeroben mesophilen, aeroben psychrotrophen und salztoleranten Keimen, Enterokokken, Enterobacteriaceen, *Escherichia coli*, koagulasepositiven Staphylokokken, Propionsäurebakterien, fakultativ heterofermentative Laktobazillen, Clostridien sporen, Yersinien, Listerien und Salmonellen sowie den Gefrierpunkt und den Harnstoffgehalt.

Material und Methoden

Auswahl der Proben

Zwischen April und November 2005 wurden monatlich Bestandesmischmilchproben aus 13 Milchschafbetrieben aus dem Emmental, dem Entlebuch und dem Kanton Aargau erhoben. Es handelte sich dabei um Herden der Rassen Ostfriesisches Milchschaaf (3), Lacaune (6) und um Tiere dieser beiden Rassen als Kreuzungstiere (4). Die Herden bewegten sich in der Grössenordnung von etwa 20 bis 200 Tieren. Die Milchproben wurden in den Betrieben erhoben, mit Kühlboxen möglichst rasch in die Labors von ALP transportiert und bis zur Analyse in Eiswasser gekühlt. Für die Bestimmung der Trockenmasse, von Protein, Fett, Laktose, Fettsäuren, Mineralstoffe und Spurenelemente wurden Proben zwischen April und November 2005 (die Anzahl der untersuchten Proben pro Monat ist im Titel der Abbildung 1 erwähnt) und für diejenige der Aminosäuren und Vitamine diejenigen von September 2005 verwendet.

Untersuchungsmethoden

Die Bestimmungen wurden in akkreditierten Laboratorien der ALP durchgeführt: Wasser (43), Total-N (daraus wurde das Gesamtprotein mit dem Faktor 6,38 berechnet) (44), Fett (45), Laktose (46), Phosphor (47), Kalzium, Natrium, Kalium, Magnesium, Zink (Flammen-Atomabsorption nach Aufschluss mit Salpetersäure), Eisen, Kupfer, Mangan (Graphitrohr-Atomabsorption mit Zeeman-Untergrundkorrektur nach Druckaufschluss mit Salpetersäure), die Vitamine A und E nach noch unveröffentlichten HPLC-Methoden (Probe mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseifen, mit Petroleumbenzin extrahieren, mit Wasser waschen, mit Natriumsulfat behandeln, zur Trockene eindampfen, Rückstand in Methanol aufnehmen und mittels HPLC durch Fluoreszenzdetektion mit programmierbaren Wellenlängen quantitativ bestimmen), die Vitamine B₁ (48), B₂ (49), B₆ (50), B₁₂ (51), D₃ (52) und Folsäure (53) mit Hilfe der HPLC. Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte nach *Collomb und Bühler* (54) und diejenige der Aminosäuren mit HPLC (55).

Die Werte werden als arithmetisches Mittel mit der Standardabweichung (als Mass der Streuung) angegeben. Bei den Vitaminen wurden die Resultate nur als Medianwerte angegeben, da sie nicht «symmetrisch» verteilt sind. Der Energiegehalt (kcal/100 g) wurde nach den Angaben des Lebensmittelbuches mit folgenden Faktoren berechnet: Fett 8,79, Eiweiss 4,27, Kohlenhydrate 3,87 (56). Die Umrechnung von kcal in kJ erfolgte mit dem Faktor 4,184, wobei die berechneten Werte auf die nächste Fünfeinheit auf- oder abgerundet wurden.

Resultate und Diskussion

Im Folgenden werden vor allem die Resultate aller Tiere sowie diejenigen der beiden Rassen Ostfriesisches Milchschaaf und Lacaune besprochen, weniger die gemischten Herden beider Rassen mit Kreuzungstieren.

Protein, Fett, Laktose

Die Zusammensetzung der Schafmilch an Protein, Fett, Laktose und Energie ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Der Proteingehalt betrug im Mittel über alle Proben 5,61 g/100 g (Minimum: 4,73 g/100 g im November und Maximum: 7,70 g/100 g im September), der Fettgehalt knapp 7,08 g/100 g (4,59 g/100 g im April und 10,23 g/100 g im September) und der Laktosegehalt 4,7 g/100 g (4,04 g/100 g im September und 5,16 g/100 g im Oktober). Über den monatlichen Verlauf des Protein-, Fett- und Laktosegehalts der Schafmilch orientiert Abbildung 1; dabei ist bis September ein Anstieg des Fett- und Proteingehaltes und ein geringer Abfall des Laktosegehaltes zu beobachten. Die Unterschiede zwischen den beiden Rassen Ostfriesische Milchschafe und Lacaune sind beim Fett mit 1,07 g/100 g recht bedeutend, dagegen bei Protein und Laktose als gering zu bezeichnen. Dabei umfasst der Fettgehalt bei der Rasse Lacaune einen Bereich von 5,99 bis 10,23 und bei den Ostfriesischen Milchschaafen von 4,72 bis 9,37 g/100 g. Beim Protein sind die Bereiche (Minimum –

Tabelle 1
Chemische Zusammensetzung von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (1) (Angaben pro 100 g)

Parameter	Einheit	Schafmilch ¹				Ziegenmilch			Kuhmilch past.		
		Alle n=86	Ostfriesisches Milchschaf n=18	Lacaune n=41	Kreuzungstiere n=27	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
Trockenmasse	g	18,16	17,63	18,60	17,82	11,34	0,68	12,7	0,2		
Protein	g	5,61	0,64	5,58	5,62	2,83	0,24	3,3	0,1		
Fett	g	7,08	1,10	7,53	6,80	3,23	0,37	4,0	0,2		
Laktose ²	g	4,70	0,25	4,87	4,79	4,22	0,18	4,7	0,1		
Cholesterin	mg	26,7	3,15	nb	nb	nb		14,9	1,4		
Energie	kcal	103	100	109	102	57		67	2		
	kJ	430	420	455	430	240		280	7		

\bar{x} = Mittelwert; s_x = Standardabweichung; nb = nicht bestimmt

¹ Probenahmezeitraum: April bis November 2005

² Laktosemonohydrat

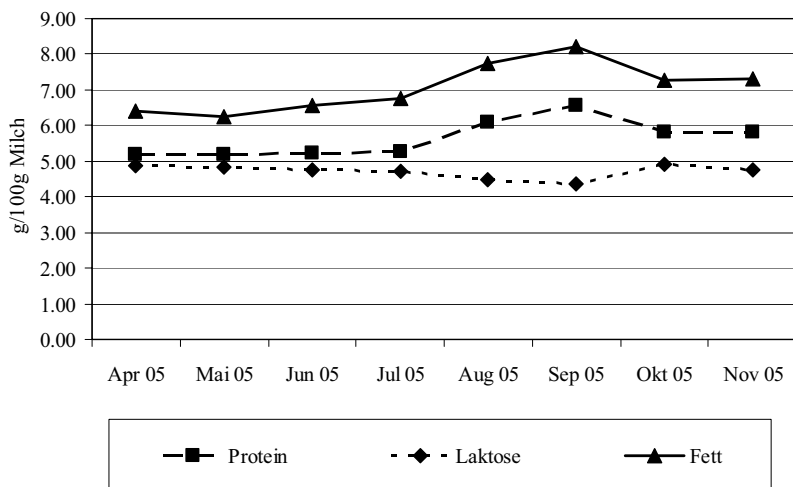


Abbildung 1 Monatlicher Verlauf des Protein-, Fett- und Laktosegehalts in Schafmilch (Anzahl Proben pro Monat: 12, 13, 13, 10, 10, 12, 8, 7)

Maximum) mit 4,84 bis 7,70 bei den Ostfriesischen Milchschaften und mit 4,73 bis 7,45 g/100 g bei den Lacaune sowie beim Laktosegehalt: 3,85 bis 4,82 und 3,84 bis 4,90 g/100 g recht ähnlich. Aus diesen Ausführungen wird deutlich, dass sich ein Vergleich der Zusammensetzung von Schafmilch auf die untersuchte Rasse beziehen sollte (Tabelle 1).

Schafmilch schweizerischer Herkunft von einer früheren Erhebung (je fünf Proben Morgen- und Abendmilch von ostfriesischen Milchschaften: eine Probe Februar, je zwei Proben April und Juni) enthielt weniger Protein (5,25 g/100 g) und Laktose (4,62 g/100 g) sowie mehr Fett (6,81 g/100 g) (19) als die vorliegenden Ergebnisse für die gleiche Schafrasse. In Schafmilch deutscher Herkunft bestimmten *Kirst et al.* (26) 4,99 g Protein/100 g, 5,42 g Fett/100 g und mit der IR-Methode 5,11 g Laktose/100 g (in der vorliegenden Untersuchung wurde der Laktosegehalt noch zusätzlich mit der IR-Methode bestimmt und ein etwas tieferer Wert gefunden: 4,84 g/100 g). Damit unterscheiden sich diese von Schafmilch schweizerischer Herkunft vor allem beim Fett recht deutlich. In einer anderen Untersuchung zu Ostfriesischen Milchschaften, bei denen innerhalb einer Laktationsperiode (April bis November) monatlich Proben erfasst und untersucht wurden, fanden *Hampel et al.* (22) in 100 g Schafmilch $4,74 \pm 0,21$ g Protein, $5,86 \pm 0,15$ g Fett und $4,42 \pm 0,06$ g Laktose. Im Vergleich zu dieser Arbeit sind die von uns bestimmten Gehalte für die Ostfriesischen Milchschafe mit 5,68 (Protein), 6,46 (Fett) und 4,84 (Laktose) g/100 g zum Teil deutlich höher. *Bencini und Pulina* (27) haben für die gleiche Rasse einen

im Vergleich zu unserer Arbeit höheren Proteingehalt von 6,21 g/100 g und einen vergleichbaren Fettgehalt von 6,64 g/100 g angeben.

Ein Vergleich mit der Zusammensetzung von Ziegen- (10) und Kuhmilch (1) schweizerischer Herkunft zeigt einige Unterschiede. Schafmilch hat einen deutlich höheren Gehalt von Fett und Protein als Ziegen- und Kuhmilch und einen mit der Kuhmilch vergleichbaren Laktosegehalt, der aber etwas höher liegt als in der Ziegenmilch. Damit geht auch ein Energiegehalt der Schafmilch einher, der im Vergleich zu Ziegen- und Kuhmilch um die Hälfte und mehr erhöht ist (Tabelle 1). Da die Proteine der Schafmilch recht ähnlich denjenigen der Kuhmilch sind (57), kann Schafmilch von Personen, die unter einer Allergie gegenüber Kuhmilchprotein leiden, nicht ohne weiteres als Ersatz empfohlen werden (31).

Aminosäuren

Neben den Hauptnährstoffen interessieren auch deren Bestandteile. Denn das Protein ist nämlich der Lieferant verschiedener essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren. Deshalb wurde das Protein der Schafmilch auf ihren Gehalt an diesen verschiedenen Aminosäuren mit Ausnahme des Tryptophans – nach Souci-Fachmann-Kraut (13) ist der Tryptophangehalt von Schafmilch 70 mg/100 g – untersucht. Diese Daten sind für sämtliche Proben in Tabelle 2 zusammengestellt. Die

Tabelle 2
Gesamte Aminosäuren von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (1) (Median und Interquartilbereich, mg/100 g)

Aminosäure	Schafmilch ¹ (n=11)		Ziegenmilch (n=12)		Kuhmilch past. (n=10)	
	\bar{x}	$I_{25; 75}$	\bar{x}	$I_{25; 75}$	\bar{x}	$I_{25; 75}$
Asparaginsäure +						
Asparagin	481	433; 488	287	258; 317	269	253; 310
Glutaminsäure +						
Glutamin	1424	1376; 1468	707	641; 749	747	725; 824
Serin	351	332; 356	175	153; 194	200	194; 203
Histidin	154	143; 165	85	79; 88	92	90; 94
Glycin	121	117; 123	56	55; 60	65	61; 70
Threonin	269	255; 280	178	154; 188	157	152; 167
Alanin	217	204; 230	100	92; 113	109	107; 119
Arginin	193	148; 227	103	89; 112	119	114; 123
Tyrosin	295	278; 304	123	114; 138	166	163; 178
Valin	393	378; 403	237	211; 245	209	203; 216
Methionin	166	149; 170	86	78; 88	87	83; 92
Isoleucin	309	293; 317	156	145; 165	170	165; 176
Phenylalanin	287	275; 297	162	144; 167	162	159; 173
Leucin	607	573; 617	333	302; 342	333	325; 359
Lysin	502	418; 519	254	243; 265	279	267; 291
Prolin	611	583; 643	329	298; 367	332	328; 338
Summe	6280	6048; 6516	3419	3062; 3586	3487	3413; 3720

\bar{x} =Median; $I_{25; 75}$ =Interquartilbereich

¹ Probenahmezeitraum: April bis November 2005

dominierendsten Aminosäuren waren Glutaminsäure + Glutamin, gefolgt von Prolin, Leucin, Lysin, Asparaginsäure + Asparagin, Valin und Isoleucin. Bedingt durch den höheren Proteingehalt liegen auch die Aminosäuregehalte der Schafmilch deutlich höher als in Ziegen- und Kuhmilch.

Fettsäuren

Ebenso wie beim Protein ist auch beim Fett die Zusammensetzung ihrer Bestandteile, der Fettsäuren, als Lieferanten von essentiellen Fettsäuren von besonderem Interesse. Die heute zur Verfügung stehenden analytischen Methoden erlauben eine umfassendere Bestimmung der verschiedenen Fettsäuren und die Resultate können auf 100 g Fett bezogen und nicht wie bis anhin in relativen Gewichtsprozenten angegeben werden. In der von ALP verwendeten Bestimmungsmethode werden bis zu 70 verschiedene Fettsäuren ermittelt (54). Die Angaben zu den wichtigsten Fettsäuren, den Minorfettsäuren und den verschiedenen Fettsäuregruppen sind in den Tabellen 3 bis 5 zusammengestellt.

Unter den verschiedenen Fettsäuren dominieren mit über 9 g/100 g Fett die Palmitin-, Öl- und Stearinsäure, gefolgt von zehn Fettsäuren im Bereich von 1 bis 9 g/100 g Fett (Tabelle 3). Diese Reihenfolge gilt auch für die einzelnen Rassen, bei denen die Ostfriesischen Milchschafe mehr Palmitin- und Ölsäure enthielten als die Lacaune, was aber nicht für die Stearinsäure zutrifft. Auch in der Studie von *Hampel et al.* (22) wiesen die Palmitin- (24,81 vs 21,09 g/100 g Fett in dieser Studie), die Öl- (16,67 vs 18,23 g/100 g Fett) und die Stearinsäure (10,07 vs 9,55 g/100 g Fett) die höchsten Konzentrationen im Milchfett von Ostfriesischen Milchschaafen auf. Ebenfalls bei Ziegen- (10) und Kuhmilch (54) war die Reihenfolge Palmitin- und Ölsäure dieselbe, während bei der Ziegenmilch als nächste Fettsäure die Stearinsäure und bei der Kuhmilch die Myristinsäure folgten. Neben den so genannten Makrofettsäuren wurden verschiedene Minorfettsäuren nachgewiesen, die mit einem Masseanteil von weniger als 1 g/100 g Fett vorhanden sind (Tabelle 4). Darunter sind auch iso- und anteiso-Formen sowie trans-Fettsäuren vorhanden.

Die Resultate zu den Fettsäuren werden in Tabelle 5 in verschiedene Fettsäuregruppen zusammengefasst. In Bezug auf die Gruppierung der Kettenlänge dominieren im Schafmilchfett die langkettigen Fettsäuren vor den mittel- und den kurzkettigen und in Bezug auf gesättigte – ungesättigte Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren (58,2 g/100 g Fett) vor den einfach-ungesättigten (24,1 g/100 g Fett) und den mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (6,5 g/100 g Fett). *Hampel et al.* (22) geben für Ostfriesische Milchschafe gegenüber dieser Studie einen deutlich höheren Gehalt an gesättigten Fettsäuren an: 65,7 vs 57,4 g/100 g Fett (Weideperiode 65,1, Stallperiode 67,9 g/100 g Fett), während die einfach-ungesättigten Fettsäuren bei 19,1 vs 25,0 g/100 g Fett (19,5 resp. 17,5 g/100 g Fett) und die mehrfach-ungesättigten Fettsäuren bei 4,4 vs 6,7 g/100 g Fett (4,3 resp. 4,0 g/100 g Fett) lagen. In australischer Schafmilch (58) waren die gesättigten Fettsäuren mit 66,2 g/100 g Fett wie auch die mehrfach-ungesättigten Fettsäuren mit 5,0 g/100 g Fett mit denjenigen der

Tabelle 3

Zusammensetzung der wichtigsten Fettsäuren von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (54) (g/100 g Fett)

	alle	Schafmilch ¹ (n=86)				Ziegenmilch (n=je 15)			Kuhmilch (n=je 15)	
		\bar{x}	s_x	O	L	K	April	Oktober	Winter	Sommer
C4	3,02	0,31	2,97	3,02	3,06	2,20	1,99	3,16	3,09	
C6	2,11	0,29	1,86	2,15	2,22	2,09	2,07	2,08	1,95	
C8	1,87	0,38	1,51	1,93	2,00	2,29	2,32	1,20	1,12	
C10	5,44	1,24	4,42	5,59	5,84	7,26	8,52	2,56	2,38	
C10:1	0,25	0,06	0,23	0,24	0,26	0,24	0,37	0,30	0,30	
C12	3,11	0,72	2,56	3,23	3,28	3,18	4,45	3,12	2,78	
C14	8,56	0,90	8,33	8,64	8,59	8,42	10,22	10,35	9,31	
C15	0,99	0,13	1,13	0,94	0,98	0,97	1,09	1,11	1,04	
C16	19,70	1,54	21,09	19,37	19,32	21,68	23,92	28,69	23,52	
C16:1c	0,68	0,14	0,79	0,64	0,65	0,55	0,67	1,31	1,19	
C17	0,61	0,11	0,60	0,65	0,57	0,66	0,46	0,49	0,63	
C18	9,75	1,43	9,55	10,04	9,44	9,18	6,13	7,81	8,32	
C18:1 c9	17,41	2,21	18,23	17,82	16,25	19,30	14,48	15,74	17,20	
C18:2 c9, c12	2,06	0,47	2,18	1,98	2,09	2,06	1,27	1,27	1,15	
C18:3 c9c12c15	1,17	0,27	1,12	1,16	1,22	0,67	0,56	0,69	0,83	
C18:1 t10-11	2,88	0,78	2,68	2,82	3,11	1,38	1,98	1,44	3,15	
C18:2 c9t11*	1,41	0,38	1,49	1,30	1,53	0,68	1,19	0,64	1,44	
C20:4 (n-6)	0,17	0,06	0,22	0,14	0,17	0,15	0,11	0,16	0,13	
C20:5 EPA (n-3)	0,08	0,02	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08	
C22:5 DPA (n-3)	0,15	0,03	0,15	0,14	0,15	0,14	0,14	0,10	0,11	
C22:6 DHA (n-3)	0,06	0,02	0,06	0,06	0,06	0,04	0,04	0,01	0,01	

\bar{x} =Mittelwert; s_x =Standardabweichung

O=Ostfriesisches Milchschat (n=18); L=Lacarne (n=41); K=Kreuzungstiere (n=27)

¹ Probenahmezeitraum: April bis November 2005

* in der Schafmilch noch die Isomeren 18c10+17c9 enthalten

Tabelle 4
Zusammensetzung der Minorfettsäuren von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (54) (g/100 g Fett)

Fettsäuren	\bar{x}	alle	Schafmilch (n=81)			Ziegenmilch (n=je 15)			Kuhmilch (n=je 15)	
			s_x	O	L	K	April	Oktober	Winter	Sommer
C5	0,07	0,02	0,08	0,06	0,07	0,03	0,07	0,02	0,02	0,02
C7	0,03	<0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03
C12 iso	0,03	<0,01	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
C12 also	0,04	0,01	0,04	0,04	0,04	0,03	0,07	0,08	0,08	0,08
C12:1 c und C13	0,12	0,03	0,12	0,11	0,13	0,14	0,24	0,16	0,14	0,14
C13 iso	0,12	0,02	0,14	0,11	0,12	0,11	0,08	0,12	0,10	0,10
C14:1 c	0,16	0,05	0,17	0,16	0,15	0,11	0,23	0,88	0,86	0,86
C14 iso	0,27	0,05	0,31	0,25	0,28	0,23	0,19	0,24	0,24	0,24
C14:1 t	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01
C14 also	0,45	0,09	0,57	0,40	0,47	0,38	0,32	0,44	0,45	0,45
C15 iso	0,27	0,05	0,32	0,24	0,27	0,29	0,19	0,26	0,23	0,23
C16 iso	0,39	0,07	0,46	0,36	0,40	0,39	0,32	0,30	0,36	0,36
C16:1 t	0,22	0,09	0,23	0,20	0,25	0,14	0,17	0,10	0,19	0,19
C16 also	0,39	0,07	0,46	0,36	0,40	0,44	0,36	0,61	0,73	0,73
C17 iso	0,07	0,02	0,07	0,07	0,06	0,06	0,04	0,06	0,05	0,05
C17:1 t	0,02	<0,01	0,02	0,02	0,02	<0,01	0,03	0,01	0,02	0,02
C17 also	0,23	0,05	0,24	0,24	0,21	0,32	0,20	0,25	0,22	0,22
C18:1 t4	0,02	<0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01
C18:1 t5	0,02	<0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:1 t6-8	0,14	0,05	0,15	0,14	0,15	0,12	0,12	0,07	0,14	0,14
C18:1 t9	0,28	0,06	0,30	0,27	0,28	0,24	0,23	0,22	0,27	0,27
C18:1 t12	0,25	0,07	0,25	0,25	0,27	0,18	0,17	0,15	0,19	0,19
C18:1 t13-14 + c6-8	0,77	0,24	0,79	0,70	0,87	0,33	0,45	0,37	0,59	0,59
C18:1 c11	0,39	0,11	0,42	0,37	0,39	0,50	0,34	0,40	0,43	0,43
C18:1 c12	0,18	0,09	0,18	0,16	0,21	0,15	0,10	0,12	0,12	0,12
C18:1 c13	0,05	0,01	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05
C18:1 c14+t16	0,37	0,08	0,38	0,35	0,39	0,21	0,20	0,23	0,29	0,29
C18:2 ttNMID	0,10	0,03	0,10	0,10	0,12	0,04	0,07	0,07	0,07	0,16

Fettsäuren	alle			Schafmilch (n=81)			Ziegenmilch (n=je 15)			Kuhmilch (n=je 15)	
	\bar{x}	s_x	O	L	K	April	Oktober	Winter	Sommer		
C18:2 c9c11+t11c13	0,07	0,02	0,05	0,07	0,07	0,02	0,03	0,04	0,09		
C18:2 t9t11	0,04	0,01	0,04	0,03	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02		
Linolelaidinsäure	0,02	<0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,01	0,02		
C18:2 c9t13 + t8c12)	0,36	0,09	0,39	0,32	0,39	0,18	0,25	0,15	0,26		
C18:2 c9t12 + (cc-MID+t8c13)	0,34	0,06	0,37	0,31	0,36	0,21	0,22	0,35	0,24		
C18:2 t11c15 + t9c12	0,41	0,14	0,34	0,40	0,48	0,13	0,33	0,22	0,52		
C18:2 c9c15	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,04	0,04		
C18:3 c6c9c12	0,02	<0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01		
C19	0,11	0,03	0,12	0,11	0,12	0,08	0,06	0,08	0,10		
C20	0,24	0,04	0,27	0,24	0,23	0,21	0,19	0,17	0,14		
Arachinsäure	0,05	0,01	0,05	0,04	0,05	0,03	0,02	0,04	0,04		
C20:1 t	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	0,01	0,01		
C20:1 c5	0,04	<0,01	0,04	0,03	0,04	0,04	0,08	0,16	0,13		
C20:1 c9	0,05	0,01	0,05	0,05	0,04	0,05	0,17	0,05	0,04		
C20:1 c11	0,02	<0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02		
C20:2 c,c (n-6)	0,02	<0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,05	0,05		
C20:3 (n-6)	0,04	0,05	0,03	0,05	0,03	0,01	0,17	0,01	0,02		
C20:3 (n-3)	0,16	0,07	0,20	0,15	0,15	0,06	0,07	0,08	0,06		
C22											

\bar{x} =Mittelwert; s_x =Standardabweichung

O=Ostfriesisches Milchschatf (n=18); L=Lacaune (n=41), K=Kreuzungstiere (n=27)

Tabelle 5

Fettsäuregruppen von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (54) (g/100 g Fett)

	Schafmilch (n=86)			Ziegenmilch (n=je 15)			Kuhmilch (n=je 15)			
	alle	\bar{x}	s_x	O	L	K	April	Oktober	Winter	Sommer
Σ kurzketige Fs	C4-C10:1	12,82	1,91	11,09	13,10	13,48	14,20	15,38	9,36	8,90
Σ mittellangketige Fs	C12-C16:1c	35,62	2,39	36,83	35,26	35,40	37,08	42,55	47,80	41,26
Σ langketige Fs	C17-C22:6	40,52	4,23	41,42	40,61	39,82	37,63	30,02	31,84	37,46
Σ gesättigte Fs	C4-C17, C18, C19, C20, C22+iso+aliso	58,15	2,19	57,42	58,43	58,19	60,67	63,41	63,10	56,99
Σ gesättigte C12, C14, C16		31,41	2,18	31,98	31,33	31,18	33,28	38,59	42,16	35,61
Σ C18:1		22,68	2,52	23,46	22,80	21,99	22,44	18,13	18,84	22,47
Σ C18:2		4,80	0,77	5,01	4,51	5,12	3,37	3,42	2,71	4,01
Σ ungesättigte Fs	1)	30,69	3,02	31,81	30,42	30,38	28,10	24,31	25,50	30,48
Σ einfach- ungesättigte Fs	2)	24,10	2,52	25,01	24,16	23,43	23,59	19,85	21,71	25,26
Σ mehrfach- ungesättigte Fs	3)	6,54	0,94	6,74	6,22	6,90	4,48	4,44	3,79	5,39
Σ CLA	C18:2-c9t11, -c9c11+t11c13, -9t11	1,51	0,41	1,58	1,39	1,64	0,72	1,24	0,70	1,55
Σ C18:1t	C18:1-t4-C18:1-t13-14	4,33	1,06	4,20	4,14	4,70	2,26	2,97	2,30	4,37
Σ C18:2t ohne CLA t	4)	1,22	0,29	1,22	1,12	1,36	0,57	0,88	0,70	1,25
Σ C18:2t mit CLA	C18:2t+CLA	2,66	0,65	2,75	2,44	2,39	1,27	2,09	1,36	2,72
Σ trans ohne CLA	5)	5,84	1,39	5,73	5,52	6,40	3,00	4,07	3,17	5,88
Σ trans mit CLA	6)	7,28	1,74	7,26	6,84	7,96	3,70	5,28	3,83	7,35
Σ n-3 Fs	7)	1,95	0,40	1,82	1,93	2,06	1,07	1,20	1,15	1,62
Σ n-6 Fs	8)	3,05	0,57	3,28	2,88	3,17	2,80	1,95	2,02	1,91

 \bar{x} =Mittelwert; s_x =Standardabweichung

1) C10:1, C14:1ct, C16:1ct, C17:1t, C18:1-t4-c14t16, C18:2-tNMID-C18:2-e9c15, C20:1t-C20:2cc, C20:3(n=6)-C22:6(n=3)

2) C10:1, C14:1ct, C16:1ct, C17:3ct, C18:1t-t4-c14-16, C20:1t-C20:1c11

3) C18:2-tNMID-e9c15, C18:3-c6c9c12+-c6c12c15, C18:2-e9t11-C20:2cc, C20:3-C22:6

4) C18:2 trans (Summe -tNMID, -9t12, -9t13 + (8c12), -9t12 + (ccMID + (8c13)), -t11c15 + (9c12))

5) C14:1t, C16:1t, C17:1t, C20:1t, C18:1t+C18:2t

6) C14:1t, C16:1t, C17:1t, C20:1t, C18:1 trans + C18:2 trans + CLA trans

7) C18:2-t11c15+e9c15, C18:3-e9c12c15, C20:3 n-3, C20:5, C22:5, C22:6

8) C18:1-t12 +c12, C18:2-9t12+c9t12+e9c12, C18:3-c6c9c12, C20:2cc, C20:3 n-6, C20:4 n-6

Studie von *Hampel et al.* (22) vergleichbar, während die einfach-ungesättigten Fettsäuren bei 28,6 g/100 g Fett lagen. Der relativ hohe Gehalt an mehrfach-ungesättigten Fettsäuren wird durch die Linolsäure (2,06), konjugierte Linolsäure (CLA= conjugated linoleic acid) (1,41) und die α -Linolensäure (1,17 g/100 g Fett) dominiert. Das Verhältnis von n-6 zu n-3 beträgt 1:0,6. Im Vergleich zu unseren Werten bei den mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (6,74 g/100 g Fett), α -Linolensäure (1,12 g/100 g Fett) und dem Verhältnis von n-6/n-3 (1:0,6) wiesen die Ostfriesischen Milchschafe von *Hampel et al.* einen Gehalt von $4,4 \pm 0,5$ und $1,9 \pm 0,2$ g/100 g Fett sowie ein Verhältnis von 1:1,4 auf.

Wie Ziegen- und Kuhmilch enthält auch Schafmilch verschiedene trans-Fettsäuren, zu denen auch die CLA zählen. Diese entstehen über die Biohydrierung der über das Futter aufgenommenen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren. Dabei bildet sich als Zwischenprodukt die trans-Vaccensäure (59). Den CLA werden verschiedene bedeutsame physiologische Funktionen zugeschrieben (60, 61). Der Gehalt der trans-Vaccensäure und des gesamten CLA in Schafmilch beträgt 2,88 resp. 1,51 g/100 g Fett und liegt damit unter dem in einer früheren Studie gefundenen Werten für Schafmilch aus dem Talgebiet (3,82 resp. 1,85 g/100 g Fett) wie auch des Berg- (4,18 resp. 2,01 g/100 g Fett) und des Alpengebietes (5,02 resp. 2,43 g/100 g Fett) (20). Bei den Ostfriesischen Milchschafen haben *Hampel et al.* (22) 1,62 g CLA/100 g Fett (Weideperiode 1,58 und Stallperiode 1,76 g CLA/100 g Fett) gefunden. Dieser Gehalt ist damit vergleichbar mit dem in dieser Studie für dieselbe Rasse ermittelten Wert von 1,58 g CLA/100 g Fett. Der erhaltene CLA-Wert der Schafmilch liegt im gleichen Rahmen wie derjenige der Kuhmilch aus der Sommerproduktion und ist höher als bei der Ziegen- (April und Oktober) und Kuhmilch aus der Winterproduktion (Tabelle 5). In Fett von Kuhmilch, die in unterschiedlichen Höhenstufen (600–650, 900–1210, 1275–2120 m) produziert wurde, haben wir einen deutlich erhöhten CLA-Gehalt in der Alpenmilch festgestellt (62). Dass das Schafmilch ebenso wie das Kuhmilchfett (63) saisonal bedingte Unterschiede: mehr CLA im Sommer- als im Wintermilchfett aufweist, haben bereits *Jahreis et al.* (64) nachgewiesen.

Vitamine

Die Untersuchung der Vitamine in Schafmilch beschränkte sich auf die Vitamine A, E, D₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂ und Folsäure (Tabelle 6). Mit Ausnahme der Vitamine D₃ und B₁₂ wurden Konzentrationen im $\mu\text{g}/100\text{ g}$ -Bereich gemessen. Diese Resultate unterscheiden sich von denjenigen von *Hampel et al.* (22): deutlich beim Vitamin A 41 ± 4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, Vitamin E 39 ± 3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, Vitamin B₂ 429 ± 74 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ und liegen etwa im ähnlichen Rahmen beim Vitamin B₁ 70 ± 8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Tabelle 6). Gegenüber der Ziegen- und Kuhmilch ist in Schafmilch die Konzentration der untersuchten Vitamine A, E, B₁ und B₂ höher. Ausnahmen davon bilden die Vitamine B₆ (vergleichbare Gehalte) und B₁₂ (nur für Kuhmilch zutreffend, da in Ziegenmilch kein B₁₂ gefunden wurde).

Tabelle 6
Vitamingehalt von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (1) (Median und Interquartilbereich; µg/100 g)

Vitamin	Schafmilch ¹ (n=11)		Ziegenmilch (n=12)		Kuhmilch past. (n=10)	
	\bar{x}	$I_{25;75}$	\bar{x}	$I_{25;75}$	\bar{x}	$I_{25;75}$
Vit. A	108	104; 114	52	42; 56	46	43; 48
Vit. E	247	215; 346	67	54; 85	112	99; 115
Vit. D ₃	<0,02		0,025	0,010; 0,053	nb	nb
Vit. B ₁	82	76; 93	16	11; 19	20	20; 21
Vit. B ₂	305	263; 320	108	76; 116	147	135; 156
Vit. B ₆	31	29; 34	38	36; 45	28	25; 30
Vit. B ₁₂	0,30 ^a	0,28; 0,31	0		0,12	0,11; 0,13
Folsäure	10,0	7,9; 13,2	nb		5,1	

\bar{x} =Median; $I_{25;75}$ =Interquartilbereich

nb=nicht bestimmt

¹ Probenahmezeitraum: April bis November 2005

^an=4; im Rahmen der Arbeit von *Collomb et al.* (20) ermittelt, aber unveröffentlicht

Mineralstoffe und Spurenelemente

Die Gehalte für die untersuchten Mineralstoffe und Spurenelemente sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Unter den Mineralstoffen enthält Schafmilch am meisten Kalzium. Eine frühere Studie zur Milch von ostfriesischen Milchschaafen schweizerischer Herkunft kam im Vergleich zur vorliegenden Studie zu folgenden Resultaten: Natrium 37 vs 46 mg/100 g, Kalzium 180 vs 171 mg/100 g, Kalium 140 vs 121 mg/100 g und Phosphor 130 vs 149 mg/100 g (19). In der Studie von *Hampel et al.* (22), in der Milch von Ostfriesischen Milchschaafen untersucht wurde, war der Gehalt des Kalziums (207 ± 18 vs 171 mg/100 g), des Natriums (56 ± 8 vs 46,4 mg/100 g), des Kaliums (164 ± 8 vs 121 mg/100 g) und des Magnesiums (24 ± 3 vs 19,1 mg/100 g) deutlich höher, aber derjenige des Phosphors vergleichbar (150 ± 8 vs 149 mg/100 g). In italienischer roher Schafmilch (n=7) betrug der Magnesiumgehalt $44,2 \pm 8,7$ mg/100 g (41). In Bezug auf die beiden untersuchten Rassen konnten bei den Mineralstoffen Kalzium, Magnesium und Phosphor statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Ein Vergleich mit dem Mineralstoffgehalt von Ziegen- und Kuhmilch zeigt folgende Unterschiede: Natrium ist in der Schafmilch um mehr als 40% resp. etwas weniger als 20%, Kalzium um die Hälfte, Magnesium um mehr als 70% und Phosphor um mehr als 60 resp. 50% höher als in der Ziegen- und Kuhmilch, dagegen Kalium um 40 resp. etwas mehr als 20% tiefer (Tabelle 7).

Unter den verschiedenen Spurenelementen weist Zink die höchste Konzentration auf, gefolgt von Eisen, Kupfer und Mangan (Tabelle 7). Auch hier zeigten sich zwischen den untersuchten Rassen einige statistisch signifikante Unterschiede. Der Spurenelementgehalt in der Milch der Ostfriesischen Milchschaafe dieser Studie und derjenigen von *Hampel et al.* (22) unterscheidet sich zum Teil recht deutlich: Zink 475 resp. 513 ± 11 µg/100 g, Eisen 27,6 resp. 51 ± 10 µg/100 g, Kupfer 4,0 resp. $8,7 \pm$

Tabelle 7

Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen von Schafmilch schweizerischer Herkunft im Vergleich zu Ziegen- (10) und pasteurisierter Kuhmilch (1) (Angaben pro 100 g)

Parameter	Einheit	Schafmilch ¹						Ziegenmilch		Kuhmilch past. (n=10)	
		alle		(n=81)			(n=30)				
		\bar{x}	s_x	O	L	K	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	
Natrium	mg	45,9	8,4	46,4	45,6	46,1	31,9	2,5	39,0	1,7	
Kalzium	mg	180	14	171	182	181	120	7	122	10	
Kalium	mg	118	14	121	117	118	195	8	155	4	
Magnesium	mg	17,5	2,1	19,1	17,1	17,2	10,0	0,8	10,4	0,4	
Phosphor	mg	140	13	149	137	140	87	6	92	4	
Zink	µg	512	79	475	540	492	294	39	362	52	
Eisen	µg	26,1	8,0	27,6	24,0	28,4	17,2	3,3	14,5	1,5	
Kupfer	µg	6,4	4,9	4,0	7,7	6,1	5,3	1,7	2,4	0,5	
Mangan	µg	5,5	1,3	5,9	5,9	5,1	4,3	1,2	2,1	0,2	

O = Ostfriesische Milchschafe (n=18); L = Lacaune = (n=41), K = Kreuzungstiere (n=27)

¹ Probenahmezeitraum: April bis November 2005

1,6 µg/100 g. Rohe Schafmilch aus Italien enthielt deutlich höhere Gehalte an diesen Spurenelementen: Zink 2160 ± 850 µg/100 g, Eisen 333 ± 92 µg/100 g, Kupfer 90 ± 34 µg/100 g (41). Nach diesen Autoren könnten die festgestellten höheren Gehalte mit möglichen Kontaktkontaminationen während der Probenerhebung erklärt werden. Im Vergleich zu Ziegen- und Kuhmilch ist die Schafmilch reicher an diesen Spurenelementen.

Nährstoffdichte

Als ein Kriterium zum Vergleich von Lebensmitteln untereinander kann die Nährstoffdichte herbeigezogen werden. Dabei handelt es sich um das Verhältnis des Nährstoffgehaltes (Menge in 100 g) bezogen auf die Energie (kcal, im Folgenden auf 100 kcal bezogen). Das Resultat dieser Berechnungen für Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Am Beispiel des Kalziums kann ausgesagt werden, dass die Ziegenmilch mit 211 mg/100 kcal nährstoffreicher ist als die Kuhmilch mit 182 mg/100 kcal und die Schafmilch mit 175 mg/100 kcal. Die Nährstoffdichte war in der Ziegenmilch bei neun Nährstoffen am höchsten gegenüber sechs in der Schaf- und zwei in der Kuhmilch.

Tabelle 8
Nährstoffdichte von Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch (pro 100 kcal)

		<i>Schafmilch</i>	<i>Ziegenmilch</i>	<i>Kuhmilch</i>
Protein	g	5,4	5,0	4,9
Fett	g	6,9	5,7	6,0
Laktose	g	4,6	7,4	7,0
Vit. A	µg	109,6	91,2	68,7
Vit. E	µg	283,5	117,5	167,2
Vit. B ₁	µg	82,5	28,1	29,9
Vit. B ₂	µg	284,5	189,5	219,4
Vit. B ₆	µg	32,0	66,7	41,8
Vit. B ₁₂	µg	0,29	0	0,18
Natrium	mg	44,6	56,0	58,2
Kalzium	mg	174,8	210,5	182,1
Kalium	mg	114,6	342,1	231,3
Magnesium	mg	17,0	17,5	15,5
Phosphor	mg	135,9	152,6	137,3
Zink	µg	497,1	515,8	540,3
Eisen	µg	25,3	30,2	21,6
Kupfer	µg	6,2	9,3	3,6
Mangan	µg	5,3	7,5	3,1

fett markiert = Nährstoff mit der höchsten Nährstoffdichte

Nährwertprofil

Dank ihrer Zusammensetzung kann die Schafmilch einen bedeutenden Beitrag an die Nährstoffversorgung leisten, was im Folgenden mit dem Verzehr von 4 dl Milch aufgezeigt wird. Dazu wurden die DACH-Empfehlungen (65) herbeigezogen. Mit dem Nährwertprofil wird dargestellt, welcher prozentuale Teil des empfohlenen Bedarfs durch die vorgegebene Menge an Schafmilch gedeckt wird. Das Nährwertprofil für eine Frau von 25 bis 51 Jahren zeigt, dass im Vergleich zur Energie Protein, Fett, Vitamin A, B₁, B₂ und B₁₂ sowie Natrium, Kalzium, Phosphor und Zink höhere prozentuale Anteile am empfohlenen Bedarf aufweisen (Abb. 2). Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich Natrium und Kalium auf den täglichen Mindestbedarf beziehen.

Im gleichen Nährwertprofil (Abb. 2) wurden auch die Werte für Kuh- und Ziegenmilch integriert. Der Vergleich zwischen diesen drei Milcharten zeigt einige wichtige Unterschiede auf. Die bedeutendsten liegen beim Fett und Protein und damit auch bei der Energie, beim Vitamin A, B₁, B₂ und B₁₂ sowie bei den Mineralstoffen.

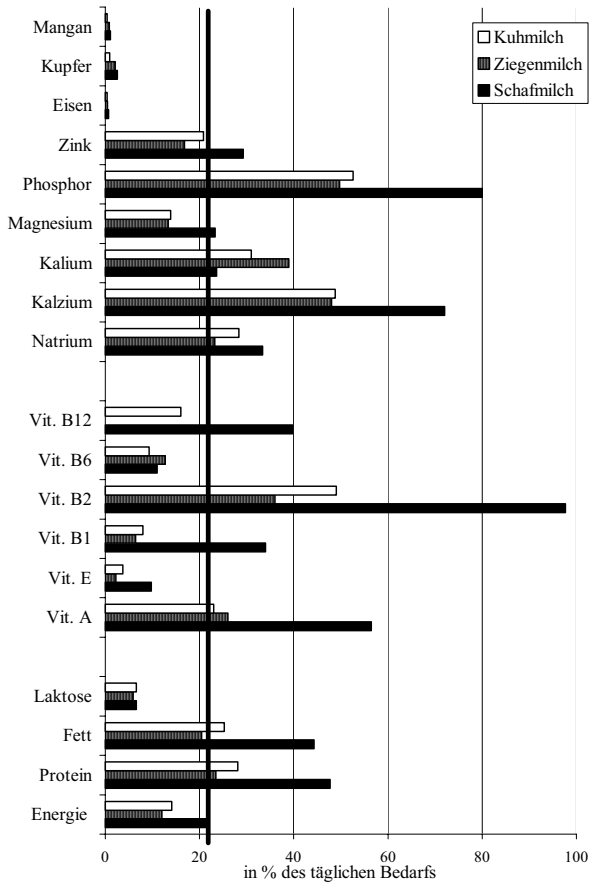


Abbildung 2 Nährwertprofil für den Verzehr von 4 dl Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch für eine Frau von 25 bis 51 Jahren (Natrium und Kalium beziehen sich auf den geschätzten täglichen Mindestbedarf)

Schlussfolgerung

Mit dieser Arbeit liegen unseres Wissens erstmals umfassende Resultate zur Zusammensetzung von in über einen Zeitraum von 6 Monaten produzierter Schafmilch schweizerischer Herkunft vor. Dabei wurden Resultate zur Zusammensetzung der Milch der beiden Schafrassen Ostfriesische Milchschafe und Lacaune sowie von Kreuzungstieren gewonnen. Diese Ergebnisse könnten Grundlagen für eine eventuelle Qualitäts- und Gehaltsbezahlung liefern. Im Vergleich zur Kuh- und Ziegenmilch sind einige Unterschiede vorhanden.

Dank

Den verschiedenen Milchschafterbesitzern sind wir für die zur Verfügung gestellten Milchproben zu Dank verpflichtet. Wir danken unseren Kolleginnen Maria Brühlhart, Marie-Louise Geisinger, Désirée Hirschi, Agathe Liniger, Priska Noth, Madeleine Tatschl für die Bestimmung von Fett, Protein, Mineralstoffen und Spurenelementen, Lychou Abbühl für diejenige von Laktose, Doris Fuchs für diejenige von Vitaminen und Aminosäuren, Monika Spahni-Rey und unserem Kollegen Patrick Malke für diejenige der Fettsäuren.

Zusammenfassung

Schafmilch schweizerischer Herkunft wurde analytisch auf ihre Zusammensetzung untersucht. Dabei wurden der Gehalt an Protein, Fett, Laktose, Vitaminen, Mineralstoffen, Spurenelementen, Aminosäuren und Fettsäuren bestimmt. Der Vergleich mit der Kuh- und Ziegenmilch zeigt einige Unterschiede auf.

Résumé

Le lait de brebis d'origine suisse a été analysé quant à sa composition en protéines, matière grasse, lactose, vitamines, sels minéraux, oligo-éléments, acides aminés et en acides gras. Des différences existent entre la composition du lait de brebis et celles de vache et de chèvre.

Summary "Composition of Swiss ewes milk"

In a study on the composition of sheep's milk available on the Swiss market, the contents of protein, fat, lactose, vitamins, mineral salts, trace elements, amino acids and fatty acids were determined. The comparison with milk of cow's and goat's shows some differences.

Key words

Sheep Milk, Composition, Nutrient

Literatur

- 1 Sieber R., Badertscher R., Bütikofer U. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischer pasteurisierter und ultrahocherhitzter Milch. Mitt. Lebensm. Hyg. **90**, 135–148 (1999)
- 2 Sieber R., Badertscher R., Bütikofer U. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischem Joghurt. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. **87**, 743–754 (1996)
- 3 Sieber R., Badertscher R., Eyer H., Fuchs D. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischem Voll-, Halb- und Kaffeerahm. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. **87**, 103–110 (1996)
- 4 Sieber R., Badertscher R., Bütikofer U., Collomb M., Eyer H. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischer Butter. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. **89**, 84–96 (1998)

- 5 Sieber R., Collomb M., Lavanchy P. und Steiger G.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung schweizerischer konsumreifer Emmentaler, Greyerzer, Sbrinz, Appenzeller und Tilsiter. Schweiz. Milchwirt. Forsch. 17, 9–16 (1988)
- 6 Sieber R., Badertscher R., Fuchs D. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung schweizerischer konsumreifer Weich- und Halbhartkäse. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg 85, 366–381 (1994)
- 7 Sieber R., Badertscher R., Bütikofer U. und Nick B.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischem Quark und Hüttenkäse. Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 662–669 (1999)
- 8 Sieber R.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von schweizerischem Ziger. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg 89, 294–300 (1998)
- 9 Sieber R., Badertscher R., Bütikofer U. und Meyer J.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von Glarner Kräuterkäse (Glarner Schabziger). Mitt. Lebensm. Hyg. 92, 188–196 (2001)
- 10 Sollberger H., Schaeren W., Collomb M., Badertscher R., Bütikofer U. und Sieber R.: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung von Ziegenmilch schweizerischer Herkunft. Mitt. Lebensm. Hyg. 95, 68–84 (2004)
- 11 Sieber R.: Zusammensetzung von Milch und Milchprodukten schweizerischer Herkunft. FAM-Information Nr. 426, 1–23 (2001), http://www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_SieberR_2001_15231.pdf, eingesehen 6. Dezember 2006
- 12 Bundesamt für Gesundheit und Eidgenössische Technische Hochschule Zürich: Schweizer Nährwertdatenbank (2006), <http://www.swissfir.ethz.ch/>, eingesehen 6. Dezember 2006
- 13 Scherz H. und Senser F.: Souci Fachmann Kraut. Food Composition and Nutrition Tables. Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives. 6. Auflage. medpharm Scientific Publishers, Stuttgart (2000)
- 14 Heseke B. und Heseke H.: Nährstoffe in Lebensmitteln. Die Grosse Energie- und Nährstofftabelle. 2. aktualisierte Auflage. Frankfurt (1999)
- 15 Favier J.-C., Ireland-Ripert J., Toque C. et Feinberg M.: Répertoire générale des aliments. Table de composition. 2^e éd. Paris (1995)
- 16 Food Standards Agency: McCance and Widdowson's the Composition of Foods: Summary Edition. 6th Edition. Royal Society of Chemistry, Oxford (2004)
- 17 Renner E. und Renz-Schauen A.: Nährwerttabellen für Milch und Milchprodukte. Verlag B. Renner, Giessen (1992)
- 18 TSM Treuhand GmbH, Schweizer Milchproduzenten (SMP), Sekretariat des Schweizerischen Bauernverbandes: Milchstatistik der Schweiz 2005. Brugg (2006)
- 19 Gerber H. und Baumgartner H.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Schafmilch. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. 56, 38–40 (1965)
- 20 Collomb M., Bütikofer U., Maurer J. und Sieber R.: Fettsäuren in Schafmilch von unterschiedlichen Höhenlagen. Agrarforschung 13, 330–335 (2006)
- 21 Eberhard P. und Bütikofer U.: UHT-Schaf- und -Ziegenmilch. Alimenta 2, 4–5 (16) (2006)
- 22 Hampel K., Schöne F., Böhm V., Leiterer M. und Jahreis G.: Zusammensetzung und ernährungsphysiologische Bedeutung von Schafmilch und Schafmilchprodukten. Dtsch. Lebensm. Rdsch. 100, 425–430 (2004)
- 23 Hardy G. and Marin A.: The nutritional value of sheep milk: a natural supplement for clinical nutrition? Bull. Int. Dairy Fed. 354, 36–37 (2000)
- 24 Martin-Hernandez C., Amigo L., Martin-Alvarez P.J. and Juarez M.: Differentiation of milks and cheeses according to species based on the mineral content. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 194, 541–544 (1992)
- 25 Albanell E., Caceres P., Caja G., Molina E. and Gargouri A.: Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 82, 753–758 (1999)

- 26 Kirst E., Rensing A., Hammel M., Klopsch B. und Schurig J.: Untersuchung von Schaf- und Ziegenmilch. Dt. Molk.-Ztg Lebensmittelind. Milchw. **123**, 37–43 (2002)
- 27 Bencini R. and Pulina G.: The quality of sheep milk: a review. Wool Technology and Sheep Breeding **45**, 182–220 (1997), zitiert nach Hampel et al. (22)
- 28 Fitscher C.: Untersuchungen zum Vorkommen, zur Bedeutung und zur Variabilität der Proteine, Peptide und freien Aminosäuren in Schafmilch. Dissertation Universität Giessen, 1–37 (1986)
- 29 Kracmar S., Gajdusek S., Kuchtik J., Zeman L., Horak F., Doupovcova G., Matejkova R. and Kracmarova E.: Changes in amino acid composition of ewe's milk during the first month of lactation. Czech J. Anim. Sci. **43**, 369–374 (1998)
- 30 Caric M. and Djordjevic J.: Amino acid composition of sheep milk casein. Milchwissenschaft **28**, 166–168 (1973)
- 31 Bernard H., Creminon C., Negroni L., Peltre G. and Wal J.M.: IgE cross-reactivity with caseins from different species in humans allergic to cow's milk. Food Agric. Immunol. **11**, 101–111 (1999)
- 32 Mozzon M., Frega N.G., Fronte B. and Tocchini M.: Effect of dietary fish oil supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in ewe milk. Food Technol. Biotechnol. **40**, 213–219 (2002)
- 33 Addis M., Cabiddu A., Pinna G., Decandia M., Piredda G., Pirisi A. and Molle G.: Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9,trans-11. J. Dairy Sci. **88**, 3443–3454 (2005)
- 34 Cabiddu A., Decandia M., Addis M., Piredda G., Pirisi A., and Molle G.: Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk. Small Rum. Res. **59**, 169–180 (2005)
- 35 Cabiddu A., Addis M., Pinna G., Spada S., Fiori M., Sitzia M., Pirisi A., Piredda G. and Molle G.: The inclusion of a daisy plant (*Chrysanthemum coronarium*) in dairy sheep diet. 1: Effect on milk and cheese fatty acid composition with particular reference to C18:2 cis-9, trans-11. Livestock Sci. **101**, 57–67 (2006)
- 36 Scott K.J. and Bishop D.R.: Nutrient content of milk and milk products: vitamins of the B complex and vitamin C in retail market milk and milk products. J. Dairy Sci. Technol. **39**, 32–35 (1986)
- 37 Sawaya W.N., Khalili J.K., Al-Shalhat A.F. and Al-Mohammad M.M.: Mineral and vitamin contents of sheep milk. Milchwissenschaft **40**, 81–83 (1985)
- 38 Sahan N., Say D. and Kacar A.: Changes in chemical and mineral contents of Awassi ewes' milk during lactation. Turk. J. Vet. Anim. Sci. **29**, 589–593 (2005)
- 39 Van Dael P., Shen L., van Renterghem R. and Deelstra H.: Selenium content of sheep's milk and its distribution in protein fractions. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **196**, 536–539 (1993)
- 40 Coni E., Bocca A., Coppolelli P., Caroli S., Cavallucci C. and Marinucci M.T.: Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. Food Chem. **57**, 253–260 (1996)
- 41 Coni E., Bocca B. and Caroli S.: Minor and trace element content of two typical Italian sheep dairy products. J. Dairy Res. **66**, 589–598 (1999)
- 42 Skeaff C.M., Williscroft K., Mann J. and Chisholm A.: Replacing cows' with sheep's dairy fat lowers plasma cholesterol concentration in participants consuming dairy fat-rich diets. Eur. J. Clin. Nutr. **58**, 250–257 (2004)
- 43 Anonymous: Cheese and processed cheese products. Determination of the total solids contents. IDF Standard 4A (1982)
- 44 Collomb M., Spahni M. et Steiger G.: Dosage de la teneur en azote selon Kjeldahl de produits laitiers et de certaines de leurs fractions azotées à l'aide d'un système automatisé. Trav. chim. aliment. hyg. **81**, 499–509 (1990)

- 45 *Anonymous*: Milk. Fat content (Röse Gottlieb). IDF Standard 1C (1987)
- 46 *Anonymous*: Methoden der biochemischen Analytik und Lebensmittelanalytik. Boehringer GmbH, Mannheim (1986)
- 47 *Anonymous*: Cheese and processed chesse products. Determination of total phosphorus content (Photometric method). IDF Standard 33 C (1987)
- 48 *Tagliaferri E., Bosset J.O., Bütikofer U., Eberhard P. und Sieber R.*: Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen sowie nach verschieden langen Belichtungszeiten. II. Bestimmung des Vitamins B₁ mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. **83**, 435–452 (1992)
- 49 *Tagliaferri E., Sieber R., Bütikofer U., Eberhard P. und Bosset J.O.*: Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen sowie nach verschieden langen Belichtungszeiten. III. Bestimmung des Vitamins B₂ mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode. Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. **83**, 467–491 (1992)
- 50 *Bognar A.*: Bestimmung von Vitamin B₆ in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **181**, 200–205 (1981)
- 51 *Gauch R., Leuenberger U. und Müller U.*: Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine B₁, B₂, B₆ und B₁₂ in Milch durch HPLC. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **195**, 312–315 (1992)
- 52 *Anonymus*: Schweizerisches Lebensmittelbuch, Vitamin D. Kapitel 62, Untersuchungsmethode 3 (2000)
- 53 *Vahteristo L.T., Ollilainen V., Koivistoinen P.E. and Varo P.*: Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. **44**, 477–482 (1996)
- 54 *Collomb M. et Bühler T.*: Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait. I. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution. Trav. chim. aliment. hyg. **91**, 306–332 (2000)
- 55 *Bütikofer U., Fuchs D., Bosset J.O. and Gmür W.*: Automated HPLC-amino acid determination of protein hydrolysates by precolumn derivatization with OPA and FMOC and comparison with classical ion exchange chromatography. Chromatographia **31**, 441–447 (1991)
- 56 *Högl O. und Lauber E.*: Nährwert der Lebensmittel. In: Schweizerisches Lebensmittelbuch, S. 713–735. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern (1964)
- 57 *Sieber R.*: Allergene in der Milch. In: Wüthrich, B. (Hsg.), Nahrungsmittel und Allergie, S. 175–191. Düstri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen (2002)
- 58 *Templeman R.P. and Tivey D.R.*: Australian Hyfer ewe's milk: Fatty acid composition and fat globule size. Austr. J. Dairy Technol. **52**, 98–101 (1997)
- 59 *Collomb M., Sieber R. and Bütikofer U.*: CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. Lipids **39**, 355–364 (2004)
- 60 *Pariza M.W.*: Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. Am. J. Clin. Nutr. **79**, 1132S–1136S (2004)
- 61 *MacDonald H.B.*: Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. J. Am. Coll. Nutr. **19**, 111S–118S (2000)
- 62 *Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Bosset J. and Jeangros B.*: Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands. J. Dairy Res. **68**, 519–523 (2001)
- 63 *Collomb M., Malke P., Spahni M., Bütikofer U. et Sieber R.*: Dosage des acides gras trans et linoléique conjugués dans la matière grasse du lait par chromatographie gaz-liquide: Comparaison des méthodes et étude de la variation des teneurs en fonction des saisons et de l'altitude. Trav. chim. aliment. hyg. **93**, 459–480 (2002)

- 64 Jahreis G., Fritsche J., Möckel P., Schone F., Möller U. and Steinhart H.: The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutr. Res.* **19**, 1541–1549 (1999)
- 65 *Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung und Schweizerische Vereinigung für Ernährung*, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage. Umschau/Braus, Frankfurt am Main (2000)

Korrespondenzadresse: Jürg Maurer, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, 3003 Bern, E-Mail: juerg.maurer@alp.admin.ch

Mercury concentration in perch and whitefish from Swiss lakes

Max Haldimann, Annabelle Blanc and Vincent Dudler
Swiss Federal Office of Public Health, 3003 Bern, Switzerland

Eingegangen am 6. Februar 2007, akzeptiert am 23. Mai 2007

Introduction

Mercury (Hg) is considered to be a contaminant of continuing concern. The major natural source of mercury is the degassing of the earth's crust. Industrial activities contribute a considerable part to the global emission of mercury to the atmosphere as well (1). Elemental mercury in the atmosphere is oxidized by ozone or hydrogen peroxide to soluble forms, e.g., Hg^{2+} , and deposited by rain onto soil and water (2). Its presence and behavior in aquatic systems is of ecological importance. Local variations of the mercury concentrations are considerable, especially in coastal sea water and in lakes or rivers where mercury is associated with suspended material. Hg^{2+} forms organometallic compounds. The most numerous are those of the type RHgX , where R represents the organic moiety and X may be one of a variety of anions. Hg^{2+} is converted to methyl mercury in sediments in fresh and ocean waters, e.g., by methyl cobalamine compounds that are produced as a result of bacterial synthesis (3). Fish absorb methyl mercury as they feed on aquatic organisms. Originating from plankton, methyl mercury accumulates in the aquatic food chain (4). Maximum concentrations are found in both freshwater and marine fish at the highest trophic levels. Predatory fish such as shark and swordfish may have average values of total mercury in edible tissues well above $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ (5), whereas pike from Swiss lakes does not normally exceed this concentration (6). Elevated mercury levels ($>1000 \mu\text{g}/\text{kg}$) in pike were found in Finnish reservoirs (7).

Methyl mercury is the predominant mercury species in fish. Methyl mercury to total mercury ratios approach unity in muscle tissue of higher food chain fish residing in waters that are relatively uncontaminated with mercury. Freshwater fish such as whitefish exhibit high methyl mercury to total mercury ratios as well (8).

Mercury toxicity depends on its chemical form, alkyl mercury compounds being the most toxic. Methyl mercury is lipophilic and penetrates cell membranes. In general, the effects of exposure to organic mercury are primarily neurological (9).

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) recommended a provisional tolerable weekly intake (PTWI) of mercury of 5 µg/kg body weight (bw), of which no more than 1.6 µg/kg bw weight should be methyl mercury (10). Total mercury in fishery products is regulated by the European Commission Decision 93/351 (11). The mean total content of mercury in edible parts of fish must not exceed 0.5 mg/kg of fresh products. The limit value is, however, increased to 1 mg/kg in certain predatory species. Switzerland has adopted essentially the same regulation (12).

Despite its excellent sensitivity, the use of ICP-MS for the determination of mercury in fish samples digested by nitric acid has been restricted because of memory effects and erratic signals (13). Although the limitations can be overcome by cold vapor generation or flow-injection (14), a rapid and robust method has been developed using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) as a tissue solubilizer. TMAH solubilization was previously used as a sample preparation method for gas chromatographic determination of mercury (15). Species interconversion during the pretreatment of the fish samples with TMAH is of the order of only a few percent (16).

Human exposure to methyl mercury is primarily through the consumption of fish. Although most people's fish consumption does not cause adverse health effects, some fish may contain methyl mercury at sufficiently high levels to be a concern. The purpose of this study was to provide recent data on total mercury concentration in significant species of freshwater fish intended for human consumption and thereby identify sites with high fish-mercury concentrations. As a basis for food safety recommendations, it is important to have reliable up-to-date information on the levels and distribution of total mercury in individual fish. European perch (*Perca fluviatilis*), roach (*Rutilus rutilus*) and whitefish (*Coregonus* spp.) from Swiss lakes and lakes bordering Germany and France were analyzed. These species are among the principal fishing products. This paper presents the results of a survey of total mercury in 168 fish samples. The mercury measurements were part of a monitoring program focused on polychlorinated contaminants, particularly dibenzofurans (PCDF) biphenyls (PCB) and dibenzo-p-dioxins (PCDD) in fish (17).

Material and methods

Fish samples

The perch, roach and whitefish samples were collected from September to December 2001 by the respective fishery authorities of the lakes (Figure 1). From 5 to 34 fishes were obtained from each lake, with approximately equal numbers of males and females per species. The sample groups were comparatively homogenous with respect to length. The length, weight, and location of collection were recorded for each fish. The fishes were dissected, the skin was removed and representative tissues were cut into small pieces. The subset of the filet pieces was put aside and



Figure 1 Fish sampling locations for selected species: Lake Geneva (A), Neuchâtel (B), Biel (C), Thune (D), Sempach (E), Lucerne (F), Zug (G), Zurich (H), Greifensee (I) and Constance (J). No samples were obtained from Lakes Maggiore (K) and Lugano (L)

stored in a deep freezer at -20°C . After thawing, the samples of fish tissues were cut into small pieces (approximately 0.5 cm cubes) on a plastic cutting board using a ceramic blade knife. The composite fish samples were freeze-dried for 48 h. Freeze-dried fish tissue can be homogenized more effectively than wet tissue (8). Subsequently, the dried samples were thoroughly milled into a homogenous sample using a knife mill (Grindomix GM 200, Retsch, Germany).

Pulverized freeze-dried fish tissue samples (0.3 g) and 2.5 ml of 25 % analytical grade TMAH solution (TAMA Chemicals, Japan) were placed in a graduated 50 ml polypropylene tube and heated in an oven at a fixed temperature of 90°C for 3 h. After cooling, the sample solubilization solutions were made up to volumes of 50 ml by addition of ultra-pure water (18 M Ω , Easy Pure LF, Barnstead, USA) and then centrifuged for 5 min at 5100 rpm (Labofuge 400, Heraeus, Germany). The final dissolution for the measurement was made with 500 μl of the supernatant and 1500 μl 1.2 % TMAH solution.

Calibration solutions and reference materials

The stock solution of methyl mercury was prepared by dissolving methyl mercury (II) chloride (Pestanal[®], Riedel-de Haën, Germany) in analytical grade 2-propanol (Riedel-de Haën) to obtain a solution of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The calibration solutions were prepared by appropriate dilution of the methyl mercury chloride

stock solution with 1.2% TMAH solution to obtain mercury levels of 0.5, 1, 2 and 3 µg/l. Two certified reference materials were used to validate the proposed method. DORM-2 (dogfish muscle) and BCR-422 (cod muscle) were obtained from the National Research Council of Canada (NRC) and the Community Bureau of Reference (BCR), respectively. In addition, canned fish test material (tuna) was obtained from FAPAS®. The FAPAS sample was prepared in the same way as described above.

Instrumentation

The sector field-ICP-MS instrument used in this work was an Element 2 (Thermo-Finnigan, Germany), equipped with a mini-cyclonic glass spray chamber with a central tube (Twinnabar, Glass Expansion, Australia) for a better filtering effect and a Sea Spray nebulizer (Ar30-07-FSS04, Glass Expansion) operating at a sample uptake of 0.3 ml/min and sample-gas (Ar) flow ranging from 0.9–1.0 l/min (Auxiliary gas flow 0.6 l/min). The plasma-gas flow was 16 l/min at a power of 1.2 kW. The mercury isotope ²⁰²Hg was monitored using take-up and wash times of 2 min and 10 min, respectively. Blanks, standards and samples were measured using this procedure.

Statistical evaluation

The two-sample t-test was performed to compare the mean mercury concentrations for the two principal species perch and whitefish originating from the same lake (5 cases). Pearson correlation coefficients (r) were computed to examine potential relationships between mercury concentration and biometric data.

Results and discussion

Method and quality control

TMAH was considered as the most appropriate tissue solubilizer, as it was able to dissolve the samples almost completely under mild conditions. Following the solubilization of the fish samples in TMAH, the fraction of inorganic mercury was expected to be bound to soluble proteins or other molecules and therefore the residual sample matrix was not analyzed for insoluble mercury (18). Compared with conventional sample preparation techniques for mercury analysis, this method is relatively simple and fast. Methyl mercury chloride has a covalent Hg-Cl bond, thus its use as calibration standard emulates the chemical form of mercury in fish (19). The Sea Spray nebulizer that was designed to produce aerosol from solutions with a high content of total dissolved solids (20) has proven to be effective for solubilized solutions; hence no instabilities were observed.

Quality control measures for each analytical batch included duplicates of two different standard reference materials with certified mercury concentrations. In addition, the laboratory participated in a proficiency testing program (FAPAS®),

which is a food analysis performance assessment scheme (21). The quality control results, summarized in Table 1 were satisfactory, as the 95 % confidence intervals of both reference materials largely overlap with the corresponding intervals of the measurements. The performance in the FAPAS® proficiency test was considered satisfactory because an individual z-score of 1.1 was obtained (Table 1). The positive z-score value indicates that the method, including sample preparation, was not prone to mercury losses. In addition, the results in Table 1 suggest that the method yields results for total mercury and is not selective with regard to methyl mercury. Duplicate analysis for mercury was completed on homogenized fish tissue during the analytical runs and showed a 93 % agreement between samples on average. The between-run precision as inferred from the BCR 422 sample was about 4 % (Table 1).

Table 1
Quality control results summarized for all analytical batches (\pm half width of the 95 % confidence intervals)

Reference material	n	Certified or target values		Measured total mercury ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		Total mercury ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Methyl mercury ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
BCR CRM 422, cod	6 ¹	559 \pm 16	430 \pm 60	534 \pm 20
NRC DORM-2, dogfish	5 ¹	4640 \pm 260	4470 \pm 320	4660 \pm 130
FAPAS®, canned tuna	3	397 \pm 146 ²	no data	476 \pm 19

¹sets of results (each of 2 replicates)

²assigned value with z-scores of -2 and +2, based on the results submitted by the participants in food analysis performance assessment scheme (FAPAS®).

Edible tissue mercury concentration and geographical variation

Table 2 summarizes the mean total mercury concentrations found in each composite sample with its characteristics (species, weight and sizes of fish) and location of sampling. By species, the average mercury concentration (wet weight) ranged from 24.8 to 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for whitefish and from 77.5 to 173 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for perch. Only one composite sample was available for roach.

The results for all samples did not exceed the maximum legal limit of 0.5 mg/kg (wet weight) for these species. The highest mercury concentrations were found in perch and whitefish harvested from Lake Biel, probably as a result of high microbial activity, i.e., microbial synthesis of methyl mercury from its inorganic precursor (22). Within species, mercury concentrations varied according to the sample sites. Among species, significant differences between perch and whitefish were found (Figure 2). In fact, higher mercury concentrations were measured in perch than in whitefish, if pairs originating from the same lake were compared ($p=0.02$). The differences in mercury concentrations indicate the higher trophic position of European perch, which is a predatory species that feeds on fishes and invertebrates. These findings agree with a previous study on whitefish and perch collected from several Swiss lakes (23).

Table 2

Total mercury (Hg) concentrations in edible tissue (wet and dry mass) of whitefish (*Coregonus* spp), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*), collected from lakes in Switzerland

Fish Species	Sampling Site	Harvest (t) ¹	Sample Size ²	Weight (g) ³	Length (cm) ³	Hg (µg/kg) dry mass	Hg (µg/kg) wet mass
Whitefish	Lake Biel	96	10	259 ± 22	30.7 ± 1.2	457	120
Perch	Lake Biel	15	10	149 ± 72	23.6 ± 2.9	746	173
Whitefish	Lake Constance	265	10	283 ± 62	32.3 ± 2.7	239	64.3
Perch	Lake Constance	78	34	79.6 ± 21	18.9 ± 1.4	359	77.5
Whitefish	Lake Geneva	67	10	552 ± 45	40.3 ± 1.6	118	33.2
Perch	Lake Geneva	165	14	64.0 ± 16	17.4 ± 1.9	524	114
Whitefish	Lake Greifen		5	640 ± 114	40.4 ± 1.7	262	62.9
Whitefish	Lake Neuchâtel	201	10	304 ± 96	33.4 ± 2.7	191	56.6
Perch	Lake Neuchâtel	51	10	93.0 ± 96	18.3 ± 4.7	376	82.4
Whitefish	Lake Sempach	71	10	95.5 ± 14	26.4 ± 1.2	113	24.8
Whitefish	Lake Thune	11	10	237 ± 39	30.4 ± 1.3	327	85.0
Whitefish	Lake Lucerne	113	10	75.7 ± 8.8	21.9 ± 1.1	224	50.2
Whitefish	Lake Zug	9	10	319 ± 99	31.6 ± 2.7	207	45.7
Roach	Lake Zurich	38	5	372 ± 220	27.4 ± 6.5	241	53.2
Whitefish	Lake Zurich	138	5	390 ± 33	34.4 ± 1.1	163	36.7
Perch	Lake Zurich	50	5	274 ± 207	27.2 ± 6.8	559	113

¹ Mean harvest data from 2002/3 (Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape 2005), resulting in a weighted mean $\bar{x}_w = \sum w_i x_i = 70 \mu\text{g/kg}$; where w_i is the ratio between individual and total harvest and x_i the mercury concentration (wet mass).

² Number of individual fishes per composite sample

³ Mean value ± standard deviation

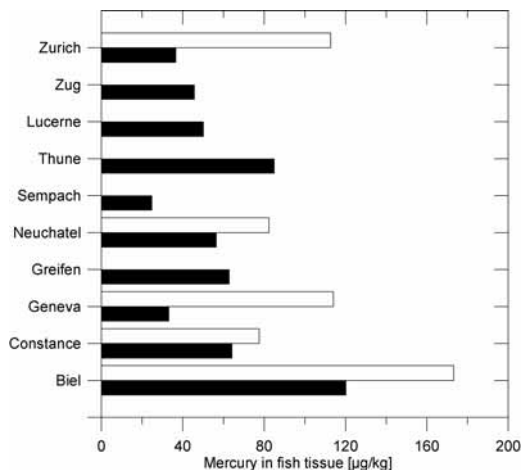


Figure 2 Total mercury concentrations in tissue of perch (white bars) and whitefish (black bars) from Swiss lakes

The changes in fish-mercury concentrations among samples collected across different lakes are due to either spatial or sample characteristic effects or some combination (Figure 2). The fish-mercury concentrations in this study represent average values from subsets, which consist of samples with differing characteristics, such as ecotype, age or sizes of fish. Ecotypes feed on different organisms and large-size fish may accumulate more mercury. Mercury concentrations in fish are known to increase with age due to cumulative exposure (24), but fish ages were not recorded for the caught populations. Fish lengths and weights can be used as surrogates for age, and positive relationships between mercury concentrations and both size and age were reported for perch (24, 25). Due to the limited number of observations (composite samples) in this study, the mercury concentrations were not positively related to both length and wet weight in whitefish and perch ($r=0$; $0.05 < p < 1$).

Development of the fish mercury concentration

To put the observations of fish tissue mercury levels into perspective, comparable measurements from previous and recent studies were compiled (22, 23, 26, 27). Available data regarding mercury concentrations in perch and whitefish from the lakes Geneva and Biel are shown in Figure 3. Although perch and whitefish of variable size are included in the data presented in Figure 3, a distinction for the mercury concentrations between the two species is visible. This distinction remains even if the time aspect regarding the decline of mercury in fish from Lake Geneva is taken into consideration.

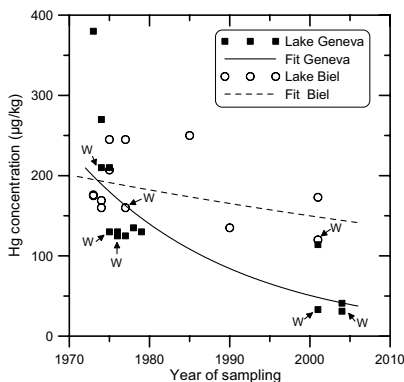


Figure 3 Comparison of the measured mean mercury levels in edible fish tissue (muscle) with previously published data from the lakes Geneva (■) and Biel (○). The dots denoted either with “w” or without a letter are mean values of mercury concentrations in whitefish and perch, respectively. The fits ($\ln[\text{Hg}] = a + b \cdot \text{Year}$) to the data corroborate the difference in fish mercury decline for the two lakes

The reduced concentrations in fish from Lake Geneva may be a result of initiatives for controlling releases and limiting use of mercury (28). Contrary to Lake Geneva, the corresponding data from Lake Biel do not show a comparable decrease in mercury levels over time.

In this study, no samples were obtained from the lakes Maggiore and Lugano bordering Italy (Figure 1). Published data show, however, that the mercury level in whitefish from Lake Maggiore ($117 \pm 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) falls in the range listed in Table 2 and has remained constant over the past six years (29).

Risk assessment

The total fish intake that consists of fresh, frozen and processed fish varies greatly throughout Europe (30). FAO statistics show the highest annual per capita consumptions to be in Norway (50 kg), Spain (41 kg) and France (29 kg), whereas Germany (14 kg) and Switzerland (8 kg) rank among the lowest in Europe (31). Perch, roach and whitefish are the most frequently caught species in Swiss lakes. The annual harvest yields approximately 1500 t, which, however, represents only a small fraction (2.5 %) of the Swiss per capita consumption (32). The estimated average weekly consumption of local freshwater fish by the Swiss population is therefore only about 4 g. As it is imperative to consider fish that is actually being consumed, an overall mean mercury tissue concentration of $70 \mu\text{g}/\text{kg}$ was calculated weighted with the respective harvests (Table 2). As a result, the weekly per capita mercury exposure from these species was about $0.3 \mu\text{g}$, i.e., a dietary exposure much lower than that recommended by JECFA, assuming any body weight. The average population, however, includes both fish eaters and non-fish eaters. Exposure to fish-mercury is determined by an individual's consumption pattern. Frequent fish eaters could have dietary mercury intakes that substantially exceed the average mercury intake of the population. By consuming reasonable weekly fish meals of 200 g (30), the JECFA PTWI of $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw would be exceeded for a person with a body weight of 60 kg, if the individual fish contained total mercury concentrations in excess of $1500 \mu\text{g}/\text{kg}$. All values listed in Table 2 are markedly below this concentration. Given that mercury accumulates in fish tissue primarily as methyl mercury, the PTWI of $1.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ bw, as methyl mercury, is not exceeded under the same assumptions as before. Consequently, the fish species investigated in this study were not contaminated to a level of concern.

Conclusion

The accumulation of mercury in Swiss freshwater fish is not higher than what one would expect from the comparison with previously published data. Although no significantly elevated mercury levels were observed, the data obtained from this monitoring program indicate that mercury contained in edible portions of fish tissue can vary greatly depending on the species collected and the location of the harvest. In principle, comprehensive risk assessments should take into account

the geographic location. The mercury risk depends on the dietary habits of the consumer and sources of contaminated fish. The mercury exposure level estimated in this study does not pose a health threat to average consumers of freshwater fish. In contrast, people who consume high amounts of contaminated marine fish may be more exposed to mercury and are therefore at greater risk of adverse health effects. Public health food policies should strike a balance between the nutritional benefits of fish and the potential risk from exposure to contaminants such as mercury compounds.

Acknowledgment

The authors thank Erich Staub, Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape, for his helpful comments on the data. We further thank Alan Eastgate for critical comments on the manuscript.

Summary

The purpose of this study was to determine the concentrations of mercury in the edible portion of fish tissue and to estimate mercury exposure from the consumption of European perch, whitefish and roach collected from selected lakes in Switzerland. The samples were grouped by species and location of collection and were analyzed as composites. The concentration of total mercury was determined using sector-field ICP-MS after tissue solubilization with tetramethylammonium hydroxide. The concentrations ranged from 24.8 to 120 µg/kg and from 77.5 to 173 µg/kg in the tissue of whitefish and perch, respectively. The single roach composite sample had a concentration of 53.2 µg/kg. Differences were noted in the concentration of mercury depending on the location of collection and the species examined. Perch contained higher concentrations of mercury when compared with whitefish from the same lake. The consumption of fish with mercury levels found in this study is not likely to result in exposures of concern. Even frequent consumers are not at risk from such mercury levels. Provided that normal quantities of perch and whitefish are consumed once a week, the dietary mercury intake would fall below the provisional tolerable weekly intake (PTWI).

Zusammenfassung

Der Zweck dieser Studie war die Bestimmung von Quecksilber im essbaren Anteil von Fisch und die Abschätzung der Quecksilberbelastung, die sich aus dem Verzehr von Egli, Felchen und Rotaugen ergibt. Die Proben wurden entsprechend der Fischart und der Herkunft aus ausgewählten Seen der Schweiz als Mischproben analysiert. Die Gesamtkonzentration von Quecksilber wurde nach Auflösen des Gewebes in Tetramethylammoniumhydroxid mittels Sektorfeld-ICP-MS bestimmt. Die Konzentrationen reichten von 24,8 bis 120 µg/kg für Felchen, beziehungsweise von 77,5 bis 173 µg/kg für Egli. Die einzige Mischprobe für Rotaugen wies eine Konzentration von 53,2 µg/kg auf. Abhängig vom See, aus welchem die Fische her-

kamen und von der Fischart, ergaben sich Unterschiede in der Quecksilberkonzentration. Im Vergleich zu Felchen war die Quecksilberkonzentration in Egli stets höher, falls die Proben aus demselben See stammten. Der Verzehr von Fischen, welche die in dieser Studie gemessenen Gehalte aufweisen, führt nicht zu einer besorgniserregenden Belastung mit Quecksilber. Selbst Konsumenten, die häufig Fisch verzehren, gehen kein erhöhtes Risiko ein. Unter der Voraussetzung, dass nicht übermässig hohe Mengen an Egli und Felchen konsumiert werden, liegt die Quecksilberaufnahme unterhalb der vorläufig tolerierbaren wöchentlichen Aufnahmemenge (PTWI – provisional tolerable weekly intake).

Résumé

La teneur en mercure dans la partie comestible de poissons provenant de lacs suisses (perche commune, corégones et gardon) a été déterminée dans cette étude et l'exposition au mercure a été estimée à partir de leur consommation. Les poissons ont été groupés par espèces et lieu de pêche puis analysés comme échantillon composite. La concentration totale de mercure a été déterminée par spectrométrie de masse à secteur magnétique ICP-MS après solubilisation des chairs par de l'hydroxyde de tétraméthylammonium. Les concentrations mesurées se répartissent entre 24,8 et 120 µg/kg pour les corégones et entre 77,5 et 173 µg/kg pour la perche commune. L'unique échantillon composite de gardon montre une concentration de 53,2 µg/kg. Des différences dans la concentration de mercure sont observées en fonction du lieu de pêche et de l'espèce. La perche commune a une teneur en mercure plus élevée que les corégones d'un même lac. La consommation de poisson ayant une teneur en mercure semblable à celles observées dans cette étude ne pose pas de risque sanitaire. A ce niveau de contamination, même une consommation régulière ne pose pas de problème. En estimant qu'une quantité normale de perche et corégones soit consommée une fois par semaine, la quantité de mercure ingéré reste inférieure à la valeur de consommation hebdomadaire tolérable provisoire (PTWI – provisional tolerable weekly intake).

Key words

freshwater fish, mercury, perch, roach, sector-field ICP-MS, tissue solubilization, whitefish

References

- 1 Pacyna E.G. and Pacyna J.M.: Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995. *Water Air Soil Pollut.* 137,149–165 (2002)
- 2 Horvat M.: Mercury – do we know enough? In: Ebdon L, Cornelis R, Crews H, Donard OF, Quevauviller P (Eds.) *Trace element speciation for environment, food and health*, 1st ed., 127–141, Royal Society of Chemistry, Cambridge UK (2001)
- 3 Wood J.M. and Wang H.K.: Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology* 17, 582A–590A (1983)

- 4 Westcott K. and Kalff J.: Environmental factors affecting methyl mercury accumulation in zooplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 2221–2228 (1996)
- 5 Forsyth D.S., Casey V., Dabeka R.W. and McKenzie A.: Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada. *Food Addit. Contam.* **21**, 849–856 (2004)
- 6 Official Food Control Authority of the canton of Bern. Retrieved July 7, 2005, from http://www.gef.be.ch/site/gef_kl_jahresbericht_2003.pdf
- 7 Porvari P.: Development of fish mercury concentrations in Finnish reservoirs from 1979 to 1994. *Sci. Total Environ.* **213**, 279–290 (1998)
- 8 Lasorsa B. and Allen-Gil S.: The methylmercury to total mercury ratio in selected marine, freshwater and terrestrial organisms. *Water Air Soil Pollut.* **80**, 905–913 (1995)
- 9 Risher J.F., Murray H.E. and Prince G.R.: Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. *Toxicol. Ind. Health* **18**, 109–160 (2002)
- 10 JECFA: Safety evaluation of certain food additives and contaminants, prepared by the 61st meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, WHO (2003)
- 11 Commission decision of 19 May 1993 determining analysis methods, sampling plans and maximum limits for mercury in fishery products. *Official Journal L* **144**, 16/06/1993 P. 0023–0024
- 12 Ordinance of the Department of Home Affairs on Foreign Substances and Constituents in Foods (Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln) SR 817.021.23. (1995) Web site: http://www.admin.ch/ch/d/sr/817_021_23/index.html
- 13 Moreton J.A., and Delves H.T.: Simple direct method for the determination of total mercury in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, 659–665 (1998)
- 14 Tao G., Willie S.N. and Sturgeon R.E.: Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1929–1931 (1999)
- 15 Tseng C.M., De Diego A., Martin F.M., Amouroux D. and Donard O.F.: Rapid determination of inorganic mercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 743–750 (1997)
- 16 Qvarnström J. and Frech W.: Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, 1486–1491 (2002)
- 17 Zennegg M., Schmid P., Gujer E. and Kuchen A.: PCDD, PCDF, and dioxin-like PCB in fish from Swiss lakes. 22nd International Symposium on halogenated environmental organic pollutants, Barcelona, Proceedings **58**, 489 (2002)
- 18 Puk R. and Weber J.H.: Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Appl. Organomet. Chem.* **8**, 293–302 (1994)
- 19 Harris H.H., Pickering I.J. and George G.N.: The chemical form of mercury in fish. *Science* **301**, 1202 (2003)
- 20 Shuyin C. and Yunlong L.: A novel type of concentric glass nebulizer for an analysis of solutions with high salt content by inductively coupled plasma atomic spectroscopy. *Spectrochim. Acta B* **43**, 287–291 (1988)
- 21 FAPAS: Metallic contaminants in canned fish. Proficiency test report 0757, FAPAS, York 2005
- 22 Rieder K.: Quecksilber, Blei und Cadmium in Fischen aus bernischen Gewässern. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **84**, 8–15 (1993).
- 23 Favarger P.Y.: Teneur en Mercure des Poissons des lacs Suisses, 1973–1979. *Chimia* **36**, 365–372 (1982)
- 24 Metsälä T. and Rask M.: Mercury concentrations of perch, *perca fluviatilis* L., and in small Finish headwater lakes with different pH and water colour. *Aqua Fennica* **19**, 41–46 (1989)

- 25 Szefera P., Domagala-Wieloszewska M., Warzocha J., Garbacik-Wesolowska A. and Ciesielski T.: Distribution and relationships of mercury, lead, cadmium, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) from the Pomeranian Bay and Szczecin Lagoon, southern Baltic. *Food Chem.* **81**, 73–83 (2003)
- 26 Hegi H.R. und Geiger W.: Schwermetalle (Hg, Cd, Cu, Pb, Zn) in Lebern und Muskulatur des Flussbarsches (*Perca fluviatilis*) aus Bielersee und Walensee. *Schweiz. Z. Hydrol.* **41**, 94–107 (1979)
- 27 Corvi C., Zimmerli P., Ortelli D., Khim-Heang S. et Becker van Slooten K.: Métaux et micropolluants organiques dans les eaux, les moules et les poissons du Léman. Campagne 2004. *Rapp. Comm. Int. prot. Eaux Léman contre pollut.* 55–77 (2005)
- 28 Müller P.M.: Swiss contribution to the global mercury assessment as initiated by the United Nations Environment Programme (UNEP). Review published by the Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape, Bern 2001
- 29 Official Food Control Authority of the canton of Ticino. Retrieved August 17, 2005, from <http://www.ti.ch/DSS/DSP/LabC/temi/rapporti>
- 30 Welch A.A., et al.: Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* **5**, 1273–1285 (2002)
- 31 FAO: Statistical Databases FAOSTAT. Retrieved August 19, 2005, from <http://www.faostat.fao.org>
- 32 Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape. Retrieved 2005 July, 2005, from <http://www.umwelt-schweiz.ch/buwal>

Corresponding address: Max Haldimann, Swiss Federal Office of Public Health, Division of Food Science, Food Chemistry Section, 3003 Bern, Switzerland, e-mail: max.haldimann@bag.admin.ch

Entwicklung der GVO-Verunreinigungen in biologischen und konventionellen Lebens- und Futtermitteln im Zeitraum von 2000 bis 2005

GMO contamination in organic and conventional food and feedstuff in the course of the years 2000 to 2005

Karin Nowack, Katharina Wüthrich und Bernadette Oehen
Forschungsinstitut für biologischen Landbau, CH-Frick

Eingegangen am 17. November 2006, akzeptiert am 3. Mai 2007

Einleitung

In den grossen Agrarexportländern USA, Argentinien, Brasilien und Kanada sowie in weiteren 17 Ländern haben sich die Anbauflächen von gentechnisch veränderten Kulturen auch 2005 weiter ausgedehnt (1). Vor allem Mais und Soja werden als Rohstoff und in verarbeiteter Form weltweit gehandelt.

Biologische und konventionelle Produkte, welche nach den Vorgaben des Abnehmers keine gentechnisch veränderten Organismen (GVO) enthalten sollen, werden durch kontrollierte Warenflüsse vom Feld bis zum Verarbeitungsbetrieb vor Verunreinigung oder Vermischung mit GVO-Material geschützt. Da durch verschiedene Prozesse wie Saatgutverunreinigungen, Abdrift oder Verschleppungen in der Verarbeitung trotzdem GVO-Verunreinigungen auftreten können (2), wurden in der Europäischen Union und in der Schweiz Limiten für die Kennzeichnung von gentechnisch verändertem Material eingeführt. Liegt der Gehalt von GVO unterhalb dieser Limite müssen die Produkte nicht als GVO deklariert werden.

Mit der Revision der Lebensmittel- und der Futtermittelverordnung, die am 1. März 2005 in Kraft traten, gilt in der Schweiz für Futtermittel und für Lebens-

mittel die gleiche Deklarationslimite von 0,9% wie in der EU (keine Zutat darf GVO im Umfang von mehr als 0,9 Massenprozent enthalten mit Ausnahme von Mikroorganismen). Dieser Schwellenwert kann nur in Anspruch genommen werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass die Spuren unbeabsichtigt sind. Neu müssen auch GVO-Erzeugnisse gekennzeichnet werden, die vom eigentlichen Organismus abgetrennt, gereinigt und chemisch definierbar sind, zum Beispiel Sojaöl aus gentechnisch veränderten Sojabohnen.

Die Einhaltung der Limiten und der Rückverfolgbarkeit wird vom Handel und von den Verarbeitern im Rahmen der Selbstkontrolle sowie von den Behörden überprüft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ergebnisse von Laboranalysen aus mehreren Jahren zusammenzustellen und die Entwicklung der Verunreinigung vor dem Hintergrund der Einhaltung der gesetzlichen Deklarationslimiten und weiterer privatrechtlicher Limiten zu überprüfen. Es stellt sich die Frage, ob insbesondere die Futtermittel den neuen Deklarationslimiten genügen, da bis Ende 2004 für Futtermittel-Ausgangsprodukte eine Deklarationslimite von 3% und für Mischfuttermittel eine solche von 2% galt.

Die Akteure in der Bioproduktion interessierte speziell, ob die in der Regel strikteren Warenflusstrennungen und ausführlicheren Vorschriften bei Bioprodukten weniger GVO-Verunreinigungen zur Folge haben.

Material und Methoden

GVO-Verunreinigungsdaten in Saatgut, Futtermitteln und Lebensmitteln aus den Jahren 2000–2002 waren im Rahmen eines vom Bundesamt für Umwelt (BAFU) finanzierten Projektes bereits ausgewertet worden (3). Drei Jahre später wurden nun im Auftrag der Bio Suisse die GVO-Verunreinigungsdaten in Futter- und Lebensmitteln vom Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL) erneut erfasst und ausgewertet und mit den Daten 2000–2002 verglichen (4). In dieser Untersuchung wurden Häufigkeit und Höhe von GVO-Verunreinigungen bei Mais-, Sojaerzeugnissen und bei Fertigprodukten im schweizerischen Lebens- und Futtermittelmarkt ausgewertet. Dazu wurden Einzeldaten, die im Rahmen von Kontrollen durch die Behörden sowie im Rahmen der betrieblichen Qualitätssicherung erhoben wurden, berücksichtigt. Von den folgenden kantonalen Laboratorien konnten Daten von GVO-Analysen für diese Arbeit verwendet werden: Bern, Baselstadt, Aargau, Graubünden, St. Gallen, Schaffhausen, Zürich, Appenzell Ausserrhoden, Appenzell Innerrhoden, Glarus, Solothurn, Tessin, Thurgau, Urkantone (Uri, Nidwalden, Obwalden, Schwyz). Zusätzlich wurden Daten aus Publikationen und Jahresberichten gesammelt, die staatliche, kantonale und private Labors im Zeitraum 2003 bis 2005 erhoben haben. Aus diesen Unterlagen konnten neben dem Gehalt an GVO meistens auch Informationen über die Produktionsform (biologisch, konventionell) entnommen werden.

In einigen Untersuchungen konnte keine amplifizierbare DNA nachgewiesen werden. Diese Daten wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Rohdaten wurden nach folgenden Kriterien sortiert:

- nicht nachweisbar: GVO-DNA $< 0,01\%$
- nicht bestimmbar, nur qualitative Aussage möglich: GVO-DNA $0,01-0,1\%$
- bestimmbar, sichere quantitative Aussage: GVO-DNA $> 0,1\%$
- Deklarationslimite Lebensmittel (2003–2004) überschritten: GVO-DNA $\geq 1\%$
- Deklarationslimite Lebensmittel (ab 2005) überschritten: GVO-DNA $\geq 0,9\%$
- Deklarationslimite Futtermittel (2003–2004) überschritten: GVO-DNA $\geq 3\%$ bzw. $\geq 2\%$
- Deklarationslimite Futtermittel (ab 2005) überschritten: GVO-DNA $\geq 0,9\%$

Diese Untersuchung zeigt, dass ab 2005 keine GVO-Anteile zwischen 0,9 und 1,0% nachgewiesen wurden. Daher wurde zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellbarkeit der Daten aus den verschiedenen Jahren in allen Abbildungen (auch bei den Daten aus dem Jahr 2005) anstelle der gültigen Limite für die Kennzeichnung von 0,9% GVO 1,0% GVO verwendet.

Resultate und Diskussion

1. Häufigkeit und Höhe der GVO-Verunreinigungen in Lebensmitteln

Von den staatlichen und privaten Laboratorien wurden uns für den Zeitraum 2003–2005 insgesamt 1876 GVO-Analysedaten zur Verfügung gestellt. Davon konnten 704 eindeutig Mais und 546 Soja zugeordnet werden. 464 Proben waren Fertigprodukte und können sowohl Mais als auch Soja enthalten.

Zusätzlich wurden von den Labors weitere GVO-kritische Produkte wie Erdnüsse (Anzahl Proben=5), Kartoffeln (2), Lupine (1), Papaya (6), Raps (57), Reis (45), Senf (2), Tomaten (7) und Weizen (37) untersucht. Diese Produkte werden entweder als gentechnisch veränderte Kultur angepflanzt (Raps, Papaya in Hawaii/USA, Reis in Iran) oder die Forschung entwickelt gentechnisch veränderte Sorten (Tomaten, Kartoffeln, Reis, Lupine, Weizen). Senf wird untersucht, da Verunreinigungen mit Raps vorkommen könnten. Zudem können in diesen Produkten GVO-Verunreinigungen auftreten, wenn sie als Massenware zusammen mit GVO-kritischen Soja- und Maisprodukten gehandelt werden.

Von den Proben waren 1500 als konventionelle und 376 als biologische Erzeugnisse bezeichnet.

In einem ersten Schritt wurde ermittelt, wie häufig Verunreinigungen mit GVO-DNA in biologischen und in konventionellen Lebensmitteln in den letzten drei Jahren nachgewiesen wurden. Damit eine Probe als frei von GVO-DNA beurteilt wurde, durfte entweder keine GVO-DNA nachweisbar sein oder der Gehalt an GVO-DNA musste unter der Nachweisgrenze von 0,01% liegen. Alle anderen Proben wurden als GVO-verunreinigt behandelt. Die Höhe der Verunreinigung wurde dabei noch nicht berücksichtigt. Diese grobe Analyse zeigte, dass Verunrei-

nigungen bei konventionellen Lebensmitteln häufiger (15% der Proben) auftraten als bei Bio-Lebensmitteln (7% der Proben).

Werden in der Auswertung Mais-, Sojaerzeugnisse und Fertigprodukte getrennt, zeigt sich Folgendes:

- In 10% der biologischen und in 17% der konventionellen Maiserzeugnisse liess sich GVO-DNA >0,01% nachweisen.
- In 3% der biologischen und in 22% der konventionellen Sojaerzeugnisse liess sich GVO-DNA >0,01% nachweisen.
- In 10% der biologischen und in 11% der konventionellen Fertigprodukte liess sich GVO-DNA >0,01% nachweisen.

Von den untersuchten Produkten, die kein Mais und Soja enthalten, zeigten Senf, Reis- und Weizenprodukte GVO-Verunreinigungen (gemessen wurden Marker- oder Promotorensequenzen wie 35 S, RRS, NOS-Terminator u.a.), diese lagen alle unter 0,1% GVO-DNA.

In einem weiteren Schritt wurde die Höhe der GVO-Verunreinigungen bei Mais- und Sojaerzeugnissen sowie Fertigprodukten untersucht. Die Tabelle 1 zeigt, dass Biomais und -soja etwas weniger mit GVO verunreinigt sind als die entsprechenden konventionellen Produkte. Bei 98% der Biomaisproben, und 100% der biologischen Soja- und Fertigprodukte wurde keine oder nur eine geringe GVO-Verunreinigung (<0,1%) festgestellt. Bei den konventionellen Produkten waren 95% der Maiserzeugnisse, 89% der Sojaprodukte und 98% der Fertigprodukte negativ oder unter 0,1% GVO. Die Kennzeichnungslimite wurde bei keinem Bioprodukt überschritten, bei den konventionellen Produkten waren es etwa 3%.

Tabelle 1
Höhe von GVO-Verunreinigungen in Mais, Soja und Fertigprodukten aus konventionellem und biologischem Anbau. Die Daten stammen aus Untersuchungen der Kantonslaboratorien und von privaten Labors aus der Zeit von 2003 bis 2005

<i>Produkte</i>	<i>negativ (<0,01% GVO)</i>	<i><0,1% GVO</i>	<i>0,1-1,0% GVO</i>	<i>>1,0% GVO</i>
Mais konv. (n=586)	83%	12%	5%	0,3%
Mais bio (n=118)	90%	8%	2%	0%
Soja konv. (n=362)	78%	11%	8%	2%
Soja bio (n=184)	97%	3%	0%	0%
Fertigprodukt konv. (n=392)	89%	9%	2%	1%
Fertigprodukt bio (n=72)	90%	10%	0%	0%

2. Vergleich der Daten 2003–2005 mit den Daten von 2000–2002

Die Proben aus den Jahren 2003–2005 zeigen im Verlauf der Zeit eine tendenzielle Abnahme der Häufigkeit von GVO-Verunreinigungen. So wurden in den untersuchten Proben der Jahre 2003, 2004 und 2005 weniger oft GVO-Verunreinigungen festgestellt als im Zeitraum von 2000–2002 (Abb. 1 und 2). Bei den konventionellen Produkten waren 13–16% GVO-verunreinigt, im Vergleich dazu waren

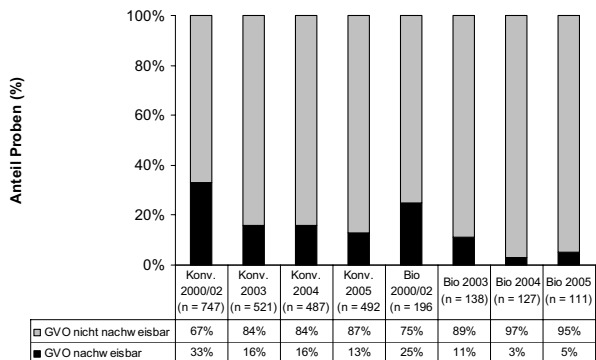


Abbildung 1 Vergleich der Häufigkeit von GVO-Verunreinigungen bei biologischen und konventionellen Lebensmitteln aus den Jahren 2000–2002, 2003, 2004 und 2005. Die Daten stammen aus Untersuchungen der Kantonslaboratorien und von privaten Labors aus der Zeit von 2003 bis 2005 und aus dem Bericht GVO-Verunreinigungen in Bioprodukten. GVO nicht nachweisbar heisst GVO-DNA <0,01%

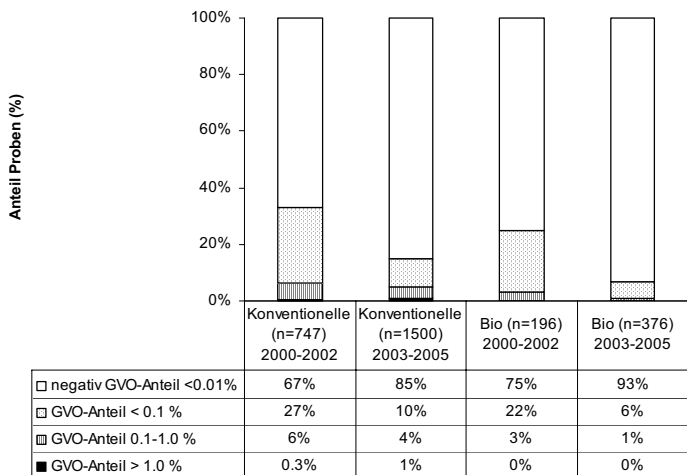


Abbildung 2 Vergleich der Höhe von GVO-Verunreinigungen in konventionellen und biologischen Lebensmitteln in den Jahren 2000–2002 und 2003–2005. Die Daten stammen aus Untersuchungen der Kantonslaboratorien und von privaten Labors und aus dem Bericht GVO-Verunreinigungen in Bioprodukten

es in den Jahren 2000–2002 noch 33%. Dabei nahmen die GVO-Verunreinigungen sowohl in den maishaltigen (von 41% auf 16%) als auch in den sojahaltigen Produkten (von 30% auf 22%) ab.

Auch die biologischen Produkte zeigten einen Rückgang der Häufigkeit von GVO-Verunreinigungen (Maisprodukte von 31% auf 10%, Sojaprodukte von 23% auf 3%). Diese Zahlen zeigen, dass der Unterschied zwischen konventionellen und biologischen Lebensmitteln bezüglich GVO-Verunreinigungen, der sich im Vergleich von 2000–2002 abzeichnete, bei Sojaprodukten zugenommen hat.

3. Diskussion GVO-Verunreinigungen in Lebensmitteln

Die tendenzielle Abnahme der GVO-Verunreinigungen der Jahre 2003–2005 im Vergleich zu den Daten von 2000–2002 hat folgende Gründe (4, 5):

- a) klare Anforderungen der Abnehmer, also des Handels (Forderung nach Produkten mit minimaler GVO-Verunreinigung, welche unter der Deklarationslimite von 0,9% liegt).
- b) Entwicklung von Exportkanälen in Übersee mit dem Ziel «Non-GMO».
- c) der Ersatz von Rohstoffen bzw. die Wahl neuer Lieferanten.

Die konventionellen Produkte weisen in der vorliegenden Studie deutlich häufiger GVO-Verunreinigungen auf als biologische Lebensmittel, dies gilt insbesondere für Sojaprodukte und entspricht auch den Resultaten der Studie aus den Jahren 2000–2002. Im biologischen Landbau wurden in den letzten Jahren zusätzlich zu den Punkten a) bis c) weitere Massnahmen wie kontrolliertes und möglichst biologisches Saatgut, verbesserte Qualitätssicherungs-Systeme (internationale Standards), Warenflusstrennung insbesondere beim Transport aus Übersee (immer Container-Ware) eingeführt, um Verunreinigungen mit GVO und anderen im biologischen Anbau unerwünschten Stoffen zu verhindern.

Auch bei den konventionellen GVO-freien Produkten sind die Anstrengungen der Warenflusskontrolle sichtlich erfolgreich. Konventionelle Ware wird aber nicht generell in Containern transportiert, was ein Hauptgrund für die vermehrten Verunreinigungen sein könnte.

Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen, dass die bisher ergriffenen Massnahmen erfolgreich sind um die GVO-Verunreinigungen in Mais und Soja zu vermindern, selbst wenn aus GVO-Anbauländern importiert wird.

Es kann aber keine absolute GVO-Freiheit im Sinne von 0,00% GVO-DNA garantiert werden, da alle technischen Massnahmen auch Machbarkeitsgrenzen haben.

Überschreitungen der Deklarationslimite wurden nur bei konventionellen Produkten gefunden. Dies betraf Polenta, ein Maisgericht, ein Gebäck, zwei Sandwiches, zwei Sojadinks, zwei Tofugerichte und einen «Suppenmix». Fertigprodukte bestehen aus vielen unterschiedlichen Zutaten, welche zum Teil aus Soja oder Mais hergestellt sind und meist aus mehreren unabhängigen Warenflüssen stammen. Dadurch sind sie mehr möglichen GVO-Verschleppungen ausgesetzt als Produkte aus einem Rohstoff.

Die Resultate zeigen, dass bei Mais und Fertigprodukten die Differenz zwischen Bio und Konventionell kleiner ist als bei Soja. Für Mais und Soja wurde dies auch in den Jahren 2000–2002 und im Ökomonitoring 2005 in Baden Württemberg (6) gefunden. Hypothetische Ursachen dafür könnten sein:

- Ähnliche Warenflusstrennung bei konventionellem und biologischem Mais, unterschiedliche bei den Sojaqualitäten.
- Gleiche Verarbeitungsschritte und -standorte der Qualitäten bei Mais, unterschiedliche bei den Sojaqualitäten.

Bei den biologischen Produkten wiesen die Sojaprodukte etwas seltener GVO-Verunreinigungen auf als die Maisprodukte und Fertigprodukte. Dies könnte folgende Gründe haben: anhand der am Schweizer Zoll erhobenen Daten konnten die Autorinnen feststellen, dass die USA als Lieferantin für Soja zur Lebensmittelherstellung durch Südamerika (Brasilien), Kanada, Europa und China abgelöst wurde. Die Wahl neuer Lieferanten und die strengen Kontrollen der Importe haben wahrscheinlich zu einem Rückgang der Verunreinigungen geführt (5). Auch wurden in den letzten Jahren aufgrund der Konsumentennachfrage nach GVO-freiem Soja die Warenströme systematisch optimiert (7). Zudem spielen Saatgutverunreinigungen und Einkreuzungen auf dem Feld bei Mais möglicherweise eine grössere Rolle als bei Soja, die ja zu einem grösseren Teil selbstbestäubend ist, während Mais windbestäubt ist.

Auch in Deutschland gab es tendenziell mehr GVO-Verunreinigungen in Bio-Mais als in Bio-Soja (8). In den deutschen Bundesländern Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern gab es ebenfalls einen generellen Trend zu weniger Verunreinigungen, bei den Untersuchungen in Bayern und Baden-Württemberg war jedoch keine bestimmte Entwicklung über die Jahre zu erkennen (8).

4. Häufigkeit und Höhe der GVO-Verunreinigungen in Futtermitteln

In den Jahren 2003–2004 wurden von der Zoll-Einfuhrkontrolle 125 Proben Sojaextraktionsschrot und 20 Proben Maiskleber analysiert. Zwei Proben mussten wegen fehlender Deklaration bemängelt werden.

Im Jahr 2003 wurden 267 Futtermittel von der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) im Auftrag des Bundes auf GVO analysiert. Der GVO-Anteil war in allen Proben <3% (für Futtermittel-Ausgangsprodukte) bzw. <2% (für Mischfuttermittel). Ein Jahr später untersuchte die ALP 228 Futtermittel. Dabei wiesen 1 Mischfuttermittel und 4 Heimtierfuttermittel GVO von >2% auf. Im Jahr 2005 wurden 247 Futtermittel von der ALP untersucht. Zwei Futtermittel-Ausgangsprodukte enthielten mehr als 0,9% GVO, jedoch noch innerhalb des tolerierten Streubereiches (bei der Analytik von Futtermitteln wird gemäss Futtermittelverordnung ein Fehler von 50% toleriert, das bedeutet, dass die GVO-Analytik Werte bis 1,45% GVO-DNA nachweisen kann, ohne dass eine Kennzeichnung zwingend notwendig wird). Drei Mischfutterproben enthielten ein gentechnisch verändertes Ausgangsprodukt >0,9%, waren aber nicht als GVO deklariert (9).

Leider lagen für die Jahre 2003–2005 weniger Einzeldaten als bei der Untersuchung 2000–2002 vor. Die im Folgenden ausgewerteten Daten stammen aus Untersuchungen von privaten Laboratorien und dem Kantonalen Labor Bern aus der Zeit von 2003 bis 2005.

Bei den meisten Proben (248) war die Zusammensetzung der Futtermittel den Labors nicht genau bekannt; 29 Proben konnten eindeutig Soja, 6 Proben Mais, 18 Proben Raps, 9 Proben Getreide und 4 Proben Erbsen zugeordnet werden. Nur 26 Proben wurden aus Biofuttermitteln gezogen, während 246 Proben von konventionellen Futtermitteln stammten. Von den 26 biologischen Futtermitteln enthielten 16 Proben keine GVO, 5 Proben <0,1%, 4 Proben zwischen 0,1 und 0,5% und eine Probe (Mischfuttermittel) 7,7% GVO. Ein solches Futter ist natürlich nicht biofuglich und darf nicht als Biofuttermittel verwendet werden.

Bei den konventionellen Futtermitteln wurden in 41% der Proben GVO nachgewiesen. Die Anzahl untersuchter biologischer Proben ist jedoch zu gering um einen aussagekräftigen Vergleich der GVO-Verunreinigungen in biologischen und in konventionellen Futtermitteln zu machen.

Die erhaltenen Daten konnten jedoch aufgeteilt werden in Futtermittel-Ausgangsprodukte (Rohstoffe von Soja, Mais, Raps, Erbsen und Getreide) und Mischfuttermittel. Die Auswertung ergab, dass 21% der Futtermittel-Ausgangsprodukte und 47% der Mischfuttermittelproben GVO aufwiesen. Zudem wurden in 3 der 6 untersuchten Maisproben GVO nachgewiesen, jedoch ist die Probenanzahl mit $n=6$ zu klein, um eine generelle Aussage über die Verunreinigungen bei Mais zu machen. Von den analysierten Sojaprodukten ($n=29$) waren in 31% der Proben GVO-DNA enthalten. Bei einer von 9 untersuchten Getreideproben und in einer von 18 Rapsproben wurde GVO nachgewiesen, jeweils unter 0,1% (bei den erhaltenen Daten war nicht angegeben, welcher GVO oder Marker bestimmt wurde).

5. Vergleich der Daten 2003–2005 mit den Daten von 2001–2002

Da die Daten von 2003–2005 zuwenig biologische Futtermittel beinhalten und eine klare Aufteilung in Soja und Maisprodukte nicht möglich war, können die Daten von 2003–2005 nur begrenzt mit den Daten aus den Jahren 2000–2002 verglichen werden.

Die Ergebnisse in Abb. 3 zeigen die Entwicklung in den Jahren 2003–2005.

- In den Mischfuttermittelproben wurde in allen drei Untersuchungsjahren (2003–2005) häufig eine GVO-Verunreinigung gefunden. Dabei war der Anteil GVO-verunreinigter Proben im 2003 mit 71% am grössten, im 2004 betrug der Anteil 37% und im Jahr 2005 43%.
- Mischfuttermittelproben weisen in allen untersuchten Jahren häufiger höhere GVO Verunreinigungen auf als die Futtermittel-Ausgangsprodukte.
- 2003 überschritten 5% der Mischfuttermittelproben die Deklarationslimite für Mischfuttermittel (2%), 2004 waren es 2% und 2005 überschritten 1% die neue Deklarationslimite von 0,9%. Keine Futtermittel-Ausgangsprodukte überschritt die Deklarationslimite.

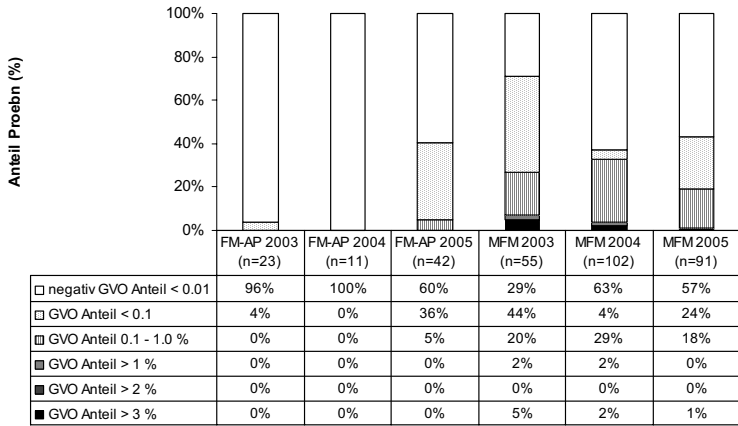


Abbildung 3 Analyse der Höhe von GVO-Verunreinigungen in Futtermittel-Ausgangsprodukten (FM-AP) und Mischfuttermitteln (MFM). Die Daten stammen aus Untersuchungen des Kantonslabors Bern und von privaten Labors aus den Jahren 2003, 2004 und 2005

Von den untersuchten biologischen und biokompatiblen Futtermitteln wiesen im Zeitraum 2000–2002 52% Verunreinigungen auf, die konventionellen 78%. Im Zeitraum 2003–2005 waren 47% der Mischfuttermittel und 21% der Futtermittel-Ausgangsprodukte GVO-verunreinigt. Dies deutet darauf hin, dass die GVO-Verunreinigungen in den Futtermitteln in den letzten Jahren tendenziell zurückgingen.

6. Diskussion GVO-Verunreinigungen in Futtermitteln

Auch bei den Futtermitteln lagen die GVO-Verunreinigungen meist unter 0,9%. Futtermittel weisen aber häufiger GVO-Verunreinigungen auf als die untersuchten Lebensmittel. Dies könnte darauf beruhen, dass gentechnisch veränderte Pflanzen in der Futtermittelbranche in der EU deutlich häufiger eingesetzt werden als in der Lebensmittelbranche. In der Schweiz werden jedoch fast keine gentechnisch veränderten Futtermittel verfüttert, da die Fleisch-Labels der Grossdetailisten COOP und MIGROS und das Label Suisse Garantie für Milchprodukte bei der Pflanzenkomponente die Verwendung von GVO-deklarationspflichtigen Futtermitteln verbieten.

Auffällig ist, dass Futtermittel-Ausgangsprodukte relativ selten GVO-Verunreinigungen aufweisen. Fast die Hälfte der Mischfutterproben enthält jedoch GVO-Verunreinigungen. Leider ist aus den erhaltenen Daten die Herkunft und Zusammensetzung der Mischfuttermittel nicht ersichtlich. Je stärker ein Produkt verarbeitet bzw. je mehr verschiedene Zutaten es enthält, desto wahrscheinlicher

enthält es GVO-Verunreinigungen. Dabei sind die Ursachen (Akkumulation und Verschleppung an mehreren Stellen in der Kette) wohl ähnlich wie im Lebensmittel-sektor bei den Fertigprodukten.

Die Untersuchung zeigt, dass auch bei den Futtermitteln wie bei den Lebensmitteln die Häufigkeit von GVO-Verunreinigungen im Vergleich zu den Jahren 2000–2002 tendenziell abnahm.

Obwohl seit dem 1. März 2005 strengere Deklarationslimiten für GVO-Verunreinigungen gelten, wurden im Jahr 2005 Proben, welche die Deklarationslimiten überschreiten, nicht häufiger gefunden als in den vorhergehenden Jahren 2003 und 2004.

Schlussfolgerungen

Sowohl die biologische wie auch die konventionelle Lebensmittelproduktion haben Massnahmen zur Vermeidung von GVO-Verunreinigungen verstärkt und verbessert. Der Erfolg dieser Anstrengungen spiegelt sich in den vorliegenden Resultaten wider. Die GVO-Verunreinigungen haben sowohl im Lebensmittelbereich wie auch im Futtermittelbereich abgenommen, wobei konventionelle Lebensmittel häufiger GVO-Verunreinigungen aufweisen als biologische Lebensmittel. Dies beruht darauf, dass die biologischen Lebensmittel generell höheren GVO-Standards (Saatgut, Anbau, Warenflusskontrolle, Zutaten) standhalten müssen und insbesondere strikt von konventioneller Ware und somit teilweise GVO-Ware getrennt sind.

Die seit 2004 neuen und strengeren Richtlinien im Futtermittelbereich in der EU haben vermutlich dazu geführt, dass Futtermittel-Ausgangprodukte seltener GVO-Verunreinigungen aufweisen. Mischfuttermittel zeigen aber immer noch häufig GVO-Verunreinigungen, wobei diese meist unterhalb der Deklarationslimite liegen.

Die strengeren Deklarationslimiten sowohl im Futtermittel- als auch im Lebensmittelbereich, die seit 2005 in der Schweiz in Kraft sind, wurden gut eingehalten.

Die häufigeren und zum Teil auch höheren GVO-Verunreinigungen in verarbeiteten Produkten sowohl bei Lebensmitteln wie auch insbesondere bei Mischfuttermitteln weisen auf ein Verbesserungspotential bei der Warenflusstrennung hin.

Dank

Wir danken den kantonalen Labors und den Verarbeitungsbetrieben, welche uns ihre Analysedaten zur Verfügung gestellt haben.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden GVO-Analysen von Lebens- und Futtermitteln, welche in den Jahren 2003 bis 2005 von privaten und staatlichen Labors durchgeführt worden sind, ausgewertet und mit Daten vom Zeitraum 2000–2002 verglichen. Dabei zeigte sich, dass abhängig von der Art der Lebensmittel (Mais, Soja und Fertigprodukte) und der Produktionsform (Bio oder konventionell) in 3–22% der Proben GVO nachgewiesen wurde. Der grosse Teil der Verunreinigungen

gen lag im nicht quantifizierbaren Bereich von unter 0,1%. Der Vergleich mit Daten aus den Jahren 2000 bis 2002 zeigt, dass GVO-Verunreinigungen im Durchschnitt von 34% auf 15% abgenommen haben. Wie in den Untersuchungen 2000–2002 waren auch 2003–2005 allgemein die biologischen Lebensmittel weniger häufig und weniger stark von GVO-Verunreinigungen betroffen als die konventionellen Lebensmittel. Für die Futtermittel waren die Resultate ähnlich, wobei diese generell mehr und höhere Verunreinigungen aufweisen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der Zunahme des Anbaus von gentechnisch veränderten Pflanzen GVO-Verunreinigungen verringert werden konnten und somit die Strategien und Massnahmen zur Vermeidung von GVO-Verunreinigungen bislang erfolgreich sind.

Résumé

Des aliments et des aliments pour animaux aux organismes génétiquement modifiés (OGM) des années 2003 à 2005 ont été analysés et comparés avec les résultats des années 2000 à 2002. Les analyses ont été faites dans des laboratoires privés et publics.

Les résultats dépendaient et des aliments (maïs, soja ou produits finis) et de la manière avec laquelle ils ont été produits (bio ou conventionnel). Il y avait des OGM dans 3 à 22% des produits.

La plupart des contaminations s'est trouvée dans la zone «non quantifiable» (<0,1%). Comparés avec les résultats des années 2000 à 2002, les contaminations ont diminué en moyenne de 34% à 15%. De même que dans les années 2000 à 2002, les aliments biologiques des années 2003 à 2005 étaient contaminés moins souvent et moins fortement que les aliments conventionnels. Les résultats pour les aliments pour animaux étaient semblables mais en général ils étaient contaminés plus souvent et plus fortement.

Bien que la culture des aliments OGM ait mondialement augmenté, on a réussi à réduire les contaminations comme ces résultats en font preuve. Cela démontre que les stratégies et les mesures pour éviter les contaminations ont abouti à un certain succès.

Summary "GMO contamination in organic and conventional food and feedstuff in the course of the years 2000 to 2005"

GMO-Analyses of food and feedstuff, such as maize, soy and their products, from the years 2003 to 2005 have been analysed and compared to data from 2000 to 2002. Depending on the production system (organic or conventional) Swiss food control authorities or private laboratories detected GMOs in 3 to 22% of the samples tested. Most of the contaminations found were not quantifiable and ranged below 0.1% GMO-DNA. Compared with data from the years 2000 to 2002 the GMO contaminations were on average between 34% to 15%. In general, organic food contained less GMO contaminations than conventional food. The results were

similar for feedstuff but feed contained generally more often and higher levels of GMO-DNA. Despite of increasing cultivations of genetically modified plants all over the world contaminations with GMOs can be reduced as our analysis has shown. Preventive measures such as controlled food supply chains from farm to processing unit or cleaning protocols seem to be appropriate strategies for a successful reduction or protection of or from GMO contaminations, respectively, especially along organic food supply chains.

Key words

GMO contamination, GMO free, GMO-Analyses, trend, food supply chain

Literatur

- 1 James C.: Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005 ISAAA Brief No. 34. <http://www.isaaa.org>
- 2 Nowack K., Bickel R., Pushparajah R. und Wyss E.: Sicherung der gentechnikfreien Produktion. Eintrittswege gentechnisch veränderter Organismen, Gegenmassnahmen und Empfehlungen. Hrsg. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL). Schriftenreihe Umwelt Nr. 340. 90 S. 2002
- 3 Nowack K. und Oehen B.: Analyse von GVO-Verunreinigungen in Bioprodukten, Belastungsgrade und Vermeidungsmöglichkeiten in Saatgut, Lebensmitteln und Futtermitteln, Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), CH-Frick im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), CH-Bern, Dezember 2003
- 4 Wüthrich K., Nowack K. und Oehen B.: Trend der GVO-Verunreinigungen in Lebensmitteln und Futtermitteln. Analyse und Vergleich der GVO-Verunreinigungen in biologischen und konventionellen Produkten in den Jahren 2000–2005. Projektbericht FiBL Frick im Auftrag der Bio Suisse, Juni 2006
- 5 Oehen B., Stolze M., Hermanowski R. und Mäder R.: Kosten der Vermeidung von Gentechnik in der Lebensmittelherstellung. Eine Literaturanalyse im Auftrag des Migros Genossenschaftsbundes, März 2006
- 6 Ökomonitoring Baden-Württemberg 2006, http://www.cvua-freiburg.de/pdf/gentechnik_in_lebensmitteln2005.pdf
- 7 Teuscher P., Grüniger B. and Ferdinand N.: Risk management in sustainable supply chain management (SSCM): lessons learnt from the case of GMO-free soybeans. Corporate Social Responsibility and Environmental Management. 13,1–10 (2005)
- 8 Bericht über GVO-Verunreinigungen in verschiedenen deutschen Bundesländern <http://www.transgen.de/einkauf/ueberwachung/>
- 9 Jahresberichte der ALP (2003, 2004, 2005) <http://www.alp.admin.ch>

Korrespondenzadressen:

Karin Nowack und Bernadette Oehen, Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Ackerstrasse, Postfach, 5070 Frick,

E-Mail: karin.nowack@fibl.org

Katharina Wüthrich, Bundesamt für wirtschaftliche Landesversorgung, Geschäftsstelle Bereich Ernährung, Belpstrasse 53, 3003 Bern

Bestimmung von Lysozym in Käse mittels LC-MS

Franziska Bärtschi¹, Lorenz Muralt¹, Konrad Rieder¹, Urs Kämpfer²,
Johann Schaller²

¹Kantonales Laboratorium Bern (Schweiz)

²Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern (Schweiz)

Eingegangen am 16. Mai 2006, akzeptiert am 22. August 2006

Einleitung

Lysozym ist ein Enzym, das in verschiedenen Organismen vorkommt und sie gegen bakterielle Infektionen schützt. Allerdings wirkt Lysozym nur gegen Bakterien, deren Zellwand aussen aus Murein aufgebaut ist (grampositive Bakterien). Lysozym wurde im Speichel, im Nasenschleim, in der Tränenflüssigkeit und im Blutplasma des Menschen nachgewiesen, aber auch im Eiklar von Vogeleiern, in der Milch von Säugetieren, in einigen Pilzen und sogar in Pflanzensäften.

Empfindlich auf Lysozym sind unter anderem auch Buttersäurebakterien (*Clostridium tyrobutiricum*) und dessen Sporen, die in Milch von mit Silagefutter gefütterten Kühen vorkommen. Solche unerwünschten Bakterien können durch Zusatz von Lysozym in die Käsemilch im Wachstum gehemmt und dadurch eine Spätblähung des Käses verhindert werden. Der Zusatz von Lysozym in die Käsemilch für die Produktion von gereiftem Käse ist in der EU und der Schweiz grundsätzlich zugelassen (im Rahmen der Guten Herstellungspraxis, keine Höchstmenge festgelegt). Die Verwendung des Zusatzstoffes muss deklariert werden (E 1105). In den Spezifikationen von Käsesorten mit geschützter Ursprungsbezeichnung oder geschützter geografischer Angabe wird aber oft ausdrücklich auf den Einsatz dieses Enzyms verzichtet. Biokäse darf in der Schweiz nicht mit Lysozym hergestellt werden.

In der Literatur sind bis jetzt nur wenige Methoden für die analytische Bestimmung von Lysozym in Lebensmitteln, publiziert worden, die sich für die Praxis der staatlichen oder betrieblichen Überwachung eignen (1, 2, 3). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine für die Überwachung geeignete Methode zur Bestimmung von Lysozym in Käse zu entwickeln. Die Identifikation sollte mit zwei voneinander

unabhängigen Detektionsverfahren möglich sein und die Bestimmungsgrenze unter 50 mg/kg liegen.

Vorversuche

In der Aminosäuresequenz von Lysozym kommt die fluoreszierende Aminosäure Tryptophan relativ oft vor. Pellegrino und Tirelli publizierten im Jahr 2000 eine gut reproduzierbare Methode für die Bestimmung von Lysozym in Milchprodukten mittels isokratischer HPLC-FLD (1). Bei der Erprobung dieser Methode stellten wir fest, dass sich – je nach Käsesorte – im Chromatogramm die für Lysozym spezifischen Signale teilweise mit störenden Matrixsignalen überlagerten. Für Übersichtsmessungen wurde das von Pellegrino entwickelte Verfahren beibehalten, die chromatografische Trennung erfolgte aber durch Elution mit einem Gradienten. Für Bestätigungsanalysen wurde eine LC-MS-Methode entwickelt. Zusätzlich wurde Lysozym mittels HPLC gereinigt und mit Trypsin hydrolysiert. Mit LC-MS konnte im Hydrolysat ein für Lysozym spezifisches Peptid nachgewiesen und dessen Identität mittels Analyse der Aminosäuresequenz zusätzlich abgesichert werden.

LC-MS-Methode

Prinzip

Die Probe wird zerkleinert und mit Natriumchloridlösung bei pH 6,0 extrahiert. Störende Proteine werden bei pH 4,3 ausgefällt und abfiltriert. Im filtrierten Extrakt wird Lysozym mittels LC-MS identifiziert und quantifiziert.

Probenlagerung

Die Proben werden nach dem Eingang im Laboratorium bei 4 °C gelagert.

Probenvorbereitung

Für die Untersuchung wird eine repräsentative Teilprobe ausgewählt. Die Teilprobe wird an einer Käseraffel (handelsübliche Käseraffel, Lochdurchmesser ca. 2 mm) geraffelt.

Geräte

LC-MS mit folgenden Komponenten: Gradientenpumpe P680, Autosampler ASI-100, Säulenthmostat TCC-100, Massendetektor MSQ, Integrationssoftware Chromeleon, Dionex AG.

Weitere Geräte: Polytron PT 3000, Kinematica AG; Analysenwaage, Ablesbarkeit $\pm 0,01$ mg; Laborwaage, Ablesbarkeit ± 10 mg; Schüttler, GFL 3017; pH-Meter; Membranfilter Millex-GV PVDF 0,22 μm , Millipore Art. SLGV 013 NL.

Trennsäulen

Trennsäule für Lysozym

PLRP-S 250×4,6 mm, 300 Å, 5 µm, Polymer Laboratories

Falls eine schlechte Empfindlichkeit von Lysozym beobachtet wird oder eine nicht lineare Kalibrierkurve resultiert, kann die Trennsäule mit Acetonitril/Wasser 80:20+0,1 mol Ammoniak regeneriert werden.

Trennsäule für Untersuchungen des Trypsinhydrolysates

Nucleodur Gravity C18, 250×2 mm, 3 µm, Macherey Nagel

Reagenzien

Lysozym (Biochem, Sigma); Trypsin (from porcine pancreas, Merck, 40 U/mg); Natriumchlorid (pro analysi, Merck, Reinheit: >99%); HCl 37% (puriss, Fluka); NaOH 50% (pro analysi, Baker); Ameisensäure (pro analysi, Merck, Reinheit: >98%); Trifluoressigsäure (UvaSolv, Merck, Reinheit: >99,8%); Acetonitril (LiChrosolv, Merck, Reinheit: >99,9%).

Arbeitsvorschrift für die Extraktion und Reinigung des Lysozyms

- 2,00 g homogenisiertes Probematerial in einen 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff einwiegen.
- 20 mL Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L zugeben, mit Natronlauge $c=1$ mol/L auf pH 6,0 stellen.
- Mit Polytron bei 2500–3000 U/min während ca. 30 Sekunden dispergieren.
- Zum Spülen des Polytron-Stabes 20 mL Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L in ein 100 mL Becherglas geben, kurz dispergieren und Spüllösung zum Käse-Dispergat geben.
- Erlenmeyerkolben mit einem Stopfen verschliessen und während einer Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit einer Frequenz von ca. 160/min schütteln.
- Käse-Dispergat mit Salzsäure $c=1$ mol/L auf pH 4,3 stellen, mit Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L in einen 50 mL Messkolben überführen und 15 Minuten stehen lassen.
- Anschliessend durch ein Faltenfilter filtrieren, Filtrat durch ein Membranfilter Millex GV PVDF 0,22 µm in ein HPLC-Vial filtrieren und messen.

Bedingungen LC-MS für die quantitative Bestimmung von Lysozym und Untersuchung des Lysozym-Trypsinhydrolysates

Lysozym-Standardlösungen mit 2, 4 und 8 mg/L aus Standardstammlösung 1000 mg/L und Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L täglich neu herstellen.

Da die Standardlösungen und die Probelösungen in Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L gelöst sind, muss ein Motorschaltventil (z.B. 6-Weg) zwischen der Trenn-

säule und dem Massendetektor installiert sein. Dieses Ventil wird während den ersten 7 Minuten der Chromatografie so geschaltet, dass die mobile Phase in einen Abfallbehälter fließt und kein NaCl zum Massendetektor gelangt.

Das Laufmittel darf keine Trifluoressigsäure enthalten, da sonst die Ionisation von Lysozym gänzlich unterdrückt wird.

Tabelle 1
Bedingungen LC-MS

	<i>Bestimmung von Lysozym</i>			<i>Untersuchung Lysozym-Hydrolysat</i>		
Einspritz-Volumen	5 µL			5 µL		
Säule	PLRP-S 250*4,6 mm, 300 A, 5 µm, Polymer Laboratories			Nucleodur Gravity C18, 250 mm, 3 µm, 2 mm, Macherey Nagel		
Temperatur Säule	40 °C			40 °C		
Eluent A	0,5 % Ameisensäure in Wasser			0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Eluent B	0,5 % Ameisensäure in Acetonitril			0,1 % Ameisensäure in Acetonitril		
Flow Eluent	0,80 mL/min			0,20 mL/min		
Flow-Split	0,5 mL/min MS; 0,3 mL/min Waste (bei 25 % B)					
MS	Needle	3,0 kV		Needle	2,6 kV	
	Probe	550 °C		Probe	450 °C	
	Cone	130 V		Cone	55 V	
Masse zu Ladungsverhältnis	1431 [M+H ₁₀] ¹⁰⁺			Peptid 523 [M+H ₂] ²⁺		
	1590 [M+H ₉] ⁹⁺					
	1788 [M+H ₈] ⁸⁺					
Retentionszeit	~ 12,5 min			~ 16,0 min		
Motorschaltventil	0,0 min Eluent MS 0,5 min Eluent Waste 7,0 min Eluent MS					
	<i>min</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>	<i>min</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>
Gradient	0,0	70	30	0,0	90	10
	9,0	30	70	10,0	80	20
	9,1	0	100	18,0	70	30
	12,0	0	100	20,0	60	40
	12,1	70	30	20,1	30	70
	16,0	70	30	21,0	30	70
				21,1	30	70
				30,0	90	10

Lysozym kann massenspektrometrisch als Ion mit der Ladung $z=8^+$, 9^+ oder 10^+ nachgewiesen und quantifiziert werden. Abbildung 1 zeigt als Beispiel das Chromatogramm mit $z=10^+$ eines mit Lysozym hergestellten Emmentalerkäses.

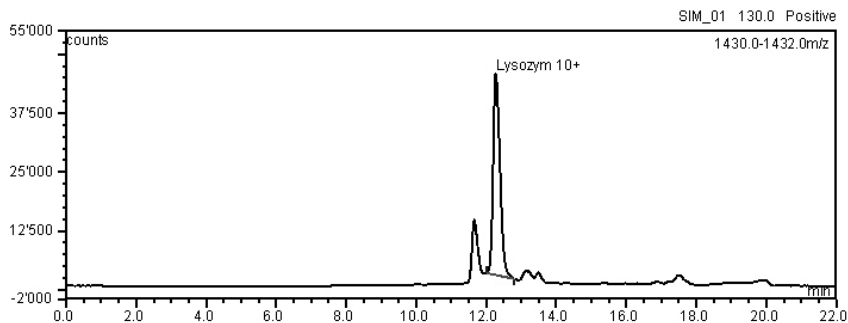


Abbildung 1 LC-MS-Chromatogramm von Emmentalerkäse, hergestellt mit Lysozym ($z=10^+$), bestimmter Gehalt: 240 mg/kg

Als zusätzliche Absicherung kann im Retentionszeitfenster von Lysozym ein TIC-Spektrum aufgenommen und mit reinem Lysozym als Referenz verglichen werden (Abbildung 2).

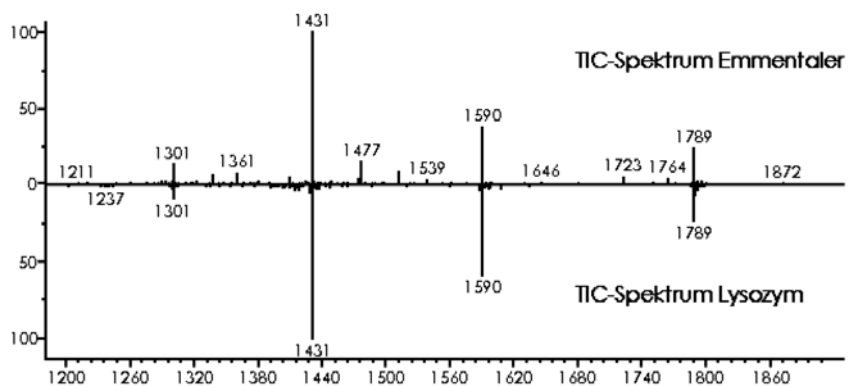


Abbildung 2 Vergleich der TIC-Spektren von Emmentalerkäse, hergestellt mit Lysozym und reinem Lysozym)

Berechnung des Lysozymgehaltes

$$\text{mg Lysozym pro kg} = \frac{\text{MW} \cdot 50}{\text{EW}}$$

MW = Messwert der Probelösung (mg/L)

EW = Einwaage (g)

Hydrolyse von Lysozym mit Trypsin für zusätzliche Bestätigungsanalysen

- 200 µL der membranfiltrierten Extraktionslösung im Zeitfenster von Lysozym fraktionieren (HPLC-FLD).
- Aufgefängene Fraktion mit einer Vakuumpzentrifuge (SpeedVac) zur Trockene einengen.
- Rückstand in 500 µL Hydrolysepuffer (395 mg Ammoniumhydrogencarbonat in 100 mL Wasser lösen, mit Ammoniaklösung auf pH 8,5 einstellen) lösen, 20 µL Trypsinlösung (10 mg lyophilisiertes Trypsin in 10 mL 0,01 % Trifluoressigsäure lösen) zugeben und während 24 h bei 35 °C inkubieren.
- Lysozymhydrolysat in ein HPLC-Vial transferieren und mit LC-MS untersuchen.

Ergebnisse und Diskussion

Extraktionszeit

Im Extrakt einer Probe Grana Padano, hergestellt mit Lysozym wurde der Lysozymgehalt nach verschiedenen langen Extraktionszeiten bestimmt. Die Resultate bestätigten, dass die von Pellegrino (1) vorgeschlagene Extraktionsdauer von 60 Minuten optimal ist (Tabelle 2).

Tabelle 2
Einfluss der Extraktionsdauer bei Grana Padano

Extraktionsdauer	Lysozymgehalt in mg/kg
1 Minute	165
15 Minuten	161
30 Minuten	162
60 Minuten	184
90 Minuten	178

Kalibrierung

Standardlösungen mit 2, 4 und 8 mg/L wurden je dreifach mit LC-MS gemessen. Die relativen Standardabweichungen lagen im Bereich von 1–10 %. Die Kalibrierkurve war im Messbereich von 2 bis 8 mg/L linear ($R^2 > 0,99$).

Untersuchungen von Emmentalerkäse ohne und mit Lysozym

In einer Käserei wurden zwei Chargen Emmentalerkäse mit (=Proben A und B) und eine Charge ohne (=Probe C = Nullprobe) Lysozym hergestellt. Die Käselai

wurden etwa während eines halben Jahres in einem Käsekeller gereift. Für die Proben A und B wurde aus der Rezeptur ein Lysozymgehalt von 235 mg/kg abgeschätzt (Annahme: Lysozym geht vollständig in den Käseteig über). Die gemäss Vorschrift hergestellten Extrakte der 3 Proben wurden mit der LC-MS- und HPLC-FLD- Methode von Pellegrino untersucht.

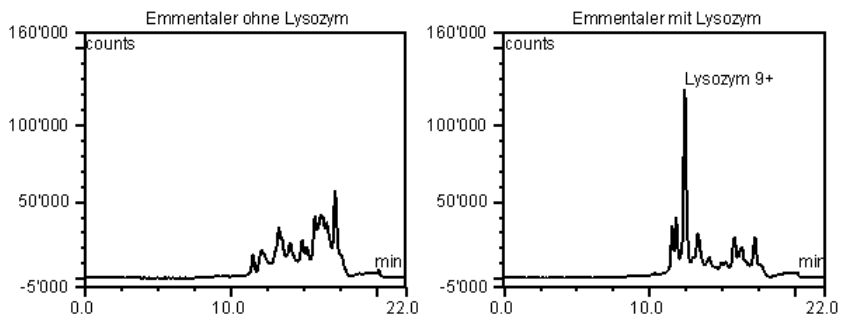


Abbildung 3 LC-MS-Chromatogramm von Emmentalerkäse, hergestellt ohne und mit Lysozym ($z=9^+$)

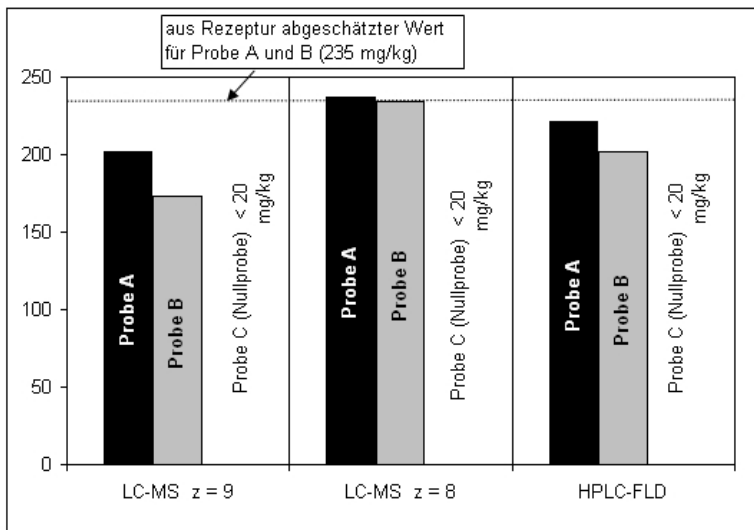


Abbildung 4 Wiederauffindungsraten mit LC-MS und HPLC-FLD

Das Chromatogramm von Probe C (Nullprobe) mit LC-MS und $z=9$ wies im Zeitfenster von Lysozym einige Matrixsignale auf, die aber die quantitative Auswertung nicht erheblich störten (Abbildung 3).

Die Resultate für Probe A und B stimmten erstaunlich gut mit dem aus der Rezeptur abgeschätzten Wert überein (Abbildung 4). Sie zeigen auch, dass Lysozym in Emmentalerkäse während der Reifung nur wenig abgebaut wird. Die Abweichungen zwischen den LC-MS-Resultaten mit $z=9$ und $z=8$ sind vermutlich auf die unterschiedlichen Signalintensitäten und die erwähnten Matrixsignale im Zeitfenster von Lysozym zurückzuführen.

Wiederholbarkeit der LC-MS-Methode

3 Proben wurden gemäss Vorschrift je 2mal aufgearbeitet. Die Wiederholbarkeit der LC-MS-Methode lag im Bereich von 6 bis 14%.

Bestätigung mittels Peptidanalyse nach Hydrolyse mit Trypsin

In einem Vorversuch wurde eine Standardlösung von Lysozym gemäss Vorschrift mittels HPLC fraktioniert und mit der Endoproteinase Trypsin hydrolysiert. Trypsin spaltet dabei interne Peptidbindungen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin C-terminal. Das für Lysozym charakteristische Peptid f(117–125) GTDVQAWIR (Abbildung 5) konnte mit der beschriebenen LC-MS-Methode und einer Sequenzanalyse nach Edman identifiziert werden (Sequenzanalyse, durchgeführt durch die Forschungsgruppe für Proteinanalytik, Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern, Schweiz).

1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC AAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DNGMNAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRLL

Abbildung 5 Peptid f(117–125) GTDVQAWIR in der Aminosäuresequenz von Lysozym aus Hühnereiwiss)

Je eine Probe Käse, hergestellt mit und ohne Lysozym, wurden gemäss Vorschrift aufgearbeitet. Die Lysozym-Fractionen wurden mit Trypsin hydrolysiert und auf das Peptid f(117–125) GTDVQAWIR untersucht. Ein Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass das Signal des gesuchten Peptids (m/z 523, $z=2$) nur im Hydrolysat der Käseprobe mit Lysozym erscheint (Abbildung 6).

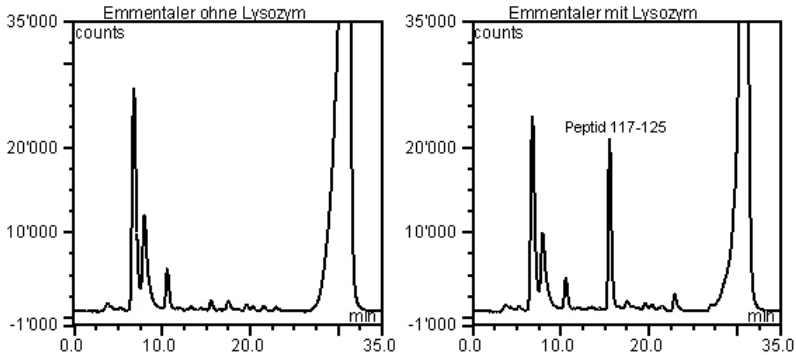


Abbildung 6 Vergleich der Trypsin-Hydrolysate von Käseproben ohne und mit Lysozym)

Abschätzung der Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenze mit LC-MS (halbe Standardabweichung des Rauschens $\times 10$) für Lysozym beträgt ca. 1 mg/L in der Messlösung; dies entspricht etwa 25 mg/kg im Käse.

Untersuchungen von Käseproben aus dem Handel

Im Zeitraum 2002 bis 2005 wurden insgesamt 258 Käseproben aus Verkaufsgeschäften im Kanton Bern mit der Methode von Pellegrino (1) auf ihren Lysozymgehalt untersucht. Lysozym war vor allem in den Käsesorten Grana Padano (Italien), Manchego (Spanien) und in geriebenem Parmigiano Reggiano (Italien) nachweisbar (Abbildung 7). 7 Proben mit Gehalten über 50 mg/kg wurden auch mit der LC-MS-Methode untersucht. Sie zeigten alle das für Lysozym charakteristische Massenspektrum. Die Abweichungen zwischen der LC-MS- und der HPLC-FLD-Methode lagen im Bereich von $\pm 20\%$.

Lysozymgehalte über 100 mg/kg wurden auch in Proben von Le Petite Chaumes, Brebiou (Frankreich); Castelões, Queija (Portugal) und Montasio (Italien) gemessen.

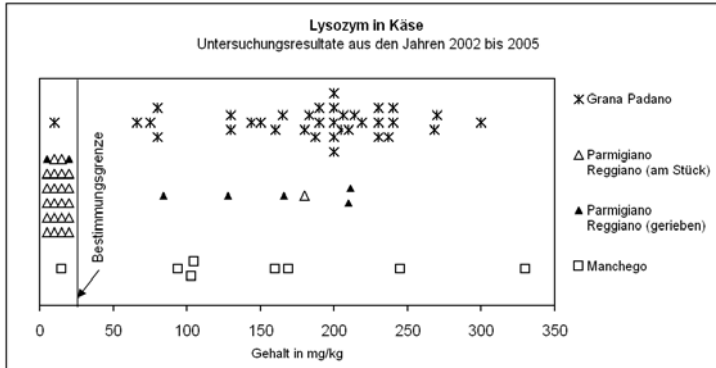


Abbildung 7 Lysozym in Proben von Grana Padano, Parmigiano Reggiano und Manchego

Zusammenfassung

Für die Bestimmung von Lysozym in Käse wurde eine LC-MS-Methode entwickelt und in der Praxis erprobt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 25 mg/kg. In einer mit HPLC gereinigten Fraktion konnte nach Hydrolyse mit Trypsin ein für Lysozym spezifisches Peptid mit LC-MS nachgewiesen und die Identität mittels Aminosäure-Sequenzierung zusätzlich abgesichert werden.

Résumé

Une méthode LC-MS a été développée et utilisée en routine pour le dosage des lysozymes dans le fromage. La limite de quantification est de 25 mg/kg. Après hydrolyse trypsique d'une fraction purifiée par HPLC, un peptide spécifique aux lysozymes peut-être décelé. L'identification de ce dernier peut-être en outre certifiée par le séquençage d'acides aminés.

Summary "Determination of Lysozyme in cheese by LC-MS"

A LC-MS method for the determination of Lysozyme in cheese was developed and tested in practice. The detection limit was about 25 mg/kg. An extract, purified by HPLC was digested with Trypsin. A peptide characteristic for Lysozyme was identified by LC-MS and additionally by amino acid sequence analysis.

Key words

Lysozyme, Cheese, HPLC, LC-MS

Literatur

- 1 *Pellegrino L. and Tirelli A.:* A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products, *International Dairy Journal* **10**, 435–442 (2000)
- 2 *Rauch P. et al.:* Sandwich enzyme immunoassay of hen egg lysozyme in foods, *Journal of Food Science* **55**, 103–105 (1990)
- 3 *Sariri R.:* The use of the detection of lysozyme in different Iranian cheese samples, *International Journal of Chemical Sciences* **2**, 291–298 (2004)

Korrespondenzadresse: Dr. Konrad Rieder, Kantonales Laboratorium,
Muesmattstrasse 19, CH-3012 Bern, Telefon: +41 31 633 11 21,
E-Mail: konrad.rieder@gef.be.ch

Quantitative Determination of Tryptophan in Wheat Flour, Milk Powder and Meat by High-Performance Liquid Chromatography – Short Note

Hanna Schneider¹, Nadine Gerber², Barbara Friedli-Wunderli³, Caspar Wenk² and Renato Amadò¹
ETH Zurich, CH-8092 Zurich, Switzerland

¹Institute of Food Science and Nutrition, Food Chemistry

²Institute of Animal Science, Nutrition Biology

³Present address: Haco AG, 3073 Gümligen, Switzerland

Eingegangen am 2. November 2006, akzeptiert am 5. April 2007

Introduction

An accurate determination of L-tryptophan is an important issue because this amino acid is essential for man as well as for many animals and must be ingested as part of the diet. The main function of L-tryptophan is as a building unit in protein synthesis. Additionally L-tryptophan is a precursor for serotonin (a neurotransmitter), melatonin (a neurohormone), and niacin and it is essential for brain functions and neuronal regulatory mechanisms by the action of its indole functional group.

L-tryptophan is found as a component of dietary protein. The quantitative determination of this amino acid in food and feed is a challenge for analytical chemists, because of its chemical instability. The indole group is very sensitive to redox reactions, particularly in strong acidic media as generally used for protein hydrolysis (1). Numerous efforts have been made to find a generally applicable method for the analysis of tryptophan (2). Some researchers have proposed direct reactions both with hydrolysed and with intact proteins applying procedures such as second-derivative spectroscopy (3, 4), reactions with *p*-dimethylaminobenzaldehyde (5), *p*-phenylenediamine (6) and ninhydrin in strong acid media (7). Direct spectrophotometric analysis of the protein is rapid and does not require hydrolysis of the protein. However, direct determination is subject to error due to interferences

and can only be considered as an approximate procedure. Photometric methods can be tedious and suffer from problems such as colour stability and interferences with other food or feed components. According to most suggestions tryptophan is to be measured in hydrolysates by chromatography under time-consuming and special conditions. These include using (i) hydrochloric acid+additives (8–12), (ii) organic acids (13), (iii) enzyme (14), and (iv) bases (15–25). But since the release of tryptophan in the methods i–iii is often reported to be incomplete (17) the alkaline hydrolysis of protein-bound tryptophan has thus become the method of choice. The majority of these procedures involve the following basic steps: (a) alkaline hydrolysis of the sample at 110–125 °C in oxygen-free medium for 16–18 h; (b) dilution of the hydrolysate, with chromatographic buffer (neutralised or not); (c) clarification of the dilute hydrolysate; (d) high-performance liquid chromatographic (HPLC) separation; (e) spectrophotometric or fluorimetric determination (25).

The aims of this investigation were: a) to optimise a method particularly by taking into account for the differences in the ratio tryptophan to internal standard in order to have a simple and accurate method for quantitative determination of tryptophan; b) to evaluate the levels of tryptophan in different meat cuts as well as in wheat flour and milk powder.

Material and Methods

Determination of the protein content

Meat samples were heated to 1050 °C following AOAC 992.15 (26) in a Leco model CN-2000 (Leco Instruments, Michigan, USA) protein/nitrogen analyser calibrated with EDTA (Dumas method). The nitrogen to protein conversion factor considered was 6.25.

Determination of tryptophan

Principle

The food or feed sample is hydrolysed in alkali, neutralised and diluted. Subsequently tryptophan is determined by HPLC with fluorescence detection. α -methyl-tryptophan is used as internal standard.

Chemicals

The following chemicals were used: lithium hydroxide, D (+)-lactose-monohydrate, hydrochloric acid fuming 37% (Fluka AG, Buchs, Switzerland), ortho-phosphoric acid, DL-tryptophan (Merck, Darmstadt, Germany), methanol Chromosolv® for HPLC (Riedel-de Haen, Buchs, Switzerland), α -methyl-tryptophan (Sigma, Taufkirchen, Germany), water of Nanopur quality (Skan AG, Allschwil, Switzerland).

The α -methyl-tryptophan standard (1 mg/ml) as well as the tryptophan standard (10 mg/1 ml) were dissolved in 0.4 M lithium hydroxide solution and stored at -18°C until used.

Samples

Several meat samples from different productive livestock, commercial milk powder and wheat flour were analysed. The meat samples were homogenised (Moulinette S, Moulinex, Ecully Cedex, France) at room temperature and stored vacuum packaged (bags polyamide/polyethylene 90 μm , Inauen Maschinen AG, Herisau, Switzerland) at -18°C until analysed. Milk powder and wheat flour were analysed without prior treatment.

Sample preparation

The amount of sample to be analysed was chosen in a way that it contained approximately 1 mg tryptophan, or 60 mg protein. The appropriate amount was weighed into a 25 ml Pyrex hydrolysis tube (Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, United Kingdom), 1 ml α -methyl-tryptophan standard solution (1 mg/1 ml), 150 mg D (+)-lactose-monohydrate and 19 ml 4 M lithium hydroxide solution were added.

The standard samples contained 100 μl tryptophan solution (10 mg/ml), 1 ml α -methyl-tryptophan solution (1 mg/ml), 150 mg D (+)-lactose-monohydrate and 19 ml 4 M lithium hydroxide solution. The samples were heated in an oven at $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 1 h followed by 16 h at $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. During the first hour of hydrolysis the tubes were not tightly closed to completely remove the oxygen and for pressure equalisation in the flasks.

After cooling the samples were shaken and 1 ml hydrolysate was neutralised with 1 ml 4 M hydrochloric acid. The neutralised samples were diluted 1:200 with HPLC eluent (composition see below) and filtered in vials through 0.45 μm pore size membrane (17 mm Titan HPLC-Filter membrane PVDF, Infochroma AG, Zug, Switzerland).

With each sample batch, 4 standard samples containing 1 mg tryptophan and 1 mg α -methyl-tryptophan were analysed as well. The tryptophan concentration was calculated by means of a corresponding response factor. In addition samples with 0.5, 0.75, 1.25 and 1.5 mg/ml tryptophan were analysed to calculate the recovery.

Chromatographic conditions

A Hewlett Packard HPLC system (Serie HP1050, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) equipped with a fluorescence detector (Serie HP1046A, Hewlett-Packard) was used for all analyses. Separation was achieved with a Nucleosil 100-5 C 18 column (250 \times 8 \times 4 mm; Macherey Nagel AG, Oensingen, Switzerland).

A mobile phase consisting of 1.5 g ortho-phosphoric acid, 750 ml water and 250 ml methanol was used. The pH was adjusted to 4.00 with 6 M NaOH solution and the eluent filtered through a membrane (pore size: 0.22 µm, Infocroma).

Separation was performed at ambient temperature at a flow rate of 0.8 ml/min. The injection volume was 20 µl. The fluorescence detector was operated at an excitation wavelength of 228 nm and at an emission wavelength of 350 nm.

Each sample was injected twice; standards were measured at the beginning, in the middle and at the end of a series of analyses.

Calculation

Calculation of the response factor:

$$F = \frac{\text{Area Trp}}{\text{Area IS}}$$

F: Response factor

Trp: Tryptophan

IS: Internal Standard

Calculation of the tryptophan content in sample:

$$m = \frac{1 \cdot \text{Area Trp (sample)}}{F \cdot \text{Area IS (sample)}}$$

$$\% \text{Trp} = \frac{m \cdot 100}{E \cdot 1000}$$

m: Mass tryptophan in the sample

%Trp: Tryptophan content in weight by weight (w/w)

E: Weighed sample in g

Results and Discussion

Optimisation of the method

The method used in this study is based on the method published by VDLUFA (23). In preliminary experiments the method was optimised and an internal standard (α -methyl-tryptophan) was added to the sample before hydrolysis. The reliability of the method was checked by using different amounts of tryptophan at a constant concentration of internal standard.

Figure 1 shows to what extent the ratio tryptophan to internal standard (α -methyl-tryptophan) affects the accuracy and reliability of the determination. Setting a 5% margin of error as limit of accuracy, none of the values for the samples containing 0.5 and 1.5 mg/ml tryptophan were within this range, whereas half of the values of the samples containing 0.75 and 1.25 mg/ml tryptophan were in the preset

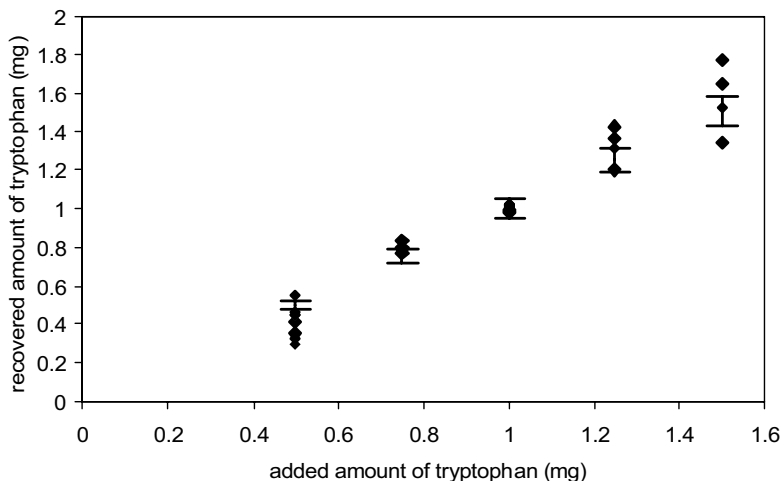


Figure 1 Recovery rate of tryptophan at different concentration
 (♦ individual recovery rate, $\bar{x} \pm 5\%$ margin of error as limit of accuracy)

range. These results clearly indicate that the applied method provides reliable results only for samples containing approximately 1 mg/ml tryptophan, the same amount as for the internal standard. Based on the above mentioned results three different sample weights were analysed to get as close as possible to the optimal ratio. The findings obtained with standard solutions were confirmed by experiments using different amounts of samples of milk powder and wheat flour for which similar results were found (results not shown).

Tryptophan analysis in food

To establish and test the performance of the method, the amount of tryptophan in milk powder, wheat flour, and meat samples were measured. Figure 2 shows typical chromatograms for a standard solution (A) and for a meat sample (veal rolled breast) (B). Tryptophan and α -methyl-tryptophan were resolved at baseline by applying the procedure to different type of samples. The peak eluting at a retention time of approx. 3 min has not been identified since it did not disturb the quantification of tryptophan in the food samples.

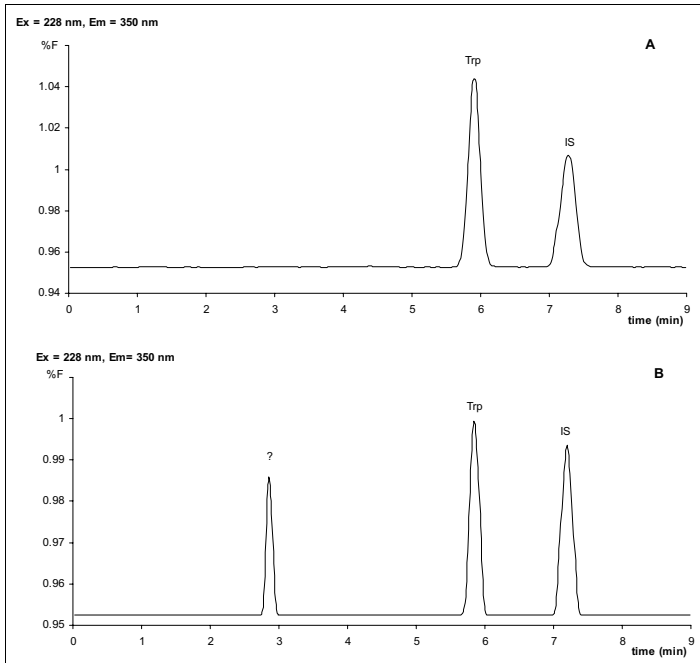


Figure 2 HPLC chromatograms of tryptophan analyses
 A: Standard solution; B: meat sample (veal rolled breast)
 Trp= tryptophan peak, IS= internal standard peak; ?= unknown peak;
 Ex=excitation wavelength; Em= emission wavelength

Table 1 shows the data of tryptophan analyses of wheat flour and milk powder. The values obtained were compared with data found in the literature (19, 25, 27–28). Results lay within the range of those previously reported for these food stuffs. The examination of the literature data has revealed a wide variability in the determined tryptophan contents of wheat flour which could be due to the natural variability of the grains as well as to the various analytical methods used.

Table 1
Tryptophan content of different food samples

<i>Food stuff</i>	<i>Tryptophan (g/100 g product)</i>	<i>Literature values, range</i>
wheat flour (n=13)	0.176 ± 0.009	0.145–0.21 ^a
milk powder (n=5)	0.364 ± 0.015	0.35 ^b

^areferences (19, 25, 27–28); ^b references (28)

The results obtained for the tryptophan analyses with meat samples are compiled in Table 2. For the analyses of meat slices three different initial weights (150, 300 and 450 mg) were used to get as close as possible to the optimal concentration of 1 mg tryptophan in the sample. The tryptophan contents of meat cuts from different animal species ranged from 0.20 to 0.35 mg/100 g fresh meat (table 2). In literature

Table 2
Tryptophan content of meat cuts from different animal species

<i>Animal</i>	<i>meat cut</i>	<i>n</i>	<i>% crude protein (N×6.25)</i>	<i>Trp (g/100 g fresh meat)</i>	<i>Literature (28)</i>
Beef	Entrecôte	2	23.8	0.282±0.035	0.290 ^a
	Top sirloin	3	19.1	0.271±0.005	0.260 ^a
	Simmer meat	3	20.1	0.259±0.018	0.250 ^a
	Brasing steak	2	21.4	0.311±0.042	0.290 ^a
	Mince meat	2	21.0	0.254±0.041	0.260 ^a
	Meat cut into strips	2	23.7	0.313±0.014	0.280 ^a
Veal	Ragout	2	18.9	0.263±0.039	0.280 ^a
	Loin	2	22.1	0.310±0.078	0.300 ^a
	Chop	3	20.2	0.255±0.014	0.270 ^a
	Brasing steak	2	21.0	0.266±0.002	0.280 ^a
	Rolled breast	3	18.1	0.228±0.029	
	Mince meat	2	20.7	0.284±0.053	0.270 ^a
Pork	Meat cut into strips	2	21.7	0.245±0.026	
	Ragout	2	18.8	0.217±0.035	
	Chop	2	23.5	0.317±0.052	0.300 ^a
	Loin	2	22.7	0.348±0.048	0.300 ^a
	Brasing steak	2	22.2	0.277±0.038	0.300 ^a
	Steak	3	18.2	0.241±0.025	0.250 ^a
Lamb	Spare ribs	3	18.3	0.264±0.047	0.240 ^a
	Mince meat	2	19.7	0.255±0.007	0.260 ^a
	Meat cut into strips	2	22.0	0.289±0.015	0.290 ^a
	Ragout	2	20.0	0.250±0.007	0.260 ^a
	Gigot	2	20.7	0.255±0.034	
	Chop	2	21.9	0.269±0.040	
Horse	Loin	2	22.0	0.283±0.034	
	Ragout	2	17.6	0.231±0.036	
	Entrecôte	2	22.7	0.299±0.044	
Foal	Filet	2	22.5	0.316±0.054	0.150 ^{a, b}
	Brasing steak	2	21.0	0.302±0.043	
	Entrecôte	2	24.5	0.348±0.058	
ABison	Filet	2	22.3	0.316±0.063	
	Brasing steak	2	21.5	0.292±0.046	
	Entrecôte	2	22.7	0.295±0.043	
Ostrich	Filet	2	20.6	0.289±0.081	
Deer	Entrecôte	2	21.0	0.287±0.049	
Rabbit	Filet	2	22.5	0.314±0.056	
Venison	Ragout	2	22.0	0.288±0.042	
	Escalope	2	23.1	0.312±0.054	
Wild boar	Entrecôte	2	21.0	0.261±0.047	

^areference (28); ^breference (29)

(28) similar results can be found for veal, beef and pork. In contrast, the tryptophan content of horse meat in this study was found to be twice as high compared with other studies (28, 29). However, it has to be considered that in these studies the crude protein content was much lower. Furthermore, the tryptophan contents in study (28) were even calculated and not analysed. Only few or no detailed data about tryptophan content in different meat cuts can be found for bison, foal/horse, rabbit, venison, ostrich and wild boar.

Conclusion

The present results show that the method described provides reliable results only if the amount of tryptophan correspond to the amount of internal standard. In this case, the method has been shown to be suitable for a quantitative routine determination of tryptophan in different meat cuts, wheat flour and milk powder. The HPLC method is easy to perform, and gives highly reproducible results.

Summary

A high performance liquid chromatography method is presented which allows quantification of tryptophan in different food matrices. Tryptophan is liberated from proteins by an alkaline hydrolysis, followed by a neutralisation and appropriate dilution. Separation is performed by HPLC using fluorescence detection. Emphasis is laid on the optimisation of the ratio tryptophan to internal standard (α -methyl tryptophan) and accordingly to the sample weight. These parameters mostly influence the reliability of the results.

The method was established for routine tryptophan analysis in wheat flour, milk powder and particularly meat slices of different origin (veal, pork, beef etc).

Zusammenfassung

Eine HPLC Methode wird beschrieben, die eine einfache quantitative Bestimmung von Tryptophan in verschiedenen Lebensmittel Matrices erlaubt. Die Freisetzung des Tryptophans aus den Proteinen erfolgt durch eine alkalische Hydrolyse, gefolgt von einer Neutralisation und einer entsprechenden Verdünnung der Proben. Die Analyse wird mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Das Schwergewicht bei der Methodenanpassung lag bei der Optimierung des Verhältnisses Tryptophan zu internem Standard (α -Methyl Tryptophan) und damit der Einwaage der Probe, da diese Parameter den grössten Einfluss auf die Zuverlässigkeit der erzielten Resultate haben.

Die Methode wurde erfolgreich für die routinemässige quantitative Bestimmung von Tryptophan in Weizenmehl, Milchpulver und insbesondere in Fleischproben unterschiedlicher Herkunft (Schwein, Rind Kalb usw.) verwendet.

Résumé

Une méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est présentée, laquelle permet une détermination simple et quantitative de l'acide aminé tryptophane dans des aliments avec des matrices différentes. La libération du tryptophane se fait par une hydrolyse alcaline, succédée par une neutralisation et une dilution appropriée des échantillons. L'analyse est faite par HPLC équipé avec un détecteur de fluorescence. L'adaptation de la méthode a été focalisée sur l'optimisation de la relation tryptophane/standard interne (α -méthyl-tryptophane) et avec ça sur le poids de l'échantillon. Ces deux paramètres ont l'effet le plus prononcé sur les résultats obtenus.

La méthode a été utilisée avec succès pour une détermination de routine du taux de tryptophane dans des échantillons de farine de blé, de poudre de lait et surtout de viande d'origine différente (veau, porc, bœuf, etc.).

Key words

Tryptophan, HPLC, meat, milk powder, wheat flour

References

- 1 *Molnár-Perl I.*: Review-Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **763**, 1–10 (1997)
- 2 *Molnár-Perl I.*: Advances in the analysis of tryptophan and its related compounds by chromatography. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **467**, 801–816 (1999)
- 3 *Fletouris D.J., Botsoglou N.A., Papageorgiou G.E. and Mantis A.J.*: Rapid determination of tryptophan in intact proteins by derivative spectrophotometry. *J. AOAC Intern.*, **76**, 1168–1173 (1993)
- 4 *Servillo L., Colonna G., Balestrieri C., Ragone R. and Irace G.*: Simultaneous determination of tyrosine and tryptophan residues in proteins by second-derivative spectroscopy. *Anal. Biochem.*, **126**, 251–257 (1982)
- 5 *Votisky E.*: In *Progress in tryptophan and serotonin research: proceedings fourth meeting of the international study group for tryptophan research* (pp. 115–117). Berlin: Walter de Gruyter (1984)
- 6 *Nagaraja P., Yathirajan H.S. and Vasantha R.A.*: Highly sensitive reaction of tryptophan with p-phenylenediamine. *Anal. Biochem.*, **312**, 157–161 (2003)
- 7 *Pinter-Szakacs M. and Molnár-Perl I.*: Determination of tryptophan in unhydrolyzed food and feedstuffs by the acid ninhydrin method. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 720–726 (1990)
- 8 *Ashworth R.B.*: Amino acid analysis for meat protein evaluation. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **70**, 80–85 (1987)
- 9 *Gardner M.L.G.*: Cysteine: A potential source of error in amino acid analysis of mercaptoethane sulfonic or hydrochloric acid hydrolysates of protein and peptides. *Anal. Biochem.*, **141**, 429–431 (1984)
- 10 *Ng L.T., Pascaud A. and Pascaud M.*: Hydrochloric acid hydrolysis of proteins and determination of tryptophan by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **167**, 47–52 (1987)
- 11 *Muramoto K. and Kamiya H.*: Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. *Anal. Biochem.*, **189**, 223–230 (1990)

- 12 *Fábián V., Pintér-Szakács M. and Molnár-Perl I.*: Gas chromatography of tryptophan together with other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **520**, 193–199 (1990)
- 13 *Nakazawa P. and Manabe K.*: The direct hydrolysis of proteins containing tryptophan on polyvinylidene difluoride membranes by mercaptoethanesulfonic acid in the vapour phase. *Anal. Biochem.*, **206**, 105–108 (1992)
- 14 *García S.E. and Baxter J.*: H Determination of tryptophan content in infant formulas and medical nutritional. *J. AOAC Intern.*, **75**, 1112–1119 (1992)
- 15 *Delhaye S. and Laundry J.*: Quantitative determination of tryptophan in food and feedstuffs: practical considerations on autoclaving samples for hydrolysis. *J. Chromatogr.*, **520**, 193–199 (1990)
- 16 *Huet J. and Pernollet J.*: Chromatographic separation and determination of tryptophan in food-stuffs after barytic hydrolysis using Fractogel TSK W 40 S. *J. Chromatogr.*, **355**, 451–455 (1986)
- 17 *Landry J. and Delhaye S.*: Simplified procedure for the determination of tryptophan of foods and feedstuffs from barytic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 776–779 (1992)
- 18 *Landry J. and Delhaye S.*: Tryptophan contents of pea and broad bean seeds as a function of nitrogen content. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3855–3858 (1997)
- 19 *Landry J., Delhaye S. and Viroben G.*: Tryptophan content of feedstuffs as determined from three procedures using chromatography of barytic hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 51–52 (1988)
- 20 *Slump P., Flissebaalje T.D. and Haaksman I.K.*: Tryptophan in food proteins: A comparison of two hydrolytic procedures. *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 493–496 (1991)
- 21 *Fontaine J., Bech-Andersen S., Bütikofer U. and de Froidmont-Görtz I.*: Determination of tryptophan in feed by HPLC – Development of and optimal hydrolysis and extraction procedure by the EU commission DG XII in three international collaborative studies. *Agribiol. Res.*, **51**, 97–108 (1998)
- 22 *Werner G.*: A HPLC-method for determination of tryptophan in feeds and cereals. *Landwirtsch. Forschung*, **39**, 109–117 (1986)
- 23 *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalt (VDLUFA)*: Bestimmung von Tryptophan – HPLC-Verfahren. Methode 4.11.2, Methodenbuch III, (1988)
- 24 *Bech-Anderson S.*: Determination of tryptophan with HPLC after alkaline hydrolysis in autoclave using α -methyl-tryptophan as internal standard. *Acta Agric. Scand.*, **41**, 305–309 (1991)
- 25 *Yust M.M., Pedroche J., Girón-Calle J., Vioque J. Millán F. and Alaiz M.*: Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chem.*, **85**, 317–320 (2004)
- 26 *Association of Official Analytical Chemists*: In Official methods of the association of official analytical chemists. (pp. 3–6) 16th ed. AOAC. Washington DC (1995)
- 27 *Aiple K. and Menke K.H.*: Determination of tryptophan in feeds – recovery of tryptophan from peptides and lysozyme. *Agribiol. Res.*, **43**, 200–208 (1990)
- 28 *Souci S.W., Fachmann W. und Kraut H.*: Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. 6. Auflage. Medpharm Scientific Publishers (2000)
- 29 *Badiani A., Nanni N., Gatta P.P., Tolomelli B. and Manfredini M.*: Nutrient profile of horse-meat. *J. Food Comp. Anal.*, **10**, 254–269 (1997)

Corresponding address: Hanna Schneider, ETH Zurich, Institute for Food Science and Nutrition, Schmelzbergstrasse 9, CH-8092 Zurich, Switzerland,
 Phone: +41 (0)44 632 55 89, e-mail: hanna.schneider@ilw.agrl.ethz.ch

Sampling Strategy for Karst Waters

Adrian Auckenthaler, Annette Affolter

Eingegangen am 27. April 2006, akzeptiert am 30. Mai 2007

Introduction

Karst waters are highly dynamic systems in terms of water flow and water quality changes (1, 2). These changes should be considered when defining sampling strategies for drinking water controls. When assessing results from drinking water controls, it is crucial to know if base flow or peak flow was monitored. This however, requires the knowledge of the local system behaviour. Routine drinking water controls in Switzerland based on the legal foundation can not give this information needed because sampling frequencies are mainly based on the number of consumers (3). Especially small water supplies, using karst spring waters have their water therefore only tested two to four times a year. Regarding long time periods of several years or decades to describe system behaviour does not help much further. The data only allow giving a general statement on the behaviour of karst springs i.e. a raise of fecal contamination after precipitation events but no evidence regarding the maximum concentration or the exact time of occurrence of the contamination. However, the aim of a drinking water control should be to get a water quality description specific to the water supply tested over some period as accurate as possible. Instead a static description is given that only allows a general statement on the water at the sampling location.

To account for the dynamic behaviour of karst systems continuous measurement instruments have to be installed. Suitable parameters for such kind of measurement are e.g. discharge, turbidity, electrical conductivity and UV-extinction and as a supplement microbiological parameters sampled several times a day during precipitation events (4). These measurements can show the reaction time of the karst spring after precipitation events, this means how long it takes e.g. for the turbidity to begin to rise, to reach the peak maximum and to come back to the base level again. This information allows a conclusion on the quality changes over time of the karst water. In addition, it is a basis for the dimension of drinking water treatment plant and for the optimization of the control loop in drinking water treatment. Furthermore, it helps to plan the dimension of water supply reservoirs and the combi-

nation of water supplies in order to bridge periods with bad water quality. The recorded breakthrough curves of the continuously measured parameters can also be used to determine transport velocities like for tracer tests and are so used to optimize the time of sampling for the specific location (5). A continuous measurement of appropriate parameters in karst waters can therefore contribute to an optimization of several parts of the water quality system.

The study presents two sampling strategies, routine sampling and event-based sampling. The data for the formulation of these strategies were gathered in a small water supply that uses two karst springs. The aim was to optimize the sampling strategy and significance of the drinking water analysis by keeping the time, cost and effort as low as possible. Therefore the study is based mainly on available data (e.g. previous tracer tests and discharge measurements from local authority). New data acquisition, data analysis and data interpretation was reduced to a minimum in order to present a practicable approach especially for small water supplies. It is shown, that with routine sampling general statements on karst springs can be made whereas with event-based sampling, site specific information is gained.

Catchment area

The study was carried out at a small water supply in Tabular Jura of Northwestern Switzerland. The water supply uses three very closely located karst springs. Since January 2004, only two springs are used as the third spring caused high turbidity in the water supply. Our findings are therefore based on the two springs (spring 1 and 3) which are currently in use. The catchment area of the springs, which was delineated in (6) according to general geological criteria and dye tracer tests is part of the syncline of "Rossboden/Bürten" and has an dimension of about 1.8 km². The aquifer is built on top of this syncline by tertiary marls with low to middle permeability depending on the thickness of the formation. The main aquifer consists of highly porous detritic limestone so called Sequanian Formation (Malm) which is embedded in a low permeable marly clay formation. This latter formation (Effinger-Formation) builds the aquitard. The underlying formations, built by formations of Dogger and Jura are not part of the catchment area. The three springs occur at the stratigraphic contact of the Sequanian Formation and Effinger Formation in the spark-eroded depression of Bürtengraben (6, 7).

Previous Tracer tests

Two tracer tests were performed at Bürtengraben springs (6). In the first tracer test in 1969, Uranine was injected into Bürtengraben creek 250 m above the springs (Fig. 1). The tracer could be detected in all three springs 1¼ hours after injection, peak maximum was after about 3 to 5 hours. Unfortunately, only a semi quantitative analysis of tracer concentration was made. Therefore, the time of peak concentration is unclear and the tracer recovery can not be calculated. In the second tracer test in 1998, three input locations with three different tracers (Uranine, Eosin and

Naphthionate) were chosen (Fig. 1). During the tracer test it was raining. The following days unsettled weather conditions prevailed. The Uranine (amount 200 g) was flushed with 3 m³ of water on a sloping stony pasture (area 14 × 3 m²). The input site showed good infiltration capacity. Also Eosin (amount 200 g) showed good infiltration. The tracer was flushed with 2 m² of water into a dredger slit, which reached the intensively karstified rock. Naphthionate (amount 2 kg) was flushed with 3.3 m³ of water into a natural depression in the terrain. Fastest transport was detected for Uranine which was transported over a distance of 570 m within 14 hours (Fig. 2). For Eosin first arrival was after 7 days (flow distance 850 m). Naphthionate could not be detected within a sampling period of 20 days in the two springs but in the Bürtengraben creek. It is assumed, that the Naphthionate like the other tracers exfiltrated at the stratigraphic contact of the Sequanian and Effinger Formation, but according to the topographic circumstances, did not reach the catchment area of the springs. Unfortunately, in this tracer test spring discharge was not measured, the three springs were not analysed separately and sampling period was too short to give the whole breakthrough curve of Eosin. A rough estimation of the tracer recovery, assuming a discharge between 200 and 400 L/min as a sum for the three springs, gives a range of 2 % to 6 % for Uranine and 2 % to 8 % for Eosin.

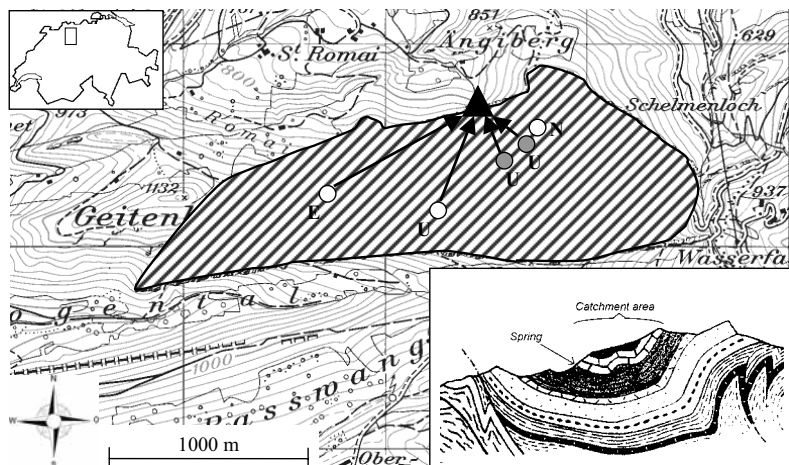


Figure 1 Map of study area in Northwestern Switzerland with springs, input locations of tracers and a geological cross profile. The two top formation of the syncline, the tertiary marls and the Sequanian Formation (Malm) build the aquifer. The underlying Effinger-Formation builds the aquitard. Black triangle: location of the three springs; grey points: input locations in the tracer test of 1969; white points: input locations in the tracer test of 1998; E: Eosin input; U: Uranine input; N: Naphthionate input

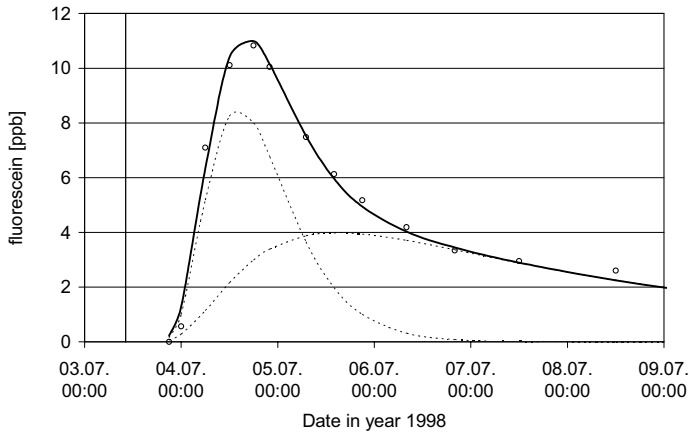


Figure 2 Measured data from the tracer test in 1998 (circles) (6) and fitted tracer breakthrough using eq. 1. The initial time is indicated by the vertical line, dotted lines are the two fitted curves, the black line is the whole fitted BTC

In conclusion, fast reaction from Bürtengraben creek and the Uranine input location could be detected. From the Eosine input site transport was comparably slow with an estimated mean flow velocity of about 30 days.

Drinking water controls and water analyses

Over the last 20 years Bürtengraben springs were sampled periodically two to four times a year. The indicator bacteria *E. coli*, enterococci and heterotrophic plate count were measured in every sample taken. Chemical parameters (e.g. Nitrate, Chloride, UV-extinction) were in average only measured once a year. All the analysis was performed according to the Swiss drinking water regulation (11). Discharge of the three springs was measured monthly by the local authority.

In order to gain a better understanding of the transport of particles, as well as the extent and the duration of the faecal contamination of drinking water, online measurements were conducted. Turbidity and conductivity were recorded at two intervals from October 2003 to July 2004 and from February 2005 to Mai 2005. A discharge of up to a value of 260 L/min was recorded online in the reservoir inlet of the water supply. The spring overflow at the water catchment was additionally measured between January 2004 and Mai 2005. For a period of one year beginning in March 2004, the overflow of the spring was recorded using a V-notch wire with an angle of 30° according to (12). Over a period of two weeks from 14th to 28th April 2005, samples of *E. coli* and enterococci were taken every four hours with a sam-

pling device. The samples were collected daily and analysed in the laboratory according to the Swiss drinking water regulation (11).

Transport model

In order to analyse the breakthrough curves of the tracer Uranine, turbidity and microorganisms and to also calculate transport parameters, a 1D-advective-dispersive transport model according to (13) and (14) was used:

$$c(x, t) = \frac{M}{Q} \frac{x}{\sqrt{(4\pi D_L t)^3}} \exp\left(-\frac{(x-vt)^2}{4D_L t}\right) \quad (\text{eq. 1})$$

where c is the tracer concentration, M is the tracer mass at input, Q is spring discharge, x is distance from input site to spring, D_L is longitudinal dispersion coefficient, t is time and v is average tracer transport velocity.

This model is designed to analyse tracer tests in different kinds of geological settings. We suggest, that the model can also be applied in modelling transport of particles in fast flow conduits in karst systems. During fast flow the main transport components are advection and dispersion, whereas adsorption, desorption and decay have a measurable influence on transport only during slow flow.

Over the observation period, 6 main precipitation events were recorded. An event was defined as a time period in which turbidity begins to rise, reaches the peak maximum and comes back to the base level again. To generate a breakthrough curve (BTC) a minimum precipitation of 5 mm was necessary. The precipitation data were taken from a meteorological station at Gempen which is in a distance of 10 km from the catchment area of the springs. The fits of BTC were performed by nonlinear least squares regression.

Results

Discharge measurements

Measurements of discharge show seasonal variations and a strong reaction to precipitation events (Fig. 3). Whereas the monthly measurements only show long term variations, continuous measurements indicate that fast increase of discharge is induced approximately 1 to 2 days after a precipitation of 15 mm. Spring 3 is responsible for fast changes in total discharge as can be seen in the monthly measurements. Therefore, it can be assumed that the groundwater feeding this spring only has a small residence time with marginal filter capacity. On the contrary, spring 1 only shows little variation in discharge with a mean value of about 100 L/min. This spring must be fed by a long term reservoir with good filtration capacity. The values of the monthly measurements correspond very well with the continuously recorded values. However, it is impossible to gain information on the specific behaviour of spring discharge to precipitation by monthly measurements.

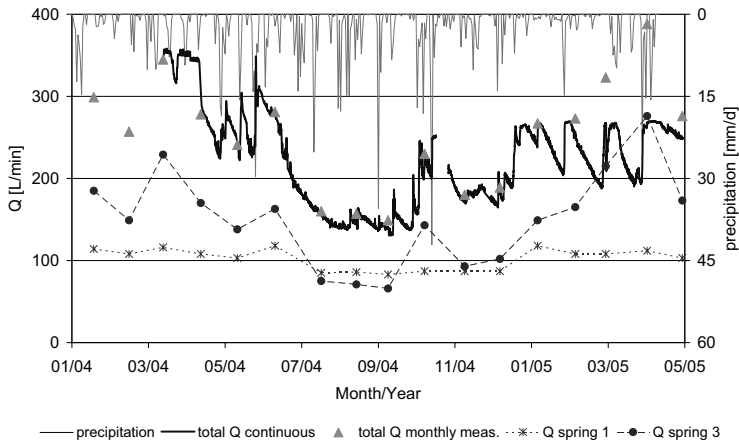


Figure 3 Measurement of discharge of spring 1, spring 3 and total discharge. The sum of monthly measurements of spring 1 (Q spring 1) and spring 3 (Q spring 3) results in total discharge (total Q monthly meas.) which corresponds well with the continuous measurements of discharge (total Q continuous)

The two springs together have a mean annual discharge of about 220 L/min. The effective precipitation (precipitation minus evapotranspiration) that feeds the groundwater is about 550 mm/a. This results in a catchment area of 0.22 km². The calculated area is much smaller than the one determined on geological information by (6). In (6) the catchment area was delineated by the dimension of the water leading formation building the aquifer. This however, leads to a too big area because also other springs and little creeks are fed by this groundwater.

The microbial water quality of karst springs is mainly influenced by the fast flow component of the system, which is in most cases fed by a small part of the catchment area. To determine this area a peak separation according to (21) was performed. The derived area is very small with a dimension of about 0.02 to 0.03 km² what corresponds to about 10 % of the whole catchment area.

Routine drinking water controls

Over a period of 20 years, 59 microbial samples and 17 to 35 chemical samples (number depending on the parameter) of total spring water were performed. During sampling, the atmospheric conditions at the moment of sampling and 1 to 4 days before sampling were noted.

Microbiological data show a low to middle fecal load of raw water of the spring. Concentrations of *E. coli* and enterococci are in a range of 0 to 50 and 0 to 111 CFU/100 mL, respectively. Due to the fact that sampling was not based on specific atmos-

pheric conditions, it is not known if fecal contamination could be much higher e.g. during storm events. However, a separation of the samples according to the noted atmospheric conditions 1 to 4 days before sampling shows significant higher microbial load after precipitation than during dry periods (Tab. 1). This effect can also be seen for some chemical parameters. However, for turbidity and electrical conductivity which are expected to clearly show a dependence on precipitation, no significant difference can be measured.

Table 1

Comparison of samples taken during dry periods and 1 to 4 days after precipitation. The t-test on a significance level of 0.05 shows that there is a significant difference for microorganisms and some chemical parameters. HPC: heterotrophic plate count, n: Number of samples

	Dry period			Wet period			t-test
	Median	Mean	n	Median	Mean	n	
El. conductivity	379	375	15	372	371	17	0.61
KMnO ₄ consumption	2.3	2.5	16	2.95	3.1	16	0.02
UV-extinction	1.640	1.665	9	2.465	2.495	8	0.03
Turbidity	0.520	0.530	7	0.67	0.79	10	0.18
Chloride	1.5	1.7	13	1.9	2.2	15	0.02
Nitrate	6.5	6.9	17	7.5	7.5	18	0.04
HPC	89	186	23	320	549	24	0.01
Enterococci	2	3	23	9	18	26	0.01
<i>E. coli</i>	1	2	23	9	13	26	0.00

The information gained from routine sampling is very general. It shows what one would expect when analyzing karst spring water and gives no indication on the flow system and reaction times of the spring.

Event-specific sampling and derivation of transport parameters

During the observation period, six precipitation events occurred resulting in a raise in turbidity. Fig. 4a shows a single input pulse by precipitation in January 2004 leading to two overlapping breakthrough curves of turbidity. During the event in June 2004 (Fig. 4b), two rainfall events followed each other closely. Only one turbidity breakthrough curve per precipitation input could be detected instead of the suggested two curves from the event in January 2004. Most probably, the second curves are hidden in the main breakthrough curves of the event.

The breakthrough curves of *E. coli* and enterococci are shown in Fig. 4c and 4d. The whole precipitation event of 6 hours led to one main peak and one minor peak. With the sampling interval of 4 hours, it was not possible to receive the beginning and the maximum concentration of the BTC. The maximum concentration measured of *E. coli* was 103 CFU/100mL and of enterococci 312 CFU/100mL. The real maximum concentrations are expected to be much higher and to occur 2 to 3 hours after the beginning of the precipitation. In addition, the microorganism peak preceded the turbidity peak in the event in April 2005.

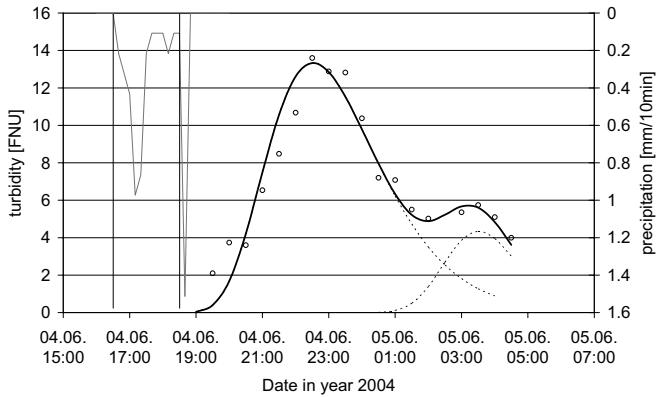
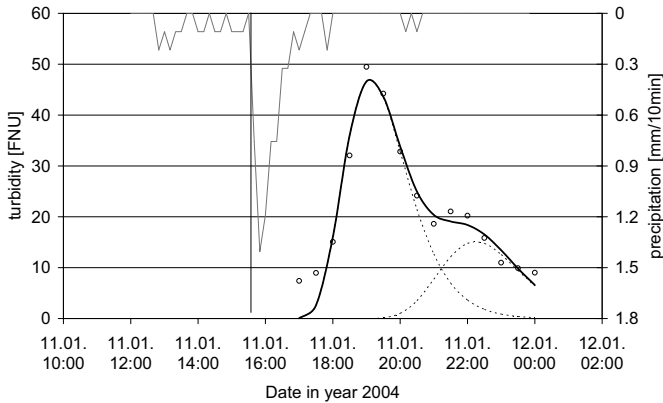


Figure 4a and 4b A single input pulse by precipitation in January 2004 leads to two overlapping break through curves (BTC) of turbidity. The precipitation event in June 2004 has two broad input pulses. This results in a BTC of turbidity with two overlapping peaks. The two second peaks of the first and second sub-precipitation event are completely hidden in the two main peaks. The initial times for fitting the data are indicated by the vertical lines, dotted lines are the single BTC, the black line is the whole fitted BTC, the circles are the measured turbidity, and the grey line is precipitation

The times for peak maximum after the beginning of the precipitation can be calculated for all the turbidity and microorganisms breakthrough curves to be in a range of 3 to 8 hours for the first peak and 7 to 14 hours for the second peak. This fast peak occurrence and the results from the previous tracer tests suggest that the raise in turbidity and microbial contamination is most probably caused by infiltrat-

ing water of the Bürtengraben creek and to a lesser extent also from the Uranine input site in the tracer test of 1998. The duration of the contamination was in a range of a half to one day depending on the duration of the precipitation event.

To test the applicability of the model (eq. 1) in our karst system, the tracer test derived in 1998 was fitted (Fig. 2). The tracer curve has a long tailing which could be caused by a second flowpath, pool like structure in the underground or matrix diffusion (15, 16, 17). Because of very few data from only one tracer test and in order to keep the model as simple as possible, the tailing was fitted to a second breakthrough curve. The calculated curve fits well with the data. The peak maximum of the tracer was measured about 24 hours after injection. This is much longer compared with the recorded BTC of turbidity and microorganisms which had a peak maximum after 3 to 8 hours. Therefore, it seems more appropriate to fit particle BTC using the information of the tracer test in 1969 which showed transport velocity of about 3 to 5 hours for a flow distance of 250 m from the input in the Bürtengraben creek to the spring. To account for the fast transport velocity of the particles, precipitation events with interruptions in precipitation were divided into two or three sub-precipitations and two or three input pulses were fitted accordingly.

As Fig. 4a to 4d show, the model fits well with the data. Table 2 gives the derived transport parameters. The transport velocities of turbidity are in a range of 16.2 to 65.0 m/h with a mean value of 31.4 ± 11.9 m/h. These values are comparable to other karst systems (2, 8, 9). Whereas the transport velocities for *E. coli* and enterococci are in the same range as for turbidity, the Uranine in the tracer test of 1998 was transported slower than the particles. This may have two reasons: first the input of Uranine was at an other location as the input of microorganisms during precipitation is and second, as a dye tracer Uranine can undergo matrix diffusion, what results in a retardation of the tracer.

The derived values of the transport velocities are only rough estimations of the real transport velocities because the input conditions with rainfall events over several hours and changing intensities are fairly different from a Dirac impulse (eq. 1). Although, the calculated transport parameters give some insight into transport behaviour of particles in our karst system.

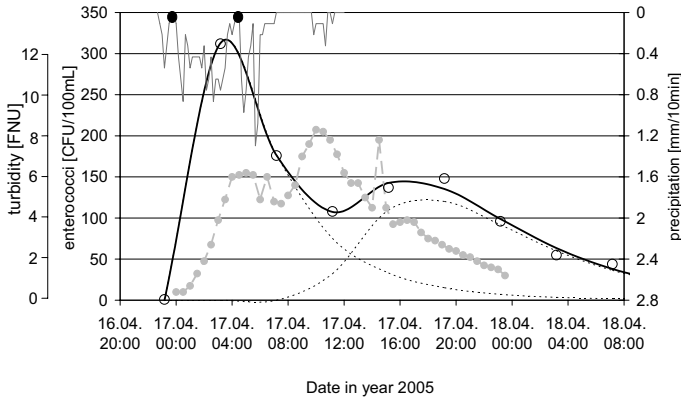
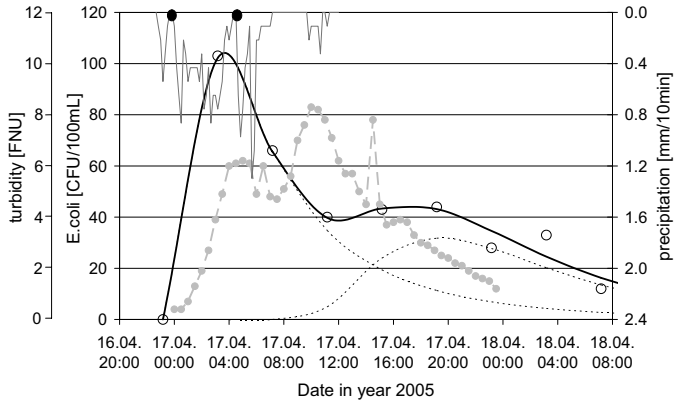


Figure 4c and 4d Break through curve (BTC) of *E. coli*, enterococci and turbidity in the event of April 2005. For each microorganism two BTC were fitted. The initial times are indicated by black points, dotted lines are the single BTC, the black line is the whole fitted BTC, the circles are the measured data, grey dotted lines with points is turbidity and the grey line is precipitation

Table 2

Transport parameters of BTCs of tracer fluorescein and particles causing turbidity and microorganisms. The input site of fluorescein is at a distance of 570 m and of the particles 250 m from the spring. No. pulse: number of input pulses caused by precipitation in one event; No. peak: number of fitted peaks for the particular pulse (e.g. for the date 11th January 2004 precipitation caused one pulse which resulted in a first and second peak of the break through curve; for the event of 17th April 2005 there were two pulses induced by precipitation what resulted in one peak for the first pulse and a first and second peak for the second pulse); M: ppb for fluorescein, FNU for turbidity, CFU/100 mL for microorganisms; Sd. standard deviation

Date	Parameter	No. pulse	No. peak	M/Q [M/m ³]	Sd. M/Q [M/m ³]	v [m/h]	Sd. v [m/h]	D _L [m ² /h]	Sd. D _L [m ² /h]
03.07.1998	fluorescein	1.	1.	9432	4030	16.6	0.9	609	122
	fluorescein	1.	2.	23852	5335	3.9	0.5	887	460
11.01.2004	turbidity	1.	1.	4.7	0.7	65.0	3.6	595	136
	turbidity	1.	2.	1.9	0.8	36.2	1.9	149	110
12.01.2004	turbidity	1.	1.	5.1	0.2	18.0	0.2	149	13
	turbidity	2.	1.	1.5	0.4	16.2	0.3	9	2
	turbidity	3.	1.	1.9	0.7	34.1	5.5	2126	1667
13.01.2004	turbidity	1.	1.	4.2	1.3	33.8	0.4	78	16
	turbidity	1.	2.	7.3	1.3	23.6	1.0	196	54
03.06.2004	turbidity	1.	1.	1.8	0.4	33.5	0.8	38	13
	turbidity	2.	1.	9.4	0.5	30.3	0.3	155	21
04.06.2004	turbidity	1.	1.	2.4	0.1	37.8	0.4	384	17
	turbidity	2.	1.	0.5	0.1	27.1	0.4	50	13
17.04.2005	turbidity	1.	1.	2.6	0.3	25.2	3.8	1631	116
	turbidity	2.	1.	0.7	0.2	40.9	1.9	327	57
	turbidity	2.	2.	1.2	0.3	18.5	0.9	337	119
	enterococci	1.	1.	97	32	34.9	14.5	2349	1650
	enterococci	2.	1.	83	29	14.1	0.6	368	133
	E. coli	1.	1.	40	27	26.5	29.4	2625	2234
	E. coli	2.	1.	24	25	12.5	2.3	330	286

Discussion

The studied karst system shows a fast and violent reaction in spring discharge, turbidity and microorganisms during precipitation events. However, only a marginal part of the catchment area is responsible for the observed contamination which is displayed mainly in spring 3. The recovery rates of the previously conducted tracer tests and the resident times calculated for the tracers, particles causing turbidity and microorganisms emphasize, that this small area of 0.02 km² must be located very close to the spring and therefore most probably is the area of Bürtengraben creek. To get further information on exact flowpath of particles and microorganisms tracer tests with particles (2) and microbial source tracking could be performed (22).

The whole catchment area of the two observed springs is about 0.22 km². This calculated area is much smaller than the one of 1.8 km² derived from the general geological considerations. Therefore, the main part of the agricultural land in the

hydrogeological catchment area derived from existing geological maps probably does not contribute to microbial contamination.

Furthermore, the transport velocity of microorganisms is faster than for particles causing turbidity. Such findings were also made for other karst systems (2, 10, 18) indicating that turbidity is not always an appropriate parameter to control a rise in concentrations of microorganisms.

The model used to calculate transport velocity is applicable not only for fluorescent tracers but also for particles. However, there are some restrictions regarding eq. 1, that must be accounted for, when interpreting results. First, the input function is meant to be a Dirac impulse what is not always true for some precipitation events. To get better model fits, only heavy short time storm events should be used for fitting or the input function should be adaptable to the input by precipitation. In general, the shorter the input pulse compared to the flow time, the closer the input conditions come to a Dirac impulse. Second, the changes in spring discharge during the precipitation should be included into the model. But this latter effect probably has a minor influence on the derived values as was already stated by (15). Third, during particle transport also sorption and desorption may play a role. However, regarding the BTCs these effects do not have a major influence on transport velocity and dispersion in our system because transport is very fast. Finally, a further restriction is the exact location of the contaminant input which is not absolutely clear from the previously performed tracer tests. Anyhow, the model fits well with the data, the derived transport parameters are clearly defined and the obtained parameter values of flow velocity and dispersion are comparable to other studies in karst systems.

Before performing tracer tests, continuous measurements of discharge, turbidity, el. conductivity, or other online measurable parameters should be performed during several precipitation events. These results give an indication of the expected output signal in tracer tests and numbers of input locations for fast particle transport (19). The temporal decomposition must be rather high to be able to differentiate changes e.g. in discharge, turbidity and electrical conductivity in order to distinguish different processes as e.g. remobilization of particles (23, 24) or direct transport from input to output (2). Further it is recommended to integrate as well the precipitation – discharge relations based on monitoring of at least one hydrological cycle. During tracer tests discharge should be measured to be able to calculate the recovery rates of the tracer mass. Furthermore, it is recommended to perform tracer tests during precipitation events because the input conditions of this tracer test correspond with the input conditions of microorganisms. Moreover, turbidity can be measured and this BTC can be compared with the BTC of the tracer.

As a conclusion and recommendation for the water supply from the above statements, the following aspects are important: 1) only spring 1 should be used for the water supply. This spring provides about 470 l/d*person compared to the needs of 332 l/d*person (20); 2) the area of Bürtengraben creek should be exclusively consid-

ered as a protection zone with tight restriction, however, for other parts of the current protection zone restrictions can be loosened; 3) a turbidimeter must be installed and the turbid water must be rejected; 4) if the capacity of the reservoir is not able to bridge the time of rejection, a filter system as a further measure for water treatment, beside the existent UV-disinfection, has to be installed.

Defining sampling strategies in the studied water supply to control raw water quality and water treatment process in a classical manner is difficult, because maximum concentrations of microorganisms and turbidity, building high risk phases, occur 2 to 5 hours after the begin of a precipitation event. Manual sampling of single samples to evaluate the water quality is therefore almost impossible. For that reason, a water management and treatment system that is able to handle high contaminations has to be installed. In order to control such a system, an automated sampling device should be arranged. The raw and treated water samples are then automatically taken when previously defined tolerance values e.g. turbidity or changes in discharge are transgressed. During one event, at least 2 to 3 samples of each spring and of the treated drinking water should be taken. After filling the sample bottles, the local authorities should automatically be informed so that they collect the bottles from the sampling device and take them to the laboratory for analysis. It is only with this kind of automated sampling that the function of water treatment during high contamination phases can be verified.

Acknowledgements

The authors would like to thank the water supply of Lauwil for technical support and two reviewers for their helpful comments.

Summary

To optimize sampling strategy in a small water supply in Northwestern Switzerland, event-specific sampling of turbidity and microorganisms was conducted. These data were compared with previously performed tracer tests and water quality data from routine drinking water sampling 1 to 4 times a year. Whereas the data from routine sampling only give information on the general behaviour of karst springs, event-specific sampling gives specific information of the karst system and residence times of microorganisms. In addition, previously conducted tracer test gave partly wrong evidence on the input locations of microorganisms. Furthermore, the present sampling strategy can not account for microbial risk. Therefore, karst systems with short response times on precipitation in the order of hours should be equipped for automatic sampling. After the transgression of defined tolerance values of e.g. turbidity, a sample device should be activated to take several samples and send a signal to the local authorities who should collect the bottles from the sampling device and take them to the laboratory for analysis.

Zusammenfassung

In einer kleinen Wasserversorgung in der Nordwestschweiz wurden zu Verbesserung der Probenahmestrategie die Trübung und die Mikroorganismen bei Niederschlagsereignissen untersucht. Ein Vergleich dieser Daten mit früher durchgeführten Tracertests, sowie den routinemässig ein- bis viermal jährlich erhobenen Trinkwasseranalysen zeigt, dass Routineuntersuchungen lediglich eine allgemeine Beschreibung des Verhaltens von Karstquellen geben können, aus den ereignisbezogenen Probenahmen jedoch spezifische Information zum Karstsystem und der Aufenthaltszeit von Mikroorganismen gewonnen werden. Frühere Tracertests führten zudem teilweise zu falschen Schlüssen zum Eintrag von Mikroorganismen ins Quellwasser. Die heutige Untersuchungsstrategie wird deshalb der Erfassung der mikrobiologischen Risiken nicht gerecht. Als Alternative ist zu empfehlen, Karstsysteme mit kurzen Ansprechzeiten auf Niederschläge automatisiert zu beproben. Nach der Überschreitung von definierten Grenzwerten beispielsweise der Trübung, sollte ein Probensampler aktiviert werden, der in definierten Zeitabständen mehrere Proben des Roh- und Trinkwassers zieht. Ein Vertreter der lokalen Wasserversorgung würde daraufhin informiert, um die Proben zu sammeln und zur Analyse ins Labor zu bringen.

Résumé

Dans le but d'améliorer les procédures de prélèvement d'échantillons par les distributeurs d'eau de petits captages de le Nord-Ouest de la Suisse, des mesures de turbidité ainsi que la teneur en microorganismes lors des périodes de précipitations sont effectuées. Une comparaison de ces données avec les résultats d'essais de traçage réalisés antérieurement permet d'obtenir des informations spécifiques sur les systèmes karstiques et sur le temps de résidence des microorganismes dans ces aquifères. Ces observations confirment que les contrôles de routine effectués sur ce type de système aquifère, réalisés entre une et quatre fois par an, ne donnent que des indications générales sur leur fonctionnement. Les essais de traçage effectués dans le passé ont partiellement conduit à de fausses estimations du taux de microorganismes des eaux de sources. Ainsi, la stratégie de contrôle actuelle qui en résulte ne permet pas d'évaluer correctement le risque microbiologique. Il est par conséquent recommandé d'automatiser la prise d'échantillons au niveau des captages d'eau potable pour des systèmes karstiques très sensibles aux précipitations. Si les valeurs limites, notamment fixées pour la turbidité, sont dépassées, il serait alors nécessaire d'installer des préleveurs automatiques asservis à la turbidité et capables de prélever plusieurs échantillons d'eau brute et d'eau traitée. Le responsable locale de la distribution d'eau serait en charge de collecter les échantillons et de les transmettre à un laboratoire d'analyses.

Key words

karst, drinking water, microorganisms, sampling strategy, tracer

References

- 1 *Jeannin P.Y.*: Comportement hydraulique mutuel des volumes de roche peu perméable et des conduits karstiques: conséquences sur l'étude des aquifères karstiques. *Bulletin d'Hydrogéologie*, **14**, 113–148, (1995)
- 2 *Auckenthaler A., Raso G. and Huggenberger P.*: Particle transport in a karst aquifer: Natural and artificial tracer experiments with bacteria, bacteriophages and microspheres. *Wat. Sci. Techn.*, **46**, 3, 131–138, (2002)
- 3 *SVGW. Schweizerischer Verein des Gas- und Wasserfaches*: Richtlinien für die Überwachung der Trinkwasserversorgungen in hygienischer Sicht. W1, 48 pp., (1997)
- 4 *Auckenthaler A. und Huggenberger P.*: Pathogene Mikroorganismen im Grund- und Trinkwasser. Birkhäuser Verlag Basel Boston Berlin, 184 pp., (2003)
- 5 *Auckenthaler A.*: Transport von Mikroorganismen in einem Karstaquifer am Beispiel der Lützelquelle. PhD Geological Institute University Basel, **33**, pp. 132, (2004)
- 6 *Vögtli B. und Noher H.P.*: Gemeinde Lauwil Bürtengrabenquellen Schutzzonenausscheidung Bericht. Geotechnisches Institut, p.10, (1998)
- 7 *Buxtorf A., Christ P. und Elber R.*: Geologischer Atlas der Schweiz 1:25000, Blätter Laufen, Erschwil, Bretzwil, Mümliswil. Geologische Kommission Schweiz. Naturforsch. Gesellschaft, (1936)
- 8 *Rossi P., Doerflinger N., Kennedy K., Müller I. and Aragno M.*: Bacteriophages as surface and groundwater tracers. *Hydrology and Earth Systems Sciences* **2**(1), 101–110, (1998)
- 9 *Käss W., Schaber J. und Schloz W.*: Eine kombinierte Karstgrundwassermarkierung mit Uranin und Mikrokügelchen zwischen Geislingen-Waldhausen und Eybach. *Laichinger Höhlenfreund*, 61–70, (1994)
- 10 *Doerflinger N.*: Advances in karst groundwater protection strategy using artificial tracer tests analysis and multiattribute vulnerability mapping (EPIK method). Diss. Uni Neuchâtel, pp. 308, (1996)
- 11 *SLMB, Schweizerisches Lebensmittelbuch*: Kap. 56., (1987)
- 12 *Grant D.M. and Dawson B.D.*: ISCO open channel flow measurement handbook. 5th edn, Isco, 501 pp., (1997)
- 13 *Schudel B., Biaggi D., Dervey T., Kozel R., Müller I., Ross J.H. und Schindler U.*: Einsatz künstlicher Tracer in der Hydrogeologie, Praxishilfe. Berichte BWG, Serie Geologie, Nr. 3 – Bern, p. 75, (2002)
- 14 *Kreft A. and Zuber A.*: On the physical meaning of dispersion equation and its solution for different initial boundary conditions. *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 1471–1480, (1978)
- 15 *Werner A.*: Hydraulische Charakterisierung von Karstsystemen mit künstlichen 4 Tracern. *Schr. Angew. Geol. Karlsruhe*, 169 pp., (1998)
- 16 *Maloszewski P. and Zuber A.*: On the theory of tracer experiments in fissured rocks with a porous matrix. *J. Hydrol.*, **79**, 333–358, (1985)
- 17 *Hauns M.*: Modeling tracer and particle transport under turbulent flow conditions in karst conduit structures. *Freiburger Schriften Hydrologie*, Band 12, p. 78, (2002)
- 18 *McKay L.D., Sanford W.E. and Strong J.M.*: Field-scale migration of colloidal tracers in fractured shals saprolite. *Ground Water*, **38** (1), 139–147, (2000)
- 19 *Auckenthaler A.*: Mikrobiologische Trinkwasserüberwachung – Am Beispiel der Nordwestschweiz. *gwa*, 829–836, (2003)
- 20 *Amt für Umweltschutz und Energie Baselland*: Wasserstatistik, (2004)
- 21 *Dyck S. und Peschke G.*: Grundlagen der Hydrologie. Verlag für Bauwesen, Berlin, p. 536, (1995)
- 22 *Blanch A.R., Belanche-Munoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer Ch., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kühn I., Moce L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skraber S., Papageorgiou G.T., Taylor H., Wallis J. and Jofre J.*: Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking. *Applied Environm. Microbiol.*, **72**(9), 5915–5926, (2006)

- 23 *Pronk M., Goldscheider N. and Zopfi J.: Dynamics and interactions of organic carbon, turbidity and bacteria in a karst aquifer system. Hydrogeology Journal, 14, 473–484, (2006)*
- 24 *Massei N., Wang H.Q., Dupont J.P., Rodet J. and Laignel B.: Assessment of direct transfer and resuspension of particles during turbid floods at a karstic spring. J. Hydrology, 275:109–121 (2003)*

Korrespondenzadresse: Dr. Adrian Auckenthaler, Bundesamt für Gesundheit,
Abteilung Lebensmittelsicherheit, 3003 Bern,
e-mail: adrian.auckenthaler@bag.admin.ch

SGLUC SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL- UND UMWELTCHEMIE
SSCAE SOCIETE SUISSE DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENTALE
SSCAA SOCIETA SVIZZERA DI CHIMICA ALIMENTARE ED AMBIENTALE

Die Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltchemie (SGLUC) ist eine multidisziplinäre Vereinigung und steht allen Personen offen, die sich durch eine Ausbildung an einer universitären Hochschule, an einer Fachhochschule oder durch berufliche Tätigkeit Kompetenz in Belangen der Lebensmittel- oder Umweltchemie im weitesten Sinne erworben haben.

Die Mitglieder der SGLUC sind in verschiedenen Bereichen der Lebensmittel- und Umweltchemie sowie in angrenzenden Disziplinen, z.B. in der Lebensmitteltechnologie, der Ernährungswissenschaft oder der Lebensmittelsicherheit, bzw. in den Umweltwissenschaften tätig. Im Allgemeinen sind die Mitglieder der SGLUC primär an analytischen Problemstellungen interessiert. Zurzeit zählt die SGLUC etwa 400 Mitglieder.

Die SGLUC fördert die analytische und angewandte Chemie, besonders die Lebensmittelchemie, Agrikulturchemie sowie verwandte Gebiete. Sie fördert die Weiterbildung und den Kontakt ihrer Mitglieder durch Veranstaltung von Fachtagungen, Symposien, Workshops und Exkursionen. Bei Bedarf unterstützt sie Bestrebungen zum Ausbau und zur Vereinheitlichung von Untersuchungsmethoden und Beurteilungsgrundsätzen im Bereich der Kontrolle von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen.

Die SGLUC pflegt regen Kontakt mit benachbarten Fachgesellschaften im In- und Ausland sowie den entsprechenden Ausbildungsinstituten aller Ebenen.

Der Mitgliederbeitrag beträgt für Einzelmitglieder Fr. 45.– (50.– bei Adressaten ausserhalb der Schweiz) und für Kollektivmitglieder Fr. 100.–.

Die «Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene» sind als offizielles Publikationsorgan der Gesellschaft im Mitgliederbeitrag inbegriffen.

Weitere Informationen zu den Aktivitäten und Zielen der SGLUC sind auf der Homepage unter www.sgluc.ch zu finden.

Werden auch Sie Mitglied der SGLUC!

Anmeldung direkt auf unserer Homepage www.sgluc.ch oder wenden Sie sich an den Sekretär der SGLUC, Dr. Michael Beer, Bundesamt für Gesundheit, Abt. Lebensmittelwissenschaft, 3003 Bern, E-Mail: michael.beer@bag.admin.ch

SGLUC SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL- UND UMWELTCHEMIE
SSCAE SOCIETE SUISSE DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENTALE
SSCAA SOCIETA SVIZZERA DI CHIMICA ALIMENTARE ED AMBIENTALE

La SSCAE est une société pluridisciplinaire qui est ouverte à toute personne qui a acquis, soit par une formation universitaire ou d'une haute école spécialisée, soit par l'expérience professionnelle, des connaissances dans les domaines, au sens large, de la chimie alimentaire ou environnementale.

Les membres de la société sont actifs dans le domaine de la chimie alimentaire et de la chimie environnementale ainsi que dans les disciplines apparentées, comme les sciences de l'alimentation, la technologie alimentaire ou la sécurité alimentaire. En règle générale les membres sont intéressés par les problèmes analytiques au sens large. La société compte actuellement environ 400 membres.

La SSCAE encourage la chimie analytique et appliquée, en particulier la chimie des denrées alimentaires, la chimie agricole et les domaines apparentés. La SSCAE encourage la formation continue et les contacts entre ses membres. Elle organise des journées scientifiques, des séminaires, des workshops et des excursions. Au besoin elle encourage les efforts entrepris pour améliorer et développer les méthodes d'investigation et pour établir des critères d'appréciation dans le domaine du contrôle des denrées alimentaires et des objets usuels.

La SSCAE entretient des contacts étroits avec les sociétés sœurs au niveau national et international ainsi qu'avec les centres de recherche et d'enseignements spécialisés.

La cotisation annuelle s'élève à 45 FS pour les membres individuels (50 FS lors d'envoi à l'étranger) et à 100 FS pour les membres collectifs.

Les «Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène» sont l'organe de publication officiel de la Société; l'abonnement est inclus dans la cotisation des membres.

D'autres informations sur les activités et les buts de la SSCAE se trouvent sur notre site Internet à l'adresse www.sgluc.ch.

Devenez membre de la société !

Vous pouvez vous inscrire directement sur notre site Internet www.sgluc.ch ou en vous annonçant au secrétaire de la SSCAE, le Dr Michael Beer, Office fédéral de la santé publique, Division Science des aliments, 3003 Berne, e-mail: michael.beer@bag.admin.ch

Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH)

Die Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH) hat sich im Interesse der öffentlichen Gesundheit die Förderung einer hygienisch sicheren Ernährung, die Bearbeitung fachspezifischer Anliegen der Lebensmittelhygiene sowie den Erfahrungsaustausch unter den Mitgliedern zur Aufgabe gemacht.

Diese Ziele sucht die SGLH mit der Durchführung von jährlichen Arbeitstagen, praktisch orientierten Fachkursen, Fachvorträgen und Workshops zu erreichen. Sie schafft und fördert Arbeitsgruppen zur Behandlung aktueller Probleme der Lebensmittelhygiene und unterstützt aktiv das Ausarbeiten von Vorschlägen für Normen und Beurteilungskriterien mikrobiologischer Untersuchungen. Diese Ziele möchte die SGLH in enger Zusammenarbeit mit anderen Fachgruppierungen, Behörden, Lehranstalten und weiteren Interessenvertretern der Lebensmittelsicherheit realisieren.

Den Veranstaltungen sind jeweils Themen aus dem Bereich der Lebensmittelhygiene gewidmet, vor allem Fragen der hygienischen Behandlung von Lebensmitteln, der modernen mikrobiologischen Diagnostik und der Bekämpfung von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen. Das Verständnis aktueller Forschungsergebnisse und deren Umsetzung in die Praxis soll generell gefördert werden.

Die SGLH zählt 560 Mitglieder. Zu ihnen gehören insbesondere Vertreter der gewerblichen und industriellen Lebensmittelproduktion, Mitglieder schulischer Einrichtungen sowie Mitarbeiter der Überwachungsbehörden.

Der Mitgliederbeitrag beträgt Fr. 50.– für Einzelmitglieder und Fr. 200.– für Kollektivmitglieder.

Die «Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene» sind das offizielle Publikationsorgan der SGLH. Der Preis für das Abonnement ist im Mitgliederbeitrag inbegriffen.

Weitere Informationen zu Leitbild und Schwerpunkten der SGLH-Aktivitäten sind auf der Homepage unter www.sglh.ch zu finden.

Werden auch Sie Mitglied der SGLH!

Anmeldung direkt via Internet mit dem Formular auf der Homepage www.sglh.ch.

Roger Stephan, Präsident der SGLH, Postfach 9066, 8050 Zürich,
E-Mail: stephanr@fsafety.uzh.ch

Société suisse d'hygiène des denrées alimentaires (SSHDA)

La société suisse d'hygiène des denrées alimentaires (SSHDA) œuvre dans l'intérêt de la santé publique par la promotion de la sûreté hygiénique des aliments, en informant sur les questions actuelles liées à l'hygiène des denrées alimentaires et en favorisant les échanges d'expérience entre ses membres.

La SSHDA assure la poursuite de ces buts par des journées de travail, des cours techniques orientés vers la pratique, des conférences spécialisées et des workshops. Elle crée et encourage la mise sur pied de groupes de travail consacrés à l'analyse des problèmes actuels et soutient activement l'élaboration de propositions de normes et de critères d'appréciation pour les analyses microbiologiques alimentaires. La SSHDA veut réaliser ces buts en étroite collaboration avec d'autres associations, les instances officielles, les universités, les écoles supérieures et d'autres personnes ou institutions œuvrant dans le domaine de la sûreté alimentaire.

Les activités de la société sont consacrées à des thèmes d'actualité liées à l'hygiène des denrées alimentaires, avant tout dans les domaines du traitement hygiénique des denrées alimentaires, des méthodes modernes de diagnostic microbologique et de la lutte contre les intoxications et infections d'origine alimentaire. La compréhension des résultats de recherche actuels et leur application dans la pratique doivent être encouragées d'une manière générale.

La SSHDA compte 560 membres. Parmi eux se trouvent en particulier des représentants de l'industrie alimentaire et de la production alimentaire artisanale, des membres d'institutions de formation professionnelle, ainsi que de nombreux collaborateurs des instances officielles de surveillance.

La cotisation annuelle s'élève à Fr. 50.– pour les membres individuels et à Fr. 200.– pour les membres collectifs.

Les «Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène» constituent l'organe de publication officiel de la SSHDA. Le prix de l'abonnement est compris dans le montant de la cotisation.

Des informations concernant la vision directrice et les centres d'intérêt de la SSHDA se trouvent sur Internet à l'adresse www.sglh.ch.

Devenez vous aussi membre de la SSHDA!

Inscription en qualité de membre de la SSHDA directement par Internet sur le site www.sglh.ch.

Roger Stephan, président de la SSHDA, Postfach 9066, 8050 Zürich,
e-mail: stephanr@fsafety.uzh.ch

