

## 8 Zusammenfassung / Summary

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen als Konservierungsverfahren ist weltweit unterschiedlich geregelt. Zur Angleichung der Rechtsvorschriften in der EU wurde eine Richtlinie über die mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile verabschiedet, die seit September 2001 anwendbar ist. Diese Richtlinie erlaubt nur die Bestrahlung von aromatischen Kräutern und Gewürzen. Über eine Erweiterung der Positivliste um z.B. Garnelen, Froschschenkel oder Eiklar wird zur Zeit diskutiert. Bisher ist dies jedoch aufgrund fehlender validierter Analyseverfahren für die proteinreichen und zugleich fettarmen Lebensmittel nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von Aminosäure-Radiolyseprodukten entwickelt. Insbesondere die aromatischen Aminosäuren TRP, TYR und PHE reagieren empfindlich auf  $\gamma$ -Bestrahlung.

Bei der Bestrahlung wässriger TRP-Lösungen wurden OH-TRP-Isomere als Radiolyseprodukte identifiziert. Aufgrund der hohen Gehalte an freiem TRP in Nordseegarnelen sollte daher ein Bestrahlungsnachweis über die OH-TRP-Isomere mittels einer Aufarbeitung ohne Hydrolyse möglich sein. Die zu erwartenden Gehalte an OH-TRP-Isomeren wurden über den TRP-Verlust in den Nordseegarnelen bei Bestrahlung und die Bildungsraten in den bestrahlten wässrigen TRP-Lösungen abgeschätzt. Zur Isolierung der OH-TRP-Isomere wurde nach Proteinfällung mit Essigsäure eine zweistufige SPE an einer C18-Phase mit nachfolgendem Kationenaustausch an einer PRS-Phase durchgeführt. Durch diese Aufarbeitung gelang eine vollständige Abtrennung von Störsubstanzen. Die Analyse erfolgte mittels HPLC und EC-Detektion. Mit dem entwickelten Verfahren wurden Wiederfindungsraten von 75% für 6- und 7-OH-TRP und 57% für 4-OH-TRP erreicht. Die Anwendung der Methode auf mit 1, 3 und 5 kGy bestrahlte Nordseegarnelen zeigte jedoch, dass nur 5-OH-TRP bei der Bestrahlung gebildet wird. Die Gehalte stiegen bis zu einer Dosis von 3 kGy an und nahmen bei 5 kGy wieder ab. Anhand von Modellversuchen mit einer bestrahlten Aminosäure-Lösung, deren Zusammensetzung ungefähr den Gehalten an freien Aminosäuren in den Nordseegarnelen

entsprach, konnte festgestellt werden, dass die Bildung von 4-, 6- und 7-OH-TRP durch den hohen Überschuss an anderen Aminosäuren unterdrückt wird. Die nicht-physiologischen OH-TRP-Isomere aus dem frei vorkommenden TRP sind damit als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen nicht geeignet.

Um weitere potenzielle Bestrahlungsmarker zu identifizieren, wurde ein Screening auf polare Radiolyseprodukte mittels HPLC und UV-, FL- und EC-Detektion durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Garnelenarten (Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps, Tiefsee Shrimps), Hühnerfleisch und Eiklar untersucht. Ohne Probenanreicherung ließen sich nur die in konservierten Nordseegarnelen bei Bestrahlung entstehenden Radiolyseprodukte der Benzoesäure nachweisen. Nach Anreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether konnten 3- und 4-OH-BA mittels HPLC-MS identifiziert werden. Der Nachweis von Phenol gelang nach Anreicherung durch Vakuumdestillation mittels GC-MS. Die Quantifizierung mittels HPLC-ECD zeigte, dass die Gehalte an BA-Radiolyseprodukten in den bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen um den Faktor 10 höher sind als in den gefroren bestrahlten Proben. Signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben konnten bei Raumtemperatur ab einer Dosis von 1 kGy, bei den gefroren bestrahlten Proben ab einer Dosis von 3 kGy festgestellt werden. Damit kann mit dieser Methode ein nicht erlaubter Einsatz von Benzoesäure in Verbindung mit einer nachfolgenden Bestrahlung der Nordseegarnelen nachgewiesen werden.

Nach Probenanreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether um den Faktor 50 konnte HPPA, das Desaminierungsprodukt von TYR, in allen untersuchten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Die Identifizierung gelang anhand von bestrahlten und mit dem Fenton-System behandelten Aminosäurelösungen mittels HPLC-MS. Die Quantifizierung mittels HPLC-FL/MS zeigte, dass die HPPA-Gehalte unabhängig von der Bestrahlungstemperatur sind. Sie betragen 2 - 20 µg/kg in den mit 1 - 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch. Obwohl in allen Proben geringe Blindwerte gemessen werden konnten, waren signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben ab einer Dosis von 1 kGy feststellbar. In den bestrahlten Tiefsee Shrimps und im Eiklar waren die HPPA-Gehalte (2 - 5 µg/kg) geringer, wodurch sich signifikante Unterschiede erst bei höheren Bestrahlungsdosen ergaben.

HPPA eignet sich als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch. Um die HPPA-Methode als Routineverfahren einsetzen zu können, müssen die Blindwerte in unbestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln und der Einfluss der Bestrahlungsbedingungen näher untersucht werden.

Abschließend wurden sensorische und physikalische Untersuchungen an bestrahlten Nordseegarnelen durchgeführt, um Erkenntnisse über die Verbraucherakzeptanz dieser Produkte zu erhalten. Es wurde ein erweiterter Triangeltest mit einem ungeschulten Sensorik-Panel durchgeführt. Hiermit sollte untersucht werden, ob sensorische Unterschiede zwischen den im gefrorenen Zustand bestrahlten Garnelen und unbestrahlten Kontroll-Proben von einem Verbraucher festgestellt werden.

In dem Verbrauchertest (Erweiterter Dreieckstest mit einem ungeschulten Panel) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den im gefrorenen Zustand bestrahlten Garnelen und den unbestrahlten Proben ab einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy festgestellt werden. Eine signifikante Bevorzugung der unbestrahlten Garnelen war erst bei einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy festzustellen. Des Weiteren wurde mit einem geschulten Sensorik-Panel eine Profilprüfung hinsichtlich Aussehen/Farbe, Geruch, Geschmack und Textur der  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen durchgeführt. Es zeigte sich, dass schon ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy bei den gefroren bestrahlten Garnelen deutliche Flavour-Veränderungen auftreten. Der typische Garnelengeruch und -geschmack nach Algen/Meer nahm deutlich ab, während eine Zunahme von vor allem pilzigen, käsigen, kartoffelartigen und muffig/modrigen Geruchs- und Geschmackseindrücken zu verzeichnen war. Bei hohen Bestrahlungsdosen zeigten sich zusätzlich Farb- und Texturveränderungen. Die physikalische Farbmessung zeigte eine signifikante lineare Abnahme des Rotwertes in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, während sich der Gelbwert durch die Bestrahlung nicht veränderte. Die instrumentelle TPA lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Tendenziell ließ sich eine Zunahme der Scherkraft und Kohäsion bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy feststellen. Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch bei gefroren bestrahlten Nordseegarnelen schon bei geringen Bestrahlungsdosen deutliche sensorische Veränderungen auftreten, die die Verbraucherakzeptanz negativ beeinflussen können.

## 8 Summary

Legislation on irradiation treatment of foodstuffs varies throughout the world. To assimilate legislation in the EU European commission ratified the directive 1999/2/EG on irradiation of food and food ingredients which became applicable in September 2001. It includes the permission to irradiate herbs and spices to a maximum dose of 10 kGy. Clearance for further foodstuff to be treated by  $\gamma$ -irradiation like shrimps, frog legs, or egg white is currently discussed. The lack of reliable analytical methods for determination irradiation treatment of these protein-rich, low-fat products prohibits the extension of the positive list at the moment.

This work presents different methods for determination of amino acid radiation products, especially for the aromatic amino acids TRP, TYR, and PHE which are very sensitive to irradiation treatment.

OH-TRP-isomers were identified in irradiated TRP-solutions. Because of the high free TRP content in brown shrimps (*crangon crangon*), OH-TRP isomers were supposed to be formed in detectable amounts for the use as irradiation markers. Analysis of unbound radiation products made it possible to leave out the enzymatic pre-treatment. Expected amounts of OH-TRP-isomers were approximated from experimental determination of TRP loss and OH-TRP-isomers conversion rates in irradiated TRP-solutions. For isolation of OH-TRP-isomers from irradiated brown shrimps proteins were precipitated by addition of acetic acid. SPE-clean-up was performed on a C18-cartridge followed by cation-exchange on a PRS-cartridge in order to remove other matrix components. Analysis was done using RP-HPLC with EC-detection. Recovery rates were 75% for 6- and 7-OH-TRP and 57% for 4-OH-TRP. Application of the method for brown shrimps irradiated with doses of 1, 3 and 5 kGy showed that 5-OH-TRP was the only OH-TRP-isomer formed in irradiated samples. Contents raised up to an irradiation dose of 3 kGy followed by decrease at a dose of 5 kGy. Experiments using irradiated amino acid solutions as model systems, in which the amino acid composition was similar to the composition in brown shrimps, showed totally suppression of the formation of 4-, 6- and 7-OH-TRP by excess of other amino acids. Therefore, non-physiological OH-TRP-isomers

formed from free TRP represent no appropriate markers for the determination of irradiation treatment of protein-rich, low-fat foodstuff.

For identification of other marker compounds irradiated samples were screened for polar radiation products by HPLC analysis with UV-, FL- and EC-detection. Three different shrimps (brown shrimps, black tiger shrimps, deep sea shrimps), chicken meat and egg white were analysed. Without further sample concentration it was only possible to detect radiation products of benzoic acid in preserved brown shrimps. 3- and 4-OH-BA could be identified by HPLC-MS after sample concentration by liquid-liquid-extraction with diethylether. Identification of phenol was done by GC-MS after sample enrichment by vacuum distillation. Quantitation by HPLC-ECD showed that the contents of BA radiation products were significantly higher (10fold) in samples irradiated at room temperature. Significant differences to unirradiated samples were obtained for samples irradiated at room temperature from doses of 1 kGy, for irradiated frozen samples from 3 kGy. This method is applicable for determination illicit chemical preservation in combination with subsequent irradiation treatment of brown shrimps.

After sample enrichment by liquid-liquid-extraction by a factor of 50 HPPA, the deamination product of TYR, was detectable in all samples. Identification was done by HPLC-MS analysis of irradiated amino acid solutions in comparison with amino acid solutions treated with FENTON's reagent. Quantitation by HPLC-MS/FL showed that HPPA increased linearly with dose and was independent from irradiation temperature. Samples contained 2 - 20 µg/kg in brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat irradiated with doses of 1 - 10 kGy. Minor blind values of HPPA were detected in all unirradiated samples. Nevertheless, significant differences between irradiated and non-irradiated samples were obtained for doses from 1 kGy. HPPA contents of deep sea shrimps and egg white were much lower (2 - 5 µg/kg), hence significant differences were only obtained for higher irradiation doses.

HPPA represents an appropriate marker for the detection of irradiated brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat. In order to use the HPPA-method for routine analysis further investigations have to be done on the origin of the HPPA contents in unirradiated protein-rich foodstuffs and on the influence of the irradiation conditions.

In addition, sensory and physical properties of irradiated brown shrimps were investigated to evaluate occurring changes and consumer's acceptance for irradiated foodstuffs. An extended triangle test with an untrained panel was used to evaluate consumer's acceptability for irradiated foods. Aim of this study was to show if it is possible for the consumer to discriminate between irradiated and unirradiated brown shrimps. Panellists were able to detect a significant difference between these samples from a irradiation dose of 5 kGy. Significant preferences of unirradiated samples were obtained at a dose of 10 kGy.

Profile test was used to evaluate changes in colour, smell, taste and texture of irradiated brown shrimps with increasing irradiation doses. From an irradiation dose of 3 kGy flavour changes were noticeable. The typical smell and taste of unirradiated brown shrimps decreased, and cheesy, musty, mushroom-, and potato-like off-flavours occurred. At high irradiation doses changes of colour and texture also increased. Physical colour measurement showed a significant linear decrease of the red value with increasing irradiation dose. No changes of the yellow value could be observed. Instrumental TPA showed no significant results. Shear force and cohesion increased slightly up to an irradiation dose of 5 kGy.

It can be concluded that even low-dose irradiation of frozen brown shrimps leads to changes in sensory quality that might have a negative impact on consumer's acceptability for irradiated foodstuffs.