

Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, CH-3097 Liebefeld-Bern (Schweiz)
(Direktion: Prof. Dr. B. Blanc)

Zur Frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Käsefabrikation verwendeten Schimmelpilzkulturen

R. Sieber

Mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 18. Februar 1978)

1. Einleitung

Unter den ubiquitär vorkommenden Schimmelpilzen bilden eine prozentual geringe Zahl von Arten toxische Stoffwechselprodukte (45). Bis heute sind eine etliche Anzahl verschiedener Toxine, nach ihrer Herkunft als Mykotoxine bezeichnet, nachgewiesen, und ihre Identifizierung zeigte eine große Vielfalt in deren chemischer Struktur auf (2, 4, 29) (Tab. 1). Die einzelnen Mykotoxine können bei Säugetieren als Karzinogene, Hepato-, Nephro- oder Neurotoxine sowie hämatomfördernd oder östrogen wirken. So sind bereits verschiedene Mykotoxikosen bei Mensch und Tier beschrieben worden (2). Unter den Mykotoxinen haben die Aflatoxine die stärkste Bedeutung erlangt, da ihre akute Toxizität mit der von Strychnin zu vergleichen ist und sie zu den stärksten oral wirkenden, bisher bekannten Karzinogenen zu rechnen sind. Gebildet werden sie vor allem von *Aspergillus flavus* LINK ex FRIES und *Aspergillus parasiticus* SPEARE und deren Varietäten (11).

In der Milchwirtschaft sind Pilze und Hefen weit verbreitet, teils erwünscht als Reifungsflora auf der Oberfläche oder im Innern von Käsen, teils unerwünscht als Infektionsflora (30). Edelpilzkäse, Weichkäse und Sauermilchkäse mit Schimmelbildung zählen zu jenen Käsen, bei denen bestimmte Pilzarten während der Reifung auf Aussehen, Geruch und Geschmack einen maßgeblichen Einfluß ausüben. An Pilzen, die zur Herstellung von Käsen verwendet werden, sind zu nennen:

- *Penicillium* (P.) *caseicolum*, *P. camemberti*, *P. candidum* bei der Herstellung von Weißschimmelkäsen wie Camembert und Brie sowie Sauermilchkäsen mit Schimmelbildung und anderen wie Ziegenkäse und Neufchâtel;
- *Penicillium roqueforti* bei Käsen mit blaugrünem Innenschimmel, z. B. bei Roquefort, Fromage bleu, Blue cheese, Edelpilzkäsen; bei Gorgonzola (*P. gorgonzola*) und Stilton werden eng verwandte Arten eingesetzt.

Im folgenden soll nun anhand der Literatur untersucht werden, ob unter diesen zur Käsefabrikation benutzten Schimmelpilzen Mykotoxinbildner vorhanden sein können und welche Risiken sie für die menschliche Gesundheit darstellen.

Tab. 1. Einige Mykotoxine und mykotoxinbildende Pilzarten.

Toxingruppen	Toxine	Pilzarten
Alkaloide	Lysergsäurederivate Clavinalkaloide	<i>Claviceps purpurea</i> ; <i>Cl. fusiformis</i> ; <i>Cl. paspali</i>
Anthrachinone	Islandicin Luteoskyrin Rugulosin	<i>Penicillium islandicum</i> ; <i>P. rugulosum</i>
Butenolide	Patulin	<i>P. patulinum</i> ; <i>P. expansum</i> ; <i>P. urticae</i> ; <i>Aspergillus clavatus</i>
Cumarin (substituiert)	Aflatoxine $B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2$ Ochratoxin A Sterigmatocystin	<i>A. flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i> <i>P. viridicatum</i> ; <i>A. ochraceus</i> <i>A. versicolor</i> ; <i>A. nidulans</i>
Cyclopeptide	Islanditoxin	<i>P. islandicum</i>
Nonadride	Rubratoxin B	<i>P. rubrum</i> ; <i>P. purpurogenum</i>
Phenolische Makrolide	Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> ; <i>F. culmorum</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>F. fricinetum</i>
Piperazine	Sporidesmin	<i>Pithomyces chartarum</i>
Pyrone und Pyrane	Citrinin Citreo-iridin	<i>P. viridicatum</i> ; <i>P. citrinum</i> <i>P. citreo-viride</i>
Terpenverbindungen (Scirpene) (Trichothecene)	T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Fusarenon, Nivalenol Roridin, Verrucaridin Satratoxin	<i>F. tricinatum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. nivale</i> <i>Myrothecium roridum</i> , <i>M. verrucaria</i> <i>Stachybotrys atra</i>
Steroide	Sporofusarin Poafusarin	<i>F. tricinatum</i> <i>F. poae</i> , <i>F. lateritium</i>

2. Das PR-Toxin

Penicillium roqueforti wird schon seit langem als Reifungskultur für verschiedene Blauschimmelkäsespezialitäten verwendet. *P. roqueforti* kommt jedoch auch auf verschiedenen Nahrungsmitteln vor; so wurde er in Fetten, verschiedenen Käsesorten, Brot, Fruchtsäften, Beeren, Trauben, Marmelade und Konfitüren (46), auf Reis (51, 52), in Schinken und Rohwurst (26), auf ungarischer Salami (19), auf rumänischer Dauerwurst (38), aber auch in fermentierter Silage (50) nachgewiesen.

Aus Reismehl wurden zwei Stämme von *R. roqueforti* (Stamm-Nummern MR 212-2 und 219-2) isoliert, die nach subkutaner Injektion des Kulturfiltrats und des methanolischen Extrakts des festen Substrats bei Mäusen eine schwache Toxizität aufwiesen (18, 24). Der Stamm MR 212-2 wurde auf einem flüssigen Czapek-Medium bebrütet und aus dem Kulturfiltrat mit Aktivkohle, Acetonitril und Flüssigkeitschromatographie drei

Substanzen extrahiert, die nach intraperitonealer Injektion an Mäusen toxisch wirkten (20):

- ein erstes Toxin mit der Formel $C_7H_{11}O_7$ oder $C_7H_{12}O_7$ besaß eine Laktolfunktion und war von relativ schwacher Toxizität,
- das zweite Toxin erzeugte starke Veränderungen der Leber und Hämorrhagien im Verdauungskanal, und
- das dritte war ebenfalls wieder von schwacher Toxizität.

Bereits 1956 wurden einige fatale Intoxikationen beim Vieh dem Entstehen von *P. roqueforti* auf Körnersilage zugeschrieben (50), und auch Still et al. (48) isolierten diesen Pilz von Körnern und Silage, die für Aborte bei den Kühen verantwortlich gemacht wurden, und extrahierten aus der Reinkultur ein Toxin; jedoch zeigte ein *P. roqueforti*-Stamm, der gewöhnlich für die Roquefort-Herstellung verwendet wird, keine toxische Wirkung. Extrakte von Reinkulturen von *P. roqueforti*, isoliert aus toxischen Futterproben, und von *P. roqueforti* NRR 849 zeigten bei oraler oder intraperitonealer Verabreichung an Ratten eine letale Wirkung, wobei die mittleren letalen Mengen 115 bzw. 11 ppm betrugen (53). Eine partielle Charakterisierung der kristallinen Komponenten ergab die Formel $C_{17}H_{20}O_6$. Verschiedene chemische Umsetzungen zeigten, daß drei C-Methylsubstituenten, eine Acetoxy-, eine Aldehyd- und eine α , β -ungesättigte Ketongruppe sowie zwei Sauerstoffatome entweder in der Epoxid- oder Ätherform vorhanden waren. Dieses Mykotoxin wurde als PR-Toxin bezeichnet und seine Struktur durch Derivatbildung mit Hilfe spektroskopischer Methoden durch Wei et al. (54) ermittelt und durch Moreau et al. (32) bestätigt; es handelt sich dabei um ein Sesquiterpen (Abb. 1). Die LD_{50} beträgt bei intraperitonealer Applikation für Ratten und Mäuse ungefähr 7 mg/kg (34). Dieses Toxin beeinträchtigt den Stoffwechsel in der Leber, indem es die RNA- und Protein-Synthese inhibiert (34–36).

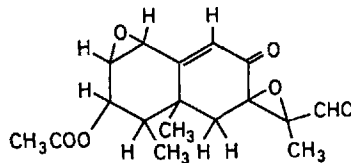


Abb. 1. Struktur des PR-Toxins, $C_{17}H_{20}O_6$.

Sporen aus einem *P. roqueforti*-Stamm, der bei der Reifung von verschiedenen Käsen des Types Bleu d'Auvergne verwendet wird, wurden in einem Medium von 150 g/l Saccharose und 20 g/l Hefeextrakt bebrütet und daraus vier Metaboliten im prozentualen Verhältnis von 30 : 30 : 20 : 20 isoliert (33). Die zweite Verbindung stimmte in ihren physikalischen und spektroskopischen Daten mit denjenigen des PR-Toxins überein. Die Struktur der übrigen drei wurde ebenfalls aufgeklärt, doch wird über deren eventuelle Toxizität nichts ausgesagt. Erst kürzlich wurde von einem neuen Stoffwechselprodukt, Eremofortin, berichtet, das aus *P. roqueforti*-Kulturen und durch Biotransformation erhalten wird (31). Auch wurden *In-vitro*-Untersuchungen über den Stoffwechsel dieser Substanz wie auch des PR-Toxins beschrieben (6).

Verschiedene Autoren haben sich mit dem Einfluß der Kulturbedingungen auf die Ausscheidung eines Mykotoxins durch verschiedene Stämme von *P. roqueforti* (39, 43), mit der PR-Toxinbildung bei *P. roqueforti*-Stämmen (38) und mit der Toxin-Produktion von 50 *Penicillium*-stämmen, die in der Käsefabrikation verwendet werden, beschäftigt (25). Piva et al. (39) verwendeten den Stamm CBS 221-30, der dem Stamm NRRL 849 von Wei entspricht, ferner die Stämme A1 und A6, die in der Käsefabrikation eingesetzt werden.

Das Kulturmedium bestand aus einem Hefeextrakt Difco 2% mit Zusätzen von verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Saccharose, Milchsäure) in variablen Konzentrationen mit einem pH von 4,5. Das Toxin wurde aus dem Filtrat des Kulturmediums mit Chloroform extrahiert und auf zwei Kieselgel- und einer Sephadex LH 20-Säule gereinigt. Die Identifizierung des Toxins erfolgte durch Dünnschichtchromatographie und NMR-Spektroskopie.

Es zeigte sich, daß die Produktion des PR-Toxins sehr stark von den Kulturbedingungen abhängig ist. Die Faktoren, die geeignet sind, eine PR-Toxinbildung zu verhindern, sind: ungenügende Belüftung, die Gegenwart von Natriumchlorid oder eines Faktors, der die ionischen Kräfte erhöht, die Erhöhung des pH auf Werte nahe beim Neutralpunkt und im besonderen das Fehlen von Saccharose; denn das Mykotoxin scheint sich nur in einem Milieu zu entwickeln, das reich an Saccharose ist. Gerade diese für eine PR-Toxinbildung ungünstigen Bedingungen sind größtenteils bei den Blauschimmelkäsen vorhanden: schwache Belüftung, Abwesenheit von Kohlenhydraten, Gegenwart von NaCl und sogar eine Tendenz zur Erhöhung des pH.

Vier Stämme von *Penicillium roqueforti* THOM wurden aus Gorgonzola, Stilton, Danish Blue und Finnish Blue isoliert und auf fünf verschiedenen Medien kultiviert (43). Die verschiedenen Medien ermöglichten nicht bei jedem Stamm eine Toxinbildung. Jedoch produzierten alle vier Stämme auf dem Saccharose(15%)-Hefeextrakt(2%)-Medium das PR-Toxin. Dabei konnte vom Stamm HPB 111275 nach 21 Tagen bei 25 °C bis zu 770 mg/Liter PR-Toxin im Medium nachgewiesen werden, während nach 43 Tagen bei 15 °C die Ausbeute 60-70 % des bei 25 °C maximalen Ertrages ausmachte. Auch zeigte sich bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Toxinbildung, daß die Produktion des PR-Toxins im Medium bei 25 °C um den 20. Tag das Maximum erreichte, nachher drastisch abnahm und bei 15 °C erst vom 20. Tag an stark zunahm.

Orth (38) studierte die PR-Toxin-Bildung bei einer Blauschimmelkäse-Starterkultur, bei drei Isolaten von verschiedenen Blauschimmelkäsen des Handels und bei Isolaten von verschiedenen Nahrungsmitteln: Dosenleberwurst, Korken von Rotweinflaschen, Nußeis, Dessertcreme, Brot, Roquefort-Kultur A und B des Bakteriologischen Institutes der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan. Als Vergleichsstamm für die PR-Toxin-Bildung wurde der von Wei et al. verwendete *P. roqueforti* NRRL 849 benutzt.

Diese Stämme wurden in einem sterilen Medium von 20 g Reis und 10 ml 1 %-iger Magermilchpulverlösung bei 15 und 30 °C während 14 Tagen im Dunkeln bebrütet. Die Isolierung erfolgte durch Extraktion mit Chloroform und die Identifizierung mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie.

Das PR-Toxin konnte bei 15 °C in den Isolaten von Nußeis (310 ppb), Korken einer Rotweinflasche (935 ppb) und von Dessertcreme (960 ppb, bei 30 °C 31 ppb) nachgewiesen werden. Der Vergleichsstamm NRRL 849 erzeugte 935 ppb bei 15 °C und 720 ppb bei 30 °C. Daraus kann angenommen werden, daß das verwendete Substrat für den Test auf die PR-Toxinbildung geeignet war. Alle übrigen Isolate, darunter auch die Isolate aus den 3 verschiedenen Blauschimmel-

käsen wie auch die Starterkultur, zeigten keine PR-Toxin-Bildung auf Reis als Nährmedium.

Das Vermögen einiger von *Orth* benutzter *P. roqueforti*-Isolate, toxische Substanzen zu bilden, wurde im Hühnerembryotest durch Mintzlauff u. Machnik (28) überprüft. Dabei zeigten im Gegensatz zum chemischen PR-Toxin-Nachweis 6 von 7 Pilzstämmen eine toxische Wirkung, für die wahrscheinlich bisher noch unbekannte toxische Stoffwechselprodukte verantwortlich sein können.

Bei 47 *Penicillium*stämmen aus verschiedenen Käsesorten (27 *P. roqueforti*, 2 *P. camemberti* und 18 weiteren *Penicillium*-Stämmen) und 1 *P. roqueforti*-Stamm aus einer Probe von ägyptischem Boden und zwei Stämmen aus verschimmeltem Brot haben Lafont et al. (25) die Toxinbildung studiert.

Die Stämme wurden auf einem modifizierten, flüssigen Czapekmedium gehalten. Myzel und Medium wurden 2mal mit Aceton-Wasser und die wäßrige Phase mit Chloroform extrahiert. Der Nachweis des PR-Toxins erfolgte dünn-schichtchromatographisch und durch UV-Bestrahlung. Die Toxizität der Extrakte wurde durch drei biologische Testverfahren bestimmt: Wachstumsverzögerung von Hühnerembryonen, Verzögerung der Teilung von Zellkulturen und die akute Toxizität bei Mäusen.

Die Resultate zeigen, daß ungefähr die Hälfte der untersuchten Stämme keine toxischen Wirkungen aufwiesen und die Extrakte von 15 Stämmen im wesentlichen frei von einer toxischen Wirkung bei den drei Tests waren, während die Extrakte von 6 Stämmen nur bei einem sehr positive Resultate ergaben und neun Stämme bei zwei der verwendeten Systeme. Nur ein *P.*-Stamm ergab bei allen 3 Tests ein klares positives Resultat. Es wird angenommen, daß verschiedene Substanzen in variablen Mengen für die erzeugten Wirkungen verantwortlich gemacht werden müssen. Das PR-Toxin war in den Extrakten nur selten vorhanden. Es ist jedoch schwierig, mit diesen Resultaten zu beurteilen, welche Rolle toxische Metaboliten von *Penicillium*-Stämmen in Käse für die menschliche Toxikologie und die Gesundheit spielen. Auch ist zu erwähnen, daß die bei den Mäusen injizierten Mengen des Extrakts von 100 mg Trockenkultur, bezogen auf ihr Körpergewicht, sehr großen Mengen von Myzel entspricht. Es ist vorläufig nicht möglich, aus diesen Resultaten zu extrapolieren.

Insgesamt ist festzustellen, daß unter normalen Fabrikationsbedingungen von Blauschimmelkäsen mit *P. roqueforti* als Starterkultur das PR-Toxin nicht produziert wird. So läßt sich mit Piva et al. (39) sagen: «S'il était permis de s'inquiéter de l'excrétion d'une mycotoxine chez une souche de *Penicillium roqueforti* dans des conditions de culture in vitro bien particulières, nos résultats montrent qu'il est hautement improbable qu'une souche de *Penicillium* puisse sécréter cette substance dans les conditions de l'affinage des fromages.»

3. Roquefortin und andere Alkaloide von *Penicillium roqueforti*

Penicillium roqueforti-Stämme können außerdem auch Alkaloide produzieren, wie bereits verschiedene Autoren gezeigt haben (1, 3, 49). Ohmomo et al. (37) konnten verschiedene kristalline Alkaloide isolieren und charakterisieren. Sie fanden das bereits bekannte Festuclavin (6,8-dimethylergolin) und zwei andere Alkaloide, die als Roquefortin A und B bezeichnet und für welche die Struktur 7-Acetoxy-6,9-dimethylergolin und 6,9-Dimethylergolin-7-ol vorgeschlagen wurden. Ein viertes Alkaloid Roquefortin C konnte strukturell nicht charakterisiert werden. Nach diesen Autoren können diese Toxine in verschiedenen Käsen des Typs Roquefort in Mengen von 0,2 bis 3,6 ppm Roquefortin A vorhanden sein.

Aus dem Mycel von 2 Wochen alten Kulturen von *Penicillium roqueforti* (Stamm CS1) auf Hefeextrakt-Saccharose-Medium haben Scott et al.

(44) zwei kristalline, N-enhaltende Stoffwechselprodukte extrahiert und die Struktur durch chemische und spektroskopische Studien bestimmt. Die in stärkerer Menge vorhandene Komponente (20–30 mg/l) wurde als Roquefortin bezeichnet und weist folgende Struktur auf (Abb. 2).

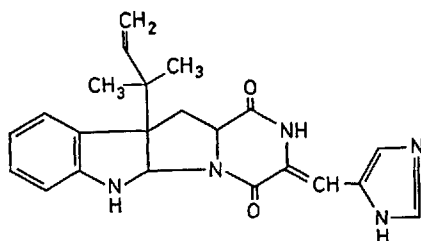


Abb. 2. Struktur des Roquefortins, $C_{22}H_{23}N_5O_2$.

Roquefortin hat neurotoxische Eigenschaften, und die LD_{50} (Intraperitoneal, männliche Mäuse) betrug 15–20 mg/kg (14). Es entspricht dem von Ohmomo et al. bezeichneten Roquefortin C. Das andere Stoffwechselprodukt war Isfumigaclavin A, $C_{18}H_{22}N_2O_2$ (9-Acetoxy-6,8-dimethylergolin). Dabei handelt es sich um das Stereoisomere des Fumigaclavins A und dürfte dem Roquefortin A von Ohmomo et al. (37) entsprechen. Durch Hydrolyse des Isfumigaclavins A entsteht das Isfumigaclavin B (6,8-dimethylergolin-9-ol).

Mit einer dünnschichtchromatographischen Methode zur Analyse von Blauschimmelkäsen auf Roquefortin und Isfumigaclavin A und B (Nachweisgrenze: 0,03–0,05 ppm Roquefortin und etwa die Hälfte davon für Isfumigaclavin) konnte Roquefortin in allen untersuchten 16 Proben aus 7 verschiedenen Ländern nachgewiesen werden; die höchste Konzentration (6,8 ppm) war in einem ausgewählten Stück mit einem visuell starken Schimmelgehalt im Zentrum des Käses zu finden (42). In dänischen, italienischen, holländischen, französischen und deutschen Blauschimmelkäsen wurden maximal 1,3 ppm Roquefortin gefunden (8). Die Resultate von drei Käseproben, die in Stücke mit visuell feststellbarer oder ohne Schimmelbildung zerteilt wurden, zeigen eine variable Verteilung der internen Schimmel und deuten darauf hin, daß keine oder nur eine geringe Wanderung von Roquefortin in nichtverschimmelte Partien des Käses stattfindet (42). Isfumigaclavin A konnte bis zu 4,7 ppm bestimmt werden, und in einigen Proben waren Spuren von Isfumigaclavin B vorhanden. Beim Studium der Wachstumsbedingungen für die Produktion von Roquefortin und anderer Metaboliten des *P. roqueforti* zeigte sich, daß alle vier untersuchten Stämme, aus Gorgonzola, Stilton, Danish Blue und Finnish Blue isoliert, Roquefortin auf dem Saccharose-Hefeextrakt-Medium bei 25 °C produzierten (43). So betrug die maximale Menge an Roquefortin bei 25 °C nach 16 Tagen ungefähr 100 mg/Liter im Myzel und bei 15 °C nach 49 Tagen 60 bis 70 % der bei 25 °C erreichten maximalen Menge. Isfumigaclavin A wurde bei 15 °C dreimal mehr gebildet als bei 25 °C. Es ist jedoch von Interesse zu erwähnen, daß die Reifung der Blauschimmelkäse im allgemeinen während 3 Monaten bei 9 bis 12 °C erfolgt. Aufgrund der beschränkten toxikologischen Daten über Roquefortin müssen bei der Be-

wertung der möglichen Bedeutung des Vorkommens und der in Käse gefundenen Mengen weitere Untersuchungen abgewartet werden.

4. Zur Frage von karzinogen wirkenden Metaboliten in Schimmelpilzen und in *Penicillium*-Stämmen

Verschiedene Mykotoxine weisen neben ihrer akuten Toxizität auch eine krebserzeugende Wirkung bei Versuchstieren auf (2). So sind die Aflatoxine B₁ und G₁ zu den stärksten Karzinogenen zu rechnen (11). Über die Bedeutung der Aflatoxine in der Milchwirtschaft sei auf das Dokument 98 des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes verwiesen (21). In diesem Zusammenhang interessiert lediglich die Frage, ob Schimmelpilze und *Penicillium*-Stämme Aflatoxine und/oder andere krebserzeugende Wirkstoffe enthalten oder produzieren.

Nach Groll (17) ist die Gefahr eines Befalls mit aflatoxinbildenden Schimmelpilzen bei Camembertkäse äußerst gering, wenn nicht sogar ausgeschlossen. So wurden zwei und sieben Tage alte Camembertkäse mit Sporen von *Aspergillus flavus* besprüht; es ließ sich jedoch kein Wachstum dieses Pilzes erzeugen, und ein Nachweis von Aflatoxin B₁ war in jedem Falle negativ. Daraus wurde geschlossen, daß der für den Camembert eingesetzte Pilz *Penicillium candidum* Fremdinfectionen durch aflatoxinbildende Schimmelpilze verhindert.

In 5 Blauschimmel-, 2 Roquefort- und 3 Camembert-Käsen (47) wie auch in 4 Weißschimmel- und 3 Blauschimmel-Käsen (41) konnten keine Aflatoxine, in je 40 Proben von getrockneten, entfetteten camembertähnlichen und Rokpol-Käsen wurden weder Aflatoxin B₁ noch G₁ gefunden (5). Bei Käsen mit Oberflächenschimmel (45 Proben Camembert, 15 Brie, 1 Weichkäse mit Schimmel) und Käsen mit Innenschimmel (2 Edelpilzkäse, 1 Bergazola) war der qualitative Nachweis auf Aflatoxin B₁ in allen Proben negativ (17, 22). In verschiedenen Käsesorten des Handels (197 Proben, darunter 38 Camembert und 5 Edelpilzkäse) konnten die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ nicht nachgewiesen werden, jedoch Aflatoxin M₁, das jedoch aus der für die Käsefabrikation verwendeten Milch stammte (23).

Unter 8 Stämmen von *Penicillium roqueforti* und 19 von *P. caseicolum*, die auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, Aflatoxine und antibiotische Substanzen zu produzieren, bildete kein Stamm Aflatoxine oder war antibiotisch aktiv (10). In je 8 Stämmen von *Penicillium candidum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti* aus polnischen Käseereien wurden weder Aflatoxin B₁ noch G₁ gefunden (5).

70 Schimmelpilzstämmen als Starterkulturen oder als Isolate von Käsen (36 Stämme *P. caseicolum* BAINIER, 5 *P. camemberti* THOM und 17 *P. roqueforti* THOM) wurden in einem flüssigen Medium von 10 % Saccharose und 2 % Hefeextrakt während 10–14 Tagen bei 27 °C bebrütet (9, 27); der aus dem Myzel mit Acetonitril/Chloroform hergestellte Extrakt dünnschichtchromatographisch und spektralanalytisch auf das Vorhandensein von Aflatoxinen (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁), Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol, Ochratoxin A, Patulin, Citrinin, Penicillinsäure und Citreoviridin untersucht. In den 58 Extrakten aus den Stämmen, die in den Käseereien verwendet werden, konnten keine dieser erwähnten Toxine nach-

gewiesen werden, während bekannte Toxinbildner zu positiven Ergebnissen führten. Einzig ein *Penicillium sp.*-Stamm, aus einem französischen Weichkäse mit Gewürzbelag isoliert und als Kontamination bewertet, hatte die Fähigkeit, Patulin und Citrinin zu bilden. Bei der Überprüfung derselben Extrakte an Zellkulturen (Girardi heart und Flow 4000 KII) wirkten 2 Extrakte von *P. caseicolum* schwach toxisch, alle anderen Extrakte aus *P. caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti* waren inaktiv, während Kontrollversuche mit bekannten Toxinbildnern wiederum positive Ergebnisse aufwiesen (27).

Im Jahre 1971 haben jedoch Gibel et al. (16) nach oraler oder subkutaner Verabreichung einer Reinkultur des Stammes *P. camemberti* var. *candidum* III C3 aus der Stammsammlung des Instituts für Milchwissenschaft in Oranienburg (DDR) eine kanzerogene Wirkung bei Wistarratten nachgewiesen. 20 Tiere erhielten eine Menge von 0,5 ml einer Suspension des Myzels 3mal in der Woche auf oralem Wege (per Sonde) und 30 Tiere die gleiche Menge subkutan verabreicht. Mindestens 6 Monate haben 17 von 20 Tieren bzw. 13 von 30 Tieren überlebt. Dabei wiesen von der ersten Gruppe 4 Tiere Tumore auf, von der zweiten deren 8. Die Autoren denken dabei an eine Mykotoxinwirkung, haben jedoch das Myzel nicht auf Mykotoxine untersucht. Auch schließen sie wegen der längeren Aufbewahrung der Sporen-Myzel-Aufschwemmung bei einer Temperatur von 6 °C eine Wirkung von Zersetzungsprodukten durch enzymatische Autolyse nicht völlig aus. Weitere Untersuchungen von Gibel (15) ergaben, daß von zwei weiteren, zur Camembetherstellung in der DDR eingesetzten Pilzstämmen einer im Tierversuch ebenfalls kanzerogen wirkte, während der andere keine Anzeichen einer karzinogenen Wirkung erbrachte.

An Regenbogenforellen wurden ebenfalls Fütterungsversuche mit Camembert- und Roquefort-Kulturen durchgeführt (12). Die Regenbogenforelle ist ein in der Aflatoxinforschung besonders erfolgreich erprobtes Versuchstier, da sie vor Erreichen der Geschlechtsreife sehr empfindlich gegenüber Aflatoxinen ist (55). An Kulturen wurden verwendet:

- 2 Pilzstämme von *Penicillium caseicolum* BAINIER, Handelskultur für die Herstellung von Camembert,
- *Penicillium camemberti* var. *candidum* III C3, von Gibel et al. bei ihren Versuchen verwendet
- *Penicillium roqueforti* THOM, Handelskultur für die Herstellung von Blauschimmelkäse.

Reis wurde mit diesen Pilzstämmen beimpft und in getrockneter, pulverisierter Form mit gemahlenem Handelsfutter vermischt und an die Tiere verfüttert. Trotz des hohen Anteils des Pilzmyzels an der gesamten Nahrung der Tiere, im Durchschnitt etwa 30 %, über die ganze Versuchszeit von 100 Tagen waren keine Krankheitserscheinungen oder Schäden an den Lebern der Fische zu vermerken; auch war die Gewichtszunahme bei den mit verpilztem Futter ernährten Gruppen gleich oder besser als die der Kontrollgruppe. Wegen der verschiedenen Tierart und anderen Kultivierungsbedingungen der Pilze können diese Versuche nicht direkt mit den Ergebnissen von Gibel et al. (16) verglichen werden.

Weitere Fütterungsversuche haben Frank et al. (13) über die karzinogene Wirkung von *P. caseicolum* und *P. roqueforti* an 740 Sprague-Daw-

Tab. 2. Zusammenstellung der Karzinogenese-Untersuchungen von Frank et al. (13).

Fütterung	Anzahl Tiere	Menge an Käse resp. Myzel-suspension/Tier	Mittlere Lebensdauer in Monaten	Prozent maligne Tumoren	Mittlere Induktionszeit t_0 in Testmonaten
A Langzeitfütterungsversuch (5 Tage Käse, 2 Tage Altromin)					
A1 Handelskäse (5 Typen) (12-45% F. i. Tr.)	80	12,7 kg	22 \pm 6	6,3	19 \pm 9
A2 Blauschimmelkäse (30% F. i. Tr.)	60	12,5	18 \pm 8	3,3	20 \pm 23
A3 Test-Camembert A (5,6% F. i. Tr.)	60	9,5	22 \pm 7	6,6	25 \pm 4
A4 Test-Camembert F (5,6% F. i. Tr.)	60	8	21 \pm 7	8,3	26 \pm 4
A5 Kontrolle: Altromin	21				
B 2,5 ml Myzelsuspension, 1 \times wöchentlich, oral, ganze Lebensdauer					
B1 Camembert-Kultur A	60	198 ml	21 \pm 6	8,3	15 \pm 5
B2 Camembert-Kultur F	60	164	20 \pm 6	5,0	18 \pm 13
B3 P. camemberti var. cand. III C3	60	249	28 \pm 5	15,0	25 \pm 3
B4 Blauschimmelkäse-Kultur	60	192	18 \pm 8	1,7	23
B5 Kontrolle: 0,9% NaCl	44	126			
C 2,5 ml Myzelsuspension, 1 \times wöchentlich, subkutan, 52 Wochen					
C1 Camembert-Kultur A	60	118 ml	20 \pm 7	10,0	17 \pm 4
C2 Camembert-Kultur F	60	110	19 \pm 6	11,6	22 \pm 4
C3 P. camemberti var. cand. III C3	60	105	27 \pm 5	10,0	24 \pm 5
C4 Blauschimmelkäse-Kultur	60	117	14 \pm 6	5,0	19 \pm 3
C5 Kontrolle: 0,9% NaCl	44	105			
Total Kontrollen	109		17 \pm 8	2,7	11 \pm 6

Mit freundlicher Erlaubnis des Birkhäuser Verlags, Basel

ley-Ratten durchgeführt. In einem ersten Teil (A) wurden an 4 Gruppen von Ratten während ihrer ganzen Lebensdauer verschiedene Käsesorten (Camembert, Brie, Blauschimmelkäse) verfüttert, in einem zweiten Teil (B) erhielten sie 1mal in der Woche während ihrer ganzen Lebensdauer 2,5 ml einer Myzelsuspension von verschiedenen Kulturen durch eine Sonde und im dritten Teil (C) ebenfalls 1mal pro Woche während 52 Wochen dieselbe Menge subkutan verabreicht. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) sind verschiedene Angaben aus diesem Versuch zusammengestellt: Fütterungsplan, Anzahl der verwendeten Tiere, Menge des verzehrten Käses bzw. der verabreichten Myzelsuspension pro Tier, die mittlere Lebensdauer in Monaten, das Auftreten von malignen Tumoren in Prozent und die mittlere Zeit zur Induktion von malignen Tumoren t_{50} in Testmonaten.

Die erhaltenen Resultate zeigen deutlich, daß beim Verfüttern von extremen Mengen Käse keine signifikant höheren Tumorraten bei den Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden konnten. Das gleiche gilt ebenso für die orale wie auch für die subkutane Applikation der Myzelsuspensionen. Das Fehlen einer karzinogenen Wirkung zeigte sich auch darin, daß die mittlere Induktionszeit für maligne Tumore in allen Versuchsgruppen höher war als bei den Kontrollen. Das höhere Tumoraufreten in B3, C1-C3 ist nur darum offensichtlich, weil diese Tiere eine längere Lebensdauer aufweisen als die Kontrolltiere und aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung auch eine höhere Tumorzinzenz zu erwarten ist.

5. Schluß

Die Frage, ob die zur Herstellung von Käse üblicherweise verwendeten Pilzstämmen wie *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti* wie auch der Genuß dieser Käse unbedenklich seien, läßt sich aufgrund der gesichteten Literatur folgendermaßen beantworten: Es konnten bis jetzt keine gesundheitlichen Schäden bei Bevölkerungsgruppen mit einem hohen Verbrauch entsprechender Käsesorten festgestellt werden. Ebenso ließen sich an Versuchstieren experimentell keine Schäden verursachen. Auch kann man annehmen, daß diese Pilzstämmen als „Kulturpflanzen“ zu betrachten sind, die man seit Jahren unter Kontrolle hat (12). Die Verwendung von *Penicillium caseicolum*, *P. camemberti* und *P. roqueforti* in der Käseherstellung stellt also, was das PR-Toxin wie auch die Frage einer karzinogenen Wirkung betrifft, keine Risiken für die menschliche Gesundheit dar. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß wir über eine eventuelle toxische Wirkung des Roquefortins und Isofumigaclavins A und B in Blauschimmelkäsen noch zu wenig wissen, um deren Bedeutung für die menschliche Gesundheit abschätzen zu können. Im Interesse des Verbrauchers ist es empfehlenswert, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (7) aufgestellten Anforderungen für die Hersteller von Starterkulturen zu beachten.

Zusammenfassung

Schimmelpilzkulturen werden bei der Herstellung von Weißschimmel- und Blauschimmelkäse verwendet. Es wird über den gegenwärtigen Stand der

Kenntnisse zur Frage von Mykotoxinbildnern in Schimmelpilzkulturen der Käsefabrikation berichtet. Verschiedentlich wurde aus *Penicillium roqueforti*-Stämmen, die auf speziellen Medien bebrütet wurden, das PR-Toxin isoliert, auch aus *P. roqueforti*-Kulturen, die zur Käseherstellung verwendet werden. Doch sind die Bedingungen der Käsereifung für eine Produktion dieses Toxins nicht geeignet. Weitere Stoffwechselprodukte von *P. roqueforti* wie Roquefortin und Isofumigaclavin konnten in Käse aufgefunden werden, doch ist über deren toxische Wirkung wenig bekannt.

Kanzerogen wirkende Mykotoxine konnten in Schimmelkäsen nicht gefunden werden, außer Aflatoxin M_1 , das jedoch aus der kontaminierten Milch stammen dürfte. Das Auftreten von Tumoren nach Verfütterung einer Reinkultur von *P. camemberti* var. *candidum* ließ auf eine Mykotoxinwirkung schließen. Doch haben weitere Tierversuche mit verschiedenen, bei der Käsefabrikation verwendeten Schimmelpilzstämmen diesen Befund nicht bestätigt.

Es läßt sich aufgrund der gesichteten Literatur sagen, daß der Einsatz von Schimmelpilzkulturen in der Käsefabrikation kein Risiko für den Menschen darstellt, also toxikologisch unbedenklich ist.

Summary

Mould cultures are used for the manufacture of soft and blue cheese. The report deals with the present stage of knowledge of the question of mycotoxin-producers in mould cultures used for cheesemaking. The PR-toxin was isolated repeatedly from *Penicillium roqueforti* strains which were incubated on special media, but also from *P. roqueforti* cultures used for cheese manufacture. However, cheese ripening conditions do not favour the production of this toxin. Other catabolites from *P. roqueforti* such as roquefortine and isofumigaclavine have been found in cheese, but there is not much known about their toxic effect.

No cancerogenic mycotoxins have been discovered in these types of cheese, except aflatoxin M_1 , which might however originate from contaminated milk. It must be concluded that the occurrence of tumors after feeding of a pure *P. camemberti* var. *candidum* culture is due to the effect of mycotoxins. On the other hand, further animal experiments with various mould culture strains used for cheesemaking have not confirmed these findings.

On the basis of the literature consulted it may be said that the use of mould cultures for cheesemaking does not involve any risk for human health, that means it is toxicologically harmless.

Literatur

1. Abe, M., S. Yamatodani, T. Yamano, Y. Konzu, S. Yamada, Nippon Nogei Kagaku Kaishi 41 (2), 68 (1977), zit. nach (34).
2. Austwick, P. K. C., Brit. med. Bull. 31, 222 (1975).
3. Bekmakhanova, N. E., Mikol. Fitopatol. 8, 152 (1974), zit. nach (34).
4. Blaser, P., Chem. Rdsch. 29 (9), 1 (1976).
5. Bulinski, R., Roczn. Inst. Przem. mlec. 14, 35 (1972), zit. nach Dairy Sci. Abstr. 34, 826 (1972).
6. Cacan, M., S. Moreau, R. Tailliez, Toxicology 8, 205 (1977).
7. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Mikroorganismen für die Lebensmitteltechnik. Gemeinsame Mitteilung der Kommission für Ernährungsforschung und der Kommission zur Prüfung fremder Stoffe bei Lebensmitteln (Bonn-Bad Godesberg 1974).
8. Engel, G., E. Kinder, Jahresbericht der Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel B29 (1976).
9. Engel, G., K. E. von Milczewski, Milchwissenschaft 32, 517 (1977).
10. Frank, H. K., Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 150, 151 (1972).
11. Frank, H. K., Aflatoxine. Bildungsbedingungen, Eigenschaften und Bedeutung für die Lebensmittelwirtschaft (Hamburg 1974).
12. Frank, H. K., R. Orth, G. Reichle, W. Wunder, Milchwissenschaft 30, 594 (1975).
13. Frank, H. K., R. Orth, S.

- Ivankovic, R. Kuhlmann, D. Schmähl, *Experientia* **33**, 515 (1977). – 14. Frayssinet, C., C. Frayssinet, zit. nach (44). – 15. Gibel, W. (1972), zit. nach Preußmann, Chemische Carcinogene in der menschlichen Umwelt, Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. VI, Teil V, Geschwülste II (Berlin-Heidelberg-New York 1975). – 16. Gibel, W., K. Wegner, G. P. Wildner, *Arch. Geschwulstforsch.* **38**, 1 (1971). – 17. Groll, D., Zur Aflatoxin-Entwicklung in Käse. Diss. TH München (1969). – 18. Ichinoe, M., S.-I. Udagawa, M. Tazawa, H. Kurata, *Proc. 1st U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganisms* U.S. Dept. Interior, Washington D.C., 191 (1970). – 19. Jirkovsky, M., J. Galgoczy, *Fleischwirtschaft* **46**, 128 (1966). – 20. Kanota, K., *Proc. 1st U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganisms* U.S. Dept. Interior, Washington D.C., 129 (1970). – 21. Kiermeier, F., The significance of aflatoxins in the dairy industry. *Int. Dairy Fed. Ann. Bull. Doc.* **98** (1977). – 22. Kiermeier, F., D. Groll, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **143**, 81 (1970). – 23. Kiermeier, F., G. Weiß, G. Behringer, M. Müller, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **163**, 268 (1977). – 24. Kurata, H., S. C. Udagawa, M. Ichinoe, Y. Kawasaki, M. Tazawa, H. Tanabe, M. Okudaira, *J. Fd. Hyg. Soc. Japan* **9**, 385 (1968). – 25. Lafont, P., J. Lafont, J. Payen, E. Chany, G. Bertin, C. Frayssinet, *Fd. Cosmet. Toxicol.* **14**, 137 (1976). – 26. Leistner, L., J. C. Ayres, *Fleischwirtschaft* **47**, 1320 (1967). – 27. Milczewski, K. E. v., G. Engel, U. Krusch, A. Lompe, Jahresbericht der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel B **28** (1976). – 28. Mintzlaff, H.-J., W. Machnik, Jahresbericht der Bundesanstalt für Fleischforschung **1**, 52 (1973). – 29. Moreau, C., *Moisissures toxiques dans l'alimentation* (Paris 1974). – 30. Moreau, M., *Ind. Alim. Agric.* **96**, 1315 (1976). – 31. Moreau, S., M. Cacan, *J. Org. Chem.* **42**, 2632 (1977). – 32. Moreau, S., C. Frayssinet, M. Jemmali, *La PR toxine* in Biguet, J.: *Les mycotoxines*. Inserm, Paris **89** (1975). – 33. Moreau, S., A. Gaudemer, A. Lablache-Combiere, J. Biguet, *Tetrahedron Letters* **11**, 833 (1976). – 34. Moulé, Y., M. Jemmali, N. Rousseau, *Chem. Biol. Interact.* **14**, 207 (1976). – 35. Moulé, Y., S. Moreau, J. F. Bousquet, *Chem. Biol. Interact.* **17**, 185 (1977). – 36. Moulé, Y., M. Jemmali, N. Rousseau, N. Darracq, *Chem. Biol. Interact.* **18**, 153 (1977). – 37. Ohmomo, S., T. Sato, T. Utagawa, M. Abe, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **49**, 615 (1975). – 38. Orth, R., *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **160**, 131 (1976). – 39. Piva, M.-T., J. Guiraud, J. Crouzet, P. Galzy, *Lait* **56**, 397 (1976). – 40. Racovita, A., A. Racovita, T. Constantinescu, *Fleischwirtschaft* **49**, 461 (1969). – 41. Rothenbühler, E., M. Bachmann, *Schweiz. Milchztg.* **96**, 1053 (1970). – 42. Scott, P. M., B. P. C. Kennedy, *J. Agr. Fd. Chem.* **24**, 865 (1976). – 43. Scott, P. M., B. P. C. Kennedy, J. Harwig, B. J. Blanchfield, *Appl. Environm. Microbiol.* **33**, 249 (1977). – 44. Scott, P. M., M.-A. Merrien, J. Polonsky, *Experientia* **32**, 140 (1976). – 45. Senser, F., *Lebensmittelchem. u. ger. Chem.* **23**, 210 (1969). – 46. Senser, F., *Gordian* **69**, 159 (1969). – 47. Shih, C. N., E. H. Marth, *J. Dairy Sci.* **52**, 1681 (1969). – 48. Still, P. E., R.-D. Wei, E. B. Smalley, F. M. Strong, *Fed. Proc.* **31**, 733 (1972). – 49. Taber, W. A., L. C. Vining, *Can. J. Microbiol.* **4**, 611 (1958). – 50. Tsubaki, K., *Trans. Mycol. Soc. Japan* **1**, 6 (1956). – 51. Tsunoda, H., *Proc. 1st U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganisms*, U.S. Dept. Interior, Washington D.C., 143, (1970). – 52. Udagawa, S.-I., M. Ichinoe, H. Kurata, *Proc. 1st U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganisms*, U.S. Dept. Interior, Washington D.C., 174 (1970). – 53. Wei, R.-D., H. K. Schnoes, P. A. Hart, F. M. Strong, *Tetrahedron* **31**, 109 (1975). – 54. Wei, R.-D., P. E. Still, E. B. Smalley, H. K. Schnoes, F. M. Strong, *Appl. Microbiol.* **25**, 111 (1973). – 55. Wunder, W., *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **151**, 250 (1973).

Anschrift des Verfassers:

Dr. R. Sieber, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
CH-3097 Liebefeld-Bern, Schweiz