

„Edelschimmel“ – Genuss o

Neue Aspekte zur Selektion unbedenklicher *Penicillium*-Arten

Manfred Gareis, Ralf Rotheneder und Wolfgang Rödel (Kulmbach)

Schimmelpilze werden seit alters her neben Bakterien und Hefen als erwünschte Mikroorganismen bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt. Traditionell mit Schimmelpilzen veredelte und gereifte Produkte sind weltweit verbreitet, wobei es sich in Europa vor allem um bestimmte Käsesorten (Camembert, Roquefort u. a.) und Fleischerzeugnisse (z. B. Salami, Südtiroler Speck, Serrano) handelt. Die Schimmelpilze führen bei den Lebensmitteln zu einer Verbesserung des Aromas und tragen zur Konservierung der Produkte bei. Verwendet werden in Europa primär Arten der Schimmelpilzgattung *Penicillium*. Eine Vielzahl von Stämmen dieser Gattung ist aber als Bildner einer Reihe von toxischen Stoffwechselprodukten, den Mykotoxinen, bekannt. Für den Einsatz im Lebensmittelbereich sollten daher nur solche *Penicillium*-Stämme in Frage kommen, die dem Anspruch der gesundheitlichen Unbedenklichkeit weitestgehend genügen.

Schimmelpilz-Starterkulturen zählen nach § 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandegesetzes (LMBG) zu den Lebensmittelzusatzstoffen, können aber ohne Zulassung verwendet werden. Dennoch müssen sie eine Reihe von Anforderungen erfüllen: Im Vordergrund stehen die technologische Eignung, ästhetische Ansprüche des Verbrauchers (Farbe, Aussehen) sowie die gesundheitliche Unbedenklichkeit. Für die Lebensmittelsicherheit hat der letztgenannte Aspekt größte Bedeutung.

Es ist durchaus schwierig, das toxinogene Potential der verschiedenen *Penicillium*-Stämme auszuschließen beziehungsweise nachzuweisen, da die Bildung von Mykotoxinen von einer Reihe externer Faktoren, wie den Substrateigenschaften oder dem pH- und aw-Wert (Säuregrad und mikrobiell verfügbares Wasser) abhängt. Erschwerend kommt hinzu, dass Schimmelpilze auch mehrere Mykotoxine gleichzeitig produzieren können.

Da unter diesen Stoffwechselprodukten auch Verbindungen bislang

unbekannter Natur auftreten können, reichen Analysen, die lediglich auf den Nachweis bereits bekannter Mykotoxine ausgerichtet sind, nicht aus, um eine Starterkultur im Hinblick auf ihr toxinogenes Potential zu charakterisieren. Gleichermäßen genügt es nicht, die toxischen Eigenschaften von Schimmelpilzen nur nach Anzucht auf künstlichen Nährmedien zu überprüfen, da Lebensmittel andere Substrateigenschaften aufweisen und somit einen anderen Einfluss auf eine mögliche Toxinproduktion ausüben. Die Anforderungen an mikrobiologisch sichere Kulturen verlangen daher nach umfassenderen Selektionsmethoden.

Um den Gesundheitsschutz der Verbraucher zu gewährleisten, ist ein Verfahren wünschenswert, das sowohl die Wachstumseigenschaften der Schimmelpilz-Isolate auf dem Lebensmittel berücksichtigt, als auch den Nachweis möglicher unbekannter, biologisch aktiver Metabolite durch biologische Testsysteme garantiert.

Zu diesem Zweck ist an der Bundesanstalt für Fleischforschung

(BAFF) ein dreistufiges Selektionsschema entwickelt worden. Es wurde bereits eingesetzt, um lebensmittelgeeignete *Penicillium*-Stämme für die Rohwurstveredelung zu überprüfen.

DAS SELEKTIONSSCHEMA

Das Auswahlverfahren umfasst drei aufeinander folgende Schritte der Beurteilung (Abb. 1):

- Aussehen der Schimmelpilze im Hinblick auf die Verbrauchererwartung, zusammen mit einer chemotaxonomischen Gruppierung,
- technologische Eignung,
- toxikologische Charakterisierung und gesundheitliche Unbedenklichkeit.

In die experimentellen Untersuchungen wurden 249 Schimmelpilz-Isolate der Gattung *Penicillium* aus der Stammsammlung der BAFF einbezogen. Bei diesen handelte es sich größtenteils um *P. nalgiovense* (n=113) und *P. camemberti* (n=69), daneben um *P. chrysogenum* (n=18) und sonstige Arten, die sämtlich von Lebensmitteln isoliert wurden.

Erster Schritt: Äußeres Erscheinungsbild

Schimmelpilze wurden auf künstlichen Nährmedien angezogen. Isolate, die deutlich von den Anforderungen der Verbrauchererwartung und der technologischen Eignung abwichen, wurden ausgesondert. Wesentliche Gesichtspunkte waren hierbei die Farbe und Exsudatbildung (Flüssigkeitsabsonderung) der einzelnen Isolate (Abb. 1). Daneben wurden auch der Koloniedurchmes-

ohne Reue?

ser sowie die Höhe und Dichte des Pilzgeflechtes für die Beurteilung herangezogen.

Diese kulturmorphologischen Verfahren führten zu einem Ausschluss von insgesamt 102 *Penicillium*-Isolaten, da sich diese in ihrem Erscheinungsbild deutlich von der Verbrauchererwartung unterschieden (Tab. 1).

Zweiter Schritt: Technologische Eignung

Für diesen Selektionschritt mussten Salamis hergestellt und mit den entsprechenden Isolaten beimpft werden. Die Rezeptur, Herstellung und Reifung der Rohwürste richtete sich nach traditionellen Vorgaben. Zur Beimpfung mit den Schimmelpilz-Isolaten wurden die Rohwürste in Spo-

rensuspensionen getaucht und anschließend in Klimakammern verbracht. Dort reiften die Salamis unter standardisierten Bedingungen. Für die technologische Beurteilung der *Penicillium*-Isolate wurden unter anderem die Gleichmäßigkeit der Kolonieausbildung, der Koloniedurchmesser, die Farbe oder auch die Kontamination mit Fremdkeimen herangezogen.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden Sekundärmetabolite – also die Stoffe, unter denen sich Mykotoxine befinden können – aufgetrennt und die Schimmelpilze chemotaxonomischen Gruppen zugeordnet (vgl. Abb. 1). Hierzu wurden jeweils die Isolate mit gleichem Auftrennungsmuster als zusammengehörig eingestuft. Mit Hilfe dieser Gruppierung war es möglich, die Isolate im Hinblick auf ihre technologische Eignung für die Rohwurstveredelung zu charakterisieren. Die Prüfungen innerhalb des zweiten Selektionsschrittes führte zur Aussonderung weiterer 62 *Penicillium*-Isolate.

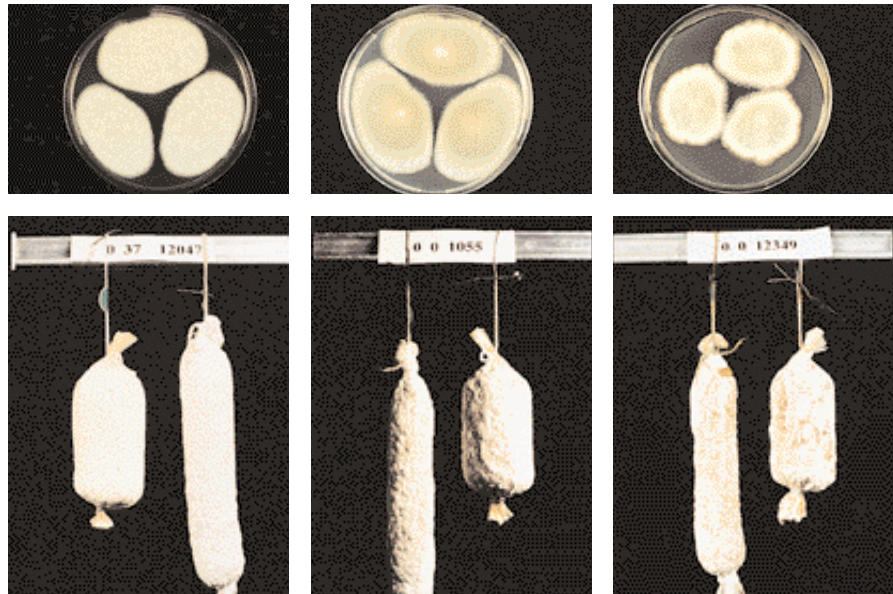
Dritter Schritt: Toxikologische Charakterisierung und gesundheitliche Unbedenklichkeit

Die Prüfung auf Unbedenklichkeit erfolgte mit biologischen Testsystemen sowie mit immunchemischen und dünnschichtchromatographischen Methoden (vgl. Abb. 1). Während die beiden letztgenannten Methoden zum gezielten Nachweis bekannter Mykotoxine dienen, konnten mit Hilfe der biologischen Testsysteme die zytotoxischen (= zellschädigenden), antibiotischen und mutagen Wirkungen der Schimmelpilze untersucht werden. Dadurch ließen sich auch Effekte durch bisher unbekannte toxische Stoffe aufspüren.

Neben der Prüfung auf antibiotische und mutagene Substanzen, die mit weitgehend bekannten Testsystemen vorgenommen wird, kam als weiteres biologisches System der so genannte MTT-Zellkulturtest zum Einsatz. Bei diesem Test lässt sich die zellschädigende Wirkung von Proben über eine Farbreaktion nachweisen: Gesunde Zellen setzen den gelben Farbstoff MTT vollständig zu violett gefärbten Verbindungen um. Eine fehlende oder unvollständige Umsetzung weist auf zellschädigende Inhaltsstoffe der Probe hin. Die Aussagekraft des Tests hängt ganz entscheidend von der Verwendung

Abb. 1: Selektion nicht-toxischer *Penicillium*-Isolate für die Reifung von Fleischprodukten

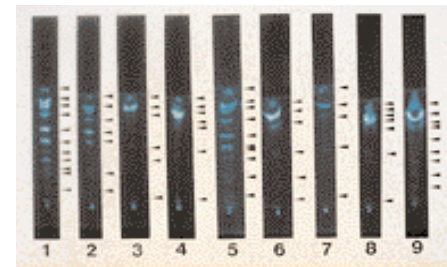
Schritt I: äußeres Erscheinungsbild



Schritt II: technologische Eignung



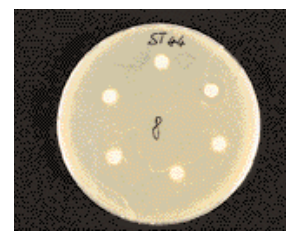
Wurstherstellung



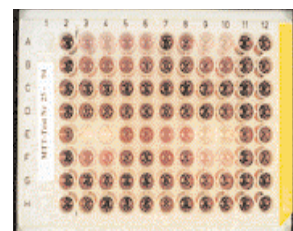
Eingruppierung der Isolate anhand ihrer Sekundärstoffwechselprodukte

Schritt III: toxikologische Charakterisierung und gesundheitliche Unbedenklichkeit

Mykotoxin-Analyse mittels TLC/HPLC/EIA
 Test von Rohextrakten auf:
 – Mutagenität (AMES-Test)
 – antibiotische Aktivität
 – Zytotoxizität (MTT-Test)



Antibiotische Aktivität



MTT-Zellkultur-Test

geeigneter Zielzellen ab: Die Zellen sollen einerseits eine genügend hohe Empfindlichkeit gegenüber Mykotoxinen aufweisen, andererseits aber robust genug sein, um Matrixeffekte der Rohextrakte auszuschließen.

Zur Untersuchung der *Penicillium*-Isolate wurden Rohextrakte verwendet, die zum einen von schimmelgereiften Salamiwürsten stammten und zum anderen von Kulturen, die auf künstlichen Nährmedien gewachsen waren.

Spuren bekannter Mykotoxine (Ochratoxin A, Citrinin) wurden lediglich in Kulturextrakten von sieben Isolaten, in keinem Fall jedoch in den gereiften Produkten detektiert.

Von den untersuchten *Penicillium*-Stämmen erwiesen sich 24 Stämme unabhängig von den Kulturbedingungen als nicht zytotoxisch. 38 Stämme zeigten im MTT-Test eine zytotoxische Wirkung nur nach Anzucht auf künstlichem Nährmedium (Malzextrakt-Agar), jedoch nicht auf Salami. 7 Isolate zeigten sowohl auf Malzextrakt-Agar als auch auf Salami eine zytotoxische Wirkung. Auffallend war das Verhalten von 5 untersuchten Kulturen. Bei ihnen war eine zytotoxische Wirkung nur nach Anzucht auf Salami zu beobachten – ein klarer Hinweis darauf, dass die Bildung von Mykotoxinen von dem Substrat abhängt, auf dem die Pilze wachsen.

Neben den substratabhängigen Unterschieden in der Zytotoxizität waren auch deutliche Artunterschiede zwischen den beiden Spezies *P. camemberti* und *P. nalgiovense* festzustellen. So zeigten *P. camemberti*-Kulturen sowohl auf Salami als auch auf Malzextrakt-Agar insgesamt geringere zytotoxische Wirkung als *P. nalgiovense*-Kulturen. Bemerkenswert war weiterhin das gleichzeitige Vorkommen von „nicht“ und „stark“ zytotoxischen Isolaten aus beiden überprüften Spezies.

Aufgrund der Ergebnisse wurden in diesem dritten Selektionsschritt weitere 72 Isolate ausgesondert, so

dass von den ursprünglich überprüften 249 Isolaten nur 13 Isolate, also lediglich 5 %, dem Anforderungsprofil entsprachen (Tab. 1).

RESÜMEE

Schimmelpilze für den Lebensmittelbereich sind im Hinblick auf den Verbraucherschutz möglichst in ihrer gesamten biologischen Leistungsfähigkeit mit den jeweiligen neuesten Möglichkeiten der Wissenschaft auf ihre gesundheitliche Unbedenklichkeit zu überprüfen und zu beurteilen.

kannte, möglicherweise gesundheitsschädliche Metabolite zu detektieren. Zellschädigende Effekte waren insgesamt dann häufiger zu verzeichnen, wenn die Isolate auf Malzextrakt-Agar angezüchtet wurden, jedoch konnten dadurch keine Rückschlüsse über das Verhalten der einzelnen *Penicillium*-Stämme auf dem eigentlichen Ziel-Produkt, der Salami, gezogen werden. Eine zusätzliche Überprüfung der auf dem Lebensmittel gewachsenen Schimmelpilze erscheint also in jedem Fall notwendig, um die gesundheitliche Unbedenklichkeit eines Isolats beurteilen zu können.

Tab. 1: Ergebnisse der Selektion verschiedener *Penicillium*-Isolate auf ihre Eignung im Lebensmittelbereich (Rohwurst-Veredelung).

Selektions-schritt	Kriterium	Anzahl verbleibender Isolate	Anzahl verworfener Isolate
I	äußeres Erscheinungsbild	249 (100 %)	102 (41 %)
II	technologische Eignung	147 (59 %)	62 (25 %)
III	toxikologische Sicherheit	85 (34 %)	72 (29 %)
	geeignete Isolate	13 (5 %)	

Der im Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG) verwendete Begriff der „gesundheitlichen Unbedenklichkeit“ wird im Gesetzestext nicht näher erläutert, was ein Problem bei der Beurteilung von Schimmelpilz-Starterkulturen darstellt. Der negative Nachweis einiger weniger bekannter Mykotoxine ist hier sicher nicht ausreichend. Ein derartiger Ausschluss bedeutet nicht, dass ein bestimmter Schimmelpilz nicht in der Lage wäre, diese oder weitere Toxine unter anderen Produktionsbedingungen zu erzeugen. Diesen Gesichtspunkten ist bei der Erstellung eines Anforderungsprofils für Schimmelpilz-Starterkulturen vor allem Rechnung zu tragen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der MTT-Zellkulturtest eine geeignete Methode ist, um Unterschiede innerhalb der einzelnen *Penicillium*-Arten und der Isolate aufzudecken und vor allem auch unbe-

Darüber hinaus müssen zum Einzeltoxin-Nachweis auch Verfahren aus der Analytik und andere biologische Testsysteme wie zum Beispiel Antibiotika-Assays und Mutagenitätstests herangezogen werden.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass das vorgestellte Verfahren geeignet ist, um Pilzstämme nach den Anforderungskriterien „Verbrauchererwartung“, „technologische Eignung“ und „gesundheitliche Unbedenklichkeit“ zu selektieren. Dabei wurde deutlich, dass – zumindest bei dieser konkreten Untersuchung – nur relativ wenig Schimmelpilz-Isolate den gestellten Anforderungen entsprechen und sich für den Einsatz im Lebensmittelbereich empfehlen. ■

Dir. u. Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, Dr. Ralf Rotheneder und Dir. u. Prof. Dr. Wolfgang Rödel, Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, E.-C.-Baumann-Str. 20, 95326 Kulmbach