



Nur für persönlichen Gebrauch

DK 637
Milchwirtschaftliches
Ordnungssystem
Bibliotheca Lactis 05

Fütterungsversuche an Forellen mit Camembert- und Roquefort-Kulturen

Von H. K. FRANK*), R. ORTH*), G. REICHLÉ**) und W. WUNDER***)

*) Aus dem Institut für Physik und Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe

**) Von der Teichwirtschaftlichen Versuchsanstalt in Wöllershof bei Weiden

***) Vom I. Zoologischen Institut der Universität Erlangen

1. Problemstellung

In den letzten Jahren wurde im Rahmen der weltweiten Forschungsarbeiten über Mykotoxine immer wieder die Frage aufgeworfen, ob die zur Herstellung von Käse üblicherweise verwendeten Pilzarten unbedenklich seien. Die Antwort auf diese Frage wurde im kleinen Kreis wie auch in der Öffentlichkeit dahingehend formuliert, daß sich bisher keine Anzeichen von Schädigungen bei Bevölkerungsgruppen mit hohem Verbrauch solcher Käsesorten ermitteln ließen und andererseits die für die Produktion verwendeten Pilzstämme „Kulturpflanzen“ seien, die man seit Jahren unter Kontrolle habe. Unsicherheit bereitete sich erst aus, als 1971 durch die Publikation von GIBEL u. a. (1) wahrscheinlich gemacht wurde, daß ein be-

stimmter Stamm von *Penicillium camemberti* im Langzeitversuch bei Ratten oral und subcutan zu einer Erhöhung maligner, nicht organspezifischer Ereignisse führte. KANOTA (2) fand bei einem von KURATA (3) in Japan isolierten *Penicillium roqueforti* drei chemische und in ihrer Wirkung verschiedene Toxine. WEI u. a. (4, 5) schließlich konnten bei der gleichen Pilzart ein weiteres Toxin finden, das sie rein darstellten und seine Struktur aufklärten; es wurde PR-Toxin genannt, hat die Summenformel $C_{17}H_{20}O_6$ und bei Ratten eine LD_{50} von 11 mg/kg i. p. bzw. 115 mg/kg oral.

Vor diesem Hintergrund wurden an verschiedenen Stellen Forschungsvorhaben begonnen mit dem Ziel, Klarheit für die Milchwirtschaft und für den Verbraucher zu schaffen. Aus dem gleichen Grund haben auch

die Ernährungskommission und die Fremdstoffkommission der DFG eine gemeinsame Mitteilung (6) herausgebracht, in der die Anforderungen formuliert wurden, die an Starterkulturen im Rahmen der Lebensmitteltechnik und an die Hersteller solcher Kulturen zu stellen sind.

Es wurden daher Fütterungsexperimente mit Regenbogenforellen durchgeführt, um an diesen in der Toxikologie ganz allgemein, der Aflatoxinforschung besonders erfolgreich erprobten Versuchstieren (7, 8) Erfahrungen mit handelsüblichen Pilzkulturen zu sammeln.

2. Material und Methode

2.1 Pilzstämmе

- A = *Penicillium caseicolum* Bainier
Handelskultur für die Herstellung von Camembert
- F = *Penicillium caseicolum* Bainier
Handelskultur für die Herstellung von Camembert
- G = *Penicillium camemberti* var. *candidum* III C 3
Kultur, die von GIBEL u. a. (1) bei ihren Versuchen mit Ratten verwendet wurde
- R = *Penicillium roqueforti* Thom
Handelskultur für die Herstellung von Blauschimmel-Käse.

2.2 Herstellung des Forellenfutters

Patna-Langkornreis (Müller's Mühle) wurde mit einer Hefeextraktglucoselösung (1 : 1000) in entmineralisiertem Wasser im Gewichtsverhältnis 2 : 1 etwa 1 Std. bei Zimmertemperatur vorgequollen, dann 20 min. bei 120° C autoklaviert und nach dem Abkühlen massiv mit den einzelnen Pilzstämmen beimpft. Die Kultur geschah bei 25° C in langsam um die Längsachse rotierenden Fernbachkolben (2 U/min.) bei guter O₂-Versorgung 10 Tage lang; während der ganzen Fermentation rieselte der Reis in den Kolben.

Nach der Ernte wurde das Material in zugeschweißten Beuteln schockgefroren und bei -18° C gelagert. Die gefrorenen Körner wurden gemahlen und sofort lyophilisiert. Nicht verpilzter, sonst aber genauso behandelte Reis diente als Kontrolle.

Das pulverisierte Material wurde mit gemahlenem Handelsfutter (Ringforelle 63 gek — Raiffeisen-Kraftfutterwerk Kehl) am Institut für Landmaschinenforschung der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig-Völkenrode vermischt und unter schonendsten Bedingungen auf eine Körnung von etwa 2,5 mm pelletiert, wofür wir Herrn Professor Baader zu großem Dank verpflichtet sind.

Der Verlauf der Fermentation und der Herstellung des Futters ist in Tab. 1 dargestellt. Dabei fällt auf, daß bei den drei Camembert-Stämmen übereinstimmend etwa 50 % des angebotenen Kohlenhydrates veratmet wurden, während der Roquefort-Stamm nur 20 % verbrauchte. Der Pilzanteil läßt sich bei dieser Kulturmethode nicht bestimmen, doch konnte in Nebenversuchen mit Reisagar und quantitativer Ernte des Mycels über das Trockengewicht festgestellt werden, daß bei A etwa 650 g Pilz (trocken) während der ganzen Zeit verfüttert wurden, bei F etwa 720 g, bei G etwa 575 g und bei R etwa 870 g.

Tab. 1 Zusammensetzung des Futters für die Versuchstiergruppen

	Pilzstämmе				Kontrolle
	A	F	G	R	
Reis vor der Verpilzung trocken	2200 g	2560 g	2240 g	2520 g	2400 g
Reis vor der Verpilzung feucht	3300 g	3840 g	3360 g	3780 g	3600 g
Verpilzter Reis feucht	2400 g	2800 g	2500 g	3020 g	2600 g*)
Verpilzter Reis trocken	860 g	1050 g	900 g	1640 g	2100 g*)
Handels-Mischfutter-Zusatz	1540 g	1750 g	1600 g	1380 g	500 g
Versuchsfutter nach dem Pelletieren	2100 g	2620 g	2300 g	2830 g	2650 g*)
Pilzanteil im Futter	31 %	28 %	25 %	31 %	

*) Nichtverpilzter Reis

2.3 Versuchstiere

Es wurde ein einheitlicher Forellenstamm der Art *Salmo gairdneri* verwendet. Die Setzlinge mit einem Durchschnittsgewicht von 100 g waren zum größten Teil geschlechtlich noch unentwickelte Weibchen; nur vereinzelt waren meist unreife Männchen dazwischen.

2.3.1 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere wurden entsprechend der in den letzten Jahren von VON SENGBUSCH und MESKE (9, 10) entwickelten Methode der „Warmwasserhaltung“ bei 14° C in dem Teichwirtschaftlichen Beispielsbetrieb in Wöllershof bei Weiden/Oberpfalz untergebracht (11). Diese Methode der Fischhaltung hat sich für die Durchführung exakter Versuche, vergleichbar denen mit warmblütigen Versuchstieren in Käfighaltung, gut bewährt (12).

Die Becken mit jeweils 15 Regenbogenforellen-Setzlingen enthielten 230 l. Das Wasser wurde durch Zusammenmischen auf die gewünschte Temperatur gebracht und durchströmte die Becken so, daß alle 2 Std. eine Totalerneuerung erfolgte. Das verbrauchte Wasser wurde in Teiche abgeleitet. Die Luftzufuhr geschah über eine Düse am Zufluß und zusätzlich über einen Ausströmer; der O₂-Gehalt betrug konstant 80 %.

Die Becken wurden täglich zweimal mit einem Gummikratzer gereinigt. Desinfektionsmittel oder chemische Stoffe zur Vorbeugung gegen Krankheiten wurden nicht verwendet.

Die Fische wurden alle 7 Tage gewogen, und zwar 20 Std. nach der letzten Fütterung. Dadurch war sichergestellt, daß der Darm der Tiere beim Wiegen praktisch leer war.

2.3.2 Fütterung der Versuchstiere

Es wurden täglich 2 % des Körpergewichtes der Fische an Versuchsfutter gegeben (vgl. 13). Diese Futtermenge wurde in drei Portionen — morgens, mittags und abends — verabreicht.

2.3.3 Eingewöhnen der Versuchstiere

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Becken zunächst mit 20 Tieren zu besetzen und 8–10 Tage an die neuen Verhältnisse zu gewöhnen. Die Forellen sind zunächst unruhig und stoßen an die Wände an. Sie müssen sich im Laufe einiger Tage beruhigen und lernen das Futter noch in der Luft oder beim Absinken aufzuschnappen; die Futterpellets sollen den Boden des Behälters nicht erreichen. In dieser Zeit werden Tiere, welche die anderen jagen und Unruhe stiften sowie schlecht aussehende dunkle oder zu große entfernt. Nach dem Eingewöhnen befinden sich in jedem Becken 15 Fische, die ruhig stehen und gut fressen.

Nun wurde erst das Futter für die 5 Versuchsgruppen über einen Zeitraum von 100 Tagen gegeben; das Endgewicht der Tiere beträgt dann 200–300 g, und Unterschiede in der Futterwirkung sind dann gut erkennbar (14).

3. Ergebnisse

Die Futteraufnahme der Tiere war während der ganzen Versuchsdauer gleichmäßig gut. Die Versuchsfuttermittel (vgl. Tab. 1, letzte Zeile) gingen einige Tage vor Versuchsende zur Neige; es wurde mit Normalfutter weitergearbeitet. Einen Tag vor der Auswertung wurde die Fütterung eingestellt und die Fische alle einzeln gemessen, gewogen und ausgeschlachtet. Der Futterquotient lag bei 2. Am Anfang der Versuchsdauer war er etwas besser, am Ende schlechter, was keine Besonderheit darstellt. Das Aussehen aller Fische war gut; bei der Ausschächtung war nichts zu beanstanden.

Die Lebern machten einen gesunden Eindruck und zeigten alle rotbraune Farbe; blasse Lebern kamen nicht vor. Das absolute Lebergewicht schwankte zwischen 3 g und über 10 g pro Tier; das durchschnittliche relative Lebergewicht betrug 1,89 % des Körpergewichts. Bei dem schwersten Fisch mit 340 g erreichte das Lebergewicht 3,21 % des Körpergewichtes. Bei 3 Lebern waren kleine, gut verheilte Risse an der Oberfläche festzustellen, die auf traumatische Schädigungen zurückzuführen sein dürften, welche nichts mit der Futterzusammensetzung zu tun hatten. Wegen des gesunden Aussehens wurden die Lebern nicht histologisch untersucht.

Verluste an Tieren, die fütterungsbedingt gewesen wären, traten nicht auf.

Tab. 2 Gewichtszunahme der Versuchstiere in 100 Tagen

Futterart	Gewicht von 15 Fischen		Gesamt-zuwachs	Stückzuwachs	
	Beginn	Ende		absolut	% der Kontrolle
Kontrolle	1560 g	3210 g	1650 g	110 g	—
F	1430 g	3080 g	1650 g	110 g	± 0 %
A	1450 g	3445 g	1995 g	133 g	+ 29 %
G	1560 g	3755 g	2195 g	146 g	+ 33 %
R	1620 g	3895 g	2275 g	151,7 g	+ 40 %

In Tab. 2 sind die Gewichtszunahmen der Versuchsgruppen zusammengestellt.

Die Geschmacksprüfung der Fische ergab, daß das Fleisch durch die Testpersonen als wohlschmeckend beurteilt wurde; Geschmacksunterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren nicht feststellbar.

4. Diskussion

Nachdem in einem Vorversuch festgestellt worden war, daß der verpilzte Reis nur sehr zögernd von den Fischen direkt aufgenommen wurde und der Kontroll-Reis ganz verweigert wurde, entschlossen wir uns zum Verschneiden des Materials mit einem Handelsfutter.

Der geringe Zuwachs der Kontrolltiere dürfte auf den relativ hohen Kohlenhydratanteil in diesem Futter zurückzuführen sein — vgl. Tab. 1, letzte Spalte. Für die unterschiedlichen Zuwachsraten der Gruppen A, F, G und R lassen sich keine sicheren Gründe angeben; man könnte vermuten, daß die Pilze nicht gleich gut ausgewertet werden konnten, denn es ergibt sich auch keine Korrelation mit der verabreichten Pilzmenge pro Tier und Tag. Gruppe A erhielt täglich 6,2 g Pilztrockenmasse/kg Fisch, Gruppe F 5,6 g, Gruppe G 5,0 g und Gruppe R ebenfalls 6,2 g.

Trotz des hohen Anteils des zu untersuchenden Agens — nämlich Pilzmycel — an der Gesamtnahrung der Tiere über die ganze Versuchszeit hinweg — im Mittel etwa 30 % —, war nichts nachteiliges an den Tieren zu beobachten. Das scheint zu beweisen, daß die geprüften Stämme von *P. caseicolum* und der Stamm von *P. roqueforti* nach Wachstum auf Reis bei Regenbogenforellen keine schädlichen Folgen haben. Es ist jedoch hervorzuheben, daß ein direkter Vergleich dieser Untersuchung mit den Ergebnissen von GIBEL und Mitarbeiter (1) nicht statthaft erscheint, da weder Tierart noch Anzuchtbedingungen der Pilze dies zuließen.

5. Literatur

- (1) GIBEL, W., WEGNER, K. und WILDNER, G. P.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage einer kanzerogenen Wirkung von *Penicillium camemberti* var. *canadum*. Arch. Geschwulstforsch. **38**, 1–6 (1971).
- (2) KANOTA, K.: Studies on toxic metabolites of *Penicillium roqueforti*. In: HERZBERG, M. (Edit.): Proceedings of the first U.S.-Japan conference on toxic micro-organisms, mycotoxins, botulism. Honolulu, Hawaii, 1968. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C., 1970, p. 129.
- (3) ICHINOE, M., UDAGAWA, S.-I., TAZAWA, M. and KURATA, H.: Some considerations on a biological method for the detection of mycotoxins in Japanese foods. In: HERZBERG, M. (Edit.): Proceedings of the first U.S.-Japan conference on toxic micro-organisms, mycotoxins, botulism. Honolulu, Hawaii, 1968. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C., 1970, p. 191.
- (4) WEI, R.-D., STILL, P. E., SMALLEY, E. B., SCHNOES, H. K. and STRONG, F. M.: Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. Appl. Microbiol. **25**, 111–114 (1973).
- (5) WEI, R.-D., SCHNOES, H. K., HART, P. A. and STRONG, F. M.: The structure of PR-toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. Tetrahedron **31**, 109–114 (1975).
- (6) DFG: Mikroorganismen für die Lebensmitteltechnik. Gemeinsame Mitteilung der Kommission für Ernährungsforschung und der Kommission zur Prüfung fremder Stoffe bei Lebensmitteln, Bonn-Bad Godesberg, 1974.
- (7) HALVER, J. E., and MITCHELL, I. A. (Edit.): Trout hepatoma research conference papers. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C. 1967.
- (8) WUNDER, W.: Der durch Aflatoxine hervorgerufene Leberkrebs bei der Regenbogenforelle. Z. Lebensm.-Unters. u. -Forsch. **151**, 250–255 (1973).
- (9) MESKE, C.: Die Warmwasserfischzucht und ihre Bedeutung für Wissenschaft und Praxis. Der Fischwirt **19**, 244–253 (1969).
- (10) Bundesforschungsanstalt für Fischerei und Max-Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung Hamburg: Vortrags-

veranstaltung über neue Methoden der Fischzucht und -haltung am 15. Febr. 1967.

- (11) REICHLER, G. und BECHTEL, H.: Vorläufiger Bericht über eine erste Warmwasserfischzuchtanlage in der Oberpfalz. *Der Fischwirt* 20, 268—270 (1970).
- (12) WUNDER, W.: Beobachtungen und Betrachtungen über Warmwasserhaltung von Fischen im Aquarium und über die Bedeutung dieser Methode für Wissenschaft und Praxis. *Der Fischwirt* 20, 263—267 (1970).
- (13) LIEBMANN, H.: Probleme der Ernährung und Haltung von Süßwasserfischen im Intensivbetrieb. München 1972.
- (14) v. SENGBUSCH, R., MESKE, C., SZABLEWSKI, W. und LUHR, B.: Gewichtszunahme von Karpfen in Kleinstbehältern, zugleich ein Beitrag zur Aufklärung des Raumfaktors. *Z. Fischerei* 15, 45—60 (1967).

6. Zusammenfassung

FRANK, H. K., ORTH, R., REICHLER, G. und WUNDER, W.: **Fütterungsversuche an Forellen mit Camembert- und Roquefort-Kulturen.** *Milchwissenschaft* 30. (10) 594—597 (1975).

53 Camembert-Kulturen (Schädlichkeitsprüfung).

Regenbogenforellen in Warmwasserhaltung bei 14° C wurden bei einem Anfangsgewicht von 100 g/Tier insgesamt 100 Tage lang mit einer Mischung aus Handelsfutter und verpilztem Reis gefüttert; der Pilzanteil betrug etwa 30 % der Trockenmasse. Die Pilzaufnahme lag zwischen 5,0 bis 6,2 g/kg Fisch am Tag. Es wurden 3 Stämme Camembert-Schimmel und ein Stamm Roquefort-Schimmel verfüttert.

Fütterungsbedingte Verluste bei den Tieren traten nicht auf, Krankheitserscheinungen oder Schäden an den Lebern der Fische wurden nicht beobachtet. Der Zuwachs der mit verpilztem Futter versorgten Gruppen war gleich oder bes-

ser als der der Kontrollgruppe. Geschmacksunterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren nicht feststellbar.

Dok.-Ref.

FRANK, H. K., ORTH, R., REICHLER, G., and WUNDER, W.: **Feeding experiments with rainbow trouts using Camembert and Roquefort starters.** *Milchwissenschaft* 30. (10) 594—597 (1975).

53 Camembert starters (test for harmfulness to health).

Rainbow trouts with an initial weight of 100 g each, kept in warm water at 14° C, were fed a mixture of commercial feed and rice affected by fungi over a period of 100 days. The portion of fungi in the feed mixture made up about 30 % of the dry matter, and the intake of fungi varied between 5.0 and 6.2 g/kg fish and day. Three strains of mould cultures used for Camembert and one strain of Roquefort mould were fed.

There were neither animal losses due to the diet fed, nor were there any pathological symptoms or affected livers in the animals. The weight gain of the animals receiving the fungi-affected diet was equal or superior to the controls. Differences in taste between the test animals and the controls were not found.

FRANK, H. K., ORTH, R., REICHLER, G., et WUNDER, W.: **Expériences d'alimentation des truites avec des levains fromagers pour le Camembert et le Roquefort.** *Milchwissenschaft* 30. (10) 594—597 (1975).

53 Levains pour Camembert (étude de la nocivité).

FRANK, H. K., ORTH, R., REICHLER, G., y WUNDER, W.: **Experimentos de alimentación en truchas con cultivos de quesería para el Camembert y el Roquefort.** *Milchwissenschaft* 30. (10) 594—597 (1975).

53 Cultivos para el Camembert (estudio de la nocividad).