Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Mykotoxinen in verschimmeltem Brot und Käse

SANDRA MELISSA WOLF

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Mykotoxinen in verschimmeltem Brot und Käse

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

SANDRA MELISSA WOLF

Tierärztin aus Hanau

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

Prof. Dr. habil. Christa Ewers

Tag der Disputation: 27. Januar 2016

Meiner Familie

und

in besonderem Gedenken an meine liebe Mama

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS **I**

TABELLENVERZEICHNIS **VI**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS **VIII**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **XIII**

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG **1**

2 SCHRIFTTUM **2**

2.1 Brot **2**
2.1.1 Allgemeines 2
2.1.2 Wirtschaftliche Aspekte 4
2.1.3 Schimmelpilzwachstum auf Brot 5
2.1.3.1 *Penicillium* spp. 5
2.1.3.1.1 Allgemeine Charakterisierung von *Penicillium* spp. 5
2.1.3.1.2 Systematik von *Penicillium* spp. 6
2.1.3.1.3 Vorkommen und Bedeutung von *Penicillium* spp. 7
2.1.3.1.4 Technologische Bedeutung von *Penicillium* spp. in der Industrie 7
2.1.3.1.5 Bedeutung von *Penicillium* spp. als Lebensmittelverderber 8
2.1.3.2 *Aspergillus niger* 9
2.1.3.2.1 Allgemeine Charakterisierung von *Aspergillus niger* 9
2.1.3.2.2 Systematik von *Aspergillus niger* 10
2.1.3.2.3 Vorkommen und Bedeutung von *Aspergillus niger* 10
2.1.3.2.4 Technologische Bedeutung von *Aspergillus niger* in der Industrie 11
2.1.3.2.5 Sicherheitsaspekte von *Aspergillus niger* 12
2.1.3.2.6 Bedeutung von *Aspergillus niger* als Lebensmittelverderber 13
2.1.3.3 *Neurospora* spp. 14
2.1.3.3.1 Allgemeine Charakterisierung von *Neurospora* spp. 14

2.1.3.3.2	Vorkommen und Bedeutung von *Neurospora* spp.	15
2.2	**Käse**	**16**
2.2.1	Allgemeines	16
2.2.2	Wirtschaftliche Aspekte	18
2.2.3	Schimmelpilzwachstum auf Käse	19
2.2.3.1	*Penicillium roqueforti*	19
2.2.3.1.1	Allgemeine Charakterisierung von *Penicillium roqueforti*	19
2.2.3.1.2	Technologische Bedeutung von *Penicillium roqueforti* in der Industrie	20
2.2.3.1.3	Sicherheitsaspekte von *Penicillium roqueforti*	21
2.2.3.1.4	Bedeutung von *Penicillium roqueforti* als Lebensmittelverderber	21
2.2.3.2	*Scopulariopsis* spp.	22
2.3	**Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen**	**24**
2.4	**Mykotoxine**	**25**
2.4.1	Allgemeines	25
2.4.2	Fumonisine	27
2.4.2.1	Bildung, Vorkommen und Bedeutung	27
2.4.2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften	28
2.4.2.3	Toxizität	30
2.4.2.3.1	Toxizität beim Tier	30
2.4.2.3.2	Toxizität beim Menschen	32
2.4.2.4	Rechtliche Regelungen für Fumonisine	32
2.4.3	Ergoline – Ergotalkaloide und Clavine	34
2.4.3.1	Allgemeines	34
2.4.3.2	Isofumigaclavin A	35
2.5	**Analytische Nachweismethoden für Mykotoxine**	**39**
2.5.1	Enzymimmunologische Nachweisverfahren (EIA)	39
2.5.2	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren	41
3	**EIGENE UNTERSUCHUNGEN**	**42**
3.1	**Material und Geräte**	**42**
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	42
3.1.2	Puffer und Lösungen	43

3.1.3	Mykotoxine	43
3.1.4	Immunreagenzien	44
3.1.5	Nährmedien	47
3.1.6	Geräte und sonstige Materialien	47
3.1.6.1	Hard- und Software	47
3.1.6.2	Photometer	47
3.1.6.3	Enzymimmuntests	47
3.1.6.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	48
3.1.6.5	Mykologische Untersuchung	48
3.1.6.6	Sonstiges	48
3.1.7	Probenmaterial	49
3.1.7.1	Brot	49
3.1.7.2	Käse	50
3.1.7.3	Schmelzkäse	50
3.2	**Methodik**	**51**
3.2.1	*Orientierende Untersuchung zur Bestimmung von Schimmelpilzen auf Brot und Käse*	51
3.2.2	*Untersuchung von Schimmelpilzwachstum auf Brot*	52
3.2.2.1	Lagerungssystematik	52
3.2.2.2	Nachweis von Fumonisinen	52
3.2.2.2.1	EIA zum Nachweis von Fumonisinen (FB_1-Äquivalenten)	53
3.2.2.2.1.1	Probenvorbereitung	53
3.2.2.2.1.2	Testdurchführung	54
3.2.2.2.2	HPLC-Nachweis von Fumonisinen	55
3.2.2.2.2.1	Probenvorbereitung	55
3.2.2.2.2.2	Testdurchführung	56
3.2.2.3	Nachweis von Isofumigaclavin A	57
3.2.2.3.1	Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	58
3.2.2.3.1.1	Probenvorbereitung	58
3.2.2.3.1.2	Testdurchführung	58
3.2.2.3.2	GEA-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	59
3.2.2.3.2.1	Probenvorbereitung	59
3.2.2.3.2.2	Testdurchführung	59
3.2.3	*Untersuchung von Schimmelpilzwachstum auf Käse*	60

3.2.3.1	Lagerungssystematik	60
3.2.3.2	Nachweis von Isofumigaclavin A	60
3.2.3.2.1	Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	61
3.2.3.2.1.1	Probenvorbereitung	61
3.2.3.2.1.2	Testdurchführung	61
3.2.3.2.2	Isofumigaclavin A-EIA	62
3.2.3.2.2.1	Probenvorbereitung	62
3.2.3.2.2.2	Testdurchführung	62
3.2.4	*Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen auf Isofumigaclavin A*	63
3.2.4.1	Probenvorbereitung	63
3.2.4.2	Testdurchführung	63
3.2.5	*Validierung der verwendeten Testsysteme*	63
3.2.6	*Statistische Auswertungskriterien*	64
4	**ERGEBNISSE**	**65**
4.1	**Enzymimmunologische Untersuchungsverfahren – Auswertungen der EIA-Standardkurven**	**65**
4.2	**Schimmelpilzbefall von Brot**	**68**
4.2.1	Orientierende Untersuchungen zum Schimmelpilzwachstum auf Brot	68
4.2.2	Qualitativer Nachweis und Identifizierung von Brotschimmel	75
4.2.3	Mykotoxikologische Untersuchungen von natürlich verschimmeltem Brot	76
4.2.3.1	Nachweis von Fumonisinen	76
4.2.3.1.1	Enzymimmunologischer Nachweis von Fumonisinen (FB_1-Äquivalenten)	76
4.2.3.1.2	Chromatographischer Nachweis von Fumonisinen	85
4.2.3.2	Enzymimmunologische Untersuchung auf Isofumigaclavin A	88
4.2.3.2.1	GEA-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	88
4.2.3.2.2	Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	89
4.3	**Schimmelpilzbefall von Käse**	**92**

4.3.1	Orientierende Untersuchungen zum Schimmelpilzwachstum auf Käse	92
4.3.2	Qualitativer Nachweis und Identifizierung von Käseschimmel	95
4.3.3	Mykotoxikologische Untersuchung von natürlich verschimmeltem Käse auf Isofumigaclavin A	97
4.3.3.1	Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)	97
4.3.3.2	IsoFuA-EIA	100
4.4	**Enzymimmunologische Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen auf Isofumigaclavin A**	**102**
5	**DISKUSSION**	**103**
5.1	**Schimmelpilzbefall von Brot**	**104**
5.2	**Schimmelpilzbefall von Käse**	**109**
5.3	**Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen**	**110**
5.4	**Schlussfolgerung**	**111**
6	**ZUSAMMENFASSUNG**	**114**
7	**SUMMARY**	**117**
8	**LITERATURVERZEICHNIS**	**119**
9	**DANKSAGUNG**	**152**
10	**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**	**153**

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Besondere Beurteilungsmerkmale für ausgewählte, gängige Brotsorten mit entsprechenden Verkehrsbezeichnungen gemäß der Leitsätze für Brot und Kleingebäck des deutschen Lebensmittelbuches	3
Tabelle 2:	Einteilung der Käsegruppen in Abhängigkeit des Wassergehaltes in der fettfreien Käsemasse nach § 6 Abs. 2 KäseV	17
Tabelle 3:	Einteilung in Fettgehaltsstufen in Abhängigkeit des Fettgehaltes in der Trockenmasse nach § 5 KäseV	17
Tabelle 4:	Richtwerte für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel nach (2006/576/EG)	34
Tabelle 5:	Relative Kreuzreaktion des FB_1-Antikörpers mit strukturverwandten Fumonisinanaloga im kompetitiven direkten FB_1-EIA (USLEBER, 1997)	45
Tabelle 6:	Relative Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers mit strukturverwandten Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten EIA	46
Tabelle 7:	Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C. Insgesamt wurde blaugrüner Brotschimmel auf 5 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.	72
Tabelle 8:	Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C. Insgesamt wurde blaugrüner Brotschimmel auf 15 von 30 Broten, schwarzer Brotschimmel auf 9 von 30 Broten sowie orangefarbener Brotschimmel auf 4 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.	73

Tabelle 9:	Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C. Insgesamt wurde schwarzer Brotschimmel auf 12 von 30 Broten, blaugrüner Brotschimmel auf 7 von 30 Broten sowie orangefarbener Brotschimmel auf 2 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.	73
Tabelle 10:	Verteilungsmuster der Fumonisingehalte in schwarzem Pilzmycel sowie in Brot mit schwarzem Schimmelrasen und überwiegend schwarz verschimmeltem Brot mit weißgelben und blauen Anteilen in Abhängigkeit zur Lagerungstemperatur.	80
Tabelle 11:	Verteilungsmuster der Fumonisingehalte in Abhängigkeit der Mycelfarbe	84
Tabelle 12:	Wiederfindungsraten für FB_1 in künstlich kontaminiertem Brot	85
Tabelle 13:	Vergleich von Analysen mittels HPLC und EIA	86
Tabelle 14:	Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Brot	91
Tabelle 15:	Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Käse bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C	95
Tabelle 16:	Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Käse	100
Tabelle 17:	Vergleichende Darstellung der Messwerte mittels Enzymimmuntest für Ergonovin und IsoFuA	101
Tabelle 18:	Wiederfindungsraten von Ergonovin in künstlich kontaminiertem Schmelzkäse	102

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Strukturformeln von Fumonisin B_1 und Fumonisin B_2	29
Abbildung 2:	Strukturformeln des Ergolin-Grundgerüstes, Ergonovin, Fumigaclavin A und Isofumigaclavin A	38
Abbildung 3:	Strukturformeln des Ergolin-Grundgerüstes sowie der Ergolin-Verbindungen Ergonovin und Isofumigaclavin A	46
Abbildung 4:	Derivatisierung von FB_1 mit OPA-Reagenz bei einem pH-Wert von 10 (Abbildung nach KLAFFKE, 2002)	56
Abbildung 5:	Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von FB_1 unter Verwendung polyklonaler Antikörper (FB_1-Antiserum, Pool 11. – 20. Woche, gefällt). Nach Auswertung von 30 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,19 ± 0,06 ng/ml.	66
Abbildung 6:	Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum generischen Nachweis von Ergotalkaloiden unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 9 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 1,2 ± 0,16 ng/ml.	66
Abbildung 7:	Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergonovin unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 38 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,08 ± 0,02 ng/ml.	67
Abbildung 8:	Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von IsoFuA unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 4 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,69 ± 0,07 ng/ml.	67
Abbildung 9:	Verschimmeltes Weißbrot mit schwarzgelbem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB_1-Äquivalente) betrug 18 µg/g (Lagerung: 22 Tage bei 24 °C).	69

Abbildung 10: *A. niger* aus oben abgebildetem, schwarzgelb verschimmeltem Weißbrot (Abb. 9), angezüchtet auf Malzextrakt-Agar (7 Tage bei 24 °C bebrütet). 69
Abbildung 11: *A. niger*-Konidiophor aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem schwarzgelb verschimmeltem Weißbrot (Abb. 9) (40fache Vergrößerung) 70
Abbildung 12: Verschimmeltes Roggenmischbrot mit blauem, schwarzem und weißgelbem Mycel (Lagerung: 56 Tage bei 21 °C) 71
Abbildung 13: Konidiophor von *Penicillium* spp. aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem blauweiß verschimmeltem Roggenmischbrot (Abb. 12) (40fache Vergrößerung) 71
Abbildung 14: Prozentualer Anteil verschiedener Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C auf Brot gewachsenen Schimmelpilzkolonien ($n_K = 56$). Auf allen 30 Broten, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden. 74
Abbildung 15: Prozentualer Anteil verschiedener Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C auf Brot gewachsenen Schimmelpilzkolonien ($n_K = 45$). Auf allen 30 Broten, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden. 74
Abbildung 16: Verschimmelte Weißbrotscheibe mit orangefarbenem Wachstum (*N. tetrasperma*, links) und schwarzgelbem Wachstum (*A. niger*, rechts) (Lagerung: 8 Tage bei 21 °C) 75
Abbildung 17: Konidiosporen von *N. tetrasperma* aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem Weißbrot (Abb. 16) mit orangefarbenem Schimmelbefall (40fache Vergrößerung) 75

Abbildung 18: a) Roggenbrot mit schwarzgelbem und weißblauem Schimmelpilzwachstum, (Lagerung: 9 Tage bei 24 °C). b) In (a) abgebildetes Roggenbrot mit deutlicher Ausbreitung des Schimmelrasens nach 15 Tagen Lagerung bei 24 °C. Die jeweiligen Brotsegmente enthielten folgende Fumonisingehalte (FB_1-Äquivalente): schwarz verschimmelte Anteile: 2.650 ng/g, gelb verschimmelte Anteile: 269 ng/g, blau verschimmelte Anteile: 249 ng/g. 78

Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Fumonisingehalte in Abhängigkeit zur Lagerungstemperatur (links: 21 °C, rechts: 24 °C). Die Messwerte wurden mittels FB_1-EIA in schwarzem Pilzmycel sowie in Brot mit schwarzem Schimmelrasen und in überwiegend schwarz verschimmeltem Brot mit weißgelben und blauen Anteilen ermittelt. 79

Abbildung 20: Verschimmeltes Weizenmischbrot mit orangegelbem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB_1-Äquivalente) lag bei 0,2 µg/g (Lagerung: 9 Tage bei 21 °C). 81

Abbildung 21: Verschimmeltes Vollkornbrot mit gelbweiß, -blauem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB1-Äquivalente) betrug 0,09 µg/g (Lagerung: 28 Tage bei 21 °C). 82

Abbildung 22: Verschimmeltes Roggenmischbrot mit blauweißem Mycel. Fumonisine (FB_1-Äquivalente) waren nicht nachweisbar (< 2 ng/g) (Lagerung: 26 Tage bei 21 °C). 82

Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der Fumonisingehalte in unterschiedlichen Mycelien. Die Messwerte wurden mittels FB_1-EIA in überwiegend schwarz (links), orangefarben (Mitte) und blau bzw. blaugrün (rechts) verschimmelten Broten ermittelt. 84

Abbildung 24: HPLC-FLD-Chromatogramm einer fumonisinfreien Brotprobe (Probe 3347, Brot mit kleinen blauen Mycel-Arealen, 21 °C, 30 Tage gelagert) 87

Abbildung 25: HPLC-FLD-Chromatogramm von künstlich mit FB_1, FB_2 und FB_3 kontaminiertem Brot. Die Injektionsmenge aller drei Toxine lag bei 25 ng. 87

Abbildung 26: HPLC-FLD-Chromatogramm von „natürlich“ auf Brot gewachsenem schwarzem Mycel (Probe 3284, schwarzes Mycel, 24 °C, 34 Tage gelagert). Der mittels HPLC bestimmte Gehalt dieser Probe für FB_2 lag bei 14,5 µg/g. 88

Abbildung 27: a) Leerdammer Käse mit schwarzem Pilzmycel nach unbekannter Lagerungszeit und Lagerungstemperatur im Lebensmittelgeschäft.
b) Der in (a) abgebildete Käse nach weiteren 13 Tagen Lagerung bei einer Temperatur von 7 °C 93

Abbildung 28: Schweizer Appenzeller mit braunbeigefarbenem Schimmelpilzmycel nach 35 Tagen Lagerung bei 7 °C. IsoFuA war nicht nachweisbar. 94

Abbildung 29: Prozentualer Anteil visuell detektierter Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C auf Käse gewachsenen Schimmelpilzkolonien (n_K = 104). Auf allen 46 Käseproben, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden. 94

Abbildung 30: Typische pinselförmige Konidiophore mit Konidiosporen der Schimmelpilzgattung *Penicillium*, *P. roqueforti*-Isolat aus Pilzmycel des in Abb. 33 dargestellten Tilsiter Käses (40fache Vergrößerung). 96

Abbildung 31: a) Butterkäse mit schwarzem Pilzmycel nach zehn Wochen Lagerung bei 7 °C, die rechnerische IsoFuA-Belastung betrug 26,7 ng/g (Ergonovin- Messwert: 5,9 ng/g), Fumonisin war nicht nachweisbar.
b) Konidiophor von *Aspergillus* spp., aus Pilzmycel des in (a) abgebildeten Käses bei 40facher Vergrößerung 96

Abbildung 32: Bio-Wiesentaler Käse, 29 Tage bei einer Temperatur von 7 °C gelagert. Der rechnerische IsoFuA-Gehalt betrug 21,5 ng/g (Ergonovin-Messwert: 4,75 ng/g). 98

Abbildung 33: a) Tilsiter Käse mit blauem Schimmelpilzmycel nach 14 Tagen Lagerung bei 7 °C
b) Farbwechsel des Mycels von blau zu grau nach weiteren zwei Wochen Lagerung
Die rechnerische IsoFuA-Belastung stieg innerhalb dieses Zeitraumes von 29,71 ng/g (a) auf 546,65 ng/g (b) an (Ergonovin-Messwerte: von 6,56 ng/g auf 120,7 ng/g). 98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	*Aspergillus*
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ABAS	Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACN	Acetonitril
ATA	Alimentäre toxische Aleukämie
a_w	Activity of water (Wasseraktivität)
B/B_0 x 100	Relative prozentuale Extinktion
BAnz	Bundesanzeiger
BGBl	Bundesgesetzblatt
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C.	*Claviceps*
ca.	circa
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
e. V.	eingetragener Verein
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme Immunoassay (Enzymimmuntest)
ELEM	Equine Leukoenzephalomalazie
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay (Enzymimmunoassay)
ESI	Electrospray ionization (Elektronenspray-Ionisation)
F.	*Fusarium*

FAO	Food and Agriculture Organization (Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen)
FB_1	Fumonisin B_1
FB_2	Fumonisin B_2
FB_3	Fumonisin B_3
FB_4	Fumonisin B_4
FB_6	Fumonisin B_6
FDA	Food and Drug Administration
FLD	Fluoreszenzdiagnostik
FuA	Fumigaclavin A
FuB	Fumigaclavin B
FuC	Fumigaclavin C
FuD	Fumigaclavin D
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GEA	Generic Ergot Alkaloid (Gesamt-Ergotalkaloide)
GfK	Gesellschaft für Konsumforschung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMBl	Gemeinsames Ministerialblatt
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRAS	generally regarded as safe (allgemein als sicher erachtet)
HCl	Hydrochlorid
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Hemisuccinat
i.p.	intraperitoneal
IARC	International Agency for Research on Cancer (Internationale Agentur für Krebsforschung)
Ig	Immunglobulin
IsoFuA	Isofumigaclavin A
IsoFuB	Isofumigaclavin B
ITS	Internal transcribed spacer

JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe)
KäseV	Käseverordnung
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
l	Liter
LAG	Bund/Länder Arbeitsgemeinschaft Gentechnik
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
LD_{50}	Mittlere letale Dosis
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
max.	maximal
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
n. Chr.	nach Christi Geburt
N.	*Neurospora*
n. n.	nicht nachweisbar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n_K	Anzahl der gewachsenen, visuell festgestellten Schimmelpilzkolonien

NOAEL	No observed adverse effect level (maximale Konzentration oder Dosis eines Stoffes, die Organismen (z. B. Versuchstieren) unter bestimmten Versuchsbedingungen verabreicht werden kann, ohne erkennbare toxische Wirkungen (z. B. Tumore) hervorzurufen)
Nr.	Nummer
OPA/MCE	o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol (Derivatisierungsreagenz)
OTA	Ochratoxin A
p. a.	pro analysi (zur Analyse)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
P.	*Penicillium*
pH	pondus/potentia Hydrogenii (Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung)
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake (vorläufige tolerierbare tägliche Aufnahmemenge)
PPE	Porcine Pulmonary Edema
P50	50stes Perzentil
Rf	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	Reversed-phase HPLC (Umkehrphase-HPLC)
s	Standardabweichung
SAX	strong-anion-exchange (starker Anionenaustauscher)
SCF	Scientific Committee on Food (wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der Europäischen Kommission)
S.	*Scopulariopsis*
sec.	Sekunde
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
spp.	Species pluralis
t	Tonne
TDI	Tolerable daily intake (tolerierte Tagesdosis)
TM	Trockenmasse
TMB	Tetramethylbenzidin
*t*R	Retentionszeit
TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe

UV	Ultraviolett
v/v	Volume per Volume
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
x_{max}	Maxima
x_{min}	Minima
YES	Yeast extract sucrose (Hefeextrakt-Saccharose)
z. B.	zum Beispiel
ZMB	Zentrale Milchmarkt Berichterstattung GmbH

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Seit Beginn der Nahrungsmittelbevorratung muss sich der Mensch mit dem Problem der begrenzten Haltbarkeit bzw. dem Verderb von Lebensmitteln auseinandersetzen. In erster Linie wird dieser durch mikrobielle Kontaminationen mit ubiquitär vorkommenden Schimmelpilzen oder Bakterien verursacht. Während das Risiko von Schimmelbefall und der damit möglicherweise verbundenen Mykotoxinbildung im Bereich der Urproduktion (preharvest) und der technologischen Lebensmittelverarbeitung (postharvest) vergleichsweise gut untersucht ist, liegen relativ wenige Untersuchungen zur Situation im Verbraucherhaushalt vor.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Mykotoxinbildung aufgrund von Schimmelbefall von Lebensmitteln während ihrer Lagerung im Haushalt. Besonders Brot und Käse haben hier große Bedeutung, da sie einerseits Grundnahrungsmittel sind, andererseits aber auch zu denjenigen Lebensmitteln gehören, die am häufigsten von Schimmelbefall betroffen sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie Brot und Käse unter ungezielten, haushaltsnahen Bedingungen gelagert und die Entwicklung des Befalls mit Schimmelpilzen beobachtet. Anhand des Nachweises einiger als Indikatoren ausgewählter Mykotoxine sollte in diesen Lebensmitteln das Risiko geprüft werden, das von Toxinen ausgeht, die insbesondere durch „Haushaltsschimmel“ wie Aspergillen und Penicillien gebildet werden.

Ein weit verbreiteter, typischer „Haushaltsschimmel“ ist *Penicillium* (*P.*) *roqueforti*. Dieser kann auch unter „Kühlschrankbedingungen“ wachsen und zahlreiche Mykotoxine bilden (MÜCKE und LEMMEN, 2004). Daher wurde unter haushaltsähnlichen Bedingungen geprüft, ob und inwieweit ein solcher Befall von Brot und Käse mit einer Toxinbildung einhergeht. Als Markertoxin wurde hierbei die Bildung von Isofumigaclavin A (IsoFuA) untersucht. Des Weiteren gehört auch *Aspergillus* (*A.*) *niger* aufgrund seines ubiquitären Auftretens zu den häufig im Haushalt zu findenden Lebensmittelverderbern (FLANNIGAN et al., 2001; SCHUSTER et al., 2002). Da *A. niger* in der Lage ist, das Mykotoxin Fumonisin B_2 (FB_2) zu bilden (FRISVAD et al., 2007c), sollten in der vorliegenden Studie schimmelbefallene Brot- und Käseproben auf eine FB_2-Belastung untersucht werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Brot

2.1.1 Allgemeines

Funde aus Russland, Tschechien und Italien belegen, dass die Technik des Backens dem Menschen bereits seit der Steinzeit bekannt ist (STANG, 2010). In der Schweiz fanden Archäologen das bislang älteste Brot, dessen Alter auf etwa 5.500 Jahre geschätzt wurde (ZIEHR et al., 1984). Bereits im 3. Jahrtausend v. Chr. war Brot ein wichtiges Grundnahrungsmittel in Ägypten. Die Griechen übernahmen die „Brotkultur“ und gaben sie an die Römer weiter, welche die Technik weiterentwickelten und optimierten (ZIEHR et al., 1984; EISELEN und BECKER, 1995). Heute lautet die in den LEITSÄTZE FÜR BROT UND KLEINGEBÄCK (1993) des deutschen Lebensmittelbuches formulierte Definition für Brot wie folgt:

> „Brot wird ganz oder teilweise aus Getreide und/oder Getreideerzeugnissen, meist nach Zugabe von Flüssigkeit sowie von anderen Lebensmitteln (z. B. Leguminosen-, Kartoffelerzeugnisse) in der Regel durch Kneten, Formen, Lockern, Backen oder Heißextrudieren des Brotteiges hergestellt. Brot enthält weniger als 10 Gewichtsteile Fett und/oder Zuckerarten auf 90 Gewichtsteile Getreide und/oder Getreideerzeugnisse.“ (LEITSÄTZE FÜR BROT UND KLEINGEBÄCK, 1993)

In Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Getreide werden auf dem Markt unterschiedliche Brotsorten angeboten. Tabelle 1 bietet eine Übersicht der Beurteilungsmerkmale gängiger Brotarten mit ihrer entsprechenden Verkehrsbezeichnung.

Tabelle 1: Besondere Beurteilungsmerkmale für ausgewählte, gängige Brotsorten mit entsprechenden Verkehrsbezeichnungen gemäß der Leitsätze für Brot und Kleingebäck des deutschen Lebensmittelbuches*

Verkehrsbezeichnung	**Getreideart**	**Anteil in %**
Weizenbrot	Weizenmehl	mindestens 90
Weizenmischbrot	Weizenmehl	> 50 - < 90
Roggenbrot	Roggenmehl	mindestens 90
Roggenmischbrot	Roggenmehl	> 50 - < 90
Weizenvollkornbrot	Weizenvollkornerzeugnisse	mindestens 90
Vollkornbrot	Roggen- und Weizenvollkornerzeugnisse	mindestens 90
Hafervollkornbrot	Hafervollkornerzeugnisse	mindestens 20
	Vollkornerzeugnisse insgesamt	mindestens 90
Schrotbrot	Roggen	mindestens 90
Weizenroggenschrotbrot	Weizenbackschrot	> 50
Roggenweizenschrotbrot	Roggenbackschrot	> 50
Pumpernickel	Roggenbackschrot und/oder Roggenvollkornschrot	mindestens 90
Toastbrot	Weizenmehl	mindestens 90
Weizenvollkorntoastbrot	Weizenvollkornerzeugnisse	mindestens 90
Weizenmischtoastbrot	Weizenmehl	> 50 - < 90
Roggenmischtoastbrot	Roggenmehl	> 50 - < 90
Vollkorntoastbrot	Weizen- und Roggenvollkornerzeugnisse	mindestens 90
Dinkelbrot	Dinkelerzeugnisse	mindestens 90
Triticalebrot	Triticaleerzeugnisse	mindestens 90

*LEITSÄTZE FÜR BROT UND KLEINGEBÄCK vom 19.10.1993 (Beilage zum BAnz. Nr. 58 vom 24.03.1994, GMBl. Nr. 10 S. 346 vom 24.03.1994), zuletzt geändert am 19.09.2005 (BAnz. Nr. 184 vom 28.09.2005, GMBl. Nr. 55 S. 1125).

Zusätzlich unterscheidet man zwischen gesäuerten und ungesäuerten Broten. Die Definition des für gesäuerte Brote verwendeten Sauerteiges wird in den LEITSÄTZE FÜR BROT UND KLEINGEBÄCK (1993) wie folgt formuliert:

> „Sauerteig ist ein Teig, dessen Mikroorganismen (z. B. Milchsäurebakterien, Hefen) aus Sauerteig oder Sauerteigstartern sich in aktivem Zustand befinden oder reaktivierbar sind. Sie sind nach Zugabe von Getreideerzeugnissen und Wasser zur fortlaufenden Säurebildung befähigt.“ (LEITSÄTZE FÜR BROT UND KLEINGEBÄCK, 1993)

Nach Angaben des ZENTRALVERBANDES DES DEUTSCHEN BÄCKER-HANDWERKS E. V. (2015b) bedürfen Weizenmischbrote keiner Säuerung. In der Regel wird bei Weizenbroten, wie Weißbrot, Toastbrot oder Weizenvollkornbrot, zur Teiglockerung hauptsächlich Backhefe verwendet. Roggenmischbrote sind hingegen typische Sauerteigbrote. Zusätzlich werden Brote, welche sich durch besondere Mahlprodukte, pflanzliche oder tierische Zusätze oder Back- und Teigführungsverfahren auszeichnen, als Spezialbrote bezeichnet. Vor einigen Jahren bestimmte die Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung rund 300 verschiedene Brotsorten. Diese Zahl dürfte aktuell überholt sein, jedoch sind keine neueren offiziellen Zahlen bekannt (ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E.V., 2015b).

2.1.2 Wirtschaftliche Aspekte

Der ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E. V. (2015a) veröffentlicht alljährlich die jeweils aktuellen, durch die Gesellschaft für Konsumforschung (GfK) erhobenen Daten des Vorjahres für den deutschen Brotmarkt. Im Jahr 2014 konsumierten deutsche Haushalte rund 1.832.000 Tonnen Brot; eine Abnahme von 3,9 % gegenüber dem Vorjahr. Dies kann zum einen auf den erneut angestiegenen Brotpreis als auch auf die rückläufige demografische Entwicklung zurückgeführt werden. Im Jahre 2014 lag die sogenannte Käuferreichweite für Brot bei 98,8 %, das heißt nur 1,2 % der deutschen Bevölkerung konsumieren kein Brot. Dieser Wert ist seit Jahren stabil

und spiegelt deutlich den Stellenwert von Brot in der Gesellschaft wieder (ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E. V., 2015a). Mit einem Anteil von 33,7 % wurden im Jahr 2014 in Deutschland überwiegend Mischbrote gekauft. Zusätzlich setzte sich der Brotkorb der Deutschen zu 19,3 % aus Toastbrot, zu 15,4 % aus Brot mit Körner und Saaten, zu 10,3 % aus Vollkorn-/Schwarzbrot, zu 5,4 % aus Weizenbrot, zu 5,4 % aus Roggenbrot und zu 10,4 % aus sonstigen Brotsorten zusammen (ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E. V., 2015a).

2.1.3 Schimmelpilzwachstum auf Brot

Die meisten Brotsorten sind aufgrund günstiger Wachstumsbedingungen (Feuchte, Nährstoffe) anfällig für einen Schimmelbefall (LIU et al., 2011). Zahlreiche Vertreter der Schimmelpilzgattung *Penicillium* zählen zu den typischen Brotschimmeln im Haushalt. Insbesondere *P. carneum*, *P. paneum*, *P. corylophilum* und *P. roqueforti* sowie *Eurotium repens*, *Eurotium rubrum* und verschiedene Hefepilze sind häufig am Brotverderb beteiligt (SPICHER, 1985; FILTENBORG et al., 1996). *A. flavus*, *A. niger, P. commune, P. solitum, P. decumbens, Paecilomyces variotii*, *Mucor* spp. (FILTENBORG et al., 1996) und *Neurospora* spp. können ebenfalls gelegentlich aus Brot isoliert werden (SHEAR und DODGE, 1927).

2.1.3.1 *Penicillium* spp.

2.1.3.1.1 Allgemeine Charakterisierung von *Penicillium* spp.

Penicillium spp. sind seit mehr als 200 Jahren bekannt und werden systematisch den Schlauchpilzen, Ascomyceten, Ordnung *Eurotiales* zugeordnet (RAPER und THOM, 1949; GEISER et al., 2006; REIß, 2009). Der Gattungsname *Penicillium* leitet sich von dem lateinischen Wort *penicillus*, der Pinsel, ab. Er wurde durch die charakteristische

Anordnung der Konidiophoren, welche pinselartig aus Rami, Metulae und Phialiden aufgebaut sind, geprägt (REIß, 2009). Aus diesem Grund werden Penicillien umgangssprachlich auch als Pinselschimmel bezeichnet. Das Mycel stellt sich als ein stark verzweigtes Netz septierter Hyphen dar und zeichnet sich überwiegend durch eine grünblaue Färbung aus (RAPER und THOM, 1949). In der Regel verfügen Vertreter der Gattung *Penicillium* über ein speziesspezifisches Metabolitenprofil (FRISVAD und SAMSON, 2004).

2.1.3.1.2 Systematik von *Penicillium* spp.

Es sind derzeitig ca. 235 *Penicillium*-Arten bekannt, deren Unterscheidung primär anhand ihrer Morphologie erfolgt (REIß, 2009). In klassischen Monografien werden sie oft als asymmetrische, in drei Äste gegliederte Schimmelpilze beschrieben. Im Laufe der Forschungsgeschichte wurden von verschiedenen Autoren differierende Klassen-einteilungen aufgestellt (SAMSON et al., 2004). Die systematische Aufgliederung „Manual of *Penicillium*“ von RAPER und THOM (1949) galt lange Zeit als das Standardwerk für Penicillien. In der praktischen Anwendung dieser Taxonomie ergaben sich jedoch Probleme. Aufgrund einer Überbetonung der Farb- und Texturbeschaffenheit der einzelnen Kolonien wurden nahe verwandte Stämme sehr genau unterschieden, die jedoch teilweise erhebliche Gemeinsamkeiten in ihrer Mikromorphologie aufwiesen (SAMSON und GAMS, 1984). Daher erfolgte eine Berichtigung durch weitere Spezieskonzepte, die sich primär auf die Mikromorphologie stützten (SAMSON et al., 1977). Zusätzlich führten dünnschichtchromatographische Untersuchungen sekundärer Metaboliten, insbesondere von Mykotoxinen, zu vielversprechenden Ergebnissen. Diese ließen wichtige taxonomische Zusammenhänge erkennen (FRISVAD und FILTENBORG, 1983). FRISVAD et al. (1984) erkannten, dass teilweise Parallelen zu charakteristischen Pigmentierungen bestehen, sodass auf einen Zusammenhang zwischen Metaboliten und dem Phänotyp geschlossen werden konnte. Dies bedeutete eine Aufhebung der Grenzen zwischen morphologischer und chemischer Taxonomie (SAMSON und GAMS, 1984). Eine Kombination der verfügbaren Aussagen über das Koloniewachstum, die mikromorphologische Erscheinung und das sekundäre Metabolitenprofil führte zu einem akzeptablen Spezieskonzept. Dieses wurde in den Jahren darauf von mehreren Autoren

durch weiterführende Molekularstudien codierender Gensequenzen ergänzt (SAMSON et al., 2004).

2.1.3.1.3 Vorkommen und Bedeutung von *Penicillium* spp.

Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* zeigen überwiegend im niedrigen Temperaturbereich ein vermehrtes Wachstum. Demzufolge treten sie vor allem in den gemäßigten Klimazonen auf. Allgemein tolerieren sie einen Temperaturbereich von 5 °C bis 37 °C, wobei die Mehrzahl der Penicillien bei 15 °C ein stärkeres Wachstum zeigt als bei 25 °C (FRISVAD und SAMSON, 2004). Zusätzlich verfügen die meisten Penicillien über eine ausgeprägte Salztoleranz und wachsen auch noch bei Kochsalzkonzentrationen von bis zu 5 % NaCl (FRISVAD und SAMSON, 2004). Vertreter der Gattung *Penicillium* können häufig aus dem Erdboden bzw. von organischem Abfallmaterial sowie von zahlreichen verdorbenen Lebensmitteln isoliert werden (RAPER und THOM, 1949). Einige Arten dieser Gattung besitzen die Fähigkeit, sekundäre Metaboliten wie z. B. Mykotoxine oder Antibiotika zu bilden (FRISVAD et al., 2004). Zusätzlich finden gewisse Gattungsvertreter Anwendung in der Biotechnologie (MÜCKE und LEMMEN, 2004; REIß, 2009).

2.1.3.1.4 Technologische Bedeutung von *Penicillium* spp. in der Industrie

Alexander Fleming entdeckte 1928 im Londoner Krankenhaus St. Mary's die antibakterielle Wirkung eines Schimmelpilzes, isolierte ihn und nannte den Wirkstoff Penicillin. Charles Thom identifizierte diesen später als einen zu *P. notatum* Westling nahe verwandten Stamm. Seither nimmt die Gewinnung von Penicillin G einen besonderen Stellenwert in der pharmazeutischen Industrie ein (RAPER et al., 1944). Die heutige Penicillinproduktion erfolgt jedoch aus Gründen der Effizienz durch Penicillien des *P. chrysogenum*-Stammes (REIß, 2009). Weitere antibiotisch wirkende Stoffwechselprodukte der Gattung *Penicillium* sind Patulin und Citrinin (RAPER et al., 1944). In der Regel ist die Bildung einzelner Stoffwechselprodukte nicht auf gewisse

Stämme beschränkt. So besitzen beispielsweise neben *P. griseofulvum* noch weitere Penicillien die Eigenschaft, das Antimykotikum Griseofulvin zu bilden (FRISVAD et al., 2004). Weitere pharmakologisch angewendete Sekundärmetaboliten sind Mycophenolsäure und das Statin Compactin. Letzteres wird zur Cholesterinsenkung eingesetzt. Mycophenolsäure ist ein stark wirksames Immunsuppressivum, das häufig nach Organtransplantationen angewendet wird (FRISVAD et al., 2004). Des Weiteren werden Penicillien nach genetischer Veränderung zur Produktion rekombinanter Fremdproteine wie z. B. ß-Glucanase, Cellulase, Glucose-Oxidase, Protease und Xylanase eingesetzt. Einige Penicillienspezies besitzen daher große Bedeutung für die Lebensmitteltechnologie (REIß, 2009).

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Penicillien in der Lebensmittelindustrie ist die Fermentation von Lebensmitteln tierischen Ursprungs durch die sogenannten Edelpilze. So ist *P. roqueforti* als fester Produktionsbestandteil in der Herstellung von Blauschimmelkäse, *P. camemberti* in der von Weißschimmelkäse etabliert. Weitere *Penicillium*-Stämme wie *P. nalgiovense* und *P. chrysogenum* werden zur Herstellung von Salami eingesetzt (REIß, 2009).

2.1.3.1.5 Bedeutung von *Penicillium* spp. als Lebensmittelverderber

Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* gehören zu den häufigsten Lebensmittelverderbern unter den Mikropilzen (MÜCKE und LEMMEN, 2004). Häufig sind Brot, Käse, Nüsse, Zwiebeln, verschiedene Getreidearten, Zitrusfrüchte und Kernobst wie Äpfel, Pflaumen, Aprikosen oder Pfirsiche betroffen (RAPER und THOM, 1949; FRISVAD und SAMSON, 2004; BARKAI-GOLAN und PASTER, 2008). Neben der Verursachung von Farb-, Aroma- und Strukturverlust der befallenen Lebensmittel bilden zahlreiche Penicillienspezies Mykotoxine, die das Lebensmittel zum Teil weit infiltrieren können (FILTENBORG et al., 1996).

Beispielsweise kann *P. expansum* häufig aus verdorbenen Äpfeln isoliert werden. *P. expansum* bildet unter anderem das Mykotoxin Patulin, das auch nach der Verarbeitung

kontaminierter Äpfel im Endprodukt wie z. B. Apfelwein oder -saft nachweisbar ist (BARKAI-GOLAN und PASTER, 2008).

In der Regel zeichnet sich ein Schimmelbefall durch *Penicillium* spp. durch einen blaugrünen Pilzrasen auf dem Lebensmittel aus (RAPER und THOM, 1949). Aufgrund zahlreicher psychrothropher Gattungsvertreter bietet auch die Kühlung von Lebensmitteln keinen vollständigen Schutz vor einem *Penicillium*-Befall (FRISVAD und SAMSON, 2004; MÜCKE und LEMMEN, 2004).

2.1.3.2 *Aspergillus niger*

2.1.3.2.1 Allgemeine Charakterisierung von *Aspergillus niger*

A. niger ist systematisch den Ascomyceten, Ordnung *Eurotiales*, Genus *Aspergillus* zuzuordnen (GEISER et al., 2006; REIß, 2009). Er gehört der *A. niger*-Gruppe (*Aspergillus* Subgenus *Circumdati* Section *Nigri)* an, welche aus insgesamt achtzehn Spezies besteht (SAMSON et al., 2007; NIELSEN et al., 2009). *A. niger* wächst als filamentöser Pilz weltweit aerob auf organischem Material und ist häufig am Verderb zahlreicher Lebensmittel mit einhergehender Mykotoxinbildung beteiligt (MÜCKE und LEMMEN, 2004; NIELSEN et al., 2009). *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. carbonarius* und *A. ibericus* treten häufig auf, wohingegen die übrigen Spezies der *A. niger*-Gruppe eher selten und vornehmlich in tropischen Regionen wachsen (NIELSEN et al., 2009).

Die charakteristischen schwarzen Schimmelpilzsporen bieten effektiven Schutz vor Sonnenlicht und UV-Strahlung, wodurch *A. niger* einen Konkurrenzvorteil gegenüber anderen Schimmelpilzen erhält (ESTEBAN et al., 2004). Als opportunistischer Krankheitserreger kann er bei bestehender Immunsuppression zu schweren Infektionen führen (BAKER, 2006). Zusätzlich nehmen „schwarze Aspergillen“ einen bedeutenden Stellenwert in der Biotechnologie sowie in der Medizin- und Lebensmittelindustrie ein (SCHUSTER et al., 2002; SAMSON et al., 2007). Vergleichbar mit den Penicillien weisen

auch Vertreter der *A. niger*-Gruppe in der Regel ein speziesspezifisches Mykotoxinprofil auf (FRISVAD et al., 2007b; SAMSON et al., 2007).

2.1.3.2.2 Systematik von *Aspergillus niger*

Ähnlich wie für die Penicillien existieren auch für die Aspergillen mehrere taxonomische Systeme. Diese orientierten sich im letzten Jahrhundert vorrangig an der Farbgebung der Konidiosporen. Die *A. niger*-Gruppe beinhaltet mehrere, nur schwer voneinander abgrenzbare Spezies, die einheitlich braunschwarze Kolonien bilden. In der Regel wurden diese Spezies mit der Bezeichnung *A. niger* van Tieghem zusammengefasst (SCHUSTER et al., 2002). GAMS et al. (1985) stellten ein allgemein anerkanntes, speziesübergreifendes Schema für die Schimmelpilzgattung *Aspergillus* auf. In diesem erfolgte eine Eingliederung aller Spezies mit braunschwarzen Konidien in die Gruppe *Nigri* Subgenus *Circumdati* (GAMS et al., 1985). Innerhalb der *A. niger*-Gruppe war jedoch aufgrund hoher Ähnlichkeit kaum eine eindeutige Differenzierung anhand der Morphologie möglich. Deshalb wurde versucht, eine Spezieseinteilung auf molekularer Ebene vorzunehmen (VARGA et al., 1994; PAŘENICOVÁ et al., 1997). Dies erwies sich jedoch, teilweise aufgrund komplexer molekularer Ähnlichkeiten, ebenfalls als problematisch und verdeutlichte das hohe Maß an Variabilität innerhalb der *A. niger*-Gruppe (ABARCA et al., 2004). Auf der Basis von β-Tubulin- und Calmodulin-Genfrequenzen wurden schwarze Aspergillen in drei „Hauptstämme“ untergliedert (SAMSON et al., 2007; NIELSEN et al., 2009).

2.1.3.2.3 Vorkommen und Bedeutung von *Aspergillus niger*

In der Natur findet man *A. niger* bevorzugt aerob auf dem Erdboden, Abfallprodukten, Kompost- und verfaultem Pflanzenmaterial (SCHUSTER et al., 2002). Dementsprechend ist er häufig am Verderb zahlreicher Lebensmittel beteiligt (SCHUSTER et al., 2002; MÜCKE und LEMMEN, 2004). Ein Großteil der *A. niger*-Stämme verfügt über die Eigenschaft, Mykotoxine wie Fumonisin der B-Serie oder das Ochratoxin A (OTA) zu

bilden (FRISVAD et al., 2011). REIß (2009) veröffentlichte eine Datenübersicht bezüglich der Temperatur-, Wasser- und pH-Wert-Toleranz von Aspergillen. *A. niger* wächst in einem breiten Temperaturbereich von 6 °C bis 47 °C und ist somit sehr temperaturunempfindlich. Das Wachstumsoptimum liegt mit 35 °C bis 37 °C auf einem relativ hohen Niveau (SCHUSTER et al., 2002). Generell nimmt das Wachstum von *A. niger* mit steigender Temperatur zu. Ab 42 °C zeigt *A. niger* einen leichten Wachstumsrückgang (MOGENSEN et al., 2009). Unterhalb eines a_w-Werts von 0,88 wird sein Wachstum vollständig gehemmt. Des Weiteren verfügt er über eine ausgeprägte Säureresistenz und wächst bei Werten von pH 1,4-9,8 (SCHUSTER et al., 2002). Das ubiquitäre Vorkommen von *A. niger* wird zusätzlich durch die Bildung von Konidiosporen begünstigt, die durch die Luft verbreitet werden. Da *A. niger*, wie zuvor ausgeführt, auch bei relativ niedriger Wasseraktivität wächst und ein hohes Temperaturoptimum aufweist, kommt er vermehrt in warmen und humiden Regionen vor (RIPPEL-BALDES, 1955; REIß, 2009).

2.1.3.2.4 Technologische Bedeutung von *Aspergillus niger* in der Industrie

A. niger verfügt über einen bemerkenswert vielseitigen Metabolismus, der ihn zu einem der wichtigsten industriell genutzten Organismen macht (BAKER, 2006). *A. niger* gilt als einer der bedeutendsten Mikroorganismen in der Biotechnologie. Bereits im Jahre 1919 erkannte man sein Potenzial, Zitronensäure zu bilden. Noch heute wird *A. niger* als Zitronensäureproduzent in der Industrie eingesetzt und wird von der Food and Drug Administration (FDA) als offizielle Zitronensäurequelle aufgeführt (FDA, 2013b). Darüber hinaus wird *A. niger* auch in der Glucon- und Fumarsäureproduktion eingesetzt, welche jedoch einen untergeordneten Stellenwert einnimmt (ROUKAS, 2000).

Seit den sechziger Jahren wird *A. niger* zusätzlich zur Gewinnung verschiedener Enzyme genutzt, welche als technische Hilfsmittel in der Fruchtverarbeitung, dem Bäckerhandwerk und der allgemeinen Lebensmittelindustrie eingesetzt werden (SCHUSTER et al., 2002). In der Glucosesirup- und Alkoholindustrie wird vornehmlich das durch *A. niger* synthetisierte Enzym Amyloglucosidase zur Stärkehydrolysierung verwendet (SCHUSTER et al., 2002). Die Hemicellulase, die mittels Unterwasserkultivierung von *A. niger*

gewonnen wird, ist ein altbewährtes Hilfsmittel im Bäckerhandwerk und führt zu einer verbesserten Teig- und Oberflächenstruktur (BERKA et al. 1992). Auch in der Saft- und Weinindustrie werden Enzyme von *A. niger* genutzt. Pectinesterase, Endo- und Exopolygalacturonidase sowie Pektinlyase verringern durch Pektinabbau die Saftviskosität und verbessern die Saftklärung (GRASSIN und FAUGUENBERGUE, 1999). Die *A. niger* Glucose-Oxidase und -Katalase werden zur Blutzuckermessung in diagnostischen Enzymkits genutzt. Außerdem dienen sie der Entfernung von Glucose oder Sauerstoff aus Lebensmitteln sowie der Herstellung von Gluconsäure (BERKA et al., 1992). Experten der Food and Agriculture Organization (FAO) und der World Health Organization (WHO) haben sowohl die Enzymgewinnung als auch *A. niger* als Organismus selbst akzeptiert, eine tägliche Aufnahmeempfehlung jedoch als unklar eingestuft (SCHUSTER et al., 2002). Die FDA genehmigte in den USA den Einsatz zahlreicher Enzyme für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie (FDA, 2013a). Bereits in den frühen sechziger Jahren wurden Enzymen wie α-Amylase, Cellulase, Amyloglucosidase, Katalase, Lipase und Pectinase der Status „generally regarded as safe“ (GRAS) erteilt. Als Voraussetzung nannte die FDA die Verwendung ausnahmslos nicht pathogener und nicht toxischer *A. niger*-Stämme in Verbindung mit einer guten Anwendungspraxis. Zusätzlich erkannte die FDA die *A. niger* Carbohydrase und Cellulase als sekundäre direkte Lebensmittelhilfsstoffe in der Muschel- und Shrimpsproduktion an (FDA, 2013a). Seit den achtziger Jahren werden *A. niger*-Stämme zur industriellen Anwendung produziert. Dies erfolgte anfangs durch Isolierung klassisch mutierter Stämme. Sie wurden jedoch bald darauf von diploiden *A. niger*-Stämmen ersetzt, welche durch parasexuelle Kreuzung erzeugt wurden und unter anderem eine verbesserte Zitronensäuregewinnung erbrachten (DAS und ROY, 1978). Da *A. niger* sich durch einen sicheren industriellen Nutzen auszeichnet, eignet er sich in ähnlicher Weise wie Penicillien auch gut als Wirt fremdartiger Proteine. Viele kommerziell wichtige Gene und deren Regulationssequenzen wurden durch DNA-Transformation in industrielle Expressionssysteme geklont (SCHUSTER et al., 2002).

2.1.3.2.5 Sicherheitsaspekte von *Aspergillus niger*

Im Bundesarbeitsblatt 10/2002 wird in den technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe 460 (TRBA 460, 2002) vom Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe

(ABAS) *A. niger* der Risikogruppe 1 zugeordnet. Bei Pilzen dieser Risikogruppe wird eine Infektion des Menschen als eher unwahrscheinlich erachtet. Zusätzlich wird jedoch vermerkt, dass in Einzelfällen (überwiegend bei immunsupprimierten Menschen) *A. niger* als Krankheitserreger nachgewiesen bzw. aufgrund von nicht eindeutiger Identifizierung vermutet wurde. Des Weiteren wird auf die Pathogenität gegenüber Haus- und Nutztieren hingewiesen (TRBA 460, 2002). *A. niger* zählt einerseits zu den wichtigsten Mikropilzen in der Biotechnologie, andererseits tritt vor allem *A. niger* auch häufig als Lebensmittel- und Futtermittelverderber in Erscheinung (MÜCKE und LEMMEN, 2004). So wurde er des Öfteren vom Erdboden und von häuslichen Einrichtungsgegenständen isoliert. Wie in Kapitel 2.1.3.2.4 erwähnt, wurde vielen in der Industrie eingesetzten Stämmen der Status „GRAS“ zugesprochen (SCHUSTER et al., 2002; FRISVAD et al., 2011). Das Potenzial, Fumonisin sowie OTA zu bilden, war jedoch zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt (BLUMENTHAL, 2004). FRISVAD et al. (2011) untersuchten *A. niger*-Stämme auf Mykotoxinbildung. Diese Untersuchungen ergaben, dass 81 % der *A. niger*-Stämme FB_2, FB_4 und FB_6 produzieren. OTA wurde hingegen nur von 17 % gebildet. Zu 10 % waren diese Stämme in der Lage sowohl Fumonisin als auch das OTA zu produzieren. Unter den industriell genutzten *A. niger*-Stämmen konnten bei 83 % FB_2, FB_3 und FB_6, bei 33 % OTA und bei 26 % beide Toxine nachgewiesen werden. Viele der biotechnologisch eingesetzten Stämme erwiesen sich als starke Fumonisinproduzenten (FRISVAD et al., 2011). In Hinblick auf diese Befunde empfehlen FRISVAD et al. (2011) zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit eine Überprüfung der industriell genutzten Stämme bezüglich Mykotoxinbildung. Zusätzlich weisen sie darauf hin, dass auch die Nährmedien, die zur Zitronensäureproduktion verwendet wurden, Fumonisin enthielten. Aus diesem Grund sei eine Weiterverwertung dieser Biomasse als Tierfutter kritisch zu beurteilen (FRISVAD et al., 2011).

2.1.3.2.6 Bedeutung von *Aspergillus niger* als Lebensmittelverderber

A. niger ist vor allem in wärmeren Regionen ein weitverbreiteter Schimmel auf Lebensmitteln. Er tritt überwiegend als Lagerungspilz in Erscheinung (RIPPEL-BALDES, 1955; ESTEBAN et al., 2004) und zeigt bevorzugtes Wachstum auf Substraten, die einen erhöhten Zucker- oder Salzgehalt bzw. eine niedrige Wasseraktivität aufweisen (FRISVAD

et al., 2007c). Entsprechend wurde sein Wachstum vor allem auf Gemüsesorten und Früchten wie Trauben, Mangos, Äpfeln, Trockenobst und Zwiebeln beschrieben. Des Weiteren konnte er von Getreidekörnern, Schwarzbrot, Cerealien, Erdnüssen, grünen Kaffeebohnen, Tee und Trockenfleischprodukten isoliert werden (FILTENBORG et al., 1996; ESTEBAN et al., 2004). Durch die mögliche Kontamination von Trauben können folglich auch Rosinen und Wein FB_2 enthalten (MÅNSSON et al., 2010). In der Regel geht das Wachstum von *A. niger* mit einer potenziellen FB_2-Belastung des Lebensmittels einher. Dabei sind vor allem Lebensmittel mit geringer Wasseraktivität anfällig für eine FB_2-Kontamination durch *A. niger* (FRISVAD et al., 2007c; SOARES et al., 2013).

2.1.3.3 *Neurospora* spp.

2.1.3.3.1 Allgemeine Charakterisierung von *Neurospora* spp.

Neurospora spp. gehören wie auch *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. den Ascomyceten an und werden der Familie *Sordariaceae* zugeteilt (DETTMAN et al., 2001). Schimmelpilze der Gattung *Neurospora* tragen ihren Namen aufgrund der longitudinalen Streifen ihrer Ascosporen, welche der Vertiefung neuronaler Axone ähneln (GRIFFITH und McCLUSKEY, 2004). *Neurospora* spp. zeichnen sich durch eine bemerkenswerte morphologische Vielfalt aus (DUTTA et al., 1976), sodass sie in ihrer Erscheinung zum Teil stark voneinander abweichen (DETTMAN et al., 2006). Beispielsweise bildet ein Stamm von *Neurospora* (*N.*) *crassa* anstelle von Mycel einen Schleim hefeartiger Zellen. Allgemein ist das Mycel meist schnell wachsend und von pudriger Textur. Aufgrund der orangefarbenen Konidien werden *Neurospora* spp. im Volksmund auch als orangefarbener bzw. roter Brotschimmel bezeichnet (SHEAR und DODGE, 1927; WEIDENBÖRNER, 2000; GRIFFITH und McCLUSKEY, 2004). Nach Lichtexposition wird in dem Pilz das orangefarbene Carotinoid Neurosporaxanthin gebildet. Dies häuft sich in den Konidien und dem Mycel an und dient zum Schutz vor UV-Strahlung (LUQUE et al., 2012). Als pseudohomothallische Spezies unterscheidet sich insbesondere *N. tetrasperma* anhand ihres 4-Ascosporen-Ascus von den übrigen homothallischen Gattungsvertretern, die einen

charakteristischen 8-Ascosporen-Ascus aufweisen (DUTTA et al., 1976; DETTMAN et al., 2001).

2.1.3.3.2 Vorkommen und Bedeutung von *Neurospora* spp.

Ascomyceten der Gattung *Neurospora* sind weltweit verbreitet, es lässt sich jedoch eine deutliche Präferenz für tropische bzw. subtropische Regionen erkennen. In der Natur wachsen *Neurospora* spp. vermehrt nach Waldbränden auf verbranntem organischem Material (LUQUE et al., 2012). In der Industrie lassen sich *Neurospora* spp. des Öfteren aus dem Umfeld von Holzfabriken und Bäckerstuben isolieren, wobei sie im Verdacht stehen, durch chronische Aspiration der fein pudrigen Luftsporen Asthma zu verursachen (CÔTÉ et al., 1991). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff des Bäckerschimmels bzw. Bäckerasthmas geprägt (WEIDENBÖRNER, 2000). Es bestehen jedoch bislang keine Berichte über eine Mykotoxinbildung und davon ausgehende Risiken für Mensch und Tier (PERKINS und DAVIS, 2000). *Neurospora* spp. sind ebenfalls bedeutende Industrieschimmel. Aufgrund ihrer hohen proteolytischen, lipolytischen und amylotischen Aktivität werden ausgewählte Stämme ebenfalls regelmäßig in der Lebensmittelfermentierung eingesetzt (WEIDENBÖRNER, 2000).

2.2 Käse

2.2.1 Allgemeines

Käse gehört zu den ältesten Lebensmitteln der Menschheit. Die Frage, wo und zu welcher Zeit der Mensch zum ersten Mal begonnen hat, Tiere zu melken und Milchprodukte herzustellen, konnte bis heute trotz aller archäologischen Funde nicht eindeutig geklärt werden. Milch wurde im 7. Jahrhundert v. Chr. zum ersten Mal erwähnt. Es ist wahrscheinlich, dass bereits zu diesem Zeitpunkt Käseherstellung ausgeübt wurde. In Mesopotamien wurden die bislang ältesten bildlichen Darstellungen des Melkvorgangs entdeckt (EEKHOF-STORK, 1979; NEUHAUS, 1992). Die Abbildung, deren Entstehung auf ca. 3000 v. Chr. geschätzt wird, zeigt das Melken einer Kuh, das Durchseihen der Milch sowie die Butterzubereitung. Von daher ist anzunehmen, dass auch die Weiterverarbeitung der Milch zu Käse bereits bekannt war (NEUHAUS, 1992). Auch existieren ca. 7000 Jahre alte Höhlenmalereien in Libyen, deren Zeichnungen eine frühe Käseherstellung erahnen lassen (EEKHOF-STORK, 1979). Bereits in der Antike galt Käse als Hauptnahrungsmittel der Griechen und Römer. Auch war es eine wichtige Handelsware im heutigen Oberitalien, Frankreich, der Schweiz, Österreich und Süddeutschland. Schon 1.000 n. Chr. wird der Schweizer Schabziger und der französische Roquefort erwähnt, im 11. bzw. 12. Jahrhundert dann auch der Edamer sowie der englische Chester. Im weiteren Verlauf wurden Parmesan, Gorgonzola und bald darauf der Emmentaler bekannt (NEUHAUS, 1992).

Käse besteht hauptsächlich aus Wasser, Eiweiß, Fett, Vitaminen und Mineralstoffen. Alle Bestandteile außer Fett gehören zur fettfreien Käsemasse (LANDESVEREINIGUNG DER MILCHWIRTSCHAFT NORDRHEIN-WESTFALEN E. V. (LV Milch NRW), o. J.). Die Käseverordnung teilt Käse anhand des Wassergehalts in der fettfreien Käsemasse bzw. des Fettgehalts in der Trockenmasse in verschiedene Gruppen ein (§ 6 Abs. 2 KäseV). Diese Gruppeneinteilung ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Der Fettgehalt wird beim Käse in Prozent der Trockenmasse angegeben. Da Käse während der Lagerung an Feuchtigkeit und damit an Gewicht verliert, kann der relative Fettgehalt während der Lagerung zunehmen. Das Verhältnis von Fettmenge zu Trockenmasse in einem Stück Käse bleibt während der

gesamten Zeit jedoch gleich (EEKHOF-STORK, 1979). In Tabelle 3 sind die Fettgehaltsstufen nach dem Fettgehalt in der Trockenmasse dargestellt (§ 5 KäseV).

Tabelle 2: Einteilung der Käsegruppen in Abhängigkeit des Wassergehaltes in der fettfreien Käsemasse nach § 6 Abs. 2 KäseV*

Käsegruppe	Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse (%)
Hartkäse	≤ 56
Schnittkäse	> 54 – 63
Halbfester Schnittkäse	> 61 – 69
Sauermilchkäse	> 60 – 73
Weichkäse	> 67
Frischkäse	> 73

*Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), zuletzt geändert durch Artikel 19 des Gesetzes vom 25. Juli 2013 (BGBl. I S. 2722).

Tabelle 3: Einteilung in Fettgehaltsstufen in Abhängigkeit des Fettgehaltes in der Trockenmasse nach § 5 KäseV*

Fettgehaltsstufe	Fettgehalt in der Trockenmasse (%)
Doppelrahmstufe	≤ 87 ≥ 60
Rahmstufe	≥ 50
Vollfettstufe	≥ 45
Fettstufe	≥ 40
Dreiviertelfettstufe	≥ 30
Halbfettstufe	≥ 20
Viertelfettstufe	≥ 10
Magerstufe	< 10

*Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), zuletzt geändert durch Artikel 19 des Gesetzes vom 25. Juli 2013 (BGBl. I S. 2722).

Schnittkäse kommen in Form von Kugeln oder als flache, runde bzw. längliche Laibe in den Handel. Halbfeste Schnittkäse besitzen meist eine Naturrinde, die mit Rotschmiere behandelt wurde oder eine Weißschimmelflora aufweist. In der Regel besitzen Hartkäse eine Reifezeit von mindestens 3 Monaten. Aufgrund des hohen Trockenmasseanteils und der höheren Fett- oder Vollfettstufe zeichnet sich der Hartkäse durch seine lange Lagerungsfähigkeit und Haltbarkeit aus. Um das Aroma zu erhalten und den Reifungsprozess nicht zu unterbrechen, wird empfohlen, Käse bei ca. 10 °C zu lagern (NEUHAUS, 1992).

2.2.2 Wirtschaftliche Aspekte

In den vergangenen zehn Jahren konnte ein stetiger Anstieg des Käsekonsums in Deutschland verzeichnet werden. So verzehrte der deutsche Bürger 2013, einer vorläufigen Rechnung nach, im Schnitt 24,4 kg Käse. Beschränkt auf den Konsum von Hart-, Schnitt-, halbfesten Schnitt- und Weichkäse belief sich der Konsum auf rund 11,5 kg pro Kopf. Der Verzehr von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen wies in Deutschland einen durchgehend stabilen Wert von durchschnittlich 1,5 kg pro Person auf (MILCHINDUSTRIE-VERBAND E.V., 2014, S. 63). Die Daten zeigen, dass sich Käse somit immer größerer Beliebtheit erfreut und in vielen Regionen einen festen Platz als Grundnahrungsmittel einnimmt. Die deutsche Käseproduktion konnte in den vergangenen zehn Jahren kontinuierlich gesteigert werden und belief sich 2013 auf 2.439.788 t (MILCHINDUSTRIE-VERBAND E.V., 2014, S. 64). Auch stellte Käse im Jahr 2012 mit einem wertmäßigen Anteil von 47 % den wichtigsten Exportartikel unter den deutschen Molkereiprodukten dar (ZENTRALE MILCHMARKT BERICHTERSTATTUNG GMBH, ZMB, 2013a). So hat sich insbesondere beim Käseexport der steigende Trend der Vorjahre mit einem Plus von 3,7 % weiter fortgesetzt (ZENTRALE MILCHMARKT BERICHTERSTATTUNG GMBH, ZMB, 2013b).

2.2.3 Schimmelpilzwachstum auf Käse

Viele Käsearten bieten ausgezeichnete Substratbedingungen zum Wachstum von Schimmelpilzen (MARTH und YOUSEF, 1991). So wurden bereits Vertreter der Schimmelpilzgattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* und *Mucor* von schimmelbefallenem Käse isoliert (TANIWAKI et al., 2001). Der Verderb von Käse ist zu 91 % auf die Schimmelpilzgattung *Penicillium* zurückzuführen (VALÍK et al., 1999). Auch die Edelschimmel *P. roqueforti* und *P. camemberti*, die – wie in Kapitel 2.1.3.1.4 erwähnt – vielfach in der Lebensmittelindustrie zur Käsefermentation eingesetzt werden, können durch ihr Wachstum zum Verderb von Schnittkäse führen (RAPER und THOM, 1949). Des Weiteren kommt es gelegentlich zum Wachstum von *P. commune*, *P. caseifulvum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. nalgiovense*, *P. solitum*, *P. echinulatum*, *P. discolor* und *P. palitans*. Letzterer besitzt unter anderem die Eigenschaft, die Mykotoxine Fumigaclavin A und B (FuA und FuB) auf Käse zu bilden (KURE und SKAAR, 2000; FRISVAD und SAMSON, 2004). *P. chrysogenum* und *P. nalgiovense* bilden eine Vielzahl an antibiotisch wirksamen Substanzen, unter anderem Penicillinsäure. Diese ist in Käse jedoch nicht stabil, sodass eine Belastung des Käses eher unwahrscheinlich ist. Entsprechendes gilt für Patulin und PR-Toxin (FILTENBORG et al., 1996; VALÍK et al., 1999; TANIWAKI et al., 2001). Als weitere Schimmelpilzgattungen sind gelegentlich *Aspergillus* spp., insbesondere *A. vesicolor* sowie *Scopulariopsis* (*S.*) *brevicaulis* am mykotischen Verderb von Käse beteiligt (FILTENBORG et al., 1996).

2.2.3.1 *Penicillium roqueforti*

2.2.3.1.1 Allgemeine Charakterisierung von *Penicillium roqueforti*

P. roqueforti setzt sich als sogenannter *P. roqueforti*-Komplex aus drei Spezies zusammen: *P. carneum* Frisvad, welcher des Öfteren von Fleisch, Käse und Brot isoliert werden konnte, *P. paneum* Frisvad, der vorrangig auf Brot oder Silage wächst, sowie *P. roqueforti* Thom, welcher bereits auf zahlreichen Lebensmitteln und Silage

nachgewiesen wurde (BOYSEN et al., 1996; O'BRIEN et al., 2006). *P. roqueforti* ist in der Natur weit verbreitet. Er wächst im Erdboden, auf verrotteten Pflanzenteilen und organischem Abfallmaterial. Zusätzlich ist er in der Lage, zahlreiche Mykotoxine zu bilden (EPA, 1997). *P. roqueforti* bildet flache Kolonien, deren Oberflächen sich in der Regel samtartig darstellen. Im weißen, schleierähnlichen Randbereich befinden sich keine Konidienträger. Zur Mitte hin besitzen die Kolonien eine grünblaue Färbung mit dunklem Mittelpunkt. In diesem Bereich erfolgt die Sporulation. Die 3,5 µm bis 5 µm großen Konidien sind rund und glatt ummantelt. Die pinselartigen Konidienträger sind entsprechend der Gattung *Penicillium* dreiwirtelig bisweilen auch vierwirtelig (RAPER und THOM, 1949).

Die meisten Penicillien werden durch Sorbinsäure und Benzoesäure gehemmt. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Mitglieder der Serie *Roqueforti* durch eine erhebliche Säureresistenz aus. Es wurde sogar über ein zum Teil gesteigertes Wachstum von *P. roqueforti* bei 1 %iger Propionsäure- und 0,5 %iger Essigsäurekonzentration berichtet. Es besteht die Vermutung, dass *P. roqueforti* Säure als weitere Kohlenstoffquelle zu nutzen vermag (FRISVAD und SAMSON, 2004). Des Weiteren ist *P. roqueforti* sehr gut an ein niedriges Sauerstoff- und erhöhtes CO_2-Angebot angepasst. Er zeigt beispielsweise auch bei einer 40 %igen CO_2- und 5 %igen O_2-Konzentration ein gutes Wachstum (TANIWAKI et al., 2001). Zusätzlich verfügt *P. roqueforti* über eine ausgeprägte Salztoleranz. Sein Wachstum wird erst ab einer Konzentration von 5 % NaCl gehemmt (FRISVAD und SAMSON, 2004).

2.2.3.1.2 Technologische Bedeutung von *Penicillium roqueforti* in der Industrie

P. roqueforti ist seit vielen Jahren ein wichtiger Bestandteil der Käseherstellung. Aufgrund seiner hervorragenden Substratanpassung und der Fähigkeit, proteolytische sowie lipolytische Enzyme zu bilden, nimmt *P. roqueforti* als Starterkultur in der Blauschimmelkäsefermentation eine bedeutende Rolle ein (ARNOLD et al., 1978; SIEBER, 1978; TANIWAKI et al. 2001). Er hat einen maßgeblichen Einfluss auf Aussehen, Geruch und Geschmack verschiedener Blauschimmelkäse wie beispielsweise Roquefort, Fromage Bleu, Blue Cheese, Gorgonzola, Stilton oder Gamalost (VALÍK et al.,

1999). Neben seinem bedeutenden Stellenwert als Reifungskultur stellt *P. roqueforti* in der Milchwirtschaft jedoch auch einen ernstzunehmenden Infektionserreger dar (EPA, 1997). Des Weiteren wird *P. roqueforti* in der Industrie zur Gewinnung von Aromastoffen, antibakteriellen Substanzen, Polysacchariden sowie zur Herstellung einiger Enzyme wie beispielsweise Proteasen genutzt (EPA, 1997).

2.2.3.1.3 Sicherheitsaspekte von *Penicillium roqueforti*

P. roqueforti bildet eine ganze Reihe an Mykotoxinen. So wurde bereits die Bildung von PR-Toxin, Patulin, Roquefortin C, IsoFuA und IsoFuB sowie Penicillin- und Mycophenolsäure beschrieben (OHMOMO et al., 1975; EPA, 1997). Daher werden zur Käsefermentation ausschließlich Stämme eingesetzt, denen allgemein der Sicherheitsstatus „GRAS“ zugesprochen wurde (VALÍK et al., 1999). Aufgrund des jahrelang bewährten Einsatzes von *P. roqueforti* in der Käsefabrikation wurde dieser von der US Environmental Protection Agency (EPA) als toxikologisch unbedenklich für den Menschen bewertet (EPA, 1997). SIEBER wies jedoch bereits 1978 auf den mangelnden Wissensstand bezüglich der Toxizität von IsoFuA hin, welches in Konzentrationen zwischen 0,2 µg/g und 4,7 µg/g in Blauschimmelkäse verschiedentlich nachgewiesen wurde.

2.2.3.1.4 Bedeutung von *Penicillium roqueforti* als Lebensmittelverderber

Als weitverbreiteter „Haushaltsschimmel“ wurde *P. roqueforti* bereits mehrfach als Verderbniserreger in verschiedenen Lebensmitteln beschrieben. Er konnte unter anderem von Fruchtsäften, Fetten, Brot, Bier, Beeren, Trauben, Oliven, Marmelade, Konfitüre, Reis sowie verschiedenen Wurst- und Käsesorten isoliert werden (SIEBER, 1978; NIELSEN et al., 2006a). Wie in Kapitel 2.2.3.1.1 erwähnt, verfügt *P. roqueforti* über eine ausgeprägte Säure-, Salz- und CO_2-Toleranz. Aus diesem Grund findet man ihn unter anderem oft auf Käsesorten wie dem norwegischen Semihartkäse Norvegia bzw. Jarlsberg, die in typischer Weise mit Milchsäure- bzw. Propionsäurebakterien fermentiert werden (KURE und SKAAR, 2000). Zusätzlich identifizierten TSAI et al. (1988) *P. roqueforti* als

Hauptverderbniserreger von Cheddar-Käse. Aufgrund seiner relativen Unempfindlichkeit besitzt *P. roqueforti* gegenüber anderen Schimmelpilzen einen deutlichen Wachstumsvorteil in säurekonservierten oder salzhaltigen Lebensmitteln (FRISVAD et al., 2004).

2.2.3.2 *Scopulariopsis* spp.

Pilze der Gattung *Scopulariopsis* kommen ubiquitär auf totem Pflanzenmaterial, Erdboden und Produkten tierischen Ursprungs vor. Vertreter dieser Gattung sind daher in erster Linie Saprophyten (MARCHISIO und FUSCONI, 2001). Ihre Konidien werden durch die Luft verbreitet und sind in geringen Konzentrationen in der Natur häufig nachweisbar (AIRAUDI und MARCHISIO, 1996; MARCHISIO und FUSCONI, 2001). Daher sind *Scopulariopsis* spp. häufig von einer Vielzahl an Substraten, insbesondere von proteinreichen Produkten wie Fleisch, Käse und Milch zu isolieren (BOTHAST et al., 1975; CUENCA-ESTRELLA et al., 2003). Vor allem organisches Material, das einen erhöhten Stickstoffgehalt aufweist, wie z. B. überreifer Käse, stellt ein bevorzugtes Substrat von *Scopulariopsis* spp. dar (BOTHAST et al., 1975). Insbesondere *S. brevicaulis* besitzt die Eigenschaft, einfache Stickstoffverbindungen wie Ammoniak oder Nitrat unter Bildung eines intensiven Ammoniakgeruchs zu verstoffwechseln (THOM und RAPER, 1932; BOTHAST et al., 1975).

S. brevicaulis weist eine hohe Ähnlichkeit zu Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* auf. Aus diesem Grund wurde er ehemals als *P. brevicaulis* bezeichnet (CHALLENGER und HIGGINBOTTOM, 1935). Mehrere Studien konnten ihm eine keratolytische Aktivität nachweisen. Dementsprechend wurde er bereits des Öfteren von zahlreichen tierischen Substraten wie Vogelfedern, Krallen, Säugerhaaren, Hufen und Hörnern isoliert (MARCHISIO et al., 2000). *S. brevicaulis* ist häufig sowohl primär als auch sekundär nach Dermatophytosen oder Traumata an Onychomykosen beteiligt (MARCHISIO und FUSCONI, 2001; LEE et al., 2012). MARCHISIO et al. (2000) wiesen darauf hin, dass nicht alle *S. brevicaulis*-Isolate keratolytisch wirken und es somit nicht als speziesspezifische Eigenschaft anzusehen sei. In einer weiteren Studie isolierten MARCHISIO und FUSCONI (2001) *Scopulariopsis* spp. aus der Außenluft sowie von Finger- und Fußnagelläsionen. In Untersuchungen auf Keratolyse wurde Haar von allen

Schimmelpilzisolaten angegriffen. Jedoch zeigten nur *S. brumptii*, *S. candida*, *S. carbonaria* und *S. koningii* auch keratolytische Aktivität (MARCHISIO und FUSCONI, 2001). Darüber hinaus wurde von *Scopulariopsis*-Infektionen der Weichteil-, Knochen- und Lungengewebe bei immunsupprimierten Patienten berichtet (KRISHER et al., 1995). Da Vertreter dieser Pilzgattung vornehmlich im Erdboden vorkommen, erfolgt die Infektion in erster Linie über die Haut oder durch die Aspiration von Sporen. WELSH und ELY (1999) berichteten über einen Hund, der an hochgradiger purulenter Meningitis und granulomatöser Milzentzündung litt. Nach Kultivierung der Gehirnzellen wurde *S. chartarum* isoliert und als mögliche Krankheitsursache diskutiert (WELSH und ELY, 1999). Im Vergleich hierzu konnte jedoch in Tierversuchen eindeutig nachgewiesen werden, dass einige *S. brevicaulis*-Isolate eine disseminierte Infektion bei Mäusen verursachen (CUENCA-ESTRELLA et al., 2003).

2.3 Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen

Laut Käseverordnung handelt es sich bei Schmelzkäse um „Erzeugnisse, die mindestens zu 50 Prozent, bezogen auf die Trockenmasse, aus Käse, auch unter Zusatz anderer Milcherzeugnisse, durch Schmelzen unter Anwendung von Wärme, auch unter Verwendung von Schmelzsalzen, und Emulgieren hergestellt sind“ (§ 1 Abs. 4.1 KäseV).

Schmelzkäse entstand aus dem Bedürfnis heraus, Käse auf einfache Weise länger haltbar und somit besser transportfähig zu machen (KIELWEIN und LUH, 1979). Dabei waren einige Allgäuer Käsereien richtungsweisend. Durch das Befüllen von Blechdosen mit Weichkäse und anschließendem Pasteurisieren gelang es ihnen, Käse zu konservieren (KIELWEIN und LUH, 1979). Die Schmelzkäseherstellung erfolgt auch heute noch nach altbewährtem Grundprinzip. Junge sowie gereifte Käseanteile werden zu einer einheitlichen Käsemasse fein zermahlen und mithilfe von Schmelzsalzen, wie beispielsweise Natriumphosphat, unter Erwärmung und Druck verflüssigt. Anschließend wird die geschmolzene Masse in Formen gefüllt und erstarrt beim Abkühlen. Durch dieses Verfahren gelingt es, einen physikalisch, chemisch und mikrobiologisch stabilen Zustand des Käses zu schaffen (KIELWEIN und LUH, 1979).

Schmelzkäsezubereitungen sind laut Käseverordnung „Erzeugnisse, die unter Zusatz anderer Milcherzeugnisse oder beigegebener Lebensmittel aus Käse, aus Schmelzkäse oder aus Käse und Schmelzkäse durch Schmelzen unter Anwendung von Wärme, auch unter Verwendung von Schmelzsalzen, und Emulgieren hergestellt sind“ (§ 1 Abs. 4.3 KäseV). Schmelzkäsezubereitungen zeichnen sich durch die Zugabe gewisser Gewürze und Zutaten wie Kräuter, Pilze oder geräucherte Schinkenstückchen aus (KIELWEIN und LUH, 1979).

Des Weiteren bietet die Schmelzkäseproduktion auch die Möglichkeit, Käseprodukte zweiter Wahl, welche kleine strukturelle Mängel wie Risse oder Fehllochungen aufweisen, zu qualitativ hochwertigen Fertigprodukten zu verarbeiten (KIELWEIN und LUH, 1979).

2.4 Mykotoxine

2.4.1 Allgemeines

Als Mykotoxine werden die für Mensch und Tier giftigen niedermolekularen Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen bezeichnet (BENNETT und KLICH, 2003). Mykotoxikosen werden überwiegend durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel verursacht. Darüber hinaus kann auch Hautkontakt mit kontaminierten Substanzen oder Sporeninhalation zu Vergiftungserscheinungen führen (BENNETT, 1987; BENNETT und KLICH, 2003). Für die Mykotoxinproduktion bevorzugen die meisten Schimmelpilze einen Temperaturbereich von ca. 20 °C bis 30 °C. Die Mykotoxinbildung erfolgt primär während des Wachstums auf Pflanzen oder Lebensmitteln (BENNETT und KLICH, 2003). Darüber hinaus besteht für den Menschen auch das Risiko einer Vergiftung durch den Verzehr tierischer Lebensmittel, welche durch ein carry-over aus Futtermitteln mit Mykotoxinen kontaminiert wurden (KUIPER-GOODMAN, 1991; REIß, 2009).

Mykotoxine wirken häufig bereits in geringen Dosen in vielfältiger Weise und Intensität toxisch auf Vertebraten (BENNETT, 1987). Die Symptome sind sehr unterschiedlich und richten sich in erster Linie nach der chemischen Struktur, der Dosis und der zeitlichen Expositionsdauer (BENNETT und KLICH, 2003). Des Weiteren unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Mykotoxikosen. Akute Intoxikationen zeichnen sich durch einen raschen Krankheitsverlauf mit starken Symptomen aus. Ein chronischer Krankheitsverlauf ist in der Regel durch die kontinuierliche Aufnahme niedriger Mykotoxindosen bedingt. Diese werden meist unbeachtet mit der Nahrung konsumiert (BENNETT und KLICH, 2003). In Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur zeigen Mykotoxine mutagene, karzinogene, teratogene, immunsupprimierende sowie gen- und embryotoxische Wirkung (SMITH et al., 1995; KRSKA und MOLINELLI, 2006). Erkrankungen, die auf diese Weise entstehen, stellen meist irreversible Schäden des Körpers dar und werden oft erst im fortgeschrittenen Stadium bemerkt (WILLIAMS et al., 2000).

Es gibt nur für wenige Mykotoxine eine genaue toxikologische Charakterisierung. Die Gruppe der Mykotoxine zeichnet sich durch eine Fülle an unterschiedlichen chemischen

Strukturen aus. Entsprechend sind sie in der Lage, unzählige biologische Effekte zu verursachen (SMITH et al., 1995; BENNETT und KLICH, 2003). Die chemischen Strukturen reichen von einfachen heterocyclischen C_4-Ringen mit einem Molekulargewicht von knapp 50 Da bis hin zu sehr komplexen Ringsystemen mit einem Molekulargewicht von über 500 Da. Derartig kleine Moleküle führen in der Regel zu keiner Immunantwort (PITT, 2000).

Schimmelpilze weisen bezüglich ihres Wachstums und ihrer Toxinbildung unterschiedliche Ansprüche an das Medium auf. Gewisse Lebensmittelparameter geben somit Hinweis auf potenziell auftretende Schimmelpilze sowie eine mögliche Mykotoxinbildung (BULLERMAN und BIANCHINI, 2007).

Mykotoxine sind in der Regel sehr widerstandsfähig gegenüber physikalischen oder chemischen Einwirkungen. Aus diesem Grund sind sie auch nach der Lebensmittelverarbeitung oder Lagerung kontaminierter Ausgangsmaterialien noch im Produkt nachweisbar (FILTENBORG et al., 1996; BULLERMAN und BIANCHINI, 2007). Um ein Mykotoxin in direkte Verbindung zu einem Krankheitsbild zu setzen, sind gewisse Kriterien zu erfüllen. Es muss ein Nachweis des jeweiligen Mykotoxins im konsumierten Lebensmittel erbracht werden sowie eine Korrelation zwischen Aufnahme und Inzidenz bestehen (STEYN, 1995). Zusätzlich muss anhand epidemiologischer Studien eine Dosis-Antwort-Beziehung zwischen Mykotoxin und Krankheitssymptomen in einen logischen Zusammenhang gesetzt werden (WILLIAMS et al., 2000). Des Weiteren ist eine eindeutige Reproduzierbarkeit der humanen Symptome anhand von Tierversuchen anzustreben (SMITH et al., 1995; STEYN, 1995; BENNETT und KLICH, 2003). Unterernährung sowie ein allgemeiner Hygienemangel in der Lebensmittelproduktion und Lagerung sind die häufigsten Gründe für eine erhöhte Mykotoxinbelastung der Bevölkerung. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass regionale Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung mit regionalen Krankheitsauftritten in direkter Verbindung stehen (BENNETT und KLICH, 2003).

Es ist bis heute noch nicht abschließend geklärt, welch evolutionärer Vorteil den Schimmelpilzen durch die Mykotoxinbildung zuteilwird. Es bestehen nur relativ geringe Hinweise darauf, dass Mykotoxine eine verbesserte Wachstumsrate der Schimmelpilze im Wirt ermöglichen (BENEDIX, 2000).

2.4.2 Fumonisine

2.4.2.1 Bildung, Vorkommen und Bedeutung

Bereits 1902 wurde erstmals eine zumeist tödlich verlaufende equine Gehirnerkrankung beschrieben, die aufgrund von Fütterungsexperimenten schon damals auf verschimmelten Mais zurückgeführt wurde und als „equine Leucoenzephalomalazie“ (ELEM) bezeichnet wurde (HALIBURTON et al., 1979; GRENADE und BEAN, 1994; KLAFFKE, 2002). Erst 1970 gelang in Südafrika die Isolierung des kausalen Mikroorganismus, des Pilzes *Fusarium* (*F.*) *verticillioides* (früher als *F. moniliforme* bezeichnet) aus schimmelbefallenem Mais (MARASAS, 2001). Die Schimmelpilzgattung *Fusarium* stellt den Hauptverderbniserreger von Mais dar (NELSON et al., 1992; DUTTON, 2009). MARASAS et al. (1984) gelang es, durch Fütterungsversuche mit kontaminiertem Futter an Ratten das kanzerogene Potenzial von *Fusarium* spp. nachzuweisen. Die Tiere erkrankten aufgrund des mit *Fusarium* kontaminierten Futters an Leberkarzinomen. Wenige Jahre darauf machten MARASAS et al. (1988a) auf endemisch auftretende Ösophagealkarzinome der Bevölkerung von Transkei, einer Region in der Mais das primäre Grundnahrungsmittel darstellt, aufmerksam. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen vermehrtem Maisverzehr und endemisch auftretenden Ösophagealkarzinomen herzustellen (KLAFFKE, 2002). Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts konnten schließlich GELDERBLOM et al. (1988) FB_1 bzw. FB_2 als krebsförderndes Agens von *F. verticillioides* identifizieren. Anschließende Tierversuche belegten dessen neuro-, nephro-, ösophago-, pulmo- und hepatotoxisches Potenzial sowie die Wirkung als Tumor-Promotor (GELDERBLOM et al., 1988; MARASAS, 2001; KLAFFKE, 2002). *F. verticillioides* und *F. proliferatum* erwiesen sich als Hauptbildner von Fumonisin (NELSON et al., 1992).

FRISVAD et al. (2007c) beschrieben erstmals, dass auch *A. niger* die Eigenschaft besitzt, FB_2 und FB_4 zu bilden. Weitere chromatographische Untersuchungen erbrachten die Erkenntnis, dass *A. niger* noch ein drittes Fumonisin, FB_6, bildet (MÅNSSON et al., 2010).

F. verticillioides und *A. niger* unterscheiden sich bezüglich der Fumonisinproduktion deutlich in der Genregulation und in ihrem Toxinbildungsprofil. Genvergleiche der

jeweiligen Fumonisincluster ergaben Abweichungen im Syntheseweg (FRISVAD et al., 2007c; MÅNSSON et al., 2010). MOGENSEN et al. (2009) untersuchten das Fumonisinbildungsvermögen von *A. niger* unter verschiedenen Bedingungen. *A. niger* erreichte in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 30 °C maximale FB_2-Bildungskapazität. Im Vergleich dazu lag die optimale Temperatur zur FB_1- bzw. FB_2-Bildung durch *Fusarium* spp. zwischen 20 °C und 25 °C. Bei *A. niger* lag das Wachstumsoptimum in der Regel 5 °C über dem Temperaturoptimum zur FB_2-Bildung. Ab einer Temperatur von 37 °C war die FB_2-Produktion durch *A. niger* sehr eingeschränkt und stagnierte ab 42 °C völlig. Hingegen wurde durch einen Substratzusatz von 2,5-5 % NaCl oder von 10-20 % Saccharose die FB_2-Produktion durch *A. niger* gesteigert. Im Vergleich dazu führten dieselben Substratveränderungen bei *Fusarium* spp. generell zu einem Rückgang der Fumonisinbildung. Dies deutet auf deutliche Unterschiede innerhalb der Fumonisinregulation bei *A. niger* und *Fusarium* spp. hin (MOGENSEN et al., 2009). *A. niger*-Stammanalysen erbrachten das Ergebnis, dass alle untersuchten Stämme FB_2 bildeten, darüber hinaus produzierten 10-25 % FB_4 und 5-10 % FB_6 (MÅNSSON et al., 2010). Nach FRISVAD et al. (2007c) sind auch einige *A. niger*-Stämme, die in der Industrie angewendet werden, zur FB_2-Bildung fähig. Daraus ergibt sich das Risiko einer FB_2-Belastung des Endprodukts. Somit stellt der technologische Einsatz von *A. niger*, neben dem Lebensmittelverderb durch *A. niger* oder *Fusarium* spp., eine weitere mögliche Fumonisin-Kontaminationsquelle zahlreicher Lebensmittelgruppen dar (FRISVAD et al., 2007c).

2.4.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

BEZUIDENHOUT et al. (1988) beschrieben die chemische Struktur von Fumonisinen als langkettige Polyhydroxyalkylamine, bei denen zwei Hydroxygruppen mit Propan-1,2,3-tricarbonsäure verestert sind (KLAFFKE, 2002). Die freie Aminogruppe gilt als Hauptfaktor des kanzerogenen Potenzials (SEO und LEE, 1999). Die verschiedenen Fumonisinanaloga lassen sich in vier Gruppen einteilen: A, B, C und P (MARASAS, 1995; KLAFFKE, 2002). Es wurden bislang über 25 Fumonisine isoliert. Die B-Gruppe ist aufgrund ihres vermehrten Auftretens und stärksten toxischen Potenzials die bedeutendste Gruppe. Diese gliedert sich weiterhin in FB_1, FB_2, FB_3, FB_4 und FB_6. FB_2 unterscheidet

sich zu FB_1 anhand der fehlenden Hydroxygruppe in Position 10 und stellt somit ein Deoxyanalogon zu FB_1 dar (JECFA, 2001; MÅNSSON et al., 2010). In Abbildung 1 sind die Strukturformeln von FB_1 und FB_2 vergleichend dargestellt. In Reinsubstanz liegt FB_1 als weißes, hygroskopisches Pulver vor. Die Polarität der Fumonisine bedingt eine gute Löslichkeit in Wasser, Methanol und Acetonitril. In unpolaren, organischen Lösungsmitteln sind sie hingegen schwer löslich (IARC, 2002; TURNER et al., 2009).

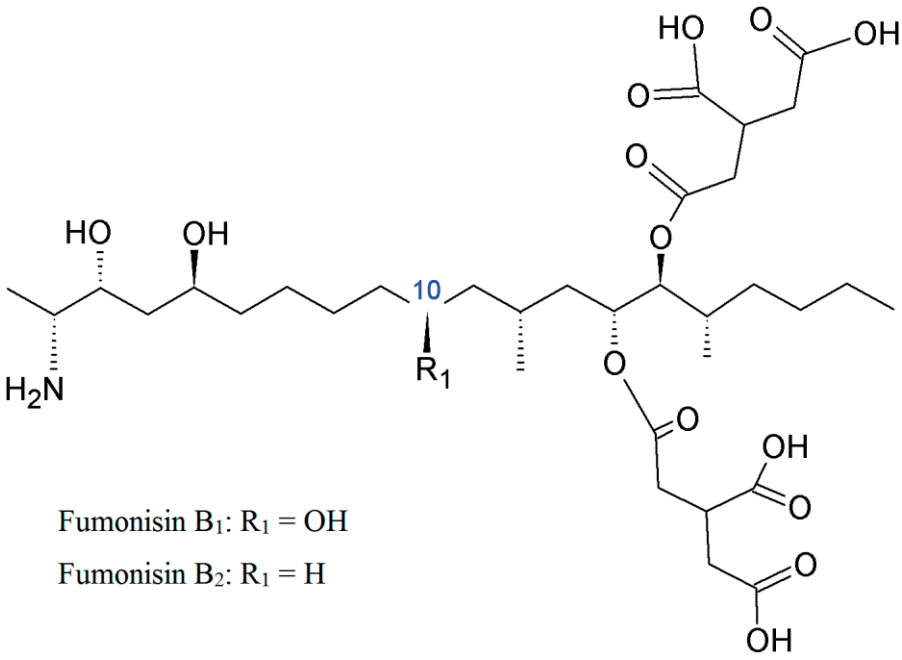


Abbildung 1: Strukturformeln von Fumonisin B_1 und Fumonisin B_2

2.4.2.3 Toxizität

2.4.2.3.1 Toxizität beim Tier

Tierversuche zeigten, dass Fumonisin nach oraler Aufnahme nur zu einem geringen Teil aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und rasch wieder ausgeschieden wird (IARC, 2002; TURNER et al., 2009). In den Versuchen ergab sich eine in der Regel speziesübergreifende hepato- und nephrotoxische Wirkung von Fumonisin. In Abhängigkeit der betroffenen Tierart kam es jedoch zur Ausbildung unterschiedlicher Krankheitsbilder (EFSA, 2005). In mehreren Studien wurde die Karzinogenität von FB_1 nach oraler Aufnahme bei Mäusen und Ratten untersucht. Bei weiblichen Mäusen wurde durch die FB_1-Aufnahme ein Anstieg an hepatozellulären Adenomen und Karzinomen beobachtet. Bei männlichen Ratten traten vermehrt cholangiozelluläre sowie hepatozelluläre Karzinome mit Metastasen in der Lunge auf (SHEPHARD, 2001; IARC, 2002).

Neben der meist chronischen Toxizität führt FB_1 bei Equiden und Schweinen zu einem akuten Krankheitsverlauf (IARC, 2002). WILSON und MARONPOT (1971) dokumentierten das Auftreten der ELEM bei Eseln nach der Verfütterung von *Fusarium*-Kulturmaterial. Zusätzlich beschrieben KELLERMAN et al. (1972) die Induktion von Leberschäden bei Pferden durch *Fusarium*-haltiges Futter. Die ELEM zeichnet sich durch massive Ödeme im Gehirn und bilateral symmetrische, fokale Nekrosen in der Medulla oblongata aus (MARASAS et al., 1988b). In der Regel traten innerhalb von 7 bis 14 Tagen kontinuierlicher FB_1-Gabe deutliche Symptome wie zielloses Umherirren (PITT, 2000), Zittern, Ataxie sowie Paresen der Unterlippe und Zunge auf (MARASAS et al., 1988b). Unmittelbar vor dem Tod kam es zum vollständigen Verlust der Muskelkontrolle (PITT, 2000). Parallel zur ELEM wurde eine Störung des Sphingolipidstoffwechsels beschrieben (KLAFFKE, 2002). FB_1-Gabe an Hasen verursachte kleine Blutungen in der weißen Gehirnsubstanz und führte in ähnlicher Weise wie ELEM zu zentralnervösen Störungen (DOMIJAN, 2012).

Beim Schwein kam es hingegen nach FB_1-Gabe nicht zu neurologischen Krankheitserscheinungen (KRIEK et al., 1981; HARRISON et al., 1990; COLVIN et al., 1993).

KRIEK et al. (1981) beschrieben in einer vergleichenden Studie nach Verfütterung von *F. moniliforme*-Kulturmaterial an verschiedene Tierarten ebenfalls Leberschäden bzw. Leberversagen beim Schwein. Mit zunehmender FB_1-Dosierung kam es beim Schwein zur Ausbildung pulmonaler Ödeme mit Transsudat in Luftröhre und Bronchien (HARRISON et al., 1990). Dieses sogenannte Porcine Pulmonary Edema-Syndrom (PPE) wurde bisher nur beim Schwein beobachtet (COLVIN et al., 1993). SMITH et al. (1996) vermuteten, dass das PPE-Syndrom auf eine pulmonale Hypertonie zurückzuführen ist, die aufgrund einer primären Herzschädigung entsteht.

Beide akute Krankheitsbilder, ELEM und PPE, zeichnen sich durch einen raschen Ausbruch sowie kardiovaskuläre Dysfunktionen und einen gestörten Sphingolipidmetabolismus aus (IARC, 2002). Auch Geflügel reagierte empfindlich auf fumonisinbelastetes Futter. SHEPHARD (2001) beschrieb eine toxische Wirkung bei jungen Puten und Hühnern. In Abhängigkeit von der Dosis wurden Gewichtsabnahme, Lebervergrößerung und Lebernekrosen sowie eine Störung des Immunsystems beobachtet (KLAFFKE, 2002). Inokulation von FB_1 in Hühnereier führte zu Embryopathien, wie Hydrocephalus, Schnabel- und Halsveränderungen sowie pathologischen Veränderungen in Leber, Niere, Herz, Gehirn, Darm, Hoden sowie Muskel- und Skelettsystem (JAVED et al., 1993). In weiteren Tierversuchen an Primaten, Hasen, Katzenfischen, Schafen, Nerzen und Enten erwiesen sich Leber und Niere als Hauptzielorgane der Fumonisinintoxikation (KLAFFKE, 2002; EFSA, 2005). Wiederkäuer reagierten überwiegend unempfindlich auf fumonisinhaltiges Futter. Es wird davon ausgegangen, dass eine stabile Pansenflora einen effektiven Schutz vor oraler Fumonisinaufnahme darstellt. Die Aussage stützt sich auf die Beobachtung, dass Kälber mit noch unzureichend entwickelter Mikroflora anfälliger auf derartig kontaminiertes Futter reagieren (MATHUR et al., 2001). Zusätzlich beschrieben MATHUR et al. (2001) nach intravenöser Fumonisingabe an Milchkälber Veränderungen an Leber, Gallengang und Niere, die in ähnlicher Weise bereits bei anderen Tierarten dokumentiert wurden. Die Entwicklung einer der ELEM oder PPE vergleichbaren Krankheitserscheinung konnte jedoch auch nach hohen Fumonisindosen bei Milchkälbern nicht beobachtet werden (MATHUR et al., 2001).

2.4.2.3.2 Toxizität beim Menschen

Fumonisin steht im Verdacht, beim Menschen Ösophagealkarzinome zu verursachen. Wie schon in Kapitel 2.4.2.1 erwähnt, stützt sich diese Hypothese primär auf epidemiologische Studien, die auf einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhtem Konsum von fumonisinbelastetem Mais und vermehrter Entstehung von Speiseröhrenveränderungen innerhalb der Bevölkerung schließen lassen (MARASAS et al., 1988a). Nachforschungen belegten ein vermehrtes Auftreten von *F. verticillioides* auf Mais in Regionen mit hoher Ösophagealkarzinomrate, wie Transkei in Südafrika, China und South Carolina in den USA (MARASAS et al., 1988a; YOSHIZAWA et al., 1994; DUTTON, 2009). Zusätzlich konnten MARASAS et al. (1988a) innerhalb einer zweijährigen Studie die Hypothese anhand von häufig histopathologisch veränderten Ösophagealzytologien der südafrikanischen Bevölkerung weiter bekräftigen. Ferner untersuchten RHEEDER et al. (1992) Mais aus Regionen mit hoher und niedriger Ösophagealkarzinomrate in Südafrika. Diese Autoren wiesen signifikant höhere FB_1- und FB_2-Konzentrationen in Mais aus Regionen mit hoher Ösophagealkarzinomrate nach. Ein eindeutiger Beweis für eine Beteiligung von Fumonisinen an der Entstehung von Ösophagealkarzinomen konnte jedoch bisher nicht erbracht werden. So führten beispielsweise Tierversuche an Primaten überwiegend zu Leberzirrhose (KRIEK et al., 1981; JASKIEWICZ et al., 1987). Lediglich in einer Arbeit wurde berichtet, dass juvenile Schweine nach Gabe von fumonisinhaltigem Futter Veränderungen in der distalen Ösophagusmukosa entwickelten (DUTTON, 1996). Bezüglich einer akut toxischen Wirkung beim Menschen wurde in einem Fall über Durchfall und Unterleibsschmerzen aufgrund von vermehrtem Verzehr von fumonisinbelasteter Hirse und Mais berichtet (BHAT et al., 1997).

2.4.2.4 Rechtliche Regelungen für Fumonisine

Die in der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 gesetzlich geregelten Grenzwerte für Fumonisine in Lebensmitteln wurden basierend auf neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen durch die Verordnung (EG) 1126/2007 geändert (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2006a, 2007). Da *F. verticillioides* als Hauptbildner von Fumonisin vorrangig auf Mais wächst, sind die geltenden Höchstmengen dementsprechend auf Mais

bzw. Maisprodukte beschränkt. Für unbearbeiteten Mais, der nicht durch Nassmahlen verarbeitet wird, gilt ein FB_1- und FB_2-Höchstgehalt von 4.000 µg/kg. Bezüglich Frühstückscerealien und Snacks auf Maisbasis ist eine maximale FB_1- und FB_2-Belastung von 800 µg/kg festgelegt. Der gesetzliche Höchstgehalt für Getreidebeikost und andere Beikost auf Maisbasis für Säuglinge und Kleinkinder beträgt 200 µg/kg. Mit Ausnahme der zuvor genannten Lebensmittel wurde für Mais und Maisprodukte, die für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmt sind, ein Höchstgehalt an FB_1 und FB_2 von 1.000 µg/kg bestimmt. Da die Partikelgröße einen Einfluss auf den nachweisbaren Toxingehalt hat, wurde zusätzlich für Maisprodukte mit einer Partikelgröße > 500 µm (z. B. Maisgrieß) eine Maximalbelastung von 1.400 µg/kg und für Maisprodukte mit einer Partikelgröße ≤ 500 µm (z. B. Maismehl) ein Maximalwert von 2.000 µg/kg vorgeschrieben (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2007). Vom wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss Scientific Committee on Food (SCF) der Europäischen Kommission wurde für Fumonisine eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (tolerable daily intake, TDI) von 2 µg/kg Körpergewicht festgelegt (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2006a). Die Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), eine wissenschaftliche beratende Körperschaft der WHO und FAO, ermittelte 2001 anhand mehrerer Studien einen NOAEL (no observed adverse effect level) für FB_1, FB_2 und FB_3 von 0,2 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Der davon abgeleitete PMTDI (provisional maximum tolerable daily intake) von 2 µg/kg Körpergewicht ist identisch mit dem festgesetzten TDI des SCF (JECFA, 2001).

FB_1 wurden von der internationalen Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) 2002 als potenziell kanzerogen für den Menschen eingestuft (Gruppe 2B) (IARC, 2002). Da Haustiere und Nutztiere Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Fumonisinen aufweisen, wurden durch die Europäische Kommission im August 2006 Empfehlungen (576/EG) für Höchstgehalte in Tierfutter festgelegt (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2006b). Die entsprechenden Richtwerte werden in Tabelle 4 wiedergegeben. Generell sollte für Mais und Maiserzeugnisse eine maximale Summenbelastung an FB_1 und FB_2 von 60 mg/kg nicht überschritten werden.

Tabelle 4: Richtwerte für Ergänzungs- und Alleinfuttermittel nach (2006/576/EG)*

Tierart	Richtwert maximaler Summenbelastung an FB_1 und FB_2 in mg/kg
Schweine, Pferde, Kaninchen und Heimtiere	5
Fische	10
Geflügel, Kälber (< 4 Monate), Lämmer und Ziegenlämmer	20
Wiederkäuer (> 4 Monate) und Nerze	50

*Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratroxin A, T-2- und HT-2- Toxin sowie von Fumonisinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (2006/576/EG)

Da nur in sehr geringem Maße ein Übertritt von Fumonisin aus Tierfutter in Milch, Eier oder Fleisch erfolgt, ist die carry-over-Problematik zu vernachlässigen (EFSA, 2005; EUROPÄISCHE KOMMISSION 2006b).

2.4.3 Ergoline – Ergotalkaloide und Clavine

2.4.3.1 Allgemeines

Indolalkaloide, die das in Abbildung 2 dargestellte tetracyclische Ringsystem aufweisen, werden als Ergoline bezeichnet. Die zwei wichtigsten Gruppen der Ergoline sind die Ergotalkaloide und die Clavinalkaloide (FLOSS, 1976; SCHIFF, 2006; METZGER et al., 2009). Ergoline können in Abhängigkeit des C_8-Substituenten des Ergolin-Ringes in vier Gruppen eingeteilt werden: Clavinalkaloide und 6,7-Secoergolene mit geöffnetem D-Ring, einfache Lysergsäure-Derivate, Peptid-Alkaloide sowie Lactam-Ergotalkaloide (FLIEGER et al., 1997). Indolalkaloide des Ergolintyps werden von verschiedenen Mikropilzen gebildet. Schimmelpilze der Gattung *Claviceps* stellen die Hauptquelle der Ergoline dar. Insbesondere *Claviceps* (*C.*) *purpurea* ist durch sein massives Auftreten auf Roggen von großer Bedeutung (FLOSS, 1976; SCHIFF, 2006). Pilze der Gattung *Neotyphodium*,

Epichloë und *Balansia* leben als Grasendophyten intrazellulär in bestimmten Gräsern. Untersuchungen ergaben, dass auch diese Pilze die Eigenschaft besitzen, Ergoline zu bilden. Auch gibt es Berichte über Ergolinproduktion durch phylogenetisch weiter entfernte Schimmelpilzgattungen wie *Aspergillus* und *Penicillium*. Des Weiteren besitzt auch die Pflanzenfamilie der sogenannten Windengewächse (*Convolvulaceae*) die Fähigkeit, Ergoline zu synthetisieren (FLIEGER et al., 1997; PANACCIONE, 2005). Ergotalkaloide werden als Lysergsäure-Derivate vor allem von Feldpilzen der Familie *Clavicipitacea* gebildet (FLIEGER et al., 1997; METZGER et al., 2009). Clavinalkaloide werden hingegen vorrangig von Mitgliedern der Ordnung *Eurotiales* wie beispielsweise *A. fumigatus* gebildet (METZGER et al., 2009).

Zahlreiche Ergotalkaloide wirken als partiale Agonisten oder Antagonisten verschiedener Serotonin-, Dopamin- und α-adrenerger Rezeptoren. Auf diese Weise beeinflussen sie das Immun-, Nerven- und Kreislaufsystem sowie die Fortpflanzung. In hohen Dosen kommt es zur Entstehung des sogenannten Ergotismus, der bereits seit dem Mittelalter bekannt ist. Dieser zeichnet sich durch eine halluzinogene Wirkung (*Ergotismus convulsivus*) oder der Entstehung von Gangränen der Extremitäten (*Ergotismus gangraenosus*) aus (PANACCIONE und COYLE, 2005).

Clavinalkaloide stellen die einfachste Form der Ergoline dar. Sie besitzen wie die Lysergsäure-Derivate ebenfalls ein tetracyclisches Ringsystem. Ihnen fehlt jedoch die amidverbundene Seitenkette am Ergolin-Ringsystem (PANACCIONE, 2005; SCHARDL et al., 2006). Clavinalkaloide lassen sich anhand der Doppelbindung innerhalb des D-Ringes in drei Gruppen untergliedern. Eine bedeutende Gruppe ist die der Fumigaclavine, die sich durch das Fehlen einer Doppelbindung im D-Ring auszeichnet (FLOSS, 1976).

2.4.3.2 Isofumigaclavin A

Fumigaclavine (FuA, FuB, FuC und FuD) werden hauptsächlich von *A. fumigatus* gebildet (PIECKOVÁ und JESENSKÁ, 1999; PANACCIONE und COYLE, 2005). Durch Deacetylierung von FuA ($C_{18}H_{22}N_2O_2$) entsteht Deacetylfumigaclavin A, welches

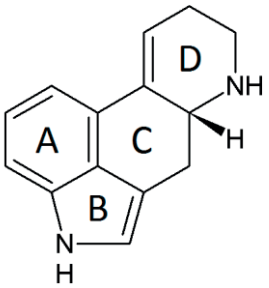
identisch zu FuB ($C_{16}H_{20}N_2O$) ist (SPILSBURY und WILKINSON, 1961). FuA und FuC beeinflussen indirekt als Serotonin-Antagonisten und Adrenolytika das periphere Nervensystem. Zusätzlich nehmen sie Einfluss auf bulbomedulläre und mesodiencephale Bestandteile des zentralen Nervensystems (LUGAUSKAS, 2005).

FuA und FuB kommen jeweils auch als Stereoisomere in Position 8 und 9 vor: IsoFuA ($C_{18}H_{22}N_2O_2$) und IsoFuB ($C_{16}H_{20}N_2O$). Diese werden auch als Roquefortin A bzw. Roquefortin B bezeichnet (SIEBER, 1978). In Abbildung 2 sind die Strukturformeln von FuA und IsoFuA vergleichend dargestellt. IsoFuB entsteht durch alkalische Hydrolyse von IsoFuA (OHMOMO et al., 1975; SCOTT et al., 1976; SIEBER, 1978). IsoFuA wird in der Regel von den zwei Spezies *P. roqueforti* Thom und *P. carneum* Frisvad des *P. roqueforti*-Komplexes gebildet (FINOLI et al., 2001; NIELSEN et al., 2006b). Zusätzlich berichteten O'BRIEN et al. (2006), dass auch die dritte Spezies *P. paneum* Frisvad vereinzelt in der Lage ist, IsoFuA zu bilden. OHMOMO et al. (1975) wiesen erstmalig IsoFuA, IsoFuB und Roquefortin C in Bodenproben nach. Als Quelle wurde *P. roqueforti* Thom identifiziert. Kurz darauf isolierten SCOTT et al. (1976) *P. roqueforti* von Blauschimmelkäse und berichteten ebenfalls über die gemeinsame Bildung von IsoFuA, IsoFuB und Roquefortin C.

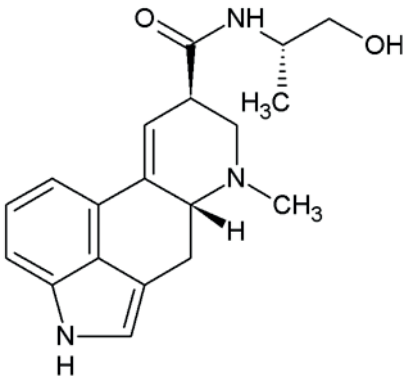
Wenige Jahre darauf gelang es OHMOMO et al. (1979), die Biosynthese der durch *P. roqueforti* gebildeten Indolalkaloide näher aufzuklären. Dabei stellen Mevalonsäure, Tryptophan, Methionin und Histidin die Grundbausteine der jeweiligen Synthesewege dar. Aus diesen werden über mehrere Intermediärstoffwechselprodukte Roquefortin C sowie über den Chanoclavin-Weg Festuclavin, IsoFuA und IsoFuB gebildet. Die Autoren wiesen darauf hin, dass der Ablauf des jeweiligen Syntheseweges und somit die Bildung der entsprechenden Stoffwechselprodukte temperaturabhängig ist. Demnach kommt es bei Temperaturen unter 22 °C vorrangig zur Bildung von Festuclavin sowie IsoFuA und B. Bei höheren Temperaturen (30 °C) dominiert hingegen die Bildung von Roquefortin C (OHMOMO et al. 1979). IsoFuA weist ein schwach pharmakologisches Potenzial auf, das sich unter anderem in Muskelrelaxation, Lokalanästhesie oder antidepressiver Wirkung äußert. Tierversuche an Mäusen ergaben mit einer LD_{50} von 340 mg/kg i.p. IsoFuA eine nur geringe akute Toxizität (OHMOMO et al., 1975). Die LD_{50} von Roquefortin C i.p. bei Mäusen lag hingegen bei 20 mg/kg (OHMOMO et al., 1994). Wie bereits erwähnt wird IsoFuA auch von *P. roqueforti*-Stämmen gebildet, die zur Herstellung von

Blauschimmelkäse eingesetzt werden. IsoFuA konnte bereits von mehreren Autoren in Konzentrationen von 20 ng/g bis 4.700 ng/g in Blauschimmelkäse nachgewiesen werden (OHMOMO et al., 1975; SCOTT und KENNEDY, 1976). SCOTT et al. (1977) isolierten *P. roqueforti*-Stämme von unterschiedlichen Sorten Blauschimmelkäse. Entsprechend dem temperaturabhängigen Syntheseweg, der wie oben erwähnt wenige Jahre später von OHMOMO et al. (1979) beschrieben wurde, berichteten SCOTT et al. (1977) bereits zu diesem Zeitpunkt über eine im Vergleich dreimal höhere IsoFuA-Bildung bei einer Temperatur von 15 °C als bei 25 °C durch *P. roqueforti*.

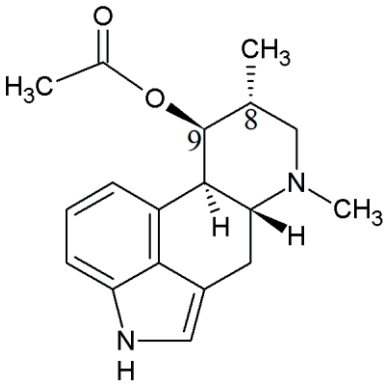
Es bestehen bislang keine Berichte über eine Langzeitwirkung (OHMOMO et al., 1994) und allgemein ist noch sehr wenig über die Toxizität von IsoFuA bekannt. Aufgrund der nur geringen akuten toxischen Wirkung ist jedoch von einer entsprechend schwachen chronischen Toxizität auszugehen (SIEBER, 1978).



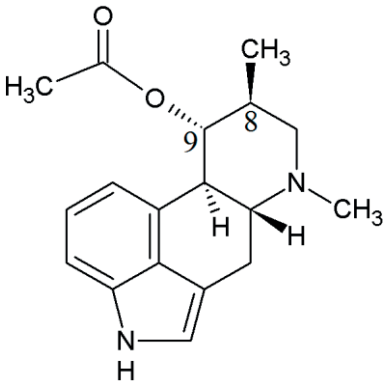
Ergolin-Grundgerüst



Ergonovin



Fumigaclavin A



Isofumigaclavin A

Abbildung 2: Strukturformeln des Ergolin-Grundgerüstes, Ergonovin, Fumigaclavin A und Isofumigaclavin A

2.5 Analytische Nachweismethoden für Mykotoxine

Mykotoxine müssen meist in geringen Konzentrationen in teilweise sehr komplexen Probenmatrices nachgewiesen werden. Um unerwünschte Matrixeffekte möglichst zu reduzieren, enthalten die meisten Nachweismethoden einen mehr oder weniger aufwendigen Reinigungsschritt des Analysenextrakts (KRSKA et al., 2008).

2.5.1 Enzymimmunologische Nachweisverfahren (EIA)

EIAs sind quantitative immunologische Detektionsverfahren, die in der Mykotoxinanalytik sowohl zum Probenscreening als auch zur Quantifizierung des jeweiligen Analyten eingesetzt werden (KLAFFKE, 2002). Antikörper besitzen die Eigenschaft, spezifische Moleküle (Antigene) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zu binden. Diese Fähigkeit bildet die Grundlage immunologischer Nachweisverfahren (FAO, 1990). Der Vorteil des EIAs gegenüber physikalisch-chemischer Verfahren besteht in seiner schnellen und einfachen Anwendung. Er ermöglicht es, innerhalb einer kurzen Bearbeitungszeit eine hohe Probenanzahl bei einem vergleichsmäßig geringen Kostenaufwand zu untersuchen (KRSKA et al., 2008; TURNER et al., 2009). Mykotoxine sind aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes nicht immunogen und führen somit zu keiner Antikörperbildung. Zur Immunisierung bedarf es daher einer Kopplung der Haptene über kovalente Bindungen an Trägerproteine (STANKER und BEIER, 1996; MURO-CACHO et al., 2004).

EIAs werden in kompetitive und nicht-kompetitive Testverfahren eingeteilt. Nicht-kompetitive Verfahren zeichnen sich durch einen Überschuss an markierten Antikörpern gegenüber dem Antigen aus. Beim kompetitiven Testverfahren steht nur eine begrenzte Anzahl an Antikörperbindungsstellen zur Verfügung. Um diese konkurriert markiertes und unmarkiertes Antigen (EKINS, 1989). Niedermolekulare Substanzen wie Mykotoxine können nur in kompetitiven Testverfahren nachgewiesen werden (USLEBER, 1991). Es werden zwei Arten an kompetitive EIAs unterschieden, die als kompetitiver direkter oder kompetitiver indirekter EIA bezeichnet werden (STANKER und BEIER, 1996).

Es wurden bereits von mehreren Autoren kompetitive direkte wie auch kompetitive indirekte Testverfahren zum FB_1-Nachweis beschrieben. Diese erfolgten vorrangig unter Verwendung von monoklonalen FB_1-Antikörper (AZCONA-OLIVERA et al., 1992; SHELBY et al., 1994; CHU, 1996). Eine Ausnahme bildete der von USLEBER et al. (1994) entwickelte kompetitive direkte FB_1-EIA unter Einsatz von polyklonalen Anti-FB_1-Antikörper. FB_1-Antikörper weisen in hohem Maße Kreuzreaktionen zu strukturverwandten FB_1-Äquivalenten wie FB_2, FB_3 und FB_4 auf; sodass mittels der beschriebenen Testsysteme die Fumonisin-Gesamtkonzentration detektiert wird (KLAFFKE, 2002).

Ebenso bestehen zum enzymimmunologischen Nachweis von Ergotalkaloiden sowohl ein kompetitiver indirekter wie auch ein kompetitiver direkter EIA. In beiden EIA-Testarten erfolgt der Ergotalkaloidnachweis mittels kreuzreagierendem Ergonovin-Antikörper (SHELBY und KELLY, 1991; CURTUI et al., 2007). SHELBY und KELLY (1991) entwickelten einen kompetitiven indirekten Ergonovin-EIA, der auf monoklonale Ergonovin-Antikörper basierte. Unter Einsatz von polyklonalen Ergonovin-Antikörper beschrieben CURTUI et al. (2007) einen kompetitiven direkten Ergonovin-EIA. Da sich der polyklonale Ergonovin-Antikörper gegen das Lysergsäure-Grundgerüst der Ergolin-Alkaloide richtet, eignet er sich aufgrund der daraus resultierenden Kreuzreaktivität sehr gut zum gruppenspezifischen Ergotalkaloidnachweis (CURTUI et al., 2007).

Beim kompetitiven direkten EIA dienen Antikörper als Festphase der Mikrotiterplatte. Sie sind entweder direkt oder über Anti-Ig-Antikörper an das Trägermaterial gebunden. Enzymgebundene und freie Antigene konkurrieren während einer ausreichenden Inkubationszeit um freie Antikörperbindungsstellen. Nicht gebundenes Antigen wird durch einen anschließenden Waschschritt entfernt. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso geringer ist die Anzahl der enzymmarkierten Antigene, die an der Festphase binden können. Nach anschließendem Substratzusatz (Chromogen) wird dieses durch das an der Mikrotiterplatte gebundene Enzymkonjugat katalysiert. Der Substratumsatz ist dabei umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen und wird in einer Farbreaktion visualisiert (STANKER und BEIER, 1996; LEE und KENNEDY, 2007)

Beim kompetitiven indirekten EIA besteht die Festphase der Mikrotiterplatte aus einem Antigen-Protein-Konjugat. Der zu untersuchenden Probe werden spezifische Antikörper

hinzugefügt. Während der Inkubationszeit konkurrieren freie Antigene mit den gebundenen Antigenen der Festphase um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschritt erfolgt eine weitere Inkubation mit enzymmarkierten Antikörpern (STANKER und BEIER, 1996; CURTUI et al., 2007; LEE und KENNEDY, 2007). Diese richten sich in der Regel gegen Immunoglobuline der entsprechenden Tierart, von der die spezifischen Antikörper stammen (LEE und KENNEDY, 2007). Die freie Antigenmenge der Probe ist wiederum umgekehrt proportional zum Substratumsatz, der durch enzymgebundenes Toxinkonjugat katalysiert wird (STANKER und BEIER, 1996; CURTUI et al., 2007; LEE und KENNEDY, 2007).

2.5.2 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

Die dominierende Methodik zum Nachweis von Mykotoxinen ist heute die Flüssigkeitschromatographie, meist gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion oder aber in Verbindung mit UV-Detektion oder Fluoreszensdetektion. Da eine Behandlung dieser Methode den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, sei auf Übersichtsarbeiten neueren Datums verwiesen (GEY, 2008; KORECK und SHAW, 2009; SNYDER, 2010; MOLDOVEANU und DAVID, 2013)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.15500)
Ammoniumsulfat	(Merck KGaA, 1.01217)
Casein, Natriumsalz	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, C8654)
Destilliertes Wasser	(Membra Pure)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei	(Merck KGaA, 1.06586)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.006404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Natriumhydroxid	(Merck KGaA, 1.06498)
n-Heptan	(Merck KGaA, 1.00731)
1,2-Propandiol	(Merck KGaA, 8.22324)
Schwefelsäure	(Merck, KGaA, 1.00729)
3,3`,5,5`Tetramethylbenzidin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, P1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)
Ortho-Phosphorsäure 85 %, reinst	(Merck KGaA, 1.00563)

Alle verwendeten Reagenzien lagen mindestens in der Reinheitsstufe p. a. vor.

3.1.2 Puffer und Lösungen

5 % Acetonitril-PBS-Lösung: 5 % Acetonitril in PBS pH 6,0

60 % Acetonitril-PBS-Lösung: 60 % Acetonitril in PBS pH 6,0

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

1 % Casein-PBS-Lösung: 10 g Natriumcaseinat/l PBS

2 % Casein-PBS-Lösung: 20 g Natriumcaseinat/l PBS

0,01 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (PBS pH 7,3)

3,72 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid (PBS pH 6,0)

Enzymsubstrat-/Chromogenlösung:

Substratlösung für Meerrettichperoxidase (nach GALLATI und PRACHT, 1985): 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,9) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H_2O_2

Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-TMB gelöst in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)

Gebrauchsfertige Lösung: 20 Teile Citratpuffer mit H_2O_2-Zusatz und ein Teil Tetramethylbenzidin-Lösung

10 % Methanol/PBS-Lösung: 10 % Methanol in PBS pH 7,3

75 % Methanol/PBS-Lösung: 75 % Methanol in PBS pH 7,3

1 %ige methanolische Essigsäure-Lösung

1 mmol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,4)

1 mol/l Schwefelsäure (H_2SO_4)

o-Phthalaldehyd (OPA-Derivatisierungsreagenz)

Waschlösung: 0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20

3.1.3 Mykotoxine

FB_1[1]	
FB_2	(BioChemica, A-7864)
FB_3	(Fluka GmbH, Nr. 32606)
a. Ergocristin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, E-140)
b. Ergonovin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, E-6500)

c. Ergotamin Tartrat (Fluka GmbH, Nr. 45510)

IsoFuA[2]

[1]Dieser Toxinstandard wurde von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

[2]Dieser Toxinstandard wurde freundlicherweise von Herrn Dr. P. Scott, Ottawa, Kanada, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Durch Lösung der Mykotoxine im jeweiligen Lösungsmittel wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

FB_1	500 µg/ml Methanol
FB_2	1 mg/ml Methanol
FB_3	50 µg/ml Methanol
Ergomix	25 µg/ml Stabilisatorlösung[3]
Ergonovin	500 µg/ml Stabilisatorlösung[3]
IsoFuA	100 µg/ml Methanol

[3]10 ml Ethylenglycol, 10 ml 1,2-Propandiol, 0,1 g Weinsäure auf 100 ml mit Ethanol/ A. dest. aufgefüllt.

3.1.4 Immunreagenzien

FB_1-EIA[4]:

Antikörper: *polyklonal*: FB_1-Antiserum (Pool 11. – 20. Woche, gefällt)

Konjugat: FB_1-Meerrettichperoxidase-Konjugat (FB_1-HRP) (USLEBER et al., 1994; USLEBER, 1997)

Generic Ergot Alkaloid (GEA)-EIA / Ergonovin-EIA / IsoFuA-EIA:

Antikörper: *polyklonal*: Ergonovin-Antiserum (Kaninchen 29, Pool III, gefällt)

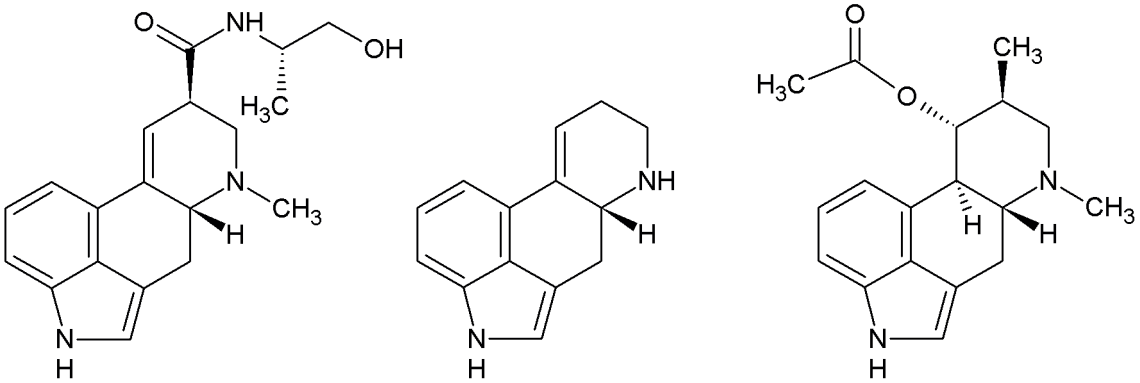
Konjugat: Ergonovin-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Ergonovin-HS-HRP) (CURTUI et al., 2007)

[4]Das hier aufgeführte FB_1-Antiserum und das Konjugat wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt, und von Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer und Herrn Dr. R. Dietrich freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Tabellen 5 und 6 bieten eine Übersicht über die von den jeweiligen Autoren beschriebenen, relativen Kreuzreaktionen der entsprechenden Antikörper zu strukturverwandten Mykotoxinen. Der Ergonovin-Antikörper ist gegen den Ergolin-Grundkörper gerichtet. Aus diesem Grund weist er zu zahlreichen Ergolin-Alkaloiden eine ausgeprägte Kreuzreaktion auf. In Abbildung 3 sind vergleichend die Strukturformeln des Ergolin-Grundgerüstes und die davon abgeleiteten Verbindungen Ergonovin und IsoFuA dargestellt.

Tabelle 5: Relative Kreuzreaktion des FB_1-Antikörpers mit strukturverwandten Fumonisinanaloga im kompetitiven direkten FB_1-EIA (USLEBER, 1997)

Toxin	Kreuzreaktion (%)
FB_1	100
FB_2	100
FB_3	40



Ergonovin Ergolin-Grundgerüst Isofumigaclavin A

Abbildung 3: Strukturformeln des Ergolin-Grundgerüstes sowie der Ergolin-Verbindungen Ergonovin und Isofumigaclavin A

Tabelle 6: Relative Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers mit strukturverwandten Ergotalkaloiden im kompetitiven direkten EIA

Toxin	relative Kreuzreaktion (%)
Ergonovin (Ergometrin)	100[1,2]
Ergometrinin	1,28[1]
Ergotamin	7,0[1]
Ergotaminin	1,0[1]
Ergocristin	2,7[1]
Ergocristinin	0,05[1]
Ergocornin	2,1[1]
Ergocorninin	0,14[1]
Ergosin	1,0[1]
Ergosinin	0,17[1]
α-Ergocryptin	0,7[1]
α-Ergocryptinin	0,01[1]
β-Ergocryptin	2,9[1]
β-Ergocryptinin	0,03[1]
FuA	0,51[2]
IsoFuA	22,08[2]

[1]Daten nach CURTUI et al., 2007; [2]Daten nach LATIF, 2010

3.1.5 Nährmedien

Malzextrakt-Agar	(Oxoid, CM 0059)

3.1.6 Geräte und sonstige Materialien

3.1.6.1 Hard- und Software

Computer	(Acer AL718)
Datenverarbeitungssoftware Magellan V 6.6	(Tecan Austria GmbH)
Datenverarbeitungssoftware Chromeleon © V 6.70 SP1	(DIONEX GmbH)
Statistik-Software SPSS Statistics 20	(IBM Deutschland GmbH)
Chemie-Software ChemSkatch, Version 12.0 Rel. 2.	(ACD/Labs)

3.1.6.2 Photometer

Photometer UV-1601	(Shimadzu)
ELISA-Auto Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)

3.1.6.3 Enzymimmuntests

Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Mikrotiterplatten Nunc Immuno Plate 439454	(Nunc GmbH)
Mikrotiterplattentaumlergerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Variable 12-Kanalpipette 10-100 µl	(Eppendorf AG)
Variable 12-Kanalpipette 50-300 µl	(Finipette Labsystems)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1.000 µl	(Eppendorf AG)

Vortex-Genie 2	(Scientific Industries Inc.)

3.1.6.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bond Elut SAX, 500 mg/10 ml	(Agilent Tech., 12113043)
Vorsäule: Lichrospher RP 18, (5 µm) 4 mm x 4 mm	(Merck KGaA, 150957.0001)
Säule: Lichrospher RP 18, (5 µm) 125 mm x 4 mm	(Merck KGaA, 150943.0001)
Pumpenserie P 580	(DIONEX GmbH)
Probengeber Modell ASI 100/ASI 100 T	(DIONEX GmbH)
Photodiode PDA 100 Array detector	(DIONEX GmbH)
Fluoreszenzdetektor RF 2000	(DIONEX GmbH)
Säulenthermostat STH 583	(DIONEX GmbH)
Fraktionskollektor 202	(Gilson SAS)
Fraktionskontroller 201-202	(Gilson SAS)

3.1.6.5 Mykologische Untersuchung

Binokulares Mikroskop Axioplan	(ZEISS)
Immersionsöl	(VWR 1.04699.0500)
Objektträger	(Carl Roth Aer.-Nr. H869)
Fotoapparat	(Olympus Camedia C-730 Ultra Zoom)

3.1.6.6 Sonstiges

Eppendorfröhrchen, self lock tubes 1 ml, 2 ml	(Eppendorf AG)
Pasteurpipette, Glas	(VWR International GmbH)
pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)

Reagenzgläser, Plastik und Glas mit Schraubverschluss	
Rundkolben	
Stomacher	(Seward Stomacher, England)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)
Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Laborota 4003)
Waage Kern FKB 4 K0,05	(Kern & Sohn GmbH)
Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 C	(Eppendorf AG)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus Christ GmbH)

3.1.7 Probenmaterial

3.1.7.1 Brot

Im Zeitraum von Oktober 2010 bis April 2011 wurden im hessischen Lebensmitteleinzelhandel insgesamt 30 Brote erworben. Die Probenauswahl berücksichtigte sowohl konventionell als auch biologisch-ökologisch hergestellte Brote. Alle Brotproben wurden in Klein- oder Großbäckereien in Deutschland produziert. Zu 63 % stammen die erworbenen Proben aus regionalen Bäckereien. Mit einem Anteil von 23 % wurden diese Brote in Bäckereien hergestellt, die ausschließlich Zutaten aus kontrolliertem biologischem Anbau verwenden. Aus dem Einzelhandel wurden 37 % der Brote bezogen. Diese wurden in abgepackter Form angeboten. Nähere Informationen bezüglich der Produkte wurden entweder beim Verkaufspersonal erfragt oder dem Etikett entnommen und protokolliert. Zusätzlich flossen auch Untersuchungen von drei schimmelbefallenen Broten, die in hessischen Privathaushalten bei einer Raumtemperatur von etwa 21 °C gelagert wurden, in die Auswertungen mit ein. Bei diesen handelte es sich um zwei Bäckereibrote und ein Brot, das als Bio-Backware im Handel vertrieben wurde. Die Probenauswahl berücksichtigte Brote verschiedener Arten: Roggenbrot (n = 2), Roggenmischbrot (n = 11), Vollkornbrot (n = 8), Weizenbrot (n = 1), Weizenmischbrot (n = 5), Weizenvollkornbrot (n = 1), Toastbrot (n = 1), Dinkelbrot (n = 1), Schrotbrot (n = 1) und Roggenweizenschrotbrot (n = 2).

3.1.7.2 Käse

Es wurden im Zeitraum Mai bis Juli 2011 insgesamt 46 Käse unterschiedlicher Käsegruppen aus dem hessischen Einzelhandel erworben. Zusätzlich erfolgte auch hier eine Untersuchung von fünf Käseproben, die in hessischen Privathaushalten eine deutliche Schimmelbildung entwickelt hatten. Die Probenauswahl umfasste sowohl konventionell als auch biologisch-ökologisch hergestellten Käse.

Die Käseproben ließen sich anhand ihres Wassergehalts in der fettfreien Trockenmasse in Weichkäse (n = 3), Schnittkäse (n = 32), Hartkäse (n = 15) und Pasta-Filata-Käse, gerieben (n = 1), unterscheiden. Bei dem Schnittkäse handelte es sich um gängige Käsesorten wie Leerdammer, Edamer, Gouda, Maasdamer, Tilsiter und Butterkäse. Die Hartkäsesorten waren durch Emmentaler, Jura-Bergkäse, Irischer Cheddar und Schweizer Appenzeller vertreten. Die Käseproben wurden entweder in abgepackter Form oder als lose Ware an der Käsetheke erworben. Nähere Produktinformationen wurden vom Verkaufspersonal erfragt oder dem Etikett entnommen. Die Käseproben wurden in Käsereien in Deutschland (n = 42), der Schweiz (n = 3), Frankreich (n = 2), Dänemark (n = 2) und Österreich (n = 2) hergestellt.

3.1.7.3 Schmelzkäse

In den Monaten August und September 2011 wurden insgesamt 33 Schmelzkäse aus dem hessischen Lebensmitteleinzelhandel erworben. Die Probenauswahl umfasste sowohl streichfähige (n = 19) als auch schnittfeste (n = 14) Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen. Die Produkte wurden in neun unabhängigen Käsereien mit Standorten in Deutschland/Bayern (n = 5), Österreich (n = 1), Dänemark (n = 1), Frankreich (n = 1) und Polen (n = 1) hergestellt. Die Schmelzkäse wurden innerhalb der angegebenen Mindesthaltbarkeit in einwandfreiem Zustand, ohne Hinweis auf einen sichtbaren Schimmelbefall untersucht.

3.2 Methodik

3.2.1 *Orientierende Untersuchung zur Bestimmung von Schimmelpilzen auf Brot und Käse*

Zur Bestimmung der auf den Brot- bzw. Käseproben gewachsenen Schimmelpilze erfolgte eine kulturelle Anzucht der jeweiligen Kolonien. Dazu wurden mittels abgeflammter Öse von vier ausgewählten Brot- und Käsescheiben Mycelproben entnommen, die sich deutlich im Erscheinungsbild unterschieden. Diese wurden jeweils auf Malzextrakt-Agar überimpft. Die beimpften Platten wurden sieben Tage bei 24 °C bebrütet und auf das Wachstum von Pilzkulturen überprüft. Getrennt in Brot- und Käseschimmel, wurden die gewachsenen Schimmelpilzkolonien in Abhängigkeit ihres Erscheinungsbildes jeweils in vier Gruppen unterteilt. Es wurden sowohl Abklatschpräparate (Tesafilm-Präparate) des angezüchteten Kulturmaterials als auch von „natürlich“ gewachsenem Brot- bzw. Käseschimmel ausgewählter Proben angefertigt. Dazu wurde jeweils ein Tesafilmstreifen auf die Pilzkultur gedrückt und anschließend auf einen Objektträger geklebt. Die angefertigten Präparate wurden bei 40facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht.

Zusätzlich wurde schwarzer sowie orangefarbener Brotschimmel auf Malzextrakt-Agar kulturell angezüchtet und mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Rolf Geisen am Max Rubner-Institut in Karlsruhe mikrobiologisch untersucht. Es wurden jeweils aus dem schwarzen und orangefarbenen Mycel Einzelsporenkulturen angefertigt. Aus diesen wurde jeweils eine Spezies isoliert. Beide Stämme wurden anschließend auf YES- (yeast extract sucrose) und Malz-Glukose-Medien überimpft und sieben Tage bei 25 °C bebrütet. Die abschließende Identifizierung der jeweiligen Stämme erfolgte mittels ITS-Sequenzierung (internal transcribed spacer). Die Gattungs- bzw. Speziesbestimmung basiert bei dieser Methode auf einem Vergleich von Sequenzähnlichkeiten der ITS-Regionen, welche zwischen den 18S- 5,8S- 28S-rRNA-Gensequenzen lokalisiert sind. Die ITS-DNA-Sequenzen bieten in vielen Fällen aufgrund ihrer hohen Variabilität die Möglichkeit, als charakteristische Signatursequenzen einer Spezies oder Pilzgattung genutzt zu werden (BALDWIN, 1992; ALVAREZ und WENDEL, 2003). Eine genaue Beschreibung des Analyseverfahrens kann der Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG): „Molekularbiologische Identifizierung von Pilzen

mittels ITS-PCR und nachfolgender Sequenzierung“ unter der Methode AM028 (2011) entnommen werden.

3.2.2 *Untersuchung von Schimmelpilzwachstum auf Brot*

3.2.2.1 Lagerungssystematik

Die Lagerung der Brote erfolgte am Institut für Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität in Gießen, und unterlag einer kontrollierten Lagerungssystematik. Die einzelnen Brote wurden in Scheiben geschnitten und zu drei gleichen Teilen jeweils in einen Plastikbeutel abgepackt. Dieser wurde mit einer Metallklammer verschlossen. Die Lagerung erfolgte jeweils unter drei Temperaturen: im Kühlschrank (7 °C), bei Raumtemperatur (21 °C) und im Brutschrank (24 °C). Der Lagerungsbeginn und das erste sichtbare Schimmelpilzwachstum wurden vermerkt. Ebenso wurde der weitere Verlauf der Mycelausbreitung und dessen Veränderung erfasst und protokolliert. Die angeschimmelten Brotscheiben wurden in Segmente unterteilt und deren Lokalisationen zueinander notiert. Dabei erfolgte eine Unterscheidung der Teilabschnitte in Brotsegmente, die keinen sichtbaren, einen schwachen oder aber einen stark ausgeprägten Schimmelpilzbefall aufwiesen.

3.2.2.2 Nachweis von Fumonisinen

Es wurden schimmelbefallenes Brot sowie reines Mycel nach verschiedenen Lagerungszeiten enzymimmunologisch sowie chromatographisch auf Fumonisin untersucht. Zur Feststellung einer Toxinausbreitung im Brot wurde bei ausgewählten Proben die Fumonisinbelastung von makroskopisch schimmelfreien Brotabschnitten vergleichend zu deutlich angeschimmelten Bereichen derselben Brotscheibe mittels FB_1-EIA untersucht.

3.2.2.2.1 EIA zum Nachweis von Fumonisinen (FB_1-Äquivalenten)

3.2.2.2.1.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 5 g der ausgewählten Brotsegmente mit 25 ml Methanol/A. dest. (75/25; v/v) für zehn Minuten im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurden die Proben wenige Minuten stehen gelassen, bis sich alle unlöslichen Festbestandteile nahezu vollständig am Grund abgesetzt hatten. Mithilfe einer Pasteurpipette wurde jeweils ein Aliquot von 2 ml des Extraktes entnommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Extrakte wurden darauf zur zeitnahen Phasentrennung für acht Minuten bei 20 °C, 11.000 x *g* (11.000fache der Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein weiteres 2 ml Eppendorfgefäß überführt und wiederholt bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte zur vollständigen Lösung der Bestandteile geschüttelt (30 sec., Vortex-Genie 2), und zur enzymimmunologischen Untersuchung auf einen Methanolgehalt von 10 % eingestellt. Hierzu wurden 100 µl des Extraktes mit 650 µl PBS pH 7,3 vermischt. Die Probenextrakte wurden direkt in den EIA eingesetzt. Durch die Extraktion und Verdünnung ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 37,5.

Zur Extraktion von reinem Mycel, ohne Brotbestandteile, wurden 2 g Mycel von Brot abgetragen und in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml MeOH/A. dest. (75/25; v/v) bis zur vollständigen Homogenisierung geschüttelt (30 sec., Vortex-Genie 2). Anschließend wurden die Extrakte für acht Minuten (11.000 x *g*, 20 °C) zentrifugiert. Die Weiterverarbeitung der Probenextrakte erfolgte wie oben beschrieben.

Ausgewählte Probenextrakte, die zur chromatographischen Untersuchung einer zusätzlichen Aufreinigung mittels SAX-Immunoaffinitätssäule unterzogen wurden (Beschreibung siehe Kapitel 3.2.2.2.2.1), wurden vergleichend auch mittels FB_1-EIA untersucht. Hierfür wurde 10 µl des gereinigten Extraktes mit 490 µl MeOH/A. dest. (10/90; v/v) vermischt und somit auf einen Methanolgehalt von ca. 10 % eingestellt. Der Probenverdünnungsfaktor, der sich aus der Extraktion, der Verdünnung und dem zusätzlichen Reinigungsschritt ergab, betrug 500.

3.2.2.2.1.2 Testdurchführung

Die Testdurchführung erfolgte mittels kompetitiven direkten FB_1-EIA. Die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden jeweils mit 100 µl Antiserum gegen FB_1 (1:4000 in Bicarbonatpuffer pH 9,6) beschichtet und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Die Haltbarkeit der beschichteten Mikrotiterplatten betrug vier Wochen bei einer Kühlschranktemperatur von 4 °C. Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurden die Platten mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit NaCl/Tween 20-Lösung wurden je Kavität 50 µl Standard- (sechs sequentielle Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,01 ng/ml bis 10 ng/ml in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) und Probenextraktlösungen (in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) sowie eine Negativkontrolle (in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) im Vierfachansatz pipettiert. Im nächsten Schritt wurde mithilfe einer Multikanalpipette 50 µl FB_1–HRP Enzymkonjugat (1:50.000 in 1 % Casein/PBS) je Kavität pipettiert. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platten bei Raumtemperatur im Mikrotiterplattentaumlergerät. Im Anschluss daran wurden die Platten zur Entfernung ungebundener Reaktionspartner dreimal gewaschen, ausgeklopft und mit Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) versehen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von ca. 15 bis maximal 20 Minuten wurde die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die entsprechende Quantifizierung der Messergebnisse wurde mit einer Auswerte-Software für kompetitive Enzymimmuntests (MAGELLAN) durchgeführt. Diese Software errechnete anhand der auf jeder Platte mitangesetzten Standardkurve die Toxingehalte der untersuchten Probenextrakte. Dabei wurden alle Messwerte (B) in Relation zur maximalen Extinktion des toxinfreien Ansatzes (B_0) gesetzt und als Prozentwert ausgedrückt (B/B_0 x 100). Die Probenextrakte wurden jeweils in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Zur Auswertung wurden diejenigen Verdünnungen herangezogen, die eine Extinktion (B/B_0 x 100) zwischen 25 % und 75 % aufwiesen und somit im annähernd linearen Bereich der Standardkurve lagen. Zusätzlich wurden für jeden ermittelten Messwert die mittlere prozentuale Extinktion (B/B_0 x 100) und der Variationskoeffizient der Replikate angegeben. Die Konzentration halbmaximaler Extinktion (50 % B/B_0 x 100)

diente als Maß für die Validität der Standardkurve und wurde ebenfalls durch die Software ermittelt.

3.2.2.2.2 HPLC-Nachweis von Fumonisinen

3.2.2.2.2.1 Probenvorbereitung

Die Extraktion der Proben erfolgte analog der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.2.1.1. Zusätzlich erforderte die chromatographische Analyse eine Aufreinigung der Probenextrakte. Diese orientierte sich an dem Untersuchungsverfahren der amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG (Juli 2004 L 15.05-2) „Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von FB_1 und FB_2 in Mais, HPLC-Verfahren mit Reinigung durch Festphasenextraktion“. Dementsprechend wurden die Rohextrakte mittels einer starken Anionenaustauscher (SAX-) Festphasenextraktionssäule (solid phase extraction, SPE) gereinigt. Dazu wurden jeweils 100 µl Extrakt mit 10 ml MeOH/A. dest. (75/25; v/v) gemischt und unter Verwendung von 230 µl Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 5,8–6,5 eingestellt. Die Säulenkonditionierung erfolgte durch Spülung der SAX-Säulen mit 5 ml MeOH und 5 ml MeOH/A. dest. (75/25; v/v). Im Anschluss wurden 10 ml Probenextrakt auf die SAX-Säule gegeben und erneut mit 8 ml MeOH/A. dest. (75/25; v/v) und 3 ml MeOH gespült. Die durchgelaufenen Waschlösungen wurden verworfen. Die Fumonisine wurden anschließend mit 10 ml 1 %iger methanolischer Essigsäure-Lösung eluiert und in einem Reagenzglas aufgefangen. Die Durchflussrate betrug weniger als 1 ml/min. Das Eluat wurde anschließend in einen Spitzkolben überführt und mithilfe eines Rotationsverdampfers abgedampft. Das Reagenzglas wurde mit 1 ml MeOH gespült und der Inhalt ebenfalls in den Spitzkolben überführt. Anschließend wurde MeOH unter Stickstoff abgedampft. Zur Lösung wurden dem Rückstand 100 µl MeOH zugegeben und geschüttelt (30 sec., Vortex-Genie 2). Danach wurden 100 µl A. dest. hinzugefügt und das Gemisch nochmals mittels Laborschüttler (30 sec., Vortex-Genie 2) vermischt. Die Extrakte wurden in 1 ml Eppendorfgefäße gefüllt und bis zur HPLC-Analyse bei -18 °C gelagert.

Zur Detektion mittels Fluoreszenz wurden die Probenextrakte unmittelbar vor der HPLC-Analyse mit o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol (OPA/MCE) derivatisiert. Hierfür wurden 25 µl Probenextrakt bzw. Standardlösung im Reagenzglas mit 225 µl Derivatisierungsreagenz OPA vermischt. Abbildung 4 zeigt die Reaktion von OPA/MCE mit dem primären Aminrest der Fumonisine zu stark fluoreszierenden Derivaten.

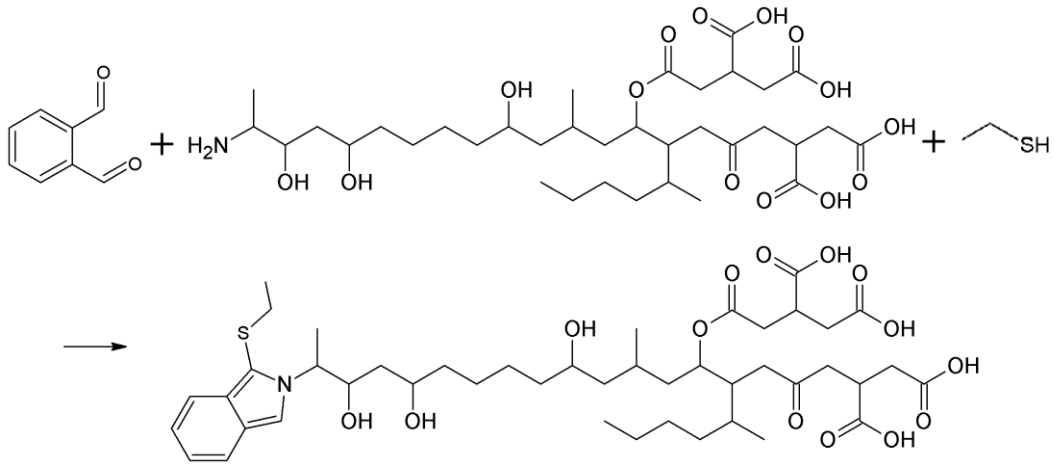


Abbildung 4: Derivatisierung von FB_1 mit OPA-Reagenz bei einem pH-Wert von 10 (Abbildung nach KLAFFKE, 2002)

3.2.2.2.2.2 Testdurchführung

Die HPLC-Analyse umfasste die selektive Detektion von FB_1, FB_2 und FB_3 in Schimmelpilzextrakten und erfolgte insbesondere zur Überprüfung der enzymimmunologischen Befunde unter Einhaltung folgender Analysebedingungen:

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18, 125 mm x 4 mm (5 µm)
	LiChroCART (Merck KGaA Nr. 1.50943.0001)
Vorsäule:	RP 18, 4 mm x 4 mm (5 µm)
	LiChroCART (Merck KGaA Nr. 1.50957.0001)

Mobile Phase:	MeOH/A. dest. (75:25; v/v),
	Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (25:75; v/v)
	pH 3,35 (85 % o-Phosphorsäure)
	Standards und Proben in MeOH/A. dest. (50:50; v/v)
Säulentemperatur:	25 °C
Flussgeschwindigkeit:	1 ml/Minute
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektion:	Fluoreszenz, λ_{ex} 335 nm, λ_{em} 440 nm

Eine Überprüfung der HPLC-Methode erfolgte unter Verwendung von künstlich mit FB_1, FB_2 und FB_3 dotiertem Probenmaterial.

3.2.2.3 Nachweis von Isofumigaclavin A

Es wurden schimmelbefallenes Brot sowie reines Pilzmycel nach verschiedenen Lagerungszeiten enzymimmunologisch auf IsoFuA untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung stand IsoFuA als Toxinstandard nicht zur Verfügung, und war auch kommerziell nicht zu erwerben. IsoFuA weist als Ergolin-Derivat vom Clavin-Typ große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Ergotalkaloiden auf. Daher erfolgte der Toxinnachweis mittels zweier gruppenspezifischer Enzymimmuntests für Ergoline. Die Testsysteme wurden jeweils im Rahmen eines Forschungsprojekts an der Professur für Milchwissenschaften in Gießen auf Basis des Anti-Ergonovin-Antikörpers von CURTUI et al. (2007) entwickelt. Der verwendete Antikörper zeichnet sich durch eine ausgeprägte Kreuzreaktivität innerhalb der Ergotalkaloide aus. Bei bekannter Identität des Analyten ist somit auch ein quantitativer Nachweis von IsoFuA möglich. Darüber hinaus wurden Brotsegmente mit deutlichem Schimmelwachstum vergleichend zu makroskopisch schimmelfreien Teilabschnitten derselben Brotscheibe auf Toxindiffusion untersucht.

3.2.2.3.1 Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

3.2.2.3.1.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 5 g ausgewählter Brotsegmente mit 25 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60/40; v/v) vermischt. Die weiterführende Probenaufbereitung entsprach grundsätzlich der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.2.1.1. Abweichend wurden die Extrakte zur enzymimmunologischen Untersuchung auf einen Acetonitrilgehalt von 5 % eingestellt. Hierzu wurden 100 µl des Extraktes mit 900 µl PBS pH 6,0 vermischt. Die Probenextrakte wurden direkt in den EIA eingesetzt. Aus der Extraktion und der Verdünnung ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 50.

3.2.2.3.1.2 Testdurchführung

Zur Testdurchführung wurde ein am Institut entwickelter kompetitiver direkter Ergonovin-EIA nach der Beschreibung von CURTUI et al. (2007) angewendet.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden jeweils mit 100 µl Antiserum gegen Ergonovin (1:2000 in Bicarbonatpuffer pH 9,6) beschichtet und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Die beschichteten Mikrotiterplatten waren bei einer Lagerung von 4 °C im Kühlschrank vier Wochen haltbar. Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurden die Platten mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Platten dreimal mit NaCl/Tween 20-Lösung gewaschen, ausgeklopft und je Kavität 50 µl Ergonovin-Standard (sechs sequentielle Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,001 ng/ml bis 15 ng/ml in 5 % ACN/PBS pH 6,0) sowie die Probenextrakte (in 5 % ACN/PBS pH 6,0) und eine Negativkontrolle (in 5 % ACN/PBS pH 6,0) im Vierfachansatz auf die Mikrotiterplatten pipettiert. Im nächsten Schritt wurde mit einer Multikanalpipette 50 µl Ergonovin-HS-HRP Enzymkonjugat (1:2000 in 1 % Casein/PBS) je Kavität pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platten im Mikrotiterplattentaumlergerät. Anschließend wurden die Platten zur Entfernung

ungebundener Reaktionspartner dreimal gewaschen, ausgeklopft und mit Enzymsubstrat-Chromogenlösung versehen (100 µl/Kavität). Nach einer weiteren Inkubationszeit von maximal 20 Minuten wurde die Farbreaktion mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt.

Die Extinktionsmessung und Auswertung erfolgte analog der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.2.1.2.

3.2.2.3.2 GEA-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

3.2.2.3.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.3.1.1.

3.2.2.3.2.2 Testdurchführung

Zur Testdurchführung wurde ein kompetitiver direkter EIA zum gruppenspezifischen Nachweis von Ergotalkaloiden (GEA-EIA) angewendet. Aufgrund einer häufigen „natürlichen“ Ergotalkaloidbelastung von Roggen durch den Schimmelpilz *C. purpurea* wurden die Brotproben vergleichend sowohl im frischen als auch im verschimmelten Zustand untersucht.

Der Untersuchungsablauf erfolgte weitgehend analog der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.3.1.2. Davon abweichend wurde als Toxinstandard ein spezielles Ergot-alkaloidgemisch „Ergomix-Standard“ (Ergonovin, Ergotamin, Ergocristin in einem Konzentrationsverhältnis von 1:10:14; sechs sequentielle Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,03 ng/ml bis 250 ng/ml in 5 % ACN/PBS pH 6,0), entsprechend der Beschreibung von CURTUI et al. (2007), im Vierfachansatz auf die Platten pipettiert (50 µl/Kavität).

Die Extinktionsmessung und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.2.1.2 beschrieben.

3.2.3 *Untersuchung von Schimmelpilzwachstum auf Käse*

3.2.3.1 Lagerungssystematik

Die Lagerung der Käseproben erfolgte ebenfalls am Institut für Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, der Justus-Liebig-Universität Gießen. Proben, die als lose Ware erworben wurden, wurden jeweils in einen Plastikbeutel gegeben und mit einer Metallklammer verschlossen. Bei fertig abgepackter Käseware wurde die Einschweißfolie zu Lagerbeginn geöffnet und durch Andrücken der Folie die Verpackung wieder verschlossen. Die Käseproben wurden praxisnah bei 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Der Lagerungsbeginn sowie die erste sichtbare Schimmelbildung wurden notiert. Zusätzlich erfolgte eine Protokollierung der weiteren Mycelentwicklung. Die angeschimmelten Käsescheiben wurden in verschiedene Segmente unterteilt, die entweder keinen sichtbaren, einen schwachen oder aber einen stark ausgeprägten Schimmelpilzbefall aufwiesen. Die Lokalisation dieser Abschnitte zueinander wurde notiert.

3.2.3.2 Nachweis von Isofumigaclavin A

Entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.2.2.3, erfolgte der Nachweis von IsoFuA auch in schimmelbefallenem Käse überwiegend mittels kompetitiven direkten Ergonovin-EIA. Ergänzend wurden ausgewählte Proben im kompetitiven direkten IsoFuA-EIA unter Verwendung kreuzreagierender Antikörper gegen Ergonovin nachuntersucht.

Zusätzlich erfolgte zur Klärung der Frage, ob IsoFuA sich in der Käsemasse ausbreitet oder nur im Mycel vorhanden ist, eine vergleichende Untersuchung von makroskopisch schimmelfreien und schimmelbefallenen Segmenten derselben Käsescheibe.

3.2.3.2.1 Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

3.2.3.2.1.1 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 5 g Probe ausgewählter Käsesegmente in 25 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60/40; v/v) für zehn Minuten im Stomacher homogenisiert. Nach Beendigung des Stomachervorganges wurden die Proben wenige Minuten stehen gelassen, bis sich alle unlöslichen Festbestandteile nahezu vollständig am Grund abgesetzt hatten. Anschließend wurde mittels einer Pasteurpipette ein Aliquot von ca. 6 ml des Gemisches in ein Reagenzglas überführt. Zur Beschleunigung des Absetzens unlöslicher Bestandteile wurde dieses für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (3000 x *g*). Im Anschluss daran wurde ein Aliquot von 2 ml des Überstandes in ein Glasreagenzröhrchen mit Schraubverschluss pipettiert. Zur Fettlösung wurde dies mit 2 ml n-Heptan versetzt und auf einem Laborschüttler (30 sec., Vortex-Genie 2) gemischt. Zur zeitnahen Phasentrennung wurde das Gemisch erneut 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (3000 x *g*). Anschließend wurde die untere Phase mithilfe einer Pasteurpipette entnommen und auf einen Acetonitrilgehalt von 5 % eingestellt. Hierfür wurden 100 µl des Extraktes mit 900 µl PBS pH 6,0 vermischt. Die Extrakte wurden direkt in den EIA eingesetzt. Durch die Extraktion und Verdünnung ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 50.

3.2.3.2.1.2 Testdurchführung

Die Durchführung des Ergonovin-EIAs erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.3.1.2 beschrieben.

3.2.3.2.2 Isofumigaclavin A-EIA

3.2.3.2.2.1 Probenvorbereitung

Dieses Testsystem beruht auf den Immunreagenzien des Ergonovin-EIAs. Zur Quantifizierung wurde jedoch eine IsoFuA-Standardkurve verwendet. Aufgrund der starken Kreuzreaktion dieser Immunreagenzien ist bei bekannter Identität des Toxins eine quantitative Analyse von IsoFuA möglich.

Die Probenextraktion entsprach überwiegend der Beschreibung in Kapitel 3.2.3.2.1.1. Davon abweichend wurden die Käsesegmente zu je 5 g in 25 ml Methanol/A. dest. (75/25; v/v) homogenisiert. Zur enzymimmunologischen Untersuchung wurden die Extrakte auf einen Methanolgehalt von 10 % eingestellt. Hierzu wurden 100 µl des Extraktes mit 650 µl PBS pH 7,3 vermischt und anschließend direkt in den EIA eingesetzt. Aus der Extraktion und der Verdünnung ergab sich ein Probenverdünnungsfaktor von 37,5.

3.2.3.2.2.2 Testdurchführung

Grundlage des Tests ist ein kompetitiver direkter EIA. Die Testdurchführung erfolgte analog zur Beschreibung in Kapitel 3.2.2.3.1.2. Davon abweichend wurden IsoFuA als Toxinstandard (sechs sequentielle Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 0,02 ng/ml bis 50 ng/ml in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) sowie die Probenextrakte (in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) und eine Negativkontrolle (in 10 % MeOH/PBS pH 7,3) im Vierfachansatz auf die Mikrotiterplatten pipettiert (50 µl/Kavität).

3.2.4 *Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen auf Isofumigaclavin A*

Der Nachweis von IsoFuA in frischen, makroskopisch einwandfreien Schmelzkäseproben erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.3 mittels kompetitiven direkten Ergonovin-EIA.

3.2.4.1 Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden 5 g Schmelzkäse ohne makroskopisch sichtbaren Schimmelpilzbefall in 25 ml Acetonitril/PBS pH 6,0 (60/40; v/v) mittels Stomacher für zehn Minuten homogenisiert. Der weitere Extraktionsvorgang erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.2.1.1 beschrieben.

3.2.4.2 Testdurchführung

Die enzymimmunologische Untersuchung entsprach der Beschreibung in Kapitel 3.2.2.3.1.2.

3.2.5 *Validierung der verwendeten Testsysteme*

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des EIA-Testsystems wurden für jeden durchgeführten Test jeweils die 50 %-Inhibitionsdosis (50 % B/B_0 x 100) sowie die Variationskoeffizienten für die einzelnen Standardkonzentrationen bestimmt. Die Ermittlung der Testparameter erfolgte mittels Auswerte-Software (MAGELLAN). Als Nachweisgrenze der jeweiligen Standardkurve wurde eine Toxinkonzentration entsprechend 75 % B/B_0 festgelegt. Diese entsprach in etwa einem Viertel der 50 %-Inhibitionsdosis. Die Nachweisgrenze der Mykotoxine im Probenmaterial wurde durch

die Multiplikation dieses Wertes mit dem jeweiligen Probenverdünnungsfaktor ermittelt. Zur Überprüfung des Testverfahrens wurden Proben ohne sichtbaren Schimmelbefall künstlich mit dem jeweiligen Toxin kontaminiert (Toxinstandard siehe Kapitel 3.1.3). Diese wurden vergleichend mit der nicht künstlich kontaminierten Probe extrahiert und die Wiederfindung im EIA untersucht.

3.2.6 *Statistische Auswertungskriterien*

Für die Auswertung wurden jeweils Probenextrakte mit Extinktionswerten von ≥ 25 % und ≤ 75 % des toxinfreien Leerwertes herangezogen. Dementsprechend wurden Proben, die Messwerte oberhalb der Nachweisgrenze aufwiesen, als positiv und Proben mit Messwerten unterhalb der Nachweisgrenze als negativ für das entsprechende Toxin gewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics sowie Microsoft EXCEL 2010. Zur deskriptiven Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (s), Variationskoeffizienten (VK), Stichprobenumfänge (n) sowie Minima (x_{min}) und Maxima (x_{max}) bestimmt. Zusätzlich wurde die Mykotoxinkonzentrations-Verteilung ausgewählter Proben in Form von Box-and-Whisker-Plots vergleichend dargestellt. Diese umfassten jeweils die Darstellung des Medians (50stes Perzentil), des 25sten Perzentils, des 75sten Perzentils sowie des geringsten und höchsten Messwerts.

4 ERGEBNISSE

4.1 Enzymimmunologische Untersuchungsverfahren – Auswertungen der EIA-Standardkurven

In Abbildung 5 bis 8 sind charakteristische Standardkurven der kompetitiven direkten Enzymimmuntests für FB_1, Ergotalkaloide, Ergonovin und IsoFuA dargestellt. Die letzten drei Tests basieren dabei jeweils auf denselben Immunreagenzien, lediglich die zur Toxinquantifizierung verwendete Toxinstandardlösung unterschied sich. Die Intraassay-Standardabweichungen der im Vierfachansatz eingesetzten Standardkonzentrationen lagen in der Regel unter 10 %.

Entsprechend der Ausführungen in 3.2.5 lag die Nachweisgrenze des Testsystems für FB_1 (75 % B/B_0) nach Auswertung von 30 Standardkurven bei 53,7 ± 17,4 pg/ml. Unter Einbeziehung des Probenextraktions- und Verdünnungsfaktors von 37,5 ergab sich eine rechnerische Nachweisgrenze für FB_1 von 2 ng/g Probe. Da die relative Kreuzreaktion des Testsystems für FB_2 identisch mit der von FB_1 ist, konnte dieses Testsystem zur gleichzeitigen Quantifizierung beider Toxine eingesetzt werden.

Für den GEA-EIA wurde anhand der Auswertung von 9 Standardkurven eine Nachweisgrenze (75 % B/B_0) von 321 ± 39 pg/ml ermittelt. Unter Einbeziehung des Probenextraktions- und Verdünnungsfaktors von 50 wurde eine rechnerische Nachweisgrenze von 16 ng/g Probe bestimmt.

Nach Auswertung von 38 Standardkurven des Ergonovin-EIAs wurde eine Nachweisgrenze (75 % B/B_0) von 23,4 ± 8,0 pg/ml ermittelt. Unter Einbeziehung des Probenextraktions- und Verdünnungsfaktors von 50 ergab sich eine rechnerische Nachweisgrenze von 1 ng/g Probe.

Es wurden 4 Standardkurven des IsoFuA-EIA ausgewertet. Die ermittelte Nachweisgrenze (75 % B/B_0) betrug 95 ± 11,2 pg/ml. Unter Einbeziehung des Probenextraktions- und Verdünnungsfaktors von 37,5 ergab sich eine rechnerische Nachweisgrenze von 4 ng/g Probe.

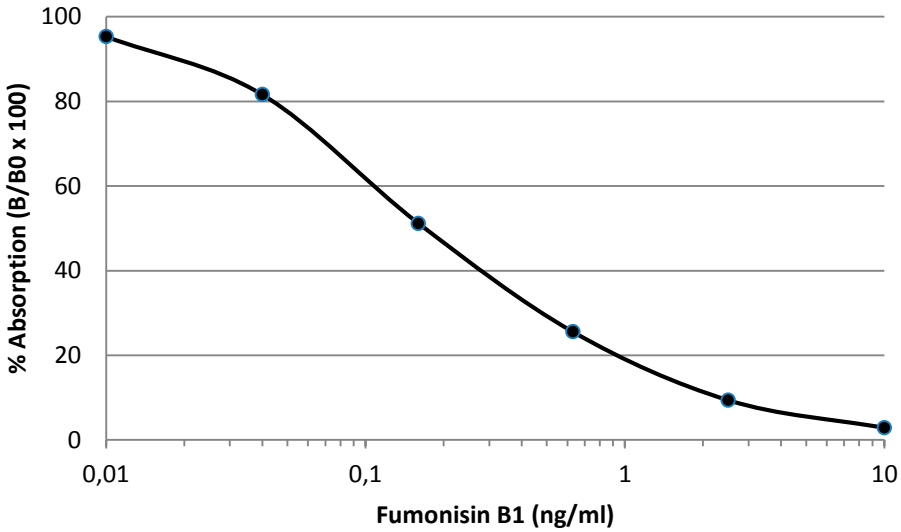


Abbildung 5: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von FB_1 unter Verwendung polyklonaler Antikörper (FB_1-Antiserum, Pool 11. – 20. Woche, gefällt). Nach Auswertung von 30 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,19 ± 0,06 ng/ml.

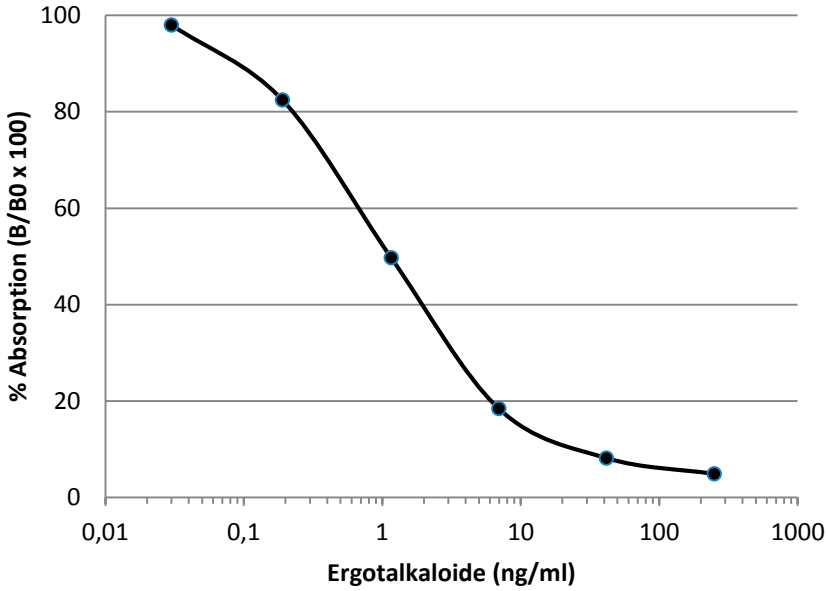


Abbildung 6: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum generischen Nachweis von Ergotalkaloiden unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 9 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 1,2 ± 0,16 ng/ml.

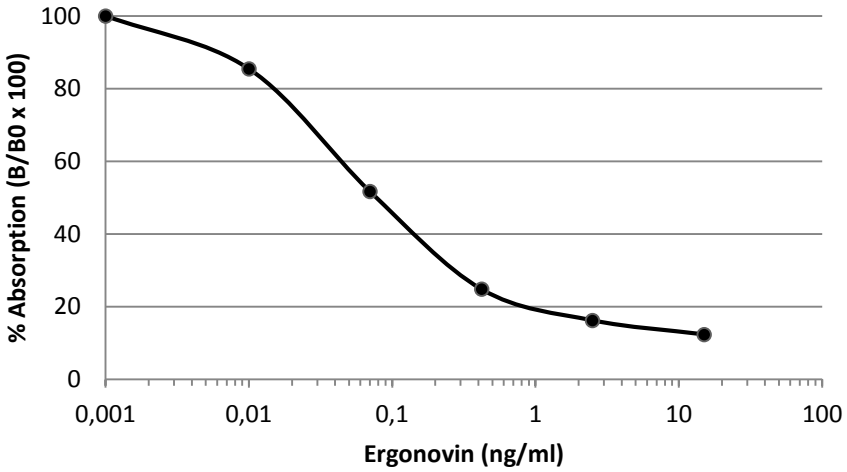


Abbildung 7: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von Ergonovin unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 38 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,08 ± 0,02 ng/ml.

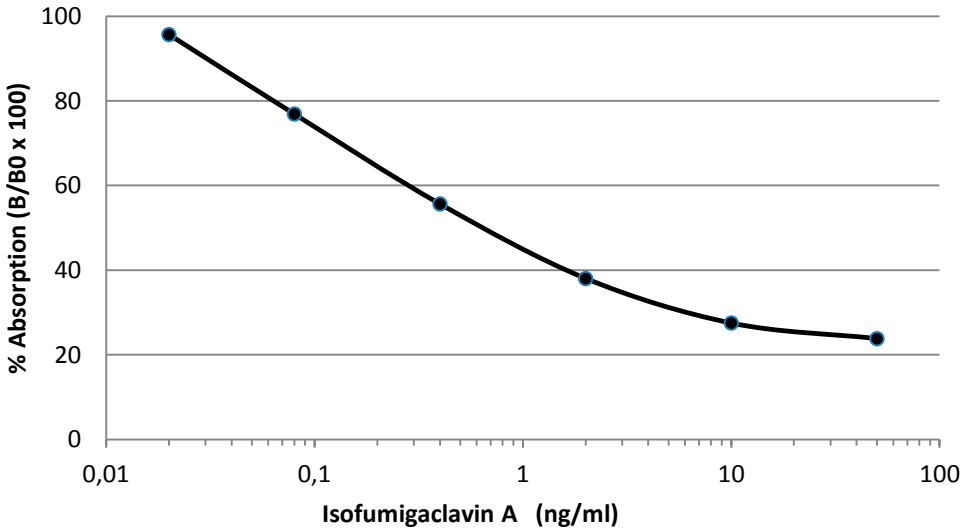


Abbildung 8: Charakteristische Standardkurve des Enzymimmuntests zum Nachweis von IsoFuA unter Verwendung polyklonaler Antikörper (Ergonovin-Antiserum, Kaninchen 29, Pool III, gefällt). Nach Auswertung von 4 Standardkurven lag die mittlere 50 %-Inhibitionsdosis bei 0,69 ± 0,07 ng/ml.

4.2 Schimmelpilzbefall von Brot

4.2.1 Orientierende Untersuchungen zum Schimmelpilzwachstum auf Brot

Grundsätzlich konnte kein von der Brotsorte abhängiger Unterschied bezüglich der Schimmelbildung festgestellt werden. Alle 30 Brote, die bei 21 °C sowie bei 24 °C aufbewahrt wurden, entwickelten innerhalb des Versuchszeitraums von maximal 18 Wochen eine sichtbare Schimmelbildung. Hingegen waren nur 5 von 30 Broten, die im Kühlschrank bei 7 °C aufbewahrt wurden innerhalb von 18 Wochen von einem sichtbaren Schimmelpilzbefall betroffen. Die erste visuell feststellbare Schimmelbildung trat stets auf den Schnittflächen angeschnittener Brote auf. Grundsätzlich konnten die gewachsenen Brotschimmel unabhängig von der Lagerungstemperatur in etwa drei Mycelausprägungen visuell unterschieden werden.

Innerhalb von durchschnittlich 27 Tagen (6-87 Tage) kam es bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C auf 9 von 30 Broten und bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C auf 12 von 30 Broten zum Wachstum eines schwarzen bzw. schwarzgelben Mycelgeflechts mit vereinzelt weißen bzw. weißblauen Anteilen (siehe Abbildung 9). In der Regel ging dem ca. 4 mm erhabenen schwarzen Mycel ein flacher gelber Pilzrasen voraus. Die Entwicklung des Brotschimmels setzte bei Raumtemperatur (21 °C) gewöhnlich später ein als bei 24 °C. Keine der kühl gelagerten Brotproben (7 °C) entwickelte innerhalb des Versuchszeitraumes einen schwarzen oder schwarzgelben Pilzrasen. In den mikroskopischen Untersuchungen von kulturell angezüchtetem sowie direkt vom Brot entnommenem schwarzem Mycel ergaben sich deutliche Hinweise auf typische Konidiophore der Schimmelpilzgattung *Aspergillus* (siehe Abbildung 9, 10 und 11).

Abbildung 9: Verschimmeltes Weißbrot mit schwarzgelbem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB_1-Äquivalente) betrug 18 µg/g (Lagerung: 22 Tage bei 24 °C).

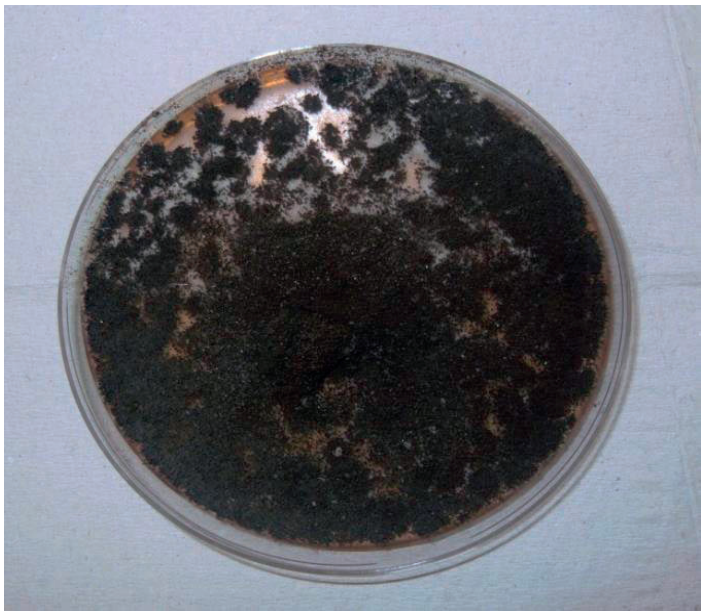


Abbildung 10: *A. niger* aus oben abgebildetem, schwarzgelb verschimmeltem Weißbrot (Abb. 9), angezüchtet auf Malzextrakt-Agar (7 Tage bei 24 °C bebrütet)

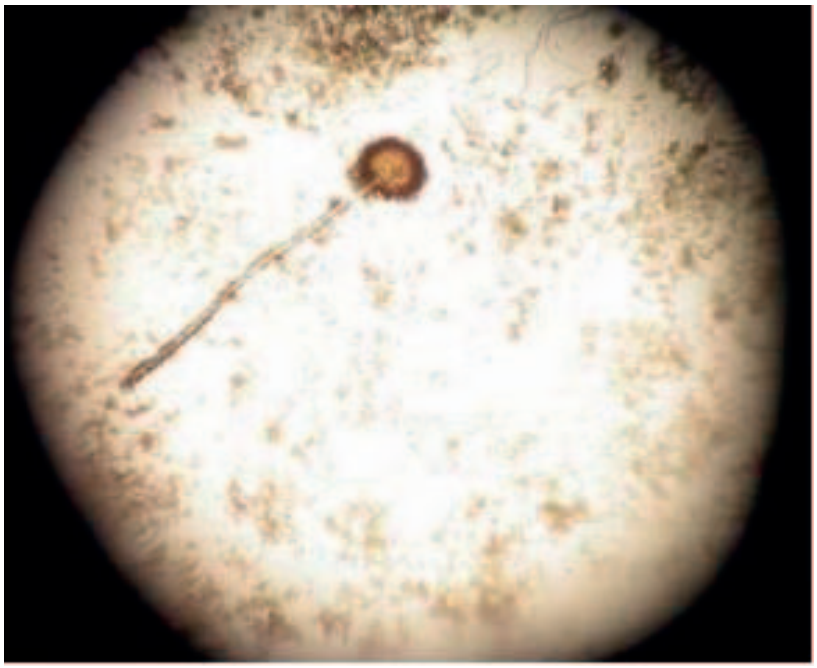


Abbildung 11: *A. niger*-Konidiophor aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem schwarzgelb verschimmeltem Weißbrot (Abb. 9) (40fache Vergrößerung)

Des Weiteren kam es innerhalb von durchschnittlich 34 Tagen (7-114 Tage) zum Wachstum von blaugrünem Schimmel mit vereinzelt weißen oder weißgelben Anteilen (siehe Abbildung 12). Dieser entwickelte sich auf 15 von 30 Broten, die bei Raumtemperatur (21 °C) gelagert worden waren und in geringerem Maße auf 7 von 30 Broten, die bei 24 °C gelagert wurden. Am seltensten kam es während einer Lagerung bei 7 °C auf 5 von 30 Broten zum Wachstum eines derartigen Pilzrasens. Blaugrüne sowie weiße oder weißgelbe Mycelien stellten sich in der mikroskopischen Untersuchung als charakteristisches *Penicillium*-Hyphengeflecht mit pinselförmigen Konidiophoren dar (siehe Abbildung 13). Mit fortschreitender Lagerungszeit nahm das Wachstum des weißblauen Mycels unter Verdrängung der übrigen Schimmelpilze stetig zu. In einigen Fällen führte dies zu einem nahezu vollständigen Umschließen des Brotes mit einem weißen Schimmelrasen (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12: Verschimmeltes Roggenmischbrot mit blauem, schwarzem und weißgelbem Mycel (Lagerung: 56 Tage bei 21 °C)

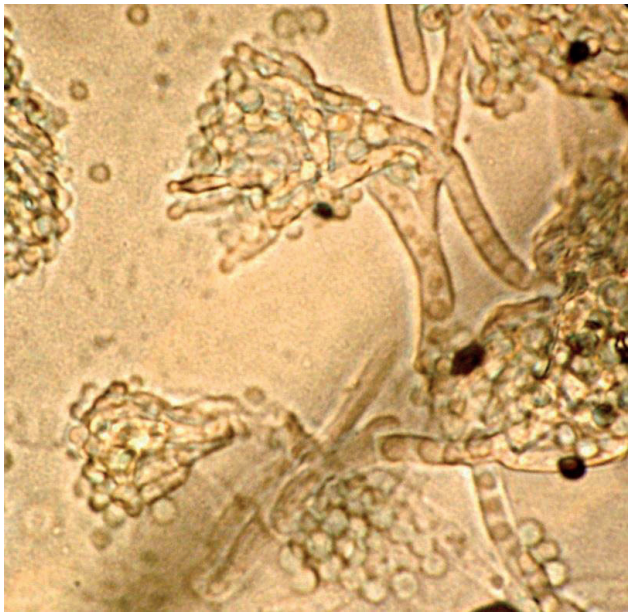


Abbildung 13: Konidiophor von *Penicillium* spp. aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem blauweiß verschimmeltem Roggenmischbrot (Abb. 12) (40fache Vergrößerung)

Die dritte Mycelausprägung zeichnete sich durch einen flachen bis leicht erhabenen orangefarbenen Schimmelrasen aus (siehe Abbildung 16 und 21). Ein derartiger Schimmelbefall konnte auf 4 von 30 Broten, die bei einer Temperatur von 21 °C gelagert worden waren sowie auf 2 von 30 Broten, die bei einer Temperatur von 24 °C gelagert wurden innerhalb von durchschnittlich 23 Tagen (9-48 Tage) beobachtet werden.

In den Tabellen 7 bis 9 ist jeweils eine Übersicht über das zeitliche Auftreten visuell festgestellter Schimmelpilzkolonien in Abhängigkeit zur entsprechenden Lagerungstemperatur dargestellt. Die Abbildungen 14 und 15 veranschaulichen jeweils die prozentuale Häufigkeitsverteilung der bei einer Temperatur von 21 °C bzw. 24 °C entwickelten farblichen Schimmelpilzerscheinungen in Form eines Kreisdiagramms.

Tabelle 7: Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C. Insgesamt wurde blaugrüner Brotschimmel auf 5 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.

Mycelfarbe	Lagerungsdauer bei 7 °C in Tagen							Gesamt
	1-14	15-28	29-42	43-56	57-70	99-112	113-126	
schwarz* (schwarzgelb)	0	0	0	0	0	0	0	0
orange*	0	0	0	0	0	0	0	0
blaugrün* (blaugelb,-weiß)	0	2	2	1	2	1	1	9
Gesamt	0	2	2	1	2	1	1	9

* dominierender Farbton

Tabelle 8: Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C. Insgesamt wurde blaugrüner Brotschimmel auf 15 von 30 Broten, schwarzer Brotschimmel auf 9 von 30 Broten sowie orangefarbener Brotschimmel auf 4 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.

Mycelfarbe	Lagerungsdauer bei 21 °C in Tagen					Gesamt
	1-14	15-28	29-42	43-56	57-70	
schwarz* (schwarzgelb)	3	6	10	0	2	21
orange*	2	4	2	1	0	9
blaugrün* (blaugelb, -weiß)	10	9	4	2	1	26
Gesamt	15	19	16	3	3	56

* dominierender Farbton

Tabelle 9: Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Brot bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C. Insgesamt wurde schwarzer Brotschimmel auf 12 von 30 Broten, blaugrüner Brotschimmel auf 7 von 30 Broten sowie orangefarbener Brotschimmel auf 2 von 30 Broten bei dieser Lagerungstemperatur festgestellt.

Mycelfarbe	Lagerungsdauer bei 24 °C in Tagen						Gesamt
	1-14	15-28	29-42	43-56	57-70	85-98	
schwarz* (schwarzgelb)	12	11	7	2	2	1	35
orange*	1	1	0	0	0	0	2
blaugrün* (blaugelb, -weiß)	2	4	1	0	0	1	8
Gesamt	15	16	8	2	2	2	45

* dominierender Farbton

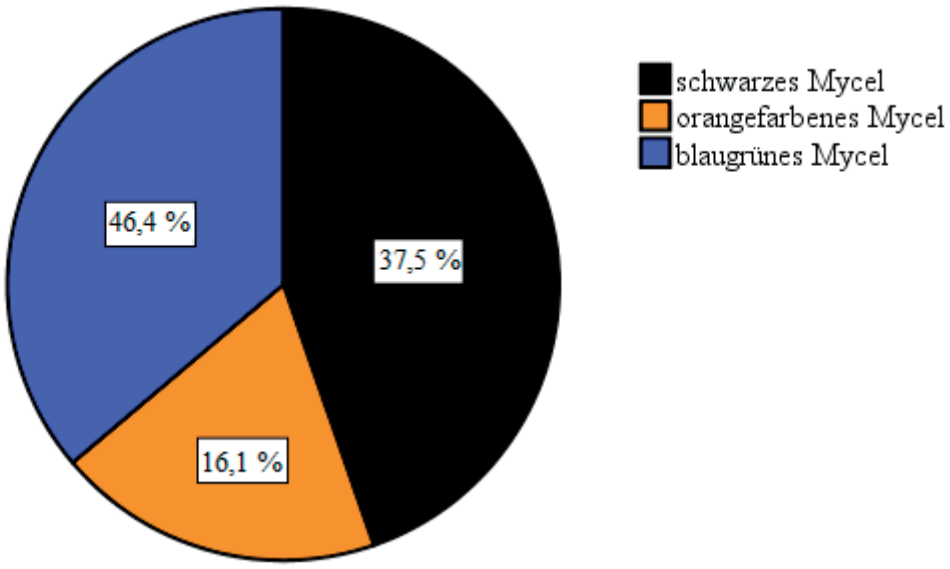


Abbildung 14: Prozentualer Anteil verschiedener Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C auf Brot gewachsenen Schimmelpilzkolonien ($n_K = 56$). Auf allen 30 Broten, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden.

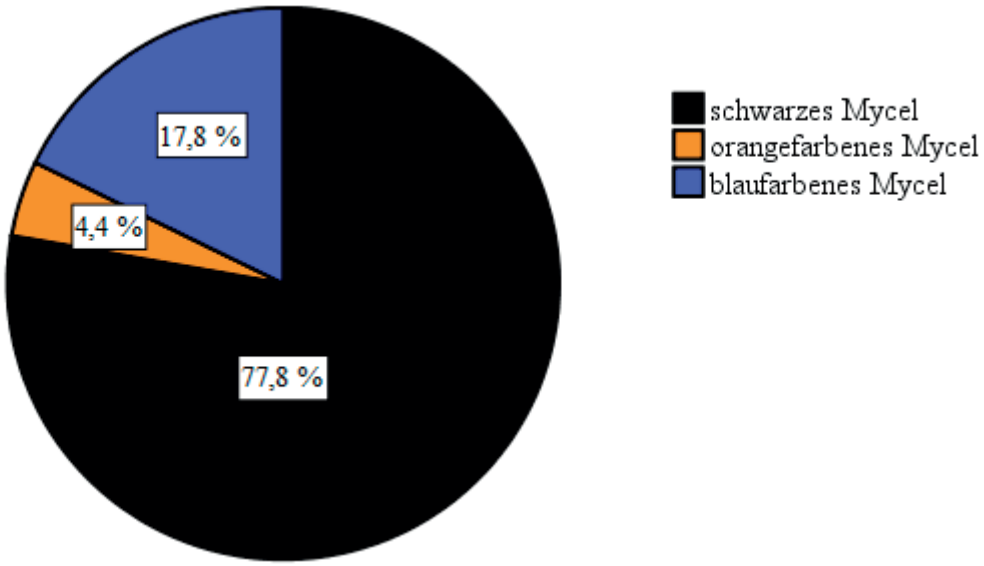


Abbildung 15: Prozentualer Anteil verschiedener Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C auf Brot gewachsenen Schimmelpilzkolonien ($n_K = 45$). Auf allen 30 Broten, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden.

4.2.2 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von Brotschimmel

Anhand makroskopischer und mikroskopischer Gattungsmerkmale sowie ITS-Sequenzierungen, welche mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Rolf Geisen am Max Rubner-Institut in Karlsruhe durchgeführt worden waren, wurde der schwarze Brotschimmel mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % als *A. niger* identifiziert. Bei dem orangefarbenen Pilzrasen handelte es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % um *N. tetrasperma* (siehe Abbildung 16 und 17).

Abbildung 16: Verschimmelte Weißbrotscheibe mit orangefarbenem Wachstum (*N. tetrasperma*, links) und schwarzgelbem Wachstum (*A. niger*, rechts) (Lagerung: 8 Tage bei 21 °C)

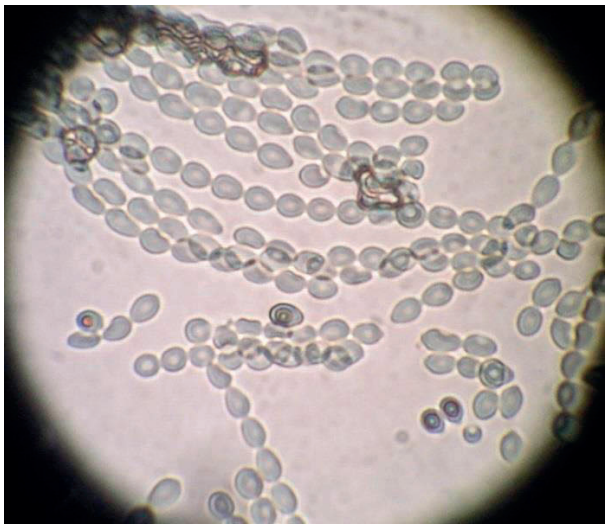


Abbildung 17: Konidiosporen von *N. tetrasperma* aus Pilzmycel, Isolat aus oben abgebildetem Weißbrot (Abb. 16) mit orangefarbenem Schimmelbefall (40fache Vergrößerung)

4.2.3 Mykotoxikologische Untersuchungen von natürlich verschimmeltem Brot

Wie in 4.2.1 beschrieben kam es in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur auf allen 30 untersuchten Broten zur Entwicklung verschiedenartiger Mycelien. Zusätzlich flossen drei weitere schimmelbefallene Brote aus hessischen Privathaushalten in die enzymimmunologischen Untersuchungen mit ein. Da die Schimmelpilzkolonien sowohl in zeitlicher Abfolge als auch parallel zueinander auftraten, war in der Regel eine segmentale Untersuchung der einzelnen Proben notwendig. Fumonisin konnte zu 96 % in schwarz bzw. schwarzgelb ($n_K = 54$) sowie zu 64 % in orangefarben verschimmelten Brotabschnitten ($n_K = 11$) nachgewiesen werden. Blau bzw. blauweiß verschimmelte Brotsegmente ($n_K = 36$) waren mit einem Anteil von 19 % am seltensten mit Fumonisin belastet. Diese enthielten hingegen mit 73 % sehr häufig IsoFuA. Im Gegensatz dazu waren alle Brote mit schwarzem bzw. schwarzgelbem Schimmelbefall negativ für IsoFuA. Orientierend durchgeführte enzymimmunologische Untersuchungen von orangegelbem Brotschimmel auf Citrinin mittels EIA ergaben keine Hinweise auf eine Belastung mit diesem Toxin (Methodik nach ABRAMSON et al., 1995; Methodik und Daten nicht dargestellt).

4.2.3.1 Nachweis von Fumonisinen

4.2.3.1.1 Enzymimmunologischer Nachweis von Fumonisinen (FB_1-Äquivalenten)

Alle untersuchten schwarzen Mycelien (n = 17), die innerhalb von durchschnittlich 36 Tagen (14-87 Tage) bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C (n = 16) und 21 °C (n = 1) auf Brot gewachsen waren, ergaben im Testsystem positive Messwerte für Fumonisin. Die Toxingehalte lagen zwischen 3,43 µg/g und 81,3 µg/g. Die durchschnittliche Fumonisinbelastung betrug 30 µg/g. Schwarzes Mycel, das kulturell auf Malzextrakt-Agar angezüchtet und als *A. niger* identifiziert wurde, war mit Fumonisingehalten von 7,46 µg/g (17 Tage bei 24 °C bebrütet) und 14 µg/g (22 Tage bei 24 °C bebrütet) ebenfalls positiv für Fumonisin.

Alle acht Brote mit einem ausschließlich schwarzen Schimmelrasen waren im Testsystem positiv für Fumonisin. Sie enthielten unabhängig von der Lagerungstemperatur bei segmentaler Untersuchung Fumonisingehalte zwischen 2,65 µg/g und 15,1 µg/g. Der Mittelwert lag bei 10,3 µg/g (21 °C: $n_K = 4$, MW: 10,7 µg/g und 24 °C: $n_K = 4$, MW: 9,93 µg/g). Die durchschnittliche Lagerungszeit betrug 24 Tage (9-36 Tage).

Brote, die sich durch einen schwarzen Pilzrasen mit weißgelben bzw. blauen Anteilen auszeichneten (siehe Abbildung 18), wiesen unabhängig von der Lagerungstemperatur im Testsystem in 29 von 31 untersuchten Fällen eine Fumonisinbelastung auf. Die Toxingehalte lagen zwischen 0,04 µg/g und 33,5 µg/g. Die durchschnittliche Fumonisin-belastung betrug 5,08 µg/g (21 °C: $n_K = 14$, MW: 3,36 µg/g und 24 °C: $n_K = 15$, MW: 6,69 µg/g). Die durchschnittliche Lagerungszeit betrug 24 Tage (6-58 Tage). Zwei schwarzgelb verschimmelte Brotabschnitte, die bei 21 °C gelagert wurden, ergaben im Testsystem Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 und wurden somit als negativ für Fumonisin gewertet.

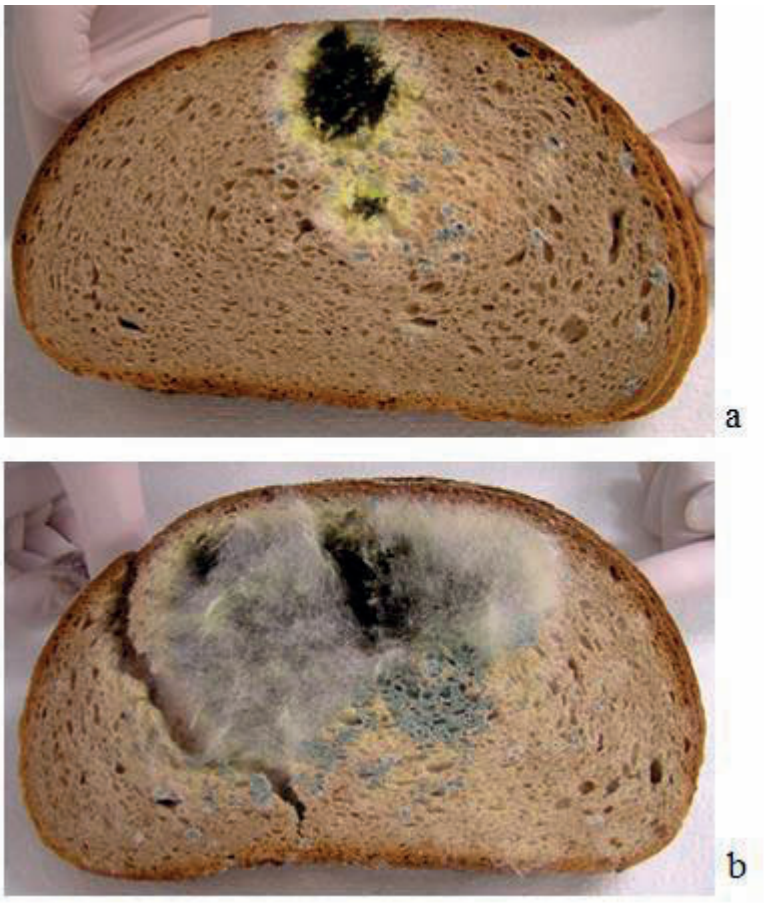


Abbildung 18: a) Roggenbrot mit schwarzgelbem und weißblauem Schimmelpilzwachstum, (Lagerung: 9 Tage bei 24 °C). b) In (a) abgebildetes Roggenbrot mit deutlicher Ausbreitung des Schimmelrasens nach 15 Tagen Lagerung bei 24 °C. Die jeweiligen Brotsegmente enthielten folgende Fumonisingehalte (FB_1-Äquivalente):

schwarz verschimmelte Anteile: 2.650 ng/g

gelb verschimmelte Anteile: 269 ng/g

blau verschimmelte Anteile: 249 ng/g

Zusammenfassend wurden in schwarzem Pilzmycel sowie in Brot mit schwarzem Schimmelrasen und in überwiegend schwarz verschimmeltem Brot mit weißgelben und blauen Anteilen bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C deutlich höhere Fumonisingehalte (x_{max} = 81,3 µg/g) nachgewiesen als bei 21 °C (x_{max} = 16,9 µg/g). Abbildung 19 bietet in Form eines Box-and-Whisker-Plots eine vergleichende Darstellung der nachgewiesenen Fumonisinkonzentrationen. Die entsprechenden Fumonisingehalte

sind in Tabelle 10 gegenübergestellt. Die Fumonisinbelastung wies bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C eine höhere Streuung als bei 21 °C auf. Bei einer Temperatur von 21 °C wurde eine durchschnittliche Fumonisinkonzentration von 5,09 µg/g ermittelt. Der Median betrug 0,87 µg/g. Das 25ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 0,31 µg/g. Das 75ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 10,9 µg/g. Bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C wurde eine durchschnittliche Fumonisinbelastung von 17 µg/g ermittelt. Der Median lag bei 8,29 µg/g. Das 25ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 2,65 µg/g. Das 75ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 23,6 µg/g. Drei Brotsegmente derselben Probe wiesen mit Messwerten zwischen 68,1 µg/g und 81,3 µg/g deutlich erhöhte Fumonisingehalte auf.

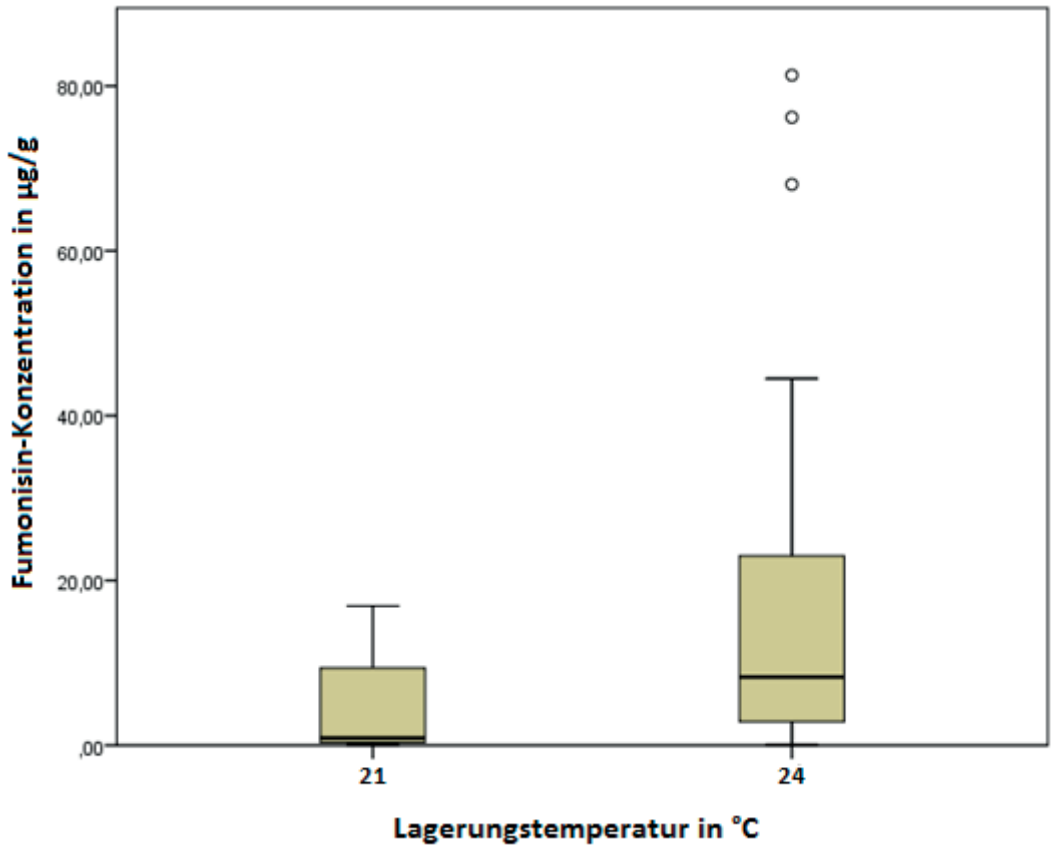


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Fumonisingehalte in Abhängigkeit zur Lagerungstemperatur (links: 21 °C, rechts: 24 °C). Die Messwerte wurden mittels FB_1-EIA in schwarzem Pilzmycel sowie in Brot mit schwarzem Schimmelrasen und in überwiegend schwarz verschimmeltem Brot mit weißgelben und blauen Anteilen ermittelt.

Tabelle 10: Verteilungsmuster der Fumonisingehalte in schwarzem Pilzmycel sowie in Brot mit schwarzem Schimmelrasen und überwiegend schwarz verschimmeltem Brot mit weißgelben und blauen Anteilen in Abhängigkeit zur Lagerungstemperatur

Lagerungstemperatur	FB_1-Äquivalente in µg/g				
	Minimum	25stes Perzentil	50stes Perzentil	75stes Perzentil	Maximum
21 °C	0,00	0,31	0,87	10,94	16,9
24 °C	0,04	2,65	8,29	23,61	81,31

Auf den untersuchten Broten konnten insgesamt 11 Schimmelpilzkolonien mit orangefarbenem Mycel (siehe Abbildung 20) visuell festgestellt werden. Im Testsystem waren 7 dieser 11 Pilzkolonien mit Toxingehalten zwischen 0,1 µg/g und 2,32 µg/g positiv für Fumonisin. Der Mittelwert lag bei 0,99 µg/g (21 °C: $n_K = 5$, MW: 0,89 µg/g und 24 °C: $n_K = 2$, MW: 1,26 µg/g). Diese Proben ergaben nach Extraktion und Verdünnung entsprechend eines Verdünnungsfaktors von 1:200 noch deutlich positive Ergebnisse. Die durchschnittliche Lagerungszeit betrug 23 Tage (9-48 Tage). Sämtliche Fumonisin-negative Brote mit orangefarbenem Schimmelpilzbefall wurden bei 21 °C gelagert und stammen zur Hälfte aus hessischen Haushalten. Orangefarbenes Mycel, das nach kultureller Anzucht als *N. tetrasperma* identifiziert wurde, wies im Testsystem Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 auf und wurde somit als negativ für Fumonisin gewertet (siehe Abbildung 16).

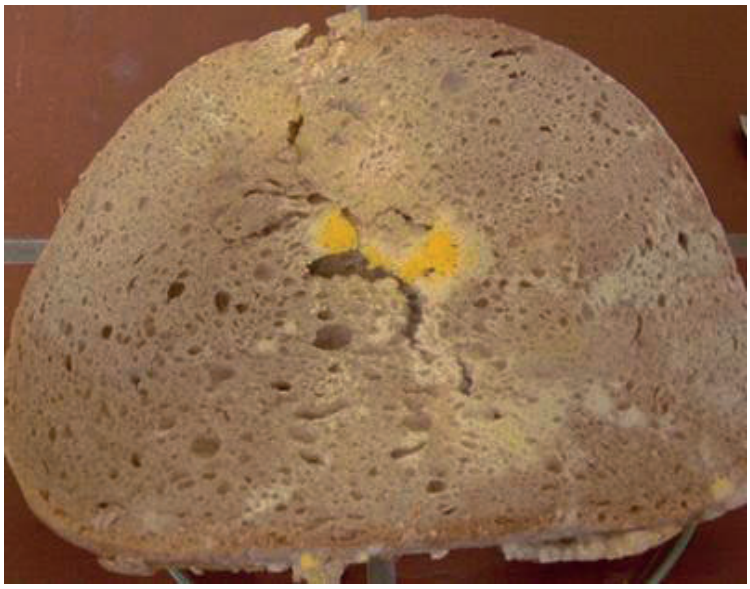


Abbildung 20: Verschimmeltes Weizenmischbrot mit orangegelbem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB_1-Äquivalente) lag bei 0,2 µg/g (Lagerung: 9 Tage bei 21 °C).

Im Testsystem waren 5 von 31 Schimmelpilzkolonien mit blaugrünem Mycel und gelbweißen Mycelanteilen (siehe Abbildung 21 und 22) – gelagert bei 7 °C, 21 °C und 24 °C – positiv für Fumonisin. Diese enthielten Toxinkonzentrationen zwischen 0,01 µg/g und 0,25 µg/g. Die mittlere Fumonisinbelastung betrug 0,06 µg/g, bei einer durchschnittlichen Lagerungszeit von 34 Tagen (7-114 Tage).

Abbildung 21: Verschimmeltes Vollkornbrot mit gelbweiß, -blauem Mycel. Der Fumonisingehalt (FB_1-Äquivalente) betrug 0,09 µg/g (Lagerung: 28 Tage bei 21 °C).

Abbildung 22: Verschimmeltes Roggenmischbrot mit blauweißem Mycel. Fumonisine (FB_1-Äquivalente) waren nicht nachweisbar (< 2 ng/g) (Lagerung: 26 Tage bei 21 °C).

Zwei von fünf blauweißen Mycelien (n = 5), die innerhalb von durchschnittlich 40 Tagen (21-68 Tage) bei Raumtemperatur (21 °C) auf Brot gewachsen waren (siehe Abbildung 22) und isoliert vom Brot untersucht wurden, ergaben im FB_1-EIA Toxingehalte von 0,01 µg/g und 7,1 µg/g. Drei der blauweißen Mycelien wiesen im Testsystem Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 auf und wurden somit als negativ für Fumonisin gewertet (siehe Abbildung 22).

Abbildung 23 bietet in Form eines Box-and-Whisker-Plots eine temperaturunabhängige Übersicht der Fumonisinkontamination aufgrund gewachsener Schimmelpilze. Die entsprechenden Fumonisingehalte sind in Tabelle 11 gegenübergestellt. Zur vergleichenden Darstellung der Fumonisinbelastungen in Abhängigkeit der Mycelausprägung wurden im Diagramm negative Proben unter Angabe der halben Nachweisgrenze (1 ng/g) in die Berechnung miteinbezogen. Schwarzer Brotschimmel wies bezüglich der Fumonisinbelastung die stärkste Streuung unter den drei untersuchten Mycelausprägungen auf. Die durchschnittliche Fumonisinkonzentration in schwarzem Schimmel betrug 12,5 µg/g. Der Median lag bei 6,6 µg/g. Das 25ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 0,59 µg/g. Das 75ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 14,8 µg/g. Bei orangefarbenem Brotschimmel wurde eine durchschnittliche Fumonisinbelastung von 0,99 µg/g ermittelt. Der Median lag bei 0,17 µg/g. Das 25ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 0,001 µg/g. Das 75ste Perzentil entsprach einem Fumonisingehalt von 1,25 µg/g. Blauer bzw. blaugrüner Schimmel wies eine durchschnittliche Fumonisinbelastung von 0,21 µg/g auf. Der Median lag bei 0,001 µg/g. Da 80 % der Proben mit einem Wert von 0,001 µg/g in die Auswertung miteinbezogen wurden, entsprach sowohl das 25ste Perzentil als auch das 75ste Perzentil einem Fumonisingehalt von 0,001 µg/g. Anhand des Box-and-Whisker-Plots wird ersichtlich, dass blaugrüne Pilzkolonien bis auf einen Extremwert von 7,1 µg/g überwiegend Fumonisingehalte unterhalb der Nachweisgrenze von 2 ng/g aufwiesen.

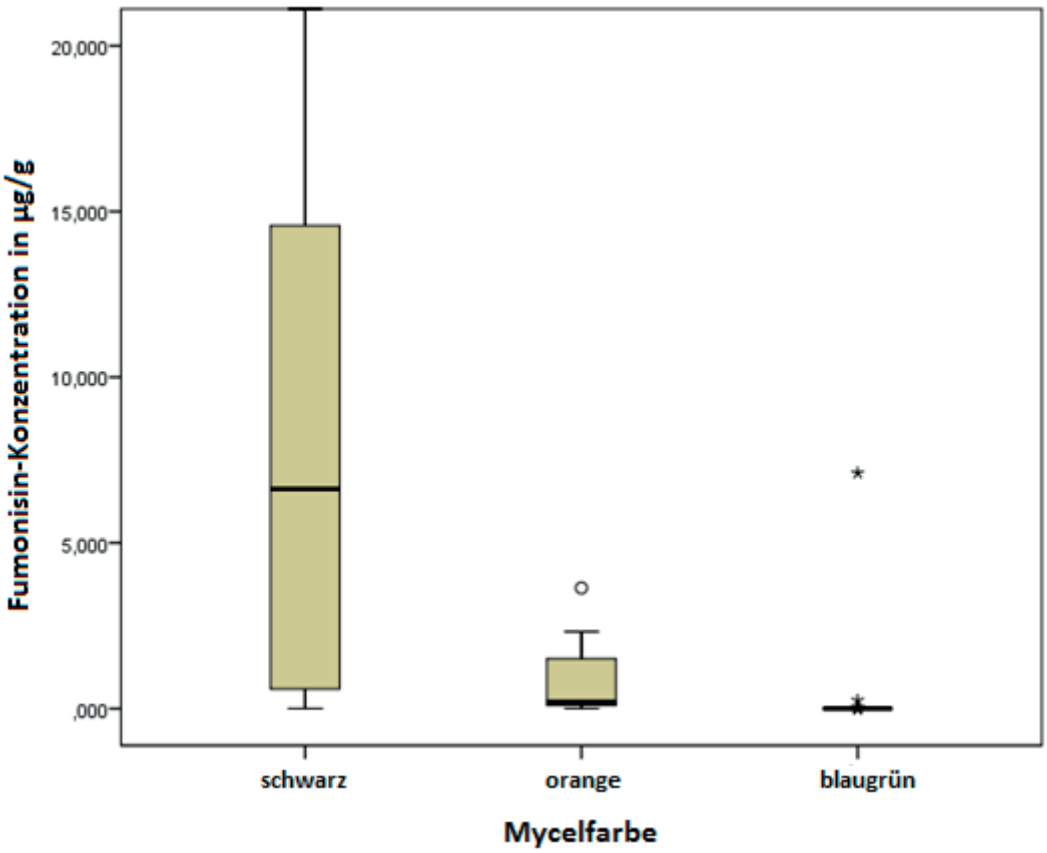


Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der Fumonisingehalte in unterschiedlichen Mycelien. Die Messwerte wurden mittels FB_1-EIA in überwiegend schwarz (links), orangefarben (Mitte) und blau bzw. blaugrün (rechts) verschimmelten Broten ermittelt.

Tabelle 11: Verteilungsmuster der Fumonisingehalte in Abhängigkeit der Mycelfarbe

Mycelfarbe	FB_1-Äquivalente in µg/g				
	Minimum	25stes Perzentil	50stes Perzentil	75stes Perzentil	Maximum
schwarz	0,001	0,59	6,63	14,8	81,31
orange	0,001	0,001	0,17	1,25	2,32
blau, blaugrün	0,001	0,001	0,001	0,001	7,1

In makroskopisch mycelfreien Brotabschnitten schimmelbefallener Brotscheiben war bereits in einem Abstand von ca. 5 cm zu verschimmelten Bereichen kein Toxin mehr nachweisbar. In deutlich verschimmelten Brotsegmenten derselben Scheibe ließen sich hingegen zum Teil erhebliche Fumonisingehalte mit einem Maximalwert von 44,5 µg/g nachweisen. Aufgrund dessen besteht kein Hinweis auf eine Toxindiffusion in mycelfreie Brotpartien.

In Tabelle 12 sind die für den FB_1-EIA ermittelten Wiederfindungsraten für FB_1 in künstlich kontaminierten Brotproben zusammengefasst. Die künstlich kontaminierten Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Es konnten zufriedenstellende Wiederfindungsraten zwischen 77,6 % und 81,7 % erzielt werden. Die Variationskoeffizienten lagen in einem Bereich von 13,7 % bis 16,2 %.

Tabelle 12: Wiederfindungsraten für FB_1 in künstlich kontaminiertem Brot

FB_1-Zusatz (ng/g)	Ergebnis FB_1				n
	Mittelwert (ng/g)	s (ng/g)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
100	77,6	12,5	16,2	77,6	4
1.000	817,4	112,3	13,7	81,7	5

4.2.3.1.2 Chromatographischer Nachweis von Fumonisinen

Die HPLC-Analyse ausgewählter Proben bestätigte bei einer Nachweisgrenze von 0,6 µg/g, dass es sich bei dem mittels FB_1-EIA nachgewiesenen Fumonisin hauptsächlich um eine FB_2-Belastung der verschimmelten Brote handelte. Die Ausnahme bildete eine bei 7 °C gelagerte Brotprobe mit blauem Pilzmycel. Sie ergab im FB_1-EIA einen positiven Messwert von 10 ng/g. Mittels HPLC-Analyse wurde in dieser Probe eine FB_1-Belastung von 1,3 µg/g nachgewiesen; FB_2 oder FB_3 wurden hingegen nicht detektiert. Brotabschnitte, die keine sichtbaren Anzeichen eines Schimmelbefalls aufwiesen, war auch im chromatographischen Analyseverfahren negativ für FB_1, FB_2 und FB_3.

Generell ergaben die durch SAX gereinigten Probenextrakte im FB_1-EIA niedrigere Messwerte als im ungereinigten Zustand. Dies kann z. B. auf unspezifische Probenmatrixeffekte zurückgeführt werden, die mithilfe der SAX-Aufreinigung reduziert werden konnten. In Tabelle 13 sind für sechs ausgewählte Brotproben die Messwerte der HPLC-Analysen sowie der enzymimmunologischen Untersuchungen mit und ohne zusätzliche SAX-Aufreinigung vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 13: Vergleich von Analysen mittels HPLC und EIA

Probe (Lagerungstemperatur)		HPLC (µg/g)			EIA Fumonisingesamtgehalt (µg/g)	
		FB_1	FB_2	FB_3	mit SAX-Aufreinigung	ohne SAX-Aufreinigung
3284	schwarzes Mycel (24 °C)	n. n.	14,5	n. n.	37,6	81,3
3284	schwarzes Mycel: kulturelle Anzucht auf Malzextrakt-Agar (17 Tage, 24 °C)	n. n.	1,9	n. n.	0,6	7,46
3282	schwarzes Mycel (21 °C)	n. n.	0,7	n. n.	0,53	16,9
3361	Brot mit schwarzgelb-weißem Mycel (21 °C)	n. n.	n. n.	n. n.	0,14	0,6
3258	Brot mit blauem Mycel (7 °C)	1,3	n. n.	n. n.	n. n.	0,01
3347	Brot mit kleinen blauen Mycel-Arealen (21 °C)	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

n. n. = nicht nachweisbar

Zur Überprüfung des chromatographischen Testsystems erfolgte eine künstliche Probendotierung mit jeweils 25 µg/g FB_1-, FB_2- und FB_3-Toxin. Die ermittelte Wiederfindungsrate betrug 46,4 % für FB_1, 54,4 % für FB_2 und 56 % für FB_3. In den Abbildungen 24 bis 26 sind ausgewählte HPLC-Chromatogramme der Studie dargestellt.

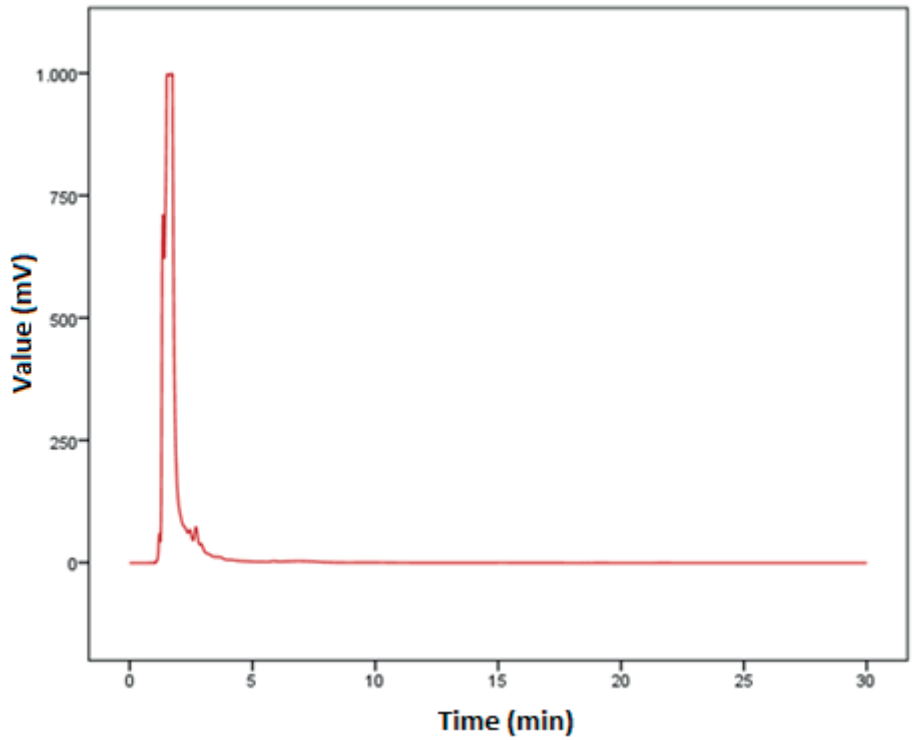


Abbildung 24: HPLC-FLD-Chromatogramm einer fumonisinfreien Brotprobe (Probe 3347, Brot mit kleinen blauen Mycel-Arealen, 21 °C, 30 Tage gelagert)

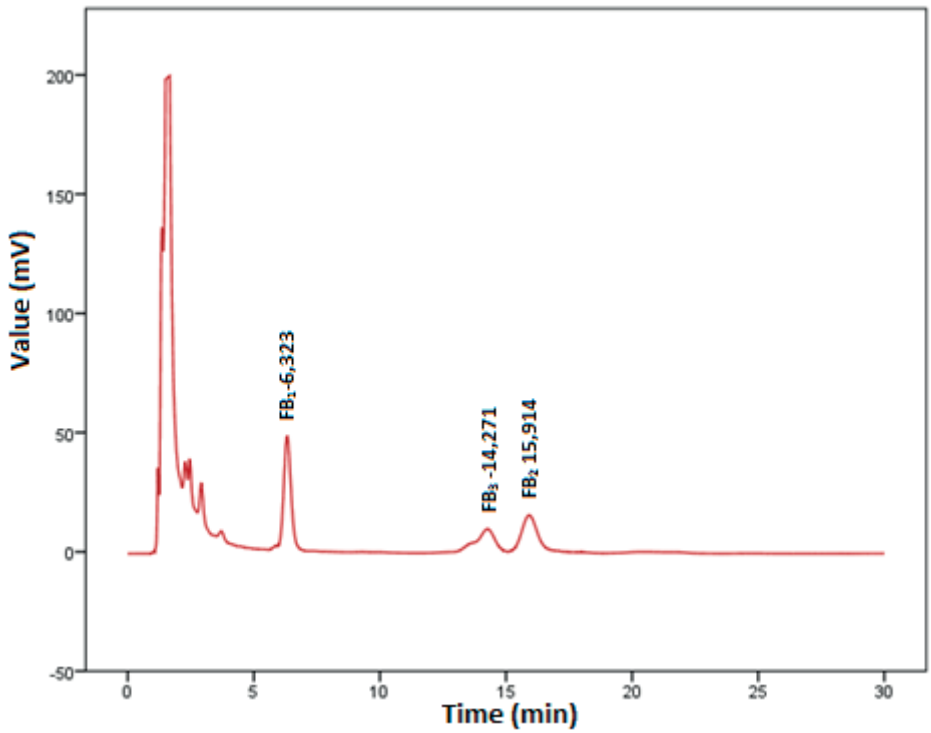


Abbildung 25: HPLC-FLD-Chromatogramm von künstlich mit FB_1, FB_2 und FB_3 kontaminiertem Brot. Die Injektionsmenge aller drei Toxine lag bei 25 ng.

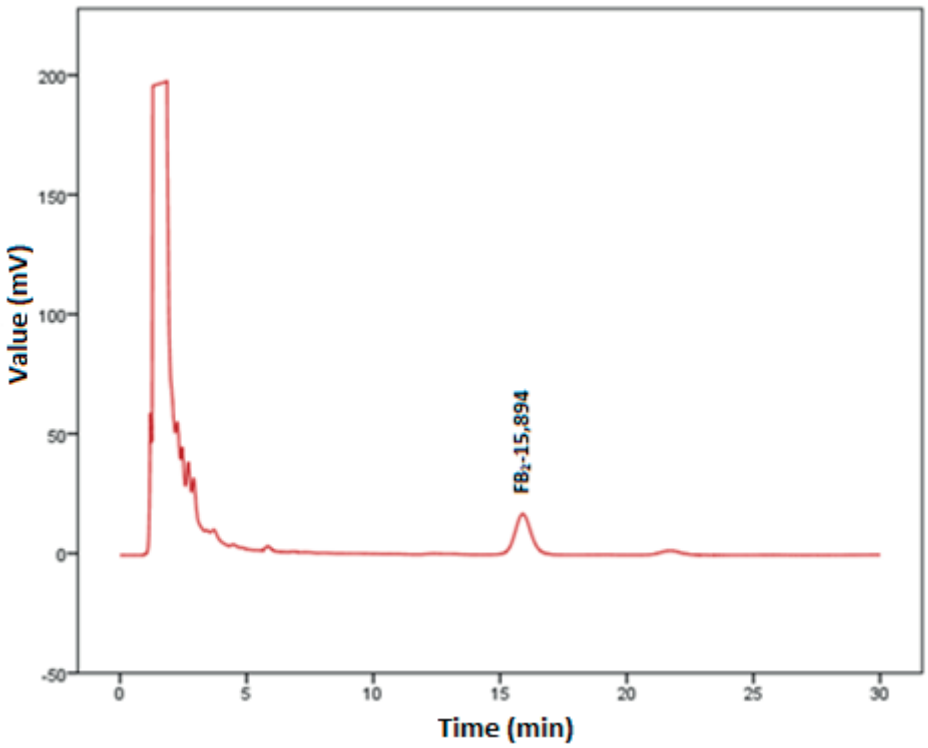


Abbildung 26: HPLC-FLD-Chromatogramm von „natürlich“ auf Brot gewachsenem schwarzem Mycel (Probe 3284, schwarzes Mycel, 24 °C, 34 Tage gelagert). Der mittels HPLC bestimmte Gehalt dieser Probe für FB_2 lag bei 14,5 µg/g.

4.2.3.2 Enzymimmunologische Untersuchung auf Isofumigaclavin A

4.2.3.2.1 GEA-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

Unter Anwendung des GEA-EIA wurde in einem von insgesamt acht visuell einwandfreien Broten, die im frischen Zustand untersucht wurden, eine Ergotalkaloidbelastung von 32,6 ng/g nachgewiesen. Des Weiteren wiesen 12 von 14 blaugrünen, blaugelben sowie schwarzen Schimmelpilzkolonien, die unabhängig von der Lagerungstemperatur auf acht Broten gewachsen waren, Toxingehalte zwischen 0,03 µg/g und 7,9 µg/g auf. Der Mittelwert lag bei 1,62 µg/g. Die durchschnittliche Lagerungszeit der untersuchten Proben betrug 18 Tage (7-27 Tage). Ein blaugelb und ein schwarz verschimmeltes Brotsegment ergaben im GEA-EIA Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 und wurden somit als negativ für

Ergotalkaloide gewertet. Die negativ getestete schwarz verschimmelte Probe wies nach weiteren 2 Wochen Lagerung bei 24 °C einen Ergotalkaloidgehalt von 33,5 ng/g auf.

Auffällig war, dass sämtliche Proben ab einer Gesamtergotalkaloid-Konzentration von ca. 160 ng/g (entsprechend einer im Test eingesetzten Konzentration von 3,2 ng/ml bei einem Probenextraktverdünnungsfaktor von 50) einen Verlust des linearen Zusammenhangs der Probenverdünnungsreihe aufwiesen, sodass es zu gegenläufigen Abweichungen im oberen Quantifizierungsbereich kam. Insofern konnte ab einem Konzentrationsniveau von 160 ng/g nicht mehr zuverlässig quantifiziert werden.

4.2.3.2.2 Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

Die Untersuchung mittels Ergonovin-EIA ergab bei 10 von 15 schimmelbefallenen Brotsegmenten (blauweißes Mycel: $n_K = 11$; gelbes/gelbschwarzes Mycel: $n_K = 4$), bei einer Lagerungszeit von durchschnittlich 32 Tagen (9-90 Tage), temperaturunabhängig Toxingehalte zwischen 1,79 ng/g und 23,9 ng/g. Unter Einbeziehung der relativen Kreuzreaktion des Anti-Ergonovin-Antikörpers zu IsoFuA (22,08 %) (LATIF, 2010) ergaben sich rechnerisch ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 8,11 ng/g und 108,3 ng/g. Die entsprechend ermittelte durchschnittliche IsoFuA-Belastung betrug 59,6 ng/g (MW mittels Ergonovin-EIA: 13,2 ng/g).

Der rechnerisch ermittelte IsoFuA-Höchstgehalt von 108,3 ng/g wurde in blauem Mycel nachgewiesen, das bei einer Temperatur von 7 °C auf Brot gewachsen war und ohne Brotanteile untersucht wurde. Im Gegensatz dazu wies ein blau verschimmelter Teilabschnitt derselben Brotscheibe (Lagerungstemperatur: 7 °C) einen Extinktionswert von ≥ 75 % B/B_0 auf und wurde daher als negativ für IsoFuA gewertet.

Im Testsystem waren 8 von 12 Schimmelpilzkolonien, die bei einer Temperatur von 21 °C auf Brot gewachsen waren, positiv für IsoFuA (blauweißes Mycel: $n_K = 6$; blauweißgelbes Mycel: $n_K = 2$). Der rechnerisch ermittelte Durchschnittsgehalt betrug 52,2 ng/g IsoFuA (Messwert mittels Ergonovin-EIA: 11,5 ng/g).

Eine Brotprobe, die bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C einen blauweißen Pilzrasen entwickelte, wies eine rechnerisch ermittelte IsoFuA-Belastung von 70,2 ng/g auf (Messwert mittels Ergonovin-EIA: 15,5 ng/g).

Fünf von fünfzehn mittels Ergonovin-EIA untersuchten schimmelbefallenen Broten (blaues Mycel: $n_K = 2$ (21 °C), $n_K = 1$ (7 °C); gelbes/gelbschwarzes Mycel: $n_K = 2$ (21 °C)) ergaben im Testsystem Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 und wurden daher als negativ für das Ergolin-Derivat IsoFuA gewertet.

Bei der Untersuchung von zwei makroskopisch schimmelfreien Brotsegmenten, welche jeweils in einem Abstand von ca. 5 cm zu sichtbar verschimmelten Abschnitten lokalisiert waren, wies eine der Proben eine rechnerische IsoFuA-Belastung von 11,4 ng/g auf (Messwert mittels Ergonovin-EIA: 2,52 ng/g). Auf derselben Brotscheibe wurde in blauem Schimmelpilzmycel die rechnerische IsoFuA-Höchstbelastung der Studie von 108,3 ng/g detektiert (Messwert mittels Ergonovin-EIA: 23,9 ng/g). Das andere schimmelfreie Segment ergab im Testsystem einen Extinktionswert von ≥ 75 % B/B_0 und wurde als negativ für Ergolin-Verbindungen / IsoFuA gewertet. Auf derselben Brotscheibe wies hingegen ein Abschnitt mit blauem Schimmelpilzwachstum eine rechnerische IsoFuA-Belastung von 16,7 ng/g auf (Messwert mittels Ergonovin-EIA: 3,68 ng/g).

Die für den Ergonovin-EIA ermittelten Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Brot sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die künstlich kontaminierten Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich von 82,6 % bis 190,3 %. Die ermittelten Variationskoeffizienten beliefen sich auf 14,4 % bis 31,2 %. Für Ergonovin-Zusätze nahe der Nachweisgrenze wurden Wiederfindungsraten von über 100 % erzielt. Dies kann z. B. durch unspezifische Probenmatrixeffekte erklärt werden. Eine weitere Begründung liegt in teilweise schwach positiven Messwerten der nicht dotierten Brotproben. Diese könnten beispielsweise auf eine „natürliche“ Ergotalkaloid-Kontamination des Korns durch Feldpilze zurückzuführen sein. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass mit dem verwendeten Testsystem eine eindeutige Toxinidentifizierung nicht möglich ist, auch wenn Toxingehalte nach Verschimmelung mit *Penicillium* spp. plausiblerweise auf IsoFuA zurückzuführen sind.

Tabelle 14: Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Brot

Ergonovin-Zusatz (ng/g)	Ergebnisse Ergonovin				n
	Mittelwert (ng/g)	s (ng/g)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
2	3,81	0,71	18,6	190,3	3
4	5,43	0,78	14,4	135,7	3
5	4,33	1,35	31,2	86,6	3
10	8,26	1,85	22,4	82,6	3

4.3 Schimmelpilzbefall von Käse

4.3.1 Orientierende Untersuchungen zum Schimmelpilzwachstum auf Käse

Unter haushaltsüblicher Lagerung im Kühlschrank (7 °C) kam es unabhängig von der jeweiligen Käsegruppe oder Käsesorte innerhalb von durchschnittlich vier Wochen zu einem sichtbaren Schimmelbefall der Käseproben. Alle untersuchten Proben (n = 46) waren innerhalb von 5 bis 77 Tagen von Schimmelpilzwachstum betroffen. Der gewachsene Käseschimmel ließ sich anhand unterschiedlicher Mycelausprägungen in etwa vier Erscheinungen visuell unterscheiden. Diese traten entweder zeitlich getrennt bzw. ineinander übergehend, oder parallel an unterschiedlichen Käsepartien auf.

Auf insgesamt 22 von 46 Käseproben kam es innerhalb von durchschnittlich 31 Tagen (5-77 Tage) zur Entwicklung eines blauen bzw. blaugrünen Schimmelrasens mit vereinzelt grauweißen Anteilen. Zusätzlich konnte innerhalb von durchschnittlich 31 Tagen (12-73 Tage) das Wachstum von grauem bzw. grauschwarzem Pilzmycel auf 14 von 46 Käseproben vermerkt werden. Ein Stück Leerdammer Käse wies bereits im Lebensmitteleinzelhandel einen deutlichen schwarzen Schimmelbefall auf. Dieser entwickelte nach weiterer Lagerung ein ca. 5-10 mm erhabenes schwarzes Hyphengeflecht, das den Käse nahezu vollständig umschloss (siehe Abbildung 27). Vereinzelt kam es auf 3 von 46 Käseproben innerhalb von durchschnittlich 31 Tagen (7-59 Tage) zum Wachstum von braunbeigefarbenem, leicht granuliertem Mycel (siehe Abbildung 28). Bei 23 von 46 Käseproben war innerhalb von durchschnittlich 19 Tagen (7–37 Tage) ein leichter Befall mit grauem, weißem und/oder blauem Mycel visuell erkennbar. Zum Teil kam es mit fortschreitender Lagerungszeit zu einem vorherrschenden Wachstum von weißem Mycel, welches zuvor gebildete Schimmelpilze zunehmend verdrängte (siehe Abbildung 32).

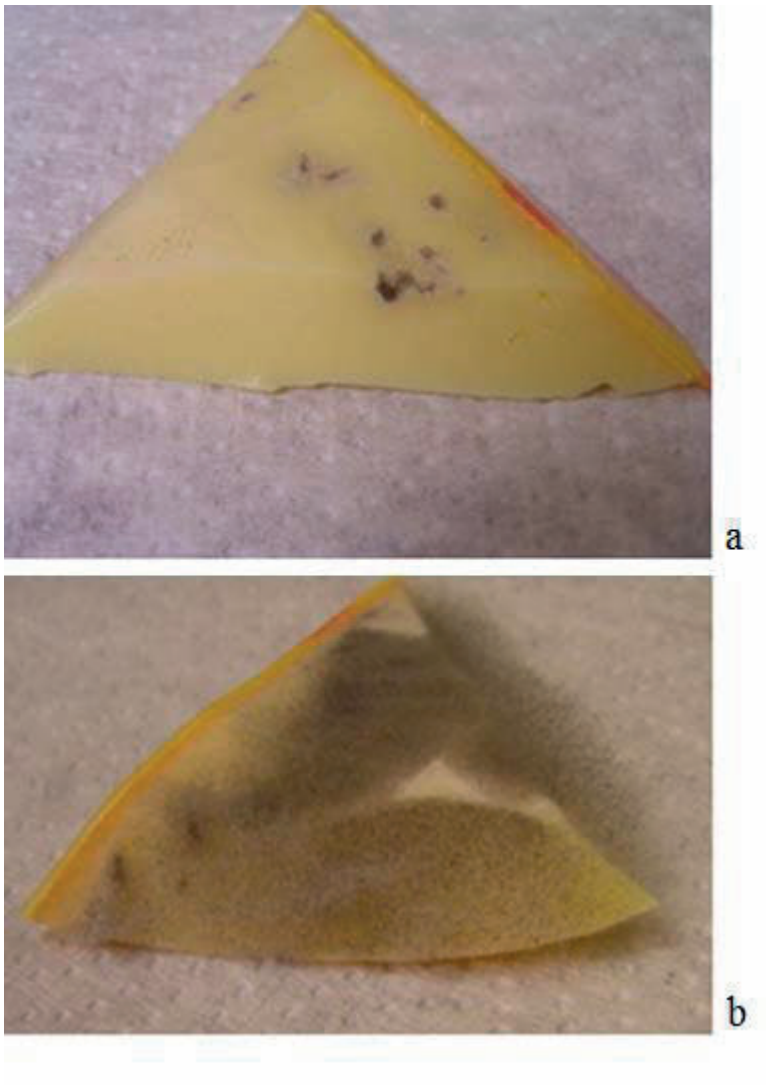


Abbildung 27: a) Leerdammer Käse mit schwarzem Pilzmycel nach unbekannter Lagerungszeit und Lagerungstemperatur im Lebensmittelgeschäft. b) Der in (a) abgebildete Käse nach weiteren 13 Tagen Lagerung bei einer Temperatur von 7 °C.

Vielfach konnte mit zunehmender Lagerungszeit ein Farbwechsel von blaugrünem zu grauem Mycel beobachtet werden (siehe Abbildung 33). In Abbildung 29 wird mittels eines Kreisdiagramms die prozentuale Häufigkeitsverteilung der auf Käse gewachsenen Mycelausprägungen verdeutlicht. Zusätzlich bietet Tabelle 15 eine Übersicht über das zeitliche Auftreten verschiedenfarbiger Pilzkolonien auf den Käseproben. In der Regel wies der schimmelbefallene Käse eine deutliche aromatische Veränderung auf. Insbesondere braunbeigefarben verschimmelte Proben entwickelten einen markanten ammoniakalischen Geruch.

Abbildung 28: Schweizer Appenzeller mit braunbeigefarbenem Schimmelpilzmycel nach 35 Tagen Lagerung bei 7 °C. IsoFuA war nicht nachweisbar.

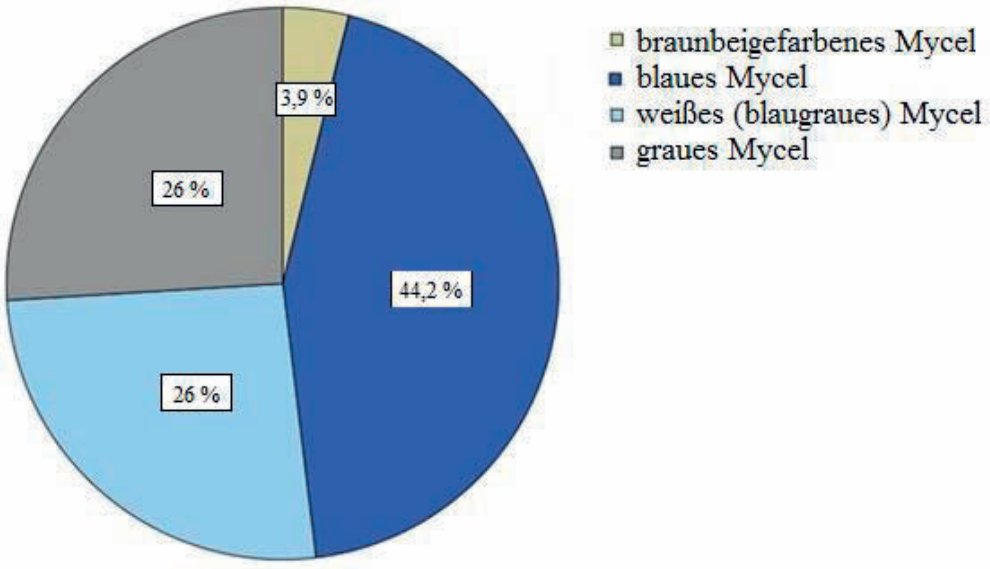


Abbildung 29: Prozentualer Anteil visuell detektierter Mycelausprägungen an der Gesamtzahl der bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C auf Käse gewachsenen Schimmelpilzkolonien ($n_K = 104$). Auf allen 46 Käseproben, die bei dieser Temperatur gelagert wurden, konnten eine oder mehrere Schimmelpilzkolonien visuell detektiert werden.

Tabelle 15: Zeitliches Auftreten farblich unterscheidbarer Schimmelpilzkolonien auf Käse bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C

Mycelfarbe	Lagerungsdauer bei 7 °C in Tage						Gesamt
	1-14	15-28	29-42	43-56	57-70	71-84	
blau* (grauweiß)	14	12	7	5	4	4	46
grau* (schwarzweiß)	7	11	3	3	1	2	27
weiß* (graublau)	4	19	4	0	0	0	27
braunbeige*	2	0	0	1	1	0	4
Gesamt	27	42	14	9	6	6	104

*dominierender Farbton

4.3.2 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von Käseschimmel

Bei mikroskopischer Beurteilung (40fache Vergrößerung) stellte sich blaues sowie graues Pilzmycel als Hyphengeflecht mit überwiegend pinselförmigen Konidiophoren dar. Diese sind charakteristisch für Vertreter der Schimmelpilzgattung *Penicillium* (siehe Abbildung 30). Zusätzlich waren im grauen Mycel vereinzelt typische Konidiophore der Schimmelpilzgattung *Aspergillus* zu erkennen. Schwarzes Mycel wies hingegen ausschließlich *Aspergillus*-Konidiophore auf (siehe Abbildung 31b). Bei braunbeigefarbenem Pilzmycel waren mikroskopisch vereinzelt runde, dickwandige Konidien zu erkennen. Diese lieferten in Verbindung mit dem makroskopischen Erscheinungsbild und einem deutlich ammoniakalischen Fremdaroma einen Hinweis auf die Schimmelpilzgattung *Scopulariopsis* spp..

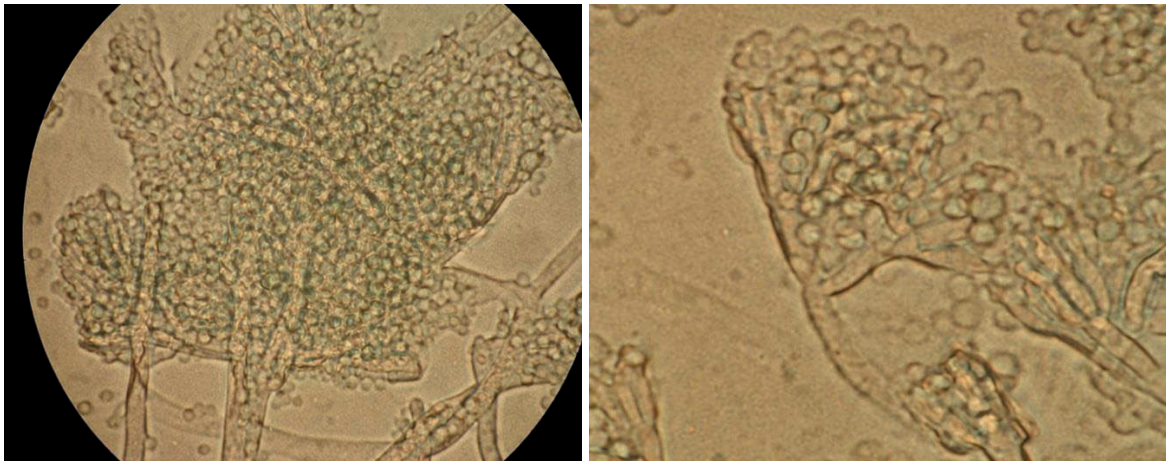


Abbildung 30: Typische pinselförmige Konidiophore mit Konidiosporen der Schimmelpilzgattung *Penicillium*, *P. roqueforti*-Isolat aus Pilzmycel des in Abb. 33 dargestellten Tilsiter Käses (40fache Vergrößerung)

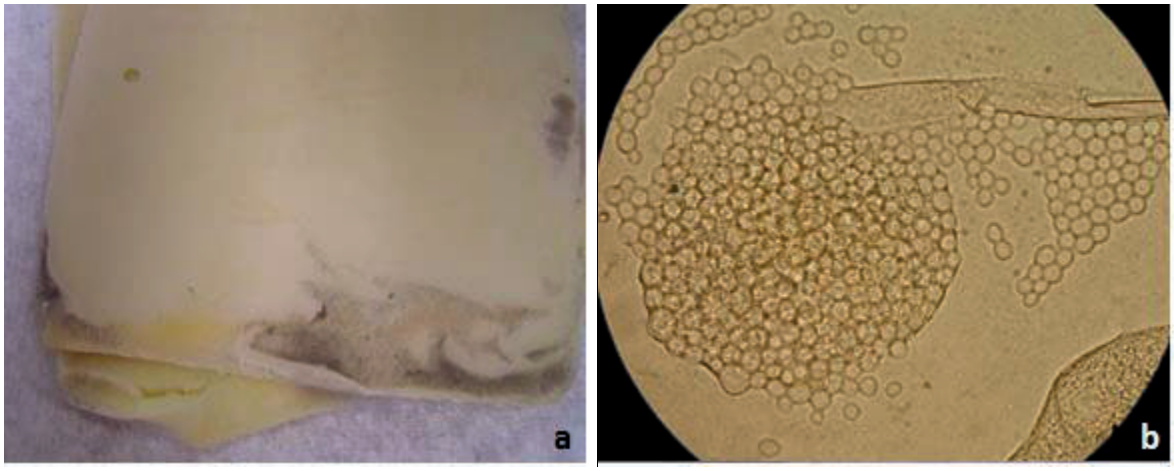


Abbildung 31: a) Butterkäse mit schwarzem Pilzmycel nach zehn Wochen Lagerung bei 7 °C, die rechnerische IsoFuA-Belastung betrug 26,7 ng/g (Ergonovin-Messwert: 5,9 ng/g), Fumonisin war nicht nachweisbar.
b) Konidiophor von *Aspergillus* spp., aus Pilzmycel des in (a) abgebildeten Käses bei 40facher Vergrößerung.

4.3.3 Mykotoxikologische Untersuchung von natürlich verschimmeltem Käse auf Isofumigaclavin A

Entsprechend der Ausführung in 4.3.1 kam es auf jeder der 46 Käseproben zum Wachstum unterschiedlicher Schimmelpilzausprägungen. Zusätzlich wurden fünf weitere schimmelbefallene Käseproben aus hessischen Privathaushalten in entsprechender Weise enzymimmunologisch untersucht. Da die Schimmelpilzkolonien sowohl in zeitlicher Abfolge als auch parallel zueinander auftraten, erfolgte in der Regel eine segmentale Untersuchung der einzelnen Käseproben. Käsescheiben, die in hohem Maße graues bzw. blaues (grauweißes) Mycel aufwiesen (siehe Abbildung 32 und 33), waren mit einem Anteil von etwa 90 % überwiegend positiv für IsoFuA. In der Regel erfolgte mit zunehmendem Schimmelpilzwachstum ein Anstieg der IsoFuA-Belastung der Käseproben. Proben mit einem leichten weißen (graublauen) Schimmelpilzbefall sowie braunbeigefarben verschimmelte Käsescheiben waren überwiegend frei von IsoFuA. Orientierend durchgeführte enzymimmunologische Untersuchungen von blaugrünem und schwarzem Käseschimmel auf Fumonisine sowie auf FuA ergaben keine Hinweise auf eine Belastung mit diesen Toxinen (Methodik FB_1-EIA nach USLEBER et al., 1994; Methodik FuA-EIA nach LATIF, 2010; jeweilige Methodik und Daten nicht dargestellt).

4.3.3.1 Ergonovin-EIA (mit Isofumigaclavinen reagierendes Testsystem)

In der Untersuchung mittels Ergonovin-EIA wiesen 24 von 27 grauschwarzen Schimmelpilzkolonien Toxingehalte zwischen 1 ng/g und 245,2 ng/g auf. Unter Einbeziehung der relativen Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers zu IsoFuA (22,08 %) (LATIF, 2010) ergaben sich rechnerisch ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 4,53 ng/g und 1.110,5 ng/g. Die rechnerisch ermittelte IsoFuA-Belastung betrug im Durchschnitt 101,99 ng/g (MW mittels Ergonovin-EIA: 22,52 ng/g).

Unter Anwendung des Ergonovin-EIAs wurden in 42 von 46 blaugrünen Schimmelpilzkolonien mit vereinzelt grauweißen Mycelanteilen Toxingehalte zwischen 1 ng/g und 52,4 ng/g nachgewiesen. Unter Einbeziehung der relativen Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers zu IsoFuA (22,08 %) (LATIF, 2010) ergaben sich rechnerisch

ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 4,53 ng/g und 237,4 ng/g. Die durchschnittliche, rechnerisch ermittelte IsoFuA-Belastung betrug 58,5 ng/g (MW mittels Ergonovin-EIA: 12,9 ng/g).

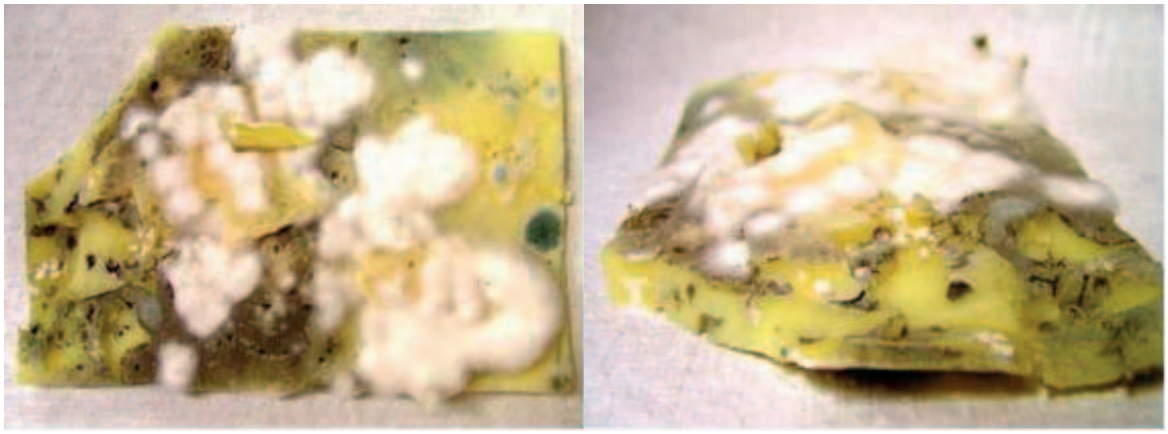


Abbildung 32: Bio-Wiesentaler Käse, 29 Tage bei einer Temperatur von 7 °C gelagert. Der rechnerische IsoFuA-Gehalt betrug 21,5 ng/g (Ergonovin-Messwert: 4,75 ng/g).

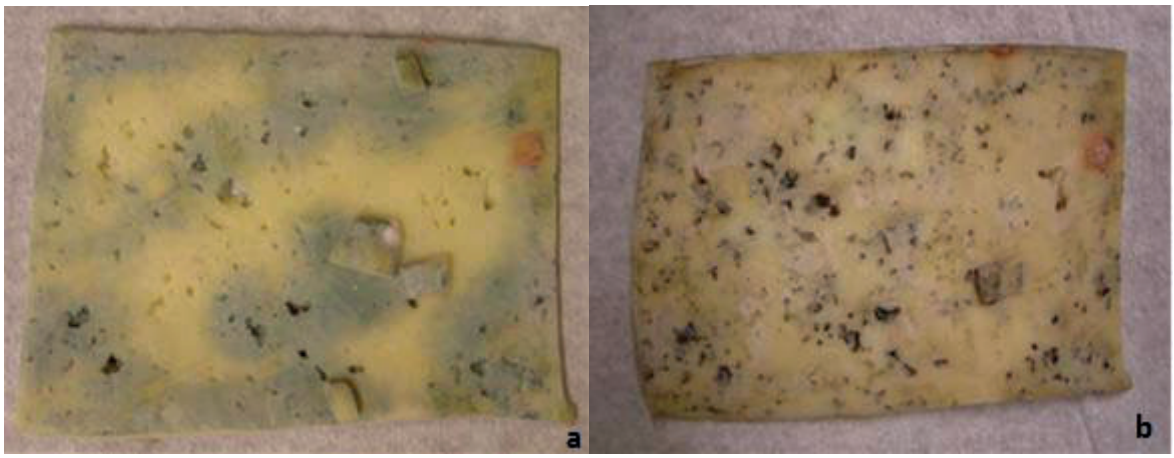


Abbildung 33: a) Tilsiter Käse mit blauem Schimmelpilzmycel nach 14 Tagen Lagerung bei 7 °C.
b) Farbwechsel des Mycels von blau zu grau nach weiteren zwei Wochen Lagerung.
Die rechnerische IsoFuA-Belastung stieg innerhalb dieses Zeitraumes von 29,71 ng/g (a) auf 546,65 ng/g (b) an (Ergonovin-Messwerte: von 6,56 ng/g auf 120,7 ng/g).

Jede der vier braunbeigefarbenen Schimmelpilzkolonien, die auf insgesamt drei Käseproben gewachsen waren, ergab im Testsystem Extinktionswerte von ≥ 75 % B/B_0 und wurden daher als negativ für IsoFuA (Ergolin-Verbindungen) gewertet.

Käseproben, die nur einen geringen Befall mit weißem, grauem und/oder blauem Mycel aufwiesen, ergaben mittels Ergonovin-EIA in einer von 27 untersuchten Proben einen Toxingehalt von 3,74 ng/g. Unter Einbeziehung der relativen Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers zu IsoFuA (22,08 %) (LATIF, 2010) wurde ein rechnerischer IsoFuA-Gehalte von 16,9 ng/g ermittelt. Eine der IsoFuA negativen, makroskopisch leicht verschimmelten Proben entwickelte nach weiteren sieben Tagen Lagerungszeit ein ausgeprägtes blaugrünes Mycelgeflecht, das nach wiederholter Untersuchung eine rechnerisch ermittelte IsoFuA-Konzentration von 55,3 ng/g aufwies (MW mittels Ergonovin-EIA: 12,2 ng/g).

Die Untersuchung zur Toxinausbreitung in Käse ergab, dass bereits in geringem Abstand zum sichtbaren, toxinhaltigen Mycel keine oder eine nur sehr geringe IsoFuA-Belastung nahe der Nachweisgrenze von 1 ng/g nachweisbar war.

Die für den kompetitiven direkten Ergonovin-EIA ermittelten Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Käse sind in Tabelle 16 dargestellt. Die künstlich kontaminierten Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich zwischen 80,5 % und 123,4 %. Die Variationskoeffizienten reichten von 4,02 % bis 25,6 %. Wiederfindungsraten von über 100 % sind beispielsweise anhand unspezifischer Probenmatrixeffekte zu erklären.

Tabelle 16: Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Käse

Ergonovin-Zusatz (ng/g)	Ergebnis Ergonovin				n
	Mittelwert (ng/g)	s (ng/g)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
2	2,12	0,09	4,02	106	2
5	5,76	0	0	115,2	1
10	9,74	2,5	25,6	97,4	5
20	16,1	3,83	23,8	80,5	5
40	49,3	0	0	123,4	1

4.3.3.2 IsoFuA-EIA

Die Nachuntersuchungen ausgewählter Käseproben mittels IsoFuA-EIA unterstützten die Hypothese, dass die ermittelten Ergonovinmesswerte überwiegend auf eine Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers mit IsoFuA zurückzuführen sind. Proben, die zuvor unter Anwendung des Ergonovin-EIA positive Messwerte ergaben, waren zu 69,2 % im IsoFuA-EIA positiv für IsoFuA. In Tabelle 17 sind die jeweiligen Messwerte vergleichend gegenübergestellt. Proben, die im Ergonovin-EIA eine Toxinbelastung zwischen 1 ng/g und 3,29 ng/g aufwiesen, ergaben im IsoFuA-EIA Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze von 4 ng/g. Proben, die mittels Ergonovin-EIA Toxingehalte zwischen 5,5 ng/g und 120,7 ng/g enthielten, waren im IsoFuA-EIA mit Messwerten zwischen 28,5 ng/g und 2.767 ng/g stark positiv für IsoFuA.

Die teilweise starken Diskrepanzen zwischen den Quantifizierungen unter Verwendung einer Ergonovin- bzw. IsoFuA-Standardkurve bei ansonsten identischen Immunreagenzien können teilweise auf die stark unterschiedliche Steilheit der Standardkurven zurückgeführt werden, was zu Abweichungen der ermittelten Toxingehalte bei identischer relativer kompetitiver Hemmung führte.

Tabelle 17: Vergleichende Darstellung der Messwerte mittels Enzymimmuntest für Ergonovin und IsoFuA

Probe	EIA-Messwerte	
	Ergonovin-EIA (ng/g)	IsoFuA-EIA (ng/g)
3400	1,0	n. n.
3426	1,41	n. n.
3399	1,6	n. n.
3404	3,29	n. n.
3348	5,5	28,5
3426	6,8	43,0
3426	9,49	61,9
3447	10,2	35,7
3428	11,4	440,2
3403	17,3	308,5
3427	29,1	937,2
3453	29,2	2.767,0
3428	120,7	806,1

n. n. = nicht nachweisbar

4.4 Enzymimmunologische Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen auf Isofumigaclavin A

In 13 von 33 Schmelzkäseproben, die im frischen, makroskopisch einwandfreien Zustand untersucht wurden, konnten mittels Ergonovin-EIA Toxingehalte zwischen 1,17 ng/g und 3,77 ng/g nachgewiesen werden. Unter Einbeziehung der relativen Kreuzreaktion des Ergonovin-Antikörpers zu IsoFuA (22,08 %) (LATIF, 2010) ergaben sich rechnerisch ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 5,3 ng/g und 17,1 ng/g. Die durchschnittliche, rechnerisch ermittelte IsoFuA-Belastung betrug 9,56 ng/g (MW mittels Ergonovin-EIA: 2,08 ng/g).

Die für den kompetitiven direkten Ergonovin-EIA ermittelten Wiederfindungsraten für Ergonovin in künstlich kontaminiertem Schmelzkäse sind in Tabelle 18 dargestellt. Die künstlich kontaminierten Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen in einem Bereich zwischen 59 % und 68,8 %. Die Variationskoeffizienten reichten von 4,37 % bis 25,7 %.

Tabelle 18: Wiederfindungsraten von Ergonovin in künstlich kontaminiertem Schmelzkäse

	Ergebnis Ergonovin				
Ergonovin-Zusatz (ng/g)	Mittelwert (ng/g)	s (ng/g)	VK (%)	Wiederfindung (%)	n
3	2,06	0,09	4,37	68,8	3
5	2,95	0,76	25,7	59	3

5 DISKUSSION

Lebensmittelverderb im Haushalt durch Schimmelpilze ist ein alltägliches Ereignis. Erstaunlicherweise ist die Frage, wie mit solchen verschimmelten Lebensmitteln umzugehen ist, nach wie vor eine oft diskutierte Thematik. In den öffentlichen Medien und vor allem in Internetforen, beispielsweise durch Verbraucherzentralen und anderen Beratungseinrichtungen, wird immer wieder die Frage nach dem Umgang mit verschimmelten Lebensmitteln thematisiert. Beispielsweise ergab eine Google-Suchanfrage nach den Begriffen „Brot verschimmelt Gefahr“ 32.900 Resultate (Zugriff am 28.04.2015). Eine analoge Anfrage „Käse verschimmelt Gefahr“ ergab sogar 69.500 Resultate (Zugriff 28.04.2015). Die von Fachjournalisten oder fachlich versierten Verbraucherberatern in den Medien abgegebenen Empfehlungen tendieren dazu, verschimmelte Lebensmittel grundsätzlich zu entsorgen oder aber von bestimmten Lebensmitteln wie Hartkäse die befallenen Stellen großzügig zu entfernen (z. B. BAYRISCHER RUNDFUNK, 2014). Obwohl fast immer auf die Gefahr durch Mykotoxine hingewiesen wird, liegen diesen Empfehlungen jedoch kaum belegte wissenschaftliche Studien zugrunde. Erstaunlicherweise wird hierbei vor Aflatoxinen oder OTA gewarnt (z. B. AOK – DIE GESUNDHEITSKASSE, 2014), obwohl gerade diese Toxine bei einer Verschimmelung im Haushalt praktisch nicht zu erwarten sind, da hier die Lebensbedingungen für die toxinbildenden Spezies (*A. flavus*, *P. verrucosum*) recht ungünstig sind (TYLLINEN et al., 1977; OSBORNE, 1980; PITT, 1994) und da andere Spezies (*A. niger*, *P. roqueforti*) mit anderem Toxinbildungsvermögen dominieren (EPA, 1997; NIELSEN et al., 2009). Ursache für diese unklare Situation dürfte sein, dass mangels einschlägiger Untersuchungen nach wie vor eine relativ große Unsicherheit bezüglich der konkreten Risiken durch verschimmelte Lebensmittel existiert. Obwohl beispielsweise die Bildung von Alkaloiden des Ergolintyps durch *P. roqueforti* seit langem bekannt ist, beschränkten sich bisherige Untersuchungen von Käse ausschließlich auf Blauschimmelkäse (OHMOMO et al., 1975; SCOTT und KENNEDY, 1976; SCOTT et al., 1977; SIEBER, 1978). Daten zum Vorkommen dieser Toxine in „unbeabsichtigt“ verschimmeltem Käse konnten in der wissenschaftlichen Literatur nicht gefunden werden.

Gleichermaßen ist bekannt, dass manche Isolate von *A. niger* das zu den Fumonisinen gehörende FB_2 bilden können. Untersucht wurde jedoch bisher ausschließlich der pre-

harvest Bereich wie z. B. Weintrauben (FRISVAD et al., 2011). Untersuchungen zur FB_2-Bildung durch *A. niger* in verschimmeltem Brot liegen bisher nicht vor.

In der eigenen Arbeit wurden daher Untersuchungen anhand der Lebensmittelmatrices „Brot“ und „Käse“ unter möglichst haushaltsnahen Bedingungen durchgeführt. Aus diesem Grund wurde eine zufällige, nicht durch gezielte Inokulation herbeigeführte Verschimmelung abgewartet, um die Bildung und Ausbreitung zweier Markertoxine (IsoFuA und FB_2) zu studieren. In dieser Arbeit stand die Gefahr der Mykotoxinbildung im Vordergrund, daher wurde auf eine genaue Identifizierung der Schimmelpilzspezies verzichtet, zumal viele relevante Spezies bis heute taxonomisch nicht als gefestigt angesehen werden können.

5.1 Schimmelpilzbefall von Brot

Wie auch in den eigenen Untersuchungen beobachtet wurde, sind oftmals mehrere morphologisch verschiedene Schimmelpilze zeitgleich am Brotverderb beteiligt. In der vorliegenden Arbeit ließ sich kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Brotsorten und der darauf gewachsenen Schimmelart erkennen. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Brote in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Lagerungstemperatur in unterschiedlichem Maße anfällig für einen Schimmelbefall waren. Auch hatte die Lagerungstemperatur einen Einfluss auf die gewachsene Schimmelpilzgattung selbst. In den eigenen Untersuchungen waren mesophile Aspergillen bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C als häufigste Brotschimmel (78 % von 45 visuell festgestellten Schimmelpilzkolonien) vertreten. Hingegen wuchsen Penicillien als psychrothrophe Schimmelpilze überwiegend bei einer Lagerungstemperatur von 21 °C (46 % von 56 visuell festgestellten Schimmelpilzkolonien) sowie von 7 °C (100 % von 9 visuell festgestellten Schimmelpilzkolonien). Entsprechende Beobachtungen wurden auch von LEGAN (1993) beschrieben.

Der auf einigen Proben gewachsene, schwarze Brotschimmel wurde mittels ITS-Sequenzierung als *A. niger* identifiziert. *A. niger* gehört aufgrund ubiquitärer Luftsporen zu den häufigsten Lebens- und Futtermittelverderbern (SCHUSTER et al., 2002; ESTEBAN

et al., 2004; REIß, 2009). Aufgrund der Tatsache, dass auch *A. niger* in der Lage ist, unter anderem FB_2 zu bilden (FRISVAD et al., 2007c), ergab sich die Notwendigkeit auf dieses Toxin zu untersuchen. So konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine FB_2-Bildung durch *A. niger* in spontan verschimmeltem Brot beschrieben werden. Bisherige Untersuchungen auf Fumonisin bezogen sich ausschließlich auf Substrate, die für einen *Fusarium*-Befall, als typischen Feldpilz, günstige Wachstumseigenschaften (pflanzliche Materialien mit hoher Wasseraktivität) bieten (ROSS et al., 1990; THIEL et al., 1991; NELSON et al., 1992; MARASAS, 1995; HUMPHREYS et al., 2001). Im Gegensatz dazu befällt *A. niger* vornehmlich Lebensmittel während ihrer Lagerung (ESTEBAN et al., 2004; MOGENSEN et al., 2009), was mit den eigenen Befunden übereinstimmt.

Da prinzipiell eine Quelle von Fumonisinen in Getreideerzeugnissen auch ein Befall des Getreides auf dem Feld durch Spezies wie *F. verticillioides* oder *F. proliferatum* sein könnte, war es von Bedeutung, in den eigenen Untersuchungen die Ursache für die in dieser Arbeit festgestellten Fumonisinbefunde abzuklären. Ein Feldbefall durch Fusarien als Kontaminationsursache hätte in der Verarbeitungskette Getreide-Mehl-Brot zu einer homogenen Belastung führen müssen. Tatsächlich waren aber jeweils nur die verschimmelten Bereiche FB_2-positiv, in den restlichen Teilen des Brotes war jeweils kein Toxin nachweisbar. Zum anderen bilden Fusarien in Getreide weit überwiegend FB_1. Hier wurde jedoch in *A. niger*-befallenen Bereichen nur FB_2 nachgewiesen. Schlussfolgernd sind die FB_2-Befunde im Brot eindeutig auf die Verschimmelung durch *A. niger* zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Studie mittels HPLC-Analyse erzielten FB_2-Nachweise bestätigten, dass *A. niger* FB_2 auf spontan verschimmeltem Brot bildet. Folglich zeigte die HPLC-Analyse, dass die mittels FB_1-EIA detektierten positiven Messwerte überwiegend auf das in diesem EIA zu 100 % kreuzreagierende FB_2 zurückzuführen waren. FB_1 wurde in den eigenen Untersuchungen nur in einem blauweißen Brotschimmel chromatographisch detektiert.

Um das Gesundheitsrisiko, das vom Verzehr verschimmelter Brote ausgeht, abzuschätzen, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 33 Brote mit deutlichem Schimmelbefall mittels FB_1-EIA untersucht. Die höchsten FB_2-Konzentrationen mit einem Maximalwert von 81,3 µg/g wurden in schwarzem Brotschimmel, der bei einer Temperatur von 24 °C

spontan gewachsen war, nachgewiesen. Die Untersuchungen zeigten, dass Brote, die bei einer Lagerungstemperatur von 24 °C verschimmelt waren, deutlich höher mit FB_2 belastet waren (Median = 8,29 µg/g) als solche, die bei einer Temperatur von 21 °C (Median = 0,87 µg/g) einen Schimmelbefall aufwiesen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MOGENSEN et al. (2009), die ein Temperaturoptimum für die FB_2-Bildung durch *A. niger* von 25 °C bis 30 °C ermittelten.

Alle 17 untersuchten schwarzen Mycelien, die in der vorliegenden Studie auf Brot gewachsen waren, enthielten mit Werten zwischen 3,43 µg/g und 81,3 µg/g erhebliche Konzentrationen an FB_2. Ebenso waren alle acht ausschließlich schwarz verschimmelten Brote und 94 % der schwarzweiß, schwarzgelb oder schwarzblau verschimmelten Brote (n_K = 31) mit Toxingehalten zwischen 0,04 µg/g und 33,5 µg/g deutlich positiv für FB_2. Brote mit einem orangefarbenem Schimmelbefall (n_K = 11) wiesen zu 64 % FB_2-Gehalte zwischen 0,1 µg/g und 2,32 µg/g auf. Bei den blaugrün verschimmelten Broten (n_K = 31) waren hingegen nur 16 % mit Toxingehalten zwischen 0,01 µg/g und 0,25 µg/g belastet. Blauweißes Pilzmycel (n = 5) war zu 40 % positiv für Fumonisine und wies Werte von 0,01 µg/g und 7,1 µg/g auf. In nur geringem Abstand zum sichtbaren Mycel war hingegen in keinem Fall mehr FB_2 im Brot nachweisbar. Bisher wurde in der wissenschaftlichen Literatur nur in einer von SULYOK et al. (2007) durchgeführten Studie über einen FB_2-Nachweis in verschimmeltem Brot berichtet. Die Autoren detektierten einen mit den eigenen Untersuchungsergebnissen vergleichbaren FB_2-Gehalt von 33 µg/g, eine mögliche Toxinquelle wurde jedoch nicht beschrieben. Innerhalb einer von NIELSEN unveröffentlichten Studie wurden Erdbeeren künstlich mit *A. niger* kontaminiert. Er detektierte einen FB_2-Gehalt von 25 µg/g sowie einen FB_4-Gehalt von 2 µg/g, FB_1 wurde hingegen nicht nachgewiesen, was ebenfalls mit den eigenen Untersuchungen weitestgehend übereinstimmt (NIELSEN et al., 2009).

Bereits 1988 berichteten GELDERBLOM et al. über die krebsfördernde Aktivität von FB_1 (DUTTON, 1996; MARASAS et al., 1984; MARASAS, 2001; NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2001). Aufgrund zahlreicher Tierversuche wurde FB_1 von der IARC (2002) als potenziell kanzerogen für den Menschen eingestuft. Um dieser möglichen Gefährdung entgegenzuwirken und aufgrund der Tatsache, dass *F. verticillioides* als Hauptbildner von Fumonisinen (NELSON et al., 1992) vorrangig auf Mais wächst, wurde in der VO (EG) 1126/2007 ein Höchstgehalt für FB_1 und FB_2 von

1.000 µg/kg für zum unmittelbaren Verzehr bestimmte Maisprodukte gesetzlich festgesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit in verschimmeltem Brot nachgewiesene Fumonisinhöchstbelastung von 81,3 mg/kg übersteigt demnach den gesetzlichen Grenzwert um etwa das 80fache. Daher ist davon auszugehen, dass der Verzehr von verschimmeltem Brot ein nicht unerhebliches Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellt.

Des Weiteren ergaben in der eigenen Studie durchgeführte mikroskopische Untersuchungen von blauem Brotschimmel Hinweis auf einen *P. roqueforti*-Befall der Brote. Dieser Verdacht wird durch frühere Studien verschiedener Autoren gestützt, die *P. roqueforti* als einen der häufigsten Brotschimmel identifizierten (SPICHER, 1985; LUND et al., 1996; FRISVAD et al., 2004; NIELSEN et al., 2006a).

Die Bildung von IsoFuA durch *P. roqueforti* als Edelschimmel in Blauschimmelkäse wurde bereits mehrmals beschrieben (SCOTT, 1976; KURE und SKAAR, 2000; FRISVAD und SAMSON, 2004; O'BRIEN et al., 2006). Über einen IsoFuA-Nachweis in „natürlich“ verschimmeltem Brot wurde jedoch bisher nicht berichtet. FRISVAD et al. (2007a) wiesen lediglich darauf hin, dass eine IsoFuA-Bildung durch *P. roqueforti* auf Brot potenziell möglich wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bildung von IsoFuA in verschimmeltem Brot beschrieben. Stellvertretend für zahlreiche Mykotoxine, die von *P. roqueforti* gebildet werden, erfolgte der IsoFuA-Nachweis mittels Enzymimmuntests (GEA-EIA und Ergonovin-EIA), die beide auf der Basis gruppenspezifischer Antikörper gegen Ergoline arbeiten.

Frische Brotproben wurden vorab in sichtlich unverschimmeltem Zustand mittels gruppenspezifischen GEA-EIA untersucht. Anhand dieser Voruntersuchungen war es möglich kreuzreagierende Ergotalkaloide, die bereits durch den Feldpilz *C. purpurea* (SHELBY und KELLEY, 1992) im verarbeiteten Korn gebildet wurden, von Ergolin-Verbindungen, die durch Schimmelpilze gebildete wurden, zu differenzieren. Bei den frischen Broten wies eine von acht Proben einen Gesamtergotalkaloidgehalt von 32,6 ng/g auf, welcher, wie oben erwähnt, sehr wahrscheinlich durch einen Mutterkorn-Befall des verwendeten Getreides erklärt werden kann. Anhand der Nachuntersuchungen der Brote

im verschimmelten Zustand, konnte bei 86 % der untersuchten Brotabschnitte ($n_K = 14$) eine auf den Schimmelbefall zurückzuführende Ergolin-Belastung der Proben eindeutig nachgewiesen werden.

Da davon auszugehen ist, dass es sich bei dem in der vorliegenden Studie auf Brot gewachsenen blaugrünen Schimmel überwiegend um *P. roqueforti* handelte und der nachgewiesene Ergolingehalt der verschimmelten Proben höchstwahrscheinlich auf eine IsoFuA-Belastung durch *P. roqueforti* zurückzuführen ist, erfolgten weitere Nachuntersuchungen mittels Ergonovin-EIA. Dieser ermöglichte bei bekannter Identität des Analyten durch Umrechnung der Messwerte für die Ergonovin-Standardkurve auch einen quantitativen Nachweis des zu 22,08 % (LATIF, 2010) kreuzreagierenden IsoFuAs. So wiesen mittels Ergonovin-EIA untersuchte verschimmelte Proben rechnerisch ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 8,11 ng/g und 108,3 ng/g auf.

Geht man von dem derzeit *inoffiziell* geltenden Qualitätsstandard für Mutterkornalkaloide in Roggen von umgerechnet etwa 1.000 µg/kg aus (WOLFF et al., 1988), liegt der in der eigenen Arbeit in verschimmeltem Brot nachgewiesene Höchstgehalt von 108,3 µg/kg IsoFuA unter dem empfohlenen Grenzwert für Ergotalkaloide. Zu bedenken ist jedoch, dass derzeit nur sehr wenig über die Toxizität der Clavinalkaloide bekannt ist. Zusätzlich bietet die in der eigenen Studie nachgewiesene IsoFuA-Belastung verschimmelter Brote einen direkten Hinweis auf weitere durch *P. roqueforti* gebildete Mykotoxine, wie beispielsweise das hoch toxische PR-Toxin sowie Patulin, Penicillinsäure, Roquefortin C und Mycophenolsäure (SCOTT, 1981; EPA, 1997; FRISVAD et al., 2004). Auch herrscht unter verschiedenen Autoren Uneinigkeit über eine mögliche Brotkontamination mit weiteren Mykotoxinen. So berichteten TYLLIN et al. (1977) in einer früheren Studie über einen Patulin-Nachweis in spontan verschimmeltem Brot, was jedoch nach OSBORNE (1980) aufgrund mangelnder Stabilität von Patulin in Getreide bzw. Getreideprodukten anzuzweifeln sei. Schlussfolgernd ist aufgrund des IsoFuA-Nachweises sowie des herrschenden Wissensdefizits, derzeit von einem potenziellen Vorhandensein weiterer Mykotoxine auszugehen. Demzufolge ist ein Gesundheitsrisiko durch den Verzehr von *P. roqueforti* befallenem Brot nicht auszuschließen.

5.2 Schimmelpilzbefall von Käse

Schimmelpilzbefall von im Kühlschrank gelagerten Lebensmitteln ist ein bekanntes Problem. Vor allem psychrotrophe Penicillien zeigen bei niedrigen Temperaturen vermehrtes Wachstum (RAPER und THOM, 1949; BULLERMAN und OLIVIGNI, 1974). Dementsprechend konnte auch auf den in der eigenen Arbeit bei 7 °C gelagerten Käseproben überwiegend ein Befall mit Penicillien festgestellt werden. Ein von der Käsesorte oder Käseart abhängiger morphologischer Unterschied bezüglich der Schimmelbildung wurde nicht beobachtet. Auch von anderen Autoren wurde in früheren Studien einheitlich *Penicillium* spp. als häufigster Käseschimmel (BULLERMAN und OLIVIGNI, 1974; NORTHOLT et al., 1980; ARAN und EKE, 1987; TSAI et al., 1988; KIVANC, 1992; LUND et al., 1995; KURE und SKAAR, 2000) und *P. roqueforti* als dominante Spezies genannt (TSAI et al., 1988; KURE und SKAAR, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine IsoFuA-Belastung in spontan verschimmeltem Schnittkäse nachgewiesen. Bisherige IsoFuA-Untersuchungen bezogen sich ausschließlich auf Blauschimmelkäse (SCOTT, 1976; KURE und SKAAR, 2000; FRISVAD und SAMSON, 2004; O'BRIEN et al., 2006) oder auf mit *P. roqueforti* beimpfte Nährmedien (SCOTT et al., 1977; LARSEN et al., 2002).

In den eigenen Untersuchungen erwies sich auch im Falle von Käse der Einsatz des gruppenspezifischen Enzymimmuntests für Ergoline (Ergonovin-EIA) als geeignet. Der quantitative Nachweis des zu 22,08 % (LATIF, 2010) kreuzreagierenden IsoFuAs erfolgte analog zu den Brotuntersuchungen.

Blaugrün sowie grauschwarz verschimmelte Käseabschnitte ($n_K = 73$) wiesen zu 90,4 % im Bereich des Schimmelpilzwachstums rechnerisch ermittelte IsoFuA-Gehalte zwischen 4,53 ng/g und 1.110,51 ng/g auf. Bei Käseproben mit einem geringen blau- oder grauweißen Schimmelansatz ($n_K = 27$), war hingegen nur eine Probe mit IsoFuA belastet. Diese wies einen rechnerisch ermittelten Wert von 16,9 ng/g auf. Des Weiteren waren alle braunbeige verschimmelten Käseproben frei von IsoFuA.

Die ermittelten Toxingehalte konnten stichprobenartig mithilfe von enzym-immunologischen Nachuntersuchungen, unter Verwendung von IsoFuA als Standardtoxin,

weitgehend bestätigt werden. So wurden mittels IsoFuA-EIA in ausgewählten spontan verschimmelten Käseproben Toxingehalte zwischen 28,5 ng/g und 2.767 ng/g detektiert. Bereits in geringem Abstand zum sichtbaren, toxinhaltigen Mycel war allerdings keine oder eine nur sehr geringe IsoFuA-Belastung nachweisbar. Untersuchungen an Blauschimmelkäse führten in früheren Studien zu vergleichbaren Ergebnissen. SCOTT und KENNEDY (1976) sowie SIEBER (1978) berichteten ebenfalls über keine oder eine nur sehr geringe Toxinmigration in mycelfreie Käsepartien. Blauschimmelkäse mit deutlich sichtbarem Mycel waren in früheren Untersuchungen mit Werten von bis zu 4,7 µg/g zum Teil erheblich mit IsoFuA belastet (OHMOMO et al., 1975; SCOTT und KENNEDY, 1976). Im Vergleich dazu wiesen die in der eigenen Arbeit „natürlich“ verschimmelten Schnittkäseproben mit einem Maximalwert von 2,8 µg/g eine ähnliche IsoFuA-Belastung auf. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der positiven IsoFuA-Befunde weitere durch *P. roqueforti* gebildete Mykotoxine, wie Roquefortin C oder Mycophenolsäure (OHMOMO et al., 1975; LÓPEZ-DÍAZ et al., 1996; EPA, 1997; RUNDBERGET et al., 2004), in spontan verschimmeltem Käse möglich sind. Patulin, Penicillinsäure oder PR-Toxin seien jedoch nach der Meinung verschiedener Autoren kaum zu erwarten, da diese in Käse nicht stabil seien (SCOTT und KENNEDY, 1976; STOTT und BULLERMAN, 1976; TANIWAKI und VAN DENDER, 1992; TANIWAKI et al. 2001). Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse sowie mangelnder Informationen bezüglich der Toxizität von IsoFuA und der Möglichkeit der Belastung mit weiteren Mykotoxinen, ist auch durch den Verzehr von „natürlich“ verschimmeltem Käse ein mögliches Gesundheitsrisiko zwar nicht auszuschließen, insgesamt aber eher gering.

5.3 Untersuchung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen

Käse verschiedenster Sorten dienen als Ausgangsprodukte für Schmelzkäse. Innerhalb der eigenen Studie waren 39 % der untersuchten frischen Schmelzkäseproben (n = 33) mit rechnerisch ermittelten IsoFuA-Gehalten zwischen 5,3 ng/g und 17,1 ng/g belastet. LARSEN et al. formulierten bereits 2002 den Verdacht, dass positive Toxinnachweise in unverschimmelten, tadellosen Schmelzkäseprodukten auf die mögliche Verarbeitung verschimmelter Ausgangsprodukte zurückgeführt werden könnten. In diesem Zusammenhang sind jedoch weitere IsoFuA-Quellen einer Schmelzkäsekontamination zu

diskutieren. So konnte einerseits anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eindeutig bestätigt werden, dass es durch *P. roqueforti* als „natürlichen" Schimmelerreger zur Bildung von IsoFuA auf verdorbenem Käse kommt. Andererseits besitzt *P. roqueforti* auch als Starterkultur die Eigenschaft, IsoFuA in handelsüblichem Blauschimmelkäse zu bilden (OHMOMO et al., 1975; SCOTT et al., 1977; FILTENBORG et al., 1996). Unter diesem Aspekt sind, bei Verwendung von entsprechend belastetem Edelschimmelkäse als Ausgangsprodukt, Mykotoxine aufgrund hoher Hitzebeständigkeit auch im Schmelzkäse nachweisbar. Die Hypothese der Verarbeitung schimmelbefallener Ausgangsprodukte konnte innerhalb der eigenen Studie insoweit entkräftet werden, dass die belasteten Schmelzkäseprodukte nicht einer einzelnen Käserei zuzuordnen waren. Des Weiteren dienen laut Verwaltungen der einzelnen Käsereien teilweise auch verschiedene Weichkäsesorten des Typs Roquefort als Ausgangsprodukte der Schmelzkäseproduktion. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die detektierten IsoFuA-Gehalte auf eine Mitverarbeitung von Blauschimmelkäse in der Schmelzkäseherstellung zurückzuführen sind.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass bei haushaltsähnlicher Lagerung von Brot überwiegend *P. roqueforti* und *A. niger* am Schimmelprozess beteiligt waren. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass *P. roqueforti* IsoFuA und *A. niger* zum Teil erhebliche Mengen an FB_2 in spontan verschimmeltem Brot bildet. Beide Toxine waren jeweils nur in unmittelbarer Nähe zum sichtbaren Mycel im Brot nachweisbar. Wie bereits LEGAN (1993) anmerkte, ist das von verschimmeltem Brot ausgehende Gesundheitsrisiko in Industrieländern, in denen aufgrund des bestehenden Nahrungsmittelüberflusses sichtbar verschimmeltes Brot in der Regel komplett entsorgt wird, weniger bedeutend. Anders ist es jedoch in Entwicklungsländern, besonders in solchen, in denen durch ein tropisches Klima ein *A. niger*-Befall von Brot und eine damit einhergehende FB_2-Bildung zusätzlich begünstigt wird. Aus diesem Grund wäre weitere diesbezügliche Forschungsarbeit erstrebenswert.

Des Weiteren ergaben die eigenen Untersuchungen, dass der Edelschimmel *P. roqueforti* auch als „Wildform“ zum Teil beträchtliche Mengen an IsoFuA in zufällig verschimmeltem Schnittkäse bildet. Da jedoch über die Toxizität von IsoFuA bisher nur unzureichende Informationen bestehen, wäre zur abschließenden Beurteilung entsprechende weitere Forschungsarbeit notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der natürliche Verschimmelungsprozess der Probenmaterialien teilweise bis zum extremen Verderb verfolgt. Die höchsten Toxingehalte wurden fast ausnahmslos in Probenmaterialien festgestellt, die vernünftigerweise nicht mehr für den menschlichen Verzehr geeignet sind. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein Verbraucher derartig verdorbenen Käse oder derart massiv verschimmeltes Brot noch konsumiert. Insofern sind die hier dargestellten Ergebnisse teilweise noch jenseits eines worst-case Szenarios einer Toxinaufnahme durch verschimmelte Lebensmittel.

Die hier beschriebene Vorgehensweise wurde aber auch deshalb gewählt, um erstens eine Zuordnung zu verschiedenen Schimmeltypen zu ermöglichen. Zweitens war so eine Differenzierung der Toxingehalte in massiv belasteten und visuell nicht belasteten Teilen eines Lebensmittels möglich. Die Tatsache, dass selbst unmittelbar neben massivem Schimmelbefall kaum Toxin nachweisbar war, spricht gegen die Hypothese, dass Mykotoxine in nennenswerten Mengen in nicht befallene Bereiche eines Lebensmittels diffundieren bzw. durch visuell nicht sichtbare Pilzinfiltration auch dort verursacht werden können. Dennoch sollte aus Gründen der allgemeinen Lebensmittelhygiene ein stark verschimmeltes Lebensmittel nicht mehr konsumiert werden, da alleine die Sporenbelastung gesundheitlich unerwünschte Folgen (z. B. Allergien) haben könnte.

Die festgestellten Toxinbelastungen in verschimmeltem Brot und Käse haben jedoch noch zwei weitere Implikationen. Zum einen sollten solch verschimmelte Lebensmittel auf keinen Fall einem „Rework“, das heißt einer Wiederverwertung in höher prozessierten Lebensmitteln zugeführt werden. Der Bereich des „Reworks“ könnte hier zu einem Eintrag von hitzestabilen Toxinen in Lebensmittel führen, deren Toxinbelastungsrisiko weder für die Überwachungsbehörden noch für den Verbraucher erkennbar ist. Eine Verwertung von verschimmeltem Käse, beispielsweise zu Schmelzkäse, verbietet sich somit nicht nur aus

allgemeinen lebensmittelrechtlichen Bestimmungen heraus, sondern könnte eine konkrete Gesundheitsgefahr darstellen.

Zum anderen wäre aus denselben Gründen auch eine Verwertung von verschimmelten Lebensmitteln beispielsweise in der Tierfütterung mit hohen Risiken verbunden und sollte daher nicht in Betracht gezogen werden.

Schlussfolgernd konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass unter haushaltsüblichen Bedingungen tatsächlich hohe Gehalte an Fumonisinen in Brot bzw. an Isofumigaclavin A in Käse gebildet werden, die bei Konsum durch den Verbraucher als gesundheitlich kritisch angesehen werden müssten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden „natürlich“ verschimmelte Brote und Käse enzymimmunologisch sowie chromatographisch auf eine Mykotoxinbelastung hin untersucht. Ergänzend wurden schimmelbefallene Produkte aus Privathaushalten in die Studie miteinbezogen. Die Lagerung von Brotproben erfolgte unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Des Weiteren wurden Schmelzkäseproben, die keinen sichtbaren Hinweis auf einen Schimmelbefall aufwiesen, auf eine mögliche Mykotoxinbelastung untersucht. Als Markertoxine für eine Belastung mit Mykotoxinen wurden Fumonisin B_2 (gebildet von *Aspergillus niger*) sowie Isofumigaclavin A (gebildet von *Penicillium roqueforti*) herangezogen.

Insgesamt wurden im Zeitraum 2010/2011 30 Brote bei einer Umgebungstemperatur von jeweils 7 °C, 21 °C und 24 °C gelagert. Bei 24 °C entwickelte sich nach nur wenigen Tagen auf 78 % der Proben der schwarze Brotschimmel *Aspergillus niger*. Mit einer relativen Häufigkeit von 18 % kam es ab der ersten Woche zum Wachstum von *Penicillium roqueforti* in Form eines blaugrünen Mycelgeflechts. Des Weiteren trat bei 24 °C innerhalb von vier Wochen zu 4 % ein gelborangefarbener Schimmelbefall auf, der sich aus den Pilzen *Neurospora tetrasperma* und *Aspergillus niger* zusammensetzte. Bei Raumtemperatur (21 °C) wiesen die Brote innerhalb von zehn Wochen eine deutliche Schimmelbildung auf. Den Hauptanteil bildete hier mit 46 % *Penicillium roqueforti*, der ab der ersten Woche ein deutliches Wachstum zeigte. Hingegen kam es frühestens nach drei Wochen mit einem Anteil von 38 % zur Entwicklung schwarzer Schimmelpilzkolonien, die auf eine *Aspergillus niger*-Kontamination zurückzuführen waren. Zusätzlich war bei 21 °C ab der zweiten Woche bei 16 % der Proben ein Befall von *Aspergillus niger* und *Neurospora tetrasperma* in Form von gelborangefarbenem Mycel zu vermerken. Bei Kühlschranktemperatur (7 °C) wurde bei 17 % der Proben ab der zweiten Woche ein *Penicillium roqueforti*-Befall sichtbar. *Aspergillus niger* sowie *Neurospora tetrasperma* zeigten hingegen kein Wachstum. Aufgrund der *Aspergillus niger*-Kontamination erfolgte eine Untersuchung mittels EIA und HPLC auf Fumonisin B_2 (FB_2). Zusätzlich wurden die Proben mittels EIA auf eine Isofumigaclavin A-Belastung (IsoFuA) durch *Penicillium roqueforti* überprüft.

FB_2 konnte mittels FB_1-EIA überwiegend in schwarzem (0,04-81,3 µg/g, MW: 12,9 µg/g) sowie in gelborangefarbenem Mycel (0,1-2,32 µg/g, MW: 0,99 µg/g) nachgewiesen werden, wobei deutlich höhere Fumonisingehalte bei 24 °C (x_{max} = 81,3 µg/g) als bei 21 °C (x_{max} = 16,9 µg/g) gemessen wurden. Die HPLC-Analyse bestätigte eine FB_2-Belastung der Proben. Brote mit *Penicillium roqueforti*-Befall wiesen überwiegend Messwerte für Fumonisin unter der Nachweisgrenze von 2 ng/g auf. Diese waren jedoch größtenteils positiv für IsoFuA (8,11-108,3 ng/g, MW: 59,6 ng/g). Eine orientierend durchgeführte Untersuchung auf Citrinin mittels EIA ergab keine positiven Befunde. Es ließ sich keine Toxindiffusion in schimmelfreie Brotabschnitte nachweisen, dass heißt bereits in wenigen Zentimetern Abstand zu den verschimmelten Stellen war kein Toxin mehr nachweisbar.

Die mykotoxikologische Untersuchung von Käse erfolgte anhand von insgesamt 51 Proben unterschiedlicher Sorten. Davon wurden 46 Käseproben unter praxisnahen Bedingungen mit geöffneter Vakuumverpackung im Kühlschrank (7 °C) gelagert. Die restlichen fünf schimmelbefallenen Proben stammten aus Privathaushalten. In der Regel kam es innerhalb der ersten vier Wochen zu einem sichtbaren Schimmelbefall. Am häufigsten kam es mit einem Anteil von 44 % zum Wachstum von durch typisch blaues Mycelwachstum charakterisiertem *Penicillium roqueforti.* Zu 26 % entwickelten die Proben einen schwarzgrauen Pilzrasen, der ebenfalls auf *Penicillium roqueforti* sowie *Aspergillus* spp., insbesondere *Aspergillus niger* zurückgeführt werden konnte. Vereinzelt kam es bei 4 % der Käse in Form von braunbeigefarbenem Mycel zum Wachstum von *Scopulariopsis brevicaulis*, der auch als „Arsenpilz“ bekannt ist. Die Quantifizierung von IsoFuA erfolgte rechnerisch anhand der relativen Kreuzreaktion dieses Toxins im Enzymimmuntest für Ergonovin. IsoFuA wurde in Käse mit grauem Mycel (4,53-1.110 ng/g, MW: 102 ng/g) sowie blaugrünem Mycel (4,53-237 ng/g, MW: 58,5 ng/g) nachgewiesen. Käse mit einem *Scopulariopsis brevicaulis*- sowie mit geringem *Penicillium roqueforti*-Befall wiesen überwiegend IsoFuA-Gehalte unter der Nachweisgrenze auf. Weder FB_2 noch das Isomer Fumigaclavin A waren in schimmelbefallenem Käse nachweisbar. Eine relevante Toxindiffusion beziehungsweise eine Toxinbelastung in nicht verschimmelten Bereichen konnte auch bei Käse nicht beobachtet werden.

Schmelzkäse wiesen zu 39 % eine IsoFuA-Belastung (5,3-17,1 ng/g, MW: 9,56 ng/g) auf. Dieser Befund ließe sich durch die Verwendung von Blauschimmelkäse als Ausgangsprodukt für die Schmelzkäseherstellung erklären.

7 SUMMARY

The enzyme-immunological and chromatographical research in this paper focused on the possible contamination of naturally moulded bread and cheese with mycotoxins. Mould-infested products from private households were also incorporated into the survey. The storage of the bread samples occurred under different temperature conditions like a typical household storage would. Fresh samples of processed cheese which showed no visual evidence of being mould-infested were also tested for a contamination with mycotoxins. Fumonisin B_2 (produced by *Aspergillus niger*) and Isofumigaclavin A (produced by *Penicillium roqueforti*) were used as marker toxins for a general mycotoxical contamination.

During 2010/2011, 30 breads were stored in an ambient temperature of 7 °C, 21 °C and 24 °C. At 24 °C, 78 % of the samples developed the black bread mould *Aspergillus niger* after a few days. With a relative frequency of 18 %, *Penicillium roqueforti* grew as a blue-green mycel netting during the first week. Of the samples stored at 24 °C, 4 % developed a yellow-orange mould infestation within four weeks, consisting of the fungi *Neurospora tetrasperma* and *Aspergillus niger*. At room temperature (21 °C), the breads showed a significant formation of mould within ten weeks. The main part consisted of *Penicillium roqueforti* (46 %), which showed a significant growth within the first week. In contrast, *Aspergillus niger* developed only after three weeks, with a percentage of 38 %. Additionally, at 21 °C, 16 % of the samples showed an infestation with *Aspergillus niger* and *Neurospora tetrasperma* after two weeks in the form of a yellow-orange mycel. At refrigerator temperature (7 °C), 17 % of the samples were infested with *Penicillium roqueforti* after the second week; *Aspergillus niger* and *Neurospora tetrasperma* showed no growth. Due to the contamination with *Aspergillus niger,* an examination for Fumonisin B_2 (FB_2) was carried out via EIA and HPLC. Additionally, the samples were analyzed via EIA for a contamination with Isofumigaclavin A (IsoFuA) by *Penicillium roqueforti*.

FB_2 could be detected via FB_1-EIA, mostly in black (0,04-81,3 µg/g, mean value: 12,9 µg/g) as well as in yellow-orange mycel (0,1-2,32 µg/g, mean value: 0,99 µg/g). Significantly higher Fumonisin levels were measured at 24 °C (x_{max} = 81,3 µg/g) than at 21 °C (x_{max} = 16,9 µg/g). HPLC analysis confirmed a FB_2 contamination of samples. Breads with *Penicillium roqueforti* infestation predominantly exhibited measurement

readings for FB_2 that were below the detection limit of 2 ng/g. However, they were mostly positive for IsoFuA (8,11-108,3 ng/g, mean value: 59,6 ng/g). An orienting examination for citrinin by EIA yielded no positive findings. There was no detectable diffusion of toxins into mould-free bread layers, meaning a few centimeters away from the mould, no toxin was detected.

The mycotoxical analysis of cheese was carried out based on a total of 51 samples of different varieties. 46 cheese samples were stored under practical conditions with open vacuum packaging in the refrigerator (7 °C). The remaining five mouldy samples came from private households. Generally, visible mould infestation occurred during the first four weeks. Most frequently, there was a development of *Penicillium roqueforti* (44 %) characterized by a typical blue mycel growth. 26 % of the samples developed a black-grey fungal layer, which could also be attributed to *Penicillium roqueforti,* as well as *Aspergillus* spp., especially *Aspergillus niger*. 4 % showed a development of *Scopulariopsis brevicaulis*, also known as “arsenic fungus”, in the form of a brown-beige mycel. Quantification of IsoFuA was mathematically determined by the relative cross-reactivity of this toxin in the enzyme immunoassay for ergonovine.

IsoFuA was accounted for in cheese with grey (4,53-1.110,51 ng/g, mean value: 101,99 ng/g) as well as blue-green mycel (4,53-237,4 ng/g, mean value: 58,5 ng/g). Cheese with *Scopulariopsis brevicaulis*, as well as minor infestation with *Penicillium roqueforti*, predominantly exhibited IsoFuA measurements below the detection limit. Neither FB_2 nor the isomer Fumigaclavin A could be detected in any mould-infested cheese. Also, a germane diffusion of toxins in cheese could not be noticed.

A total of 39 % of processed cheese (spread cheese, wrapped slices) showed an IsoFuA contamination (5,3-17,1 ng/g, mean value: 9,56 ng/g). This could be explained by the use of blue mould cheese as an ingredient for processed cheese.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABARCA, M. L., F. ACCENSI, J. CANO und F. J. CABAÑES (2004):
Taxonomy and significance of black aspergilli
Antonie Van Leeuwenhoek **86**, 33–49

ABRAMSON, D., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1995):
An indirect enzyme immunoassay for the mycotoxin citrinin
Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2007–2009

AIRAUDI, D. und V. F. MARCHISIO (1996):
Fungal biodiversity in the air of Turin
Mycopathologia **136**, 95–102

ALVAREZ, I. und J. F. WENDEL (2003):
Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference
Mol. Phylogenet. Evol. **29**, 417–434

AOK – DIE GESUNDHEITSKASSE (2014):
Schimmel
Verfügbar unter:
http://www.aok.de/bundesweit/gesundheit/essen-trinken-ernaehrung-schimmel-8391.php (letzter Zugriff: 05.04.2015)

ARAN, N. und D. EKE (1987):
Mould mycoflora of Kaşar cheese at the stage of consumption
Food Microbiol. **4**, 101–104

ARNOLD, D., P. SCOTT, P. McGUIRE, J. HARWIG und E. NERA (1978):
Acute toxicity studies on roquefortine and PR toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse
Food Cosmet. Toxicol. **16**, 369–371

AZCONA-OLIVERA, J. I., M. M. ABOUZIED, R. D. PLATTNER und J. J. PESTKA (1992):
Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B_1, B_2, and B_3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant
J. Agric. Food Chem. **40**, 531–534

BAKER, S. E. (2006):
Aspergillus niger genomics: Past, present and into the future
Med. Mycol. **44**, 17–21

BALDWIN, B. G. (1992):
Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae
Mol. Phylogenet. Evol. **1**, 3–16

BARKAI-GOLAN, R. und N. PASTER (2008):
Mycotoxins in fruits and vegetables, 1. Auflage
Academic Press, Amsterdam, Boston, London

BAYMAN, P., J. L. BAKER, M. A. DOSTER, T. J. MICHAILIDES und N. E. MAHONEY (2002):
Ochratoxin production by the species *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*
Appl. Environ. Microbiol. **68,** 2326–2329

BAYRISCHER RUNDFUNK (2014):
Tipps gegen Schimmel: Nur bei Hartkäse kann man ein Auge zudrücken
Verfügbar unter:
http://www.br.de/themen/ratgeber/inhalt/verbrauchertipps/schimmel-tipps100.html
(letzter Zugriff: 26.07.2015)

BENEDIX, E. H. (2000):
Viren, Bakterien, Algen, Pilze
Urania Pflanzenreich, **5**
Urania Verlag, Berlin

BENNETT, J. W. (1987):
Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia
Mycopathologia **100**, 3–5

BENNETT, J. W. und M. KLICH (2003):
Mycotoxins
Clin. Microbiol. Rev. **16**, 497–516

BERKA, R. M., N. DUNN-COLEMAN und M. WARD (1992):
Industrial enzymes from *Aspergillus* species
Biotechnology **23**, 155–202

BEZUIDENHOUT, S. C., W. C. A. GELDERBLOM, C. P. GORST-ALLMAN, R. M. HORAK, W. F. O. MARASAS, G. SPITELLER und R. VLEGGAAR (1988):
Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 743-745

BHAT, R. V., P. H. SHETTY, R. P. AMRUTH und R. V. SUDERSHAN (1997):
A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins
J. Toxicol. Clin. Toxicol. **35**, 249–255

BLUMENTHAL, C. Z. (2004):
Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi
Regul. Toxicol. Pharmacol. **39**, 214–228

BMELV, BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ
Datensammlung (BMELV 123):
302. Versorgung mit Käse
verfügbar unter:
http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4071500-0000.pdf (letzter Zugriff: 26.07.2015)

BOICHENKO, L. V., D. M. BOICHENKO, N. G. VINOKUROVA, T. A. RESHETILOVA und M. U. ARINBASAROV (2001):
Screening for ergot alkaloid producers among microscopic fungi by means of the polymerase chain reaction
Microbiology **70**, 306–310

BOTHAST, R. J., E. B. LANCASTER und C. W. HESSELTINE (1975):
Scopulariopsis brevicaulis: Effect of pH and substrate on growth
Europ. J. Appl. Microbiol. **1**, 55–66

BOYSEN, M., P. SKOUBOE, J. FRISVAD und L. ROSSEN (1996):
Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles
Microbiology **142**, 541–549

BULLERMAN, L. B. und A. BIANCHINI (2007):
Stability of mycotoxins during food processing
Int. J. Food Microbiol. **119**, 140–146

BULLERMAN, L. B. und F. J. OLIVIGNI (1974):
Mycotoxin producing-potential of molds isolated from cheddar cheese
J. Food Sci. **39**, 1166–1168

CAMPBELL, J. A., M. J. KRYDA, M. W. TREUHAFT, J. J. MARX und R. C. ROBERTS (1983):
Cheese worker's hypersensitivity pneumonitis
Am. Rev. Respir. Dis. **127**, 495–496

CHALLENGER, F. und C. HIGGINBOTTOM (1935):
The production of trimethylarsine by *Penicillium brevicaule* (*Scopulariopsis brevicaulis*)
Biochem. J. **29**, 1757–1778

CHARMLEY, L. L. und D. B. PRELUSKY (1994):
Decontamination of *Fusarium* mycotoxins, in: Miller, J. D., Trenholm, H. L. (Hrsg.) Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin
Eagan Press, St. Paul, MN, USA, 421–435

CHRISTENSEN, C. M., G. H. NELSON, C. J. MIROCHA und F. BATES (1968):
Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi
Cancer Res. **28**, 2293–2295

CHU, F. S. (1996):
Recent studies on immunoassays for mycotoxins, in: Beier, R. C., Stanker, L. H. (Hrsg.)
Immunoassays for residue analysis. Food safety: developed from a symposium sponsored by the Division of Agriculture and Food Chemistry at the 209. national meeting of the American Chemical Society, Anaheim, California, 1995
Am. Chem. Soc., Washington, D.C., 294–312

COLVIN, B. M., A. J. COOLEY und R. W. BEAVER (1993):
Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings
J. Vet. Diagn. Invest. **5**, 232–241

CÔTÉ, J., H. CHAN, G. BROCHU und M. CHAN-YEUNG (1991):
Occupational asthma caused by exposure to *Neurospora* in a plywood factory worker
Br. J. Ind. Med. **48**, 279–282

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (2003):
Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems
Task force report **139**
Council Agricultural Science and Technology Publisher, Ames, Iowa

CUENCA-ESTRELLA, M., A. GOMEZ-LOPEZ, E. MELLADO, M. J. BUITRAGO, A. MONZÓN und J. L. RODRIGUEZ-TUDELA (2003):
Scopulariopsis brevicaulis, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents
Antimicrob. Agents Chemother. **47**, 2339–2341

CURTUI, V., C. GASSEN, L. DEWENTER, E. SCHNEIDER und E. USLEBER (2007):
Immunchemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide:
Forschungsprojekt 03HS019, Abschlussbericht

DAS, A. und P. ROY (1978):
Improved production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*
Can. J. Microbiol. **24**, 622–625

DETTMAN, J. R., F. M. HARBINSKI und J. W. TAYLOR (2001):
Ascospore morphology is a poor predictor of the phylogenetic relationships of *Neurospora* and *Gelasinospora*
Fungal Genet. Biol. **34**, 49–61

DETTMAN, J. R., D. J. JACOBSON und J. W. TAYLOR (2006):
Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex
Mycologia **98,** 436–446

DOMIJAN, A.-M. (2012):
Fumonisin B_1: A neurotoxic mycotoxin
Arh. Hig. Rada. Toksikol. **63,** 531-544

DUTTA, S. K., I. SHEIKH und J. CHOPPALA (1976):
Morphological variation in the genus *Neurospora*: ascospore and DNA studies
Trans. Am. Microsc. Soc. **95**, 462–469

DUTTON, M. F. (1996):
Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects
Pharmacol. Ther. **70**, 137–161

DUTTON, M. F. (2009):
The African *Fusarium*/maize disease
Mycotox. Res. **25**, 29–39

EEKHOF-STORK, N. (1979):
Der große Käseatlas: Geschichte, Sorten, Herstellung, Rezepte
Hallwag Verlag, Bern [u. a.]

EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2005):
Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed
EFSA J. **235**, 1-32
verfügbar unter:
http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/235.pdf (Letzter Zugriff: 20.05.2015)

EISELEN, H. und H.-G. BECKER (1995):
Brotkultur
DuMont Verlag, Köln

EKINS, R. (1989):
A shadow over immunoassay
Nature **340**, 256–258

EPA, U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997):
Penicillium roqueforti Final Risk Assessment:
Attachment I – Final Risk Assessment *Penicillium roqueforti*
verfügbar unter:
http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra008.htm (Letzter Zugriff: 28.06.2015)

ESTEBAN, A., M. L. ABARCA, M. R. BRAGULAT und F. J. CABAÑES (2004):
Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli
Res. Microbiol. **155**, 861–866

FDA, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2013a):
Carbohydrase and cellulase derived from *Aspergillus niger*
verfügbar unter:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.120
(Letzter Zugriff: 20.07.2015)

FDA, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2013b):
Secondary direct food additives permitted in food for human consumption
verfügbar unter:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=173.280
(Letzter Zugriff: 02.07.2015)

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS (1990):
Manuals of Food Quality Control: Training in Mycotoxins Analysis, Band 10
Food & Agriculture Org.**,** Rom

FILTENBORG, O., J. C. FRISVAD und U. THRANE (1996):
Moulds in food spoilage
Int. J. Food Microbiol. **33**, 85–102

FINOLI, C., A. VECCHIO, A. GALLI und I. DRAGONI (2001):
Roquefortine C occurrence in blue cheese
J. Food Prot. **64**, 246–251

FLANNIGAN, B., R. A. SAMSON und J. D. MILLER (2001):
Microorganisms in home and indoor work environments: Diversity, health impacts, investigation and control
Taylor & Francis Publisher, London, New York, NY.

FLIEGER, M., M. WURST und R. SHELBY (1997):
Ergot alkaloids — Sources, structures and analytical methods
Folia Microbiol. **42**, 3–30

FLOSS, H. G. (1976):
Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds
Tetrahedron **32**, 873–912

FRISVAD, J. C. (1987):
High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites
J. Chromatogr. **392**, 333–347

FRISVAD, J. C., B. ANDERSON und R. A. SAMSON (2007a):
Association of moulds to foods, in: Dijksterhuis, J., Samson, R. (Hrsg.),
Food Mycology: A multifaceted approach to fungi and food
CRC Press, Boca Raton, 199–239

FRISVAD, J. C. und O. FILTENBORG (1983):
Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites
Appl. Environ. Microbiol., **46**, 1301–1310

FRISVAD, J. C., T. O. LARSEN, R. DE VRIES, M. MEIJER, J. HOUBRAKEN, F. J. CABAÑES, K. EHRLICH und R. SAMSON (2007b):
Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins
Stud. Mycol. **59**, 31–37

FRISVAD, J. C., T. O. LARSEN, U. THRANE, M. MEIJER, J. VARGA, R. A. SAMSON, K. F. NIELSEN und K. McCLUSKEY (2011):
Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains
PLoS ONE **6**, e23496

FRISVAD, J. C. und R. A. SAMSON (2004):
Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins
Stud. Mycol. **49**, 1–174

FRISVAD, J. C., J. SMEDSGAARD, T. O. LARSEN und R. A. SAMSON (2004):
Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*
Stud. Mycol. **49**, 201–241

FRISVAD, J. C., J. SMEDSGAARD, R. A. SAMSON, T. O. LARSEN und U. THRANE (2007c):
Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger*
J. Agric. Food Chem. **55**, 9727–9732

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_20_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, 453–460

GAMS, W., M. CHRISTENSEN, A. H. ONIONS, J. I. PITT und R. A. SAMSON (1985):
Intrageneric taxa of *Aspergillus*, in: Samson, R. A., Pitt, J. I. (Hrsg.)
Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics
Plenum Press, 55–62

GEISER, D. M., C. GUEIDAN, J. MIADLIKOWSKA, F. LUTZONI, F. KAUFF, V. HOFSTETTER, E. FRAKER, C. L. SCHOCH, L. TIBELL, W. A. UNTEREINER und A. APTROOT (2006):
Eurotiomycetes: *Eurotiomycetidae* and *Chaetothyriomycetidae*
Mycologia **98**, 1053–1064

GELDERBLOM, W. C., K. JASKIEWICZ, W. F. MARASAS, P. G. THIEL, R. M. HORAK, R. VLEGGAAR und N. P. KRIEK (1988):
Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*
Appl. Environ. Microbiol. **54**, 1806–1811

GEY, M. H. (2008):
Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen
Springer-Lehrbuch, 2. Auflage
Springer Verlag, Berlin

GRASSIN, C. und P. FAUGUEMBERGUE (1999):
Enzymes, fruit juice processing
In: Flickinger, M. C., Drew, S. W. (Hrsg.)
Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation
Wiley & Sons Press, Inc, New York

GRENADE, C. E. F. und G. A. BEAN (1994):
Studies on *Fusarium moniliforme*: causal agent of equine leucoencephalomalacia,
in: Llewellyn, G. C., Dashek, W. V., O'Rear, C. E. (Hrsg.)
Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration, 1
Springer Verlag, Boston, MA, 105–113

GRIFFITH, A. J. F und K. McCLUSKEY (2004):
Taxonomic classification: an overview
verfügbar unter:
http://www.fgsc.net/neurospora/sectionb1.htm (Letzter Zugriff: 08.05.2013)

HALIBURTON, J. C., R. F. VESONDER, T. F. LOCK und W. B. BUCK (1979):
Equine leucoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent
Vet. Hum. Toxicol. **21**, 348–351

HARRISON, L. R., B. M. COLVIN, J. T. GREENE, L. E. NEWMAN und J. R. COLE (1990):
Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by Fumonisin B_1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*
J. Vet. Diagn. Invest. **2**, 217–221

HUMPHREYS, S. H., C. CARRINGTON und M. BOLGER (2001):
A quantitative risk assessment for fumonisins B_1 and B_2 in US corn
Food Addit. Contam. **18**, 211–220

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (1993):
Some naturally occuring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins
IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **56**
IARC Press, Lyon

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (2002):
Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene:
IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **82**
IARC Press, Lyon

JASKIEWICZ, K., W. F. MARASAS und F. E. VAN DER WALT (1987):
Oesophageal and other main cancer patterns in four districts of Transkei, 1981-1984
S. Afr. Med. J. **72**, 27–30

JAVED, T., J. L. RICHARD, G. A. BENNETT, M. A. DOMBRINK-KURTZMAN, R. M. BUNTE, K. W. KOELKEBECK, L. M. CÔTÉ, R. W. LEEPER und W. B. BUCK (1993):
Embryopathic and embryocidal effects of purified Fumonisin B_1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos
Mycopathologia **123**, 185–193

JECFA, JOINT EXPERT COMMITEE ON FOOD ADDITIVES (2001):
Fumonisins
verfügbar unter:
http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm
(Letzter Zugriff: 04.09.2015)

KELLERMAN, T. S., W. F. MARASAS, J. G. PIENAAR und T. W. NAUDÉ (1972):
A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* sheldon: A preliminary communication
Onderstepoort J. Vet. Res. **39**, 205–208

KIELWEIN, G. und H. K. LUH (1979):
Internationale Käsekunde: Geschichte, Geheimnisse, Genüsse; mit e. Ratgeber "Welcher Wein zu welchem Käse?", exquisiten Käserezepten u.e. Käselexikon
Seewald Verlag, Stuttgart

KIVANC, M. (1992):
Fungal contamination of Kashar cheese in Turkey
Die Nahrung **6**, 578-583

KLAFFKE, H. S. (2002):
Bestimmung von Fumonisinen in Lebensmitteln: Bestimmung von Fumonisinen und ihren Hydrolysaten in Lebensmitteln mittels immunochemischer, chromatographischer und spektrometrischer Methoden
BgVV-Hefte / Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin**, 5**
BgVV, Berlin

KORECKA, M. und L. M. SHAW (2009):
Review of the newest HPLC methods with mass spectrometry detection for determination of immunosuppressive drugs in clinical practice
Ann. Transplant. **14**, 61–72

KRIEK, N. P., T. S. KELLERMAN und W. F. MARASAS (1981):
A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats
Onderstepoort J. Vet. Res. **48**, 129–131

KRISHER, K. K., N. B. HOLDRIDGE, M. M. MUSTAFA, M. G. RINALDI und D. A. McGOUGH (1995):
Disseminated *Microascus cirrosus* infection in pediatric bone marrow transplant recipient
J. Clin. Microbiol. **33**, 735–737

KRSKA, R. und A. MOLINELLI (2006):
Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends
Anal. Bioanal. Chem. **387**, 145–148

KRSKA, R., P. SCHUBERT-ULLRICH, A. MOLINELLI, M. SULYOK, S. MACDONALD und C. CREWS (2008):
Mycotoxin analysis: An update
Food Addit. Contam. Part A **25**, 152–163

KUIPER-GOODMAN, T. (1991):
Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products
Vet. Hum. Toxicol. **33**, 325-32; discussion 332-3

KURE, C. F. und I. SKAAR (2000):
Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg
Int. J. Food Microbiol. **62**, 133–137

LANDESVEREINIGUNG DER MILCHWIRTSCHAFT NORDRHEIN-WESTFALEN E. V. (LV Milch NRW) (o. J.):
Fett i. Tr. - Was heißt das?
verfügbar unter:
http://www.milch-nrw.de/milchlandnrw/warenkunde/kaese/fettitr/.
(Letzter Zugriff: 28.12.2014)

LARSEN, T. O., M. GAREIS und J. C. FRISVAD (2002):
Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common *Penicillia* on cheese agar
J. Agric. Food Chem. **50**, 6148–6152

LATIF, H. (2010):
Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of the mycotoxin Fumigaclavin A
Diss. vet. med., Giessen

LEE, M. H., S. M. HWANG, M. K. SUH, G. Y. HA, H. KIM und J. Y. PARK (2012):
Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: Report of two cases
Ann. Dermatol. **24**, 209

LEE, N. A. und I. R. KENNEDY (2007):
Immunoassays, in: Picó, Y. (Hrsg.)
Food toxicants analysis. Techniques, strategies, and developments
Elsevier-Verlag, Amsterdam, Boston, 91–145

LIU, Y., J. TANG, Z. MAO, J.-H. MAH, S. JIAO und S. WANG (2011):
Quality and mold control of enriched white bread by combined radio frequency and hot air treatment
J. Food Eng. **104**, 492–498

LÓPEZ-DÍAZ, T. M., C. ROMÁN-BLANCO, M. T. GARCÍA-ARIAS, M. C. GARCÍA-FERNÁNDEZ und M. L. GARCÍA-LÓPEZ (1996):
Mycotoxins in two Spanish cheese varieties
Int. J. Food Microbiol. **30**, 391–395

LOVETT, J. (1972):
Toxigenic fungi from poultry feed and litter
Poult. Sci. **51**, 309–313

LUGAUSKAS, A. (2005):
Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin
Bot. Lith. **7**, 3–16

LUND, F., O. FILTENBORG und J. C. FRISVAD (1995):
Associated mycoflora of cheese
Food Microbiol. **12**, 173–180

LUND, F., O. FILTENBORG, S. WESTALL und J. C. FRISVAD (1996):
Associated mycoflora of rey bread
Lett. Appl. Microbiol. **23**, 213–217

LUQUE, E. M., G. GUTIÉRREZ, L. NAVARRO-SAMPEDRO, M. OLMEDO, J. RODRÍGUEZ-ROMERO, C. RUGER-HERREROS, V. G. TAGUA, L. M. CORROCHANO und S. E. BAKER (2012):
A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain
PLoS ONE **7**, e33658

MÅNSSON, M., M. L. KLEJNSTRUP, R. K. PHIPPS, K. F. NIELSEN, J. C. FRISVAD, C. H. GOTFREDSEN und T. O. LARSEN (2010):
Isolation and NMR characterization of Fumonisin B_2 and a new Fumonisin B_6 from *Aspergillus niger*
J. Agric. Food Chem. **58**, 949–953

MARASAS, W. F. O. (1995):
Fumonisins: Their implications for human and animal health
Nat. Toxins **3**, 193–198

MARASAS, W. F. O. (2001):
Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective
Environ. Health Perspect. **109** Suppl. 2, 239–243

MARASAS, W. F. O., K. JASKIEWICZ, F. S. VENTER und D. J. VAN SCHALKWYK (1988a):
Fusarium moniliforme contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei
S. Afr. Med. J. **74**, 110–114

MARASAS, W. F. O., T. S. KELLERMAN, W. C. GELDERBLOM, J. A. COETZER, P. G. THIEL und J. J. VAN DER LUGT (1988b):
Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B_1 isolated from *Fusarium moniliforme*
Onderstepoort J. Vet. Res. **55**, 197–203

MARASAS, W. F. O., P. E. NELSON und T. A. TOUSSOUN (1984):
Toxigenic *Fusarium* species, identity and mycotoxicology
Pennsylvania State University Press, University Park

MARASAS, W. F. O., R. T. RILEY, K. A. HENDRICKS, V. L. STEVENS, T. W. SADLER, J. GELINEAU-VAN WAES, S. A. MISSMER, J. CABRERA, O. TORRES, W. C. A. GELDERBLOM, J. ALLEGOOD, C. MARTÍNEZ, J. MADDOX, J. D. MILLER, L. STARR, M. C. SULLARDS, A. V. ROMAN, K. A. VOSS, E. WANG und A. H. MERRILL (2004):
Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming Fumonisin-contaminated maize
J. Nutr. **134**, 711–716

MARCHISIO, F. V. und A. FUSCONI (2001):
Morphological evidence for keratinolytic activity of *Scopulariopsis* spp. isolates from nail lesions and the air
Med. Mycol. **39**, 287–294

MARCHISIO, F. V., A. FUSCONI und F. L. QUERIO (2000):
Scopulariopsis brevicaulis: a keratinophilic or a keratinolytic fungus?
Mycoses **43**, 281–292

MARTH, E. H. und A. E. YOUSEF (1991):
Fungi and dairy products, in: Arora, D .K., Mukerji, K. G., Marth, E. H. (Hrsg.)
Handbook of applied mycology. Foods and feeds
M. Dekker, New York, N.Y., 375–415

MATHUR, S., P. D. CONSTABLE, R. M. EPPLEY, A. L. WAGGONER, M. E. TUMBLESON und W. M. HASCHEK (2001):
Fumonisin B_1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves
Toxicol. Sci. **60**, 385–396

METZGER, U., C. SCHALL, G. ZOCHER, I. UNSOLD, E. STEC, S.-M. LI, L. HEIDE und T. STEHLE (2009):
The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria
Proceed. Nat. Acad. Sci. **106**, 14309–14314

MILCHINDUSTRIE-VERBAND E.V. (2014):
Beilage zum Geschäftsbericht 2013/2014: Zahlen-Daten-Fakten
verfügbar unter:
www.milchindustrie.de/fileadmin/Dokumente/Verband/ZahlenDatenFakten_2013_14.pdf (letzter Zugriff: 02.08.2015)

MOGENSEN, J. M., K. F. NIELSEN, R. A. SAMSON, J. C. FRISVAD und U. THRANE (2009):
Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species
BMC Microbiol. **9**, 281

MOLDOVEANU, Ş. und V. DAVID (2013):
Essentials in modern HPLC separations
Elsevier Verlag, Waltham, MA.

MÜCKE, W. und C. LEMMEN (2004):
Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, 3. Auflage
Ecomed Verlag, Landsberg am Lech

MURO-CACHO, C. A., T. STEDEFORD, M. BANASIK, T. SUCHECKI und A. S. PERSAD (2004):
Mycotoxins: Mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals
J. Land Use **19,** 537-556

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (2001):
Toxicology and carcinogenesis studies of fumonisin B_1 (cas no. 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies)
Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., 1–352

NELSON, P. E., R. D. PLATTNER, D. D. SHACKELFORD und A. E. DESJARDINS (1992):
Fumonisin B_1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species
Appl. Environ. Microbiol. **58**, 984–989

NEUHAUS, H. G. (1992):
Käsesorten aus Europa
Matthaes Verlag, Stuttgart

NIELSEN, K. F., J. M. MOGENSEN, M. JOHANSEN, T. O. LARSEN und J. C. FRISVAD (2009):
Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group
Anal. Bioanal. Chem. **395**, 1225–1242

NIELSEN, K. F., M. W. SUMARAH, J. C. FRISVAD und J. D. MILLER (2006a):
Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex
J. Agric. Food Chem. **54**, 3756–3763

NIELSEN, K. F., M. W. SUMARAH, J. C. FRISVAD und J. D. MILLER (2006b):
Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex
J. Agric. Food Chem. **54**, 5216

NOONIM, P., W. MAHAKARNCHANAKUL, K. F. NIELSEN, J. C. FRISVAD und R. A. SAMSON (2009):
Fumonisin B_2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans
Food Addit. Contam.: Part A **26**, 94-100

NORTHOLT, M. D., H. P. VAN EGMOND, P. SOENTORO und E. DEIJLL (1980):
Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese
J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 115–119

NORTHOLT, M. D. und P. S. S. SOENTORO (1988):
Fungal growth on foodstuffs related to mycotoxin contamination, in: Samson, R. A. and van Reenen-Hoekstra, E. S. (Hrgs.)
Introduction to food-borne fungi
Baarn, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 231-238

O'BRIEN, M., K. F. NIELSEN, P. O'KIELY, P. D. FORRISTAL, H. T. FULLER und J. C. FRISVAD (2006):
Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland
J. Agric. Food Chem. **54**, 9268–9276

OHMOMO, S., T. SATO, T. UTAGAWA und M. ABE (1975):
Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*
Agric. Biol. Chem. **6**, 1333–1334

OHMOMO, S., H. K. KITAMOTO und T. NAKAJIMA (1994):
Detection of roquefortines in *Penicillium roqueforti* isolated from moulded maize silage
J. Sci. Food Agric. **64**, 211–215

OHMOMO, S., T. OHASHI und M. ABE (1979):
On the mechanism of the formation of indole alkaloids in *Penicillium roqueforti*
Agric. Biol. Chem. **10**, 2035–2038

OSBORNE, B. G. (1980):
The occurrence of ochratoxin A in mouldy bread and flour
Food Cosmet. Toxicol. **18**, 615-617

PANACCIONE, D. G. (2005):
Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi
FEMS Microbiol. Lett. **251**, 9–17

PANACCIONE, D. G. und C. M. COYLE (2005):
Abundant respirable ergot alkaloids from the common airborne fungus *Aspergillus fumigatus*
Appl. Environ. Microbiol. **71**, 3106–3111

PAŘENICOVÁ, L., J. A. BENEN, R. A. SAMSON und J. VISSER (1997):
Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black *Aspergilli*
Mycolog. Res. **101**, 810–814

PERKINS, D. D. und R. H. DAVIS (2000):
Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 5107–5109

PIECKOVÁ, E. und Z. JESENSKÁ (1999):
Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans
Ann. Agric. Environ. Med. **6**, 1–11

PITT, J. I. (1994):
The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health
J. Med. Vet. Mycol., **32**, Suppl. 1, 17-32

PITT, J. I. (2000):
Toxigenic fungi and mycotoxins
Br. Med. Bull. **56**, 184–192

RAPER, K. B., D. ALEXANDER und R. D. COGHILL (1944):
Penicillin: II. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species
J. Bacteriol. **6**, 639–659

RAPER, K. B. und C. THOM (1949):
A manual of the *Penicillia*
The Williams & Wilkins Company, Baltimore

REIß, J. (2009):
Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, 3. Auflage
Springer Verlag, Berlin

RHEEDER, J. P., W. F. O. MARASAS, P. G. THIEL, E. W. SYDENHAM, G. S. SHEPHARD, D. J. VAN SCHALKWYK (1992):
Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei
Phytopathology **82**, 353

RIPPEL-BALDES, A. (1955):
Grundriss der Mikrobiologie, 3. Auflage
Springer Verlag, Berlin

ROSS, P. F., P. E. NELSON, J. L. RICHARD, G. D. OSWEILER, L. G. RICE, R. D. PLATTNER und T. M. WILSON (1990):
Production of fumonisins by Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine
Appl. Environ. Microbiol. **56**, 3225–3226

ROTTINGHAUS, G. E., C. E. COATNEY und H. C. MINOR (1992):
A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B_1 and B_2
J. Vet. Diagn. Invest. **4**, 326–329

ROUKAS, T. (2000):
Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **25**, 298–304

RUNDBERGET, T., I. SKAAR und A. FLÅØYEN (2004):
The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes
Int. J. Food Microbiol. **90**, 181–188

SAMSON, R. A., C. ECKARDT und R. ORTH (1977):
The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses
Antonie van Leeuwenhoek **43**, 341–350

SAMSON, R. A. und W. GAMS (1984):
The taxonomic situation in the hyphomycete genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*
Antonie van Leeuwenhoek **50**, 815–824

SAMSON, R. A., K. A. SEIFERT, A. F. KUIJPERS, J. A. HOUBRAKEN und J. C. FRISVAD (2004):
Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β-tubulin sequences
Stud. Mycol. **49**, 175–200

SAMSON, R. A., P. NOONIM, M. MEIJER, J. HOUBRAKEN, J. C. FRISVAD und J. VARGA (2007):
Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*
Stud. Mycol. **59**, 129–145

SCHARDL, C. L., D. G. PANACCIONE und P. TUDZYNSKI (2006):
Ergotalkaloids – Biology and molecular biology, in: Cordell, G. (Hrsg.)
The Alkaloids: Chemistry and Biology, 63
Academic Press (Elsevier), 45–86

SCHIFF, P. L. (2006):
Ergot and its alkaloids
Am. J. Pharm. Educ. **70**, 1–10

SCHUSTER, E., N. DUNN-COLEMAN, J. C. FRISVAD und P. VAN DIJCK (2002):
On the safety of *Aspergillus niger* - a review
Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**, 426–435

SCOTT, P. M. (1981):
Toxins of Penicillium Species Used in Cheese Manufacture
J. Food Protec. **44**, 702-710

SCOTT, P. M. und B. P. C. KENNEDY (1976):
Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*
J. Agric. Food Chem. **24**, 865–868

SCOTT, P. M., B. P. C. KENNEDY, J. HARWIG und B. J. BLANCHFIELD (1977):
Study of conditions of production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*
Appl. Environ. Microbiol. **33**, 249–253

SCOTT, P. M., M.-A. MERRIEN und J. POLONSKY (1976):
Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*
Experientia **32**, 140–142

SEELIGER, H. P. R. (1981):
Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt: Lehrbuch und Atlas
Thieme Verlag, Stuttgart, New York

SEO, J. A. und Y. W. LEE (1999):
Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 1331–1334

SHEAR, C. L. und B. O. DODGE (1927):
Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group
United States Government printing office, Washington D. C.

SHELBY, R. A. und V. C. KELLEY (1991):
Detection of ergot alkaloids in tall fescue by competitive immunoassay with a monoclonal antibody
Food Agric. Immunol. **3**, 169–177

SHELBY, R. A. und V. C. KELLEY (1992):
Detection of ergot alkaloids from *Claviceps* species in agricultural products by competitive ELISA using a monoclonal antibody
J. Agric. Food Chem. **40**, 1090–1092

SHELBY, R. A., G. E. ROTTINGHAUS und H. C. MINOR (1994):
Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detecting Fumonisin on maize
J. Agric. Food Chem. **42**, 2064–2067

SHEPHARD, G. S. (2001):
Liquid chromatographic method for fumonisins in corn, in: Trucksess, M. W., Pohland, A. E. (Hrsg.)
Mycotoxin protocols, 157
Humana Press, Clifton, 147–158

SIEBER, R. (1978):
Zur Frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Käsefabrikation verwendeten Schimmelpilzkulturen
Z. Ernahrungswiss. **17**, 112–123

SMITH, G. W., P. D. CONSTABLE, C. W. BACON, F. I. MEREDITH und W. M. HASCHEK (1996):
Cardiovascular effects of fumonisins in swine
Fundam. Appl. Toxicol. **31**, 169–172

SMITH, J. E., G. SOLOMONS, C. LEWIS und J. G. ANDERSON (1995):
Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health
Nat. Toxins **3**, 187–192

SNYDER, L. R., J. J. KIRKLAND und J. W. DOLAN (2010):
Introduction to modern liquid chromatography, 3. Auflage
Wiley Press, Hoboken, N. J.

SOARES, C., T. CALADO und A. VENÂNCIO (2013):
Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions
Rev. Iberoam. Micol. **30**, 9–13

SOLFRIZZO, M., A. DE GIROLAMO und A. VISCONTI (2001):
Determination of fumonisins B_1 and B_2 in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up
Food Additiv. Contam. **18**, 227–235

SPICHER, G. (1985):
Die Erreger der Schimmelbildung bei Backwaren: 4. Mitteilung: Weitere Untersuchungen über die auf verpackten Schnittbroten auftretenden Schimmelpilze
Dtsch. Lebensmitt. Rundsch., 16–20

SPILSBURY, J. F. und S. WILKINSON (1961):
The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres
J. Chem. Soc. **5**, 2085–2091

STANG, M. (2010):
Lust auf Grünes
Deutschlandradio
verfügbar unter:
http://www.deutschlandfunk.de/lust-auf-gruenes.676.de.html?dram:article_id=27857
(letzter Zugriff: 26.07.2015)

STANKER, L. H. und R. C. BEIER (1996):
Introduction to immunassays for residue analysis, in: Beier, R. C., Stanker, L. H. (Hrsg.)
Immunoassays for residue analysis. Food safety: developed from a symposium sponsored by the Division of Agriculture and Food Chemistry at the 209. national meeting of the American Chemical Society, Anaheim, California
Am. Chem. Soc., Washington, D.C., 2–16

STEYN, P. S. (1995):
Mycotoxins, general view, chemistry and structure
Toxicol. Lett. **82/83**, 843–851

STOTT, W. T. und L. B. BULLERMANN (1976):
Instability of patulin in cheddar cheese
J. Food Sci. **41**, 201–203

SULYOK, M., R. KRSKA und R. SCHUHMACHER (2007):
A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples
Anal. Bioanal. Chem. **389**, 1505–1523

SYDENHAM, E. W., W. C. A. GELDERBLOM, P. G. THIEL und W. F. O. MARASAS (1990):
Evidence for the natural occurrence of fumonisin B_1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn
J. Agric. Food Chem. **38**, 285–290

TANIWAKI, M. H. und A. G. F. VAN DENDER (1992):
Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese
J. Food Prot. **55**, 187–191

TANIWAKI, M. H., A. D. HOCKING, J. I. PITT und G. H. FLEET (2001):
Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres
Int. J. Food Microbiol. **68**, 125–133

THIEL, P. G., W. F. MARASAS, E. W. SYDENHAM, G. S. SHEPHARD, W. C. GELDERBLOM und J. J. NIEUWENHUIS (1991):
Survey of fumonisin production by Fusarium species
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 1089–1093

THOM, C. und K. B. RAPER (1932):
The arsenic fungi of gosio
Science **76**, 548–550

TRBA 460, TECHNISCHE REGELN FÜR BIOLOGISCHE ARBEITSSTOFFE (2002):
Einstufung von Pilzen in Risikogruppen
Bundesarbeitsblatt 10/2002
verfügbar unter:
http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-460.pdf?__blob=publicationFile&v=3. (letzter Zugriff: 26.07.2015)

TSAI, W., M. LIEWEN und L. BULLERMAN (1988):
Toxicity and sorbate sensitivity of molds isolated from surplus commodity cheeses
J. Food Protect. **51**, 457–462

TURNER, N. W., S. SUBRAHMANYAM und S. A. PILETSKY (2009):
Analytical methods for determination of mycotoxins: A review
Anal. Chim. Acta **632**, 168–180

TYLLINEN, H., M. RAEVUORI, E. KARPPANEN und A. S. GARRY-ANDERSSON (1977):
A study on the toxicity of spontaneously molded bread
Nord. Vet. Med. **29**, 546-551

USLEBER, E. (1991):
Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Deoxynivalenol und 3-Acetyldeoxynivalenol
Diss. med. vet., München

USLEBER, E. (1997):
Immunchemische Verfahren in der Lebensmittelhygiene: Nachweis niedermolekularer Toxine und Rückstände
Veterinärmed. Fak., Habil., München

USLEBER, E., M. STRAKA und G. TERPLAN (1994):
Enzyme Immunoassay for fumonisin B_1 applied to corn-based food
J. Agric. Food Chem. **42**, 1392–1396

VALÍK, L., J. BARANYI und F. GÖRNER (1999):
Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*
Int. J. Food Microbiol. **47**, 141–146

VARGA, J., F. KEVEI, A. VRIESEMA, F. DEBETS, Z. KOZAKIEWICZ und J. H. CROFT (1994):
Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate
Can. J. Microbiol. **40**, 612–621

VINOKUROVA, N. G., D. M. BOĬCHENKO, B. P. BASKUNOV, N. F. ZELENKOVA, I. G. VEPRITSKAIA, M. U. ARINBASAROV und T. A. RESHETILOVA (2001):
Minor alkaloids of the fungus *Penicillium roqueforti* Thom 1906
Prikl. Biokhim. Mikrobiol. **37**, 209–213

WEIDENBÖRNER, M. (2000):
Lexikon der Lebensmittelmykologie
Springer Verlag, Berlin

WELSH, R. D. und R. W. ELY (1999):
Scopulariopsis chartarum systemic mycosis in a dog
J. Clin. Microbiol. **37**, 2102–2103

WILLIAMS, P. L., R. C. JAMES und S. M. ROBERTS (2000):
Principles of toxicology: Environmental and industrial applications, 2. Auflage
Wiley Press, New York

WILSON, B. J. und R. R. MARONPOT (1971):
Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals
Vet. Rec. **88**, 484–486

WOLFF, J., C. NEUDECKER, C. KLUG und R. WEBER (1988):
Chemische und toxikologische Untersuchungen in Mehl und Brot
Z. Ernährungswiss. **27**, 1–22

YOSHIZAWA, T., A. YAMASHITA und Y. LUO (1994):
Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China
Appl. Environ. Microbiol. **60**, 1626–1629

ZMB, ZENTRALE MILCHMARKT BERICHTERSTATTUNG GMBH (2013a):
Deutschland: Käseexporte mit neuem Rekord
verfügbar unter:
http://www.milk.de/pages/de/Marktinformation-1.htm (letzter Zugriff: 31.07.2015)

ZMB, ZENTRALE MILCHMARKT BERICHTERSTATTUNG GMBH (2013b):
Deutschland: Mehr Käse, Butter und Trinkmilch exportiert
verfügbar unter:
http://www.milk.de/pages/de/Marktinformation-1.htm (letzter Zugriff: 31.07.2015)

ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E. V. (2015a):
Bäckerhandwerk - Zahlen & Fakten - Brotverbrauch und Brotkorb der Deutschen - Zentralverband des Deutschen Bäckerhandwerks e. V.
verfügbar unter:
http://www.baeckerhandwerk.de/baeckerhandwerk/zahlen-fakten/brotverbrauch-und-brotkorb-der-deutschen/ (Letzter Zugriff: 23.07.2015)

ZENTRALVERBAND DES DEUTSCHEN BÄCKERHANDWERKS E. V. (2015b):
Vielfalt - Historische Informationen - Deutsche Brotkultur - Bewerbung für das Weltkulturerbe
verfügbar unter:
http://www.brotkultur.de/historische-informationen/deutsche-brotkultur/vielfalt/ (Letzter Zugriff: 23.07.2015)

ZIEHR, W., E. M. BÜHRER und M. WÄHREN (1984):
Das Brot von der Steinzeit bis heute: Bauer, Müller, Bäcker
Atlantis Verlag, Herrsching

Rechtsvorschriften und amtliche Untersuchungsverfahren

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2006a):
Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
Amtsblatt der Europäischen Union 2006, L 364, 5-24
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:DE:PDF
(Stand: Juli 2015)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2006b):
Empfehlung der Kommission vom 17. August 2006 betreffend das Vorhandensein von Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratroxin A, T-2- und HT-2- Toxin sowie von Fumonisinen in zur Verfütterung an Tiere bestimmten Erzeugnissen (2006/576/EG)
Amtsblatt der Europäischen Union 2006, L 229, 7-9
verfügbar unter:
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:DE:PDF
(Stand: Juli 2015)

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2007):
Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen
Amtsblatt der Europäischen Union 2007, L 255, 14-17
verfügbar unter:
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:DE:PDF
(Stand: Juli 2015)

Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), zuletzt geändert durch Artikel 19 des Gesetzes vom 25. Juli 2013 (BGBl. I S. 2722).

Leitsätze für Brot und Kleingebäck vom 19.10.1993 (Beilage zum BAnz. Nr. 58 vom 24.03.1994, GMBl. Nr. 10 S. 346 vom 24.03.1994), zuletzt geändert am 19.09.2005 (BAnz. Nr. 184 vom 28.09.2005, GMBl. Nr. 55 S. 1125)

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) –
Methode AM028
Molekularbiologische Identifizierung von Pilzen mittels ITS-PCR und nachfolgender Sequenzierung
Methodensammlung, Stand: März 2011

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 Lebens- und Futtermittelgesetzbuch:
Untersuchung von Lebensmitteln – Methode L 15.05-2
Bestimmung von Fumonisin B_1 und B_2 in Mais
HPLC-Verfahren mit Reinigung durch Festphasenextraktion
Methodensammlung, Stand: Juli 2004

9 Danksagung

In besonderer Weise danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Ewald Usleber für die Überlassung des interessanten Themas, die zu jeder Zeit gewährte, freundliche Betreuung und zuvorkommende Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich bedanke ich mich recht herzlich für zahlreiche fachliche Anregungen sowie sein stets entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Geisen danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei der Identifizierung der auf Brot gewachsenen Schimmelpilze.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, insbesondere für die Unterstützung und Nachsicht während der Lagerungsversuche mit einhergehender Schimmelbildung auf den Proben.
Frau Renate Stumpf und Frau Margit Keßler danke ich für ihre stets freundliche Hilfestellung bei der Labortätigkeit. Bei Frau Dr. Yvonne Ackermann bedanke ich mich recht herzlich für ihre Hilfestellung bei der Einarbeitung in das Thema sowie der chromatographischen Untersuchung der Proben. Ebenso danke ich Frau Dr. Madeleine Groß für ihre Hilfe und Beantwortung etlicher Fragen sowie Frau Cornelia Borchardt und Frau Karin Müller für die technische Unterstützung.

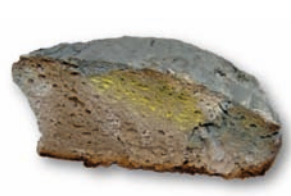
Auch möchte ich mich recht herzlich bei Frau Christa Zeidler für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei sämtlichen organisatorischen Angelegenheiten während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und stets entgegengebrachtes Verständnis und Geduld während dieser Zeit. Sowie meinem engen Freund Cornelius, der mir stets mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sandra Melissa Wolf



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6424-2