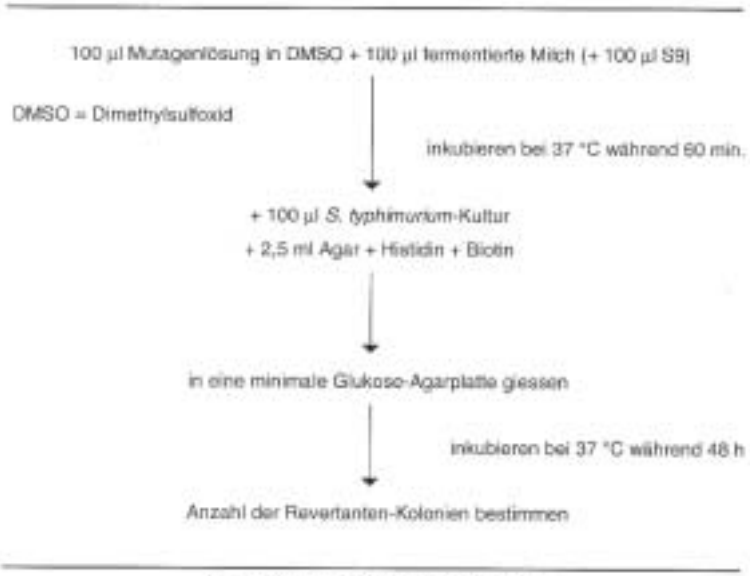
FAM-INFO



Ablaufschema des Antimutagenitätstests

Antimutagene Wirkung von Milchprodukten und von in der Milchwirtschaft verwendeten Bakterien

Teil 1. Milch, Milchprodukte und Milchinhaltsstoffe
Teil 2. Milchsäurebakterien und andere Bakterien

Januar 2002, Nr. 429

Inhaltsverzeichnis:

Teil 1. Milch, Milchprodukte und Milchinhaltsstoffe
Einleitung 3
Nachweis einer antimutagenen Wirkung... 5
Milch 5
Sauermilchprodukte 7
Käse 9
Kasein 10
Molkenproteine 12
Fette und Fettsäuren 13
Mineralstoffe 14
Schlussfolgerung 14
Zusammenfassung 14
Résumé 14
Summary 15
Key words 15
Literatur 15

Teil. 2 Milchsäurebakterien und andere Bakterien
Einleitung 22
Nachweis des Bindungsverhaltens gegenüber... 22
Milchsäurebakterien 22
Bifidobakterien 29
Propionsäurebakterien 30
Enterokokken 31
Erklärung der antimutagenen Wirkung der Milchsäurebakterien 31
Bedeutung für die menschliche Gesundheit 32
Schlussfolgerung 33
Zusammenfassung 33
Résumé 33
Summary 34
Key words 34
Literatur 34

Original erschienen in:
Mitt. Lebensm. Hyg. 92, S. 68-89 (2001) (1. Teil)
Mitt. Lebensm. Hyg. 92, S. 197-217 (2001) (2. Teil)

Impressum:

Herausgeber:
FAM
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
Liebefeld
CH-3003 Bern
Telefon +41 (0)31 323 84 18
Fax +41 (0)31 323 82 27
http://www.admin.ch/sar/fam
e-mail info@fam.admin.ch

Autoren:
Robert Sieber, Martinus A.J.S. van Boekel

Kontaktadresse für Rückfragen:
Dr. Robert Sieber
e-mail robert.sieber@fam.admin.ch
Telefon +41 (0)31 323 81 75
Fax +41 (0)31 323 82 27

Erscheinungsweise:
In unregelmässiger Folge mehrmals jährlich.

Ausgabe:
Januar 2002, Nr. 429

Teil 1. Milch, Milchprodukte und Milchinhaltsstoffe

R. Sieber
Eidgenössische Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft (FAM),
Liebefeld, CH-3003 Bern

Martinus A. J. S. van Boekel
Food Science Group
Wageningen University,
Wageningen

Eingegangen am 2. Juli 2000, angenommen am 19. Dezember 2000

Einleitung

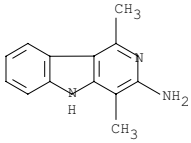
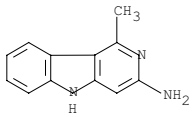
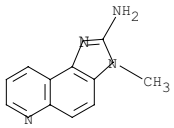
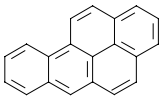
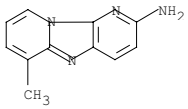
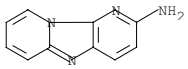
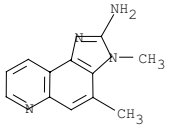
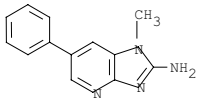
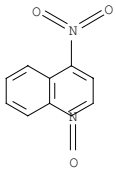
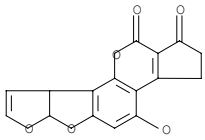
Viele mutagene Substanzen, die sich in verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Modellen als stark mutagen und auch als kanzerogen erwiesen haben (siehe dazu 1), können in der Nahrung des Menschen vorkommen. Es sind natürliche Pflanzeninhaltsstoffe, mikrobielle Stoffwechselprodukte, Stoffe, die bei der Zubereitung, Konservierung und Lagerung von Lebensmitteln entstehen, Umweltkontaminanten und Pestizidrückstände (2, 3) (Abb. 1)[1]. In Ziegenmilch kann nach dem Verfüttern der pyrrolidinenthaltenden Pflanze *Senecio jacobaea* eine mutagene Aktivität auftreten (5). Im weiteren war die Milch, die von mit aflatoxinhaltigen Baumwollsamen gefütterten Kühen gewonnen wurde, mutagen[2] (7). Dass der Mensch täglich mutagene Aktivitäten zu sich nimmt, zeigt die Arbeit von *Augustsson* et al. (8). Dabei wurde über den Verzehr von Fleisch eine mittlere tägliche Aufnahme von 862 Revertanten berechnet.

Neben den mutagen wirkenden Substanzen kommen in Lebensmitteln auch antimutagen wirkende Substanzen oder Aktivitäten vor. Nach *Bronzetti* (9) bezeichnet der Begriff antimutagen die Eigenschaft einer Substanz, die Anzahl an spontanen oder induzierten Mutationen zu reduzieren. Es werden zwei Typen unterschieden: die Desmutagene und die Bioantimutagene. Bei den Desmutagenen wird eine Interaktion des Mutagens mit der DNA verhindert, und bei den Bioantimutagenen werden die Wirkungen eines Mutagens reduziert, indem die induzierten Änderungen der Zelle rückgängig gemacht werden. Als antimutagene Nahrungsmittelbestandteile werden β-Carotin, Vitamin E und C, Glutathion, Vanillin, Zimtaldehyd, Chlorophyll, Diallylsulfid, Selen und Magnesium erwähnt. Ihre antimutagene Wirkung besteht meist darin, dass sie als Antioxidantien oder als Nitritfänger, also als Desmutagene wirken (9). Die Mechanismen, die den Organismus vor mutagenen Substanzen schützen, wurden von de Flora (10) zusammengestellt.

Für verschiedene Lebensmittel wie Gemüse und Früchte, Propolis, Apfelsaft, Tee, Bier und andere alkoholische Getränke (9, 11-20) wurde bereits eine antimutagene Wirkung nachgewiesen. Diese Arbeit fasst die entsprechende Literatur für Milch, Milchbestandteile, Sauermilchprodukte und Milchsäurebakterien zusammen.

[1]Von diesen mutagenen Substanzen sind Glu-P1, Glu-P2, IQ, MeIQ und PhIP als in Tierversuchen dickdarmkrebsverursachende Substanzen bekannt (4).
[2]Aflatoxin B_1 und B_2 im Futter werden im Stoffwechsel der Kuh zu Aflatoxin M_1 und M_2 umgewandelt und als solches in die Milch ausgeschieden (6).

Abbildung 1
Einige, im Text erwähnte mutagene Substanzen

Name	*Abkürz.*	*Formel*	*Ursprung*
Pyrolysatprodukte des Tryptophans: 3-Amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol	Trp-P1		Verarbeitung von Lebensmitteln (Fleisch) (3)
3-Amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indol	Trp-P2		
2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-f]-chinolin	IQ		Verarbeitung von Lebensmitteln (Fleisch) (3)
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin	MNNG	$NO_2NHC(:NH)N(NO)CH_3$	synthetisch
Benzo[a]pyren	B[a]P		Umwelt und Verarbeitung von Lebensmitteln
2-Amino-6-methyl-dipyrido [1,2-*a*:3',2'-*d*]-imidazol	Glu-P1		Glutaminsäure-Pyrolysat (3)
2-Amino-dipyrido [1,2-*a*:3',2'-*d*]-imidazol	Glu-P2		
2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]chinolin	MeIQ		Verarbeitung von Lebensmitteln (3)
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridin	PhIP		Verarbeitung von Lebensmitteln
4-Nitrochinolin 1-oxid	NQO		synthetisch
Aflatoxin B_1	AFB		mikrobiell

Nachweis einer antimutagenen Wirkung von Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen

Für den Nachweis mutagener oder antimutagener Eigenschaften einer Substanz werden Kurzzeitmutagenitätstests wie der Ames-Test verwendet (22, 23). Ein histidinabhängiger *Salmonella (S.) typhimurium*-Stamm (empfindlich auf Frameshift-Mutagene oder Basenpaar-Substitution-Mutagene) wird durch mutagene Substanzen histidinunabhängig. Damit kann er auf einem Mangelnährboden wachsen. Die Anzahl der Kolonien wird mit der Anzahl auf der Kontrollplatte verglichen. Eine Substanz wird als mutagen bezeichnet, wenn sich die Mutationsrate gegenüber der Kontrolle verdoppelt (3). Um den Säugetierstoffwechsel von Substanzen zu simulieren, kann bei diesem Test auch eine mikrosomale Fraktion von Rattenleberhomogenaten (S-9-Fraktion) eingesetzt werden. Eine antimutagene Wirkung wird durch eine Verminderung der Anzahl von Revertantenkolonien dargestellt. Experimentell werden die Zellsuspensionen von *S. typhimurium* mit dem zu prüfenden Agens und dem Mutagen inkubiert. Die antimutagene Wirkung wird als prozentuale Hemmung der Mutationsrate angegeben[3]. Ein weiterer Test ist der *E. coli*-DNA-Reparatur-Test (23).
Die Mutagenität einer Substanz ist eine Form der Genotoxizität und korreliert mit dieser (24). Letztere wird mit Hilfe des Schwester-Chromatid-Austausch-Tests nachgewiesen, wobei diese mit einem Säugetierzellsystem, beispielsweise Hamsterzellen, durchgeführt wird.

Milch

Eine antimutagene Wirkung von Magermilch und Vollmilch gegenüber der pfefferinduzierten Mutagenese wurde von *Hosono* et al. (25) nachgewiesen. Halbentrahmte UHT-Milch zeigte beim Test mit *S. typhimurium* TA98 und TA100 gegenüber[4] den direkten Mutagenen NQO, 2-Nitrofluoren und den drei Substanzen Quercetin, AFB und B[a]P, die erst nach metabolischer Aktivierung wirken, eine antimutagene Wirkung von 40, 20, 54, 47 und 65 % (26). Eine Hemmung liess sich auch mit Magermilch bei der von B[a]P-induzierten Mutagenese mit *S. typhimurium* TA98 nachweisen und betrug bei 100 µl Probe im Inkubationsmedium 54 %, bei 200 µl 57 % und bei 500 µl 75 % (27). Milch weist gegenüber Terasi[5] eine antimutagene Wirkung von etwa 29 % auf (29). Die antimutagene Wirkung von Magermilch und gesäuerter Magermilch (mit Milchsäure auf pH 5,0) gegenüber erhitzten Taucos[6] war signifikant nicht verschieden (30). Während der Lagerung von 28 Tagen bei 4°C veränderte sich die antimutagene Wirkung von unfermentierter, mit *L. gasseri* ergänzter Milch gegenüber Trp-P1 nicht (31).

[3] Hemmung in % = [1 - (x - b) / (y - b)] x 100
x = Anzahl der mutagen-induzierten his^+-Revertanten bei Anwesenheit der antimutagen wirkenden Substanz oder Bakterien
y = Anzahl der mutagen-induzierten his^+-Revertanten bei Abwesenheit der antimutagen wirkenden Substanz oder Bakterien (positive Kontrolle)
b = Anzahl der spontanen his^+-Revertanten in Abwesenheit der antimutagen wirkenden Substanz oder Bakterien (negative Kontrolle).

[4] «Gegenüber» meint in diesem Falle eine durch diese Substanzen induzierte Mutagenität.

[5] Terasi ist eine indonesische Würze aus fermentierten Fisch und Garnelen mit starker mutagener Wirkung (28).

[6] Tauco ist in Indonesien ein traditionelles fermentiertes Lebensmittel aus gelben Sojabohnen, das nach dem Erhitzen eine mutagene Wirkung aufweist.

Tabelle 1
Antimutagene Wirkung von mit verschiedenen Milchsäurebakterien fermentierter Milch gegenüber Trp-P2 (49) und MNNG (50)[1]

Milch, fermentiert mit	*n*[2]	*Prozentuale Hemmung verschiedener Stämme gegenüber*	
		Trp-P2	*MNNG*
L. helveticus	*7*	*26,.39, 50, 6, 47,13, 27*	*35, 40, 52, 40, 24, 16 30.*
L. delbrueckii ssp. bulgaricus	*10*	*40, 33, 19, 17, 40, 31, 18, 16, 46, 33*	*15, 40, 32, 35, 58, 27, 24, 27, 23, 40*
L. acidophilus	*12*	*39, 3, 35, 17, 21, 82, 40, 27, 29, 41, 28, 10*	*54, 26, 54, 28, 37, 77, 46, 56, 58, 40, 31, 31*
L. casei ssp. casei	*2*	*33, 15*	*61, 57*
L. casei ssp. rhamnosus	*2*	*60, 36*	*56, 23*
L. salivarius ssp. salivarius	*1*	*24*	*47*
L. plantarum	*2*	*8, 15*	*27, 28*
L. salivarius ssp. thermophilus	*22*	*7, 38, 20, 6, 25, 26, 15, 25, 22, 15, 20, 7, 14, 11, 5, 33, 27, 25, 40, 32, 47, 12*	*44, 32, 36, 42, 35, 27, 28, 29, 28, 37, 34, 38, 34, 38, 25, 44, 43, 42, 39, 45, 43, 32*
L. salivarius ssp. salivarius	*1*	*-*	*51*
Str. bovis	*1*	*44*	*41*
Lc. raffinolactis	*1*	*31*	*39*
Lc. lactis ssp. lactis	*4*	*47, 76, 77, 27*	*44, 43, 41, 42*
Lc. ladis ssp. diacetylactis	*1*	*41*	*38*
Lc. lactis ssp. cremoris	*4*	*14, 14, 10, 3*	*39, 35, 35, 44*
B. longum	*1*	*19*	*24*
B. sp.	*2*	*34, 5*	*-*
Enterococcus faecalis	*2*	*14, 5*	*-*
Enterococcus faecium	*2*	*7, 17*	*-*

[1] Der verwendete Antimutagenitätstest unterscheidet sich in diesen beiden Arbeiten dadurch, dass bei den Versuchen mit Trp-P2 noch zusätzlich ein angereichertes Mikrosomenpräparat und der *Sal. typhimurium*-Stamm TA98 (49) und in der anderen Arbeit (50) der *Sal. typhimurium*-Stamm TA100 eingesetzt wurden.
[2] Anzahl der eingesetzten Stämme
[3] In beiden Studien wurden mit wenigen Ausnahmen die gleichen Milchsäurebakterienstämme verwendet: die Resultate der gleichen Stämme entsprechen sich in den beiden Kolonnen.
L. = *Lactobacillus; Str.* = *Streptococcus Lc.* = *Lactococcus; B.* = *Bifidobacterium*

Demgegenüber wies ein japanisches Milchprodukt, das durch Eindampfen von Milch auf 1:10 konzentriert wurde, eine starke mutagene Wirkung auf (32). Nach Aktivierung der mikrosomalen S-9-Fraktion stellten *Green* et al. (33) eine mutagene Wirkung von kommerziell erhältlicher sterilisierter Milch (1 s bei 135 °C und anschliessend 20 min bei 117 °C) fest. Keine mutagene Wirkung wiesen dagegen *Sekizawa* und *Shibamoto* (34) in pasteurisierter (30 min bei 65 °C) und ultrahocherhitzter (2 s bei 120 und 140 °C) Milch sowie in Dichlormethanextrakten von stark erhitzter (5 h bei 100, 135, 150 °C) Milch nach. Diese Ergebnisse bestätigten eingehende Untersuchungen von *Berg* et al. (35) mit sterilisierter Milch (10, 20, 30 und 40 min bei 117 °C) wie auch mit UHT-Milch, in einer Pfanne angebrannter Vollmilch, Magermilch und laktosefreier Magermilch. Maillard-Reaktionsprodukte können antimutagen (36-39), aber auch mutagen (29, 40, 41) wirken.

In verschiedenen Untersuchungen wurden Milch, Joghurt oder mit Milchsäurebakterien fermentierte Milch mit Aceton oder Ethylacetat extrahiert[7]. Solche Extrakte von Magermilch verhinderten die mutagene Wirkung von NQO und 2-Aminofluoren nicht (42). Dagegen zeigte ein Acetonextrakt von Magermilch eine schwache antimutagene Wirkung gegenüber MNNG und 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB): zwischen 10 bis 21 % bei der tiefsten und 34 bis 36 % bei der höchsten verwendeten Konzentration dieses Acetonextraktes (43, 44). Acetonextrakte von Magermilch, die mit Milchsäure versetzt oder mit aus Joghurt gewonnenen Bakterienzellen oder Milchsäure und Zellen versetzt wurden, unterschieden sich in der antimutagenen Wirkung gegenüber MNNG und DMAB bei

[7] Mit einer solchen Extraktion werden apolare Komponenten gewonnen. Ob es sich dabei um die volle antimutagene Wirkung von Milch und Joghurt handelt, ist fraglich.

der höchsten eingesetzten Konzentration nicht von unbehandelter Milch (44).

Sauermilchprodukte

Joghurt
Zehn Joghurtproben von sieben verschiedenen Herstellern, darunter eine mit *Lactobacillus* (*L.*) *acidophilus* und Bifidobakterien, jedoch nicht Buttermilch, Kefir und Dickmilch, waren antimutagen gegenüber nitriertem Rindfleischextrakt. Zwei Joghurtproben, die nacherhitzt wurden, zeigten keine und zwei Proben mit *L. acidophilus*/Bifidusbakterien nur eine geringe antimutagene Wirkung. Joghurt, hergestellt mit *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* und *Streptococcus (Str.) thermophilus* war stärker antimutagen als *L. acidophilus* und Bifidobakterien enthaltende Sauermilchprodukte (45). Eine mit *Str. thermophilus* oder *L. bulgaricus* fermentierte Milch wirkte gegenüber 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamid (AF-2) und NQO wie auch gegenüber den Fecesextrakten von Affen, Katze und Hund antimutagen (46). Der Chromosomen-Aberrations- wie auch der Mikronukleus-Test zeigten starke antiklastogene Wirkung, wenn Joghurt gleichzeitig mit der mutagenen Substanz Busulfan an Hamster verabreicht wurde (47).

Versuche mit verschiedenen, durch Milchsäurebakterien fermentierte Milch
Eine antimutagene Wirkung gegenüber NQO und dem Wasserextrakt von Hundefeces wurde mit *Str. faecalis*, *Str. lactis* und *L. bulgaricus* gesäuerter Milch beobachtet, nicht aber mit Milchsäure (48). Gegenüber erhitzten Taucos zeigte mit *L. acidophilus*-Stämmen fermentierte Milch eine antimutagene Wirkung (30). Sämtliche Milchproben, die mit 71 verschiedenen Milchsäurebakterien-Stämmen (*Lactobacillus, Streptococcus*, *Lactococcus (Lc.), Bifidobacterium*) fermentiert wurden, zeigten in vitro gegenüber Trp-P2 (49) und MNNG (50) antimutagene Wirkungen, die vom eingesetzten Stamm abhängen (Tabelle 1). So wies beispielsweise die mit *L. acidophilus*-Stämmen LA102 und LA112 vergorene Milch eine Inhibitionsrate von 3 resp. 10 % gegenüber Trp-P2 (49) und von 26 und 31 % gegenüber MNNG (50) auf. Während der Inkubation nahm die Hemmungsrate bis zu einer Inkubationszeit von 18 h zu (49, 50). Milch, die mit *L. acidophilus* LA106 (51) oder mit zwei Bifidobakterien-Stämmen (*Bifidobacterium* (*B.)* bio Danone 173010, *B.* sp. CIRDC Danone 163040) und *L. helveticus* (Danone 119028) (26) vergoren wurde, hemmte in unterschiedlichem Masse die mutagene Wirkung von AFB (79 %) (51) wie auch diejenige von NQO (60 %), 2-Nitrofluoren (25 bis 50 %), B[a]P (40 bis 60 %), AFB (30 bis 40 %) und Quercetin (unter 40 %) (26). Eine mit *Bifidobacterium* sp. bio (Stamm Danone 172010) fermentierte Milch zeigte eine dosisabhängige Hemmung der durch B[a]P-induzierten Mutagenese (27). Milch, einzeln mit drei *B. longum*-Stämmen fermentiert, wirkte gegenüber Trp-P1 und Trp-P2 antimutagen (52).Viili, eine mit *Lc. lactis* ssp. *cremoris* fermentierte, zähflüssige Milch, erniedrigte die mutagene Wirkung von nitrosiertem Rindfleischextrakt um 40 %, aber auch eine nichtfadenziehende fermentierte Milch zeigte dieselbe Wirkung (53). Milchen, die einzeln mit verschiedenen, aus Dadih (indonesische Sauermilch) isolierten Milchsäurebakterien (*L. casei* ssp. *casei*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis*) fermentiert wurden, hemmten die durch Terasi- oder durch Terasi-Starter-induzierte Mutagenität (29). Ebenso wurde die mutagene Wirkung von MNNG, Nitrovin und 5-Nitro-2-Furylacrylsäure durch mit *Enterococcus faecium* fermentierte Milch mit 20 bis 40 % gehemmt (54).
Eine stärkere antimutagene Aktivität gegenüber Trp-P2, MNNG, B[a]P, AF-2 und AFB wies eine Milch auf, die mit verschiedenen Milchsäurebakterien in Gegenwart von *Saccharomyces cerevisiae* vergoren wurde, als die mit einem einzelnen Milchsäurebakterienstamm wie *B. longum*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acido-*

philus oder *Str. salivarius* ssp. *thermophilus* und *Saccharomyces cerevisiae* vergorene Milch (55). Sauermilch, die mit den Joghurtkulturen *L. bulgaricus* und *Str. thermophilus* sowie mit *L. acidophilus* und *B. bifidum* hergestellt wurde, zeigte nach 30-minütiger Belüftung mit Stickstoff gegenüber der mutagenen Substanz Ethylmethansulfonat eine verminderte Genkonversion und Frequenz von Punktmutationen, nicht aber gegenüber Methylmethansulfonat (56).

Zeitverlaufsstudien
Nach zwölfstündiger Fermentation von Milch mit *L. helveticus* war deren antimutagene Aktivität gegenüber NQO von 12 auf 50 % und nach 24 Stunden auf 62 % angestiegen, dagegen war sie beim Einsatz eines proteasenegativen Stammes mit 13 bis 20 % nach 12 Stunden und 20 bis 40 % nach 24 Stunden deutlich tiefer, obwohl sich Wachstumsraten, Säureproduktion und die Stoffwechselaktivität zwischen diesen beiden Stämmen nicht unterschieden hatten. Diese Versuche weisen darauf hin, dass möglicherweise die proteolytische Aktivität der Milchsäurebakterien und die dadurch entstandenen Peptide für die erhöhte antimutagene Wirkung von fermentierten Milchprodukten verantwortlich sind (57). In Milch erreichte das Wachstum von *B. longum* nach 18 Stunden 10^9 koloniebildende Einheiten/ml und nach 24 Stunden eine antimutagene Wirkung von 75 % gegenüber Trp-P1. Dagegen war beim Stamm PS^-, der keine Polysaccharide bildete, die maximale Wirkung nach 24 Stunden erreicht, das stärkste Wachstum aber erst nach 36 Stunden, während der Polysaccharid-bildende Stamm PS^+ dafür 48 Stunden benötigte. Die antimutagene Wirkung aller drei Stämme gegenüber Trp-P2 war etwas geringer als gegenüber Trp-P1 (52).

Extraktion des antimutagenen Prinzips mit Aceton oder Ethylacetat
Wie die Milch wurden auch Joghurt oder mit Milchsäurebakterien fermentierte Milch mit Aceton oder Ethylacetat behandelt. Der Einsatz dieser beiden Lösungsmittel geht auf Vorversuche von *Rao* et al. (58) zurück, die fanden, dass Aceton- oder Ethylacetatextrakte von fermentierter Milch antimutagene Aktivität aufwiesen. Acetonextrakte von Joghurt zeigten bei beiden eingesetzten *S. typhimurium*-Stämmen TA100 und TA97 gegenüber MNNG eine gleich starke antimutagene Wirkung, während gegenüber dem Mutagen DMAB der Stamm TA100 stärker gehemmt wurde als TA98, und gegenüber Methyl- und Ethylmethansulfonat sowie Aflatoxin AFB wiesen sie mit dem Testsystem *S. typhimurium* TA100 keine, gegenüber 1,2,7,8-Diepoxyoctan nur eine schwache und gegenüber DMAB, Trp-P2 und NQO dagegen eine starke antimutagene Wirkung auf (44), was für NQO die Befunde von *Bodana* und *Rao* (42) bestätigte. Mit *Saccharomyces cerevisiae* D7 (Trp^+- und Ile^+-Gen-Revertanten) waren Acetonextrakte von Joghurt gegenüber NQO zweimal und gegenüber MNNG 25-mal stärker antimutagen als Milch (44). Aceton- und Ethylacetatextrakte von mit *L. bulgaricus* und *Str. thermophilus* vergorener Magermilch verhinderten die mutagene Wirkung von 4-Nitro-chinolin-N-oxid und ω-Aminofluoren stärker als solche von Magermilch, die nur mit *Str. thermophilus* fermentiert wurde (42). Der Acetonextrakt von mit *L. helveticus* CH65, *L. acidophilus* B62FO4, *Str. salivarius* ssp. *thermophilus* CH3, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 191R vergorener Magermilch (43) sowie von mit *Str. thermophilus* CH3-fermentierter Milch (59) verminderte die mutagene Wirkung von MNNG und DMAB in Abhängigkeit der eingesetzten Menge des Extraktes (43) resp. reduzierte die durch MNNG-induzierte DNA-Schädigung (59).
Joghurt (44) wie auch mit *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 191R oder *Str. salivarius* spp. *thermophilus* vergorene Milch (43) wurden vor der Acetonextraktion und der Gefriertrocknung von pH 4 auf pH 3 oder 7,6 oder 13 eingestellt und die Hemmung der DMAB- und MNNG-induzierten Mutagenese miteinander verglichen. Die aus Joghurt extrahierte MNNG-spezifische Aktivität war gegenüber einer pH-Einstel-

lung unempfindlich, während die DMAB-spezifische Aktivität bei einem pH-Wert von 3 am stärksten war (44). Die bei pH 7,6 aus *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* vergorener Milch isolierte MNNG-spezifische Aktivität war deutlich schwächer als diejenige bei pH 3 und 13, während die pH-Einstellung die Hemmung gegenüber DMAB nicht beeinflusste (43).
Der in Wasser gelöste Acetonextrakt der Milch, die mit den drei oben erwähnten *B. longum*-Stämmen fermentiert wurde, zeigte eine geringere Hemmung gegenüber Trp-P1 als der in DMSO gelöste Acetonextrakt. Dabei fiel der Stamm PS^+ auf, dessen antimutagene Wirkung in dem in Wasser gelösten Acetonextrakt deutlich geringer war als bei der mit diesem Stamm fermentierten Milch. Es wird von den Autoren vermutet, dass diese Wirkung teilweise dem von diesem Stamm gebildeten, aber nicht durch Aceton extrahierten Polysaccharid zugesprochen werden muss. So zeigte eine Polysaccharidlösung von 60 ❐l eine 89 %ige Hemmung der Mutagenität von Trp-P1 (52).

In vivo-Versuche
Mit *L. acidophilus* LA-2 fermentierte Milch wurde sechs Versuchspersonen verabreicht und deren Kot mit dem Ames-Test getestet. Vor dem Verzehr betrug im Mittel die Anzahl der His+-Revertanten pro 100 g Kot 151,3 ± 100,2 und nach dem Verzehr 42,5 ± 12,5. Dies entspricht einer statistisch signifikanten ($p < 0,01$) Verminderung der Mutagenität um 71,9 % (Bereich 19,4 bis 90,6 %). Eine Analyse der bakteriellen Zusammensetzung der Darmflora zeigte eine signifikante Zunahme im Kot an Laktobazillen und Bifidobakterien (60). *Lidbeck* et al. (61) verabreichten elf Versuchspersonen gebratene Hamburger und in einer ersten Phase *Lc. cremoris*-fermentierte Milch sowie in einer zweiten Phase *L. acidophilus*-fermentierte Milch. Am dritten Tag der zweiten Phase wurde über die Feces und Urin eine um 47 % geringere Ausscheidung an mutagenen Substanzen festgestellt als am gleichen Tage der ersten Phase. Bei zehn gesunden Versuchspersonen, die gekochtes Hackfleisch verzehrten, war während des Verzehrs von mit Bifidobakterien gesäuerter Milch die Mutagenität in Urin tiefer als vor oder nach der Versuchsperiode (62). Da diese Resultate an wenigen Versuchspersonen gewonnen wurden, sind jedoch weitere Studien an Menschen erforderlich, die diese positiven Resultate bestätigen werden.

Käse

Käse hemmt die Wirkung von mutagenen Substanzen[8] aus mit Nitrit behandelten *Vicia faba* um 44 %. Wurde der Käse mit Leichtpetrol oder Leichtpetrol und Chloroform oder zusätzlich zu letzteren mit Methanol und Wasser extrahiert, erhöhte sich die Hemmung der mutagenen Wirkung auf 88 bis 91 % und erreichte damit den Wert des Kaseins (88 %). Käse scheint ein sehr wirkungsvoller Inhibitor der oben erwähnten Mutagenität zu sein, denn 62,5 mg gefriergetrockneter entfetteter Käse (entsprechend 150 mg Käse) hemmten die mutagene Wirkung von 62,5 mg gefriergetrockneten nitrierten Favabohnen (entsprechend 320 mg frische Bohnen). Die antimutagene Wirkung von Käse ist praktisch pH-unabhängig (66).
Unter neun Käsen wiesen Camembert, Blauschimmelkäse, Emmentaler, Gruyère und Pont l'Evèque gegenüber dem Trp-P1 eine stärkere antimutagene Wirkung auf als Cheddar, Gouda, Edamer und Parmesan. Camembert und Blauschimmelkäse erreichten bei einer Menge von 150 und 250 ml Käsesuspension[9]

[8]Bei dieser mutagenen Substanz soll es sich nach *Piacek-Llanes* und *Tannenbaum* (63) um N-Nitrosoharnstoff und nach *Yang* et al. (64) jedoch um 4-Chlor-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitroso-indolin-3-on-oxim handeln.
[9]Für die Herstellung dieser Käsesuspension wurden 2 g Käse in 98 g destilliertem Wasser homogenisiert (67).

eine 100 %ige Hemmung, während es bei den anderen Käsen bei einer solchen von 350 µl Käsesuspension die fogenden Werte ergab: Cheddar 69,8, Gouda 64,6, Edam 61,1, Parmesan 74,7, Emmental 89,3, Gruyère 100 und Pont-l'Evèque 93,0 % (67). Bei Camembert zeigte sich eine mit der Reifung ansteigende antimutagene Wirkung gegenüber dem Trp-P1. Bei einer Käsekonzentration von 1 % stieg diese von 18,5 % nach der ersten Woche auf 64,4 % nach der vierten Woche an, bei einer Käsekonzentration von 2 % war diese bei Beginn der Reifung bereits 91,1 % und erreichte nach drei Wochen Reifung 100 %. Diese Wirkung wird verschiedenen, während der Reifung entstandenen Hydrolyseprodukten des Kaseins wie auch den als Starterkulturen verwendeten Milchsäurebakterien zugeschrieben (67).
Verschiedene Käse wurden mit einer Mischung von Methanol-Wasser extrahiert und auf einer Ionenaustauschersäule gereinigt. Mit *Salmonella typhimurium*-Stämmen wurde die mutagene Wirkung sowie mit den rec- (*Bacillus subtilis* rec^+ und rec^-) und umu (biochemische Prophagen-Induktions)-Methoden die Genotoxizität dieses «Käseextraktes» ermittelt. Bei Gorgonzola, Pecorino Romano, Parmesan, Roquefort, Blauschimmelkäse, Stilton und Fourme d'Ambert war eine hohe Mutagenität (über 1000 revertante Kolonien) und Genotoxizität feststellbar, während sie für Gruyère, Cantal, Edamer, Neufchatel und Limburger mässig und für Rahm- und Hüttenkäse sowie Amsterdam, Camembert, Brie, Münster, Cheddar, Gouda und Emmentaler nicht vorhanden waren. Dabei hemmten Myristin- und Ölsäure die Mutagenität des «Käseextraktes», was mit der Interferenz der Fettsäuren bei der Aufnahme des Mutagens in die Zelle erklärt wird (68).

Kasein

Auch Kasein zeigt eine antimutagene Wirkung. Im Salmonella/Mikrosomen-Test erzeugte Natriumkaseinat bei 10 mg/Platte gegenüber der durch NQO (5 nmol/Platte)-induzierten Mutagenität eine Hemmung von etwa 40 % und gegenüber dem nitrosierten 4-Chlorindol (2 nmol/Platte) eine solche von etwa 70 % (23). Kasein (35, 65) wie auch ein Kasein/Laktose-Modellsystem (35) reduzierten die Mutagenität von NQO und MNNG, ebenso diejenige von N-Nitroso-Verbindungen (65) und von B[a]P (27). Gegenüber erhitztem Tauco war Natrium-

Tabelle 2
Prozentuale Hemmung der Mutagenität durch Kasein und Serumalbumin, unhydrolysiertes und Pepsin-hydrolysiertes Kasein

Protein	*Verwendetes Testsystem*	*Mutagen*	*Konzentration Protein*	*Prozentuale Hemmung unhydrolysiert*	*hydrolysiert*	*Lit.*
Kasein	SCA	NQO		78±13		(24)
Serumalbumin	SCA	NQO		94±9		(24)
Kasein	SCA	MNNG	0,12% (w/v)	40±6	61±6	(24)
		MNNG	0,23 %	63±12	73±1	(24)
		MNNG	0,58%	76±26	81±10	(24)
		MNNG	1,15%	83±24	84±2	(24)
Ca-Kaseinat	*E. coli* DNA-Reparatur	NQO	10 nmol/l	94±3	-	(23)
			20	57±11		
			30	21±4		
		B[a]P	0,5 pmol/l	71±19		(23)
			1	42±24		
			2	26±21		
		NMU	0,8 mmol/l	92±13		(23)
			2,4	71±10		
			4	65±8		

SCA = Schwester-Chromatid-Austausch
NOO=4-Nitrochinolin 1-oxid
MNNG = N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
B[a]P = Benzo[a]pyren
NMU = N-Nitroso-N-methylharnstoff

kaseinat nur schwach antimutagen und war bei gleicher Proteinmenge geringer als diejenige von Milch, gesäuerter oder fermentierter Milch (30). Nach *Vis* et al. (70) war Natriumkaseinat gegenüber MNNG im *E.coli*-Flüssig-Suspension-Test antimutagen. Gewisse Gewürze wie Pfeffer können gegenüber einem auf Streptomycin angewiesenen Stamm von *S. typhimurium* mutagen wirken. Mit Hilfe eines solchen Kurzzeitmutagenitätstests konnte von *Hosono* et al. (25) eine antimutagene Wirkung des Gesamtkaseins nachgewiesen werden. Unter den einzelnen Proteinen zeigte das β-Kasein die stärkste antimutagene Wirkung, gefolgt vom Rinderserumalbumin, Gesamtkasein und von α_{s1}-Kasein, während das κ-Kasein gegenüber der Kontrolle (Wasser-Pfeffer) nur eine geringe Aktivität aufwies (65).
Kasein hemmte den durch 4NQO- wie auch durch MNNG-induzierten Schwester-Chromatid-Austausch (24) (Tabelle 2). Im *E.coli*-DNA-Reparatur-Test verminderte sich die antimutagene Wirkung gegenüber NQO, B[a]P und NMU mit höherer Kaseinmenge (23).
Nach *Sasaki* et al. (70) stellt sich die Frage, ob die bei der Milch mit Hilfe des Ames-Testes festgestellte antimutagene Wirkung nicht auch mit der Anwesenheit von Histidin im Milchprotein zu erklären ist. Diese Autoren hatten jedenfalls festgestellt, dass die Anzahl der *S. typhimurium* TA100-Kolonien von der Menge an Kaseinpeptiden abhing und dass die gleiche Menge an Histidin, wie sie in diesen Peptiden vorhanden war, zu ähnlichen Resultaten führte**.** Die Resultate anderer Tests zeigen jedoch, dass eine antimutagene Wirkung von Milch, Milchprodukten und Milchinhaltsstoffen vorhanden ist. Auch haben eigene Untersuchungen (vB) gezeigt, dass nur bei einer starken Proteolyse der Milch das Histidin freigesetzt wird, denn im nativen Milchprotein liegt das Histidin nur gebunden vor.

Hitzebehandlung des Kaseins
Über den Einfluss der Erhitzung auf die antimutagene Aktivität von Kasein existieren widersprüchliche Resultate. Nach unseren Resultaten (vB) unterschied sich die Hemmung von auf 90, 100, 110, 120 und 130 °C während 10 min erhitztem Kasein gegenüber nitrosiertem 4-Chlorindol praktisch nicht von derjenigen von unerhitztem Kasein. Eine Erhitzung des Kaseins auf 130 °C während 0 bis 20 min erhöhte sie von unter 80 auf gegen 100% (23). Dies wurde auch von *Abdelali* et al. (27) für hitzebehandeltes Kasein (10 mg/100 ❑, 50, 70 und 95 °C während 15 min) mit der B[a]P-induzierten Mutagenese bei *S. typhimurium* TA98 bestätigt. Auch *Rogers* et al. (71) fanden keine mutagene Wirkung in einem neutralen und basischen, wässerigen System von Kasein und Laktose nach Erhitzen von 2 oder 6 Stunden unter Rückfluss, was auch von *Brands* et al. (41) für das bei 120 °C
während 20, 40 und 60 min erhitzte Gemisch von Kasein und Laktose bestätigt wurde. Dagegen führte eine Hitzebehandlung des Kaseins auf 121 °C während 15 Minuten zu einem Verlust der antimutagenen Aktivität, während eine solche bei 100 °C und 15 Minuten noch eine Wirkung von 30 % aufwies (25).
Da bei 180 °C während 2 Stunden erhitztes Kasein bei Ratten das Wachstum von aberrant crypt foci und damit von mit Azoxymethan verursachtem Dickdarmkrebs erhöhte (72), wurde vermutet, dass die Pyrolyse des Proteins zu mutagenen Substanzen führen kann. Doch wirkte in gleicher Art erhitztes Kasein mit den *S. typhimurium*-Stämmen TA98 und TA1538 mit oder ohne metabolischer Aktivierung nicht mutagen (73). Demgegenüber zeigte nach *Vis* et al. (69) erhitztes Ovalbumin (60 s bei 60, 90, 120 und 180 °C) eine antimutagene Wirkung gegenüber MNNG, nicht aber unerhitztes Ovalbumin, was mit der Denaturierung des Eiproteins und damit einer besseren Interaktion der mutagenen Substanz mit dem Protein erklärt werden kann.

Hydrolysiertes Kasein - Peptide
Die Inkubation von Kasein mit proteolytischen Enyzmen erzeugt verschiedene Peptide. Dabei wird dessen antimuta-

gene Aktivität mit steigender pepsininduzierter Hydrolyse erhöht. Gegenüber NaN_2 erhöht sie sich von unter 20 (Zeit 0) auf etwa 40 % nach 50 min. und gegenüber NQO von 10 auf unter 60 % nach 20 min. und auf etwa 50 % nach 50 min (23). Dass pepsinhydrolysiertes Natriumkaseinat im *E.coli*-DNA-Reparatur-Test die Antimutagenität erhöht, konnte auch von *Vis* et al. (69) bestätigt werden. Auch zeigte sich dies für hydrolysiertes Ovalbumin und Sojaprotein, wobei eine antimutagene Wirkung beim nativen Sojaprotein nicht und beim nativen Ovalbumin nur zu 15 % vorhanden war.
Nach einer Hydrolyse des Natriumkaseinates (Hydrolysierungsgrad: 22 %) erhöhte sich die antimutagene Wirkung deutlich gegenüber MNNG im *E. coli*-DNA-Reparatur-Test (69). Nach *Hosono* et al. (25) weist trypsinhydrolysiertes Kasein die gleiche antimutagene Aktivität wie unbehandeltes Kasein auf. Dagegen verliert vollständig hydrolysiertes Kasein seine Aktivität. Wurde das Kasein mit Säure oder mit Papain hydrolysiert, wurde keine antimutagene Wirkung mehr beobachtet (25).
Nach einer Fermentation der Milch mit *L. helveticus* während 24 Stunden bei pH 6,0 wurden die Milchproteine mit Ausschluss-HPLC fraktioniert und die dabei erhaltenen Peptide auf ihre antimutagene Aktivität gegenüber NQO getestet. Von den acht Hauptfraktionen zeigte die Fraktion 5 die höchste Aktivität. Diese Fraktion enthielt nach der Reinigung mit Umkehrphasen-HPLC vier Peptide, bei denen es sich um die Sequenzen 128 bis 130 (Thr-Leu-Thr), 177 bis 182 (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Glu) und 183 bis 188 (Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Glu) des β-Kaseins und um die Sequenz 124 bis 131 (Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Glu) des α-Kaseins handelte (57).

Bindung von mutagenen Substanzen durch Kasein
Gesamtkasein wie auch α_s-, β- und κ-Kasein sind in der Lage, in vitro mit den mutagenen heterozyklischen Aminen Trp-P1, Trp-P2 und Glu-P1 eine Bindung einzugehen (74, 75). Dabei zeigte sich eine deutliche pH-Wirkung. Unterhalb eines pH-Wertes von 6,5 wurde die Bindung gegenüber Trp-P1 und Trp-P2 gehemmt und zeigte sich bei einem solchen von über 7,4 am stärksten. Gegenüber Glu-P1 war die Bindung zwischen pH 6,5 und 7,4 am stärksten und über pH 8,4 wie auch unter pH 5,5 minimal (74).

Verdauung
Kasein, verabreicht an Mäuse, verminderte die mutagene Aktivität von MNNG im Zwölffingerdarm, Jejunum, Caecum und Colon im Gegensatz zur Kontrolldiät und zum Sojaprotein. Wurde MNNG oral verabreicht, wurde im Magen keine schützende Wirkung festgestellt. Bei intraperitonealer Verabreichung von MNNG war die Mutagenität im Colon signifikant erhöht. Im weiteren wurden in den Inhalten der oben erwähnten Organe von mit Kasein und Sojaprotein gefütterten Mäusen mit Ausnahme des Magens eine starke Antimutagenität festgestellt (76, 77).

Molkenproteine

Rinderserumalbumin (Teil der Molkenproteine, Gehalt = 6 % der gesamten Molkenproteine) hemmte den durch NQO-induzierten Schwester-Chromatid-Austausch, dagegen wirkten aber das gesamte Molkenprotein und das β-Laktoglobulin in diesem Test nicht (24) (Tabelle 2). Im Kurzzeitmutagenitätstests konnte von *Hosono* et al. (25) keine antimutagene Wirkung von Molke gefunden werden, dagegen von *Jongen* et al. (65) eine solche von 46 % für Molkenprotein, vergleichbar mit derjenigen von Käse. Dabei betrug sie für Molkenprotein 63 % bei pH 2 und unter 40 % bei den pH-Werten 3, 4 und 5. Denaturiertes Molkenprotein wies dagegen bei pH 2 und 3 keine antimutagene Wirkung auf, wohl aber bei pH 4 und 5 eine solche von 25 und 40 %.
In vitro binden β-Laktoglobulin und α-Laktalbumin die drei mutagenen Substanzen Trp-P1, Trp-P2 und Glu-P1.

Dabei zeigte sich beim β-Laktoglobulin eine pH-Abhängigkeit. Trp-P1 wurde oberhalb eines pH-Wertes von 6,5 zu mehr als 90 % und Trp-P2 oberhalb von pH 7,4 zu mehr als 70 % gebunden. Maximal war die Bindung mit Glu-P1 bei pH 7,4 (78). Dagegen band nach einer anderen Mitteilung der gleichen Arbeitsgruppe (75) α-Laktalbumin Trp-P1 nicht. Weitere Molkenproteine wie Laktoperoxidase und Laktoferrin waren dazu jedoch in geringem Masse in der Lage. Es ist möglich, dass sich die heterozyklischen Amine mit der Thiolgruppe der Molkenproteine verbinden. β-Laktoglobulin besitzt zwei S-S-Bindungen des Cystins und eine freie Sulfhydrylgruppe und α-Laktalbumin vier S-S-Bindungen, aber keine freie Sulfhydrylgruppe (79). In letzterem Falle müssten die S-S-Bindungen des α-Laktalbumins reduziert werden.

Fette und Fettsäuren

Magermilch und Milch mit reduziertem Fettgehalt hemmten die durch B[a]P-induzierte Mutagenese mit 69 und 66 % (27). Damit scheint Milchfett keine antimutagene Wirkung aufzuweisen, was auch von *Pool-Zobel* et al. (45) bestätigt wurde. Dagegen wirkten Hexanextrakte von lipasebehandelter Milch in Abhängigkeit der eingesetzten Lipase antimutagen (80).
Unter vier organischen Säuren wirkte die Buttersäure gegenüber acht verschiedenen mutagenen Substanzen (gegenüber NQO, MNNG, Nitrofluoren, 4-Nitro-O-phenylendiamin mehr als 60 %) am stärksten antimutagen, während Essigsäure (gegenüber NQO und Nitrofluoren mehr als 60 %) höhere antimutagene Aktivitäten aufwies als Milch- (gegenüber NQO etwa 90 %) und Brenztraubensäure (81). Auch wird der Buttersäure zugesprochen, dass sie präventiv gegenüber Dickdarmkrebs wirkt (82) und in der Leber als eine wirkungsvolle, apoptoseinduzierende Substanz angesehen werden kann (83). Deren Einsatz zur Behandlung von Dickdarmkrebs wird bereits erwogen (84).

Die konjugierten Linolsäuren (CLA), die antikarzinogen wirken (85), weisen bei Konzentrationen bis zu 1 □g/ml keine Wirkung gegenüber einer durch MNNG- oder DMAB-induzierten Mutagenese auf (44) und auch nicht gegenüber 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin (IQ) (86). Doch konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass CLA die DNA-Addukt-Bildung mit IQ (87, 88) und PhIP (89) verhindert. Ursprünglich haben *Pariza* et al. (90, 91) in gebratenem Hackfleisch einen antimutagenen Faktor gefunden, der in der Folge als CLA identifiziert werden konnte (92, siehe auch 93). Diese Substanz wurde dann von der gleichen Arbeitsgruppe (94) auch im Milchfett nachgewiesen und ihre Anwesenheit im Milchfett von anderen Autoren mehrmals bestätigt (95-97).
Aus dem Acetonextrakt von Joghurt wurde eine anti-MNNG-Aktivität isoliert, die massenspektrometrisch als Palmitinsäure identifiziert wurde (98, 99). Die antimutagene Aktivität korreliert mit der Konzentration an freier Palmitinsäure in Joghurt (80). In diesen Untersuchungen wurden neben der Palmitinsäure noch verschiedene andere Fettsäuren auf eine Wirkung gegenüber einer MNNG-induzierten Mutagenese untersucht. Dabei zeigte die Isopalmitinsäure gegenüber 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen und NQO (99) wie auch gegenüber MNNG eine stärkere antimutagene Wirkung als die Palmitinsäure (98). Ausgehend vom Modell, dass die freie Palmitinsäure oder die freie Palmitin- und Stearinsäure die einzigen antimutagenen Substanzen in diesen Extrakten waren, zeigte sich zwischen der beobachteten und der erwarteten Hemmung der durch MNNG-induzierten Mutagenese eine gute Übereinstimmung (80). Dagegen hemmten weder Palmitin- noch Isopalmitinsäure die DNA-schädigende Wirkung von MNNG (59). Ob diese Befunde von praktischem Interesse sind, bedarf weiterer Untersuchungen, da der Gehalt der Milch an freien Fettsäuren nur gering ist und zudem Palmitinsäure nicht wasserlöslich ist. So erhöhte sich gegenüber der Ausgangsmilch die freie Palmitinsäure in mit *L. delbrueckii* ssp.

bulgaricus fermentierter Milch um 6,8 % (100) und in Joghurt um 5,6 % (101). Im getrocknetem Hexanextrakt von Joghurt fand sich freie Palmitinsäure in einer Konzentration von 17,1 gegenüber 7,9 mg/100 g in Milch (80).

Mineralstoffe

Da Kasein in der gleichen Menge, wie in der Milch vorhanden, nicht die gleiche antimutagene Hemmung bewirkte, haben *Abdelali* et al. (27) mit Calcium als weiterem Inhaltsstoff der Milch experimentiert. Calciumphosphat verminderte die durch B[a]P-induzierte Mutagenese bei 0,1 mg/100 µl um 22 % und bei 0,4 mg/100 µl auf 42 %. Sie schliessen daraus, dass die gesamte antimutagene Wirkung der Magermilch der zusätzlichen Aktivität von Kasein und Calcium entspricht.

Schlussfolgerung

Verschiedene Untersuchungen zeigen in vitro eine neue funktionelle Eigenschaft von Milch, Sauermilchprodukten und Käsen auf. Unter den Milchinhaltsstoffen weisen vor allem die Milchproteine und gewisse Fettsäuren eine antimutagene Wirkung auf. Trotz der wenigen Versuche ist anzunehmen, dass in vivo Sauermilchprodukte ebenfalls antimutagen wirken. Nach *Cassand* et al. (26) könnte mit drei Hypothesen die antimutagene Wirkung von Milch und Sauermilchprodukten erklärt werden. Deren Inhaltsstoffe könnten als abfangende Substanzen die Verfügbarkeit von genotoxischen Agentien verhindern oder eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung von indirekt wirkenden Mutagenen ausüben. In Sauermilchprodukten könnte die antimutagene Wirkung den Milchsäurebakterien zugeschrieben werden. Es ist möglich, dass die Milchproteine oder während der Vergärung entstandene Peptide mutagene heterozyklische Amine binden. Die resultierenden Reaktionsprodukte sind nicht mehr mutagen und werden dann über den Dickdarm ausgeschieden. *Bosselaers* et al. (24) spekulieren, dass die beiden antimutagenen Proteine Kasein und Serumalbumin als blockierende Agentien wirken, indem sie Interaktionen mit dem Mutagen eingehen. Nach *Nadathur* et al. (102) bestehen zwei Möglichkeiten, die Rolle der Sauermilchprodukte hinsichtlich ihrer antimutagenen Wirkung zu erklären. Inaktive Milchbestandteile können durch die Wirkung von Milchsäurebakterien in Antimutagene umgewandelt werden oder die Milch dient als neutrales Substrat für die Milchsäurebakterien, die während ihres Wachstums Antimutagene bilden oder mutagene Substanzen binden. Die in unvergorener Milch festgestelllte antimutagene Wirkung kann mit der pH-abhängigen Bindung der mutagenen heterozyklischen Amine durch das Kasein erklärt werden.

Zusammenfassung

Verschiedene Substanzen in Lebensmitteln können im genetischen Material Mutationen verursachen. Daneben kommen in Lebensmitteln auch antimutagen wirkende Substanzen vor. Erkenntnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Milch, Sauermilchprodukte und Käse sowie Milchproteine antimutagen wirken können. Die bei der Milch festgestellte Wirkung ist dem Milchprotein zuzuschreiben. Bei den Sauermilchprodukten kommt daneben der Anwesenheit der dabei eingesetzten Milchsäurebakterien eine zusätzliche Rolle zu.

Résumé

Différentes substances contenues dans les aliments peuvent modifier le matériel génétique et provoquer ainsi une mutation. En outre, il y a également dans les aliments des substances qui agissent en tant qu'antimutagènes. Les découvertes de ces dernières années ont démontré que le lait, les produits laitiers fermentés, le fromage ainsi que

les protéines de lait peuvent également avoir des effets antimutagènes. Les effets constatés avec le lait sont à mettre sur le compte de la protéine lactique. En ce qui concerne les produits laitiers fermentés, les bactéries lactiques sont non seulement présentes mais elles ont en plus un effet antimutagène.

Summary «Antimutagenic Activity of Dairy Products and of Bacteria used in Dairy Industry. Part 1. Milk, Fermented Dairy Products and Milk Components»

Different substances in food are able to induce mutations. In addition, the presence of substances in foods acting as antimutagens has been detected. Findings made in recent years have shown that milk, fermented dairy products and cheese as well as milk proteins may have an antimutagenic effect. The antimutagenic effect of milk is to be attributed mainly to milk protein. As regards to the fermented dairy products, the presence of the used lactic acid bacteria is an additional factor.

Key words

Antimutagenicity, Milk, Yogurt, Cheese, Casein, Whey protein

Literatur

1 *Zeiger, E.*: Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. Cancer Res. **47**, 1287-1296 (1987).

2 *Glatt, H.R.*: Ernährung und Krebs aus der Sicht des Toxikologen. Jahresbericht 1995, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, BKB Verlag Köln Berlin, 82-96 (1996).

3 *Uhde, W.-J.* und *Macholz, R.*: Mutagene Substanzen in Aminosäure- und Proteinpyrolysaten sowie hitzebehandelten Lebensmitteln. Nahrung **30**, 59-73 (1986).

4 *Nagao, M.* and *Sugimura, T.*: Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. Mutat.Res. **290**, 43-51 (1993).

5 *White, R.D., Krumperman, P.H., Cheeke, P.R., Deinzer, M.L.* and *Buhler, D.R.*: Mutagenic responses of tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) plant, pyrrolizidine alkaloids and metabolites in goat milk with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. J. Anim. Sci. **58**, 1245-1254 (1984).

6 *Sieber, R.* und *Blanc, B.*: Zur Ausscheidung von Aflatoxin M_1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten - eine Literaturübersicht. Mitt.Geb.Lebensm.Hyg. **69**, 477-491 (1978).

7 *Jorgensen, K.V., Park, D.L., Rua, S.M.* and *Price, R.L.*: Reduction of mutagenic potentials in milk: effects of ammonia treatment on aflatoxin-contaminated cottonseed. J. Food Protect. **53**, 777-778 (1990).

8 *Augustsson, K., Lindblad, J., Övervik, E.* and *Steineck, G.*: A population-based dietary inventory of cooked meat and assessment of the daily intake of food mutagens.

Food Addit. Contam. **16**, 215-225 (1999).
9 *Bronzetti, G.*: Antimutagens in food. Trends Food Sci. Technol. **5**, 390-395 (1994).
10 *de Flora, S.*: Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. **402**, 151-158 (1998).
11 *Arimoto-Kobayashi, S., Sugiyama, C., Harada, N., Takeuchi, M., Takemura, M.* and *Hayatsu, H.*: Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. J. Agric. Food Chem. **47**, 221-230 (1999).
12 *Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S.* and *Seeger, K.*: In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. Food Chem. Toxicol. **32**, 443-459 (1994).
13 *Ekasari, I., Jongen, W.M.F.* and *Pilnik, W.*: Antimutagenic effects of apple juices: interference with heat load measurement by microbiological methods. J. Food Sci. **55**, 1026-1028 (1990).
14 *Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z.-L.* and *Hosoda, H.*: Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. Agr. Biol. Chem. **52**, 1369-1375 (1988).
15 *Tang, X.* and *Edenharder, R.*: Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. Food Chem. Toxicol. **35**, 373-378 (1997).
16 *Stavric, B., Matula, T.I., Klassen, R.* and *Downie, R.H.*: The effect of teas on the in vitro mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines. Food Chem. Toxicol. **34**, 515-523 (1996).
17 *Cizmarik, J.* and *Lahitova, N.*: Antimutagenicity of propolis. Pharmazie **53**, 883-884 (1998).
18 *Yamada, J.* and *Tomita, Y.*: Antimutagenic activity of water extracts of black tea and oolong tea. Biosci. Biotechnol. Biochem. **58**, 2197-2200 (1994).
19 *Yen, G.C.* and *Chen, H.Y.*: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. **43**, 27-32 (1995).
20 *Kuroda, Y.* and *Hara, Y.*: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. Mutat. Res. **436**, 69-97 (1999).
21 *Ames, B.N., McCann, J.* and *Yamasaki, E.*: Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res. **31**, 347-364 (1975).
22 *Maron, D.M.* and *Ames, N.B.*: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. **113**, 172-215 (1983).
23 *van Boekel, M.A.J.S., Weerens, C.N.J.M., Holstra, A., Scheidtweiler, C.E.* and *Alink, G.M.*: Antimutagenic effects of casein and its digestion products. Food Chem. Toxicol. **31**, 731-737 (1993).
24 *Bosselaers, I.E.M., Caessens, P.W.J.R., van Boekel, M.A.J.S.* and *Alink, G.M.*: Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. Food Chem. Toxicol. **32**, 905-909 (1994).
25 *Hosono, A., Shashikanth, K.N.* and *Otani, H.*: Antimutagenic activity of whole casein on the pepper-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA 98. J. Dairy Res. **55**, 435-442 (1988).
26 *Cassand, P., Abdelali, H., Bouley, C., Denariaz, G.* and *Narbonne, J. F.*: Inhibitory effect of dairy products on the mutagenicities of chemicals and dietary mutagens. J. Dairy Res. **61**, 545-552 (1994).

27 *Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Koch-Bocabeille, B.* and *Narbonne, J.F.*: Antimutagenicity of components of dairy products. Mutat. Res. **331**, 133-141 (1995).

28 *Surono, I.S*. and *Hosono, A.*: Bacterial mutagenicity of terasi and antimutagenicity of Indonesian jasmine tea against terasi. Int. J. Food Microbiol. **32**, 49-58 (1996).

29 *Surono, I.S.* and *Hosono, A.:* Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from Dadih against mutagenic Terasi. Milchwissenschaft **51**, 493-497 (1996).

30 *Usman* and *Hosono, A.*: Desmutagenicity of milk cultured with *Lactobacillus acidophilus* strains against mutagenic heated tauco. Food Chem. Toxicol. **36**, 805-810 (1998).

31 *Usman* and *Hosono, A.*: Viability of *Lactobacillus gasseri* and its cholesterol-binding and antimutagenic activities during subsequent refrigerated storage in nonfermented milk. J. Dairy Sci. **82**, 2536-2542 (1999).

32 *Yamada, M., Nakazawa, Y*. and *Hosono, A.*: (Mutagenicity of "So", a heat concentrated and coagulated milk product). Jap. J. Dairy Food Sci. **41**, A-127-A-131 (1992), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. **55**, 170 (1993).

33 *Green, M., Ben-Hur, E., Riklis, E., Gordin, S.* and *Rosenthal, I.*: Application of mutagenicity test for milk. J. Dairy Sci. **63**, 358-361 (1980).

34 *Sekizawa, J.* and *Shibamoto, T.*: Salmonella/microsome mutagenicity tests of heat-processed milk samples. Food Chem. Toxicol. **24**, 987-988 (1986).

35 *Berg, H.E., van Boekel, M.A.J.S.* and *Jongen, W.M.F*.: Heating milk: a study on mutagenicity. J. Food Sci. **55**, 1000-1003 (1990).

36 *Hosono, A., Usman* and *Ohba, R.*: Inhibitory activity of Maillard reaction products against Trp-P1-induced mutagenicity to the *Salmonella typhimurium* TA 98 streptomycin-dependent strain assayed in the absence of S-9 mix. Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**, 424-426 (1997).

37 *Usman* and *Hosono, A.*: Antimutagenic activity of Maillard reaction products against mutagenic heated tauco. Ital. J. Food Sci. **9**, 267-276 (1997).

38 *Yen, G.-C.* and *Lii, J.-D.*: Antimutagenic effect of Maillard reaction products prepared from glucose and tryptophan. J. Food Protect. **55**, 615-619 (1992).

39 *Yen, G.-C., Tsai, L.-C.* and *Lii, J.-D.*: Antimutagenic effect of Maillard browning products obtained from amino acids and sugars. Food Chem. Toxic. **30**, 127-132 (1992).

40 *Hosono, A.* and *Shirai, H.*: Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against the heated solution of cysteine-glucose. Anim. Sci. Technol. **67**, 1076-1081 (1996).

41 *Brands, C.M.J., Alink, G.M., van Boekel, M.A.J.S.* and *Jongen, W.M.F.*: Mutagenicity of heated sugar - casein systems: Effect of the Maillard reaction. J. Agric. Food Chem. **48**, 2271-2275 (2000).

42 *Bodana, A.R.* and *Rao, D.R.:* Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Sci. **73**, 3379-3384 (1990).

43 *Nadathur, S.R., Gould, S.J.* and *Bakalinsky, A.T*.: Antimutagenicity of fermented milk. J. Dairy Sci. **77**, 3287-3295 (1994).

44 *Nadathur, S.R., Gould, S.J.* and *Bakalinsky, A.T.*: Antimutagenicity of an acetone extract of yogurt. Mutat. Res. **334**, 213-224 (1995).

45 *Pool-Zobel, B.L., Münzner, R.* und *Holzapfel, W.H*.: Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* mutagenicity assay. Nutr. Cancer **20**, 261-270 (1993).

46 *Hosono, A., Kashina, T.* and *Kada, T.*: Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. J. Dairy Sci. **69**, 2237-2242 (1986).

47 *Renner, H.W.* and *Münzner, R.*: The possible role of probiotics as dietary antimutagens. Mutat. Res. **262**, 239-245 (1991).
48 *Hosono, A., Sagae, S.* and *Tokita, F.*: Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp-hcr-. Milchwissenschaft **41**, 142-145 (1986).
49 *Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M.* and *Hosono, A.*: Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P2-induced mutagenicity to TA98 strain of *Salmonella typhimurium*. J. Dairy Res. **59**, 543-549 (1992).
50 *Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M.* and *Hosono, A.*: Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Dairy Sci. **75**, 976-981 (1992).
51 *Hosoda, M., Hashimoto, H., Hiramatsu, M., Morita, H.* and *Hosono, A.*: Inhibitory effect of milk cultured with *Lactobacillus acidophilus* LA106 (LA2) on the mutagenicity of aflatoxin B_1. Jap. J. Dairy Food Sci. 42, A-1-A-5 (1993), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. **55**, 701 (1993).
52 *Sreekumar, O.* and *Hosono, A.*: The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. Can. J. Microbiol. **44**, 1029-1036 (1998).
53 *Nakajima, H.*: Characteristics of fermented milk produced by slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Snow Brand R & D Rep. **104**, 97-169 (1995).
54 *Belicova, A., Krajcovic, J., Dobias, J.* and *Ebringer, L.*: Antimutagenicity of milk fermented by *Enterococcus faecium*. Folia Microbiol. **44**, 513-518 (1999).
55 *Tamai, Y., Oishi, H., Nakagawa, I., Watanabe, Y., Shinmoto, H., Kuwabara, Y., Yamato, K.* and *Nagai, S.*: Antimutagenic activity of the milk fermented by mixed-cultured with various lactic acid bacteria and a yeast. J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. **42**, 383-387 (1995).
56 *della Croce, C., Morichetti, E., Bronzetti, G., Salvadori, C.* and *Macri, E.*: Antimutagenic investigations on commercial yogurt. In Bronzetti, G., Hyatsu, H., de Flora, S., Waters, M.D., Shankel, D.M.: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms, III. Plenum Press, New York (1993) 119-125.
57 *Matar C., Nadathur S.S., Bakalinsky A.T.* and *Goulet J.*: Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. J. Dairy Sci. **80**, 1965-1970 (1997).
58 R*ao, D.R., Pulusani, S.R., Sharma, C.* and *Reddy, B.S.*: Antimutagenic activity of fermented milk. Fed. Proc. **44**, 521 (1985).
59 *Wollowski, I., Ji, S.T., Bakalinsky, A.T., Neudecker, C.* and *Pool-Zobel, B.L.:* Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. J. Nutr. **129**, 77-82 (1999).
60 *Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Morita, H.* and *Hosono, A.*: Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. J. Dairy Sci. **79**, 745-749 (1996).
61 *Lidbeck, A., Övervik, E., Rafter, J., Nord, C.E.* and *Gustafsson, J.-A.*: Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. Microb. Ecol. Health Dis. **5**, 59-67 (1992).
62 *Asahara, T., Shimizu, K., Ohashi, Y., Matsuki, T., Matsumoto, K., Takada, T., Yuki, N., Takayama, H.* and *Tanaka, R.*: The effects of Bifidobacteria-fermented milk on human urinary mutagenicity, which increases following ingestion of

cooked ground beef. J. Intestinal Microbiol. **12**, 89-96 (1998), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. **61**, 538-539 (1999).

63 *Piacek-Llanes, B.G.* and *Tannenbaum, S.R.*: Formation of an activated N-nitroso compound in nitrite-treated fava beans (*Vicia faba*). Carcinogenesis **3**, 1379-1384 (1982).

64 *Yang, D., Tannenbaum, S.R., Büchi, G.* and *Lee, G.C.*: 4-Chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitroso-indolin-3-one oxime) that forms during nitrosation of the fava bean (Vicia faba). Carcinogenesis **5**, 1219-1224 (1984).

65 *Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S.* and *van Broekhoven, L.W.*: Inhibitory effect of cheese and some food constituents on mutagenicity generated in *Vicia faba* after treatment with nitrite. Food Chem.Toxic. **25**, 141-145 (1987).

66 *Yamada, M., Nakazawa, Y.* and *Hosono, A.*: Desmutagenicity of commercial cheese against the Trp-P1-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA 98. Anim. Sci. Tech. **69**, 359-364 (1998).

67 *Yamada, M., Nakazawa, Y., Tsukasaki, F.* and *Hosono, A.*: Antimutagenic activity of camembert cheese on the Trp-P-1-induced mutagenicity to streptomycin-dependent strain SD510 of *Salmonella typhimurium* TA98. Int. Dairy J. **7**, 795-798 (1997).

68 *Yamaguchi, T.:* Mutagenic activity of various kinds of cheese on the Ames, rec and umu assays. Mutat. Res. **224**, 493-502 (1989).

69 *Vis, E.H., Plinck, A.F., Alink, G.M.* and *van Boekel, M.A.J.S.*: Antimutagenicity of heat-denatured ovalbumin, before and after digestion, as compared to caseinate, BSA, and soy protein. J. Agric. Food Chem. **46**, 3713-3718 (1998).

70 *Sasaki, I., Uchiwa, H*. and *Murakami, U.*: Effects of histidine on the mutagenicity of casein tryptic peptides as food ingredient. Jap. J. Toxicol. Environm. Hlth. **38**, 295-299 (1992), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. **55**, 297 (1993).

71 *Rogers, A.M.* and *Shibamoto, T.*: Mutagenicity of the products obtained from heated milk systems. Food Chem. Toxicol. **20**, 259-263 (1982).

72 *Corpet, D.E., Stamp, D., Medline, A., Minkin, S., Archer, M.C.* and *Bruce, W.R.*: Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar or cooked casein and fat. Cancer Res. **50**, 6955-6958 (1990).

73 *Corpet, D. E*. and *Cassand, P*.: Lack of aberrant crypt promotion and of mutagenicity in extracts of cooked casein, a colon cancer-promoting food. Nutr. Cancer **24**, 249-256 (1995).

74 *Yoshida, S.* and *Ye-Xiuyun*: The binding ability of bovine milk caseins to mutagenic heterocyclic amines. J. Dairy Sci. **75**, 958-961 (1992).

75 *Yoshida, S., Ye-Xiuyun* and *Nishiumi, T.*: Binding ability of bovine milk protein to mutagenic heterocyclic amine of 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. J. Fac. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ. **30**, 123-127 (1991).

76 *Goeptar A.R., Koeman J.H., van Boekel M.A.J.S.* and *Alink G.M.*: Impact of digestion on the antimutagenic activity of the milk protein casein. Nutr. Res. **17**, 1363-1379 (1997).

77 *van Boekel, M.A.J.S., Goeptar, A.R.* and *Alink, G.M.*: Antimutagenic activity of casein against MNNG in the *E.coli* DNA repair host-mediated assay. Cancer Lett. **114**, 85-87 (1997).

78 *Yoshida, S.* and *Ye-Xiuyun, Nishiumi, T.*: The binding ability of α-lactalbumin and β-lactoglobulin

to mutagenic heterocyclic amines. J. Dairy Sci. **74**, 3741-3745 (1991).
79 *Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrel, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R.* and *Whitney, R.McL.*: Nomenclature of proteins of cow`s milk: fifth revision. J. Dairy Sci. **67**, 1599-1631 (1984).
80 *Nadathur, S.R., Zhou, L., Lowry, R.R.* and *Bakalinsky, A.T.*: Effects of hydrolysis of milk glycerides on the antimutagenicity of a hexane extract of milk. J. Dairy Sci. **81**, 664-671 (1998).
81 *Lankaputhra, W.E.V.* and *Shah, N.P.*: Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. Mutat. Res. **397**, 169-182 (1998).
82 *Smith, J.G.* and *German, J.B.*: Molecular and genetic effects of dietary derived butyric acid. Food Tech. **49**, 87-90 (11) (1995).
83 *Watkins, S.M., Carter, L.C., Mak, J., Tsau, J., Yamamoto, S.* and *German, J.B.*: Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells. J.Dairy Res. **66**, 559-567 (1999).
84 *Pouillart, P.R.*: Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and hemoglobinopathies. Life Sci. **63**, 1739-1760 (1998).
85 *O'Shea, M., Lawless, F., Stanton, C.* and *Devery, R.*: Conjugated linoleic acid in bovine milk fat: a food-based approach to cancer chemoprevention. Trends Food Sci.Tech. **9**, 192-196 (1998).
86 *Liew, C., Schut, H.A.J., Chin, S.F., Pariza, M.W.* and *Dashwood, R.H.* Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. Carcinogenesis **16**, 3037-3043 (1995).
87 *Zu, H.X.* and *Schut, H.A.*: Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA adduct formation in CDF1 mice by heat-altered derivatives of linoleic acid. Food Chem. Toxicol. **30**, 9-16 (1992).
88 *Schut, H.A.* and *Zu, H.X.*: Application of the 32P-postlabelling assay to the inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA adduct formation by dietary fatty acids. IARC Sci Publ. 181-188 (124) (1993).
89 *Josyula, S., He, Y.H., Ruch, R.J.* and *Schut, H.A.*: Inhibition of DNA adduct formation of PhIP in female F344 rats by dietary conjugated linoleic acid. Nutr. Cancer **32**, 132-138 (1998).
90 *Pariza, M.W., Ashoor, S.H., Chu, F.S.* and *Lund, D.B.*: Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. Cancer Lett. **7**, 63-69 (1979).
91 *Pariza, M.W., Loretz, L.J., Storkson, J.M.* and *Holland, N.C.*: Mutagens and modulator of mutagenesis in fried ground beef. Cancer Res. **43**, 2444s-2446s (1983).
92 *Ha, Y.L., Grimm, N.K.* and *Pariza, M.W.*: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis **8**, 1881-1887 (1987).
93 *Kritchevsky, D.*: Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. Brit. J. Nutr. **83**, 459-465 (2000).
94 *Ha, Y.L., Grimm, N.K.* and *Pariza, M.W.*: Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. J. Agric. Food Chem. **37**, 75-81 (1989).
95 *Fritsche, J.* and *Steinhart, H.*: Analysis, occurrence, and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) - a review. Fett **100**, 190-210 (1998).
96 *Precht, D.* and *Molkentin, J.*: Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further cis-/trans-isomers of C18 : 1 and C18 : 2 in bovine milk fat. Kiel. Milchwirt. Forschungsber. **51**, 63-78 (1999).

97 *Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Bosset, J.O.* and *Jeangros, B.*: Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cow's milk fat produced in low- and high-land regions. J.Dairy Res. **68**, 519-523 (2001).
98 *Bakalinsky, A.T., Nadathur, S.R., Carney, J.R.* and *Gould, S.J.*: Antimutagenicity of yogurt. Mutat. Res. **350**, 199-200 (1996).
99 *Nadathur, S.R., Carney, J.R., Gould, S.J.* and *Bakalinsky, A.T.*: Palmitic acid is the major fatty acid responsible for significant anti-N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) activity in yogurt. Mutat. Res. **359**, 179-189 (1996).
100 *Rao, D.R.* and *Reddy, J.C.*: Effect of lactic fermentation of milk on milk lipids. J. Food Sci. 49, 748-750 (1984).
101 *Rasic, J.L.* and *Vucurovic, N.*: Untersuchung der freien Fettsäuren in Joghurt aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch. Milchwissenschaft **28**, 220-222 (1973).
102 *Nadathur, S.R., Gould, S.J.* and *Bakalinsky, A.T.*: Antimutagenicity of fermented milk. J. Dairy Sci. **77**, 3287-3295 (1994).

Teil 2. Milchsäurebakterien und andere Bakterien

R. Sieber
Eidgenössische Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft (FAM),
Liebefeld, CH-3003 Bern

Martinus A. J. S. van Boekel
Food Science Group
Wageningen University,
Wageningen

Eingegangen am
15. November 2000,
angenommen am
9. März 2001

Einleitung

Im ersten Teil wurde über die antimutagene Wirkung von Milch, Milchinhaltsstoffen, Sauermilchprodukten und Käse berichtet (1). Es zeigte sich, dass die in der Milch festgestellte antimutagene Wirkung hauptsächlich dem Protein zugeschrieben werden muss. Bei den fermentierten Milchprodukten ist diese Eigenschaft teilweise auf das Protein, aber auch auf die Anwesenheit der Milchsäurebakterien zurückzuführen. Dieser zweite Teil fasst die Ergebnisse über die antimutagene Wirkung dieser Bakterien sowie von Bifidobakterien, Propionsäurebakterien und Enterokokken zusammen.

Nachweis des Bindungsverhaltens gegenüber mutagenen Substanzen

Neben dem in Teil 1 (1) beschriebenen *Salmonella typhimurium*-Mutagenitäts-Test nach Ames wird auch in vitro das Bindungsverhalten von Zellen gegenüber mutagenen Substanzen untersucht. Dabei werden lyophilisierte Zellen mit Wasser und einer bestimmten Menge an einer mutagenen Substanz suspendiert und bei 37 °C während 15 oder 30 Minuten inkubiert. Danach wird die Lösung zentrifugiert und durch einen Mikrofilter filtriert oder ultrafiltriert. Das Filtrat wird mit der gleichen Menge an Acetonitril versetzt und dann mit HPLC aufgetrennt. Damit wird der Anteil an mutagener Substanz, der ungebunden ist, bestimmt, woraus sich die prozentuale Bindung berechnen lässt.

Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien werden bei der Vergärung verschiedener Lebensmittel eingesetzt. Sie tragen wesentlich dazu bei, dass solche Produkte länger haltbar sind. Daneben wird ihrem Vorhandensein verschiedene gesundheitliche Vorteile zugesprochen (Laktoseintoleranz, Vermeidung von Diarrhö u.a.). Verschiedene Milchsäurebakterienstämme werden auch als probiotische Bakterien eingesetzt (2,3).

Wirkungen der Milchsäurebakterien im Mutagenitäts-Test

Für den Nachweis einer antimutagenen Wirkung von Milchsäurebakterien wird ebenfalls der Mutagenitäts-Test nach Ames eingesetzt. Verschiedene Milchsäurebakterien, die aus fermentierter Milch oder Lebensmitteln isoliert wurden oder aus Kultursammlungen stammen, wiesen in diesem Test unterschiedliche antimutagene Wirkungen gegenüber verschiedenen mutagenen Substanzen[1] auf (Tabelle 1). Unter sechs *Lactobacillus* (L.) *acidophilus*-Stämmen hatte der Stamm Nr. 2400 eine antimutagene Wirkung von >50 % gegenüber MNNG, NF[2], NPD[2], NQO[2], AFB_1, AMIQ und von <30 % gegenüber AMPIP und AMPI, während der Stamm Nr. 2415 gegenüber diesen mutagenen und promutagenen Substanzen schwach antimutagen war (zum Teil deutlich unter 40 %). Wie der erste Stamm waren auch die vier anderen Stämme gegenüber NF sehr wirksam (zwischen ~75 und 95 %), jedoch teilweise nicht gegenüber MNNG (Abbildung 1) und NQO (12). Bei 28 *L. gasseri*-Stämmen lag die antimutagene Wirkung gegenüber Trp-P1

Tabelle1
Antimutagene Wirkung von Milchsäurebakterien gegenüber verschiedenen mutagenen Substanzen im Ames-Test

Stamm	*Herunft*	*mutagene Substanz*	*antimutagen*	*Lit.*
L. casei	Kultursammlung	nitrosiertes Rindfleisch	+	4
		Rindfleischextrakt + S9-Mischung	-	4
L. gasseri Bifidobakterium Escherichia coli	*Omniflora = probiotisches Erzeugnis*	nitrosiertes Rindfleisch	-	4
		Rindfleischextrakt + S9-Mischung	+	4
Lc. lactis, L. casei L. agilis, L. cryniformis, Lc. lindneri, L. plantarum, L.fermentum, L.psicicola, L. confusus, L.sake	Kultursammlung	nitrosiertes Rindfleisch	+	5
			-	5
Str. faecalis	Kultursammlung	NF, NQO	+	6
Str. thermophilus, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. rhamnosus	Kultursammlung	Nitrovin	+	*7*
L. sp., L. plantarum	Kultursammlung	Nitrovin	-	*7*
36 von 40 Laktobazillenstämmen	Kefir und Joghurt	NF	+	8
3 Stämme von *Str. lactis var. cremoris*	Kefir	AF2	+	*9*
Str. faecalis, Str. faecium, L. casei, L. plantarum, L. coryniformis, L. brevis, L.confusus, L. cellobiosus, Leuconostoc paramesenteroides, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus acidilactici	natürlich fermentiertes, indisches Getreideprodukt	Gewürze, Trp-P1, Trp-P2, Aflatoxine	+	10
L. casei ssp. casei, L. fermentum, L. plantarum	Reis	NQO	+	11
6 *L. acidophilus* Stämme	Kultursammlung	MNNG, NF, NPD, NQO, AFB, AMIQ, AMPIP AMPI	+	12
28 *L. gasseri*-Stämme	Kultursammlung	Trp-P1	+	13
9 *Str. cremoris.Stämme, Str. lactis ssp. diacetylactis*	*chinesischer Käse*	Trp-P1, Trp-P2, Glu-P2	+	14

zwischen 43,2 und 94,2 % (13). Von zehn *Streptococcus* (Str.)-Stämmen aus einem traditionellen chinesischen Käse waren sieben *Str. cremoris*-Stämme gegenüber Trp-P1 und Trp-P2 stark antimutagen und einer gegenüber Glu-P1 (14). *Str. faecalis*-Zellen waren gegenüber NF weniger wirksam als Zellextrakte (15). Von 194 aus traditionellen fermentierten Milchprodukten isolierten Milchsäurebakterienstämmen werden 27 erwähnt, die eine antimutagene Wirkung gegenüber Trp-P1 von 10 bis 100% aufwiesen (16). Aus Dadih isolierte Milchsäurebakterienstämme waren in der Lage, die mutagene Wirkung von N-Nitrosodiethylamin und in geringerem Masse von N-Nitrosodimethylamin zu hemmen, nicht aber diejenige von N-Nitrosopiperidin und N-Nitrosopyrrolidin (17).
Die antimutagene Wirkung gegenüber Trp-P2 war bei Zellsuspensionen von *L. acidophilus* LA106 und *Lactococcus* (Lc.) *lactis* ssp. lactis LlI103 (18) und mit ge-

[1]Abkürzungen der mutagenen Substanzen:
AF2 = 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acryl amid
AFB1 = Aflatoxin B1
AMIQ = 2-Amino-3-methyl-3H-imidazo-chinolin
AMPI = 2-Amino-3-methyl-9H-pyrido (3,3-6)indol
AMPIP = 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin
B(a)P = Benzo(a)pyren
Glu-P1 = 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P2 = 2-Aminodipyridol[1,2-a:3',2'-d]imidazol
IQ = 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQ = 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5f]chinolin
MeIQx = 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
MNNG = N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
NF = 2-Nitrofluoren
NPD = 4-Nitro-O-phenylendiamin
NQO = 4-Nitrochinolin-N-oxid
Phe-P1 = 2-Amino-5-phenylpyridin
PhIP = 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
Trp-P1 = 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Trp-P2 = 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Formeln siehe teilweise Tabelle 1 in (1)

[2]NF und NPD sind promutagene Substanzen, die erst nach Aktivierung im Stoffwechsel mutagen wirken.

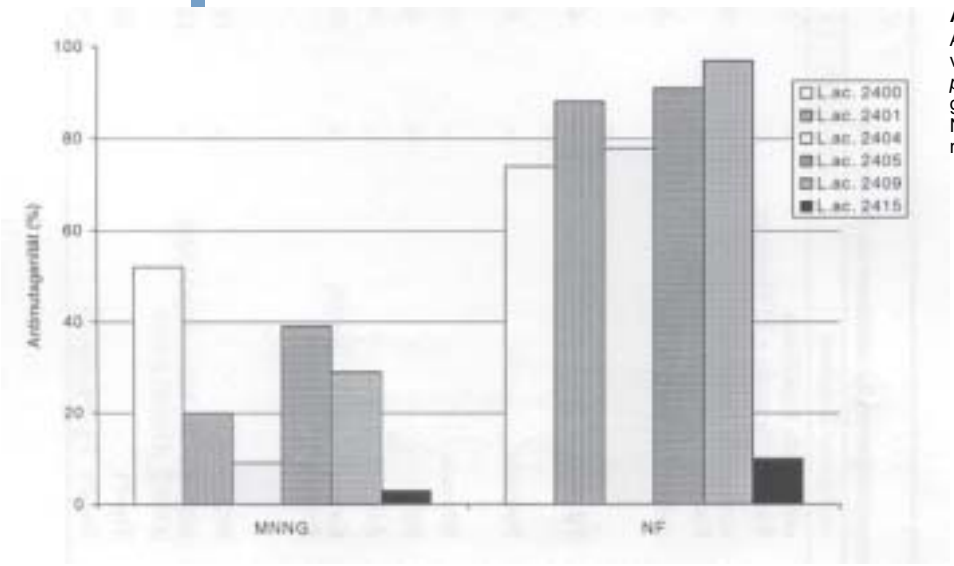


Abbildung 1:
Antimutagene Wirkung von sechs *L. acidophilus*-Stämmen gegenüber MNNG und NF (zusammengestellt nach 12)

friergetrockneten *L. gasseri*-Zellen (19) von der Anzahl der eingesetzten Zellen abhängig und erreichte mit 15 x 10^8 *L. acidophilus*-Zellen/ml eine solche von über 80 % (18). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen lebend oder abgetötet waren (19). Dagegen zeigten abgetötete Zellen von *L. acidophilus* insgesamt geringere antimutagene Wirkungen als lebende (12).
Ungereinigte und Trypsin-behandelte Zellwände von *Str. faecalis* verminderten in Vergleich zur Kontrolle die antimutagene Wirkung von Trp-P1, Trp-P2 und von Glu-P1 um mehr als 95 %. Dabei hatte nach diesen Autoren eine steigende $MgCl_2$-Konzentration nur eine geringfügige Wirkung (20). Zellen dieses Keimes waren gegenüber AF2 und NQO antimutagen, gegenüber diesen Mutagenen wie auch gegenüber Fecesextrakten von Hunden und Katzen hatten Zellwände dieselbe Wirkung (21). *L. casei* wie auch Omniflora zeigten antiklastogene Wirkung im Chromosomen-Aberrations- und Mikronukleus-Test (4).

Bindung von mutagenen Substanzen durch Milchsäurebakterien
Verschiedene Milchsäurebakterien, aus Kultursammlungen (13, 22-24, 41) stammend oder aus westeuropäischem (9) und mongolischem (25) Kefir, aus Dadih, einem indonesischen fermentierten Milchprodukt (26), aus einem algerischem Käse (27) und aus einem traditionellen chinesischen Käse (14) isoliert, wurden in In-vitro-Versuchen auf ihr Bindungsverhalten gegenüber den mutagenen Substanzen Trp-P1, Trp-P2, Glu-P1, in einigen Fällen auch gegenüber Glu-P2, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, AF2, AFB_1 und B(a)P (9,13, 23, 24, 27, 41) überprüft und dabei zeigten sich je nach Stamm und nach mutagener Substanz unterschiedliche Resultate. Trp-P1 und Trp-P2 wurden meist zu mehr als 90 %, Glu-P1 dagegen in geringerem Masse und AFB_1 sehr schlecht gebunden (Tabelle 2).
Auch aus einem indischen fermentierten Reis-Bohnenprodukt isolierte Milchsäurebakterien zeigten das gleiche Bindungsverhalten gegenüber Trp-P1, Trp-P2 und Glu-P1 (28).
Durch 20 □g und mehr der lyophilisierten

Tabelle 2
In vitro-Bindung von mutagenen Substanzen an Milchsäurebakterien

Mikroorganismus	*n*	*Bindung in % an*							
		Trp-P1	*Trp-P2*	*Glu-P1*	*Glu-P2*	*IQ*	*MeIQ*	*MeIQx*	*Lit.*
L. gasseri	28	48,5-95,4	-	-			-		(13)
L. gasseri	4	88,3-94,7	78,2-86,3	11,3-21,7		35,8-61,1	31,1-59,3		(13)
L. acidophilus YIT 0169[1]		89	81	28	20	55	76	55	(41)
L. bulgaricus YIT 0046[1]		93	90	42	32	74	86	73	(41)
L. casei YIT 9018[1]		90	90	16	10	48	70	55	(41)
L. casei ssp. *casei*[2]	4	82,4-99,3	89,3-98,4	19,2-33,0					(26)
L. casei ssp. *rhamnosus*[2]	1	98,6	98,1	40,7					(26)
L. fermentum YIT 0159[1]		86	78	21	15	46	68	53	(41)
L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* 2038		94,1						60,8	(23)
L. plantarum[4]	1	99,5	98,7	32,6					(25)
L. brevis[4]	1	99,9	99,4	55,2					(25)
Str. thermophilus 1131		83,2						32,2	(23)
Str. lactis[4]	5	99,2-99,8	97,4-99,9	29,8-73,6					(25)
Str. lactis[2]	1	96,6	96,6	23,6					(26)
Str. lactis ssp. diacetylactis[2]	3	95,6-99,3	96,7-97,7	23,6-32,7					(26)
Str. lactis ssp. diacetylactis[5]	1	98,4	95,0	2,4					(14)
Str. cremoris[5]	9	97,1-98,8	94,1-97,7	0,9-25,4					(14)
Str. cremoris[4]	3	99,7-99,9	98,5-99,9	44,9-69,5					(25)
Str. cremoris[2]	4	88,0-99,3	87,9-99,3	19,2-33,0					(26)
Str. faecalis[4]	1	99,6	98,9	32,4					(25)
Str. faecalis ssp. *liquefaciens*[2]	5	94,7-98,9	92,6-97,6	22,9-36,4					(26)
Str. sp.[3]	1	97,1	91,0	20,4					(27)
Str. cremoris gefriergetr.									
in dest.Wasser		86,6	83,9	18,6					(30)
Magensäure		65,0	53,6	13,0					(30)
Leuconostoc dextranicum[4]	6	99,1-99,7	99,1-99,99	45,6-74,9					(25)
Leuconostoc paramesenteroides[2]	18	99,1-99,7	98,3-99,7	26,0-45,2					(26)
Leuconostoc sp.[3]	1	98,7	97,4	34,6					(27)
Pediococcus sp.[3]	4	97,6-98,7	93,6-99,6	23,3-69,5					(27)

[1] aus Feces isoliert; [2] aus Dadih isoliert; [3] aus algerischem Käse isoliert; [4] aus mongolischem Kefir isoliert; [5] aus chinesischem Käse isoliert

Bakterienstämme von *L. acidophilus* NCFB 1748, *L. fermentum* KLD, *Lc. lactis* ssp. *lactis* NCFB 604, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* NCFB 607 pro µg mutagener Substanz wurden bis zu 96 % von Trp-P2 gebunden, während die Bindung von PhIP mindestens 50 % und diejenige von IQ und MeIQx bei einer maximalen Menge von 200 µg Bakterien/mg mutagener Substanz zwischen 20 und 40 % betrug (29). Gefriergetrocknete Zellen von *Str. cremoris* Z-25 zeigten in destilliertem Wasser für Trp-P1 eine Bindungsfähigkeit von 86,6 % (30) und 97 % (22), für Trp-P2 von 83,9 % und für Glu-P1 von 18,6 % (30). Bei gefriergetrockneten Zellen von *L. casei* ssp. *casei* R-52 (31) und *Lc. lactis* ssp. *lactis* T-80 (32) wurde aus der Dosis-Wirkungs-Kurve die mittlere gebundene Menge mit 123 µg (31), 137 µg (32) Trp-P1 und 110 µg (31) Trp-P2/mg Zelle ermittelt. 5 mg *L. acidophilus* IFO13951-Zellen wurden in einer Suspension von 1000 µg Trp-P1 inkubiert und dabei wurden etwas weniger als 150 µg Trp-P1/mg gebunden (33). Mit *L. casei* wurde eine maximale gebundene Menge von 40 µg Trp-P2/g gefunden (41).
L. casei- wie auch *L. gasseri*-Zellen können Trp-P1 und Trp-P2 sehr schnell binden (13, 41). Bei *Lc. lactis* ssp. lactis T-80-Zellen (32) wie auch bei zwei von vier *L. gasseri*-Stämmen (13) war die Bindung von Trp-P1 bereits unmittelbar nach dem Start der Inkubation maximal, während sie bei den zwei anderen *L. gasseri*-Stämmen während der ersten 30 Minuten Inkubationszeit noch signifikant

anstieg. Vier *L. gasseri*-Stämme banden Trp-P1 (120 bis 141 µg) am stärksten, gefolgt von Trp-P2 (87 bis 110 µg) und IQ (54 bis 65 µg). Wurden nach der Bindung von Trp-P2, Glu-P1, IQ, MeIQ ein *L. gasseri*-Stamm mit Trp-P1 inkubiert, wurden die gebundenen mutagenen Substanzen durch Trp-P1 teilweise ersetzt (34).
Die mit Trp-P1- und Trp-P2-gebundenen Zellen von *L. casei* ssp. *casei* R-52 zeigten in destilliertem Wasser nach 72-stündiger Inkubation keine Dissoziation, wohl aber in verschiedenen Pufferlösungen (31). Eine Inkubation von *L. acidophilus* in einem mutagenfreien Medium während 15 Minuten und 20 Stunden veränderte die an diesen Keim gebundene Fraktion von Trp-P2 nicht (29). Dagegen erhöhte sich die Dissoziationsrate in einer isotonischen Pufferlösung (pH 3,88) linear mit steigender Inkubationszeit. So war sie nach 48 h mit Trp-P1 ungefähr 50 % und mit Trp-P2 ungefähr 70 %.
Bei einem pH-Wert von 2 war bereits zu Beginn der Inkubation die Dissoziation am stärksten. Pepsin in der Lösung erhöhte die Dissoziation nicht, jedoch die Inkubation mit Oxgall: Trp-P1 ungefähr 50 % und Trp-P2 > 85 % in einer 0,3 % Oxgall-Lösung (31).

Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bindung von mutagenen Substanzen
Verschiedene Faktoren wie Salze (27, 30, 32, 41), pH-Wert (23, 24, 27, 29, 30, 32, 35, 41), Enzyme (35) und Hitzebehandlung der Zellen (14, 27, 29, 30, 33) beeinflussten die Bindung von mutagenen Substanzen. In Anwesenheit von $CaCl_2$ wird von *Lc. lactis* ssp. *lactis*-Zellen im pH-Bereich von 2 bis 9 weniger Trp-P1 gebunden als ohne $CaCl_2$ (32). Durch steigende Konzentrationen an NaCl, $CaCl_2$ (30,41) und $MgCl_2$ (30)

Tabelle 3
Bindung von mutagenen Substanzen durch Milchsäurebakterien in Abhängigkeit des pH-Wertes

Keim	*stärkste Bindung*		*schwächste Bindung*		*Bemerkungen*	*Lit.*
	pH	*mutagene Substanz*	*pH*	*mutagene Substanz*		
L. acidophilus	3	AFB_1	3	Trp-P2, IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP		(24)
	5	PhIP				
	7	IQ, MeIQ, MeIQx	7	AFB_1		
	8	Trp-P2				
L. casei	5-6	Trp-P2	4	Trp-P2		(41)
L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* 2038	4	Trp-P1: > 85 %	3	MeIQx: ~ 30 %		(23)
	5	MeIQx: ~ 60 %	8	Trp-P1: < 40 %		
Lc. lactis ssp. *lactis* T-80	7	Trp-P1: 91 % Trp-P2: 89 %	2	Trp-P1: 15 % Trp-P2: 21 %	gefriergetrocknete Zellen mit $CaCl_2$	(35)
Lc. lactis ssp. *lactis* T-80	6	Trp-P1: ~50 %	2	Trp-P1: 15 %		(32)
			9	Trp-P1: ~30 %		
Str. cremoris Z-25			2	Trp-P2		(30)
			9	Trp-P2		
Str. thermophilus 1131	5-9	Trp-P1: 80-90 %	3	Trp-P1: ~65 %		(23)
Pediococcus sp. BK3-11	3-4	Trp-P2	3	IQ	Zellen	(27)
	6	IQ	9	Trp-P2, IQ		
	9	Trp-P2	3	Trp-P2	Zellwände	
B. longum	3	AFB_1	3	MeIQx, Trp-P2		(24)
	5	MeIQx, MeIQ, PhIP	5	IQ		
	8	IQ, Trp-P2	7	AFB_1		
			8	MeIQ, PhIP		

wurde die Bindung des Trp-P2 an *Str. cremoris*- (30) und *L. casei*-Zellen (41) gehemmt. Ebenso beeinflussten Chloride die Bindung von IQ durch Zellen und die Zellwand von *Pediococcus*, nicht aber diejenige von Trp-P2 mit Ausnahme von $SeCl_4$ (27).
Die pH-abhängige Bindung von mutagenen Substanzen an Zellen von Milchsäurebakterien wie *L. acidophilus* (24, 29), *L. casei* (41), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (23), *Lc. lactis* ssp. *lactis* (32, 35), *Str. cremoris* (30) und *Pediococcus* sp. (27) zeigte je nach Keim und mutagener Substanz unterschiedliche Resultate (Tabelle 3). Wässerige Pufferlösungen von pH 3, 5 und 7 setzten kein Trp-P1 aus *Str. cremoris* Z-25 frei, wohl aber aus *L. acidophilus*: 8 % bei pH 3, 5 % bei pH 5 und 0,7 % bei pH 7 (22).
Bei gleichzeitiger Inkubation von Trp-P1 und Trp-P2 mit Pepsin bei einem pH-Wert von 2,0 (= optimale Aktivität von Pepsin) banden *Lc. lactis* ssp. *lactis*-Zellen nur wenig von diesen beiden Mutagenen. Mit steigender Konzentration von Trypsin (pH 7,5) oder Gallensäure (pH 8,0) sank die Bindung an diese mutagenen Substanzen, die anfangs zwischen 80 und 95 % lag, ab. Bei einer Trypsinkonzentration von 1 % banden diese Zellen noch etwa 80 % Trp-P1 und etwa 50 % Trp-P2 und bei einer Gallensäurekonzentration von 2 % wurden diese beiden Mutagene praktisch nicht mehr gebunden (35).
Durch Hitze abgetötete Zellen von *L. acidophilus* NCFB 1748 (29), IFO13951 (33), *Str. cremoris* Z-25 (30, 33) und *Pediococcus* sp. BK3-11 (27) hatten die gleiche Fähigkeit, Trp-P2 (27, 29, 30) sowie Trp-P1 und Glu-P1 (33) zu binden wie lebende (29) oder gefriergetrocknete (27, 30, 33) Bakterien, dagegen war die Bindungsfähigkeit von autoklavierten Str. *cremoris*-Zellen im Vergleich zu nicht-autoklavierten Zellen gegenüber Trp-P1 und Trp-P2 um bis zu 19 % (14) und von *Pediococcus* sp. BK3-11 gegenüber IQ um 28 % (27) reduziert.

Bindung von mutagenen Substanzen durch Zellbestandteile
Die Bindungsfähigkeit von Zellbestandteilen[3] gegenüber mutagenen Substanzen wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen ermittelt (27, 33, 34, 36-38) und ist unterschiedlich. Von der Zellwand von *Str. cremoris* Z-25 (36), *L. acidophilus* IFO13951 (33) und *Pediococcus* (27) wurden Trp-P1 und Trp-P2 zu 70 und 68 % (36), Trp-P1 zu 91 % (33), Trp-P2 zu 98 % und IQ zu 60 % (27) gebunden, während Cytoplasma eine geringe Wirkung aufwies (33,36). Dabei hemmte die Zellwand *L. acidophilus* die durch Trp-P1 und MeIQx induzierte Mutagenität zu 92 und 40 % (33). Durch die Zellwand von *L. acidophilus* und *Str. cremoris* wurden bis zu 20 µg Trp-P1/mg, 3,1 und 5,3 µg Glu-P1/mg, 5,5 und 0,8 µg Phe-P1/mg, 8,5 und 11,5 µg MeIQ/mg, 4,6 und 6,5 µg IQ/mg sowie 5,4 und 8,8 µg MeIQx/mg gebunden (36). Gereinigte Zellwände von vier *L. gasseri*-Stämmen banden mehr Trp-P1, Trp-P2 und IQ als isoliertes Peptidoglycan (total zwischen 363 und 416 im Vergleich zu 46 bis 110 µg) (34). Demgegenüber wurde Trp-P1 zu 100 % an das Peptidoglykan von *L. acidophilus* gebunden (33). Aus der Zellwand von *Leuc. mesenteroides* ssp. *dextranicum* wurde ein Peptidoglykan gewonnen, das in destilliertem Wasser mit dem Mutagen Trp-P1 inkubiert wurde. Ungefähr 90 % des Trp-P1 wurde bei einer Peptidoglykanmenge von 2 mg gebunden. Die Inkubationszeit beeinflusste das Bindungsvermögen nicht. Die Bindung war maximal bei einer Inkubationstemperatur von 25 bis 50 °C und im pH-Bereich von 7,0 bis 9,0, während verschiedene Kationen wie Calcium, Magnesium, Mangan und Eisen die Bindung hemmten (38).
Sreekumar und *Hosono* (37) unterwarfen *L. gasseri*-Zellen verschiedenen chemischen und enzymatischen Behandlungen und studierten sodann die Bindung von

[3]Die Zellen werden dazu mit Ultraschall aufgebrochen.

Trp-P1 (Tabelle 4). Erhitzen der Zellen und Zellwandsuspensionen allein oder in Gegenwart von Alkali oder Natriumdodecylsulfat (SDS) wie auch deren Behandlung mit Hydrolasen und auch mit Lectinen mit Ausnahme des Concanavalins A veränderten die Bindung nicht. Dagegen verursachte die Erhitzung der Zellen mit Trichloressig-säure (TCA) oder starker Säure (1N HCl) eine praktisch vollständige und mit Natriummetaperiodat ($NaIO_4$) eine deutliche Reduktion der Bindung von Trp-P1. Bei der Behandlung der Zellwände mit diesen Substanzen war die Wirkung nicht so ausgeprägt. Zugleich war dadurch der Gehalt der Zellen wie auch der Zellwände an Kohlenhydraten reduziert.

In-vivo-Versuche

Da Bakterien in der Lage sind, mutagene Substanzen zu binden, kann erwartet werden, dass damit die Absorption dieser Substanzen im Darm reduziert wird. Bei sechs gesunden Versuchspersonen, die über 3 Wochen *Lb. casei* erhielten, sank die durch gebratenes Hackfleisch hervorgerufene Mutagenität im Urin um 48 %. Als mögliche Erklärung für dieses Resultat wurden Änderungen in der Darmmikroflora herbeigezogen (39). Aus den Feces von Probanden, die mit *L. acidophilus* LA-2 gesäuerte Milch verzehrten, wurden 24 Laktobazillen-Stämme isoliert. Mit *Salmonella typhimurium* TA98 als Indikatororganismus lag die antimutagene Wirkung dieser Stämme gegenüber Trp-P2 zwischen 0,5 und 82,0 % und gegenüber IQ zwischen 0,4 und 63,9 %, wobei *L. fermentum*, *L. rhamnosus* und *L. salivarius* die stärkste Wirkung aufwiesen (40). Auch *L. casei* YIT 9018 isoliert aus Feces reduzierte die mutagene Wirkung von Trp-P2 (41).

Mit Hilfe einer in *situ*-Loop-Technik wurde im Darm von Ratten die Absorption von Trp-P1 in Gegenwart von Zellen des *Str. thermophilus* 1131-Stammes untersucht. Dabei wurde im Jejunum und Ileum weniger Trp-P1 absorbiert als in Abwesenheit

Tabelle 4
Prozentuale Bindung von Trp-P1 an Zellen und Zellwände von *L. gasseri*-Stämmen nach chemischen und enzymatischen Behandlungen (37)

Behandlung	*Prozentuale Bindung der Zellen von L. gasseri*		*der Zellwände von L. gasseri*	
	SBT10239	*SBT10241*	*SBT10239*	*SBT10241*
Kontrolle	100	100	100	93
Wasser 100 °C, 15'	84	80	86	87
50 mM $NaI0_4$, 4 °C, 15'	40	48	15	17
10 % TCA, 100 °C, 15'	4	1	8	18
1N bzw. 0,1 HCl, 100 °C, 15'	5	1	43	38
1N NaOH, 100 °C, 15'	78	82	86	92
2 % SDS, 100 °C, 15'	99	93	84	86
Kontrolle	100	100	100	93
Concanavalin A	56	59	-	-
Concanavalin A + Inhibitor	83	98	-	-
verschiedene Lectine	100	100	-	-
Mutanolysin	83	93	89	90
Lysozym	99	87	86	90
Trypsin	100	89	91	80
Proteinase K	100	95	100	99

dieses Stammes, während Zellen des *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*-Stammes 2038 keine Wirkung auf die Trp-P1- und MeIQx-Absorption hatten (23). Bei Ratten, denen Trp-1 mit *Str. thermophilus* verabreicht wurde, war die Trp-P1-Konzentration im Pfortaderblut tiefer als ohne Verabreichung dieses Mikoorganismus (42). Nach Verabreichung von Trp-P1 und gefriergetrockneten Bakterien wie *L. acidophilus* IFO 13951 oder *Str. cremoris* Z-25 war im Blut von Ratten, die während vier Tagen hungerten, die Menge an dieser mutagenen Substanz im Vergleich zur Kontrolle um 51,4 oder 64,7 % reduziert (22). Dem widersprechen jedoch die Resultate von *Bolognani* et al. (24), die nach der Verabreichung von *L. acidophilus*- und *Bifidobacterium* (B.) *longum*-Suspensionen an Mäuse in der Leber keine signifikante hemmende Wirkung auf die Aktivität von MeIQx, MeIQ oder Trp-P2 im Vergleich zur Kontrolle feststellten. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Studien wird durch die Form der Bakterien (gefriergetrocknet oder frisch) und durch den Ernährungszustand der Tiere erklärt.
Ratten wurden vor der oralen Verabreichung einer genotoxischen, krebserzeugenden Substanz (5 mg MNNG/kg Körpermasse) lebensfähige *L. casei*-Zellen (10^{10} Zellen in 10 ml 0,9 % NaCl/kg Körpermasse) gegeben. Dabei wurde die induzierte DNA-Schädigung in den Magen- und Dickdarm-Mukosazellen reduziert. Wurden den Tieren am Morgen Joghurt oder Milchsäurebakterien, 8 Stunden später MNNG verabreicht und weitere 16 Stunden später die Dickdarmzellen isoliert, war die Anzahl der intakten Zellen bei der *L. casei*- und Joghurtgruppe deutlich höher als in der Gruppe mit MNNG (43). Auch *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus* und *Str. thermophilus* verhinderten eine durch MNNG verursachte Induktion der DNA-Schädigung. Diese Mikroorganismen (bei *Str. thermophilus* und *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nur einer von vier resp. drei Stämmen) waren ebenfalls antigenotoxisch gegenüber 1,2-Dimethylhydrazin (44). Auch *L. bulgaricus* 191R war in der Lage, die durch 1,2-Dimethylhydrazin-verursachte DNA-Schädigung im Dickdarm von Ratten zu verhüten, nicht aber *Str. thermophilus* CH3 (45).

Bifidobakterien

Bifidobakterien stellen einen gewichtigen Anteil der menschlichen Mikroflora dar und werden auch zur Herstellung von probiotischen Produkten eingesetzt (46). Bifidobakterienstämme weisen unterschiedliche antimutagene Aktivitäten im Ames-Test gegenüber acht mutagenen Substanzen auf. Gegenüber NF betrug diese bei sieben Stämmen mehr als 90 % und gegenüber MNNG bei den fünf Stämmen mehr als 40 % (Abbildung 2). Auf 100 °C während 15 min. erhitzte Zellen zeigten meist eine geringere Wirkung (12). Gegenüber B(a)p stieg die antimutagene Wirkung mit dem erhöhten Einsatz von koloniebildenden Einheiten (kbE) von *Bifidobacterium* sp. Bio (Stamm Danone 173010) an: bei $3x10^7$ kbE betrug die Hemmung 15 % und bei $5x10^{10}$ kbE 46 % (47).
Auch Bifidobakterien können wie die Milchsäurebakterien mutagene Substanzen in unterschiedlicher Konzentration binden (Tabelle 5). Sieben Bifidobakterienstämme, aus den Feces von Probanden nach dem Verzehr von fermentierter Milch isoliert, banden Trp-P2 zwischen 2,0 und 27,2 % und IQ zwischen 5,4 und 19,7 % (40). Lyophilisierte Zellen von drei *B. longum*-Stämmen können heterozyklische Amine mit Ausnahme von Glu-P1 effizient binden, doch war der Bindungsgrad stammabhängig. Der Stamm, der kein Polysaccharid bildete – als PS^- bezeichnet -, wies eine stärkere Wirkung auf als derjenige, der Polysaccharide bildete (PS^+) (Tabelle 5). Im Falle des Trp-P1 zeigte sich eine Dosisabhängigkeit dieser drei Stämme (48). Auch in einer anderen Studie betrug die Bindung von *B. longum* BB536 gegenüber Trp-P2 mehr als 90 %, während sie gegenüber PhIP, MeIQx und IQ dosisabhängig war (29). *B. bifidum* IFO3301 band etwa 150 µg Trp-P1/mg (33) und IFO14252

Tabelle 5
In vitro-Bindung von mutagenen Substanzen an Bifidobakterien

Mikroorganismus		*Bindung in % an*										
		Trp-P1	*Trp-P2*	*Glu-P1*	*Glu-P2*	*AFB_1*	*B(a)P*	*PhIP*	*IQ*	*MeIQ*	*MeIQx*	*Lit.*
B. longum SBT2928-S		82,6										(13)
B. longum SBT2928		88,8	74,2	12,3					43,9	39,4		(13)
B. longum	pH3		25,1			12,4	95,1	18,2	20,8	11,6	17,0	(24)
	pH 5		77,5			7,7	91,8	34,5	53,1	67,2	58,0	(24)
	pH 7		79,7			1,2	88,8	7,0	14,0	22,0	28,6	(24)
	pH 8		81,5			7,2	87,7	6,2	4,2	9,6	17,3	(24)
B. longum		95,5	91,8	14,0					85,8	77,1		(48)
B. longum PS^-		87,7	76,1	10,9					65,8	58,0		(48)
B. longum PS^+		75,2	64,1	11,3					58,1	46,0		(48)
B. breve YIT 4006*		94	91	14	7				61	36	41	(41)
B. adolescentis E194a		90	91	20	10				39	69	56	(41)
B. bifidum YIT 4007*		94	93	27	19				51	69	55	(41)

PS^+ = polysaccharidbildender Stamm; PS^- = keine Polysaccharidbildung
* aus Feces isoliert

in Magensäure oder Phosphatpuffer etwa gleich viel Trp-P2 (30). *B. bifidum* IFO14252-Zellen, die durch Erhitzen bei 100 oder 120 °C während 15 Minuten abgetötet wurden, unterschieden sich nicht in ihrer Bindung von Trp-P1 und Glu-P1 im Vergleich zu gefriergetrockneten Zellen (33). *B. bifidum* IFO14252 band pro mg 19,5 µg Trp-P1, 3,7 µg Glu-P1, 5,5 µg Phe-P1, 6,0 µg MeIQ sowie je 1,7 µg IQ und MeIQx (36). Die verschiedenen mutagenen Substanzen zeigten eine pH-abhängige Bindung an *B. longum* (Tabelle 5), was auch für PhIP und AFB_1 gilt (24).
Bei zehn gesunden Versuchspersonen verminderte sich die mutagene Wirkung des Urins nach dem gleichzeitigen Verzehr von gekochtem Hackfleisch und einer mit Bifidobakterien fermentierten Milch. Dabei waren im Darm die Anzahl der Laktobazillen erhöht und diejenige der Enterobacteriaceen erniedrigt (49). Bei Ratten waren *B. breve* und *B. longum* antigenotoxisch gegenüber MNNG (44).

Propionsäurebakterien

Die Propionsäurebakterien kommen vor allem bei der Fabrikation von Emmentaler zur Anwendung und werden auch zu den Probiotika gezählt (50). Zellextrakte von *Propionibacterium* (P.) *shermanii* VKM-103 wirkten gegenüber Natriumazid und MNNG (51), 9-Aminoacridin (52) wie auch NQO (53-55) antimutagen. Auch andere Propionsäurebakterien wie *P. shermanii* KM-82, *P. pentosaceum*, *P. acne* wiesen die gleiche Wirkung gegenüber Natriumazid auf, nicht aber *P. coccoides*. Die antimutagene Wirkung der Extrakte wurde durch das Erhitzen auf 70 °C teilweise und auf 100 °C vollständig vermindert. Nach einer Auftrennung der Proteine des Extraktes konnten zwei Proteine (Molekulargewicht >70 kDa und 35 bis 70 kDa) mit einer antimutagenen Aktivität nachgewiesen werden (51, 52).

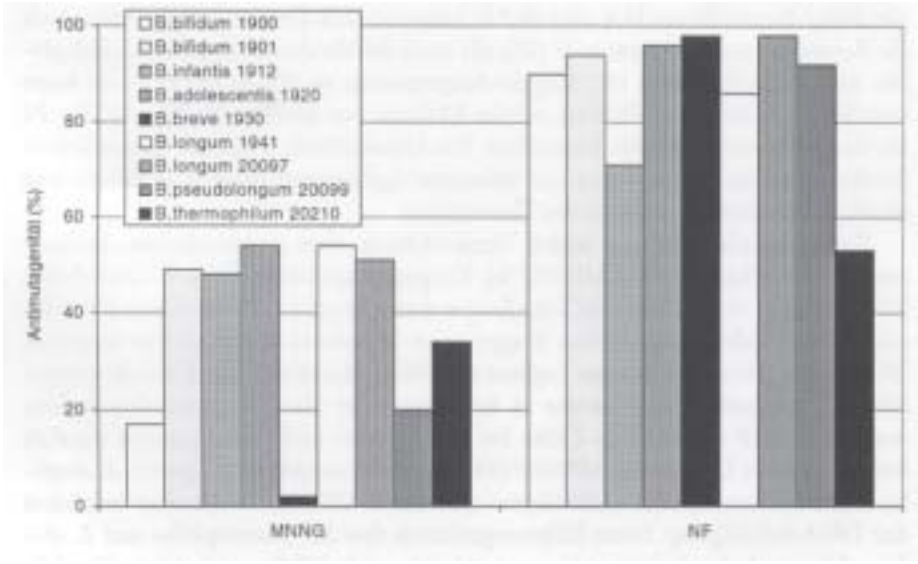


Abbildung 2:
Antimutagene Wirkung von neun *Bifidobacterium*-Stämmen gegenüber MNNG und NF (zusammengestellt nach 12)

Enterokokken

Die Möglichkeit, Enterokokken als probiotische Keime zur Herstellung von Käse zu verwenden, wurde bereits untersucht (56), doch werden hinter deren Anwendung gewisse Fragezeichen gesetzt (57, 58).
Im Ames-Test reduzierten *Enterococcus faecalis* und *faecium* die mutagene Wirkung von Nitrovin um 49 und 47 %; letzterer wirkte auch gegenüber 2-Aminofluoren antimutagen. Hitzebehandelte (100 °C während 15 Minuten) Zellen zeigten keine Wirkung (7). Autoklavierte *Enterococcus faecalis* FK23-Zellen waren ebenfalls in der Lage, verschiedene Mutagene wie Trp-P1, Trp-P2, Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 zu binden. Dabei hängt das Bindungsvermögen von der eingesetzten Menge an Bakterien ab. Bei Trp-P1 und Trp-P2 (jeweils 100 µg) lag das maximale Bindungsvermögen bei 1 mg Zellen, während bei den Aflatoxinen B_1, B_2, G_1 und G_2 das Bindungsvermögen von 15 mg gefriergetrockneten Zellen bei 60, 49, 46 und 34 % lag. Nach Behandlung von *Enterococcus faecalis* FK-23-Zellen mit SDS, wodurch Protein denaturiert wird, war die Bindung von Trp-P1 signifikant reduziert (59). Drei *Enterococcus faecalis*- und zwei *Enterococcus faecium*-Stämme banden im Mittel 98,2 % Trp-P1, 96,7 % Trp-P2 und 37,0 % IQ (27).

Erklärung der antimutagenen Wirkung der Milchsäurebakterien

Mutagene Substanzen werden unterschiedlich von den Milchsäurebakterien gebunden. Je mehr heterozyklische Amine gebunden werden, desto mehr wurde die mutagene Wirkung reduziert (29).
Wie sich mutagene Substanzen an Milchsäurebakterien binden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Aufgrund der Bindung von Trp-P2 an gefriergetrockneten Feces, Bakterienzellen und Nahrungsfasern nehmen *Morotomi* und *Mutai* (41) an, dass es sich dabei um einen Kationenaustausch-Mechanismus handeln könnte. *Tanabe* et al. (32) wie auch *Hosono* und *Hisamatsu* (59) disku-

tieren aufgrund der Bindungsweise von Trp-P1, Aminosäurepyrolysaten und Aflatoxinen an die Zellwand von *Enterococus faecalis* FK-23- und *Lc. lactis* ssp. *lactis* T80-Zellen die Möglichkeit, dass diese mutagenen Substanzen sich an ein Protein binden, das durch SDS denaturiert wurde. Es muss sich also um hydrophobe Bindungen handeln. Nach der Arbeitsgruppe von *Hosono* (20, 21, 38), die aus verschiedenen fermentierten Milchprodukten Milchsäurebakterien mit einem Bindungsvermögen gegenüber mutagenen Substanzen isolierten (25, 26, 35), war das Peptidoglycan der Zellwand die stärkste Komponente, die eine Kapazität aufwies, karzinogene Trp-Pyrolysate zu binden.
Eingehende Untersuchungen zur Bindung von Trp-P1 an *L. gasseri* SBT10239 und SBT10241-Zellen haben *Sreekumar* und *Hosono* (37) vorgenommen. Sie haben dabei Zellen und Zellwandsuspensionen allein oder in Gegenwart von Alkali oder SDS erhitzt oder mit Hydrolasen behandelt (Tabelle 4).
Die Behandlung der Zellen mit TCA wie auch mit 1 N HCl, die den Zellgehalt an Kohlenhydraten verminderte, reduzierte die Bindung von Trp-P1 praktisch vollständig. Mit dieser Behandlung wurde hingegen der Proteingehalt nicht verändert, auch die Anwendung von Hydrolasen wie Lysozym, Proteinase K, Trypsin und Mutanolysin hatte keine Wirkung auf die Bindung. Werden Zellen und Zellwände mit Natriummetaperjodat, das OH-Gruppen in der cis-Position zu Aldehyden und Carboxylsäuregruppen oxidiert, behandelt, verminderte sich wie mit den Säuren die Bindungsfähigkeit. Isolierte Polysaccharide der Zellwand, die über Phosphodiester an das Peptidoglykan gebunden sind, zeigten bei An- oder Abwesenheit von Peptidoglykanen keine Wirkung auf die Trp-P1-Bindung. Aufgrund dieser Resultate wird ersichtlich, dass die Bindungsrezeptoren für heterozyklische Amine am membrangebundenen Polysaccharid der Zellwände lokalisiert sind. Diese Autoren spekulierten deshalb, dass dafür kovalente Bindungen zwischen den CHO-Resten der Glukose und -NH_2-Resten der heterozyklischen Amine in Frage kommen könnten.

Bedeutung für die menschliche Gesundheit

Wie eine Vielzahl anderer Nahrungsbestandteile können auch mutagene Substanzen in der Nahrung beim Menschen nach dem Verzehr über die Feces ausgeschieden (60) wie auch von der Mukosa des Ileums (61) und des Kolons (62) absorbiert und im Blut transportiert werden. Aus Rattenversuchen ist bekannt, dass Trp-P2 im Dünndarm sehr rasch absorbiert wird, womit diese Substanz nicht in den Dickdarm mit seiner Flora gelangt (63). Aber die mutagenen Substanzen können dorthin über die enterohepatische Zirkulation gelangen, da der wichtigste Ausscheidungsweg für Trp-P1 (64), Trp-P2 (63) und sowie IQ und MeIQ (65, 66) über die Galle erfolgt. Dabei wird beispielsweise Trp-P1 in der ursprünglichen Form ausgeschieden (41). Zudem zeigte sich nach der gleichzeitigen Verabreichung von Trp-P1 und *Str. thermophilus* an Ratten eine geringere Trp-P1-Konzentration in der Pfortader als ohne diesen Keim (67). Im Urin wurden bereits verschiedentlich mutagene Wirkungen nachgewiesen (68-73), wobei diese in Form der Glucuronide entgiftet werden können (74).
Milchsäurebakterien, die auch Bewohner des Darmtraktes sind, können heterozyklische Amine binden und damit die Absorption und somit auch die Ausscheidung von mutagenen Substanzen beeinflussen, wie dies verschiedentlich beim Menschen gezeigt werden konnte (39, 49, 75). Eine nicht zu unterschätzende Rolle der Milchsäurebakterien in Bezug auf ihre antimutagene Wirkung dürfte in folgender Möglichkeit liegen. Wenn antimutagene Substanzen gemeinsam mit

einem fermentierten Lebensmittel verzehrt werden, so besteht im Magen durchaus die Möglichkeit, dass im Chymus die Milchsäurebakterien die mutagenen Substanzen binden können, womit diese im Dünndarm nicht absorbiert werden können. Hinzu kommt, dass gerade im Dünndarm Bifidobakterien, Laktobazillen und Streptokokken dominieren (76) und somit auch dort mutagene Substanzen abfangen können.
Da antimutagene Substanzen als gegenüber Krebs präventiv angesehen werden (77), dürfte dem Verzehr von Milchsäurebakterien und der mit diesen Bakterien fermentierten Milchprodukten eine präventive Rolle bei der Entstehung von Dickdarmkrebs zugesprochen werden (78, 79). So konnte beispielsweise in Versuchen an Ratten, denen lyophilisierte *B. longum*-Zellen verabreicht wurden, eine IQ- und Azoxymethan-induzierte Kanzerogenese im Dickdarm wie auch in der Leber signifikant gehemmt werden (80, 81). Doch ist nach epidemiologische Studien ein Beweis für eine Beziehung zwischen Dickdarmkrebs und dem Verzehr von Milchprodukten inkonsistent (82).

Schlussfolgerung

Die verschiedenen, hier diskutierten Untersuchungen zeigen, dass Milchsäurebakterien über antimutagene Eigenschaften verfügen. Dabei scheint es, dass sich die antimutagenen Substanzen, vor allem heterozyklische Amine, an Zellbestandteile der Milchsäurebakterien binden. Doch zeigte sich, dass die antimutagenen Eigenschaften der Milchsäurebakterien stark stammabhängig sind. Diese Forschungsarbeiten haben bereits dazu geführt, dass unter 194 Milchsäurebakterien-Stämmen deren sechs (*Lc. lactis* ssp. *cremoris* R-14, 80 und 111, *Lc. lactis* ssp. *lactis* 12, *L. casei* ssp. *casei* R-12 und 26) mit einem guten Wachstum in Joghurt und einer hohen antimutagenen Wirkung gegenüber Trp-P1 selektioniert wurden (16). Für einen Einsatz von Milchsäurebakterien mit der Anpreisung einer antimutagenen Wirkung sind deshalb von der Milchwirtschaft nur gut definierte Stämme zu verwenden. Dank dieser Eigenschaft sind die Sauermilchprodukte als wertvolle Lebensmittel für die menschliche Ernährung anzusehen. Bei ihnen kommt noch zusätzlich hinzu, dass auch das Kasein eine antimutagene Wirkung aufweist (1).

Zusammenfassung

Milchsäurebakterien werden zur Fermentierung von Milch und auch anderen Lebensmitteln eingesetzt. Eingehende Untersuchungen haben nun gezeigt, dass diese Bakterien wie auch Bifidobakterien und Propionsäurebakterien in der Lage sind, verschiedene mutagene Substanzen wie beispielsweise 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indol (Trp-P1), 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P2), 2-Amino-6-methyldipyrido [1,2-a:3‘,2‘-*d*]-imidazol (Glu-P1) zu binden. Doch ist diese Eigenschaft stammspezifisch, da die einzelnen Milchsäurebakterienstämme in unterschiedlichem Masse auf die verschiedenen mutagenen Substanzen reagieren. Das antimutagene Prinzip muss wahrscheinlich dem Vorhandensein von Kohlenhydraten in der Zellwand der Milchsäurebakterien zugeschrieben werden, doch ist der Bindungsmechanismus noch nicht ganz klar.

Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation du lait et d’autres denrées alimentaires. Des études approfondies ont montré que ces bactéries de même que les bactéries Bifidus et les propioniques sont capables de lier différentes substances mutagènes telles que 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P2), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3‘,2‘-d]-imidazole (Glu-P1). Toutefois, cette propriété est spécifique de la souche, les différentes souches de bactéries lactiques réagissant différemment en présence des diver-

ses substances mutagènes. Le principe antimutagène est probablement dû à la présence d'hydrates de carbone dans la paroi cellulaire des bactéries lactiques, cependant le mécanisme de fixation reste inexpliqué.

Summary «Antimutagenic Activity of Dairy Products and of Bacteria used in Dairy Industry. Part 2. Lactic Acid Bacteria and other Bacteria»

Lactic acid bacteria are used to ferment milk as well as other foods. Detailed studies have shown that these bacteria as well as bifidobacteria and propionic acid bacteria are able to fix various mutagenic substances, for instance 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P2), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-*d*]-imidazole (Glu-P1). However, this property is strain specific since different lactic acid bacteria strains react differently depending on the mutagenic substances. The antimutagenic principle is probably due to the presence of carbohydrates in the lactic acid bacteria cell wall, however, the fixation mechanism has not yet been explained.

Key words

Antimutagenicity, lactic acid bacteria, Bifidobacterium, Propionibacterium, fermented milk

Literatur

1 *Sieber, R*. und *van Boekel, M.A.J.S*.: Antimutagene Wirkung von Milchprodukten und in der Milchwirtschaft verwendeten Bakterien. 1. Teil: Milch, Milchbestandteile und Sauermilchprodukte. Mitt. Lebensm. **92**, 68-89 (2001).

2 *Naidu, A.S.*, *Bidlack, W.R.* and *Clemens, R.A.*: Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **39**, 13-126 (1999).

3 *Sanders, M.E*. and *Huis in't Veld, J.*: Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. Antonie Leeuwenhoek **76**, 293-315 (1999).

4 *Renner, H.W.* and *Münzner, R.*: The possible role of probiotics as dietary antimutagens. Mutat. Res. **262**, 239 (1991).

5 *Pool-Zobel, B. L., Münzner, R*. and *Holzapfel, W. H.*: Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the S. typhimurium mutagenicity assay. Nutr. Cancer **20**, 261-270 (1993).

6 *Vorob'eva, L.I., Cherdyntseva, T.A.* and *Abilev, S.K.*: Bioantimutagenic effect of the culture liquid of *Streptococcus faecalis* on mutagenesis induced by 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA 1538 and TA 98. Microbiology **65**, 69-73 (1996).

7 *Ebringer, L., Ferencik, M., Lahitova, N., Kacani, L.* and *Michalkova, D.*: Anti-mutagenic and immuno-stimulatory properties of lactic acid bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. **11**, 294-298 (1995).

8 *Yoon, Y.H., Cho, J.K., Baek, Y.J.* and *Huh, C.S.*: [Antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains]. Korean J. Anim. Sci. **41**, 39-44 (1999), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. 61, 549 (1999).

9 *Miyamoto, T., Morita, H., Nishioka, K., Kataoka, K., Izumimoto, M.* and *Kuyama, T.*: [Constituent species of lactic acid bacteria from kefir and their desmutagenic properties]. Jap. J. Dairy Food Sci. **40**, A-111-A-120 (1991).

10 *Thyagaraja, N.* and *Hosono, A.*: Antimutagenicity of lactic acid bacteria from „Idly" against food-related mutagens. J. Food Protect. **56**, 1061-1066 (1993).

11 *Kumagai, T., Seno, K., Watanabe, T.* and *Okada, S.*: Antimutagenicity of plant origin lactic acid bacteria isolated from rice and processed rice products. J. Jap. Soc. Food Sci. Tech. **47**, 551-554 (2000).

12 *Lankaputhra, W.E.V.* and *Shah, N.P.*: Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. Mutat. Res. **397**, 169-182 (1998).
13 *Sreekumar, O.* and *Hosono, A.*: Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. J. Dairy Sci. **81**, 1508-1516 (1998).
14 *Zhang, X.B., Ohta, Y.* and *Hosono, A.*: Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. J. Dairy Sci. **73**, 2702-2710 (1990).
15 *Vorob'eva L.I., Cherdyntseva T.A.* and *Abilev S.K.*: [Antimutagenic activity of bacterial cell extracts on mutagenesis induced by 2-nitrofluorene in strains of *Salmonella typhimurium*]. Genetika **31**, 901-907 (1995).
16 *Hashimoto, H., Oneda, K., Nakamura, S.* and *Hosono, A.*: [Studies on the selection of lactic acid bacteria for the manufacture of fermented milk with high desmutagenic activity]. Milk Sci. **47**, 101-110 (1998).
17 *Hosono, A., Wardojo, R.* and *Otani, H.*: Inhibitory effect of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicity of volatile nitrosamines. Agr. Biol. Chem. **54**, 1639-1643 (1990).
18 *Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M.* and *Hosono, A.*: Studies on antimutagenic effect of milk cultured with lactic acid bacteria on the Trp-P2-induced mutagenicity to TA98 strain of *Salmonella typhimurium.* J. Dairy Res. **59**, 543-549 (1992).
19 *Usman* and *Hosono, A.*: Viability of *Lactobacillus gasseri* and its cholesterol-binding and antimutagenic activities during subsequent refrigerated storage in nonfermented milk. J. Dairy Sci. **82**, 2536-2542 (1999).
20 *Hosono, A., Yoshimura, A.* and *Otani, H.*: Desmutagenic property of cell walls of *Streptococcus faecalis* on the mutagenicities induced by amino acid pyrolysates. Milchwissenschaft **43**, 168-170 (1988).
21 *Hosono, A., Yoshimura, A.* and *Otani, H.*: Antimutagenic activity of cellular component of *Streptococcus faecalis* IFO 12695. Neth. Milk Dairy J. **41**, 239-245 (1987).
22 *Zhang, X.B.* and *Ohta, Y.*: Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole. Can. J. Microbiol. **39**, 841-845 (1993).
23 *Terahara, M., Meguro, S.* and *Kaneko, T.*: Effects of lactic acid bacteria on binding and absorption of mutagenic heterocyclic amines. Biosci. Biotechnol. Biochem. **62**, 197-200 (1998).
24 *Bolognani, F., Rumney, C.J.* and *Rowland, I.R.*: Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. Food Chem.Toxicol. **35**, 535-545 (1997).
25 *Hosono, A., Tanabe, T.* and *Otani, H.*: Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. Milchwissenschaft **45**, 647-651 (1990).
26 *Hosono, A., Wardojo, R.* and *Otani, H.*: Binding of amino acid pyrolyzates by lactic acid bacteria isolated from ‚Dadih'. Lebensm.-Wiss. u. -Technol. **23**, 149-153 (1990).
27 *Boubekri, K.* and *Ohta, Y.*: Antimutagenicity of lactic acid bacteria form El-Klila cheese. J. Sci. Food Agric. **72**, 397-402 (1996).
28 *Thyagaraja, N.* and *Hosono, A.*: Binding properties of lactic acid bacteria from ‚idly' towards food-borne mutagens. Food Chem. Toxicol. **32**, 805-809 (1994).
29 *Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J.-A., Nord, C.E.* and *Rafter, J.*: Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. Mutat. Res.

311, 239-248 (1994).
30 *Zhang, X.B.* and *Ohta, Y.*: In vitro binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. J. Dairy Sci. **74**, 752-757 (1991).
31 *Kawase M.* and *Hosono A.*: Binding stability of lactic acid bacteria cells with mutagenic tryptophan pyrolysates. Anim. Sci. Technol. **66**, 430-435 (1995).
32 *Tanabe, T., Suyama, K.* and *Hosono, A.*: Effect of sodium dodecylsulphate on the binding of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* T-80 cells with Trp-P1. J. Dairy Res. **61**, 311-315 (1994).
33 *Zhang, X.B.* and *Ohta, Y.*: Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolysates. Mutat. Res. **298**, 247-253 (1993).
34 *Sreekumar, O.* and *Hosono, A.*: Amino acid pyrolysates competitive and combination binding with *Lactobacillus gasseri* cells. Milchwissenschaft **53**, 73-76 (1998).
35 *Tanabe, T., Suyama, K.* and *Hosono, A.*: Effect of pepsin, trypsin or bile acid on the binding of tryptophane pyrolysates by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T-80. Milchwissenschaft **49**, 438-441 (1994).
36 *Zhang, X.B.* and *Ohta, Y.*: Binding of mutagens by fractions ot the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. J. Dairy Sci. **74**, 1477-1481 (1991).
37 *Sreekumar, O.* and *Hosono, A.*: The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. Mutat. Res. **421**, 65-72 (1998).
38 *Tanabe, T., Otani, H.* and *Hosono, A.*: Binding of mutagens with cell wall peptidoglycan of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* T-180. Milchwissenschaft **46**, 622-625 (1991).
39 *Hayatsu, H.* and *Hayatsu, T.*: Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. Cancer Letters **73**, 173-179 (1993).
40 *Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Yamazaki, K.* and *Hosono, A.*: Inhibitory effects of fecal lactobacilli and bifidobacteria on the mutagenicities of Trp-P-2 and IQ. Milchwissenschaft **53**, 309-313 (1998).
41 *Morotomi, M.* and *Mutai, M.*: In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. J. Natl. Cancer Inst. **77**, 195-201 (1986).
42 *Terahara, M., Nishide, S.* and *Kaneko, T.*: Effect of *Streptococcus thermophilus* on the Trp-P-1 level in the blood. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**, 1531-1533 (2000).
43 *Pool-Zobel, B. L., Bertram, B., Knoll, M., Lambertz, R., Neudecker, C., Schillinger, U., Schmezer, P.* und *Holzapfel, W. H.*: Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastrointestinal tract of rats. Nutr. Cancer **20**, 271-281 (1993).
44 *Pool-Zobel, B.L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scassellati-Sforzolini, R.* and *Rowland, I.*: *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. Nutr. Cancer **26**, 365-380 (1996).
45 *Wollowski, I., Ji, S.T., Bakalinsky, A.T., Neudecker, C.* and *Pool-Zobel, B.L.*: Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. J. Nutr. **129**, 77-82 (1999).
46 *Arunachalam, K.D.*: Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. Nutr. Res. **19**, 1559-1597 (1999).
47 *Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Koch-Bocabeille, B.* and *Narbonne, J.F.*: Antimutagenicity of components of dairy products. Mutat. Res. **331**, 133-141 (1995).
48 *Sreekumar, O.* and *Hosono, A.*: The antimutagenic of a properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. Can. J. Microbiol. **44**,

1029-1036 (1998).
49 *Asahara, T., Shimizu, K., Ohashi, Y., Matsuki, T., Matsumoto, K., Takada, T., Yuki, N., Takayama, H.* and *Tanaka, R.*: [The effects of Bifidobacteria-fermented milk on human urinary mutagenicity, which increases following ingestion of cooked ground beef]. J. Intestinal Microbiol. **12**, 89-96 (1998), zitiert nach Dairy Sci. Abstr. **61**, 538 1999).
50 *Mantere-Alhonen, S.*: Propionibacteria used as probiotics - a review. Lait **75**, 447-452 (1995).
51 *Vorob'eva, L.I., Cherdyntseva, T.A., Vorob'eva, N.V.* and *Abilev, S.K.*: Anti-mutagenic agents from propionibacteria. Microbiol. Engl. Tr. **60**, 726-731 (1991).
52 *Vorobjeva, L.I., Cherdinceva, T.A., Abilev, S.K.* and *Vorobjeva, N.V.*: Antimutagenicity of propionic acid bacteria. Mutat. Res. **251**, 233-239 (1991).
53 *Vorob'eva L.I., Cherdyntseva T.A.* and *Abilev S.K.*: Antimutagenic action of bacteria on mutagenesis induced by 4- nitroquinoline-1-oxide in S*almonella typhimurium*. Microbiology **64**, 187-192 (1995).
54 *Vorobjeva, L.I., Khodjaev, E.Y.* and Cherdinceva, T.A.: Antimutagenic and reactivative activities of dairy propionibacteria. Lait **75**, 473-487 (1995).
55 *Vorobjeva, L.I., Khodjaev, E.Y.* and *Cherdinceva, T.A.*: The study of induced antimutagenesis of propionic acid bacteria. J. Microbiolog. Methods **24**, 249-258 (1996).
56 *Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K.* and *Stanton, C.*: Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. J. Agric.Food Chem. **47**, 4907-4916 (1999).
57 *Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H.* and *Stiles, M.E.*: Enterococci at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. **47**, 1-24 (1999).
58 *Hamilton-Miller, J.M., Shah, S.* and *Winkler, J.T.*: Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. Public Health Nutr. **2**, 223-229 (1999).
59 *Hosono, A.* and *Hisamatsu, S.*: Binding of amino acid pyrolysates and aflatoxins to autoclaved cells of *Enterococcus faecalis* FK-23. Biosci. Biotechnol. Biochem. **59**, 940-942 (1995).
60 *Hayatsu, H., Hayatsu, T., Wataya, Y.* and *Mower, H.F.*: Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. Mutat.Res. **143**, 207-211 (1985).
61 *Venitt, S.*: Mutagens in human faeces and cancer of the large bowel. In: Rowland, I.R. Role of the gut flora in txocity and cancer, 399-460. Academic Press, London 1988.
62 *Fang, W.F.* and *Strobel, H.W.*: Activation of carcinogens and mutagens by rat colon mucosa. Cancer Res. **38**, 2939-2944 (1978).
63 *Kimura, T., Nakayama, T., Kurosaki, Y., Suzuki, Y., Arimoto, S.* and *Hayatsu, H.*: Absorption of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, a mutagen-carcinogen present in tryptophan pyrolysate, from the gastrointestinal tract in the rat. Jpn. J. Cancer Res. **76**, 272-277 (1985).
64 *Brandt, I., Gustafsson, J.A.* and *Rafter, J.*: Distribution of the carcinogenic tryptophan pyrolysis product Trp-P-1 in control, 9-hydroxyellipticine and beta-naphthoflavone pretreated mice. Carcinogenesis **4**, 1291-1296 (1983).
65 *Sjödin, P.* and *Jägerstad, M.*: A balance study of ^{14}C-labelled 3H-imidazo[4,5-f]quinolin-2-amines (IQ and MeIQ) in rats. Food Chem. Toxicol. **22**, 207-210 (1984).
66 *Bergman, K.*: Autoradiographic distribution of ^{14}C-labeled 3H-imidazo[4,5-f]quinoline-2-amines in mice. Cancer Res. **45**, 1351-1356 (1985).
67 T*erahara, M., Nishide, S.* and *Kane-*

ko, T.: Effect of *Streptococcus thermophilus* on the Trp-P-1 level in the blood. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**, 1531-1533 (2000).
68 *Baker, R., Arlauskas, A., Bonin, A.* and *Angus, D.*: Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals. Cancer Lett. **16**, 81-89 (1982).
69 *Dolara, P., Caderni, G., Salvadori, M., Tringale, L.* and *Lodovici, M.*: Urinary mutagens in humans after fried pork and bacon meals. Cancer Lett. **22**, 275-280 (1984).
70 *Doolittle, D.J., Rahn, C.A., Burger, G.T., Lee, C.K., Reed, B., Riccio, E., Howard, G., Passananti, G.T., Vesell, E.S.* and *Hayes, A.W.*: Effect of cooking methods on the mutagenicity of food and on urinary mutagenicity of human consumers. Food Chem. Toxicol. **27**, 657-666 (1989).
71 *Ohyama, S., Inamasu, T., Ishizawa, M., Ishinishi, N.* and *Matsuura, K.*: Mutagenicity of human urine after the consumption of fried salted salmon. Food Chem.Toxicol. **25**, 147-153 (1987).
72 *Ji, H., Yu, M.C., Stillwell, W.G., Skipper, P.L., Ross, R.K., Henderson, B.E.* and *Tannenbaum, S.R.*: Urinary excretion of 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline in white, black, and Asian men in Los Angeles County. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **3**, 407-411 (1994).
73 *Reistad, R., Rossland, O.J., Latva-Kala, K.J., Rasmussen, T., Vikse, R., Becher, G.* and *Alexander, J.*: Heterocyclic aromatic amines in human urine following a fried meat meal. Food Chem. Toxicol. **35**, 945-955 (1997).
74 *Stillwell, W.G., Turesky, R.J., Gross, G.A., Skipper, P.L.* and *Tannenbaum, S.R.*: Human urinary excretion of sulfamate and glucuronide conjugates of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MelQx). Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **3**, 399-405 (1994).
75 *Lidbeck, A., Övervik, E., Rafter, J., Nord, C.E.* and *Gustafsson, J.-A.*: Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. Microb. Ecol. Health Dis. **5**, 59-67 (1992).
76 *Mitsuoka, T.*: The human gastrointestinal tract. In: Wood, B.J.B. The lactic acid bacteria: volume 1.The lactic acid bacteria in health and disease, 69-114. Elsevier Appl. Sci., London 1992.
77 *Ferguson, L.R.*: Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. Mutat. Res. **307**, 395-410 (1994).
78 *de Kok, T.M.C.M.* and *van Maanen, J.M.S.*: Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. **463**, 53-101 (2000).
79 *Rafter, J.*: The role of lactobacilli in colon cancer prevention. 24th Int. Dairy Congress (1994).
80 *Reddy, B.S.* and *Rivenson, A.*: Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. Cancer Res. **53**, 3914-3918 (1993).
81 *Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N.* and Reddy, B.S.: *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis **18**, 833-841 (1997).
82 Anonymous: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, 1997.