

Keine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers durch unter Sauerstoff-Schutzgas verpacktes Frischfleisch

Stellungnahme Nr. 038/2010 des BfR vom 6. August 2010

Frischfleisch und Frischfleischerzeugnisse für das Selbstbedienungsregal im Supermarkt werden häufig unter einer Schutzatmosphäre mit hohem Sauerstoffanteil verpackt. Sie sind dann mit dem Hinweis „unter Schutzatmosphäre verpackt“ versehen. Diese Art der Verpackung soll eine längere Haltbarkeit des empfindlichen Lebensmittels Fleisch gewährleisten. Kommt Fleisch, das natürlicherweise auch Cholesterin enthält, mit Sauerstoff in Kontakt, können sogenannte Cholesterinoxidationsprodukte (COPs) entstehen. Ihre gesundheitliche Wirkung auf den menschlichen Organismus ist nicht abschließend geklärt. Das Bundesinstitut für Risikobewertung wurde beauftragt, das gesundheitliche Risiko von unter Schutzatmosphäre mit hohem Sauerstoffanteil verpacktem Frischfleisch zu bewerten. Das Institut kommt zum Schluss, dass Verbraucherinnen und Verbraucher über derartige Produkte nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis mit hoher Wahrscheinlichkeit nur geringe Mengen an Cholesterinoxidationsprodukten zusätzlich aufnehmen. Von unter Schutzatmosphäre verpacktem Fleisch geht daher kein erkennbares Gesundheitsrisiko aus.

Cholesterinoxidationsprodukte können natürlicherweise in einer Vielzahl von Lebensmitteln entstehen, wenn das darin enthaltene Cholesterin mit dem Luftsauerstoff reagiert. Dazu zählen Dauerwürste wie Salami oder roher Schinken sowie gekochtes Fleisch, das längere Zeit gelagert wird. Es ist bekannt, dass bei der herkömmlichen Reifung von Fleisch COPs entstehen können. Berücksichtigt man diese ubiquitäre Exposition von Verbraucherinnen und Verbrauchern gegenüber Cholesterinoxidationsprodukten, kann die zusätzliche Aufnahme über unter Sauerstoff-Schutzgas verpacktes Fleisch vernachlässigt werden.

1 Gegenstand der Bewertung

Das BfR wurde vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) um eine Risikobewertung hinsichtlich einer möglichen Gefährdung der Gesundheit durch sogenannte „Cholesterinoxide“ in Frischfleisch, das unter Schutzatmosphäre abgepackt wurde, gebeten. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die immer dann entstehen, wenn Cholesterin (allgemein bekannter als Cholesterin) mit Sauerstoff in Kontakt kommt.

Bei der Verpackung von Frischfleisch und Frischfleischerzeugnissen unter Schutzatmosphäre werden Gase eingesetzt, die gegenüber der Luft-Zusammensetzung einen erhöhten Anteil von Sauerstoff aufweisen.

2 Ergebnis

„Cholesterinoxide“ (COPs) sind Oxidationsprodukte des Cholesterins. Es sind bis zu 80 verschiedene Verbindungen bekannt, die durch enzymatische und nicht-enzymatische Oxidation gebildet werden. Diese werden im Organismus durch endogene Oxidation gebildet, entstehen aber auch in Lebensmitteln durch Autoxidations-Prozesse und werden mit diesen aufgenommen. Eine Resorption wurde nachgewiesen. Sie können daher auch in Nahrungsmitteln, wie Fleisch, fettreichen Ei- und Milchprodukten sowie in zahlreichen anderen Cholesterin-haltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden. Sie entstehen quasi ubiquitär aus Cholesterin.

COPs zeigen verschiedene biologische Wirkungen auf zellulärer Ebene, die zum Teil weiterer Abklärung bedürfen. So wurden cytotoxische Wirkungen, Veränderungen der zellulären

Membraneigenschaften und verschiedene Enzym-Hemmungen beschrieben, wobei die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase den bedeutsamsten Effekt darstellt. Auch mutagene Effekte wurden nachgewiesen. Ganz überwiegend wurden diese Ergebnisse jedoch in Untersuchungen erhalten, die in vitro durchgeführt wurden. Da für diese Wirkungen in der Regel keine in vivo Untersuchungen vorliegen, lässt sich eine Relevanz hinsichtlich gesundheitlicher Risiken für den Menschen nicht ableiten. In Bezug auf eine atherogene (arterioskleroseauslösende) Wirkung sind COPs möglicherweise kritischer zu beurteilen als das Cholesterin selbst. Hinweise liegen aus entsprechenden Tiermodellen vor. Die genauen Wirkmechanismen sind allerdings nicht bekannt. Das Ausmaß einer Beteiligung von COPs an atherogenen Prozessen kann derzeit nicht genau beurteilt werden. Sie wäre nur dann von Bedeutung, wenn ausreichend hohe Mengen hiervon aufgenommen werden. Die durchschnittliche Aufnahme von COPs über Lebensmittel ist nicht genau bekannt. Die Aufnahme über Fleisch, das unter einer Schutzgasatmosphäre gelagert wurde, trägt nach den bisher vorliegenden wenigen Ergebnissen vermutlich nur unwesentlich zur Gesamtexposition bei. Ein spezifisch hierdurch erhöhtes Risiko ist deshalb derzeit nicht zu erkennen.

3 Begründung

3.1 Agens

Cholesterin (früher: Cholesterin) spielt im Säugetierorganismus eine wichtige physiologische Rolle u. a. beim Aufbau der Zellmembranen und als Ausgangssubstanz zur Synthese von Gallensäuren, Vitamin D und Steroidhormonen (Sottero et al., 2009). Beim Menschen wird Cholesterin endogen synthetisiert (ca. 90 %, bei Erwachsenen ca. 1-2 g täglich) und nur zu einem kleinen Teil mit der Nahrung aufgenommen; Cholesterin ist kein essentieller Nahrungsbestandteil. Die tägliche Cholesterin-Aufnahme beträgt beim Erwachsenen 0,2 bis 0,5 g. Cholesterin ist in nennenswerten Mengen nur in Lebensmitteln tierischer Herkunft enthalten; dabei liegt es z.T. in mit Fettsäuren veresterter Form vor. Rind- und Schweinefleisch enthält zwischen 70 und 125 mg/100 g, Fisch zwischen 30 und 40 mg/100 g, Leber ca. 320 mg/100 g, Vollei ca. 300 mg/100 g, Milch ca. 12 mg/100 g und Butter ca. 280 mg/100 g (Ternes et al. 2005). Nahrungsmittel, welche relevante Mengen an Cholesterin enthalten, stellen auch wichtige Quellen für gesättigte Fettsäuren dar (EFSA 2010).

Die Autooxidation von Cholesterin bei Kontakt mit Sauerstoff ist schon lange bekannt. Erste Berichte gehen bis auf die vorletzte Jahrhundertwende zurück (Schultz und Winterstein 1904). Nach Smith (1981) gibt es ca. 80 verschiedene Oxidationsprodukte. Derzeit spielen acht Verbindungen in Lebensmitteln quantitativ die größte Rolle (z.B. Novelle et al. 1998; Savage et al. 2002):

- drei 7-Derivate (7-Ketocholesterin, 7 α -Hydroxycholesterin, 7 β -Hydroxycholesterin)
- zwei 5,6-Epoxide (5 β 6 β - und 5 α 6 α -Epoxycholesterin)
- ein Triol (3 β 5 α 6 β -Cholestantriol) und
- zwei durch Seitenketten-Oxidation entstandene Verbindungen (20 α - und 25-Hydroxycholesterin).

Die Verbindungen werden als „Cholesterin-Oxidationsprodukte“ (COP) bezeichnet (engl. auch „Oxysterole“). Neben diesen primären Produkten gibt es eine Vielzahl sekundärer Verbindungen.

3.1.1 Entstehung von COPs

Geschwindigkeit, Verlauf und Ausmaß des Oxidations-Prozess werden durch viele Faktoren beeinflusst, so durch Temperatur, Zeit und Licht, durch ungesättigte Fettsäuren als Radikalbildner und andere Begleitstoffe, sowie durch technologische Verfahren, Verpackung und Lagerung (Ternes et al. 2005). In Fleisch und Fleischerzeugnissen bestehen grundsätzlich günstige Voraussetzungen für die Bildung von COPs, da ein hoher Gehalt an prooxidativ wirkenden Eisen-Ionen und ungesättigten Fettsäuren zusammentreffen (Münch und Arneith 2001).

Untersuchungen zur Auswirkung der Lagerung von überwiegend erhitzten Fleischerzeugnissen wurden von Münch und Arneith (2001) durchgeführt. Dabei zeigten sich bei ungelagertem Schweinekotelett keine wesentlichen Unterschiede zwischen rohem, frisch gekochtem und frisch gebratenem Zustand (Ausgangswerte): die Gehalte der acht oben genannten COPs lagen überwiegend zwischen knapp 30 und ca. 50 µg/kg; höhere Gehalte fanden sich lediglich für 7-Ketocholesterol (85-90 µg/kg), während das Seitenketten-Derivat 20 α -Hydroxycholesterol nicht messbar war (wie auch bei allen weiteren Untersuchungen). Die genannten Gehalte fanden sich in etwa auch bei anderem Schweine- und Rinderfleisch. Bei vorherigen Untersuchungen (Münch et al. 1999) hatte sich nach 7-tägiger Kühlung (8 °C) ein Anstieg von 7 β -Hydroxycholesterol von maximal 30-fach bei gebratenem Schweinefleisch und von maximal 100-fach bei gekochtem Schweinefleisch gezeigt. Bei ungekühlter Lagerung (90 Tage) eines rohen Rindfleischerzeugnisses unter Luftatmosphäre wurde nur ein geringer Anstieg bis maximal dem Doppelten der Ausgangswerte beobachtet. Bei der Tiefkühl Lagerung von Putenformschnitzel über ein Jahr wurde ein Anstieg von 7 β -Hydroxycholesterol auf 5000 µg/kg beobachtet, allerdings lagen in diesem Fall bereits die Ausgangswerte schon 15-fach über den sonst gemessenen Ausgangswerten. Bei der Kühlung (7 °C) in Alu-Folie von für den Direkt-Verzehr bestimmten Schweinekammern zeigte sich nach 7 Tagen, dass in gepökeltem Zustand maximal dreifach höhere Werte für einzelne Verbindungen messbar waren. Dagegen zeigte sich bei gleichzeitig untersuchten gesalzenen Schweinekamm- Erzeugnissen, dass bereits die Ausgangswerte bis zu 65-fach höher gegenüber den gepökelten Erzeugnissen lagen. Nach 7 Tagen Lagerung unter den genannten Bedingungen waren die Gehalte von 7-Ketocholesterol auf das 275-fache der üblichen Ausgangswerte gestiegen (11000 µg/kg).

Insgesamt belegen die (hier nur teilweise wiedergegebenen) Ergebnisse, dass unter ungünstigen Lagerungsbedingungen erhebliche Steigerungen der COP-Gehalte möglich sind, die für einzelne Verbindungen den zweistelligen ppm-Bereich erreichen können. Es zeigte sich aber auch, dass die Ergebnisse teilweise schwer vorhersagbar waren (z.B. sehr unterschiedliche Werte für verschiedene Chargen aus einer Produktion). Dies liegt vermutlich am Zusammenspiel von vielen Faktoren, deren Gesamteffekt derzeit schwer zu kalkulieren ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Münch und Arneith (2001) zum (geringen) Einfluss von Kochen und Braten kamen Al-Saghir et al. (2004) zu dem Ergebnis, dass das Dünsten von Lachs-Filets (12 Minuten) und das Frittieren in der Pfanne mit verschiedenen Ölen (6 Minuten) großen Einfluss auf die Bildung von COPs haben kann. Die Summe der COPs stieg von 0,9 µg/g extrahiertes Fett nach dem Erhitzen auf 6,0 µg/g (Pfanne ohne Öl), 4,0 µg/g (Pfanne mit Olivenöl), 4,4 µg/g (Pfanne mit Maisöl), 3,3 µg/g (Pfanne mit partiell hydrolysiertem Öl) bzw. 9,9 µg/g extrahiertes Fett (Dünsten). Es fand sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Fettsäure-Zusammensetzung und dem Gesamtgehalt an COPs.

3.1.2 Zusätzliche Entstehung von COPs unter Sauerstoff-Schutzgas

In Bezug auf verschiedene Schutzgase ist in dem hier diskutierten Zusammenhang nur der Einsatz von Sauerstoff-Schutzgas mit deutlich über dem Gehalt von Luft (21 %) liegenden Konzentrationen relevant.

Untersuchungen zur zusätzlichen Entstehung von COPs bei Lagerung von Fleisch und Fleischprodukten unter Sauerstoff-Schutzgas liegen nur sehr begrenzt vor. Boselli et al. (2009) untersuchten Rindfleisch (vorwiegend Scheiben von 5-6 mm Dicke mit einer Masse von 100-120 g,) abgepackt unter Luftatmosphäre oder einer modifizierten Atmosphäre mit 32 % Sauerstoff, 30 % Stickstoff und 38 % Kohlendioxid. Die Lagerung bis zu 8 Tage bei 4 °C zeigte für die Summe von 6 untersuchten COPs in etwa doppelt so hohe Werte bei der modifizierten Atmosphäre im Vergleich zur Lagerung unter Luftatmosphäre. Der in diesem Zusammenhang wichtigen Frage, inwieweit es sich hier um einen nur an der Oberfläche stattfindenden Prozess handelt, wurde durch zusätzliche Untersuchung von dickeren Fleischstücken nachgegangen. Dabei beobachteten die Autoren bei auf g Fett bezogenen COP-Werten keine Abhängigkeit von der Dicke der Stücke bei modifizierter Atmosphäre (möglicherweise bedingt durch den höheren Sauerstoffpartialdruck), während sich eine negative Korrelation dieser Parameter unter Luftatmosphäre zeigte.

Rohes und erhitztes Hackfleisch wurde bei Lagerung bis zu 15 Tage unter einer modifizierten Atmosphäre mit höherem Sauerstoff-Partialdruck (80 % Sauerstoff, 20 % Kohlendioxid) bei 3-4 °C untersucht (Ferioli et al., 2008). Bei der Summe der 3 untersuchten COP-Verbindungen zeigte sich für das rohe Hackfleisch ein signifikanter Anstieg der Werte während der Lagerung von 10,4 µg/g Fett am Tag 1 auf 30,7 µg/g Fett am Tag 8 und 60,5 µg/g Fett am Tag 15. Durch die Erhitzung zeigte sich kein Effekt auf die COP-Gehalte in frisch verpacktem Hackfleisch; bei Lagerung unter den genannten Bedingungen fand sich nach 15 Tagen ein Anstieg auf 103,2 µg/g Fett. In dieser Studie erfolgte keine vergleichende Untersuchung bei Lagerung unter Luftatmosphäre, so dass zumindest ein Teil des beobachteten COP-Anstieges allein durch den Lagerungsprozess bedingt sein könnte.

Münch und Arneth (2001) fanden bei Anwendung einer nicht näher beschriebenen „Schutzgasatmosphäre“ eine gegenüber Luftlagerung verminderte COP-Entstehung bei Geflügelprodukten; vermutlich wurde hier eine Stickstoff/Kohlendioxid-Mischung eingesetzt (Mitteilung des Max-Rubner-Instituts vom 24.02.2010).

3.1.3 Vorkommen von COPs in Lebensmitteln: Markterhebung aus Österreich

Daten zum generellen Vorkommen von COPs in Lebensmitteln liegen aus zahlreichen Untersuchungen vor. Umfangreiche Analysen wurden jüngst in einem österreichischen Forschungsprojekt vorgenommen (VUW 2007). Ziel des Projektes war es, mittels einer Markterhebung festzustellen, inwieweit handelsübliche Lebensmittel tierischer Herkunft mit COPs belastet sind. Dazu wurden drei Gruppen von Lebensmitteln ausgewählt, in denen aus Erfahrungen früherer Untersuchungen relevante Mengen an COPs erwartet wurden:

- Produkte, in denen Eipulver verarbeitet wurde,
- Fertigenüs und
- Lebensmittel, welche aufgrund ihrer mikrobiellen Stabilität besonders lange gelagert werden können (z.B. Parmesan).

Nach Angaben der Autoren hatte die Markterhebung besondere Bedeutung, da es nur sehr schwer möglich ist, aus Modellsystemen im Labor auf den tatsächlichen Gehalt von COPs in

den im Handel angebotenen Lebensmitteln zu schließen. Faktoren wie Lagerung und Zusammensetzung (vor allem natürliche und künstlich zugesetzte Antioxidantien haben großen Einfluss) können alle Ergebnisse wesentlich beeinflussen.

Mittels einer LC-MS-basierten Methode wurden 7 COPs analysiert (die oben genannten Verbindungen ohne 20α -Hydroxycholesterol). Die Studie umfasste insgesamt 180 Lebensmittelproben, wobei COPs-Gehalte (Summe der 7 analysierten Verbindungen) von 181 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Lebensmittel in Schmelzkäsescheiben bis zu 3567 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Lebensmittel in gekühlt gelagerter Salami gefunden wurden. Hohe Gehalte oberhalb von 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurden auch in Rohschinken und Hühnerei gefunden. Die COPs-Entstehung bei der Verarbeitung hat sich dabei als starker Einflussfaktor erwiesen. Auch die Lagerung von Wurstwaren im Kühlschrank (4 Tage, 4 °C) erhöhte den COPs-Gehalt beträchtlich. Industriell verpackte Lebensmittel waren dagegen meist stabiler. Milchprodukte erwiesen sich generell als resistent gegenüber Oxidationsreaktionen.

Im Rahmen der Studie wurde der Cholesterolgehalt nicht bestimmt. Um dennoch eine Aussage über die Stabilität des Cholesterols zu erhalten, wurde mit Hilfe von Nährwerttabellen soweit als möglich der Cholesterolgehalt der einzelnen Lebensmittelgruppen ermittelt und in Relation zu den jeweiligen im Mittel gemessenen COPs-Gehalten gesetzt. Die Cholesterolgehalte in den meisten Lebensmittel waren mit Anteilen unter 0,1 % recht wenig oxidiert. Dies traf auf alle Fleischproben (Faschiertes, Rindsbraten, Fleischkonserve) sowie die untersuchten Käseproben (Schmelzkäse und Hartkäse) zu. Sogar Hühnereier zeigen sich trotz des hohen Cholesterolgehalts sehr stabil. Etwas anfälliger bezüglich einer Cholesteroolxidation waren Lachsproben mit Anteilen von 0,1 bis 0,2 % COPs. Dies könnte nach Ansicht der Autoren auf die im Vergleich zum Fleisch höheren Gehalte an ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen sein, die sich fördernd auf die Cholesteroolxidation auswirken können (siehe oben, Al-Saghir et al. 2004). Die im Vergleich mit den anderen analysierten Lebensmitteln höchsten Anteile an COPs fanden sich in Rohschinken- und Salamiprüben. Dies weist darauf hin, dass die Verarbeitungsbedingungen und die lange Lagerung während des Reifungsprozesses die Cholesteroolxidation fördern.

3.2 Gefährdungspotenzial

Im Zentrum der hier geführten Diskussion um mögliche gesundheitliche Risiken durch COPs stehen ihre mögliche Beteiligung an atherogenen Prozessen sowie ihre möglichen kanzerogenen und mutagenen Wirkungen.

3.2.1 Mögliche Beteiligung an atherogenen Prozessen

Die Bildung der Atherosklerose sowie die Induktion damit im Zusammenhang stehender Herz-Kreislaufkrankungen stellen ein multifaktorielles, letztlich noch nicht zufriedenstellend geklärtes Geschehen dar. Als mögliche Teilfaktoren werden dabei die Aufnahme von Cholesterin über die Ernährung und die Höhe der Konzentration an Cholesterin im Blut angesehen, insbesondere die sogenannten Low-Density-Lipoproteine (LDL), welche Lipoproteine geringer Dichte mit hohem Cholesterinanteil darstellen und einer der beiden Haupttransporteure für Cholesterin sind.

Beim Vergleich der biologischen Effekte von Cholesterin und COPs werden in der wissenschaftlichen Literatur insbesondere die COPs im Zusammenhang mit der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert (Witztum und Steinberg, 1991). COPs gelangen durch den Verzehr von Lebensmitteln, die diese Verbindungen enthalten, in den Organismus und entstehen

ebenfalls endogen bei der körpereigenen enzymatischen und nicht-enzymatischen Oxidation von Cholesterol (Sottero et al., 2009; Linseisen und Wolfram, 1998).

Studienergebnisse am Tiermodell weisen darauf hin, dass COPs zu Beschädigungen des Gefäßendothels (zum Gefäßlumen hin gerichtete Zellen) und von Muskelzellen der glatten Muskulatur führen können, die Permeabilität von Gefäßen beeinflussen sowie allein und in Kombination mit Cholesterol experimentell atherosklerotische Veränderungen induzieren können (Peng et al., 1991). COPs sind u. a. in der Lage, die Prostaglandinsynthese zu beeinflussen sowie die Thrombozytenaggregation zu stimulieren, wichtige Prozesse im Zusammenhang mit der Förderung von Atherosklerose und Thrombose (Guardiola et al., 1996). Dabei scheint Cholesterol *per se* kaum und im Vergleich zu COPs deutlich weniger biologisch aktiv zu sein, während sich Oxidationsprodukte des Cholesterols als reaktive Mediatoren struktureller und funktioneller Veränderungen von Gefäßen zeigten (Leonarduzzi et al., 2002; Guardiola et al., 1996).

In diesem Zusammenhang sind Befunde an indischen Immigranten in London interessant, welche, ohne besondere Risikofaktoren aufzuweisen, auffallend häufig unter Atherosklerose litten. Der Autor bringt dies mit dem von diesen Personen verzehrten Buttererzeugnis „Ghee“ in ursächlichen Zusammenhang, welches in 100 g Erzeugnis 210 mg Cholesterol enthielt. Im Gegensatz zu normaler Butter mit etwa 0,1 % lagen hier in Bezug auf das Cholesterol 12,3 % als COPs vor (Jacobson 1987). Andere Autoren fanden bis zu 11,6 % COPs in Bezug auf das in „Ghee“ enthaltende Cholesterol (Kumar and Singhal, 1991).

3.2.1.1 Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen

Das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen ist ein multifaktorieller Prozess. Der mögliche Anteil von COPs am Gesamtgeschehen aufgrund der diskutierten ungünstigen biologischen Effekte ist derzeit nicht genau bestimmbar.

Die EFSA hat sich aktuell im Jahre 2010 zum Risiko für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Zusammenhang mit der Cholesterolaufnahme geäußert. Danach besteht zwischen der Zufuhr von Cholesterol über Lebensmittel und der Konzentration an LDL-Cholesterol im Blut eine direkte dosisabhängige Beziehung. Jedoch ist für die Höhe der Werte an LDL-Cholesterol im Blut die Aufnahme gesättigter Fettsäuren über die Nahrung bedeutsamer. Aus Interventionsstudien und epidemiologischen prospektiven Kohortenstudien kann geschlossen werden, dass die Fettsäurezusammensetzung der menschlichen Ernährung ein wichtiger Faktor für das Risiko des Auftretens von Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellt. Dabei kann durch eine Abnahme des Verzehrs gesättigter Fettsäuren und Transfettsäuren und eine Zunahme der Aufnahme von Fischölen das kardiovaskuläre Risiko gesenkt werden. Die verfügbaren Daten zum Verhältnis der Aufnahme von Cholesterol und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit Blick auf aktuelle Aufnahmemengen inkonsistent (EFSA, 2010):

3.2.2 Mögliche kanzerogene und mutagene Eigenschaften

3.2.2.1 In vitro Befunde

Für Gemische aus verschiedenen COPs konnten *in vitro* (bakterielles System) mutagene Eigenschaften nachgewiesen werden (Ansari et al., 1982; Smith et al 1986). Bei weiteren detaillierten Untersuchungen mit Säugerzellen in Kultur und bakteriellen Systemen wurde gezeigt, dass sowohl das 7 α - als auch das 5 α -Hydroperoxid mutagene Effekte induzieren.

Diese Peroxide sind wahrscheinlich nicht per se mutagen, sondern wirken über entstehende reaktive Sauerstoffstoff-Spezies.

Blackburn et al. (1979) sowie Sevanian and Peterson (1984) berichten über mutagene Wirkungen von $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol, was zunächst von anderen Autoren nicht bestätigt wurde (Ansari et al., 1982; Glatt et al., 1983; Kadis 1978). Dagegen wurde von Sevanian und Peterson berichtet (1986), dass das $5\beta,6\beta$ -Epoxycholesterol eine größere mutagene Potenz in V79 Zellen aufzeigte als die $5\alpha,6\alpha$ -Verbindung. Die Mutations-Frequenzen waren für beide Verbindungen erhöht. Das β -Epimer war jedoch nahezu 3-fach potenter als sein α -Epimer (Peterson et al., 1988). Beide Epoxide wurden metabolisch zum Triol hydrolysiert, das hinsichtlich einer mutagenen Wirkung völlig inaktiv ist. Das $5\beta,6\beta$ -Epoxycholesterol wurde doppelt so schnell wie das $5\alpha,6\alpha$ -Epimer zum Triol umgesetzt.

$5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol induzierte außerdem eine morphologische Transformation in Hamster-Embryo-Zellen und in Maus-C3H-Zellen im entsprechenden *in vitro* Assay (Kelsey and Pienta, 1981; Raaphorst et al., 1987).

All diese Ergebnisse wurden in *in vitro* Untersuchungen gewonnen. Entsprechende *in vivo* Untersuchungen auf ein gentoxisches Potenzial liegen für diese Verbindungen nicht vor.

3.2.2.2 In vivo Befunde

Nach Morin et al. (1991) wird als relevantes COP nur das $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol genannt, für das eine carcinogene Wirkung festgestellt werden konnte, da dieses Epoxid die Bildung von lokalen Sarkomen in der Maus nach einer subcutanen Applikation in wässriger Suspension (10 mg/Maus) induzierte.

Des Weiteren wird von einer Korrelation zwischen $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol-Gehalten und Hautkrebs berichtet. Nach einer UV Bestrahlung der Haut beim Menschen sowie bei der Maus konnten erhöhte Gehalte von diesem Epoxid nachgewiesen werden (Black und Lo 1971; Black und Douglas 1972, Black und Chan 1976). Ein Anstieg der $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol Konzentration in der Haut war mit einer erhöhten Inzidenz an Hautkrebs bei der Maus korreliert. Jedoch wurden offenbar auch andere COPs in der Haut gefunden, die nachweislich keine kanzerogenen Eigenschaften besitzen. Eine kausale Verknüpfung zwischen dem Epoxid und der Entstehung von Hautkrebs ist dadurch jedoch nicht belegt.

Zusammenfassend sind zur Problematik einer kanzerogenen oder mutagenen Wirkung von COPs in den letzten Jahren nur wenige und zudem zum Teil widersprüchliche Studien veröffentlicht worden. Hierbei handelt es sich um *in vitro* Ergebnisse. *In vivo* Untersuchungen liegen nicht vor. Aus den vorliegenden Befunden lässt sich nur für bestimmte COPs (Epoxide und Hydroperoxide) allenfalls ein mutagenes Potential unter *in vitro*-Bedingungen belegen. Hinsichtlich kanzerogener Wirkung liegt eine ältere Untersuchung vor (aus 1969 zitiert bei Morin et al., 1991), bei der das Agens – das $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol – subkutan appliziert wurde. Es handelt sich hierbei nicht um eine längerfristige Studie mit relevanten Dosierungen und oraler Applikation. Das Ergebnis ist deshalb für die Beurteilung hier nicht relevant. Innerhalb der letzten 10 Jahre wurde offenbar zu diesem Themenkomplex keine weitere wissenschaftliche Literatur mehr publiziert. Belege für mögliche gesundheitliche Risiken hinsichtlich einer mutagenen und/oder kanzerogenen Wirkung können daher aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden.

Die Cytotoxizität der COPs beruht vor allem auf der Fähigkeit, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, zu hemmen. Des Weiteren kann der Membranbaustein Cholesterin durch COPs ersetzt werden, wodurch es zu Veränderungen der Fluidität, Permeabilität und Stabilität der Zellmembranen kommt. In *in vitro* Versuchen erwiesen sich 3β 5α 6β -Cholestantriol und 25-Hydroxy-Cholesterin als stark cytotoxisch, gefolgt von 7-Ketocholesterin und einem 7-Hydroxycholesterin. Diese cytotoxischen Effekte wurden hauptsächlich in Säugerzellkulturen untersucht. Deshalb können diese *in vitro* Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die Situation beim Menschen extrapoliert werden. Eine Relevanz ist deshalb fraglich (Guardiola et al., 1996).

3.3 Zusätzliche Exposition

Wie unter 3.1.2 beschrieben ist durch die Lagerung von Fleisch und Fleischprodukten unter einer mit erhöhtem Sauerstoff-Partialdruck modifizierten Atmosphäre mit einer erhöhten Bildung von COPs zu rechnen. Die einzige vorliegende, direkt vergleichende Untersuchung von Boselli et al. (2009) fand bei den Gehalten allerdings nur eine Differenz um den Faktor zwei. Insgesamt ist die Datenlage daher zur Entstehung von COPs unter Sauerstoff-Schutzgas sehr unzureichend. Zu erwarten ist eine Abhängigkeit u.a. von der Dauer der Lagerung, dem Zerkleinerungsgrad des Fleisches und der Höhe des Sauerstoff-Partialdrucks.

Diese derzeit nicht genau quantifizierbare Bildung von COPs bei Lagerung von Fleisch und Fleischprodukten unter modifizierter Atmosphäre mit gegenüber Luft erhöhtem Sauerstoff-Partialdruck muss in Relation zu der ohnehin bei Lagerung unter normalen Bedingungen stattfindenden Bildung von COPs gesehen werden. Wie unter 3.1.1 ausführlich dargestellt, ist diese Bildung von sehr vielen Faktoren abhängig, sie kann jedoch erhebliche Konzentrationen erreichen (z.B. in lange gelagerter Salami).

Bei Berücksichtigung des Bildes der COP-Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln, das sich aus der österreichischen Markterhebung ergibt (VUW 2007, siehe 3.1.3), und der z.T. starken Erhöhung von COP-Gehalten bereits unter normalen Lagerungsbedingungen kommt eine grobe Abschätzung zu dem Ergebnis, dass nach derzeitigem Wissensstand die zusätzliche Exposition gegenüber COPs durch unter Sauerstoff-Schutzgas gelagertes Fleisch vermutlich kaum zur Gesamtexposition mit diesen Verbindungen beiträgt. Eine genauere Abschätzung scheidet derzeit sowohl an der geringen Zahl von Untersuchungen mit Sauerstoff-Schutzgas als auch daran, dass mehrere grundsätzliche Fragen noch besser geklärt werden müssen (z.B. wie valide sind die analytischen Labormethoden, welche Aussagekraft kommt einem Summenwert zu). Weiterführende Untersuchungen sind daher erforderlich, um die Exposition besser abschätzen zu können.

3.4. Risikocharakterisierung

COPs entstehen quasi ubiquitär enzymatisch und nicht-enzymatisch aus Cholesterin und Sauerstoff. In Nahrungsmitteln wie Fleisch, werden sie ausschließlich durch Autoxidationsprozesse gebildet. Sie entstehen aber auch endogen im Organismus. Es liegt damit eine ubiquitäre Belastung mit diesen Verbindungen vor. Für COPs wurden cytotoxische Wirkungen, Veränderungen der zellulären Membraneigenschaften und verschiedene Enzym-Hemmungen beschrieben, wobei die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase den bedeutsamsten Effekt darstellt. Auch mutagene Effekte wurden nachgewiesen. Ganz überwiegend wurden diese Ergebnisse jedoch in Untersuchungen erhalten, die *in vitro* durchgeführt wurden. Da hierzu in der Regel keine *in vivo* Untersuchungen vorliegen, lässt sich eine Relevanz hinsichtlich gesundheitlicher Risiken für den Menschen nicht belegen.

In Bezug auf eine atherogene Wirkung sind COPs jedoch kritischer zu beurteilen. Hier liegen entsprechende Hinweise aus Untersuchungen an Tiermodellen vor, die eine Beteiligung an einer solchen Wirkung nahelegen. Die genauen Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht bekannt. Die Beteiligung von COPs an atherogenen Prozessen ist aber nur dann von Bedeutung, wenn ausreichend hohe Mengen hiervon konsumiert werden. Die durchschnittliche Aufnahme von COPs über Lebensmittel ist nicht genau bekannt. Für die zusätzliche Aufnahme über Fleisch, das unter einer Schutzgasatmosphäre aufbewahrt wurde liegen nur sehr geringe Erkenntnisse vor, die für eine umfassende Beurteilung nicht ausreichen. Nach diesen bisherigen wenigen Informationen wird eine zusätzliche Exposition für relativ gering erachtet. Ein spezifisch hierdurch erhöhtes Risiko ist deshalb derzeit nicht zu erkennen.

3.5 Weitere Aspekte

Cholesterin ist ein lebenswichtiger Fettbestandteil und erfüllt beim Menschen vielfältige Stoffwechselfunktionen. Das Auftreten von COPs in Fleisch (und -erzeugnissen) ist im Rahmen der Fleischreifung als normal einzustufen. Es ist also immer mit einem gewissen Grundgehalt an COP-Verbindungen in Fleisch zu rechnen. Dies gilt für rohes wie auch erhitztes Fleisch.

Mit der Anwendung von Schutzgasatmosphären bei der Verpackung von Fleisch sollen überwiegend die physikalischen Eigenschaften des Fleisches beeinflusst werden. Verfahren zur Anwendung von Sauerstoff unter Hochdruck bei frischem Fleisch werden seit über einem Jahrzehnt bei Frischfleisch in Fertigpackungen angewendet. Hier hat sich die Kennzeichnung „unter Schutzatmosphäre verpackt, Sauerstoff“ durchgesetzt. Mikrobiologische Erfordernisse stehen bei diesen Verfahren im Hintergrund. Fleisch ist immer mit einem unvermeidlichen und unspezifischen Keimgehalt behaftet, der nicht primär als schädlich zu bewerten ist. Aufgrund von Literaturangaben scheint es offenbar nicht ausgeschlossen, dass bestimmte Schutzgase die Farbstabilität des Fleisches beim Erhitzen so verändern, dass es bei geringfügig niedrigeren Gar-Temperaturen als gewöhnlich seine typische rötliche Färbung verliert. Daraus können keine negativen Auswirkungen der Anwendung von Schutzgasatmosphäre bei der Verpackung von Fleisch auf die mikrobiologische Sicherheit des Fleisches aufgrund eines veränderten Verhaltens beim Erhitzen abgeleitet werden. Die küchenfertige Zubereitung des Fleisches durch den Verbraucher ist nur schwer allein anhand des Bräunungsgrades abzuschätzen: Schon die Tierart, das Alter und die Herkunft des Fleisches bewirken große Unterschiede im farblichen Erscheinungsbild. Aus diesem Grunde sind auch die hygienische Gewinnung und die sorgfältige Verarbeitung von Fleisch in der Lebensmittelkette von großer Bedeutung.

Warn-, Richt- oder gar Grenzwerte zum Vorkommen von COP-Verbindungen in Fleisch sind bislang nicht bekannt.

4 Referenzen

Al-Saghir S, Thurner K, Wagner KH, Frisch G, Luf W, Razzazi-Fazeli E, Elmadfa I. Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). *J Agric Food Chem*. 2004 Aug 11;52(16):5290-6.

Ansari GAS, Walker RD, Smart VB and Smith LL (1982) Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. *Food and Chemical Toxicology* 20: 35-41.

Blackburn GM, Rashid A and Thompson MH (1979) Interaction of 5 α , 6 α -cholesterol oxide with DNA and other nucleophiles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 420-421.

- Black HS and Chan JT (1976) Etiologic related studies of ultraviolet light-mediated carcinogenesis. *Oncology* 33:119-122.
- Black HS and Douglas DR (1972) Model system for the evaluation of the role of cholesterol α -oxide in ultraviolet carcinogenesis. *Cancer Research* 32:2630-2632.
- Black HS and Lo WB (1971) Formation of a carcinogen in human skin irradiates with ultraviolet light. *Nature* 234:306-308.
- Boselli E, Rodriguez-Estrada MT, Ferioli F, Caboni MF, Lercker G. Cholesterol photosensitized oxidation of horse meat slices stored under different packaging films. *Meat Sci.* 2010 Jul;85(3):500-5.
- EFSA (2010): Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). *EFSA Journal* 2010; 8(3):1461.
- Ferioli F, Caboni MF, Dutta PC Evaluation of cholesterol and lipid oxidation in raw and cooked minced beef stored under oxygen-enriched atmosphere. *Meat Sci* 80 (2008) 681-685
- Glatt H, Jung R and Oesch F (1983) Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides. *Mutation Research* 111:99-118.
- Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J (1996) Biological effects of oxysterols: current status. *Fd Chem Toxic*, Vol 34, No 2, 193-211.
- Jacobson MS (1987) Cholesteroloxydes in Indian ghee: possible cause of unexplained high risk of atherosclerosis in Indian immigrant populations. *The Lancet* Vol 2. September 19, 656-658.
- Kumar N, Singhal, OP (1991) Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. *J.Sci. Food Agric.* 55: 497-510.
- Kadis B (1978) Steroid epoxides in biological systems: a review. *Journal of Steroid Biochemistry* 9:75-81.
- Kelsey MI and Pienta RJ (1981) Transformation of hamster embryo cells by neutral sterols and bile acids. *Toxicology Letters* 9:177-182.
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem.* 2002 Dec;13(12):700-710.
- Linseisen J, Wolfram G (1998) Origin, metabolism, and adverse health effects of cholesterol oxidation products. *Fett/Lipid* 100, Nr. 6, 211-218.
- Morin RJ, Hu B, Peng SK, Sevanian A (1991) Cholesterol oxides and carcinogenesis. *J Clin Lab Anal* 5:219-225.
- Münch S, Arneth W, Grosch W (1999) Bildung von Oxidationsprodukten des Cholesterols in Schweinefleisch. *Fleischforschung und Entwicklung* 10:84-86.
- Münch S, Arneth W (2001) Untersuchungen zum Gehalt von Cholesteroloxyden in erhitzten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt BAFF* 152:177-186.
- Novelli E, Zanardi E, Ghiretti GP, Campanini G, Dazzi G, Madarena G, Chizzolini R. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella. *Meat Sci* 1998, 48:29-40
- Peng SK, Hu B, Morin RJ (1991): Angiotoxicity and atherogenicity of cholesterol oxides. *J Clin Lab Anal*, 5: 144-152.

- Raaphorst G P, Azzam E I, Langlois R and Van Lier JE (1987) Effect of cholesterol α and β epoxides on cell killing and transformation. *Biochemical Pharmacology* 36:2369-2372.
- Savage GP, Dutta PC, Rodriguez-Estrada MT (2002): Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in food. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 11(1): 72-78.
- Sevanian A and Peterson AR (1984) Cholesterol epoxide is a direct acting mutagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 81:4198-4202.
- Schultz, E. & Winterstein, E.: Über das Verhalten des Cholesterins gegen Licht. *Z. Physiol. Chemie*, 1904, 43, 316
- Smith, LL: *Cholesterol Autoxidation*. Plenum Press, New York, 1981.
- Smith LL, Smart VB and Made Gowda NM (1986) Mutagenic sterol hydroperoxides. *Mutation Research* 161:39-48.
- Sottero B, Gamba P, Gargiulo S, Leonarduzzi G, Poli G (2009): Cholesterol oxidation products and disease: An Emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, 16: 685-705.
- Ternes W, Täufel A, Tunger L, Zobel M *Lexikon der Lebensmittel und der Lebensmittelchemie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 4. Auflage 2005.
- VUW 2007, Veterinärmedizinische Universität Wien, Department für öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin Institut für Milchhygiene, Milchtechnologie und Lebensmittelwissenschaft. Cholesterinoxide in Lebensmitteln, Abschlussbericht des Forschungsprojekt Nr.: 1369, BMLFUW, GZ 21.210/65-II/1/03. Projektnehmer Prof. Wolfgang Luf. www.dafne.at/dafne_plus_homepage/index.php?section=dafneplus&content=result&come_from=&&project_id=627
- Witztum JL, Steinberg D (1991): Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, Vol 88, 1785-1792.