

Synergien und Verbreitungswege von emetischen *B. cereus* Toxinen in Lebensmitteln und Entwicklung von Strategien zur Hemmung der Toxinbildung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München School of Life Sciences Forschungsdepartment Molecular Life Sciences Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik Prof. Dr. Corinna Dawid/Prof. Dr. Thomas Hofmann/ Dr. Timo Stark
Forschungsstelle II:	Veterinärmedizinische Universität Wien Department für Pathobiologie Institut für Mikrobiologie Abt. für Funktionelle Mikrobiologie Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Projektkoordinatorin: Angelika Schlößler Käserei Champignon Hofmeister GmbH & Co. KG, Lauben
Laufzeit:	2017 - 2021
Zuwendungssumme:	€ 499.060,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Ob tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, ob im Unternehmen hergestellt oder im Haushalt verarbeitet: Das weltweit verbreitete Bodenbakterium *Bacillus cereus* ist nicht nur im Boden, sondern auch in einer Vielzahl von Lebensmitteln gegenwärtig. Auch bei sehr hohen Hygienestandards ist es in vielen Bereichen des Lebensmittelsektors nahezu unmöglich, eine Kontamination mit dem Bakterium zu vermeiden, da dieses hitze- und säureresistente Endosporen bildet. So weisen z.B. Milchprodukte (bis zu 75 %), Salate und getrocknete Pilze (80-90 %) und Gewürze (nahezu 100 %) hohe Kontaminationsraten auf. Die Sporen des Keims überleben auch bei starker Hitze und bringen bei niedrigeren Temperaturen wieder vermehrungsfähige Bakterien hervor. Häufig bilden diese dann Toxine, wie z.B. das emetische Toxin Cereulid, sowie die im Rahmen des IGF-Projekts AiF 16845 N erstmals identifizierten, strukturhomologen Isocereulide. Die hohe Hitze-, Säure- und Druck-stabilität sowie die geringe Größe (ca. 1.2 kDa) dieser

Dodecadepsipeptide machen eine Entfernung, z.B. durch Erhitzung oder eine Entkeimungsfiltration, nahezu unmöglich, so dass das Toxin über den Konsum kontaminierter Lebensmittel in den Verdauungstrakt gelangt.

In den letzten Jahren häufen sich Berichte über Cereulid-Intoxikationen: Die Aufnahme über ein kontaminiertes Lebensmittel führt typischerweise zum akuten Erbrechen, kann jedoch auch schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen, die in Einzelfällen sogar tödlich verlaufen können. *B. cereus* stellt daher sowohl für kleine als auch für große Unternehmen der Lebensmittelindustrie ein erhebliches Problem dar, wie auch jüngste Rückrufaktionen zeigen.

In Ermangelung evidenzbasierter Grenzwerte gilt derzeit eine „Null-Toleranz“ für Cereulid in den USA; ähnliches wird für Deutschland diskutiert. Diese „Null-Toleranz“ ist jedoch in Anbetracht der stetig zunehmenden Sensitivität der Analytik auf Dauer nicht umsetzbar, da sie die Produzenten vor massive technologische Probleme stellt und ggf. die Sperrung bzw. Ver-

nichtung ganzer Produktchargen nach sich zieht, ohne einen signifikanten Beitrag zur Konsumentensicherheit zu leisten.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die biologische Wirkung der neuen Toxinvarianten (Isocereulide) sowie additive bzw. synergistische Effekte der einzelnen Toxine zu klären und somit eine Grundlage für die Erarbeitung evidenz-basierter Grenzwerte im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes zu schaffen. Zudem sollten potentielle Quellen für den Eintrag und die Verschleppung von Cereulidtoxinen in der Lebensmittelverarbeitung ermittelt werden. Einen weiteren Schwerpunkt bildete die Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen, die die Produktion von Cereulid und Isocereuliden inhibieren, sowie die Erarbeitung von Grundlagen für eine gezielte Rezepturenentwicklung zur Verhinderung von Lebensmittelintoxikationen.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurden zusätzlich zu den bereits beschriebenen Isocereulide A–D und F+G (IGF-Projekt AiF 16845 N) sieben neue Isocereulide H–N identifiziert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Die im IGF-Projekts AiF 16845 N entwickelte UPLC-MS/MS-Quantifizierungsmethode für Cereulid und die Isocereulide A–G wurde erweitert und erlaubt nun die gleichzeitige Quantifizierung aller bekannter Isocereulide A–N. In-vitro-Zytotoxizitätsstudien zeigten, dass drei der Isovarianten einzeln 3-7-fach toxischer wirken als Cereulid. Außerdem konnten mit Hilfe der In-vitro-Toxizitätsstudien sowohl additive als auch synergistische Wirkungen für Isocereulide in Kombination mit Cereulid nachgewiesen werden. Die stärkste synergistische Wirkung zeigte sich für das natürliche Verhältnis von Cereulid zu Isocereuliden, dessen Toxizität das von reinem Cereulid um das ca. 14-fache überstieg.

Die Studien zur Lokalisierung von Cereulid innerhalb eines Lebensmittels zeigten, dass mit der Erhöhung des Milchfettanteils eine Verschiebung der Toxinverteilung von der wässrigen zur fetthaltigen Phase erfolgt. Diese Ergebnisse legen nahe, bei Untersuchungen von Produkten mit erhöhtem Fettgehalt in der Lebensmittelproduktion ein besonderes Augenmerk auf die Cereulidanalytik zu legen.

Die Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob Cereulid durch Sporen in Lebensmittelproduktionsprozessen und in Lebensmitteln verbreitet werden kann, ergaben, dass grundsätzlich Sporen als Verbreitungsvehikel in Frage kommen

können. Ebenso zeigte sich, dass ein Übertritt von an Sporen gebundenem Cereulid in Milch stattfindet, insbesondere bei erhöhtem Fettanteil.

Ein kombinatorischer Ansatz aus einem bakteriellen Zellkultur-Assay und der schnellen UPLC-MS/MS-Methode ermöglichte die parallele Untersuchung der Zellviabilität und der Quantifizierung von Cereulid. Mittels dieses neu entwickelten Systems konnten in einem breit angelegten Screening pflanzliche Naturstoffe und Polyphosphate identifiziert werden, die eine sehr starke Hemmwirkung auf das Wachstum der Bakterien und/oder die Cereulidproduktion zeigten.

Basierend auf den Projektergebnissen wurde gemeinsam mit den Mitgliedern des Projektbegleitenden Ausschusses der Industrie eine Checkliste erarbeitet, die es Unternehmen ermöglicht, Lebensmittelverarbeitungsprozesse gezielt nach potentiellen Kontaminationen mit dem Toxin Cereulid zu untersuchen und entsprechende Kontrollpunkte zu definieren bzw. sensible Prozessschritte prospektiv zu identifizieren.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die emetische Form der von *B.-cereus*-verursachten Lebensmittelvergiftungen wird häufig im Zusammenhang mit Reis- und Pasta-Gerichten berichtet, allerdings liegen auch aktuelle Fallberichte zu Milchprodukt-assoziierten Ausbrüchen aus Deutschland und der Schweiz vor. Emetische *B.-cereus*-Stämme wurden zudem aus Milch, Milchpudding, proteinhaltiger Kindernahrung und Speiseeis isoliert.

Die im Rahmen des Vorhabens erhobenen Daten zur Ermittlung von Toxinverbreitungswegen ermöglichen es Unternehmen (KMU), anhand einer Checkliste potentielle Kontaminationsquellen zu identifizieren, gezielte Probenahmen in ihren Betrieben durchzuführen, gewonnene Erkenntnisse zur Hemmung und Verbreitung der Toxine einzusetzen und im Bedarfsfall kostengünstige und schnelle LC-MS-basierte Analysen durchführen zu lassen, um sich vor ungerechtfertigten Regressforderungen zu schützen. Letzteres ist vor allem für kleine und mittelständische Unternehmen von essentieller Bedeutung, da Schadensersatzforderungen eine wirtschaftliche Tragweite haben können, die für Betriebe dieser Größenordnung existenzgefährdende Formen annehmen können. Im Kontext des globalen Handels und des kompetitiven Wettbewerbs durch neue Mitbewerber, u.a. aus dem asiatischen Raum, können für optimierte HACCP-Konzepte

und Präventionsstrategien einen wichtigen Beitrag zur Standortsicherung im Besonderen für KMU leisten.

Die deutsche Milchindustrie ist mit einem jährlichen Umsatz von knapp 28 Mrd. € (2019) einer der umsatzstärksten Wirtschaftszweige der Lebensmittelindustrie. Über den durch *B. cereus* bundesweit entstehenden Schaden existieren zwar keine statistischen Erhebungen, allerdings bewegt sich dieser nach Schätzungen der Industrie pro Jahr im zweistelligen Millionenbereich. Die im Rahmen des Vorhabens erfolgte Identifizierung von Hemmstoffen, welche die Bildung der emetischen (Iso)cereulide von *B. cereus* unterdrücken, ohne die Produktionsbedingungen zu stark zu beeinflussen, leisten einen wichtigen Beitrag zur Minimierung der Belastung von Lebensmittelzwischen- und endprodukten mit Cereulid und Isocereuliden. Damit können insbesondere KMU Handlungsoptionen angeboten werden, um wirtschaftliche Schäden durch Produktionsstopps, Entsorgungsmaßnahmen oder Rückrufaktionen und Schadenersatzforderungen präventiv abzuwenden. Präventionsstrategien zur Verhinderung der Toxinbildung erhöhen nicht nur die Produktsicherheit (food safety) und vermeiden hohe Folgekosten, sondern leisten auch einen wichtigen Beitrag zur Nachhaltigkeit der Lebensmittelproduktion (food security).

Die Ergebnisse sind insbesondere relevant für die milcherzeugende und -verarbeitende Industrie und für Produzenten von Lebensmittelzusatzstoffen, aber auch für Gewürz- und Gemüseverarbeitende Unternehmen, für Teigwaren- und Kakaohersteller, sowie für Hersteller von Convenience-Produkten und diätetischen Lebensmitteln.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2021.
2. Dietrich, R. N., Jessberger, M., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E. & Granum, P.E.: The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* 13, 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098> (2021).

3. Kalbhenn, E. M., Bauer, T., Stark, T. D., Knüpfer, M., Grass, G. & Ehling-Schulz, M.: Detection and isolation of emetic *Bacillus cereus* toxin cereulide by reversed phase chromatography. *Toxins* 13, 115. doi.org/10.3390/toxins13020115 (2021).
4. Walser, V., Kranzler, M., Ehling-Schulz, M., Stark, T. D. & Hofmann, T. F.: Structure Revision of Isocereulide A, an Isoform of the Food Poisoning Emetic *Bacillus cereus* Toxin Cereulide. *Molec.* 26 (5), 1360 (2021).
5. Rouzeau-Szynalski, K., Stollewerk, K., Messelhäuser, U. & Ehling-Schulz, M.: Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food Microbiol.* 85, 103279 (2020).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
School of Life Sciences
Forschungsdepartment Molecular Life Sciences
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik
Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-2923
Fax: +49 8161 71-2949
E-Mail: corinna.dawid@tum.de

Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Pathobiologie
Institut für Mikrobiologie
Abt. Funktionelle Mikrobiologie
Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich
Tel.: +43 1 25077-2461
Fax: +43 1 25077-2479
E-Mail: monika.ehling-schulz@vetmeduni.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben **AiF 19659 N**
der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.
(FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn,
wurde über die AiF im Rahmen des Programms
zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)
vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.