

Projektskizze

Innovative analytische Verfahren zur nachhaltigen Sicherung der Qualität und Produktsicherheit von Käseerzeugnissen

Projektdauer: 2 Jahre

Kontaktdaten:

Prof. Dr. E. Märtlbauer

Ludwig-Maximilians Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Schönleutner Str. 8

85764 Oberschleißheim

Tel. 089-2180 78601

Fax. 089-2180 78602

e-mail: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

1 Zielsetzung

Die Herstellung von Käse spielt bei der Veredelung von Milch eine zentrale Rolle. In Deutschland wurden 2008 2,2 Millionen Tonnen Käse produziert, davon 181.000 t (= ca. 8 %) Schmelzkäse. Diese Produktion und der Pro-Kopf-Verbrauch von 1,5 kg sind seit Jahren relativ konstant. Um diesen Marktanteil nicht zu verlieren, ist es wichtig, dass das Vertrauen des Verbrauchers in diese Produkte nicht erschüttert wird. Eine Voraussetzung dafür ist der Nachweis der Verwendung von einwandfreier Rohware. Ziel des Projektes ist die Vermeidung der Verarbeitung qualitativ schlechter oder hygienisch bedenklicher Rohware in der Schmelzkäseherstellung durch die Entwicklung neuer Analysenverfahren und deren Einbindung in produktionstechnische Verfahren. Die experimentelle Entwicklung beinhaltet die Optimierung und Validierung geeigneter physikalisch-chemischer, molekularbiologischer und immunchemischer Verfahren, die eine **einfache, schnelle, quantitative und kostengünstige Qualitätsüberprüfung der Rohware sowie des daraus hergestellten Schmelzkäses** im Hinblick auf die Schimmelpilz- und Mykotoxin-Belastung erlauben.

Beim Verderb von Schnitt- und Hartkäse, die das klassische Ausgangsmaterial für die Herstellung von Schmelzkäsen repräsentieren, spielen insbesondere Vertreter der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* eine große Rolle. Beide Gattungen sind aber auch in der Lage, Mykotoxine zu produzieren. Mykotoxine haben ein breites toxisches Potential und sind i.d.R. sehr hitzestabil, so dass sie die bei der Schmelzkäse-Herstellung eingesetzten Temperaturen von ca. 100 °C überstehen können. Literaturstudien zeigen, dass auf dem Substrat Käse die nephrotoxischen Schimmelpilzgifte Ochratoxin A und Citrinin, das hepatotoxische Sterigmatocystin, das neurotoxische Penitrem A, sowie immunsuppressiv wirksame Verbindungen wie Cyclopiazonsäure, Penicillinsäure und Mycophenolsäure produziert werden können.

Als Konsequenz ist es dringend erforderlich, geeignete Verfahren zu entwickeln, mit denen die Verarbeitung qualitativ schlechter oder hygienisch bedenklicher Rohware vermieden werden kann bzw. retrospektiv im Endprodukt "Schmelzkäse" die Qualität der Ausgangsware zuverlässig bestimmt werden kann. Prinzipiell stehen hierfür verschiedene analytische Verfahren zur Verfügung, die allerdings für die Untersuchung von Käse (Ausgangsware) bzw. Schmelzkäse modifiziert und validiert werden müssen.

Da bei der Schmelzkäse-Herstellung Temperaturen von über 100 °C eingesetzt werden, sind mikrobielle Verderbserreger mit konventionellen mikrobiologischen Verfahren im Schmelzkäse nicht länger nachweisbar. Durch Analyse des in der Zellmembran von Pilzen vorkommenden Mykosterins, Ergosterin, ist es dennoch möglich, Rückschlüsse auf die Keimbelastung des Ausgangsmaterials zu erhalten. Die derzeit zur Verfügung stehende GC-MS-Methode erfordert allerdings den Einsatz von hoch spezialisiertem Personal, zudem sind die Analysen sehr kostenintensiv und häufig erschweren Matrixeffekte eine sichere Quantifizierung. Daher sind diese physikalisch-chemischen Verfahren in den Käsereien nicht einsetzbar, haben als Referenzmethode aber ihre Berechtigung. Eine ganze Reihe von Publikationen beschäftigt sich mit

dem Nachweis von Schimmelpilz-DNA mittels alternativer molekularbiologischer Verfahren wie der PCR, zur Anwendung im Käse sind allerdings nur sehr wenige Arbeiten bekannt. Ein solches Verfahren würde aber die Analytik von Schmelzkäse deutlich vereinfachen und würde zudem bei Einsatz spezifischer Primer eine Identifizierung der vorherrschenden Fremdschimmel-Species ermöglichen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine potentielle Kontamination der Probe mit Mykotoxinen von Bedeutung. Auch auf dem Gebiet der Mykotoxin-Analytik sind physikalisch-chemische Analyseverfahren, insbesondere die LC-MS(/MS), Mittel der Wahl, allerdings in der täglichen Routine nicht einsetzbar. Als schnelle, einfache und kostengünstige Screening-Verfahren haben sich Enzymimmuntests auf dem Gebiet der Mykotoxin-Analytik etabliert - Sensitivität, Spezifität, Untersuchungsdauer und Kosteneffektivität repräsentieren die klassischen Vorteile dieser analytischen Verfahren. Allerdings stehen für die meisten der o.a. aufgeführten bislang auf Käse nachgewiesenen Mykotoxine keine kommerziellen Verfahren zur Verfügung.

Für die Sicherung der Qualität und Produktsicherheit von Käseerzeugnissen würde somit die in diesem Projekt entwickelten innovativen Analyseverfahren, die unter Praxisbedingungen einsetzbar sind, einen entscheidenden Zeit- und Kostenvorteil gegenüber herkömmlichen Nachweisverfahren ermöglichen.

2 **Arbeitsplan**

2.1 **Eigene Vorarbeiten**

Derzeit laufende klassische mikrobiologische Untersuchungen zur Fremdschimmel-Belastung von Handelskäse bzw. Umfeldproben aus Käsereien zeigten, dass die in der folgenden Tabelle aufgeführten Spezies besonders häufig anzutreffen sind.

Untersuchungsmaterial	Schimmelpilzspezies	potentiell gebildete Mykotoxine
Hartkäse, Schnittkäse u.a.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ochratoxin A
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Citrinin
	<i>Penicillium solitum</i>	Penitrem A
	<i>Penicillium citrinum</i>	Cyclopiazonsäure
	<i>Penicillium expansum</i>	Penicillinsäure
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Mycophenolsäure
Umfeldproben	<i>Aspergillus spp.</i>	Sterigmatocystin
	<i>Cladosporium cladosporioides;</i>	
	<i>Cladosporium herbaru;</i>	
	<i>Cladosporium oxysproum,</i>	
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	

Für die Konzeption des Forschungsprojektes ergibt sich daraus eine Fokussierung auf die Genera *Penicillium*, *Aspergillus* und *Cladosporium*. Letztere sollen dabei insbesondere als Indikatororganismen dienen, deren Nachweis in Umfeldproben für Schimmelpilze günstige Wachstumsbedingungen anzeigt. Der Schwerpunkt der Mykotoxinanalysen liegt auf dem Nachweis von Ochratoxin A, Citrinin, Sterigmatocystin, Penitrem A, Cyclopiazonsäure, Penicillinsäure und Mycophenolsäure. Antikörper gegen Ochratoxin A und Citrinin sind bereits vorhanden.

2.1 Methoden

Um eine Redundanz der Methodenvielfalt zu vermeiden, konzentrieren sich die Arbeiten auf Verfahren, die sowohl für die Analyse der Rohware als auch des Endproduktes "Schmelzkäse" eingesetzt werden können. Im besonderen Fokus steht hierbei sowohl der Nachweis der Schimmelpilzbelastung der Rohware als auch eine potentielle Kontamination der Käse mit Mykotoxinen. Folgende Analyseverfahren sollen entwickelt, optimiert und validiert werden:

- Immunchemische Verfahren: Entwicklung immunchemischer Mykotoxinarrays zum Nachweis der für die jeweiligen Pilzgattungen relevanten Mykotoxine.
- Molekularbiologische Verfahren: Entwicklung innovativer molekularbiologischer Verfahren zum Nachweis von Fremdschimmelpilz-DNA.
- Chemisch-physikalische Verfahren: Entwicklung von chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zum Nachweis von Ergosterin und Mykotoxinen.

2.2 Lösungsweg

Zur Realisierung des Forschungsprojektes sind drei Forschungsstellen (FS) mit den entsprechenden Fachkompetenzen und gerätetechnischen Ausstattungen nötig, um folgende Themen zu bearbeiten:

- (1) Methodenentwicklung (FS 1: Immunoassays; FS 2: Molekularbiologie; FS 3: Referenzanalytik).
- (2) Vergleich der DNA-Analysen und Ergosteringehalte an Modellprodukten (FS 2 und FS 3).
- (3) Verifizierung der Immunoassay-Ergebnisse mittels LC-MS an Modellprodukten (FS1 und FS 3).
- (4) Anwendung der entwickelten Verfahren an Realproben in einem Modellversuch– Identifizierung der Schimmelpilz-Spezies in natürlich kontaminierten Käsen, sowie Mykotoxin-Nachweis in der schimmelfreien Käsemasse (FS 1-3 und Industriepartner).

3 Zeitplan

		Projektjahre (Quartale)							
		1. Jahr				2. Jahr			
Punkt	FS	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	1								
	2								
	3								
2	2/3								
3	1/3								
4	1-3								

Meilensteine:

- (1) Ende 1. Projektjahr: Verfügbarkeit etablierter immunchemischer und molekularbiologischer Verfahren zum Nachweis relevanter Mykotoxine bzw. Fremdschimmelpilz-DNA
 - (2) Ende 1. Projektjahr: Validierte Referenzanalytik zum Nachweis von Ergosterin und Mykotoxinen
 - (3) Ende 2. Quartal 2. Projektjahr: Daten zur Vergleichbarkeit der DNA-Analysen und Ergosterinbestimmung in Modellkäsen
 - (4) Ende 2. Quartal 2. Projektjahr: Verifizierte Daten zur Mykotoxinbestimmung in Modellprodukten
 - (5) Ende 2. Projektjahr: Abschluss der Untersuchungen von Realproben
- Als Entscheidungskriterien dienen die gängigen Parameter zur Beurteilung analytischer Verfahren wie Sensitivität, Spezifität, Robustheit, Präzision und Reproduzierbarkeit.

4 Verwertungsplan

4.1. Wissenschaftlich-technische Erfolgsaussichten

Die derzeit zur Verfügung stehenden Methoden zur Qualitätssicherung bei der Schmelzkäseherstellung erfordern den Einsatz von hoch spezialisiertem Personal, zudem sind die Analysen sehr kostenintensiv und häufig erschweren Matrixeffekte eine sichere Analyse. Im vorliegenden Projekt sollen als Alternative einfache, schnelle und kostengünstige immunchemische und molekularbiologische Verfahren entwickelt werden. Wesentliche Schritte bei der Realisierung des Projektes sind dabei die Entwicklung robuster und sensitiver Antikörper sowie die Auswahl geeigneter Primer und Sonden für die molekularbiologischen Tests. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen der Projektbeteiligten mit der Entwicklung solcher Testsysteme, werden die Erfolgsaussichten für eine wissenschaftlich/technische Umsetzung insgesamt als gut eingeschätzt, das wissenschaftlich/technische Risiko lässt sich als gut überschaubar einstufen. Durch das vorliegende Projekt würde ein wichtiger Schritt zur Vereinheitlichung und Verkürzung der Analytik in den milchverarbeitenden Betrieben erfolgen.

4.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Aus wirtschaftlicher Sicht ist es dringend notwendig, Einbußen in der Qualität von Lebensmitteln oder Gefahren für die Gesundheit der Konsumenten rechtzeitig zu detektieren, um existenzbedrohende Imageschäden bei den Herstellern oder Risiken aus der Produkthaftung zu

vermeiden. Die erzielten Forschungsergebnisse kommen daher in direkter Form dem milcherzeugenden, landwirtschaftlichen Betrieben und dem milchverarbeitenden Gewerbe zu Gute, da das geplante System zeit- und arbeitsintensive konventionelle Verfahren ersetzen kann. Als konkrete Transfermaßnahmen sind Veröffentlichungen von Ergebnissen in Fachzeitschriften, auf Fachtagungen und –Konferenzen, insbes. auf Verbandstagungen vorgesehen (Zielgruppen: KmUs der milchverarbeitenden Industrie). Am Ende des Projektes steht die Realisierung eines praxistauglichen Analysen-Systems in Form von Testkits, dessen Tauglichkeit für das geplante Anwendungsgebiet in einem Modellversuch demonstriert wurde. Durch eine direkte Einbindung von Vertretern beteiligter Unternehmen bekommen diese die Chance, aktiv an der Realisierung des Projektes mitzuwirken und eine praxisorientierte Zielrichtung vorzugeben. Durch die Einarbeitung der Forschungsergebnisse in institutsinterne Lehrveranstaltungen und Seminare werden potentielle Nutzer schon frühzeitig für diese neue Technologie sensibilisiert und können im günstigsten Fall eine Multiplikator-Funktion ausüben.

Die Umsetzung des Projektes erfordert wissenschaftliche Kenntnisse und Laborausstattung, die bei kleinen und mittleren Unternehmen in diesem Bereich nicht vorhanden ist, so dass eine staatliche Förderung nötig ist. Die zu erwartenden Ergebnisse tragen direkt zur Produktsicherheit und -qualität von Käseerzeugnissen bei. Sie haben darüber hinaus Modellcharakter, da das analytische Konzept auch bei anderen Lebensmittelgruppen anwendbar ist.

5 Ausführende Forschungsstellen, Unternehmensdaten

Forschungsstelle 1 (FS 1): Ludwig-Maximilians Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim. Leiter: Prof. Dr. E. Märtlbauer. Die Forschungsstelle besitzt langjährige Erfahrung in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern und der Etablierung und Validierung immunchemischer Testverfahren. Die entsprechenden Labore (Zellkultur) und Ausstattung (Immunoassay) sind vorhanden.

Forschungsstelle 2 (FS 2): Max Rubner Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach, Leiter: Prof. Dr. M. Gareis. Die Forschungsstelle besitzt langjährige Erfahrung in der Etablierung und Validierung molekularbiologischer Testverfahren zum Nachweis von pathogenen Keimen und Verderbserregern. Die entsprechenden Labore und Ausstattung (RT-PCR) sind vorhanden.

Forschungsstelle 3 (FS 3): **MUVA Kempten**, Ignaz-Kiechle-Straße 20-22, 87437 Kempten, Leiter: Dr. T. Westermair. Die Forschungsstelle besitzt langjährige Erfahrung in der chemischen und mikrobiologischen Analyse von Lebensmitteln. Die entsprechenden Labore und Ausstattung (LC-MS/MS) sind vorhanden.