

# MycoRed – Mykotoxine reduzieren!



Internationales Projekt soll Belastung  
in Lebens- und Futtermitteln verringern

Rolf Geisen und Markus Schmidt-Heydt (Karlsruhe)

Mykotoxine – giftige Stoffwechselprodukte von Pilzen – stellen für die Sicherheit vieler Lebens- und Futtermittel ein entscheidendes Problem dar. Bis heute existieren noch keine umfassenden Konzepte, um Mykotoxinkontaminationen in Lebensmitteln sicher vermeiden zu können. Schimmelpilze beziehungsweise ihre Sporen sind nahezu allgegenwärtig. Daher versucht man auf verschiedenen Ebenen, zum Beispiel mithilfe von Fungiziden, wissenschaftlich basierten Empfehlungen zum Erntezeitpunkt, optimierter Lagerung und verbesserter Herstellungsprozesse, die Mykotoxinbildung zu kontrollieren und zu reduzieren. Vor diesem Hintergrund hat sich ein internationales Experten-Konsortium gebildet, das gemeinsam neue integrierte Konzepte der Kontrolle der Mykotoxinbildung erarbeiten will.



Schätzungsweise 25% der jährlichen Welternte werden durch Schimmelpilze in ihrer Qualität reduziert und können mit Mykotoxinen belastet sein. Die für Lebens- und Futtermittel wichtigsten Mykotoxine werden durch Fusarien, Aspergillen oder Penicillien gebildet (Tab. 1). Aufgrund der Anpassung der Pilze an spezifische Habitate kommen Mykotoxine besonders in folgenden Produkten vor: Getreideprodukte, Kaffee, Kakao, (Ochratoxin, Trichothecene); Mais (Fumonisin); Trauben, Wein (Ochratoxin); Gewürze (Aflatoxin, Ochratoxin); Produkte aus Äpfeln (Patulin).

nationales Projekt, an dem das Max Rubner-Institut Karlsruhe (MRI) sowohl forschend als auch koordinierend beteiligt ist. Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung neuer integrierter Ansätze, um die Sicherheit und Qualität von Lebens- und Futtermitteln zu gewährleisten bzw. zu erhöhen. Das Projekt wird mit einer Summe von 5,8 Millionen Euro für vier Jahre, bis 2013, von der EU gefördert. Insgesamt sind 25 internationale Partnerinstitutionen beteiligt. Darüber hinaus bestehen Kooperationen mit Instituten des USDA (USA) sowie der University of Kansas (USA).

## Die Projektstruktur

MycoRed („Novel strategies for world wide reduction of mycotoxins in foods and feed chains“) ist das Synonym für ein europäisch/inter-

Im Rahmen dieses Projektes werden folgende Probleme bearbeitet:

- Reduktion von Fumonisin in Mais (*Fusarium verticillioides*)
- Reduktion von Ochratoxin in Trauben (*Aspergillus westerdijkiae*)
- Reduktion von Ochratoxin in Weizen (*Penicillium verrucosum*)
- Reduktion von Aflatoxin in Nüssen und getrockneten Früchten (*Aspergillus flavus*)

**Tab. 1: Wichtige mycotoxinbildende Pilzgattungen und ihre Produkte**

Fusarium	Trichothecene, Fumonisin, Zearalenon
Aspergillus	Aflatoxin, Ochratoxin, Cyclopiazonsäure
Penicillium	Ochratoxin, Citrinin, Patulin

Das Besondere an diesem Projekt ist der integrierte, umfassende Ansatz. Alle Schritte der Lebensmittelkette werden durch sogenannte Workpackages abgedeckt, die jeweils in verschiedenen europäischen Laboratorien bearbeitet werden, die auf diesen Forschungs-





gebieten Expertise haben. Abbildung 1 zeigt die beteiligten Länder. Zwischen den einzelnen Workpackages bestehen Synergien durch den Austausch von Probenmaterial, Methoden und wissenschaftlichem Personal.

Die jeweiligen Workpackages decken eine ganze Bandbreite von Aspekten ab, die von der Resistenzzüchtung über die Entwicklung mathematischer Modelle zur Vorhersage der Mykotoxinbildung bis zur Etablierung innovativer instrumenteller Analytikverfahren reichen. Sie sind untereinander stark vernetzt und aufeinander angewiesen, da Ergebnisse bzw. entwickelte Methoden des einen Workpackages Voraussetzung für die Arbeit eines anderen sein können.

Abbildung 2 zeigt die Vernetzung der jeweiligen Workpackages. Fünf vertikale Workpackages befassen sich mit der Lebens- und Futtermittelkette, während zwei horizontal organisiert sind und mit jedem der anderen Workpackages interagieren. Workpackages, die sich mit dem Projektmanagement und der Informationsverteilung befassen, sind in der Abbildung nicht aufgeführt. Das MRI koordiniert das Workpackage 6 (WP6). Innerhalb wie auch zwischen den einzelnen Workpackages gewährleisten regelmäßige Videokonferenzen den ständigen Austausch.

## Die Workpackages

- **WP 1:** Das Ziel dieses Workpackages ist die Entwicklung von resistenten Pflanzenlinien und deren Registrierung zur europäischen Nutzung. Weiterhin sollen neue Ansätze zur Fungizidanwendung, sowie Pathogen/Wirt Interaktionen untersucht werden.
- **WP 2:** In diesem Teil sollen biologische Antagonisten (Bakterien, Hefen) identifiziert werden, die in der Lage sind, mykotoxinbildende Pilze zu hemmen. In Zusammenarbeit mit einem österreichischen Partner, sollen die biologischen Antagonisten zur Marktreife gebracht werden.
- **WP 3:** Hier soll ein ein modellgestütztes Entscheidungshilfesystem entwickelt werden, mit dem die Wahrscheinlichkeit der Mykotoxinbildung in Relation zu bestimmten Umweltbedingungen (z. B. die Wettersituation während der Ernte) vorausgesagt werden kann. In dieses Modell werden geographische, meteorologische und agrartechnische Daten einbezogen. Die entwickelten Modelle können daher zum Risikomanagement eingesetzt werden.
- **WP 4:** Entwicklung von innovativen Nachernte-Lagertechnologien zur Verminderung der Mykotoxinbildung während der Lagerung. In diesem Teil werden Ansätze wie Ozonisierung oder die Anwendung von Sensoren während der Lagerung pflanzlicher Produkte bearbeitet.
- **WP 5:** Anwendung verschiedener Prozesstechnologien zur Verminderung der Mykotoxinkonzentration in Lebensmitteln. Dazu gehören unter anderen der Einsatz von mykotoxinbindenden Agenzien oder der Einsatz von mykotoxinabbauenden Mikroorganismen.
- **WP 6:** Dieser Arbeitsbereich ist teilweise horizontal organisiert. Er entwickelt molekulare Nachweis- und Monitoringsysteme für mykotoxinbildende Pilze und neue Vermeidungsstrategien, basierend auf molekularen Grundlagen.

**Abb. 1: Schema der Interaktion des MRI mit den Partnern des WP6 (innerer Kreis), sowie den andern Partnern des MycoRed-Projekts (äußerer Kreis).**

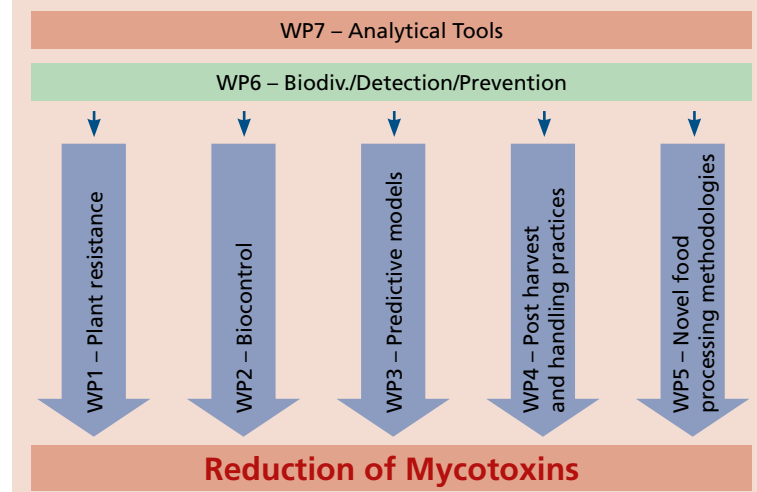


- **WP 7:** Dieser Arbeitsbereich liefert auf horizontaler Ebene analytische Unterstützung für alle anderen Bereiche. So werden analytische Methoden entwickelt, um gleichzeitig eine Vielzahl an Mykotoxinen nachweisen zu können.
- **WP 8–10:** Die letzten Workpackages befassen sich mit dem Projektmanagement und der Verbreitung der erzielten Ergebnisse in Form von „Home Education“ und der Veranstaltung von internationalen Workshops, zum Beispiel in Österreich, Malaysia, Ägypten, Südafrika, Argentinien, Russland, USA, Kanada.

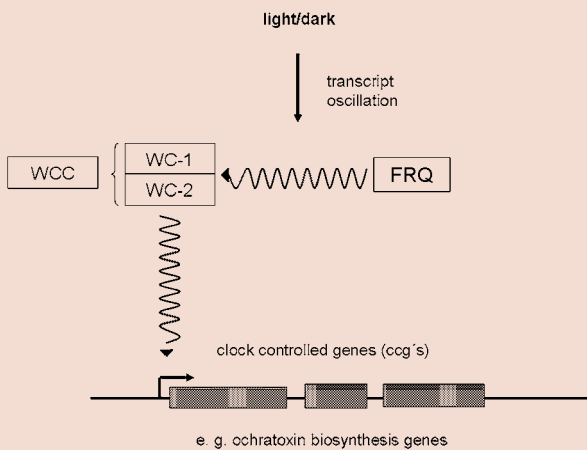
## WP 6: Diagnose, quantitative Bestimmung und Kontrolle toxischer Pilze

Im vom MRI koordinierten Workpackage 6 arbeiten Einrichtungen aus vier Ländern (Deutschland, Italien, Niederlande und Argentinien) zusammen. Gemeinsam sollen molekulare Marker und neue

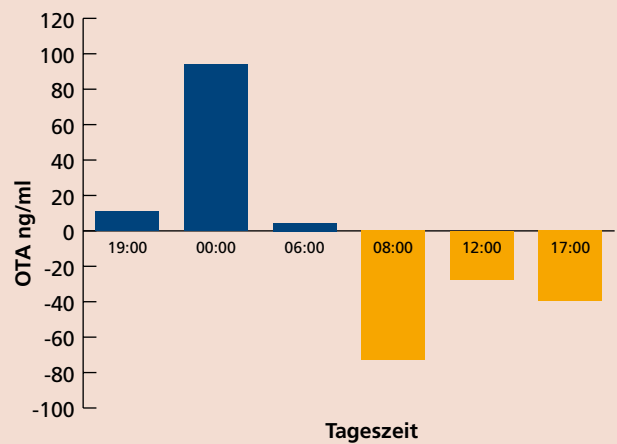
**Abb. 2: Vernetzung der einzelnen Workpackages. Das MRI ist am Workpackage 6 koordinierend beteiligt.**



**Abb. 3:** Schema der Genregulation durch eine circadiane Uhr. Der hell/dunkel-Wechsel bewirkt eine Oszillation der FRQ Expression, was wiederum einen Einfluss auf die Expression und Aktivität des White Collar Complexes (WCC) hat, der seinerseits dann rhythmisch die ccg's reguliert.



**Abb. 4:** Tagesrhythmische Bildung und Abbau von Ochratoxin bei Inkubation von *P. verrucosum* unter alternierenden hell/dunkel-Bedingungen (Inkubation im Dunkeln, blaue Balken; unter Lichtbedingungen orangefarbene Balken). Die Balken zeigen die jeweilige Zu- oder Abnahme von Ochratoxin an.



Diagnosemethoden für mykotoxinbildende Pilze entwickelt werden. Darüber hinaus konzentriert sich das MRI auf Aspekte des Einflusses von lebensmittelrelevanten Umweltstressfaktoren auf die Aktivierung der Vorgänge, die zur Bildung von Mykotoxinen führen, sowie auf neue molekulare Ansätze zur deren Kontrolle.

### Stressinduktion von mykotoxinbildenden Genen

Produktrelevante Bedingungen wie die Temperatur, die Wasseraktivität oder Lebensmittelinhalts- oder -zusatzstoffe haben einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der Gene, die für die Bildung der Mykotoxine (Mykotoxinbiosynthese) verantwortlich sind. Das MRI konzentriert sich auf die Gene der Ochratoxin-A-Biosynthese, während sich ein italienischer Partner mit den Genen der Aflatoxinbiosynthese in *Aspergillus* beschäftigt.

In früheren Arbeiten am MRI konnte gezeigt werden, dass besonders beim Wachstumsoptimum, aber auch unter Bedingungen, die gerade noch ein marginales Wachstum zulassen, eine Aktivierung der Gene der Mykotoxinbiosynthese erfolgt. Die letzteren Bedingungen werden häufig während der Lagerung oder des Transports von pflanzlichen Lebensmitteln angestrebt, um dadurch das Wachstum von Mikroorganismen zu unterdrücken. Erfolgt dies aber unvollständig, kann dieser Ansatz kontraproduktiv sein und die Bildung von Mykotoxinen sogar induzieren. Für den Pilz bedeuten diese Bedingungen physiologischen Stress, der durch äußere Faktoren ausgelöst wurde.

Äußere Faktoren haben also Einfluss auf die Aktivität der mykotoxinbildenden Gene. Dieser Einfluss wird über molekulare Signalkaskaden vermittelt, deren Rolle bei der Ochratoxin- und Aflatoxinbildung untersucht werden soll, um neue Ansatzpunkte zur Kontrolle der Mykotoxinbildung zu finden.

### Neue Ansätze zur Vermeidung der Ochratoxinbildung mittels Licht

In früheren Arbeiten des MRI konnte gezeigt werden, dass Licht unter bestimmten Bedingungen einen starken Einfluss sowohl auf das Wachstum, als auch die Mykotoxinbildung verschiedener filamentöser Pilze haben kann. Auch die Bildung von Ochratoxin A wird durch Licht beeinflusst. Dieser Einfluss und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sollen in diesem Teil des Projektes aufgeklärt werden.

Viele Organismen und auch Pilze besitzen eine molekulare Uhr, die auf Tag/Nacht Rhythmen reagiert und den Stoffwechsel entsprechend beeinflussen kann. Dies ist sehr gut für die Sporenbildung im Modellorganismus *Neurospora crassa* untersucht. Die Produkte von drei Schlüsselgenen spielen dabei eine Rolle: *frq* (frequency) sowie die Gene *wc-1* und *wc-2* (white collar 1 und 2). Das *frq* Gen kodiert für den Zeitgeber; seine Transkription ist abhängig von der hell/dunkel-Veränderung. Das gebildete FRQ Protein hat Einfluss auf die Aktivierung der Gene *wc-1* und *wc-2*, deren Geneprodukte einen Komplex bilden (WCC, white collar complex) der bestimmte Gene regulieren kann (clock controlled genes oder ccg's). Ein Schema dieses Regulationskreises ist in Abbildung 3 gezeigt.

Bis jetzt wurde die circadiane (tageszeitliche) Regulation nur für allgemeine physiologische Prozesse wie die Sporenbildung oder morphologische Veränderungen beschrieben. In neueren Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe aber zum ersten Mal zeigen, dass auch die Ochratoxinbildung durch *Penicillium* tageszeitlich reguliert ist. Alle drei oben genannten Gene konnten in ochratoxinbildenden *Penicillien* (*P. nordicum*; *P. verrucosum*) nachgewiesen werden. Die Aktivität der ochratoxinbildenden Gene steigt rhythmisch in der Nacht an und ist tagsüber reduziert. Bei Inkubation im Dunkeln

**Abb. 5: Am MRI entwickelte Lichtbox zur Analyse des Einflusses der Lichtwellenlänge auf die Ochratoxinbildung.**



wird Ochratoxin gebildet, während das Toxin unter Lichtinkubation eher abgebaut wird (Abb. 4).

Bei Inkubation unter konstanten Bedingungen oszilliert die Ochratoxinmenge nicht, die gebildete Menge ist allerdings bei konstanter Dunkelheit höher als im Hellen. Diese Differenz ist abhängig von der Lichtintensität. Bei 1600 Lux kann nur ein begrenzter Einfluss gemessen werden, während die Ochratoxinkonzentration bei 2800 Lux um 20–30 % reduziert ist. Nach diesen Ergebnissen ist zu vermuten, dass eine weitere Steigerung der Lichtintensität zu einer weiteren Verringerung der Ochratoxinbildung führt.

Die wechselnde Ochratoxinmenge unter alternierenden hell/dunkel-Bedingungen weist darauf hin, dass das Toxin unter Lichteinfluss entweder aktiv durch den Pilz oder passiv durch die Lichteinstrahlung abgebaut wird. In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass für *Penicillium* das gebildete Ochratoxin A besonders unter Lichteinfluss stark toxisch wirkt. Dies deutet darauf hin, dass die tageszeitliche Regulation der Ochratoxinbildung durch *Penicillium* offensichtlich einen Schutzmechanismus des Pilzes darstellt. Unter Lichteinfluss wird die Biosynthese von Ochratoxin A reduziert und toxische Mengen an Ochratoxin A werden bis zu einer weniger toxischen Konzentration abgebaut.

Ochratoxin A besitzt natürlich nicht nur negative Eigenschaf-

ten für den Produzenten. Nach unseren Erkenntnissen scheint Ochratoxin A die Durchsetzungsfähigkeit von *P. nordicum* und *P. verrucosum* in bestimmten Habitaten entscheidend zu verbessern. Dazu zählen insbesondere lebensmittelrelevante Habitats, wie salzreiche Produkte, zum Beispiel pilzgereifte Fleischprodukte oder fermentierte Oliven, bzw. Produkte mit geringer Wasseraktivität wie Kaffee, Kakao, Gewürze oder Getreide.

Die bisher erzielten Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten, um das Wachstum ochratoxinbildender *Penicillien*, zumindest auf Lebensmitteloberflächen, zu kontrollieren. Zu diesem Zweck ist es unabdingbar, die Lichtanteile zu kennen, die zu einer Hemmung der ochratoxinbildenden Pilze führen. Daher wurde im MRI eine Lichtbox konstruiert, die es ermöglicht, Pilze unter kontrollierten Bedingungen

unter verschiedenen Lichtqualitäten wachsen zu lassen (Abb. 5). Erste Ergebnisse zeigten, dass das Pilzwachstum und die Ochratoxinbildung sehr stark von der jeweiligen Wellenlänge abhängen. Diese ersten vielversprechenden Ergebnisse werden zurzeit intensiv weiter untersucht. Eine Wachstums- und Ochratoxinbildungshemmung ochratoxinbildender Pilze auf Oberflächen von Früchten konnte schon erzielt werden (Abb. 6). ■



Max Rubner-Institut

Forschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Prof. Dr. Rolf Geisen und Dr. Markus Schmidt-Heydt, Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe. E-Mail: [rolf.geisen@mri.bund.de](mailto:rolf.geisen@mri.bund.de)

**Abb. 6: Hemmung von oberflächlichem Wachstum von ochratoxinbildenden Pilzen durch Lichtbestrahlung.**



behandelt

unbehandelt