

## Stellungnahme der ZKBS zu gentechnischen Arbeiten mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* Stämmen (EHEC)

### 1. Einführung

*Escherichia coli* (*E. coli*) sind Gram-negative Bakterien, die physiologischerweise im Darm des Menschen und vieler Tierespezies vorkommen. Sie können als fakultative Pathogene verschiedene Krankheiten hervorrufen, wenn sie die Barrierefunktion des Darmes, der Haut, der Atemwege oder der Harnwege überwinden. Dazu ist eine anatomische oder funktionelle Vorschädigung der jeweiligen Barriere (z. B. durch ein Trauma, durch maschinelle Beatmung, durch Antibiotika-Therapie) Voraussetzung. Dies ist bei hospitalisierten Patienten häufig der Fall. Dementsprechend verursachen *E. coli* häufig Wundheilungsstörungen, Peritonitiden, Cholezystitiden, Harnwegsinfektionen, Pneumonien und – bei systemischer Streuung – Sepsis oder Meningitis. Sie sind gefürchtet als Erreger nosokomialer Infektionen mit zunehmender Resistenz gegen gängige Antibiotika.

Je nach genetischer Ausstattung mit zellgebundenen oder sezernierten Virulenzfaktoren, deren Gene chromosomal, auf Transposons, auf Plasmiden, Phagen oder Pathogenitätsinseln lokalisiert sind, führen *E. coli*-Stämme zu einem breiten Spektrum intestinaler und extraintestinaler Erkrankungen.

Nach phänotypischen, genotypischen und klinischen Merkmalen werden unterschieden:

- Extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC): Auslöser von Harnwegsinfektionen, Septikämien, Peritonitiden, Meningitiden bei Neugeborenen oder Infektionen von Vögeln<sup>1</sup>
- Enteropathogene *E. coli* (EPEC): Auslöser von Durchfällen v. a. bei Säuglingen durch Schädigung des Dünndarmepithels (Adhäsine, sekretorische Proteine)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC): Auslöser von Durchfällen durch Schädigung des Kolonepithels (Zellinvasion, intrazelluläre Vermehrung)
- Enterotoxische *E. coli* (ETEC): Auslöser von Durchfällen durch Sekretion verschiedener Toxine (hitze-labile Toxine LT I, LT II, hitzestabiles Enterotoxin ST)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC): Auslöser häufig chronischer Durchfälle durch autoaggregative Adhärenzfimbrien, Biofilmbildung und Sekretion von Serinproteasen und Enterotoxinen.
- Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC): Auslöser wässriger oder blutiger Durchfälle (Kolitidis) und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) durch Sekretion verschiedener Toxine, insbesondere Shigatoxine 1 und 2 und Hämolysin.

Die Übertragung erfolgt als Kontaktinfektion oder über Wasser bzw. kontaminierte Lebensmittel zwischen Mensch und Tier.

Zu erwähnen sind noch die *E. coli*-Laborstämme K12 und B, die als apathogen gelten und als Modellorganismen in der Erforschung der bakteriellen Genetik, Physiologie und Molekularbiologie breite Verwendung finden.

---

<sup>1</sup> Entsprechend dieser Krankheitsbilder wurden ExPEC in der Vergangenheit eigenen Gruppen zugeordnet (z. B. UPEC, NMEC, APEC). Inzwischen wurden diese jedoch zusammengefasst, da sie phylogenetisch, epidemiologisch und anhand ihrer Ausstattung mit Virulenzfaktoren nicht zu unterscheiden sind (Russo & Johnson 2000, J Infect Dis 181(5):1753-4).

Für die Diagnostik werden ein oder mehrere Virulenzfaktoren bzw. Toxine nachgewiesen. Die früher übliche Klassifikation nach serologischen Oberflächenmerkmalen (O-Antigene, H-Antigene) dient heute allenfalls als Orientierung.

Um auf verschiedene Anfragen zu reagieren, nimmt die ZKBS Stellung zur Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten mit EHEC-Stämmen und zu den nach GenTSV erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen.

## 2. EHEC-Infektionen

EHEC verursachen wässrige oder blutige Durchfälle. Als Komplikation kann das hämolytisch-urämische Syndrom mit hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie, Nierenversagen und zentralnervösen Funktionsausfällen auftreten. Die Infektionsdosis für den Menschen ist mit 100 Keimen sehr niedrig. Die Übertragung erfolgt durch Verzehr kontaminierter Lebensmittel (Fleisch, Rohmilch, Wasser, Fruchtsäfte, fäkaliengedüngte Pflanzen). Während eines Ausbruchs in Deutschland und einigen europäischen Ländern im Jahre 2011 durch einen *E. coli*-Stamm des Serotyps O104:H4 erkrankten 3842 meist erwachsene Menschen. 855 der Patienten (22 %) entwickelten ein HUS, an dem 53 dieser Patienten (4,1 %) verstarben [1]. Beim Auslöser der Epidemie handelt es sich um einen Hybridstamm von EHEC und EAEC, der daher auch als enteroaggregativ-hämorrhagischer *E. coli* (EAEHEC) bezeichnet wird [2, 3].

EHEC haben bei niedrigem pH-Wert, bei hoher Salzkonzentration und bei niedrigen Temperaturen eine hohe Überlebensfähigkeit. Die genannten Eigenschaften, besonders aber die hohe Säureresistenz in Verbindung mit der niedrigen Infektionsdosis, erklären, dass die EHEC heute zu den gefürchtetsten Erregern von Lebensmittelinfektionen gehören.

Bei akuten EHEC-Infektionen ist eine antibakterielle Chemotherapie im Allgemeinen kontraindiziert. Sie kann die Bakterienausscheidung verlängern und zur vermehrten Toxinfreisetzung beitragen. Bei asymptomatischen Dauerausscheidern kann die Kurzzeittherapie mit Azithromycin erwogen werden. Die Behandlung der Krankheitssymptome von HUS kann nur symptomatisch erfolgen (in der Regel durch forcierte Diurese, Plasmapherese und bei globaler Niereninsuffizienz durch Häm- oder Peritonealdialyse).

Ein Impfstoff zur Prävention von EHEC-Infektionen bei Tier oder Mensch steht nicht zur Verfügung.

Die meisten EHEC-Bakterien verfügen über folgende Virulenzfaktoren:

- die phagenkodierte Fähigkeit zur Bildung der Shigatoxine (auch als Vero- bzw. Verocytotoxine bezeichnet) Stx1 und/oder Stx2 (selten Variante Stx2v),
- ein Virulenzplasmid mit den Genen für EHEC-Hämolysin und Katalase/Peroxidase,
- das Adhäsionsprotein Intimin, dessen Gen *eaeA* zusammen mit Genen für den Typ-III-Sekretionsapparat auf der sog. Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) liegt; diese in LEE lokalisierten Gene sind gemeinsam für die effektive Anheftung von EHEC an die Darmepithelzellen notwendig.

Shiga-/Verotoxin-bildende *E. coli* werden im Allgemeinen als STEC/VTEC bezeichnet. Die EHEC repräsentieren eine Untergruppe der STEC, wobei man in Deutschland alle STEC aus humanen Isolaten als EHEC bezeichnet [4]. Virulente EHEC-Stämme mit den drei Virulenzfaktoren Toxinbildung, EHEC-Hämolysin und Intimin werden weit häufiger mit einer EHEC-Enteritis bzw. HUS in Verbindung gebracht als Stämme, die diese Virulenzfaktoren nicht aufweisen.

STEC/VTEC ohne Virulenzplasmide und/oder *eaeA*-Gen (Intimin), die oft anderen Serovaren als *E. coli* O157, O26 und O111 zugeordnet werden und bei landwirtschaftlichen Nutztieren, insbesondere Rindern, zirkulieren, besitzen meist eine deutlich niedrigere Virulenz für den Menschen. Es waren jedoch in der Vergangenheit auch Stämme an HUS-Ausbrüchen beteiligt, deren Genom nicht das für EHEC typische *eaeA*-Gen enthielt [2, 5]. Bekanntestes Beispiel

ist der oben genannte EHEC-Ausbruch im Jahr 2011. Dieser Ausbruch wurde durch einen *E. coli*-Stamm verursacht, in dessen Genom kein *eaeA*-Gen vorliegt. Es enthält jedoch sowohl ein Phagen-genom mit dem *stx2a*-Gen als auch Gene für aggregative Adhärenz-Fimbrien (AAF/1), die nicht für EHEC, sondern für EAEC typisch sind.

### 3. Sicherheitsbewertung

In der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten nach § 6 GenTSV werden *E. coli*-Stämme der **Risikogruppe 1** zugeordnet, wenn erwiesen ist, dass sie apathogen sind. Dies trifft z. B. auf die gut charakterisierten Laborstämme *E. coli* K12 und B, aber auch auf einige kommensale *E. coli*-Stämme wie Nissle 1917 zu.

Kommensale *E. coli* im Allgemeinen bzw. pathogene *E. coli* werden der **Risikogruppe 2** zugeordnet, da sie Erkrankungen hervorrufen können, die in der Regel gut behandelbar sind. Hierzu gehören beispielsweise EPEC, EIEC, EAEC oder ExPEC. Hybridstämme dieser Pathovaren werden der **Risikogruppe 2** zugeordnet, wenn in ihrem Genom keine Shigatoxingene enthalten sind.

Im Gegensatz dazu werden enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme, STEC bzw. Hybride aus EHEC und anderen pathogenen *E. coli*-Stämmen der **Risikogruppe 3\*\*** zugeordnet<sup>2</sup>, da sie eine geringe Infektionsdosis aufweisen und das lebensbedrohliche HUS hervorrufen können, jedoch nicht über die Luft übertragbar sind.

Ausschlaggebend für die Einstufung ist, ob die betreffenden *E. coli*-Stämme Shigatoxingene tragen und zur Kolonisierung von Wirtsorganismen in der Lage sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass STEC bzw. Hybride aus EHEC und anderen pathogenen *E. coli*-Stämmen auch ohne die Ausprägung der für EHEC typischen Virulenzfaktoren wie Intimin hämorrhagische Erkrankungen beim Menschen auslösen können. Aus diesem Grund werden alle STEC sowie Hybride aus EHEC und anderen Pathovaren, die Shigatoxingene tragen, als potentielle EHEC angesehen. Die folgende Bewertung bezieht sich sowohl auf EHEC im engeren Sinne als auch auf STEC und die o. g. Hybridstämme aus EHEC und anderen Pathovaren.

#### A. Gentechnische Arbeiten mit EHEC- und EHEC-Hybridstämmen als Spenderorganismen:

- a) Werden Gene für Virulenzfaktoren von EHEC- oder EHEC-Hybridstämmen, wie Stx1, Stx2, Stx2v oder anderer Toxine wie Hämolyisin, mit Hilfe von Vektoren, die die Anforderungen an Vektoren für biologische Sicherheitsmaßnahmen nach § 8 Abs. 2 GenTSV erfüllen, in *E. coli* K12 und Derivate (Risikogruppe 1) als Empfängerorganismen eingeführt, werden die entstehenden gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Die gentechnischen Arbeiten werden der **Sicherheitsstufe 2** zugeordnet.

#### Begründung:

---

<sup>2</sup> Die Einstufung in die Risikogruppe 3\*\* erfolgte ursprünglich durch die Richtlinie 97/59/EWG von 1997, mit der der Anhang III (Organismenliste) der „Richtlinie 90/679/EWG des Rates über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit“ an den technischen Fortschritt angepasst wurde und EHEC-Stämme der Risikogruppe 3 zugeordnet und mit (\*\*) gekennzeichnet wurden: „Bei bestimmten biologischen Arbeitsstoffen, die in die Gruppe 3 eingestuft und in der Liste mit zwei Sternchen (\*\*) versehen wurden, ist das Infektionsrisiko für Arbeitnehmer begrenzt, da eine Infektion über den Luftweg normalerweise nicht erfolgen kann. Um festzustellen, ob unter den besonderen Umständen auf bestimmte Maßnahmen verzichtet werden kann, unterziehen die Mitgliedsstaaten die auf die biologischen Arbeitsstoffe angewendeten Sicherheitsmaßnahmen einer Beurteilung, bei der sie die Art der betreffenden Tätigkeiten und die Menge des jeweiligen biologischen Arbeitsstoffes berücksichtigen.“

Es werden einzelne oder mehrere Gene, die für Virulenzfaktoren von EHEC kodieren, auf Stämme wie *E. coli* K12 übertragen. Die GVO zeigen keine oder, verglichen mit EHEC, nur eine abgeschwächte Virulenz, da die weiteren für die Pathogenese von EHEC verantwortlichen Virulenzfaktoren wie Adhäsine fehlen.

- b) Werden Gene für andere Virulenzfaktoren von EHEC, wie z. B. Intimin oder andere Gene, die auf der LEE-Pathogenitätsinsel lokalisiert sind, mit Hilfe von Vektoren, die die Anforderungen an Vektoren für biologische Sicherheitsmaßnahmen nach § 8 Abs. 2 GenTSV erfüllen, einzeln in *E. coli* K12 und Derivate als Empfängerorganismen eingeführt, werden die entstehenden GVO in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Die gentechnischen Arbeiten werden der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet.

Begründung:

Es werden einzelne, auf einer Pathogenitätsinsel lokalisierte Gene von EHEC auf Stämme wie *E. coli* K12 übertragen. Sie kodieren für sezernierte Proteine, die zum Typ-III-Sekretionssystem gehören, bzw. mit bakteriellen Effektoren interagieren (z. B. Intimin), um die Kolonisierung und das Überleben von EHEC im Wirt sicherzustellen. Einzeln können diese Gene nicht wirksam werden. Für die Entfaltung der Virulenz werden weitere Gene einer Pathogenitätsinsel benötigt. Da *E. coli* K12-Laborstämme nicht über Pathogenitätsinseln verfügen, ist nicht davon auszugehen, dass exprimierte Virulenzproteine wirksam werden können.

B. Gentechnische Arbeiten mit EHEC- und EHEC-Hybridstämmen als Empfängerorganismen:

Werden in EHEC-Stämme gentechnische Veränderungen eingeführt (Mutationen, Insertionen), die die Virulenz nicht ändern oder nicht sicher zur Abschwächung der Virulenz führen, werden die GVO in die **Risikogruppe 3\*\*** eingeordnet. Diese Einordnung gilt ebenso für gentechnisch veränderte EHEC-Stämme, die das Gefährdungspotential von EHEC-Wildtyp-Stämmen (z. B. O157:H7, O104:H4 oder O103:H2) bzw. Patientenisolaten nicht überschreiten.

Eine Mutation, die sicher zur Abschwächung der Virulenz führt, ist die Deletion des bzw. der Stx-Gene.

Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten EHEC-Stämmen bzw. STEC-Stämmen oder Hybriden aus EHEC und anderen Pathovaren sind grundsätzlich unter Einhaltung von **Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3** nach Anlage 2A GenTSV durchzuführen (vgl. TRBA 100, Nr. 5.4.2). Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Übertragungsmöglichkeiten von Organismen der Risikogruppe 3\*\* sind folgende Maßnahmen bei gentechnischen Arbeiten mit EHEC nicht erforderlich:

- Schleuse
- Unterdruck im Labor
- Abdichtbarkeit des Labors zum Zwecke der Begasung
- Filtration der Abluft aus dem Labor
- Autoklav im Labor (ein Autoklav muss innerhalb des Gebäudes vorhanden sein und der Transport des Abfalls dorthin muss gemäß GenTSV Anlage 2A III Sicherheitsstufe 3 b Satz 13 erfolgen)
- höhere Feuerwiderstandsklasse von Wänden, Fenstern und Türen im Vergleich zu gentechnischen Anlagen mit Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2
- außerbetrieblicher Notfallplan.

Die vorstehende Einstufung gentechnischer Arbeiten mit EHEC-Stämmen als Empfängerorganismen und die hier festgelegten Sicherheitsmaßnahmen entbinden die zuständigen Landesbehörden jedoch nicht, eine Stellungnahme der ZKBS einzuholen (vgl. § 10 Abs. 7 i. V. m. §§ 8 Abs. 1 und 9 Abs. 3 GenTG). Solche Arbeiten sind weiterhin der ZKBS zur Beratung/Bewertung vorzulegen.

Hat eine gentechnische Veränderung experimentell nachweislich zu einer Abschwächung der Virulenz geführt (wie z. B. die Deletion der Shigatoxingene), oder ist eine Abschwächung aufgrund einer Einzelfallbewertung zu erwarten, wird der GVO in die Risikogruppe 2 eingestuft. Die gentechnischen Arbeiten werden der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet.

Bei der Infektion von Tieren mit o. g. gentechnisch veränderten EHEC-Stämmen und bei der Haltung dieser Tiere sind Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3 gemäß Anlage 4 GenTSV ausreichend, sofern die Tiere keine sonstigen Organismen höherer Risikogruppen abgeben. Dabei ist Schutzkleidung zu tragen, die auf das Versuchstier abgestimmt ist.

Die folgenden Maßnahmen sind jedoch nicht erforderlich:

- Schleuse
- Notstromversorgung
- Unterdruck und Hochleistungsschwebstofffilter zur Filtration der Abluft
- Ein im Tierhaltungsraum befindlicher Autoklav.
- Tragen eines Atemschutzes
- Filter an Isolatoren oder isolierten Räumen.

#### Begründung:

EHEC-Stämme besitzen eine Kombination von verschiedenen Virulenzfaktoren. Das Infektionsrisiko für die an den Arbeiten beteiligten Personen ist jedoch begrenzt, da die Infektionserreger normalerweise nur durch orale oder Kontaktinfektion, jedoch nicht auf dem Luftweg übertragbar sind. Wegen der niedrigen Infektionsdosis und der Gefahr, lebensbedrohliche Erkrankungen auszulösen, ist jedoch eine besondere Sorgfalt beim Umgang mit EHEC-Stämmen geboten. Eine Gefährdung der an den Arbeiten beteiligten Personen durch die aerogene oder parenterale Übertragung der GVO ist bei Einhaltung einer guten mikrobiologischen Praxis auch ohne die o. g. Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3 auszuschließen.

#### C. Gentechnische Arbeiten, die darauf gerichtet sind, Shigatoxine zu exprimieren:

Bei Shigatoxinen handelt es sich um hochwirksame Toxine gemäß § 3 Nr. 5 GenTSV.

Gentechnische Arbeiten, die darauf gerichtet sind, Shigatoxine zu exprimieren, sind entsprechend der Einstufung der hierzu verwendeten GVO den Sicherheitsstufen 2 oder 3 zuzuordnen (s. Abschnitt A und B).

Bei solchen gentechnischen Arbeiten sind folgende zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen zu treffen:

- Bei den gentechnischen Arbeiten sollten unzerbrechliche und aerosoldichte Kultur-, Zentrifugations- und Reaktionsgefäße eingesetzt werden, die nur unter einer Mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (MSW2) geöffnet werden sollten.
- Zentrifugationsschritte sollten in aerosoldichten Rotoren erfolgen. Wenn keine unzerbrechlichen und aerosoldichten Zentrifugationsgefäße verwendet werden, sollte die Zentrifuge soweit technisch möglich unter einer MSW2 betrieben werden oder es sollten Schutzhandschuhe, ein Mund- und Nasenschutz und eine Schutzbrille getragen werden.

- Der Arbeitsbereich, in dem mit Kulturfiltrat bzw. Toxinlösungen umgegangen wird, ist zu kennzeichnen.
- Die thermische Inaktivierung von Toxinlösungen und ggf. kontaminierte Materialien, z. B. durch Autoklavieren, ist der chemischen Inaktivierung vorzuziehen, da zur Wirksamkeit der thermischen Inaktivierung eine breitere Datenbasis vorliegt [6–10].
- Zur Dekontamination sind geeignete chemische Mittel wie mind. 0,5 %ige Natriumhypochloritlösung vorzuhalten, die regelmäßig frisch zubereitet wird.
- Vor dem Verbringen von Toxinlösungen aus der gentechnischen Anlage sind die Gefäße von außen chemisch zu dekontaminieren und in unzerbrechliche und verschlossene Transportbehälter zu überführen.
- Hinweise auf das Gefährdungspotential durch Shigatoxine und die oben aufgeführten Empfehlungen sind in die Betriebsanweisung aufzunehmen.
- Wenn gentechnische Arbeiten zur Expression von Shigatoxinen in der gentechnischen Anlage durchgeführt werden, ist hierauf an der Eingangstür der gentechnischen Anlage und im Arbeitsbereich hinzuweisen.
- Um im Havariefall, wie z. B. dem Verschütten von Toxinlösungen, die Aufnahme des Toxins über die Schleimhäute zu verhindern, sind bei der Beseitigung der Kontamination Schutzhandschuhe, ein Mund- und Nasenschutz sowie eine Schutzbrille zu tragen.

#### 4. Literatur

1. **RKI** (2011). Abschlussbericht zum EHEC/HUS-Ausbruch. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC\\_O104/EHEC-Abschlussbericht.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC_O104/EHEC-Abschlussbericht.html). Besucht am 16.04.2021.
2. **Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H** (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* **11**(9):671–6.
3. **Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H** (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* **6**(7):e22751.
4. **Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF** (2016). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, Heidelberg.
5. **Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC** (1999). Molecular characterization of a Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **37**(10):3357–61.
6. **Rasooly, Reuven, Do PM, Levin CE, Friedman M** (2010). Inhibition of Shiga Toxin 2 (Stx2) in Apple Juices and its Resistance to Pasteurization. *J Food Sci* **75**(5):M296-M301.
7. **Rasooly R, Do PM** (2010). Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *Int J Food Microbiol* **136**(3):290–4.
8. **Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE** (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun* **61**(8):3392–402.
9. **CDC** (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6th Edition. <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>. Besucht am 19.03.2021.
10. **Kittell FB, Padhye VV, Doyle MP** (1991). Characterization and inactivation of verotoxin 1 produced by *Escherichia coli* O157:H7. *J Agric Food Chem* **39**(1):141–5.