

## Entwicklung einer routinetauglichen Quantifizierungsmethode von Cereulid aus *B. cereus* und Studien zur Bildung und Stabilität des Toxins in Lebensmitteln

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik Prof. Dr. Thomas Hofmann/Dr. Timo Stark
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Genia Lücking
<b>Forschungsstelle III:</b>	Veterinärmedizinische Universität Wien Department für Pathobiologie Institut für Funktionelle Mikrobiologie Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz/Dr. Elrike Frenzel
<b>Industriegruppen:</b>	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technischen Universität München e.V., Freising-Weihenstephan
	Projektkoordinator: Angelika Schlößer, Käserei Champignon Hofmeister GmbH & Co. KG, Lauben
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2014
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 658.350,-- (Förderung durch BMWi via AiF)

### Ausgangssituation:

Europaweit ist eine Zunahme von Lebensmittelvergiftungen zu verzeichnen, die auf bakterielle Toxine zurückgehen. Der Report der Europäischen Lebensmittelbehörde EFSA vom April 2009 gibt eine 42%ige Zunahme der durch *Bacillus*-Toxine verursachten Erkrankungen innerhalb der EU an. Die Bedeutung von *Bacillus cereus* für die Lebensmittelindustrie steigt massiv, 1998 - 2000 war *B. cereus* bereits an bis zu 60 % der Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen in Gemeinschaftsverpflegungseinrichtungen beteiligt. In den letzten Jahren häufen sich Berichte über durch das Toxin Cereulid verursachte Intoxikationen. Die Aufnahme des Toxins über ein kontaminiertes Lebensmittel verursacht im besten Fall ein Erbrechenssyndrom, kann jedoch

auch schwerwiegende Erkrankungen auslösen, die eine Hospitalisierung erfordern und in Ausnahmefällen sogar tödlich verlaufen. Auffällig sind hohe Inzidenzraten, häufig erkranken 100 % der Konsumenten.

Ein schnelles, akkurates und kostengünstiges Nachweisverfahren für das Toxin Cereulid existiert bislang nicht. Es ist außerdem derzeit nur unter erheblichem Aufwand möglich zu bestimmen, ob eine *B. cereus*-Kontaminante in einem Lebensmittel ein starker oder nur ein schwacher Toxinbildner ist. Genau diese Kenntnis ist jedoch Voraussetzung, um zu entscheiden, wie ein Betrieb im relativ häufigen Fall einer Belastung mit *B. cereus* reagiert. Aus diesem Grund müssen matrixunabhängige Bestimmungsverfahren entwickelt werden, die für den Einsatz in der Routi-

neanalytik geeignet sind und der mittelständischen Industrie eine objektive, analytische Bewertung der Konzentration und Toxizität von Cereulid im gegebenen Lebensmittel zu ermöglichen. Aufgrund der Stabilität und ausgeprägten biologischen Aktivität von Cereulid wären Präventionsstrategien zur Hemmung der Toxinproduktion wichtig. Zu diesem Zweck muss jedoch bekannt sein, wie die Synthese des Toxins reguliert wird und welche Lebensmittelzusatz- bzw. Inhaltsstoffe die Toxinbildung hemmen oder möglicherweise sogar stimulieren.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines schnellen und sicheren Analyseverfahrens zur Konzentrationsbestimmung und zur objektiven Bewertung der Toxizität von Cereulid und dessen Strukturvarianten in Lebensmitteln.

#### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projektes wurde die Stabilisotopenverdünnungsanalyse für die Quantifizierung von Cereulid in mehreren Punkten optimiert: die Extraktionszeit wurde signifikant und die Messzeit auf unter 1 min verkürzt sowie eine Empfindlichkeitssteigerung um ca. Faktor 10 erreicht. Die erfolgreiche Validierung der Extraktions- und Messmethode erfolgte im Rahmen der Beteiligung zur Erstellung einer einheitlichen Quantifizierungsmethode durch das Europäische Komitee für Normung (CEN). Mittels UPLC-TOF-MS-Messung, präparativer und analytischer HPLC war es möglich, 18 Strukturhomologe von Cereulid zu identifizieren und 7 zu isolieren. Es konnten 4 Varianten (Variante a - d) bestimmt werden, bei denen im Vergleich zu der Struktur von Cereulid der Austausch einer  $\alpha$ -Hydroxysäure oder Aminosäure erfolgte. Für die Varianten f und g konnte gezeigt werden, dass sie aus denselben Dipeptiden wie Cereulid aufgebaut sind, diese jedoch zum einen in anderen Verhältnissen und zum anderen in einer anderen Anordnung (Sequenz der Amino- und Hydroxysäuren) vorliegen. Variante e zeigte im Vergleich zu Cereulid den Austausch einer  $\alpha$ -Hydroxysäure kombiniert mit einem anderen Verhältnis der Dipeptide. Mit Hilfe von zwei Aktivitätstests (HEp-2 Cytotoxizität und Membranleitfähigkeit) wurde die Toxizität der Varianten im Vergleich zu Cereulid ermittelt. Varianten b - e und g erwiesen sich als geringer toxisch und Varianten a und f zeigten eine 8-fach höhere Toxizität als Cereulid. Für die Quantifizierung von Cereulid in Kombination mit sieben Strukturhomologen (Va-

riante a - g) wurde die vorhandene Messmethode ausgebaut.

Zur Aufklärung der zellulären Lokalisation von Cereulid wurden der Toxingehalt in verschiedenen Zellfraktionen quantitativ bestimmt sowie Extraktionsversuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Cereulid vorwiegend in großen Zellbruchstücken vorhanden ist und sich effektiv von Zelloberflächen isolieren lässt, woraus zu schließen ist, dass sich ein großer Teil des produzierten Cereulids an der Außenseite von *B. cereus*-Zellen befindet. Auch von aufgereinigten Sporen konnte Cereulid extrahiert werden, womit sowohl Sporen als auch vegetative Zellen von *B. cereus* als Toxinträger in Frage kommen und bei der Verbreitung des Toxins, z.B. auch im Lebensmittelproduktionsumfeld, eine wichtige Rolle spielen können.

Im Rahmen des Projekts konnte der Transkriptionsfaktor CodY als ein zentraler Regulator der Toxinbildung identifiziert werden. CodY vernetzt direkt den Primärstoffwechsel der Zellen mit der Toxinbiosynthese. Verzweigt-kettige Aminosäuren erwiesen sich hierbei als Schlüsselmetabolite. Diese Erkenntnis wurde genutzt, um die Cereulid-Ausbeute für Strukturanalysen und für die Untersuchung der unterschiedlichen Cytotoxizität von Cereulid-Strukturvarianten zu erhöhen. Ein neu generierter monoklonaler Antikörper gegen die Cereulidsynthetase lieferte einen Ansatzpunkt zur Entwicklung ELISA-basierter Nachweissysteme. Ein Referenzset bestehend aus 80 emetischen *B. cereus*-Stämmen wurde zusammengestellt und das Cereulidbildungsvermögen der Stämme mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF-MS erfolgreich in Hoch-, Mittel- u. Niedrigproduzenten eingeteilt. Begleitend durchgeführte Metabolomstudien zeigten, dass sich hoch toxische und schwach toxische Stämme in ihren metabolischen Kapazitäten unterscheiden. Dies liefert die Möglichkeit, zukünftig ausgewählte Referenzmetabolite zur Bestimmung hoch- und niedrigtoxinogener Stämme heranzuziehen.

Zur Identifizierung möglicher Cereulidsynthesehemmender Substanzen wurde die Wirkung von Lebensmittelzusatzstoffen und Einzelsubstanzen pflanzlicher Herkunft auf das Wachstum und die Cereulidproduktion von *B. cereus* untersucht. Etwa die Hälfte der getesteten Substanzen zeigte das Potential, Bakterienwachstum und/oder die Cereulidproduktion zu hemmen, allerdings war die Wirkung der meisten Substanzen in komplexen Lebensmitteln geringer bzw. produktspezifisch.

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse sind insbesondere für die deutsche Milch erzeugende sowie Milch verarbeitende Industrie und für ihre Zulieferer, wie z.B. Gewürz-, Gemüse- und Kakaohersteller, sowie für Produzenten von Tiernahrungsmitteln, Lebensmittelzusatzstoffen und Hersteller diätetischer Lebensmittel von Relevanz.

Die erzielten Forschungsergebnisse des Projektes, insbesondere die SIDA-UPLC-MS/MS-Methodenoptimierung und ihre Validierung, ermöglichen den quantitativen Nachweis des hitzestabilen emetischen Toxins Cereulid in Lebensmitteln und somit eine bessere Abschätzung des Risikopotentials von mit *B. cereus* kontaminierten Produkten. Durch die Identifizierung von teilweise bis zu 8-fach toxischeren Strukturvarianten, besteht nun die Möglichkeit, das Gefährdungspotential durch emetischen *B. cereus* besser verstehen und erfassen zu können.

Die Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Cereulidproduktion auf enzymatischer, molekularer Ebene sowie auf Proteom- und Metabolom-Ebene liefern äußerst wichtige Daten und Einblicke zum Verständnis der Cereulid-Synthese. Diese Erkenntnisse werden langfristig zur Verbesserung von Qualitätskonzepten beitragen, da sie als Meilenstein einer heutzutage angestrebten „Risiko-orientierte Diagnostik“ im Gegensatz zur derzeit standardisierten „taxonomisch-orientierten Diagnostik“ gewertet werden können. Eine aktuelle Auseinandersetzung zum Thema Verbesserungskonzepte in der *B. cereus*-Diagnostik ist einem Review von EHLING-SCHULZ und MESSELHÄUSSER zu entnehmen (siehe Publikationen). In einem umfangreichen Hemmstoffscreening wurden Lebensmittelzusatzstoffe und andere Substanzen ermittelt, welche das Wachstum und die Cereulidproduktion unter Laborbedingungen und teilweise auch im Lebensmittel selbst inhibieren. Diese Daten können zur Entwicklung von Präventionsstrategien dienen, um z.B. durch Rezepturänderungen die Toxinproduktion in besonders gefährdeten Lebensmitteln zu hemmen und somit die Produktsicherheit zu erhöhen. Die etablierte UPLC-TOF-MS-Screening-Methode erlaubt eine schnelle Eingruppierung der emetischen Stämme von *B. cereus* in Hoch-, Mittel- und Niedrigtoxinproduzenten, was die Risikoabschätzung und das Gefährdungspotential von kontaminierten Lebens- und Futtermitteln für die Produzenten beschleunigt und erleichtert.

Begleitende Untersuchungen zur effektiven Neutralisation von Cereulid bilden die Grundlage zur Etablierung von Detoxifikationsstrategien von Cereulid in Lebensmitteln. Kleine und mittelständische Unternehmen können hierdurch eigene langwierige und kostenintensive mikrobiologische Untersuchungen reduzieren.

### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Marxen, S., Stark, T.D., Frenzel, E., Rüttschle, A., Lücking, G., Pürstinger, G., Pohl, E.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. und Hofmann, T.: Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2439-2453 (2015).
3. Frenzel, E., Kranzler, M., Stark, T.D., Hofmann, T. und Ehling-Schulz, M.: The endospore-forming pathogen *Bacillus cereus* exploits a small colony variant-based diversification strategy in response to aminoglycoside exposure. *mBio*, 6 6. e01172-15 (2015).
4. Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., und Gohar, M.: Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.* 6, 704 (2015).
5. Lücking, G., Frenzel, E., Rüttschle, A., Marxen, S., Stark, T.D., Scherer, S., Hofmann, T. und Ehling-Schulz, M.: Ces locus embedded proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. *Front. Microbiol.* 6, 1101 (2015).
6. Marxen, S., Stark, T.D., Rüttschle, A., Lücking, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. und Hofmann, T.: Multiparametric quantitation of the *Bacillus cereus* toxins Cereulide and Isocereulides A-G in foods. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8307-8313 (2015).
7. Stark, T.D., Marxen, S., Rüttschle, A., Lücking, G., Frenzel, E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. und Hofmann, T.: Depsipeptide intermediates interrogate proposed biosynthesis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Sci. Rep.* 5, 10637 (2015).
8. Messelhäusser, U., Frenzel, E., Blöchinger, C., Zucker, R., Kämpf, P. und Ehling-Schulz, M.: Emetic *Bacillus cereus* Are More Volatile Than Thought: Recent Foodborne Outbreaks and Prevalence Studies in Bavaria (2007-2013). *Biomed. Res. Int.* 465603 (2014).
9. Stark, T., Marxen, S., Rüttschle, A., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. und Hofmann, T.: Mass spectrometric profiling of

*Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 191-201 (2013).

10. Ehling-Schulz, M. und Messelhäusser, U.: *Bacillus* „next generation“ diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front. Microbiol.* 4 (32), 1-8 (2013).
11. Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lücking, G., Scherer, S. und Ehling-Schulz, M.: *CodY* orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Mol. Microbiol.* 85 (1), 67-88 (2012).

Veterinärmedizinische Universität Wien  
 Department für Pathobiologie  
 Institut für Funktionelle Mikrobiologie  
 Veterinärplatz 1, 1210 Wien  
 Tel.: +43 1 25077-5223  
 Fax: +43 1 664 60257-6397  
 E-Mail: monika.ehling-schulz@vu-wien.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
 Tel.: +49 228 3079699-0  
 Fax: +49 228 3079699-0  
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
 Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
 Lehrstuhl für Lebensmittelchemie  
 und Molekulare Sensorik  
 Lise-Meitner-Str. 34  
 85354 Freising-Weihenstephan  
 Tel.: +49 8161 71 2901  
 Fax: +49 8161 71 2949  
 E-Mail: thomas.hofmann@wzw.tum.de

Technische Universität München  
 Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
 forschung, Abt. Mikrobiologie  
 Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising  
 Tel.: +49 8161 71-3516  
 Fax: +49 8161 71-4512  
 E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/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.