

## Entwicklung eines Biosensorarrays zur schnellen Bestimmung von Mykotoxinen in Getreide

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Oberschleißheim Prof. Dr. Erwin Märtlbauer/Dr. Richard Dietrich
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Department Chemie Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie Prof. Dr. Reinhard Nießner/Prof. Dr. Dietmar Knopp
<b>Industriegruppen:</b>	Verband Deutscher Mühlen e. V. (VDM), Bonn Verband Deutscher Großbäckereien e. V., Düsseldorf Verband der Teigwarenhersteller und Hartweizenmühlen Deutschlands e.V. (VTH), Berlin Getreidenährmittelverband – Bundesverband der Hersteller von Nahrungsmitteln aus Getreide und Reis e.V., Berlin Fachverband der Stärke-Industrie e.V., Berlin
	Projektkoordinator: Dr. Christoph Persin Eurofins Food GmbH, Hamburg
<b>Laufzeit:</b>	2011 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 237.220,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Für Unternehmen der Lebensmittelindustrie sind Qualitätssicherung und Verbraucherschutz essentielle Voraussetzungen für den Erhalt der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit. Im Fall von Getreide und Getreideprodukten ist dabei vor allem der Nachweis von Mykotoxinen von herausragender Bedeutung. Mykotoxine sind hochwirksame Giftstoffe, die von verschiedenen pflanzenpathogenen Schimmelpilzgattungen gebildet werden und schon bei geringer Konzentration in Lebensmitteln oder Futtermitteln eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier darstellen können. Daher wurden in der EU für eine ganze Reihe dieser Verbindungen im Rahmen von gesetzlichen Regelungen Höchstwerte festgelegt. Da diese Pilzgifte auch durch aufwändige Behandlungsmaßnahmen nur unzureichend aus dem Erntegut entfernbar sind, kommt der Eingangskontrolle (Analyse) bei den Getreideannahmestellen und Mühlen eine entscheidende Rolle zu. Um potentielle Gesund-

heitsrisiken produktions- und zeitnah erkennen und beseitigen zu können, ist die Entwicklung und Kombination neuer analytischer Techniken zum schnellen quantitativen Mykotoxin-Nachweis für kleine und mittelständische Unternehmen von enormer wirtschaftlicher Bedeutung.

Ziel des Vorhabens war deshalb die Entwicklung, Optimierung und Validierung eines auf immunologischen Prinzipien basierenden Multi-Analyt-Verfahrens unter Verwendung von neuartigen Biochips, das den parallelen, quantitativen und kostengünstigen Nachweis aller sechs in Getreide und Getreideprodukten mit einem Höchstwert belegten Mykotoxine bzw. Mykotoxin-Gruppen innerhalb von 20 - 25 min (Gesamtanalysedauer für die Extraktion der Proben und den Nachweis) mit einem vollautomatisierten Mikroarray-Auslesegerät ermöglicht. Das Verfahren sollte für verschiedene Getreidearten realisiert werden.

### Forschungsergebnis:

Zur Etablierung des Multi-Analyt-Verfahrens wurden verschiedene Verfahren zur Immobilisierung von Mykotoxinen bzw. deren Derivaten, wie z.B. Hemisuccinate oder Oxime, auf Glasoberflächen überprüft. Eine auch in Hinblick auf die gewünschte Regenerierbarkeit der Chips ausreichend stabile Bindung konnte durch die Reaktion der bei den Mykotoxinen vorhandenen bzw. eingeführten Carboxylgruppen mit den Aminofunktionen von Diaminopolyethylenglycol (DAPEG)-beschichteten Glasobjektträgern (Chip) erreicht werden. Mit Ausnahme von Zearalenon, das sich wegen einer photochemischen Isomerisierung auf dem Chip einer Regeneration entzieht, waren mit den so immobilisierten Toxinen mindestens 50 repetitive Messzyklen durchführbar.

Als Rezeptoren zum Nachweis der Mykotoxine wurden monoklonale Antikörper (mAk) eingesetzt. Dazu wurden von den bei den beiden beteiligten Arbeitsgruppen bereits vorhandenen mAk zum Nachweis von Aflatoxinen, Deoxynivalenol und Zearalenon größere Mengen hergestellt und gereinigt. Zur Komplettierung der Antikörperpalette wurde zum einen ein alternativer mAk gegen Fumonisin B<sub>1</sub> etabliert, der den Nachweis dieses Mykotoxins auf Grenzwertniveau ermöglichte. Des Weiteren konnten durch den Einsatz von HT-2-Proteinkonjugaten bei Mäusen spezifische Antikörper induziert werden, die den Summennachweis von T-2/HT-2 Toxin ermöglichen. Durchgeführte Zellfusionen resultierten in der Etablierung von vier mAk – alle vom IgG-Subtyp - zum Nachweis von T-2/HT-2. Die Nachweisgrenze der entsprechenden EIA-Verfahren liegt im Bereich von 0,3 – 0,9 ng Toxin/ml; zwei der vier etablierten Antikörper sind prinzipiell für den angestrebten Summennachweis der beiden Toxine, T-2 und HT-2 Toxin, geeignet, bei der Adaptation der Nachweise an den Biosensorarray traten aber Probleme mit der Regenerierbarkeit auf. Ein Großteil der zum Nachweis von OTA neu entwickelten mAk erreichte hingegen nicht die geforderte Bestimmungsgrenze, nur ein Klon war unter den Bedingungen eines klassischen EIA-Formats in der Lage, OTA im unteren pg-Bereich nachzuweisen. Die 50 %-Hemmdosis lag bei 0,29 ng Ochratoxin A per ml. Mit einer Nachweisgrenze von unter 0,1 ng OTA/ml zählt der neu entwickelte mAk 3A3 zu den sensitivsten, bislang beschriebenen monoklonalen Mausantikörpern gegen dieses Mykotoxin.

Zur quantitativen Untersuchung von Getreideproben im Biosensorarray wurden Kalibrationskurven in Hafer-Matrix erstellt. Nach geeigneter Verdünnung der Probenextrakte mit PBS auf einen Methanolgehalt von 20 % konnte eine Bestimmung von Aflatoxinen, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Fumonisin B<sub>1</sub> und T-2 Toxin in verschiedenen Getreidearten im MRL-relevanten Bereich realisiert werden. Für HT-2 und Zearalenon konnte aufgrund der problematischen Regenerierbarkeit dieser Assays im Biosensorarray keine fundierte Validierung durchgeführt werden. Die mittels dotierter Getreideproben bzw. Referenzmaterialien und Verwendung von Methanol/Wasser (80:20, v/v) als universellem Extraktionsmittel ermittelten Wiederfindungsraten betragen 70 - 130 % mit Ausnahme der hydrophilen Toxine Deoxynivalenol und Fumonisin B<sub>1</sub>, für die eine geringere Wiederfindung von 55 - 83 % erhalten wurde. Die Gesamtmesszeit pro Probe, inkl. Probenvorbereitung, beträgt nur 12 Minuten. Orientierende Untersuchungen im Mikrotiterplattenformat zeigten zudem, dass durch den Einsatz peroxidasemarkierter Primärantikörper die Testzeit noch weiter verringert werden könnte.

Eine Interlabor-Studie zur Bestimmung von Deoxynivalenol in kontaminierten Weizenproben unter Verwendung verschiedener Analyseverfahren (Biosensorarray, Mikrotiterplatten-Enzymimmuntest, Aokinmycontrol-Test und HPLC-MS), ergab eine akzeptable Übereinstimmung der neu entwickelten Microarray-basierten Methode mit den etablierten Verfahren, machte aber auch die herausragende Bedeutung des Extraktionsmittels und des Proben-Cleanups deutlich. Die Ergebnisse des Projektes bilden damit die Grundlage für eine verbesserte, schnelle und parallele Quantifizierung von Mykotoxinen auf Grenzwertniveau unter Praxisbedingungen.

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Anwendungsfelder der Ergebnisse ergeben sich in der gesamten getreideverarbeitenden Industrie. Die wirtschaftliche Relevanz sei aufgezeigt am Beispiel der Mühlenwirtschaft. Mit einem Jahresumsatz von 2,5 Mrd. € im Wirtschaftsjahr 2012/2013 und rund 6.000 Beschäftigten ist die deutsche Mühlenwirtschaft eine wichtige Branche innerhalb der Ernährungsindustrie. Über 600 mittelständisch geprägte deutsche Mühlen vermahlen Jahr für Jahr rund 8 Mio. Tonnen Weizen und Roggen, 540.000 t Weizen- und Roggenmahlerzeugnisse im Wert von ca. 210

Mio. € werden exportiert. Für die Untersuchung auf Mykotoxin-Kontaminanten werden derzeit vor Ort v.a. immunchemische Schnelltests, die allerdings nur Einzelsubstanzen nachweisen können, eingesetzt, vielfach werden die Analysen auch als Auftragsuntersuchungen an spezialisierte Labors vergeben. Durch seine kurzen Testzeiten, die mögliche Prozessintegration und die breite Einsetzbarkeit hebt sich das neue Sensor-System jedoch von den herkömmlichen Methoden ab. Außerdem ist eine signifikante Einsparung der Analysekosten möglich. Einbußen in der Qualität von Lebensmitteln oder Gefahren für die Gesundheit der Konsumenten können damit rechtzeitig detektiert und Imageschäden sowie Folgekosten (Produkthaftung) vermieden werden.

Das im Projekt erstmals realisierte Konzept eines regenerierbaren Biosensorarrays zur quantitativen und schnellen Bestimmung relevanter Mykotoxine in Getreide auf Grenzwert-Niveau bietet die Möglichkeit, ähnlich wie für den Antibiotika-Nachweis in Milch, zukünftig Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Schnellanalyse von Rückständen in Lebensmitteln weiterzuentwickeln und für den Lebensmittelsicherheitsmarkt anzubieten. Ebenso sind die erarbeiteten Methoden für die mikrobiologische Wasseranalytik, die Sicherheitsforschung sowie für die human- oder tiermedizinische Diagnostik übertragbar.

Aus den erzielten Ergebnissen lassen sich auch weitere Nutzenanwendungen ableiten, die über die Analyse von Rohgetreide und reinen Getreideprodukten hinausgehen. Vorstellbar wäre zum Beispiel - nach entsprechender Adaption - der Einsatz auch in anderen Bereichen der Lebensmittelproduktion, wie z.B. bei der Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung, Teigwaren, Backwaren, cerealienhaltigen Snacks, Frühstückscerealien und diätetischen Produkten. Die Notwendigkeit der Überprüfung von Rohstoffen, Zwischen- und Endprodukten hat Relevanz sowohl für kleinere als auch für größere Betriebe.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2013.
2. Oswald, S., Knopp, D., Niessner, R., Dietrich, R. und Märtlbauer, E.: Biosensorarray – ein automatisiertes immunologisches Verfahren. Dt. Lebensmittel Rundsch., 506-510 (2014).
3. Oswald, S., Karsunke, R., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R. und Knopp, D.: Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals. Anal. Bioanal. Chem. 405, 6405-6415 (2013).
4. Dietrich, R., Märtlbauer, E., Knopp, D., Oswald, S. und Nießner, R.: Innovative Mykotoxin-Analytik in 25 Minuten – Microarray-System zum Nachweis von Mykotoxinen. Food-Lab 5/6, 6-9 (2013).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Universität München  
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim  
Tel.: +49 89 2180-78601  
Fax: +49 89 2180-78602  
E-Mail: E.Maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Technische Universität München  
Department Chemie  
Institut für Wasserchemie und Chemische  
Balneologie  
Marchioninistraße 17, 81377 München  
Tel.: +49 89 2180-78231  
Fax: +49 89 2180-78255  
E-Mail: Reinhard.Niessner@ch.tum.de

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

... 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.