

## Nachweis von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* in Milchprodukten nach Bioaffinitätsanreicherung

<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>	Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Markus Fischer/Prof. Dr. Uli Hahn
<b>Forschungsstelle III:</b>	Universität Erlangen-Nürnberg Department für Chemie- und Bioingenieurwesen Lehrstuhl für Strömungsmechanik, Prof. Dr. Antonio Delgado/Dr. Rainer Benning
<b>Forschungsstelle IV:</b>	Technische Universität München Department Chemie Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie Prof. Dr. Reinhard Nießner/Dr. Michael Seidel
<b>Industriegruppe:</b>	Milchindustrie-Verband e.V., Berlin
	Projektkoordinator: Rudolf Kaiser Zott SE & Co. KG, Mertingen
<b>Laufzeit:</b>	2009 - 2012
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 765.450,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Für Unternehmen der Lebensmittelindustrie sind Qualitätssicherung und Verbraucherschutz essentielle Voraussetzungen für den Erhalt der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit. Insbesondere der Nachweis von Mikroorganismen ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung, wobei aufgrund der Vorkommenshäufigkeit und des Potentials als Lebensmittelintoxikationserreger *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* bei Milch und Milchprodukten eine besondere Rolle zukommt. Die in der Praxis eingesetzten Tests – i.d.R. klassische mikrobiologische Verfahren – zum Nachweis des Hygieneindikators *S. aureus* bzw. des Verderberregers *B. cereus* erfordern zum Teil einen hohen zeitlichen Aufwand. Um Hygiene- und Qualitätsmängel sowie

potentielle Gesundheitsrisiken während des Verarbeitungsprozesses schnell erkennen und beseitigen zu können, ist diese Zeitspanne nicht akzeptabel. Aus wissenschaftlich-technischer Sicht ist eine Vereinfachung und Verbesserung der bestehenden Analytik nur über eine selektive Aufarbeitung bzw. eine spezifische Anreicherung des Probenmaterials möglich.

Ziel des Forschungsvorhabens war deshalb die Entwicklung einer robusten und effizienten Bioaffinitäts-Methode, die die Anreicherung und den direkten Nachweis von *S. aureus* und *B. cereus* (Sporen) mittels auf Rezeptoren basierenden monolithischen Affinitätsssäulen (MAS) und eines vollautomatisierten Mikroarray-Auslesegerätes ermöglicht.

### Forschungsergebnis:

Als Rezeptoren für die Separation und Detektion der Mikroorganismen wurden poly- (pAk) und monoklonale Antikörper (mAk) sowie Aptamere zum Nachweis von *B. cereus*-Sporen und *S. aureus* hergestellt. Sowohl die mAk als auch die pAk gegen *B. cereus* (Sporen) zeigten eine breite Reaktivität mit den eingesetzten *B. cereus*-Isolaten ( $n=84$ ), mittels Sandwich-EIA konnten bis zu  $10^4$  KbE/ml *B. cereus*-Sporen nachgewiesen werden. Die pAk zum Nachweis von *S. aureus* zeichneten sich ebenfalls durch eine breite Spezifität und hohe Sensitivität aus, alle untersuchten Staphylokokken-Stämme ( $n=111$ ) reagierten positiv, die Nachweisgrenzen betragen bis zu  $9,1 \times 10^3$  KbE/ml. Eine spezifische Reaktion mit Koagulase-positiven Staphylokokken (*S. aureus*) konnte für einige der 12 genauer charakterisierten mAk gegen *S. aureus* gezeigt werden. Ebenso war die Selektion von Aptameren mittels SELEX erfolgreich für Sporen von *B. cereus* und das Oberflächenprotein A von *S. aureus*. Aufgrund der hohen Oberflächendiversität der Sporen von *B. cereus* wurden mehrere Aptamersequenzen erhalten, von denen sich drei durch eine hohe Spezifität und Affinität auszeichnen. Sechs selektierte Aptamere zeigten eine hohe Affinität für Protein A und reagierten zudem mit intakten *S. aureus*-Keimen. Eine erfolgversprechende Entwicklung einer SELEX-Methode für vollständig intakte *S. aureus*-Bakterien wurde ebenfalls etabliert. Allerdings zeigten die erhaltenen Aptamersequenzen keine deutlichen Konsensussequenzen, so dass die Isolierung eines Minimalmotivs nicht möglich war.

Parallel zu der Generierung der Rezeptoren erfolgten die theoretischen (numerische Simulationen in 2D und 3D) und praktischen Arbeiten (Prototyp) zur Herstellung der monolithischen Affinitätsäulen. Mathematische Modellierungen zeigten, dass kleine Einlassabstände ( $< 0,1$  mm) eine Rezirkulation verhindern und dass in Hinblick auf die Geschwindigkeits- und Strömungsverteilung ebene Zulaufformen Vorteile bieten. In Hinblick auf die Bindung der Mikroorganismen zeigten die theoretischen Ergebnisse, dass pro Volumeneinheit mehr Mikroorganismen bei niedrigeren Volumenflussraten adsorbiert werden können. Dies wurde durch die praktischen Versuche bestätigt. Dazu wurde das monolithische Material mit funktionellen Gruppen aktiviert, so dass die Antikörper kovalent daran gebunden werden konnten. Am besten geeignet

erwiesen sich dabei die pAk, mittels derer die Anreicherung und Isolierung für *S. aureus* (hitzeinaktiviert bzw. lebend) und *B. cereus*-Sporen optimiert wurde. Die Wiederfindungsraten für die Keime in Pufferlösungen lagen bei 74 % (hitzeinaktivierte, Protein A positive *S. aureus*), 35 % (vitale Protein A positive *S. aureus*) bzw. 79 % (vitale *B. cereus*-Sporen), betrug allerdings nur 9 % bei lebenden, Protein A negativen *S. aureus*-Keimen. Des Weiteren konnte die Anreicherung von *B. cereus*-Sporen aus Magermilch realisiert werden, bei einem Ausgangskeimgehalt von  $10^1 - 10^3$  KbE/ml betrug die Wiederfindungsraten bis zu 57 %, der Anreicherungsfaktor lag hierbei bei 50. Auf dem MCR 3 wurde ein Sandwich-Mikroarray-Immunoassay für *S. aureus* und *B. cereus*-Sporen etabliert. Die Nachweisgrenze betrug  $1,1 \times 10^3$  *S. aureus*/mL und  $9,6 \times 10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL. Bei Kombination von monolithischer Immunfiltration und Mikroarray-Detektion konnten Signalerhöhungen um bis zu Faktor 100 für *B. cereus*-Sporen realisiert werden. Die Ergebnisse des Projektes stellen eine wesentliche Vereinfachung und Verbesserung der bestehenden Analytik für diese Parameter dar.

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Primäre Anwendungsfelder der Ergebnisse sind flüssige Lebensmittel, z.B. im Bereich der Milchverarbeitung. Mit einem Jahresumsatz von über 20 Mrd. € pro Jahr und etwa 37.000 Beschäftigten ist die deutsche Milchindustrie und Molke- und Milchverarbeitung die stärkste Branche innerhalb der Lebensmittelindustrie. Für die Untersuchung auf mikrobielle Hygieneindikatoren werden derzeit mikrobiologische und molekularbiologische Methoden eingesetzt: Durch seine kurzen Testzeiten, die mögliche Prozessintegration und die breite Einsetzbarkeit hebt sich das neue Sensor-System jedoch von den herkömmlichen Methoden ab. Einbußen in der Qualität von Lebensmitteln oder Gefahren für die Gesundheit der Konsumenten können damit rechtzeitig detektiert und existenzbedrohende Imageschäden sowie Folgekosten (Produkthaftung) vermieden werden. Die Entwicklung von verlässlichen Analysemethoden ist generell von großem wirtschaftlichem Interesse. Somit leisten die im Vorhaben erzielten Ergebnisse in vielerlei Hinsicht einen Beitrag zur Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit kleiner und mittlerer Unternehmen (kmU).

Die im Projekt erstmals realisierte Kombination eines Sandwich-Mikroarray-Immunoassays für Mikroorganismen mit einer innovativen monolithischen Immunfiltration bietet Diagnostikherstellern oder -anbietern im Lebensmittelbereich die Möglichkeit, zukünftig Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Schnellkonzentrierung und -analyse von Mikroorganismen in Lebensmitteln weiterzuentwickeln und später für den Lebensmittelsicherheitsmarkt anzubieten. Ebenso sind die erarbeiteten Methoden für die mikrobiologische Wasseranalytik, die Sicherheitsforschung sowie für die human- oder tiermedizinische Diagnostik übertragbar. Durch die Erweiterung der Anwendungspalette für Multiplex-Analysen auf dem MCR 3 wird diese Analysenplattform auf dem Markt immer interessanter. Der milchverarbeitenden Industrie, die zum Großteil aus KMU besteht, bieten diese Schnellkonzentrierungs- und Schnellanalyseverfahren den Vorteil, Lebensmittel mit einer noch höheren Qualität anzubieten und damit international Wettbewerbsvorteile zu erlangen.

Aus den erzielten Ergebnissen lassen sich auch weitere Nutzenanwendungen ableiten, die über die Analyse von flüssigen Lebensmitteln hinausgehen. Vorstellbar wäre zum Beispiel der generelle Einsatz in der Lebensmittelproduktion - nach entsprechender Adaptation. Die Notwendigkeit der Überprüfung von Rohstoffen, Zwischen- und Endprodukten hat Relevanz sowohl bei kleinen als auch bei größeren Betrieben.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2012.
2. Benning, R. und Delgado, A.: Neues Verfahren zum schnelleren Nachweis lebensmittelrelevanter Mikroorganismen. RFL-Rundsch. Fleischhyg. Lebensmittelüberw. 12, 416-417 (2011).
3. Benning, R., Nesme, A. O. und Delgado, A.: Bioaffinitätsanreicherung als neues Verfahren zum Nachweis von lebensmittelrelevanten Mikroorganismen. Tagungsband FEI-Jahrestagung 2011, ISBN 978-3-925032-50-9, 15-29 (2011).
4. Ott, S., Seidel, M. und Niessner, R.: Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of *Staphylococcus aureus*. J. Separ. Sc., 34, 2181-2192 (2011).
5. Benning, R. und Delgado, A.: Bioaffinitätsanreicherung zum Nachweis von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* in Milchprodukten. Food-Lab 3/11, 11-13 (2011).
6. Díez, L., Singh, J., Nesme, A., Nagel, M., Benning, R., Wierschem, A., Rauh, C. und Delgado, A.: Prozessanalyse und -design in der Lebensmitteltechnologie. (Posterabstract) Tagungsband 68. FEI-Jahrestagung 2010, 112-113 (2010).

#### 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

Universität Hamburg  
Hamburg School of Food Science  
Institut für Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: +49 40 42838 4359  
Fax: +49 40 42838 4342  
E-Mail: markus.fischer@uni-hamburg.de

Universität Erlangen-Nürnberg  
Department für Chemie- und Bioingenieurwesen  
Lehrstuhl für Strömungsmechanik  
Cauerstrasse 4, 91058 Erlangen  
Tel.: +49 9131 85 29500  
Fax: +49 9131 85 29503  
E-Mail: antonio.delgado@Istm.uni-erlangen.de

Technische Universität München  
Department Chemie  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Marchioninistraße 17, 81377 München  
Tel.: +49 89 2180-78 231  
Fax: +49 89 2180-78 255  
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 3079699-9  
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.