

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Entwicklung eines Nachweissystems für Fusarienbefall

Dr. Klaus Stadtlander

Märkische Fachhochschule Iserlohn, Frauenstuhlweg 31, D-58644 Iserlohn

Tel. 02371-566272

stadtlander@mfh-iserlohn.de www.mfh-iserlohn.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: **109**

Poster

Für das Wildwerden (Gushing) des Bieres sind Schimmelpilze verantwortlich. Daher muß man das Eingangsmaterial optisch genau auf Schimmelpilzbefall hin untersuchen – will man das Problem nicht zu einem ökonomischen Problem auswachsen lassen –oder Untersuchungen anstellen, ob typische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen vorliegen. Zu Letzterem gehören zum einen die Toxine und zum anderen die extrazellulären Polysaccharide (EPS), einem typischen Fusarien-Stoffwechselprodukt, das ausgeschieden wird.

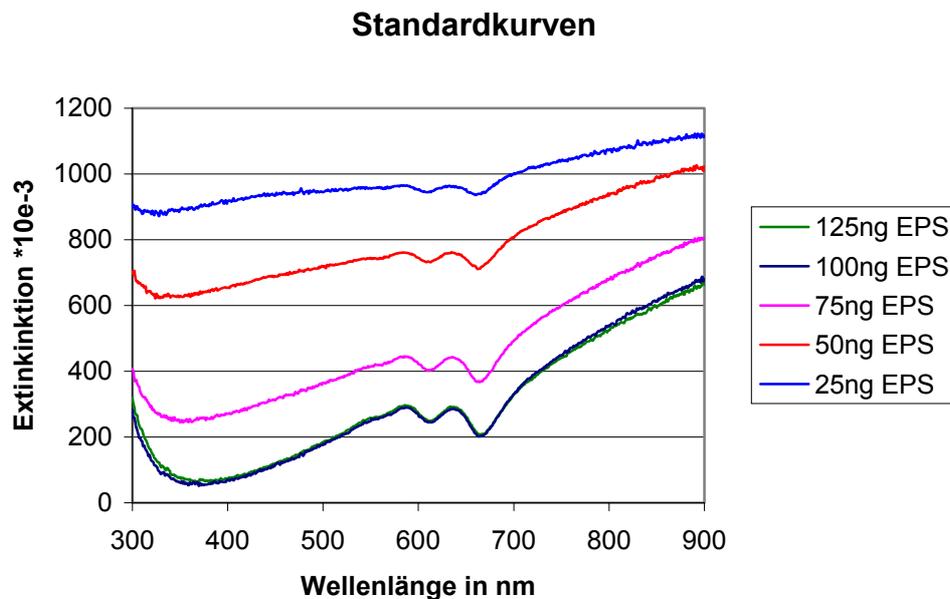
Zur Messung des Toxins wurde ein ELISA auf Desoxynivalenol (DON) entwickelt. Da jedoch das DON nicht von allen Fusarien gebildet wird, stellt dieser Nachweis keine sichere Methode dar [1]. Eine direkte Korrelation zwischen EPS und DON existiert nicht. Schimmelpilze bilden in jedem Fall EPS, aber nicht zwangsläufig DON. Daher erscheint der EPS-Test als der zuverlässigere Nachweis auf Fusarienbefall.

Der Latex-Agglutinationstest auf EPS von BioGenes (Berlin) (EPS - Test) ist leicht und mit geringem technischem Aufwand durchführbar. Er stellt eine sinnvolle Methode zur Detektion von Fusarien dar und ist den bereits bekannten Tests aufgrund seiner Spezifität und der kurzen Analysedauer wie auch der einfachen Handhabung überlegen. Aufgrund der zuverlässigen Bildung extrazellulärer Polysaccharide durch die Pilze und der spezifischen Reaktion auf der Basis eines Antikörper-Antigen-Komplexes bietet dieser Agglutinationstest eine sehr gute Möglichkeit Fusarienbefall zu detektieren.

Die zur Zeit wohl am häufigsten angewandten Untersuchungen werden beim bereits fertigen Bier gemacht, am Ende des gesamten Brauprozesses. Das Überschäumen des Bieres wird unter den forcierten Bedingungen des Schüttelns und Aufstoßens der Flaschen geprüft. Bei sämtlichen Gushing –Tests wird die Entwicklung der Schaumkrone betrachtet und vermessen, eine etwas umständliche und kostspielige Vorgehensweise, da sie am Ende des Produktionsprozesses liegt.

Ziel unserer bisherigen Arbeit war es, einen bereits bestehenden EPS-Test der Firma BioGenes (Berlin) soweit anzupassen, dass er in einem kontinuierlichen Fließ-Injektions-Analyse-System

einfach, schnell und automatisierbar eingesetzt werden kann. Der Schnelltest wird von der Firma Jüke in ein bestehendes Fließinjektionsanalyzesystem integriert. Der Latex-Agglutinationstest wurde entsprechend verändert, sodass nach Reaktion und Abzentrifugation der Überstand fotometrisch gemessen werden konnte. Dabei gilt, daß je mehr agglutiniert wird, desto höher die Trübung, aber desto geringer die Färbung des Überstandes relativ zum Leerwert wird.



Deutlich zu sehen sind die Minima im Bereich 610 und 660 nm. Daher wurde letztere Wellenlänge zur Feststellung einer Korrelation zwischen den Standardkonzentrationen und der gemessenen Absorptionsdifferenz genutzt, dann wurden Realproben eingesetzt. Verschiedene Proben (insgesamt 21) von Gerste und Malz aus einer Brauerei wurden nach Extraktion mit dem photometrischen Test vermessen. Die Werte fügten sich sehr gut in die Kalibrationskurve ein und konnten mit dem Agglutinationstest von BioGenes korreliert werden. Damit wurde deutlich, daß eine weitere Verfeinerung des Tests durchgeführt werden sollte.

Diese besteht darin, daß nun zusätzlich eine Korrelation gesucht und gefunden wurde zwischen dem Agglutinationstest von BioGenes und einem DNS-Nachweis mittels PCR. In Versuchen mit Einsatz der PCR konnte eine deutliche Korrelation gezeigt werden zwischen der Zunahme an EPS bedingt durch Weiterwachsen der Kultur nach Beimpfung und dem erhaltenen Signal in der PCR. Eine vorherige Kontrolle erbrachte kein Signal bei nicht kontaminiertem Getreide. Diese Nullprobe, wie auch die vorhergehenden Beimpfungs-Proben, konnte mit dem BioGenes – EPS-Test verifiziert werden. Nachfolgende Versuche sollen auch bildverarbeitungstechnische Lösungen angehen, mit deren Hilfe eine Automatisierung des EPS-Tests ermöglicht werden kann. Damit könnte auch der bisher noch notwendige und etwas aufwändige Zentrifugationsschritt umgangen werden.

Die hier vorgestellten Arbeiten werden durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt im Rahmen des Projektes: „Verbund Sensorik in der Biotechnologie“ gefördert. (Fördernummer 13028/14)

Literatur

[1] L.Niessen, S.Donhauser und H. Vogel, 1991; Zur Problematik von Mykotoxinen in der Brauerei , Brauwelt.**36** , 1510