

MALDI-TOF-MS FÜR DIE ANALYSE VON PILZEN

BMWK INNO-KOM 49MF200157 | Laufzeit: 04.2021 – 09.2023 | Kathrin Leppchen-Fröhlich, Birgit Voigt, Ina Prade, FILK Freiberg

Kategorien: Leder Prüfmethoden/Analyseverfahren

AUSGANGSSITUATION

Leder als Naturwerkstoff unterliegt einem natürlichen Zersetzungsprozess durch Mikroorganismen. Die Herstellung von Lederprodukten erfolgt häufig in internationaler Arbeitsteilung. Dadurch müssen Halbfabrikate, Leder und Lederwaren über weite Strecken und verschiedene Klimazonen transportiert werden, was das Wachstum von Schimmelpilzen fördert. Der Befall führt nicht nur zur Qualitätsverminderung, sondern stellt auch eine gesundheitliche Gefährdung dar. Bisherige Methoden, Schimmelpilzarten direkt von den befallenen Materialien zu identifizieren, um anschließend geeignete Maßnahmen einzuleiten, waren ungenügend, weil dazu die vom Material isolierten Schimmelpilze bis zu 14 Tage kultiviert werden mussten, um anhand morphologischer Merkmale identifiziert werden zu können. Außerdem war eine Unterscheidung bis hinunter auf Artebene nicht möglich.

PROJEKTZIEL

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung einer schnellen, kostengünstigen und validierten Bestimmungsmethode zum Nachweis materialschädigender und gesundheitsgefährdender Schimmelpilze für verschiedene Lederprodukte, Lederarten und Zwischenprodukte (Halbfabrikate). Die zu entwickelnde Methode sollte auf Grundlage des massenspektrometrischen Verfahrens MALDI-TOF und der Detektion pilzspezifischer Proteine beruhen und von Diagnostiklaboren oder in Prüflaboren produzierender Unternehmen einfach angewendet werden können. Die zu bestimmenden Schimmelpilze sollten vom Material isoliert und ohne zeitaufwendige Kultivierung direkt analysiert werden. Dabei soll die Methode bei geringem Arbeitsaufwand und mit effektiver Probenaufbereitung zuverlässige Ergebnisse liefern.

LÖSUNGSWEG

Für die Isolation der Schimmelpilze von Leder und die Methodenentwicklungen zur Identifikation der Pilze über ihr Proteinprofil mittels MADI-TOF MS wurden Leder in der FILK-eigenen Gerberei hergestellt. Für erste Untersuchungen wurde bei der Herstellung auf den Einsatz von Konservierungsmitteln verzichtet, um

das Schimmelpilzwachstum auf Crustleder und den Halbfabrikaten zu provozieren. Später wurden in den Untersuchungen verschiedene, in der Lederindustrie relevante Konservierungsmittel verwendet. Für die gezielte Kontamination der Halbfabrikate und Crustleder wurden lederrelevante Schimmelpilze auf Nährmedien kultiviert, die Schimmelpilzsporen geerntet und in definierter Sporenzahl auf die Lederproben aufgetragen. Anschließend erfolgte die Inkubation der beimpften Materialien bis zum Wachstum der Pilze (siehe Abb. 1).

Zunächst sollten Routine-Methoden zur Isolation oberflächlich und zur Isolation invasiv wachsender Schimmelpilze von Leder und Halbfabrikaten und zur Aufbereitung des Pilzmaterials etabliert werden. Für eine schonende und ergiebige Isolation von sowohl Sporen als auch Myzel wurden unterschiedliche physikalische und chemische Methoden untersucht. Als invasiv wachsende Arten wurden *A. fumigatus*, *A. versicolor* und *Rhizopus oryzae* verwendet. Danach wurden die Proteine aus den Pilzproben extrahiert.

Die Methodenentwicklung zur MALDI-TOF MS-Analyse materialzerstörender Schimmelpilze beinhaltete die Schritte:

- Applikation der Proteine auf dem Probenziel und Auswahl der Lösungsmittel bzw. der Matrix
- Identifikation von Mischkulturen
- Schimmelpilzidentifikation in Abhängigkeit von Wachstumstemperatur und -zeit
- Identifikation der vom Material isolierten Schimmelpilze
- Überprüfung der Methoden mit Hilfe von Praxisproben

Zur Validierung der Analyseergebnisse wurden *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten in mehreren biologischen und technischen Replikaten analysiert und die Ergebnisse verglichen. Für alle Schimmelpilzarten konnten jeweils identische Spektren generiert werden. Damit erweist sich die Analysemethode als sehr robust und ist geeignet, um materialzerstörende Schimmelpilze identifizieren zu können.

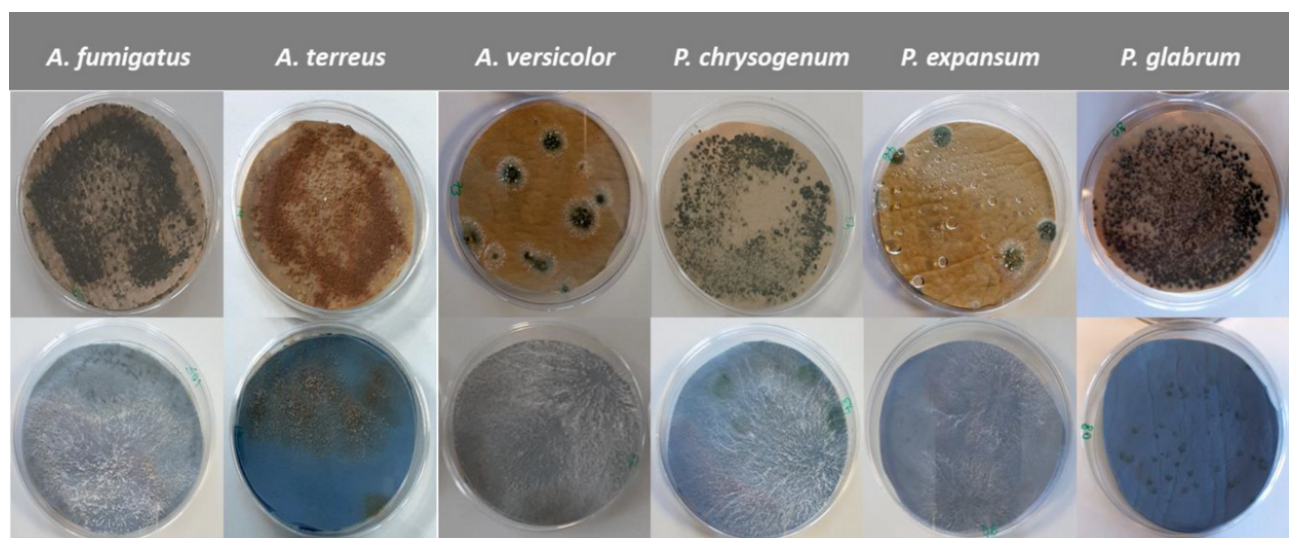


Abb. 1: Schimmelpilzwachstum auf den Halbfabrikaten Wet-White (oben) und Wet-Blue (unten) am Beispiel einiger *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten

ERGEBNISSE | NUTZEN

Die Identifikation materialzerstörender lederrelevanter Schimmelpilze über die MALDI-TOF ist möglich. Es konnten Methoden etabliert werden, um Pilzmaterial oberflächlicher und invasiv wachsender Pilze von Materialproben zu isolieren und für die Analyse entsprechend vorzubereiten. Die Messungen zeigten, dass reproduzierbare Spektren generiert werden können, unabhängig von der biologischen Varianz der Pilze, ihren unterschiedlichen Entwicklungsstadien und der Wiederholung der Messung einer Probe. Es ist jedoch zu empfehlen, die isolierten Schimmelpilze für zwei bis drei Tage in flüssigem Nährmedium zu kultivieren. Eine Identifikation einzelner Arten aus Mischkulturen war nicht möglich.

Es wurde festgestellt, dass die Spektrenbibliothek von Bruker für die im Projekt geplanten materialzerstörenden Schimmelpilze unzureichend ist und die Datenbank um fehlende Pilze ergänzt werden muss. Eine Erweiterung der Datenbank ist problemlos möglich und wird durch Bruker über ein ausführliches Manual bzw. über kommerzielle Datenbankerweiterungen unterstützt.

Auf Basis der vorangegangenen Arbeiten wurde ein Methodenguide erstellt. Damit wird dem Anwender eine Anleitung zur Verfügung gestellt, die alle Aufbereitungsschritte beschreibt, von der Isolation des Schimmelpilzes von/aus den Halbfabrikaten und Crustledern über die Probenaufarbeitung und die Applikation der Proteinextrakte auf dem Proben target bis zur Analyse der Proteine mittels MALDI-TOF MS. Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens sind vor allem für Anbieter von Identifikationsmethoden und Diagnoseverfahren für Mikroorganismen von Nutzen. Das erarbeitete Know-how zur Identifikation von materialzerstörenden Schimmelpilzen kann direkt von ihnen genutzt werden.

Bericht anfragen



DANK

Das Forschungsvorhaben „MALDI-TOF-MS für die Analyse von Pilzen“, Reg.-Nr.: 49MF200157 wurde anteilig vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages innerhalb des Förderprogramms „FuE-Förderung gemeinnütziger externer Industrieforschungseinrichtungen – Innovationskompetenz (INNO-KOM) – Modul Marktorientierte Forschung und Entwicklung (MF)“ über den Projektträger EuroNorm GmbH gefördert. Wir bedanken uns für die gewährte Unterstützung.

Gefördert durch:



INNO-KOM

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages