

Molekulare Lebensmittelmykologie am Max Rubner-Institut

ROLF GEISEN, EVA GRAF & MARKUS SCHMIDT-HEYDT

Kurzfassung

Das Max Rubner-Institut befasst sich, neben anderen Aufgaben, mit dem Thema der Lebensmittelsicherheit. Chemische und mikrobielle Kontaminationen in Lebensmitteln werden wissenschaftlich bearbeitet. Die Kontamination durch Pilze stellt für gewisse Lebensmittel, insbesondere für pflanzliche Lebensmittel wie Obst und Gemüse, ein besonderes Problem dar, namentlich durch Bildung von Mykotoxinen. Im Max Rubner-Institut wird versucht, die molekularen Hintergründe der Mykotoxinbildung, die unter anderem stark durch die Bedingungen im Lebensmittel beeinflusst werden, aufzuklären und zu verstehen. Ziel dieses Ansatzes ist die Entwicklung von Methoden, die die Kontamination der Lebensmittel durch Pilze verhindern bzw. die Bildung von Mykotoxinen vermeiden können. In diesem Zusammenhang werden besonders Arten der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* und *Alternaria* bearbeitet.

Abstract

Molecular food mycology at the Max Rubner Institute

One of the tasks of the Max Rubner Institute is to care for food safety. Microbial and chemical contaminants in foods are examined scientifically. The contamination by fungi is particularly relevant for certain plant-derived food products like fruits and vegetables. In this context the production of mycotoxins by several fungi plays an important role. The Max Rubner Institute aims at understanding and unravelling the molecular basis of mycotoxin biosynthesis, which is strongly influenced by conditions in the food. The overall goal is the development of new methods of controlling the contamination of food by fungi and to reduce mycotoxin biosynthesis. Species of the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Alternaria* are particularly studied.

Autoren

ROLF GEISEN, EVA GRAF & MARKUS SCHMIDT-HEYDT
Max Rubner-Institut, Haid-und-Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe, E-Mail: rolf.geisen@mri.bund.de

1 Mykologische Forschung am Max Rubner-Institut

Das Max Rubner-Institut (MRI) ist eine Forschungseinrichtung des Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und

hat die Aufgabe, gesundheitsfördernde Eigenschaften und Bestandteile von Lebensmitteln zu untersuchen sowie Forschungsarbeiten zur Qualität und Sicherheit von Lebensmitteln durchzuführen. Das Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse des Max Rubner-Institutes befasst sich speziell mit sicherheitsrelevanten Fragen zu Produkten wie Obst, Gemüse, Nüssen oder Gewürzen. Gerade diese pflanzlichen Produkte sind häufig sehr stark mit Schimmelpilzen kontaminiert, was ein großes Problem für die Lebensmittelsicherheit darstellt, da einige der relevanten Schimmelpilzarten in der Lage sind, Mykotoxine zu bilden. Daher werden am MRI molekulare Grundlagen erarbeitet, um auf der praktischen Ebene neue Möglichkeiten der Vermeidung des Pilzwachstums bzw. der Mykotoxinbildung zu entwickeln.

2 Das Problem der Mykotoxinbildung

Schimmelpilze sind ubiquitär vorkommende Mikroorganismen, die aufgrund der leichten, nicht kontrollierbaren Sporenverteilung über die Luft nahezu alle organischen Substrate als Saprobionten besiedeln können. Pflanzliche Produkte, wie verschiedene Obstsorten mit hohem Zuckergehalt, stellen daher ideale Substrate dar. Von der WHO/FAO (BHATNAGAR et al. 2002) wird geschätzt, dass 20 bis 25 % der jährlichen Ernte durch Pilzbefall verdorben werden. Viele Pilze sind zusätzlich in der Lage Mykotoxine zu bilden. Mykotoxine sind giftige Produkte des sekundären Stoffwechsels von Pilzen. Es sind mehr als 300 verschiedene Sekundärmetabolite bekannt, von denen aber nur ca. 20 eine Rolle als Mykotoxine spielen, weil nur sie in messbaren Mengen in Lebensmitteln vorkommen können (BHATNAGAR et al. 2002). Die in diesem Zusammenhang wichtigsten lebensmittelrelevanten mykotoxinbildenden Pilze gehören zu den Gattungen *Fusarium* (Fusarien), *Aspergillus* (Aspergillen oder Gießkannenschimmel), *Penicillium* (Penicillien oder Pinselschimmel) und *Alternaria* (Alternaria-

Schwärzepilze) (Tafel 1, Abb. 1). Für die meisten der von diesen Gattungen gebildeten Mykotoxine sind Grenzwerte festgelegt. Dies gilt für die Aflatoxine, die Trichothecene, die Fumonisine und Ochratoxin A. Für Alternariol bzw. Tenuazonensäure sind Grenzwerte in der Diskussion.

Die Vertreter der Gattung *Fusarium* kommen vor allem auf Getreide vor und können hier zur Bildung von Trichothecenen, wie Deoxynivalenol (DON), 3- oder 15-Acetyl-DON (ADON) oder Nivalenol (NIV) führen. Diese Mykotoxine gehören zur Gruppe der B-Typ Trichothecene, die durch eine etwas geringere Toxizität gekennzeichnet ist. Daher sind die Grenzwerte für diese Gruppe relativ hoch angesetzt. Die wichtigsten Spezies, die Stoffe dieser Gruppe bilden, sind *F. graminearum* (Artenkomplex) und *F. culmorum*. Beide Spezies sind in Getreide sehr häufig zu finden. Weniger häufig, aber wegen der Bildung von hochtoxischen Typ-A Trichothecenen dennoch relevant, können *F. sporotrichioides* und *F. langsethiae* nachgewiesen werden. Typ-A Trichothecene sind wesentlich toxischer als die vom Typ-B. Sie können zu starken Hautirritationen und inneren Blutungen führen, im ungünstigsten Fall zur „alimentären toxischen Aleukie“, die in den vierziger Jahren in bestimmten Teilen Russlands Tausende Todesopfer gefordert hat (DESJARDIN 2009). Gemeinsam ist beiden Toxingruppen das Trichodiengrundgerüst, das ein Sesquiterpenoid darstellt und über Isoprenoidvorstufen gebildet wird (Tafel 2, Abb. 2). Beide Toxingruppen unterscheiden sich durch Veränderungen an der Position 5 des Trichodiengrundgerüsts. Trichothecene hemmen allgemein die Proteinsynthese und führen so zu den toxischen Wirkungen. Neben den Trichothecenen bilden die Fusarien eine weitere wichtige Toxinklasse, die Fumonisine, die in bestimmten Lebensmitteln ebenfalls reguliert sind. Die Fumonisine sind aliphatische Polyketide, die aus Acetyl-CoA Einheiten aufgebaut sind. Sie werden besonders durch *F. verticillioides* und *F. proliferatum* gebildet, die besonders auf Mais regelmäßig vorkommen. Fumonisine zeigen bei Tieren verschiedene, spezifische toxische Wirkungen, die alle darauf beruhen, dass Fumonisin aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den Sphingosinen, die Ceramidsynthetase hemmt und damit in den Lipidstoffwechsel des Nervengewebes eingreift. Bei Pferden werden ernsthafte Schäden am Zentralnervensystem gemeldet. Für Menschen gelten Fumonisine als möglicherweise karzinogen (BHATNAGAR et al., 2002). Verschiedene *Fusarium*-Spezies spielen auch eine Rolle

bei Obst und Gemüseprodukten, z.B. *F. solani* (Artenkomplex) auf Kartoffeln (MECTEAU et al. 2008) oder *F. sambucinum* auf Spargel, jedoch hauptsächlich als Verderbsorganismen und weniger als Mykotoxinbildner.

Die Aspergillen sind wichtige Verderbsorganismen und Mykotoxinbildner von Getreide und andern pflanzlichen Produkten wie Obst, Kaffee, Kakao oder Gewürzen. Sie können verschiedene hochtoxische und daher wichtige Mykotoxine wie die Aflatoxine, bzw. Ochratoxin A bilden. Für beide Toxine existieren enge Grenzwerte. Bei beiden Toxinen handelt es sich um Polyketide, die wiederum aus Acetyl-CoA Einheiten aufgebaut werden. Der Polyketidanteil von Ochratoxin A (Dihydroisocoumarin) ist mit einer Aminosäure, dem Phenylalanin gekoppelt. Die Aflatoxine sind starke Leberkarzinogene und werden vor allem durch *A. flavus* und *A. parasiticus* gebildet. Beide Spezies und damit auch Aflatoxin können in Erdnüssen, Paranüssen, Feigen oder anderen fett- und zuckerreichen Produkten gefunden werden. Aflatoxine spielen besonders in Afrika und einigen asiatischen Ländern eine große Rolle. Im Jahr 2004 sind ca. 150 Personen in Kenia an einer akuten Toxinvergiftung gestorben, nachdem sie kontaminierten Mais verzehrten (PROBST et al. 2007). Ochratoxin A kann durch verschiedene *Aspergillus*-Spezies, wie *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* oder *A. steynii* gebildet werden. Diese Spezies sind besonders an Kaffee, Kakao, verschiedene Gewürze oder an Trauben angepasst und können hier Ochratoxin A bilden, das in den Endprodukten angereichert auftritt. Ochratoxin ist nephrotoxisch und wird als Karzinogen der Gruppe II eingestuft (PETZINGER & ZIEGLER 2000). Die Aspergillen sind besonders an wärmere Temperaturen (30 bis 35 °C) angepasst und spielen daher in nordeuropäischen Breiten eine untergeordnete Rolle.

Auch die Penicillien bilden wichtige Mykotoxine wie das Ochratoxin, das Citrinin oder das Patulin. Ochratoxin wird von zwei Spezies gebildet. *P. verrucosum* kommt hauptsächlich auf Getreide vor und ist hier für die Bildung von Ochratoxin A verantwortlich (LUND & FRISVAD 2003). Neueste Ergebnisse zeigen aber, dass *P. verrucosum* sehr anpassungsfähig ist und auch auf salzhaltigen Produkten, wie getrockneten Fleischprodukten oder Oliven (HEPERKAN et al. 2009) vorkommen kann. *P. nordicum* ist morphologisch sehr nah mit *P. verrucosum* verwandt und kommt nahezu ausschließlich auf sehr salzhaltigen Produkten, wie getrocknetem Schinken, Salami (LUND & FRISVAD

2003) oder sogar in reinem Salz (SONJAK et al. 2011) vor. *P. verrucosum* ist unter bestimmten Umständen auch in der Lage, Citrinin zu bilden, wozu *P. nordicum* nicht fähig ist. Citrinin ist strukturell Ochratoxin A sehr ähnlich. Patulin ist ein Mykotoxin, das durch Arten verschiedener Gattungen, wie *Penicillium* oder *Byssoschlamys* gebildet werden kann (MOAKE et al. 2005). Der wohl bekannteste Bildner ist allerdings *P. expansum*, der regelmäßig für die Bildung von Patulin in Apfelprodukten und anderen Obstsorten verantwortlich ist (BAERT et al. 2007). Da Patulin eine Reihe von toxischen Wirkungen besitzt (MOAKE et al. 2005), wurde die Höchstmenge dieses Mykotoxins ebenfalls reguliert.

Insbesondere *Alternaria alternata* (Artenkomplex) kann häufig als Kontaminante verschiedener Früchte isoliert werden, ist aber auch auf Getreide zu finden. Sie führt zur Schwarzfleckenkrankheit von Tomaten, Möhren, Birnen, Äpfeln, Oliven etc. (LOGRIECO et al. 2009). *A. alternata* ist in der Lage eine Reihe von Mykotoxinen wie Alternariol, Alternariolmonomethylether, Tenuazonsäure, Altenuen oder Altertoxin zu bilden. Für diese Mykotoxine sind verschiedene toxische Wirkungen beschrieben worden, aber eine abschließende Beurteilung der Toxizität dieser Metabolite steht aufgrund fehlender toxikologischer Daten noch aus. Erst kürzlich wurde eine Stellungnahme der EFSA (European Food Safety Authority 2011) zum *Alternaria*-Problem veröffentlicht. In dieser Stellungnahme wurde festgestellt, dass das Wissen über die toxikologischen Wirkungen von *Alternaria*-Toxinen noch nicht ausreicht, um zu einer abschließenden Bewertung zu kommen. Es wurden über 11.000 Daten über das Vorkommen von *Alternaria*-Toxinen ausgewertet. Aufgrund der vorliegenden Daten liegt allerdings die Exposition von Alternariol, bzw. Alternariol-Monomethylether über dem TTC Wert (Threshold of Toxicological Concern).

3 Regulation der Mykotoxinbildung

Für alle Mykotoxine gilt, dass sie nicht durchgehend (konstitutiv) gebildet werden, sondern dass ihre Synthese stark von den äußeren Bedingungen abhängig ist. Der Pilz kann unter Umständen vollkommen normal wachsen, ohne Mykotoxine zu bilden. Umgekehrt sind es gerade Stresssituationen, die den Pilz dazu bringen, vermehrt Mykotoxine zu bilden, obwohl er unter diesen Bedingungen in der Regel nur sehr schlecht

wachsen kann. Die wichtigsten Umweltparameter, die einen Einfluss auf die Bildung der Mykotoxine haben, sind die Substratzusammensetzung, also die Zusammensetzung der Lebensmittel, die Temperatur, der pH-Wert und die Wasseraktivität a_w , die ein Maß für die Menge des verfügbaren Wassers darstellt (MEDINA & MAGAN 2011). In der Regel reduziert sich die Mykotoxinbildung mit fallender Temperatur und fallendem a_w -Wert. Dabei müssen, wie oben schon erwähnt, das Wachstumsoptimum der Pilzkolonie und die maximale Bildung der Mykotoxine nicht übereinstimmen (PARDO et al. 2004).

Diese phänotypisch beobachtbare Regulation der Mykotoxinbildung basiert auf regulatorischen Vorgängen auf molekularer Ebene. Die Gene der Mykotoxinbiosynthese werden aktiviert, bevor es phänotypisch zu einer nachweisbaren Mykotoxinbiosynthese kommt, d.h. bevor das gebildete Mykotoxin analytisch nachgewiesen werden kann. Nahezu alle bekannten Gene der Mykotoxinbildung sind in Clustern im Genom des Pilzes organisiert, d.h. sie liegen direkt nebeneinander. Die Mykotoxinbiosynthesegene werden in der Regel durch das Genprodukt eines spezifischen regulatorischen Gens aktiviert. Dieses regulatorische Gen wird wiederum durch höher geordnete regulatorische Gene reguliert, bzw. steht mit der Außenwelt über Signalkaskaden in Verbindung. Wenn sich die Umweltparameter wie Temperatur, pH-Wert oder Wasseraktivität ändern, kann diese Änderung über zelluläre Sensoren und Signalkaskadewege direkt auf die Transkriptionsebene weitergegeben werden und hier zur Aktivierung oder Inaktivierung der Mykotoxingene führen.

Genau diese regulatorischen Vorgänge sind das zentrale Thema bei den Forschungsarbeiten innerhalb des MRI. Mit diesen Arbeiten soll ein Verständnis über die Regulationsvorgänge ausgewählter Mykotoxine (Trichothecene, Aflatoxin, Ochratoxin A und Alternariol) (Tafel 2, Abb. 2) gewonnen werden, mit dem Ziel zu neuen Ansätzen zur Kontrolle und Vermeidung der Mykotoxinbildung zu kommen und damit zu einer Erhöhung der Lebensmittelsicherheit beizutragen. In diesem Zusammenhang wurden im MRI verschiedene molekulare Ansätze und Methoden entwickelt, um den Einfluss von äußeren lebensmittelrelevanten Faktoren auf die Aktivierung der Gene der Mykotoxinbiosynthese bzw. auf die regulatorischen Gene untersuchen zu können. Unter anderem wurde eine Microarray-Methode (MycoChip) entwickelt (Tafel 3 und 4, Abb. 3) ent-

wickelt, die es erlaubt, sehr detaillierte Analysen der Aktivierung von Mykotoxinbiosynthesegenen in Relation zu Umweltbedingungen durchzuführen (SCHMIDT-HEYDT & GEISEN 2007).

4 Entwicklung eines mathematischen Modells zur Voraussage der Trichothecenbildung von *Fusarium culmorum* anhand der Expressionsdaten der Trichothecenbiosynthesegene (*tri*-Gene)

Fusarium culmorum ist eine wichtige trichothecenbildende Art, die neben *F. graminearum* häufig als Kontaminant in verschiedenen Getreideproben gefunden wird. *F. culmorum* ist Mitverursacher der partiellen Taubährigkeit (Fusarium head blight), einer Ährenerkrankung bei verschiedenen Getreidearten, die zu einer drastischen Reduktion des Ertrages führt und bei der man mit erhöhtem Vorkommen von Trichothecenen rechnen muss. *F. culmorum* ist in der Lage, Typ-B-Trichothecene zu bilden, insbesondere Desoxynivalenol und Nivalenol. Die Bildung der Trichothecene wird durch die *tri*-Gene gesteuert, deren Organisation gut aufgeklärt ist (BROWN et al. 2003). Zur Erstellung des Modells wurde die Expression des gesamten Trichothecenbiosynthesecusters unter verschiedenen Kombinationen an Temperatur und Wasseraktivität mittels des Microarrays gemessen. Eine mathematisch-statistische Auswertung ergab dann einen Algorithmus, der die Beziehung zwischen Temperatur, Wasseraktivität und der Expression bestimmter Gene des Trichothecenclusters beschreibt (Abb. 4).

Dieses Modell erlaubt eine Voraussage der Menge an Trichothecen, in Abhängigkeit von der Temperatur und der Wasseraktivität, wenn beide Parameter innerhalb der Grenzen der systematisch erhobenen Expressionsdaten liegen. Ein Vergleich der durch dieses Modell vorhergesagten Daten und der unter diesen Bedingungen tatsächlich gemessenen Daten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Mit diesem Ansatz ist es also

möglich, anhand der Expressionsdaten die Bildung des Mykotoxins Nivalenol unter bestimmten Bedingungen vorauszusagen. Dieses Modell wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. NARESH MAGAN, University of Cranfield, UK, entwickelt und veröffentlicht (SCHMIDT-HEYDT et al. 2011a). Das erstellte Modell gibt dem Produzenten Hinweise, welche Umweltbedingungen zu einer Bildung von Trichothecenen führen bzw. welche die Trichothecenbildung hemmen.

5 Analyse der Genregulation bei aflatoxinbildenden *Aspergillen*

Ein ähnlicher Ansatz wurde bei *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* durchgeführt, um Informationen über die Regulation der Aflatoxinbildung unter verschiedenen Umweltparametern zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die Pilze unter verschiedenen Kombinationen von Temperatur und Wasseraktivität wachsen gelassen und die Expression der Gene der Aflatoxinbiosynthese mittels Microarray oder Real Time PCR gemessen. Gleichzeitig wurde das gebildete Aflatoxin mittels HPLC bestimmt. Die Auswertung dieses Versuchs ergab bestimmte Gesetzmäßigkeiten in der Regulation der Aflatoxinbiosynthese, die sich in anschließenden Versuchen auch bei der Trichothecen-, bzw. Ochratoxin A Biosynthese bestätigen ließen. Auch spätere Literaturdaten über die Regulation der Fumonisinbiosynthese durch *F. verticillioides* zeigten das gleiche Ergebnis (JURADO et al. 2008). Die Aktivierung (Expression) der Aflatoxinbiosynthesegene erfolgt nach einem bestimmten Muster (Tafel 5, Abb. 5).

Es konnte ein starker Anstieg der Expression unter Bedingungen gefunden werden, die nahe am Wachstumsoptimum liegen. Stärkste Expression und damit höchste Aflatoxin-Bildung wurde bei einer Parameterkombination von 0,99 a_w und 25 bis 30 °C beobachtet, d.h. in der Nähe des Wachstumsoptimums des Pilzes (SCHMIDT-HEYDT et al. 2009). Interessanterweise erfolgte nahe der Wachstumsgrenze (0,99 a_w ; 20 °C) eine weitere

$$\text{DON (ppm)} = 5.85 + 0.216X_{a_w} - 1.1X_T - 2.5X_{\text{TRI6}} + 4.03X_{\text{TRI10}} + 3.16X_{\text{TRI4}} - 2.01X_{\text{TRI5}} - 10.8X_{\text{TRI12}} - 6.42X_{\text{TRI13}}$$

Abbildung 4. Mathematisches Modell, mit dessen Hilfe anhand der aktuellen Temperatur, der Wasseraktivität und der jeweiligen Expressionsdaten einiger relevanter Trichothecenbiosynthesegene, die mit dem Microarray ermittelt wurden, die Trichothecenbildung (DON) vorhergesagt werden kann. Die durch das Modell vorhergesagten DON-Konzentrationen korrelieren sehr gut mit den anschließend tatsächlich gemessenen Daten. SCHMIDT-HEYDT et al. (2011a).

Aktivierung der Gene der Mykotoxinbiosynthese. Diese Aktivierung wurde von einer Erhöhung der Aflatoxinbildung begleitet. Dies deutet darauf hin, dass neben optimalen Bedingungen auch Stressbedingungen (gekennzeichnet durch stark vermindertes Wachstum) zu einer, wenn auch geringeren, Bildung von Aflatoxinen führt (SCHMIDT-HEYDT et al. 2008a). Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei Fusarien (Trichothecenbildung), bei Penicillien (Ochratoxin A-Bildung) oder der Fumonisinbildung durch *Fusarium verticillioides* (JURADO et al. 2008) beobachtet und kann daher als genereller Regulationsmechanismus der Mykotoxinbildung in Relation zu bestimmten Umweltbedingungen angesehen werden. Dass bestimmte Arten von Stress, wie z.B. oxidativer Stress (JAYASHREE & SUBRAMANIAM, 2000) oder Stress durch suboptimale Mengen an Konservierungsstoffen (SCHMIDT-HEYDT et al. 2007), bzw. Fungiziden (DOOHAN et al. 1999) zu einer Aktivierung der Mykotoxinbildung führen, wurde schon mehrfach beschrieben und bestätigt die hier beschriebenen molekularen Erkenntnisse.

Unter dem Gesichtspunkt der Lebensmittelsicherheit hat diese neue Erkenntnis eine große Bedeutung. Lebensmittel werden unter Bedingungen gelagert, die ihre Haltbarkeit verlängern, d.h. das Wachstum von Schimmelpilzen und anderen Mikroorganismen vermindern. Dies geschieht durch Kühlung oder Trocknung (Verminderung des a_w -Wertes). Gerade diese physikalischen Prozesse sind aber sehr energieaufwendig. Daher wird versucht, genau den Punkt zu erreichen, der zu einer Verlängerung der Haltbarkeit führt, bei dem die Energiekosten aber noch vertretbar sind. An dieser Grenze ist das Schimmelpilzwachstum stark reduziert, aber nicht unbedingt ausgeschlossen. Wie oben schon erwähnt, führen gerade diese Stressbedingungen, falls noch ein Restwachstum des Pilzes möglich ist, zu einer Erhöhung der Mykotoxinbildung. Daher sind diese neuen Erkenntnisse für eine Optimierung der Sicherheit von zentraler Bedeutung.

6 Regulation der Ochratoxin A- und Citrininbiosynthese in *Penicillium*

Es gibt verschiedene Theorien über die ökologische Bedeutung der Bildung von Sekundärmetaboliten, also auch Mykotoxinen. Eine dieser Hypothesen besagt, dass die Bildung die Adaption und Konkurrenzfähigkeit im jeweiligen Habi-

tat erhöht. Die hier vorgestellten Ergebnisse über die Bildung von Ochratoxin, die im MRI erarbeitet wurden, unterstützen diese Hypothese.

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen und der Regulation der Ochratoxin A-Bildung in *Penicillium* ist schon seit einigen Jahren ein Schwerpunkt der Mykotoxinforschung am MRI. So wurde schon vor einiger Zeit das Gencluster, das für die Bildung von Ochratoxin in *P. nordicum* verantwortlich ist, im MRI weitgehend aufgeklärt (KAROLEWIEZ & GEISEN 2005; GEISEN et al. 2006). Für alle in diesem Cluster vorhandenen Gene wurden Real Time PCR-Systeme entwickelt und verschiedene Expressionsstudien in Abhängigkeit von unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Weiterhin wurden für die Ochratoxinbiosynthesegene verschiedene Oligonucleotide entwickelt und auf den MycoChip aufgebracht, so dass auch mit diesem Ansatz umfassende Expressionsstudien durchgeführt werden konnten. Es wurden in den letzten Jahren umfangreiche Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Umweltparameter auf die Expression der Ochratoxinbiosynthesegene in *Penicillium* durchgeführt, so dass diese Arbeiten zu einem generellen Bild der Regulation der Ochratoxinbildung unter lebensmittelrelevanten Bedingungen geführt haben.

Im MRI konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Einsatz von Real Time PCR-Systemen bzw. eines Microarrays auch sehr gut dazu geeignet sind, die Expression der Ochratoxinbiosynthesegene und damit die Bildung von Ochratoxin A direkt im Lebensmittel zu verfolgen. Durch diesen Ansatz erhält man nicht nur Informationen darüber, welche Bedingungen im Produkt direkt zu einer Aktivierung der Mykotoxinbiosynthesegene führen, sondern auch über die Bildung von Ochratoxin A. Die Bildung kann dann unter Umständen sogar verhindert werden, wenn der zeitliche Abstand zwischen der Expression und der Bildung von analytisch nachweisbarem Ochratoxin A lang genug ist und die Bedingungen (z.B. Veränderung von Temperatur, a_w -Wert oder pH-Wert) bekannt sind, die zu einer Verhinderung der Synthese führen (Abb. 6).

Es wird hier deutlich, dass mit Hilfe der Expressionsanalyse die Gene schon deutlich vor der Bildung von nachweisbaren Mengen an Ochratoxin in Weizen klar erkennbar aktiviert werden (SCHMIDT-HEYDT et al. 2008b). Wenn z.B. in dieser Zeit der Feuchtegehalt des Weizens weiter reduziert wird, kann die Bildung von Ochratoxin A vermieden werden. Dieses Beispiel de-

monstriert sehr eindrucksvoll die Möglichkeiten dieses molekularen Ansatzes. Ein ähnlicher Ansatz wurde bei der Analyse des Trocknens von Feigen eingesetzt. Feigen können mit Aflatoxin belastet sein, was durch die häufigen Warnmeldungen im RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm) dokumentiert wird. Feigen werden häufig in der Sonne getrocknet, was zu einer langsamen Trocknung bei mittleren Temperaturen führt. Dies sind optimale Bedingungen für *Aspergillus flavus* zur Bildung von Aflatoxin. Aufgrund der oben erwähnten Expressionsanalysen mittels Microarray konnte jedoch ein eindeutiger Einfluss der Temperatur und der Wasseraktivität auf die Aktivierung der Aflatoxinbiosynthesegene gefunden werden. Diese Daten können dazu benutzt werden, die Trocknung so zu steuern, dass eine Aflatoxinbildung vermieden wird. Erhöht man die Temperatur auf $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, ist nur eine geringe Expression der Aflatoxinbiosynthesegene und weiterführend

keine Aflatoxinbildung möglich (O'BRIAN et al. 2007, SCHMIDT-HEYDT et al. 2009). Wenn nach dieser Temperaturbehandlung ein a_w -Wert von 0.96 erreicht wird, ist das Produkt aufgrund des tiefen a_w -Wertes sicher und die Temperatur kann reduziert werden.

Diese Beispiele demonstrieren, wie die erzeugten Expressionsdaten von Mykotoxinbiosynthesegenen dazu genutzt werden können, die mikrobiologische Sicherheit bestimmter Lebensmittel zu erhöhen. Die Daten können evtl. aber auch dazu benutzt werden, um den ökologischen Grund der Mykotoxinbiosynthese zu erklären. Derzeit werden verschiedene Theorien diskutiert, die versuchen, den Vorteil der Mykotoxinbildung für den produzierenden Organismus zu erklären (ROZE et al. 2011), aber keine ist bis jetzt abschließend bestätigt worden.

Für die Bildung von Ochratoxin A durch *Penicillium* ist es im MRI erstmals gelungen, einen physiologisch/ökologischen Grund der Ochratoxin A Bildung zu beschreiben. Wie oben erwähnt, ist P

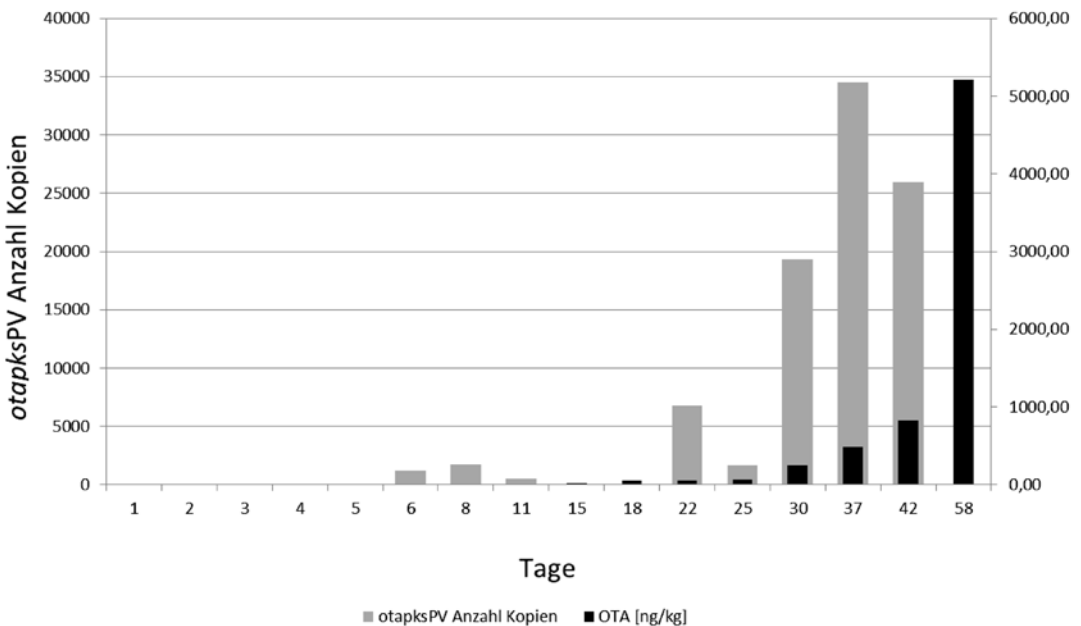


Abbildung 6: Kinetik der Bildung von Ochratoxin A (schwarze Balken) und der Expression des Ochratoxin A Polyketidsynthesegenes (graue Balken) in Weizen. Wie aus diesen Ergebnissen deutlich wird, ist die Expression dieses für die Biosynthese wichtigen Gens ein Indikator für die Toxinbildung. Die Expression der biosynthetischen Gene erfolgt naturgemäß früher als die analytisch messbare Biosynthese des Toxins. Dieser Abstand zwischen Genexpression und phänotypischer Bildung des Toxins scheint sich im Lebensmittel zu verstärken, so dass unter diesen Umständen die zukünftige Ochratoxinbildung relativ früh vorhergesagt werden kann (ab Tag 22), während hohe Toxinmengen erst wesentlich später nachgewiesen werden können.

nordicum und teilweise auch *P. verrucosum* an osmotisch anspruchsvolle Bedingungen angepasst. Beide Spezies kommen auf Lebensmitteln mit hohem Salzanteil (NaCl), wie luftgetrockneten Produkten (Schinken, Salami, Käse) oder auch auf Oliven vor. Diese Produkte können bis zu 10% NaCl enthalten. In den Untersuchungen am MRI fiel auf, dass eine gewisse Konzentration an NaCl die Ochratoxinbildung in *P. nordicum* erhöht. Weiterhin kann *P. nordicum* auch unter sehr hohen NaCl-Konzentrationen Ochratoxin A bilden (SCHMIDT-HEYDT et al. 2011b). Diese Spezies wird im Wachstum auch durch höhere NaCl-Konzentrationen kaum beeinflusst. Sie ist also sehr gut an diese Bedingungen angepasst. *P. verrucosum* kommt üblicherweise auf Getreide vor, kann aber wie oben erwähnt auch auf salzhaltigen Produkten, wie etwa Oliven, gefunden werden. *Penicillium verrucosum* kann sein Metabolitenprofil umweltabhängig ändern (SCHMIDT-HEYDT et al. 2011). Bei geringen NaCl-Konzentrationen wird auf YES-Medium hauptsächlich Citrinin gebildet, bei höheren NaCl-Konzentrationen wird die Bildung von Citrinin zu Ochratoxin A verschoben.

Wie oben erwähnt, besitzt Ochratoxin A ein Chlorid im Molekül. Citrinin besitzt einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau wie Ochratoxin A. Es enthält allerdings kein Chlorid. Diese Tatsache führte zur Hypothese, dass die Bildung von Ochratoxin A zu einer partiellen Chloridhomöostase führt. Durch diese Homöostase wird die Chloridkonzentration innerhalb der Zelle konstant gehalten. Unter hohen NaCl-Konzentrationen wird die Zelle hohe Mengen an Chlorid aufnehmen (SIMKOVIC et al. 2004), die für die Zelle unter Umständen toxisch sein können (SAMAPUNDO et al. 2010). Ein kontinuierliches Ausschleusen von Chlorid durch die Bildung und die Exkretion von Ochratoxin A würde damit die Durchsetzungsfähigkeit der Ochratoxin A bildenden Pilze in dieser Umgebung erhöhen (SCHMIDT-HEYDT et al. 2010). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich Ochratoxin A bildende *P. nordicum* Stämme besser gegen andere Spezies durchsetzen können als Nichtbildner (SCHMIDT-HEYDT et al. 2011b).

Die Bildung von Ochratoxin A scheint das Wachstum von Penicillien in diesem Habitat zu unterstützen. Damit diese Regulation funktioniert, muss der Pilz die hohen Chloridkonzentrationen im Medium messen können, und diese Information muss auf die Genebene weitergeleitet werden, so dass es zu Anpassungen in der Regulation der Gene für die Ochratoxin A-Bildung kommen

kann. Dies geschieht durch Signalkaskadewege. Für *Penicillium* wurde gezeigt, dass die Bildung von Ochratoxin A durch den sogenannten HOG-Signalkaskadeweg (High Osmolarity Glycerol Signalkaskadeweg) aktiviert wird. Der HOG-Signalkaskadeweg wird besonders durch Veränderungen des osmotischen Druckes und damit durch Veränderungen des NaCl-Gehalts beeinflusst. Nach Ausschaltung dieses Signalkaskadeweges wird jene Regulation gestört.

7 Regulation der Biosynthese von Alternariol/Alternariol-Monomethylether in *Alternaria alternata*

Alternaria alternata ist ein wichtiger Verderbsorganismus bestimmter Obst- und Gemüsesorten, kann aber auch auf Getreide gefunden werden (LOGRIECO et al. 2009). Im Rahmen eines Projektes mit der Universität Karlsruhe (KIT) über die Bedeutung der Alternariolbildung bei *A. alternata* wurden vom MRI *A. alternata*-Stämme von Tomaten und Getreide isoliert und mittels molekularen Typisierungsmethoden, wie ITS Sequenzierung (Internal Transcribed Spacer) und RAPD Analysen charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Stämme aus Tomaten eine etwas homogenere genetische Zusammensetzung haben als die Stämme aus Getreide. Auch das Toxinbildungsvermögen der Stämme aus Tomaten war wesentlich konsistenter, was darauf schließen ließ, dass die Bildung von Alternariol für die Tomatenstämme von ökologischer Bedeutung ist. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde auch hier der Einfluss verschiedener Parameter, wie Temperatur, a_w -Wert und pH-Wert auf die Bildung von Alternariol untersucht. Interessanterweise war bei Veränderungen der Temperatur oder bei geringfügiger Veränderung der Wasseraktivität durch Erhöhung der NaCl-Konzentration oder von anderen osmolytisch aktiven Substanzen, wie Glycerin, eine sofortige Inaktivierung der Alternariolbiosynthese festzustellen. Nicht so bei Veränderungen des pH-Wertes, wo die Alternariolbiosynthese über einen weiten Bereich konstant bleibt. Gerade der pH-Wert spielt aber bei Obst und Gemüseprodukten eine große Rolle und kann hier einen weiten Bereich umfassen. Andererseits besitzen diese Produkte in der Regel einen hohen Wassergehalt, sodass für *Alternaria* eine effiziente pH-Regulation, aber weniger eine osmotische Regulation der Alternariolbiosynthese eine Rolle spielt. Die im MRI

erzielten Ergebnisse deuten tatsächlich in diese Richtung. *A. alternata* bildet Alternariol nahezu im gesamten physiologischen pH-Bereich (von pH 4-10), wird aber durch sehr geringe Zusätze von NaCl (5 g/l) oder Glycerin in der Bildung gehemmt. Wie oben schon erwähnt, werden Veränderungen des osmotischen Druckes über den HOG Signalweg von der Außenwelt zur transkriptionellen Ebene der Gene übermittelt (LIN & CHUNG 2010). Änderungen des pH-Wertes werden dagegen über das *pacC/palA-J* System auf die Ebene der Genregulation weitergeleitet. Um den Einfluss beider Signalwege auf die Regulation der Alternariolbildung von *A. alternata* zu untersuchen, wurden Mutantenstämme in diesen Signalkaskadewegen erzeugt und deren Reaktion im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Es konnte bei diesem Ansatz ein sehr detailliertes Modell der Regulation der Alternariol-Bildung unter natürlichen Habitat-Bedingungen erstellt werden.

Unter hohen osmotischen Bedingungen wird HOG auch in *Alternaria* phosphoryliert, aber die Aktivierung von HOG wird bei steigender Osmolarität des Mediums zeitlich nach hinten verschoben, was zu einer wesentlich langsameren Alternariolbildung führt. Daraus kann geschlossen werden, dass eine hohe Osmolarität dem Pilz ein nicht kolonisierbares Substrat signalisiert und die Bildung von Alternariol, die einen Energieverbrauch für den Pilz darstellt, wird gestoppt. Bei Substraten mit hoher Wasseraktivität (Obst und Gemüse) ist dies nicht der Fall. HOG ist jetzt stark phosphoryliert und *A. alternata* bildet hohe Mengen an Alternariol. *A. alternata* hat also einen komplexen Regulationsmechanismus entwickelt, um möglichst unter allen Bedingungen im natürlichen Habitat Alternariol bilden zu können. Dies deutet auf einen ökologischen Grund hin. In der Tat wurde durch weitere Versuche gezeigt, dass die Bildung von Alternariol zu einer Verstärkung der Kolonisierungsfähigkeit von Tomaten (und wahrscheinlich auch anderer Substrate) führt. Stämme, in denen die HOG- bzw. *pacC*-Signalfunktion inaktiviert wurde, waren nicht mehr in der Lage, Alternariol reguliert zu bilden und auf Tomaten zu wachsen (Tafel 6, Abb. 7).

Literatur

- BAERT, K., DEVLIEGHERE, F., FLYPS, H., OOSTERLINCK, M., AHMED, M. M., VERLINDEN, B., NICOLAI, B., DEBEVERE, J. & DE MEULENAER, B. (2007): Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. – Int. J. Food Microbiol., **119**: 170-181.
- BHATNAGAR, D., YU, J. & EHRlich, K. C. (2002): Toxins of filamentous fungi. – In: BREITENBACH, M., CRAMERI, R. & LEHRER, S. B. (eds.): Fungal Allergy and Pathogenicity: 167-206; Basel (Karger).
- BROWN, D. W., PROCTOR, R. H., DYER, R. B & PLATTNER, R. D. (2003): Characterization of a *Fusarium 2*-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. – J. Agric. Food Chem., **51**: 7936-7944.
- DESJARDINS, A. E. (2009): From yellow rain to green wheat: 25 years of trichothecene biosynthesis research. – J. Agric. Food Chem., **57**: 4478-4484.
- DOOHAN, F. M., WESTON, G., REZANOOR, H. N., PARRY, D. W. & NICHOLSON, P. (1999): Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and *in planta*. – Appl. Environ. Microbiol., **65**: 3850-3854.
- GEISEN, R., SCHMIDT-HEYDT, M. & KAROLEWIEZ, A. (2006): A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. – Mycotoxin Res., **22**: 134-141.
- HEPERKAN, D., DAZKIR, G. S., KANSU, D. Z. & GÜLER, F. K. (2009): Influence of temperature on citrinin accumulation by *Penicillium citrinum* and *Penicillium verrucosum* in black table olives. – Toxin Reviews, **28**: 180-186.
- JAYASHREE, T. & SUBRAMANYAM, C. (2000): Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. – Free Radical Biology & Medicine, **29**: 981-985.
- JURADO, M., MARÍN, P., MAGAN, N., & GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. (2008): Relationship between solute and matrix potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. – Appl. Environ. Microbiol., **74**: 2032-2036.
- KAROLEWIEZ, A. & GEISEN, R. (2005): Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. – System. Appl. Microbiol., **28**: 588-595.
- LIN, C. H. & CHUNG, K.-R. (2010): Specialized and shared functions of the histidine kinase- and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. – Fungal Genetics and Biology, **47**: 818-827.
- LOGRIECO, A., MORETTI, A. & SOLFRIZZO, M. (2009): *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. – World Mycotoxin Journal, **2**: 129-140.
- LUND, F. & FRISVAD, J. C. (2003): *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. – J. Appl. Microbiol., **95**: 1117-1123.
- MECTEAU, M. R., ARUL, J. & TWEDDELL, R. J. (2008): Effect of different salts on the development of *Fusarium solani* var. *coeruleum*, a causal agent of potato dry rot. – Phytoprotection, **89**: 1-6.
- MEDINA, A. & MAGAN, N. (2011): Temperature und water activity effects on production of T-2 and HT-2 by

- Fusarium langsethiae* strains from European countries. – Food Microbiol., **28**: 392-398.
- MOAKE, M. M., PADILLA-ZAKOUR, O. I. & WOROBO, R. W. (2005): Comprehensive review of patulin control methods in foods. – Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **1**: 8-21.
- PARDO, E., MARIN, S., SANCHIS, V. & RAMOS, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. – Int. J. Food Microbiol., **95**: 79-88.
- PETZINGER, E. & ZIEGLER, K. (2000): Ochratoxin A from a toxicological perspective. – J. vet. Pharmacol. Therap., **23**: 91-98.
- PROBST, C., NJAPAU, H. & COTTY, P. J. (2007): Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. – Appl. Environ. Microbiol., **73**: 2762-2764.
- ROZE, L. V., CHANDA, A. & LINZ J. E. (2011): Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. – Fungal Genetics and Biology, **48**: 35-48.
- SAMAPUNDO, S., DESCHUYFFELEER, N., VAN LAERE, D., DE LEYN, I. & DEVLIEGHERE, F. (2010): Effect of NaCl reduction and replacement on the growth of fungi important to the spoilage of bread. – Food Microbiol., **27**: 749-756.
- SCHMIDT-HEYDT, M. & GEISEN, R. (2007): A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. – Int. J. Food Microbiol., **117**: 131-140.
- SCHMIDT-HEYDT, M., BAXTER, E., GEISEN, R. & MAGAN, N. (2007): Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. – Int. J. Food Microbiol., **119**: 277-283.
- SCHMIDT-HEYDT, M., MAGAN, N. & GEISEN, R. (2008a): Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. – FEMS Microbiology Letters, **284**: 142-149.
- SCHMIDT-HEYDT, M., RICHTER, W., MICHULEC, M., BUTTINGER, G. & GEISEN, R. (2008b): A comprehensive molecular system to study presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat. – Food Additives & Contaminants, **25**: 989-996.
- SCHMIDT-HEYDT, M., ABDEL-HADI, A., MAGAN, N. & GEISEN, R. (2009): Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. – Int. J. Food Microbiol., **135**: 231-237.
- SCHMIDT-HEYDT, M., PARRA, R., GEISEN, R. & MAGAN, N. (2011a): Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. – Journal of the Royal Society Interface, **8**: 117-126.
- SCHMIDT-HEYDT, M., GRAF, E., BATZLER, J & GEISEN, R. (2011b): The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin a biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods. – Trends in Food Science & Technology, **22**: 39-48.
- SCHMIDT-HEYDT, M., GRAF, E., STOLL, D. & GEISEN, R. (2012): The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. – Food Microbiol., **29**: 233-241.
- SIMKOVIC, M., POKORNY, R., HUDECOVA, D. & VARECKA, L. (2004): Chloride transport in the vegetative mycelia of filamentous fungus *Trichoderma viride*. – Journal of Basic Microbiology, **44**: 122-128.
- SONJAK, S., LICEN, M., FRISVAD, J. C. & GUNDE-CIMERMAN, N. (2011): Salting of dry-cured meat - a potential cause of contamination with the ochratoxin A-producing species *Penicillium nordicum*. – Food Microbiol., **28**: 1111-1116.

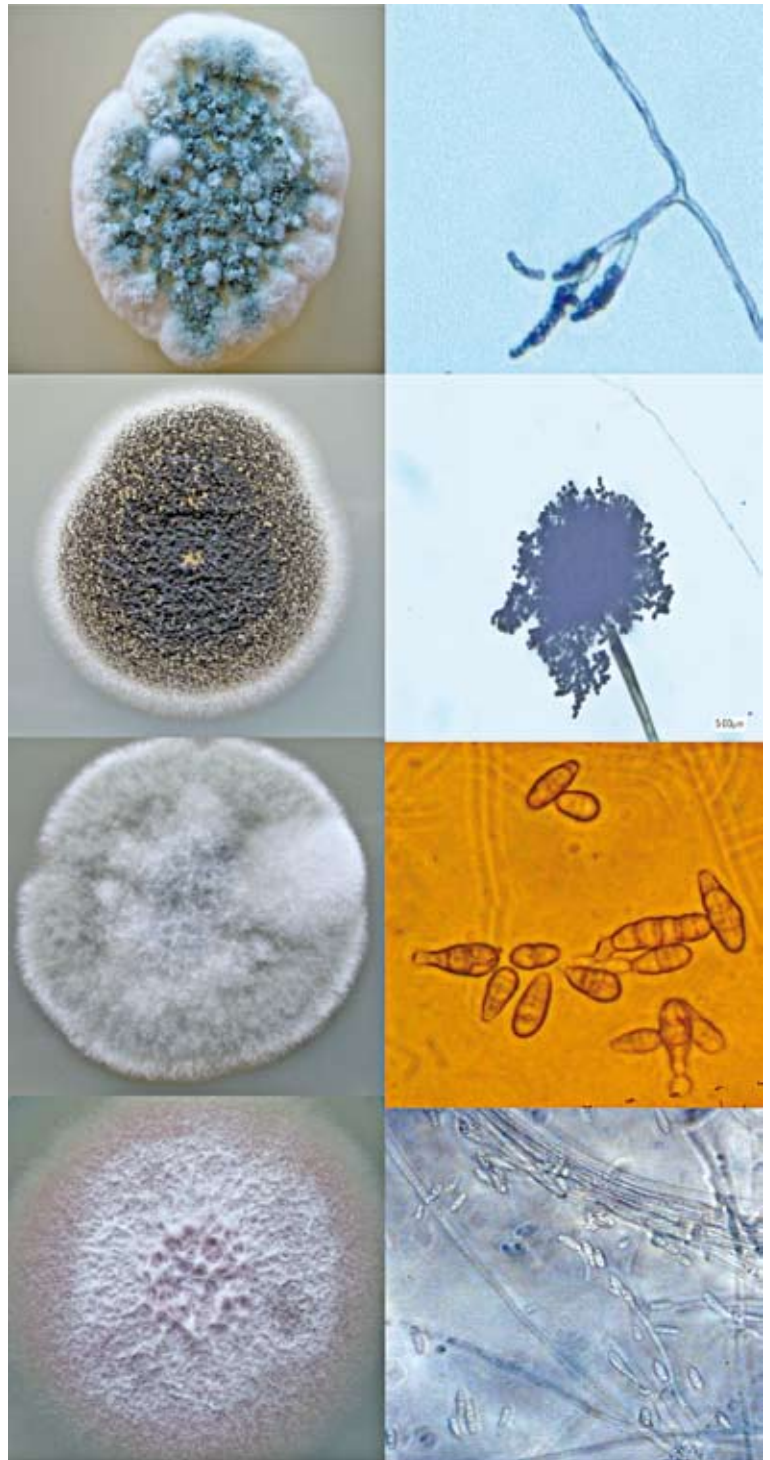
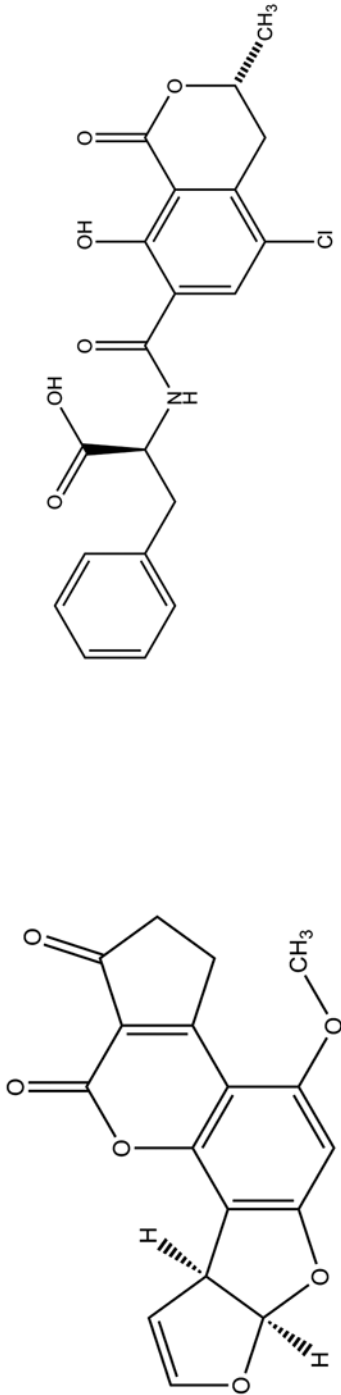
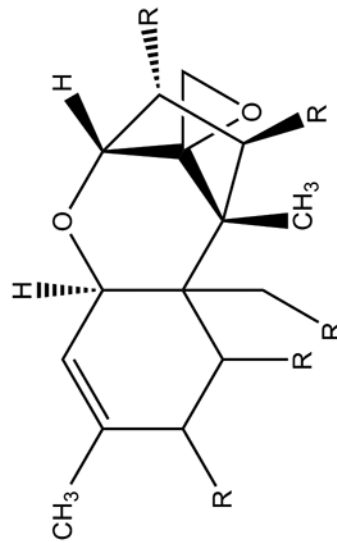


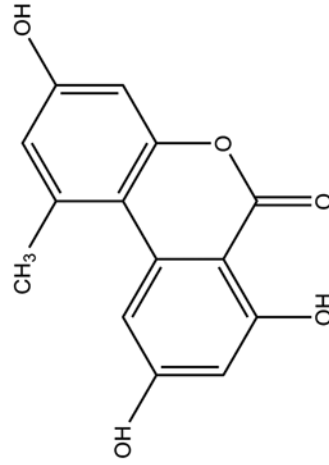
Abbildung 1. Koloniemorphologie (linke Spalte) und mikroskopische Aufnahme der Sporenträger bzw. der Sporen (rechts). Von oben nach unten *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*.

Aflatoxin B₁

Ochratoxin A



Trichothecen Grundgerüst



Alternariol

Abbildung 2. Strukturformeln der Mykotoxine, die unter anderem durch *Aspergillus* (Aflatoxin), *Penicillium* (Ochratoxin A), *Fusarium* (Trichothecene) und *Alternaria* (Alternariol) gebildet werden.

A

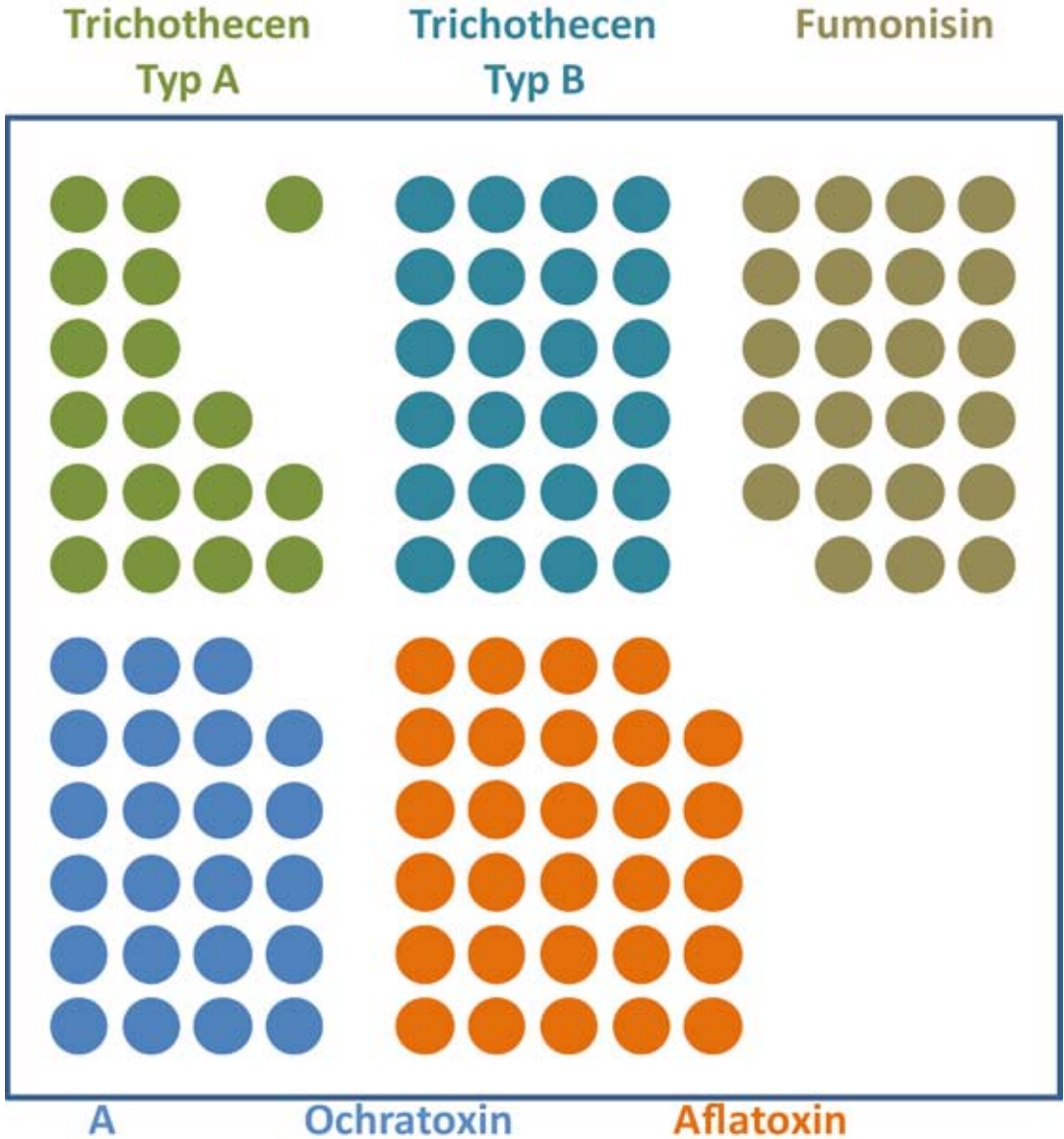
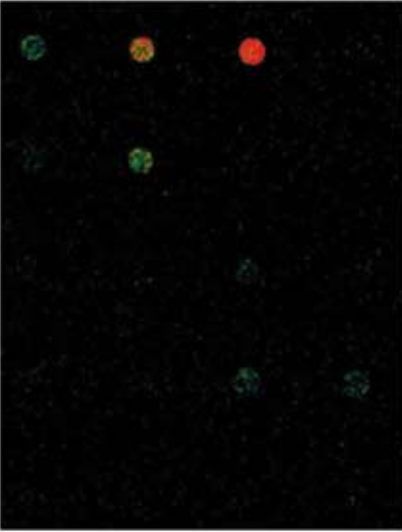


Abbildung 3: Layout A und Anwendung B (nachfolgende Tafel 4) des Microarrays (MycoChip). Auf dem MycoChip sind Oligonucleotide immobilisiert, die für die Gene der jeweiligen Mykotoxinbiosynthese spezifisch sind (SCHMIDT-HEYDT & GEISEN, 2007). Für den jeweiligen Mykotoxingencluster sind die Oligonucleotide in Subarrays angeordnet wie gezeigt. Der MycoChip wurde für die Untersuchung der Aktivierung der Ochratoxin- und Trichothecenbiosynthesegene eingesetzt. Dazu wurden die RNA von *Penicillium nordicum* (Ochratoxin) oder *Fusarium sporotrichioides* (Trichothecen Typ A) von Kulturen, die unter Bedingungen kultiviert wurden, die entweder keine Mykotoxinbildung erlaubten (inaktiv) oder die eine starke Mykotoxinbildung förderten (aktiv) isoliert, fluoreszenzmarkiert und mit dem Chip hybridisiert. Die deutlich erkennbare Aktivierung der Gene unter geeigneten Bildungsbedingungen ist unter B gezeigt. Im Fall der Trichothecengene ist durch Vergleich mit dem Schema unter A eine komplette Aktivierung des Genclusters zu erkennen.

B

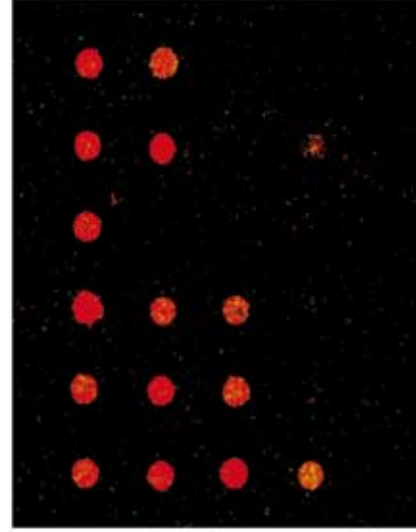
inaktiv



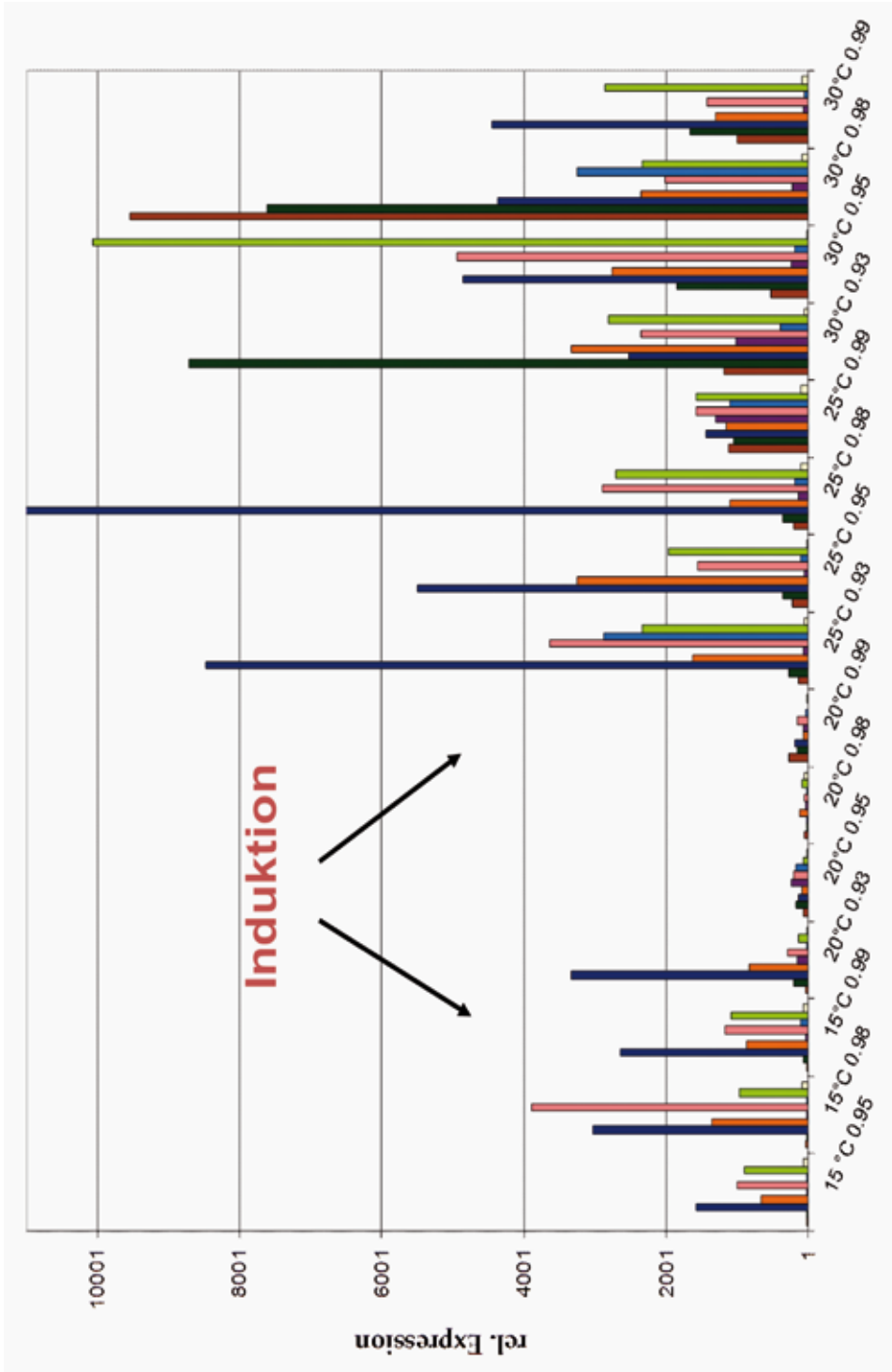
aktiv



Ochratoxin
Subarray



Trichothecen
Subarray



gutes Wachstum

stark reduziertes Wachstum

Abbildung 5. Generelles Expressionsprofil von Mykotoxinbiosynthesegenen unter verschiedenen äußeren Bedingungen (hier verschiedene Kombinationen an Wasseraktivität und Temperatur). In der Regel wird eine hohe Aktivität der Gene in der Nähe des Wachstumsoptimums und eine tiefere, aber signifikante Aktivität unter grenzwertigen Wachstumsbedingungen gefunden.



Abbildung 7. Klonisierungsfähigkeit des *Alternaria alternata* Wildtyps (wt) sowie der beiden HOG- bzw. pacC-inaktivierten Signalkaskademutanten. Beide Mutanten sind nicht mehr zu einer regulierten Alternariolbildung in der Lage und haben verglichen mit dem Wildtyp-Stamm, eine stark verminderte Fähigkeit, Tomaten zu besiedeln. Links: Aufsicht, rechts: Querschnitt.