

Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests zum Nachweis des Mykotoxins Tenuazonensäure in Lebensmitteln

MADELEINE GROß



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

Professur für Milchwissenschaften

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

**Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests
zum Nachweis des Mykotoxins Tenuazonensäure in Lebensmitteln**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MADELEINE GROß

Tierärztin aus Grünstadt

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 25.06.2012

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Charakterisierung von TeA	3
2.1.1	<i>Allgemeines</i>	3
2.1.2	<i>Physikalisch-chemische Eigenschaften</i>	6
2.1.3	<i>Biologische Eigenschaften</i>	10
2.1.3.1	Toxizität	10
2.1.3.2	Andere Wirkungen	13
2.1.4	<i>Risikobewertung</i>	14
2.1.5	<i>Bildung, Vorkommen und Metabolismus</i>	15
2.1.5.1	TeA-bildende Schimmelpilze	15
2.1.5.2	Biosynthese und chemische Synthese von TeA	19
2.1.5.3	Vorkommen von TeA in pflanzlichen Produkten	20
2.1.5.4	Möglichkeiten der Verminderung eines <i>Alternaria</i> -Befalls in pflanzlichen Produkten	28
2.1.5.5	Übergang von TeA in Lebensmittel tierischen Ursprungs	30
2.2	Verfahren zum Nachweis von Tenuazonsäure	30
2.2.1	<i>Extraktion und Reinigung</i>	30
2.2.2	<i>Biologische Nachweisverfahren</i>	34
2.2.3	<i>Immunologische Nachweisverfahren</i>	35
2.2.4	<i>Physikalisch-chemische Nachweisverfahren</i>	38
2.2.4.1	Chromatographische Verfahren	38
2.2.4.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	38

2.2.4.1.2	Gaschromatographie (GC) / Massenspektrometrie (MS)	41
2.2.4.1.3	Flüssigkeitschromatographie (LC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	43
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	46
3.1	MATERIAL UND GERÄTE	46
3.1.1	<i>Chemikalien und Biochemika</i>	46
3.1.2	<i>Mykotoxine</i>	47
3.1.3	<i>Immunreagenzien</i>	47
3.1.4	<i>Puffer und Lösungen</i>	47
3.1.5	<i>Geräte und sonstige Materialien</i>	48
3.1.5.1	Hard- und Software	48
3.1.5.2	Photometer	48
3.1.5.3	Enzymimmuntests	48
3.1.5.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	49
3.1.5.5	Mykologische Untersuchung	49
3.1.5.6.	Sonstiges	49
3.1.6	<i>Probenmaterialien</i>	50
3.1.6.1	Lebensmittel	50
3.1.6.1	Pilzkulturen	50
3.2	METHODIK	52
3.2.1	<i>Überprüfung des TeA-Standardmaterials</i>	52
3.2.2	<i>Herstellung der Immunreagenzien</i>	53
3.2.2.1	Kopplungsmethoden	53
3.2.2.1.1	Kopplung mittels aktiver Estermethode	54
3.2.2.1.2	Kopplung von TeA an BSA und KLH mittels Mannich-Kondensation	57
3.2.2.1.2.1	Kopplung von TeA an Keyhole Limpet Hemocyanin (TeA-KLH)	57
3.2.2.1.2.2	Herstellung eines TeA-bovines Serumalbumin-Konjugates (TeA-BSA)	57
3.2.2.1.3	Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat (PJ)	58
3.2.2.1.4	Charakterisierung der hergestellten TeA-Konjugate	59

3.2.3	<i>Gewinnung spezifischer Anti-Tenuazonsäure-Antiseren</i>	60
3.2.3.1	Immunsierung	60
3.2.3.2	Blutentnahme und Serumgewinnung	62
3.2.3.3	Kontrolle des Immunisierungsverlaufs	62
3.2.3.4	Auswahl geeigneter Antiseren durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)	63
3.2.4	<i>Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests</i>	66
3.2.5	<i>Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)</i>	66
3.2.6	<i>Untersuchungen zur Anwendbarkeit des kompetitiven direkten Enzymimmuntests</i>	69
3.2.6.1	Nachweis von TeA in Apfelsaft	70
3.2.6.2	Nachweis von TeA in Tomatenerzeugnissen	71
3.2.6.2.1	Tomatensaft	71
3.2.6.2.2	Tomatenketchup	72
3.2.6.2.3	Tomatenmark	72
3.2.6.3	Nachweis von TeA in schimmelbefallenen Tomaten nach verschiedener Lagerungszeit	73
3.2.6.4	Orientierende Untersuchungen zum TeA-Bildungsvermögen verschiedener Schimmelpilze	74
4	ERGEBNISSE	75
4.1	Überprüfung des TeA-Standardmaterials	75
4.2	Herstellung der Immunreagenzien	80
4.3	Gewinnung spezifischer Antiseren gegen Tenuazonsäure	85
4.3.1	<i>Antikörper-Titerverlauf</i>	85
4.3.2	<i>Auswahl geeigneter Antiseren</i>	88
4.4	Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests	89
4.5	Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)	89
4.6	Anwendbarkeit des Nachweisverfahrens unter Verwendung von künstlich und natürlich kontaminierten Probenmaterialien	95

4.6.1	Nachweis von TeA in Apfelsaft	95
4.6.2	Nachweis von TeA in Tomatenerzeugnissen	96
4.6.3	Untersuchung von natürlich verschimmelten Tomaten auf TeA	101
4.6.4	Untersuchung von Schimmelpilz-Kulturmaterial auf TeA	105
5	DISKUSSION	107
5.1	Synthese von TeA-Proteinkonjugaten	108
5.2	Antikörper gegen TeA und Entwicklung des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens	109
6	ZUSAMMENFASSUNG	115
7	SUMMARY	117
8	LITERATURVERZEICHNIS	119
	DANKSAGUNG	146
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	147
	VERÖFFENTLICHUNGEN	147

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Mykotoxine der <i>Alternaria</i> -Gruppe	4
Tabelle 2:	Vergleich der publizierten Daten zur akuten Toxizität (LD ₅₀ -Werte) von TeA	11
Tabelle 3:	Vergleich der publizierten Daten zu toxischen Wirkungen von TeA bei chronischer Applikation	12
Tabelle 4:	Übersicht über die in der Literatur beschriebenen TeA-bildenden Schimmelpilze und deren Herkunft	18
Tabelle 5:	Literaturübersicht zu TeA-Gehalten in verschiedenen pflanzlichen Produkten (natürliche Kontamination, künstliche Inokulation)	26
Tabelle 6:	Methoden zur Extraktion und Aufreinigung von TeA aus verschiedenen Probenmaterialien	32
Tabelle 7:	Nachweis von TeA mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung verschiedener Fließmittel nach JANARDHAN und HUSAIN (1983), modifiziert und ergänzt	40
Tabelle 8:	Produktgruppen und Anzahl der Proben	51
Tabelle 9:	Immunisierungsschema zur Gewinnung von Anti-TeA-Antiseren	61
Tabelle 10:	Proteingehalt der Immunogene bzw. Festphasenantigene	81
Tabelle 11:	Stabilität der TeA-Acetat-Lösung (in 5% Acetonitril/PBS) in Bezug auf den 50%-Wert der Standardkurve	91
Tabelle 12:	Referenzdaten des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für TeA unter Verwendung der optimierten Kombination aus Antiserum (K1, Woche 22) und TeA-HS-HRP-Konjugat	93
Tabelle 13:	Wiederfindungsraten von TeA in künstlich kontaminierten Apfelsaftproben (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert)	95
Tabelle 14:	Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminierten Tomatensaftproben (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert)	97
Tabelle 15:	Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Tomatenketchup (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert)	98

Tabelle 16:	Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Tomatenmark (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert)	99
Tabelle 17:	Nachweis von TeA in verschiedenen Lebensmitteln	100
Tabelle 18:	Übersicht der Ergebnisse der untersuchten Tomatenproben	102
Tabelle 19:	Übersicht über die Ergebnisse des TeA-Nachweises in Verschiedenen Schimmelpilzspezies	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Strukturformeln von Tenuazonsäure, TeA (I) und einigen anderen *Alternaria*-Toxinen: Altenuen, ALT (II), Alternariol, AOH (III), Alternariolmonomethylether, AME (IV), Alvertoxin, ATX-I (V) und Alvertoxin, ATX-II (VI). **5**
- Abbildung 2: (I) L-Tenuazonsäure (5S, 6S), (II) D-Tenuazonsäure (5R, 6R) bzw. Iso-Tenuazonsäure, (III) L-allo Tenuazonsäure (5S, 6R), (IV) D-allo Tenuazonsäure (5R, 6R), (V) Grundgerüst einer Tetramsäure. **9**
- Abbildung 3: Chemische Synthese von TeA, schematisiert, nach HARRIS, 1965; (I) L-Isoleucin, (II) Diketen, (III) N-Acetoacetyl-Isoleucin, (IV) TeA. **20**
- Abbildung 4: Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtzahl der untersuchten Lebensmittelproben. **51**
- Abbildung 5: Strukturformel von TeA (die zur Derivatisierung mit Bernsteinsäure-Anhydrid sowie zur direkten Kopplung mittels Formaldehyd-Kopplung verwendete Hydroxylgruppe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet). **53**
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Derivatisierung von TeA mit Bernsteinsäureanhydrid und Kopplung von TeA-HS an den Proteinträger mittels aktiver Estermethode. Im 1. Schritt (I) wird TeA mit Bernsteinsäureanhydrid zum Hemisuccinat. Im 2. Schritt (II) wird unter Einsatz von NHS aus TeA-HS ein aktiver Ester hergestellt. Dieses Intermediärprodukt reagiert nach Zugabe des Proteins (III) unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. **56**
- Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kopplung von TeA an einen Proteinträger mittels Mannich-Kondensationsreaktion. **58**

Abbildung 8:	Beispiel für die Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration (modifizierter direkter ELISA) zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien und Antiserumverdünnungen für TeA.	65
Abbildung 9:	Vergleichende Darstellung von TeA (I), TeA-Acetat (II) und TeA-Hemisuccinat (III). Die Strukturformeln wurden aufgrund des spezifischen Reaktionsmechanismus der Umsetzung mit Essigsäure- bzw. Bernsteinsäureanhydrid sowie aufgrund des Reaktionsverhaltens im Enzymimmunstest postuliert.	68
Abbildung 10:	Typisches UV-Spektrum von TeA in Acetonitril (10 µg/ml, TeA in Form des Kupfersalzes). Die Maxima lagen bei 194 nm, 225 nm und 291 nm.	76
Abbildung 11:	Typisches UV-Spektrum von TeA in Acetonitril (10 µg/ml, TeA in Reinform). Die Maxima lagen bei 194 nm, 241 nm und 227 nm.	76
Abbildung 12:	Typisches UV-Spektrum für acetylierte TeA in PBS (10 µg/ml). Die Maxima lagen bei 195 nm und 273 nm.	77
Abbildung 13:	HPLC-Chromatogramm (280 nm) des TeA-Standards	77
Abbildung 14:	Zum Zeitpunkt des Peakmaximums (4,15 min, Abb. 13) ergibt sich für TeA ein UV-Absorptionsspektrum (HPLC), das demjenigen des TeA-Standards entspricht (238 n, 281 nm).	78
Abbildung 15:	HPLC-Chromatogramm (280 nm) von TeA-HS-HRP (aktive Estermethode)	78
Abbildung 16:	Zum Zeitpunkt des Peakmaximums (3,81 min, Abb. 15) ergibt sich für TeA-HS ein UV-Absorptionsspektrum (HPLC) mit Maxima bei 256 nm und 278 nm.	79
Abbildung 17:	Vergleich der Standardkurven für TeA im kompetitiven direkten Enzymimmunstest (die TeA der beiden Hersteller waren nahezu deckungsgleich). Die 50%-Inhibitionsdosen lagen bei 37 ng/ml (TeA Sigma) und 42 ng/ml (TeA Alexis).	79

- Abbildung 18: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS mittels aktiver Ester-
methode synthetisierten Toxin-BSA-Konjugates (1:100 in PBS).
Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren
von Konjugat und reinem Protein (25 µg/ml) ermittelte Differenz-
spektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml)
eingezeichnet. **82**
- Abbildung 19: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS mittels aktiver Ester-
methode synthetisierten Toxin-KLH-Konjugates (1:100 in PBS).
Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren
Von Konjugat und reinem Protein (100 µg/ml) ermittelte Differenz-
spektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml)
eingezeichnet. **82**
- Abbildung 20: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS mittels aktiver Ester-
Methode synthetisierten Toxin-HRP-Konjugates (1:100 in PBS)
Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren
von Konjugat und reinem Enzym (50 µg/ml) ermittelte Differenz-
spektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml)
eingezeichnet. **83**
- Abbildung 21: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der
Mannich-Kondensation synthetisierten Toxin-KLH-Konjugates
(1:20 in PBS).
Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren
von Konjugat und reinem Protein (50 µg/ml) ermittelte Differenz-
spektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml)
eingezeichnet. **83**
- Abbildung 22: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der
Mannich-Kondensation synthetisierten Toxin-BSA-Konjugates
(1:20 in PBS).
Zum Vergleich ist jeweils das aus der Subtraktion der Spektren
von Konjugat und reinem Protein (15mg/ml) ermittelte Differenz-
spektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml)
eingezeichnet. **84**

Abbildung 23:	UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der reductiven Alkylierung synthetisierten Toxin-HRP-Konjugates (1:20 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Enzym (50 µg/ml) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 µg/ml) eingezeichnet.	84
Abbildung 24:	Relative Antiserumtiter der mit TeA-HS-KLH immunisierten Kaninchen nach Überprüfung im direkten Testsystem unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG (K1, K2, K3).	87
Abbildung 25:	Relative Antiserumtiter der mit TeA-KLH immunisierten Kaninchen nach Überprüfung im indirekten Testsystem unter Verwendung von TeA-BSA als Festphase(K4, K5, K6).	87
Abbildung 26:	Relative Antiserumtiter der beiden mit TeA-BSA und des einen Mit Tenuazonsäure-KLH immunisierten Kaninchens nach Überprüfung im direkten Testsystem unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG (K7, K8, K9).	88
Abbildung 27:	Vergleich der Standardkurven des kompetitiven direkten Enzymimmun-Tests unter Verwendung von TeA, TeA-Acetat und TeA-HS als Standardantigenlösung (Konzentration jeweils 1.000 ng/ml), weitere Verdünnungen in 5% Acetonitril/PBS. Die 50%-Dosen lagen bei 226 ng/ml (TeA), 23,3 ng/ml (TeA-Acetat) und 4,9 ng/ml (TeA-HS).	92
Abbildung 28:	Typische Standardkurve des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für TeA unter Verwendung von Antiserum K 1 (Woche 22) 1:3.000 in PBS und TeA-HS-Konjugat (1:3.000) in 1% Casein/PBS. Die Intra-Assay-Standardabweichungen der einzelnen Standardkonzentrationen (n = 4) lagen unter 10%, die 50%-Dosis lag bei 23,3 ng/ml. Die Extinktion des Leerwertes betrug 1,0 Einheiten, die höchste TeA-Konzentration (1mg/ml) führte zu einem Extinktionswert von 0,13 Einheiten.	94
Abbildung 29:	Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in vier künstlich kontaminierten Apfelsaftproben.	96

Abbildung 30:	Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in drei künstlich kontaminierten Tomatensaftproben.	97
Abbildung 31:	Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in drei künstlich kontaminiertem Tomtenketchup.	98
Abbildung 32:	Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in drei künstlich kontaminierten Tomatenmarkproben.	99
Abbildung 33a:	Verschimmelte Tomaten (Außenansicht, Probe 5). Der TeA-Gehalt lag bei 440 ng/g.	103
Abbildung 33b:	Verschimmelte Tomaten (Innenansicht, Probe 5)	103
Abbildung 34a:	<i>Alternaria</i> spp. aus einer Probe der oben abgebildeten Tomaten (Probe 5), angezüchtet auf Malzextraktagar (acht Tage bebrütet bei 25 °C)	104
Abbildung 34b:	Konidiosporen von <i>Alternaria</i> spp., aus Pilzmycel, Isolat aus Probe 5 (40fache Vergrößerung)	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AE	Aktivester
AK	Antikörper
ALT	Altenuen
AME	Alternariolmonomethylether
AOH	Alternariol
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation, chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
APPI	Atmospheric pressure photo ionization, Atmosphärendruck- Photoionisation
ATX I, -II, -III	Altertoxin I, -II, -III
a_w	Activity of water
Az.	Aktenzeichen
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMD	Benchmark dose
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CCM	Corn cob mix
CI	Chemische Ionisation
CI-MS	Massenspektrometrie mit chemischer Ionisierung
d	Tag
DASP	Double Antibody Solid Phase, Doppelantikörpertechnik
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNHP	Dinitro-phenyl-hydrazin
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECD	Electron capture detector, Elektroneneinfangdetektor

EFSA	European Food Safety Authority; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EI	Electron impact, Elektronenstoßionisation
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest
EI-MS	Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay, Enzymimmunoassay
et al.	et altera, und andere
ESI	Electrospray ionization, Elektronenspray-Ionisation
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation
FD	Felddesorption
FIA	Fluorescence immunoassay, Fluoreszenz-Enzymimmuntest
FID	Flame ionisation detector, Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-EI-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GC-SI-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie mit Single Ion Monitoring
GLC	Gas liquid chromatography, Gasflüssigkeitschromatographie
GSC	Gas solid chromatography, Gasfeststoffchromatographie
h	Stunde(n)
HCl	Hydrochlorid
HFB	Heptafluorobutyrat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HPLC/MS	Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
HRP	Horse Raddish Peroxidase
HS	Hemisuccinat
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär

i.v.	intravenös
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
k. A.	Keine Angabe
Kan.	Kaninchen
kGy	Kilogray
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
l	Liter
LC	Liquid Chromatography
LC ₅₀	Mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Max	Maximum
m/e	Masse/Ladung
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
Min.	Minimum
MeOH	Methanol
MIC	Minimal Inhibitory Concentration, Minimale Hemm-Konzentration
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n. a.	nicht auswertbar
NAHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
n. n.	nicht nachweisbar
nm	Nanometer

NOAEL	No observed adverse effect level, maximale Konzentration oder Dosis eines Stoffes, die Organismen (z.B. Versuchstieren) unter bestimmten Versuchsbedingungen verabreicht werden kann, ohne erkennbare toxische Wirkungen (z.B. Tumore) hervorzurufen
Nr.	Nummer
NWG	Nachweisgrenze
o.g.	oben genannt (es)
P	Probe
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
pH	pondus/potentia Hydrogenii (Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung)
$\text{P}k_s$	Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante k_s
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake, vorläufige tolerierbare tägliche Aufnahmemenge
PJ	Perjodat
ppm	Parts per million
Rf	Retentionsfaktor
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	Reversed-phase HPLC; Umkehrphase-HPLC
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
s	Standardabweichung
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Solid phase extraction, Festphasenextraktion
Spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TDI	Tolerable daily intake; tolerierte Tagesdosis
TeA	Tenuazonic acid, TeA
TLC	Thin-layer chromatography, Dünnschichtchromatographie
TMS	Trimethylsilan
TSI	Thermospray ionization, Thermopray-Ionisation
U	Umdrehung
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett

UV-DAD	Ultraviolet diode array detection
V.a.	vor allem
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Mykotoxine (griechisch: μύκης Pilz und τοξικόν Gift) sind giftige Stoffwechselprodukte bestimmter Schimmelpilze mit der Fähigkeit pathologische Veränderungen bei Mensch und Tier hervorzurufen. Das im Rahmen dieser Dissertation behandelte Mykotoxin Tenuazonensäure (TeA) 3-Acetyl-5-s-butyl-pyrrolidin-2,4-dion (JAGUSCH, 2005) wird insbesondere von verschiedenen *Alternaria*-Arten, sowie von *Phoma sorghina* (STEYN et al., 1976), *Pyricularia oryzae* (IWASAKI et al., 1972; UMETSU et al., 1972) und *Aspergillus*-Arten (MILLER et al., 1963) gebildet.

Da insbesondere Pilze der Gattung *Alternaria* ubiquitär als Saprophyt oder Parasit auf pflanzlichem Material vorkommen, findet sich TeA in unterschiedlichen Lebensmitteln, wie beispielsweise in Äpfeln, Zitrusfrüchten, Tomaten und in Getreide (VIÑAS et al., 1992; SINGH und SUMBALAY, 2004; STINSON et al., 1980, 1981; STACK et al., 1985; MISLIVEC et al., 1987; LOGRIECO et al., 1988; Da MOTTA und VALENTE SOARES, 2001; LOGRIECO et al., 1990 a+b; WEBLEY et al., 1997; LI und YOSHIZAWA, 2000; HÄGGBLUM et al., 2007). Neben ihrer pflanzenpathogenen Eigenschaft weisen einige *Alternaria*-Spezies beim Menschen allergenes Potential auf (RANDRIAMANANTANY et al., 2009) und sind als pathogene Schimmelpilze bei immunsupprimierten Menschen, z.B. nach Knochenmarktransplantationen (VARTIVARIAN et al., 1993; MORISSON et al., 1993) von Bedeutung.

Trotz des in den letzten Jahren steigenden Interesses an den *Alternaria*-Toxinen, ablesbar an der Zahl wissenschaftlicher Publikationen, ist die Datenlage bezüglich ihrer toxikologischen Relevanz sowie bezüglich der Exposition des Verbrauchers unbefriedigend, so dass eine Risikobewertung derzeit nicht möglich ist. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) schloss eine Stellungnahme aus dem Jahre 2003 mit dem Hinweis, dass weitere Untersuchungen bezüglich der Eigenschaften der *Alternaria*-Toxine erforderlich seien. Ein weiteres Expertengespräch am BfR im Jahre 2010 kommt immer noch zu dem gleichen Schluss. In einem im Jahre 2008 erschienenen Technical Report der European Food Safety Authority (EFSA) wurden sowohl die Entwicklung validierter Methoden zum Nachweis von *Alternaria*-Toxinen als auch die Überwachung des Auftretens zum Schutz des Verbrauchers vorgeschlagen (BATTILANI et al., 2008).

Bisher etablierte Verfahren zum Nachweis von TeA sind hauptsächlich physikalisch-chemischer Natur. Es handelt sich hierbei um chromatographische Methoden, wie Dünnschichtchromatographie (SAUER et al., 1978; JANARDHAN und HUSAIN, 1983; LEBRUN et al., 1990; MÜLLER und LEPOM, 1992; VIJAYALAKSHMI und RAO, 1988), Gaschromatographie (HARVAN und PERO, 1974; SAUER et al., 1978; STACK et al., 1985; LEBRUN et al., 1990; SCOTT et al., 1997) und Flüssigkeitschromatographie (HARVAN und PERO., 1974; SCOTT und KANHERE; 1980; STACK et al., 1985; LEBRUN, 1989; SHEPHARD et al., 1991; MÜLLER und LEPOM, 1992; WEBLEY et al., 1997; LI und YOSHIZAWA, 2000; DA MOTTA und VALENTE SOARES, 2000; SOLFRIZZO et al., 2004; PATRIARCA et al., 2007; SIEGEL et al., 2009; SIEGEL et al., 2010), die in der Durchführung sehr zeitintensiv sind und einen in der Regel hohen apparativen Aufwand ebenso wie einen hohen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln benötigen, weswegen eine breitere Anwendung dieser Testverfahren in der Routinediagnostik nicht kosteneffektiv ist.

Im Gegensatz dazu sind immunchemische Verfahren bei geringem technischem Aufwand schnell und relativ einfach durchführbar. Dadurch sind auch größere Probenzahlen leicht zu untersuchen, wobei die Nachweisempfindlichkeit zumeist sehr hoch ist (USLEBER, 1991). Derartige Tests werden bei verschiedenen Mykotoxinen in der Routinediagnostik durchgeführt (MÄRTLBAUER, 1988; MÄRTLBAUER et al., 1988; BRÖSIGKE, 1999; USLEBER et al., 2008; LATIF et al., 2009), bisher wurden allerdings keine immunchemischen Verfahren für den Nachweis von TeA beschrieben. Es besteht daher ein Bedarf an einem schnellen, einfach durchzuführenden und ausreichend empfindlichen Testsystem, das beispielsweise in Verbindung mit anderen Schnelltests, im Rahmen eines integrierten Nachweissystems, eine sinn- und wertvolle Ergänzung darstellen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, erstmals Antikörper gegen TeA herzustellen, ein enzymimmunologisches Verfahren zum quantitativen Nachweis dieses Mykotoxins in Lebensmitteln zu entwickeln und zu validieren, sowie in einer ersten Anwendungsstudie Daten zum Vorkommen dieses Mykotoxins in Lebensmitteln des deutschen Einzelhandels zu gewinnen.

2 SCHRIFTTUM

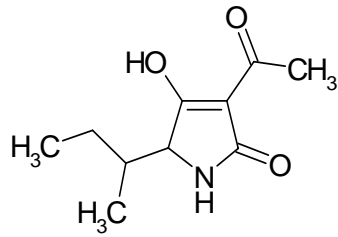
2.1 Charakterisierung von TeA

2.1.1 Allgemeines

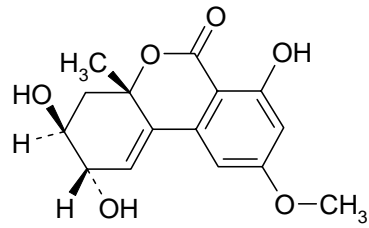
STICKINGS und Mitarbeiter untersuchten zwischen 1953-1961 Kulturen von *Alternaria tenuis* und fanden dabei auf Dzapak-Dox-Medium zahlreiche Metaboliten, die sich später als Mykotoxine herausstellten (RAISTRICK et al., 1953; STICKINGS, 1959; STICKINGS und TOWNSEND, 1961). RAISTRICK et al. (1953) entdeckten die Metaboliten Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME), nachdem BRIAN et al. (1951) schon vorher einen Metaboliten namens „Alternarische Säure“ gewinnen konnten. RAISTRICK et al. (1953) erkannten anhand von Farbreaktionen mit Eisen(III)-chlorid (FeCl_3) und papierchromatographischen Untersuchungen, dass neben AOH und AME noch weitere Metaboliten vorliegen mussten. ROSETT et al. (1957) untersuchten daraufhin diese Mischung und beschrieben neben anderen Metaboliten erstmals die von ihnen als Tenuazonsäure bezeichnete Verbindung. Später wurden dann Altenuen, ALT (PERO et al, 1971), und die Alertoxine (ATX) I, -II und -III entdeckt (PERO et al, 1973, CHU, 1981, STACK und PRIVAL, 1986). TeA nimmt innerhalb der Gruppe dieser *Alternaria*-Toxine (Tab. 1) eine Sonderstellung ein, da dieses Mykotoxin als einziger Metabolit Stickstoff enthält. TeA hat die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$, erstmals dargestellt durch ROSETT et al (1957). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 71 Mykotoxine und Phytotoxine der Gattung *Alternaria* bekannt, von denen aber nur wenige natürlich in Lebensmitteln vorkommen oder eine toxikologische Bedeutung haben. (SCHADE und KING, 1984; OTANI und KOHMOTO, 1992; SCHEFFER, 1992; WEIDENBÖRNER, 2001). Die am häufigsten erwähnten *Alternaria*-Toxine sind in Tab. 1 zusammengestellt, die Strukturformeln dieser Toxine sind in Abb. 1 dargestellt.

Tab. 1: Mykotoxine der *Alternaria*-Gruppe

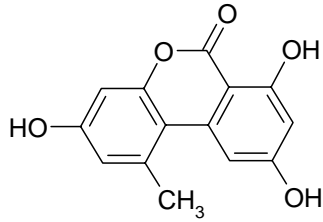
Mykotoxin	Molekulargewicht	Summenformel	Referenz
Alternariol (AOH)	258	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	RAISTRICK et al, 1953
Alternariol-Monomethylether (AME)	272	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	RAISTRICK et al., 1953
Tenuazonsäure (TeA)	197	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ N	ROSETT et al., 1957
Altenuen (ALT)	292	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	PERO et al., 1971
Altertoxin I (ATX I)	352	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	PERO et al., 1973; CHU, 1981; STACK und PRIVAL, 1986
Altertoxin II (ATX II)	350	C ₂₀ H ₁₄ O ₆	PERO et al., 1973; CHU, 1981; STACK und PRIVAL, 1986
Altertoxin III (ATX III)	348	C ₂₀ H ₁₂ O ₆	STACK und PRIVAL, 1986



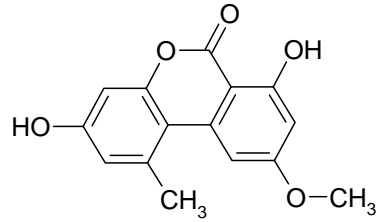
I



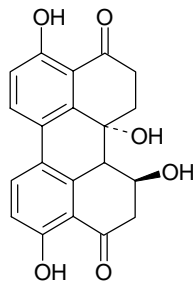
II



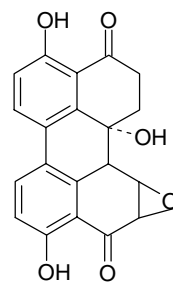
III



IV



V



VI

Abb. 1: Strukturformeln von Tenuazonsäure, TeA (I) und einigen anderen *Alternaria*-Toxinen: Altenuen, ALT (II); Alternariol, AOH (III); Alternariolmonomethylether, AME (IV); Alvertoxin, ATX I (V) und Alvertoxin, ATX II (VI) (RAISTRICK et al., 1953; ROSETT et al., 1957; PERO et al., 1971; PERO et al., 1973; CHU, 1981; STACK und PRIVAL, 1986)

2.1.2 *Physikalisch-chemische Eigenschaften*

TeA (Abb. 2, I) ist eine Tetramsäure und somit ein Derivat des heterozyklischen Pyrrolidin-2,4-dion Grundgerüsts (ROYLES, 1995). Die am häufigsten in der Natur vorkommenden Tetramsäuren sind am C3-Atom acetyliert. Aus der Gruppe der natürlich vorkommenden Tetramsäuren ist TeA der einfachste Vertreter (JAGUSCH, 2005).

ROSETT et al. (1957) bestimmten die Summenformel von TeA durch Mikroelementaranalyse als $C_{10}H_{15}NO_3$. Nach Aufklärung der Strukturformel von TeA wurden in der Literatur verschiedene Bezeichnungen verwendet, wie z.B. 3-Acetyl-5-sec-butyl-tetramsäure, 5-sec-butyl-4-hydroxy-pyrrolin-2-on (HARRIS et al., 1965; YUKI et al., 1971; GATENBECK und SIERANKIEWICZ, 1973) oder 3-Acetyl-5-s-butyl-pyrrolidin-2,4-dion (SCOTT, 2001; JAGUSCH, 2005; OSTRY, 2008), je nachdem welches Nummerierungssystem verwendet wurde.

In der Erstbeschreibung von TeA durch ROSSETT et al. (1957) wird die Substanz als leicht bräunliches Öl charakterisiert, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte und im Hochvakuum bei 117 °C siedet.

TeA ist gut löslich in vielen organischen Lösungsmitteln wie z. B. Aceton, Chloroform, Ethanol, Methanol, Ethylacetat etc., allerdings nur wenig löslich in Wasser (ROSETT et al., 1957), obwohl es sich um eine monobasische Säure mit einem pK_s -Wert von 3,35 handelt (STICKINGS, 1959). Die Acidität ist vergleichbar mit der von Ameisensäure (Methansäure), die einen pK_a -Wert von 3,75 besitzt (OTTO, 1995). Die UV-Absorptionsmaxima für TeA wurden von STICKINGS (1959) in verschiedenen Lösungsmitteln wie folgt angegeben: Hexan: 274 nm; Ethanol: 277 nm; Wasser/Natronauge (NaOH): 279 nm; Salzsäure (HCl): 277 nm. Die UV-Absorptionsmaxima in Ethanol lagen nach STICKINGS und TOWNSEND (1961) bei 278 - 280 nm, nach MERONUCK et al. (1972) bei 278 nm.

TeA ist ein starker Chelatbildner – eine Chelat- bzw. Salzbildung mit Calcium, Magnesium, Kupfer, Eisen und Nickel ist von STEYN und RABIE (1976) sowie LEBRUN et al. (1985) beschrieben. Da freie TeA recht instabil ist, wird das Toxin gerne zur Aufbewahrung in sein stabiles Kupfersalz $Cu(TeA)_2$ -Salz umgewandelt

(ROSETT et al., 1957). Das Kupfersalz tritt in der Form von Trihydrat (grüne Nadeln, Schmelzpunkt ca. 175 °C) und als Monohydrat (blaue Flocken, Schmelzpunkt ca. 173 °C) auf (ROSETT et al., 1957; SCHADE und KING, 1984).

TeA hat zwei Chiralitätszentren, die asymmetrischen C5- und C6-Atome. TeA ist eine optisch aktive Substanz und dreht die Schwingungsebene polarisierten Lichtes um $[\alpha] = -128$ ($c = 1,0$ g in 100 ml Methanol; JAGUSCH, 2005); $[\alpha] = -132$ ($c = 0,5$ g in 100 ml Chloroform; ROSETT et al., 1957); $[\alpha] = -121$ ($c = 2,0$ g in 100 ml Chloroform; MIKAMI et al., 1971); $[\alpha] = -136$ ($c = 0,2$ g in 100 ml Chloroform; ROSETT et al., 1957). Durch formales Vertauschen der Substituenten am C5- und/oder C6-Atom entstehen Diastereomere (siehe Abbildung zwei). Die absolute Konfiguration der Stereoisomere wird nach der Cahn-Ingold-Prelog (CIP)-Regel (CAHN und INGOLD, 1951) eindeutig festgelegt. In der älteren Literatur wurden für die Diastereomere Bezeichnungen wie IsoTeA, L-allo- bzw. D-allo-TeA verwendet, in der neueren Literatur findet sich auch die CIP-Regel mit R*-, S*-Schreibweise (ROSETT et al., 1957; STICKINGS, 1959; GITTERMAN, 1965; GATENBECK und SIERANKIEWICZ, 1973; SCOTT, 2001; GALLARDO et al., 2004; WEIDENBÖRNER, 2001).

Es existieren verschiedene Angaben über die Lokalisierung der Doppelbindungen im TeA-Molekül (ROSETT et al., 1957; STICKINGS, 1959; MILLER et al., 1963; ROYLES, 1995; SCOTT et al., 1997; SCOTT, 2001; SCHRADER et al., 2001; OSTRY, 2008; SIEGEL et al., 2009). Der Grund hierfür ist das Auftreten der Keto-Enol-Tautomerie, bei der sich eine Keto-Gruppe durch Aufnahme eines Protons in eine Alkoholgruppe unter gleichzeitiger Ausbildung einer Doppelbindung mit einem benachbarten C-Atom umwandelt (BEYER und WALTER, 1991). Zwischen den beiden entstehenden Formen besteht ein Gleichgewicht. Innerhalb des TeA-Moleküls existieren mit den Atomen C2, C4 sowie der Acylgruppe an C3 insgesamt drei zur Keto-Enol-Tautomerie befähigte C-Atome. Das Vorhandensein einer Enol-Form ist Voraussetzung für die festgestellte starke Azidität von TeA. Die Erstbeschreiber ROSETT et al., 1957 beschrieben für TeA die Enolisierung an C4, daher werden die im Verlauf dieser Arbeit abgebildeten Strukturformeln für TeA ebenso dargestellt.

COMBINA et al. (1998) untersuchten die Stabilität von TeA in organischen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen Temperaturen. Sie schlugen eine Lagerung bei -20°C

vor. Das beste Lösungsmittel ist nach ihrer Meinung Benzol im Verhältnis zu Acetonitril von 98 zu 2, ungeeignet ist das Lösungsmittel Methanol für eine Lagerung von TeA bei höheren Temperaturen. Ab einer Lagerung von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ spielt das Lösungsmittel eine untergeordnete Rolle, bei höheren Temperaturen über eine längere Zeit ist o.g. Benzol-Acetonitril-Verhältnis am besten geeignet.

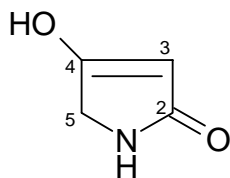
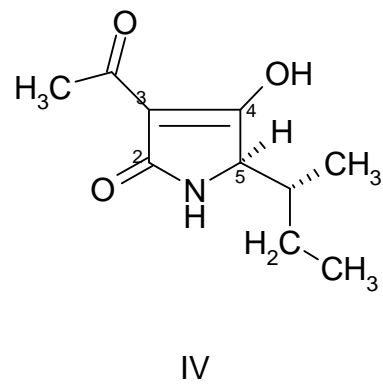
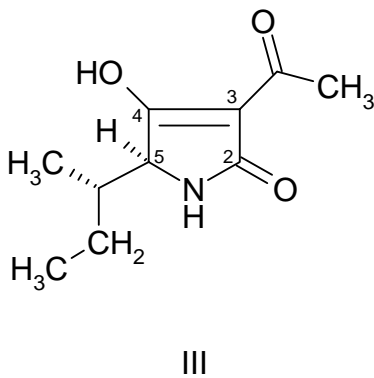
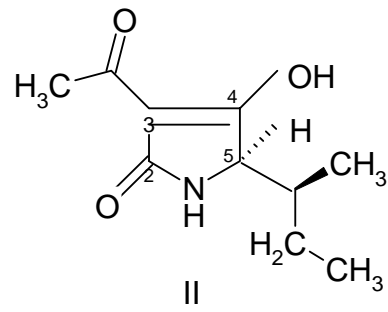
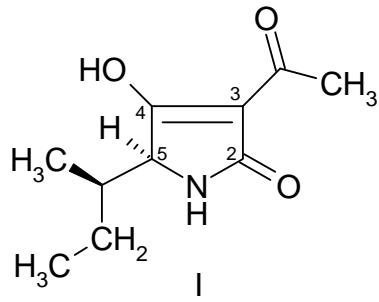


Abb. 2: (I) L-Tenuazonsäure (5S, 6S); (II) D-Tenuazonsäure (5R, 6R) bzw. Iso-Tenuazonsäure; (III) L-allo-Tenuazonsäure (5S, 6R); (IV) D-allo-Tenuazonsäure (5R, 6R); (V) Grundgerüst einer Tetramsäure (in Anlehnung an ROSETT et al., 1957; STICKINGS, 1959; JAGUSCH, 2005)

2.1.3 *Biologische Eigenschaften*

2.1.3.1 Toxizität

TeA wirkt toxisch durch eine Hemmung der Proteinbiosynthese (SHIGEURA und GORDON, 1963). Das Toxin greift bei der 60S-Einheit der Ribosomen, am Peptidyltransferase-Zentrum, an (CARRASCO und VASQUEZ, 1973).

Angaben zur akuten Toxizität von TeA liegen bei verschiedenen Spezies vor (Tab. 2). Toxische Wirkungen von TeA bei chronischer Applikation sind in Tab. 3. zusammengestellt.

Bezüglich möglicher toxischer Wirkungen von TeA beim Menschen liegen keine belastbaren Daten vor. Sehr spekulativ wurde von LIU et al. (1991) eine Exposition mit *Alternaria*-Toxinen mit dem Auftreten von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht. LIU et al. (1991) zeigten, dass *Alternaria* spp. karzinogene Effekte aufweisen, was sie auf die Beobachtung zurückführten, dass es in einer Region Chinas (Linxian) zu einem vermehrten Auftreten von Speiseröhrenkrebs bei gleichzeitig hohem *Alternaria alternata*-Befall pflanzlicher Produkte kam. In Regionen mit niedriger Speiseröhrenkrebshäufigkeit war auch gleichzeitig eine geringere *Alternaria alternata*-Kontamination gegeben. YEKELER et al. (2001) zeigten, dass eine zehnmonatige Fütterung mit TeA in einer Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht zu präkanzerogenen Veränderungen in der Mukosa der Ösophagus-Schleimhaut führte. Der Verzehr von Hirse, die mit TeA-produzierenden *Phoma sorghina*-Spezies befallen war, wurde mit dem Auftreten der Erkrankung „Onyalai“ beim Menschen in Verbindung gebracht (LURIE et al., 1969; STEYN und RABIE, 1976; BOTTALICO und LOGRIECO, 1998). „Onyalai“ ist eine Erkrankung, die hauptsächlich in einigen Regionen Zentralafrikas auftritt und durch Thrombozytopenie gekennzeichnet ist – mit weiteren Symptomen wie Schleimhautblutungen, Nasenbluten, Melena. Auch tödliche Krankheitsverläufe wurden beschrieben.

Bezüglich der zytotoxischen Eigenschaften von TeA untersuchten ZHOU und QUIANG (2008) die Wirkung von TeA auf drei Säugerzelllinien. Dabei führte TeA zu einer verminderten Proliferation und verringerte den Gesamtproteingehalt in 3T3 -

2 SCHRIFTTUM

Mäusefibroblasten, Lungenzellen chinesischer Hamster (CHL-Zellen) und menschlichen Hepatozyten (L-O2-Zellen) bei eingesetzten Konzentrationen von 12,5-400 µg/ml. Von den drei verwendeten Zelllinien waren die 3T3-Zellen am empfindlichsten, ($EC_{50} = 37,75 \mu\text{g/ml}$), gefolgt von CHL-Zellen ($EC_{50} = 63,33 \mu\text{g/ml}$) und L-O2-Zellen ($EC_{50} = 117,77 \mu\text{g/ml}$).

Tab. 2: Vergleich der publizierten Daten zur akuten Toxizität (LD_{50} -Werte) von TeA

Tierart	Applikationsform	LD_{50} , mg/kg KGW	Referenz
Maus	i.v.	125 ± 10	MILLER et al. (1963)
Maus	i.p.	150 ± 10	
Maus	s.c.	145 ± 20	
Maus	p.o.	225 ± 25	
Affe (<i>Macaca fascicularis</i>)	p.o.	ca. 150	
Ratte	p.o.	168	SMITH et al. (1968)
Hund	p.o.	2,5-10	
Maus (männlich)	p.o.	186	
Maus (männlich)	i.v.	162	
Maus (weiblich)	p.o.	81	
Maus (weiblich)	i.v.	115	
Affe (<i>Macaca mulata</i>)	p.o.	> 50	
Ratte (männlich)	p.o.	180	
Ratte (männlich)	i.v.	146	
Ratte (weiblich)	p.o.	168	
Ratte (weiblich)	i.v.	157	
Ratte	p.o.	100-200	MERONUCK et al. (1972)

Tab. 3: Vergleich der publizierten Daten zu toxischen Wirkungen von TeA bei chronischer Applikation

Tierart	Dosis (mg/kg KGW und Tag)	Art der Verabreichung	Anzahl Todesfälle/ Anzahl Tiere	Todestag	Festgestellte Effekte	Referenz
Hund	11,2	i.v.	2/2	8, 20	Speicheln, Erbrechen, blutiger Durchfall, Hämokonzentration, Leukozytose, blutige Gastroenteropathie	SMITH et al., 1968
Hund	11,2	p.o.	1/2	18	Speicheln, Erbrechen, blutiger Durchfall, Tachykardie, blutige Gastroenteropathie	
Affe (Facies mulata)	22,4	i.v.	1/2	8	Speicheln, gelegentliches Erbrechen, Krämpfe, verhärtete Venen an der Einstichstelle	
Affe (Facies mulata)	89,6	p.o.	1/2	33	Speicheln, Erbrechen, blutiger Durchfall, erhöhte Harnstoffwerte, Blutbildveränderungen, erhöhte Harnstoffwerte	
Ratte	bis zu 200	p.o.	2/2	3,10	Gewichtsverlust, Blutungen im intestinalen Lumen	MERONUCK et al., 1972
Küken	145	p.o.	3/5	3*	Schwächeanfälle, lokomotorische Störungen	SAUER et al., 1978
Küken	370	p.o.	3/5	3,4	Apathie, Blutungen in Muskelmagen und Schlund	

*euthanasiert aufgrund der Schwere der klinischen Vergiftungserscheinungen

2.1.3.2 Andere Wirkungen von TeA

GITTERMAN (1965) beschrieb eine moderate antibakterielle Aktivität von TeA und IsoTeA gegen *Bacillus megatherium*. Auch inhibiert sie das Wachstum von *Paenibacillus larvae*, ein Bakterium, das für die Amerikanische Faulbrut der Bienen verantwortlich ist. TeA zeigte dabei eine vergleichbare Wirkung (minimale inhibitorische Konzentration 32 µg/kg) wie das zu Vergleichszwecken eingesetzte Antibiotikum Oxytetracyclin (GALLARDO et al., 2004).

MILLER et al. (1963) untersuchten mögliche antivirale Eigenschaften von TeA. Es zeigte sich dabei, dass das Mykotoxin antivirale Effekte gegen Enteroviren, respiratorische Viren, Vaccinia-Virus, Herpes simplex und 'B'-Virus zeigte. Gegen Polyoma-Viren, Japanische Grippe, Tollwut und „Friend leukemia“-Viren wurde keine Aktivität beobachtet.

Mutagene Wirkungen von TeA konnten bei den bisher erfolgten Untersuchungen unter Verwendung des Ames-Salmonellen-Tests (siehe auch biologische Nachweisverfahren) nicht festgestellt werden (WOODY und CHU, 1992; SCHRADER et al., 2001). Auch HRADEC und VESELY (1989) konnten bei ihren Untersuchungen von 20 Mykotoxinen mittels des tRNA-Akzeptanz-Tests weder eine karzinogene noch mutagene Aktivität von TeA nachweisen.

KAZCKA et al. (1964), GITTERMAN et al. (1964) und GITTERMAN (1965) fanden heraus, dass TeA einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum menschlicher Adenokarzinome aufweist. ANTONY et al. (2002) untersuchten die antikarzinogene Wirkung von TeA bei „Swiss Albino“-Mäusen. Ihnen wurde Dimethylbenz(a)anthrezen appliziert, der entsprechenden Versuchsgruppe ebenso, aber mit dem Unterschied, dass diesen Tieren noch zusätzlich 250 µg TeA täglich verabreicht wurden. Die mit TeA behandelten Mäuse entwickelten zu 60% Tumore, wohingegen die unbehandelten zu 100% mit Tumoren befallen waren.

2.1.4 *Risikobewertung*

In einer Stellungnahme des Bundesinstitutes für Risikobewertung, BfR (2003) wurde auf ein mögliches Risiko der *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln eingegangen. Zum derzeitigen Zeitpunkt reichte die Datenlage nach Ansicht der Verfasser allerdings nicht aus, um eine Risikoabschätzung für den Verbraucher vornehmen zu können. Gleichwohl wurde die Erforderlichkeit weitergehender Untersuchungen bezüglich der Exposition sowie der Toxikologie der Mykotoxine betont.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren, im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen, keinerlei offizielle Höchstmengen für TeA in Lebensmitteln. Die für andere Mykotoxine festgelegten Höchstmengen liegen beispielsweise für das Mykotoxin Patulin, einer teratogenen Substanz mit einer LD₅₀-Dosis von 35 mg/kg Körpergewicht (Maus) in Apfelsaft bei 50 µg/ml und für Säuglingsnahrung bei 25 µg/ml (ABRAMSON et al., 2009; Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln). Auch auf europäischer oder internationaler Ebene existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine Grenzen für *Alternaria*-Toxine. Weder der gemeinsame FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JEFCA) noch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) haben bisher sogenannte „No observed adverse effect levels“ (NOAEL), „lowest observed adverse effect levels“ (LOAEL) bzw. „benchmark doses“ (BMD) festgesetzt. Auch reicht die Datenlage nicht, um einen unbedenklichen und sicheren Aufnahmegrenzwert (tolerable daily intake, TDI) oder vorläufigen maximal-tolerierten, unbedenklichen, sicheren Aufnahmegrenzwert (provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI) festzulegen (OSTRY, 2008).

2.1.5 *Bildung, Vorkommen und Metabolismus*

2.1.5.1 TeA-bildende Schimmelpilze

Nach bisherigen Erkenntnissen wird das Mykotoxin Tenuazonäure hauptsächlich von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria* gebildet. Alternarien sind weltweit verbreitet und werden zu den Schwärzepilzen gezählt. Es wurden bisher ca. 300 Arten beschrieben, bei den meisten handelt es sich um wirtsspezifische Pflanzenpathogene, wobei viele Spezies bereits in Samen zu finden sind. Darüber hinaus existieren jedoch auch einige saprophytische Arten, welche in Erdproben ubiquitär anzutreffen sind (KÜCK et al., 2009). Die Nomenklatur der Schimmelpilze im Allgemeinen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht als abgeschlossen gelten. Neben der Einordnung nach morphologischen Merkmalen werden immer häufiger die molekulargenetischen Methoden (DNA-Analysen) herangezogen (LOGRIECO et al., 2009), auf die im Folgenden aber nicht näher eingegangen werden soll. Bei Pilzen der Gattung *Alternaria* führen gerade die Taxonomie und Nomenklatur zu einigen Unklarheiten, auch da bisweilen nicht einmal klar ist, welche der beschriebenen Taxa wirklich existieren bzw. welche nur Synonyme von bereits früher beschriebenen Formen sind (CHELKOWSKY, 1992). Die Identifikation wird auch dadurch erschwert, dass die Kulturen recht instabil sind und für eine genauere Bestimmung unter standardisierten Bedingungen (mit gleichen Medien, bei gleicher Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gleichen Lichtverhältnissen) gearbeitet werden muss (CHELKOWSKY, 1992). Die systematische Stellung des Genus *Alternaria* lässt sich wie folgt darstellen (REISS, 1998; alte Nomenklatur bzw. www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp, 2010; neue Nomenklatur):

Reich:	Mycota
Abteilung:	Ascomycota (früher: Eumycota)
Klasse :	Dothideomycetes (früher: Deuteromycetes (Fungi imperfecti))
Ordnung:	Pleosporale (früher: Moniliales (Hyphomycetes))
Familie:	Pleosporaceae (früher: Dematiaceae)
Gattung:	<i>Alternaria</i>

Bei Pilzen der Gattung *Alternaria* ist die Bildung Melanin-artiger Pigmente eine ihrer Hauptcharakteristika (TAKANO et al., 1997; BATTILANI et al., 2008). Makroskopisch fallen *Alternaria* spp. durch ein schnelles Wachstum auf Kartoffel-Glucose-Agar auf, innerhalb von 7 Tagen werden bei 25 °C Koloniedurchmesser von 3-9 cm erreicht. Die Kolonie erscheint flach, daunig bis wollig und ist frühzeitig durch graue, kurze, luftig erscheinende Pilzhypen bedeckt. Anfänglich erscheint die Oberfläche gräulich weiß, wird aber später grünlich-schwarz bis schwarzbraun mit hellerem Rand. Die Rückseite ist aufgrund der Pigmentproduktion typischerweise braun bis schwarz (ST.-GERMAIN und SUMMERBELL, 1996; BATTILANI et al., 2008). Mikroskopisch zeigen sich bei *Alternaria* spp. septierte, bräunliche Hyphen. Die Konidiosporen erscheinen ebenso septiert und braun, stellenweise mit einem zickzackartigen Verlauf. Sie tragen große (7-10 x 23-24 µm), einfache oder verzweigte Konidien, die Quer- und Längssepten enthalten. Diese Konidien können einzeln oder in akropetalen Ketten vorliegen und Keimfäden produzieren. Sie erscheinen eiförmig bis schmal zulaufend, dunkel pigmentiert, muriform glatt oder angeraut. Das zur Konidiophore gerichtete Ende der Konidie ist rund, während es sich zur Spitze hin verjüngt. Daraus ergibt sich die typische Schnabel- oder Keulenform der Konidie (LARONE, 1995; ST.-GERMAIN und SUMMERBELL, 1996; BATTILANI et al., 2008).

Die optimale Wachstumstemperatur von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria* liegt generell zwischen 20 °C und 25 °C, es handelt sich somit um mesophile Spezies. Die Wachstumstemperatur liegt minimal bei -2 °C bis 5 °C und maximal zwischen 31 °C und 32 °C. (KÜCK et al., 2009). HASAN (1995) beschrieb 21 °C als Idealtemperatur für *Alternaria alternata* in Bezug auf eine TeA-Produktion. Nach YOUNG et al. (1980) liegen die optimalen Wachstumsbedingungen (mit TeA-Produktion) von *Alternaria tenuissima* auf Hefeextrakt-Saccharose-Agar und Baumwollsaat bei 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 37,5%. POSE et al. (2009) untersuchten den Einfluss von Wasseraktivität (a_w) und Temperatur auf das Wachstum von *Alternaria alternata* (frühere Bezeichnung: *Alternaria tenuis*) auf einem synthetischen „Tomaten-Medium“. Die kürzeste Keimungszeit von eineinhalb Tagen konnte bei einem a_w -Wert von 0,982 und einer Temperatur von 21 °C und 35 °C beobachtet werden, die schnellste Wachstumsrate bei identischem a_w -Wert und einer Temperatur von 21 °C (8,31 mm/Tag). Bei steigendem a_w -Wert erhöhte sich auch die Wachstumsrate. Bei einem a_w -Wert von 0,904 und einer Temperatur von 6 °C sowie 15 °C trat eine Wachstumsstagnation ein. Bei diesen niedrigen Temperaturen konnte selbst bei Einsatz des optimalen a_w -Wertes kein nennenswertes Wachstum verzeichnet werden. Nach

KÜCK et al. (2009) beträgt für *Alternaria alternata* die für die Sporulation benötigte Temperatur 25-27 °C, bei einem pH-Wert-Optimum von 4-4,5. Mycelwachstum war auch bei pH-Werten zwischen 2,7 und 8,0 möglich. Der minimale a_w -Wert für ein Mycelwachstum lag bei 0,85, idealerweise bei 0,98. Für die Sporenbildung wurden minimal 0,90 und optimal 0,98-0,99 und für die Sporenceimung 0,94 angegeben. OVIEDO et al. (2009) untersuchten den Einfluss von Umweltfaktoren auf die TeA-Produktion von *Alternaria alternata*, die sie auf einem Nährmedium mit Sojabohnen anzüchteten. Eine TeA-Produktion war in einem Temperaturbereich zwischen 5 ° und 30 °C und a_w -Werten von 0,92-0,995 zu beobachten. Der optimale Wachstumsbereich lag bei einem a_w -Wert von 0,98 und (je nach Stamm) einer Temperatur von 25 °C bzw. 30 °C.

In der Literatur wird auch für andere Pilzspezies von einer TeA-Produktion berichtet (siehe Tab 4), beispielsweise bei *Phoma sorghina* (STEYN und RABIE., 1976) und *Pyricularia oryzae* (IWASAKI et al., 1972; UMETSU et al., 1972). Als Einzige führen BRÄSE et al. (2009) *Penicillium*-Arten als TeA-Produzenten auf. MILLER et al. (1963) isolierten TeA aus einem *Aspergillus*-Stamm – zwischenzeitlich sind aber Veränderungen in der Systematik einiger Pilze vorgenommen worden, so dass nicht mehr davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei tatsächlich um ein *Aspergillus*-Isolat gehandelt hat. KAČERIGUS et al. (2005) beschrieben *Ulocladium oudemansii*, *Aspergillus rasperi* und *Penicillium expansum* als TeA-Produzenten – allerdings sind auch hier dieselben Einschränkungen bezüglich der taxonomischen Identifizierung zu machen (Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht über die in der Literatur beschriebenen TeA-bildenden Schimmelpilze und deren Herkunft

Pilzspezies	Herkunft	Anzucht auf	Referenz
<i>Alternaria alternata</i> (<i>Alternaria tenuis</i>)	k. A.	Glucose-Medium	ROSETT et al., 1957; STICKINGS et al., 1959 MERONUCK et al., 1972
<i>Alternaria capsici-anui</i>	k. A.	Kartoffel-Dextrose- Agar, Reis-Nährmedium	BILGRAMI et al., 1994
<i>Alternaria citri</i>	Kulturmaterial	Richard's Medium (+ 0,5% Pepton)	KINOSHITA et al., 1972
<i>Alternaria japonica</i>	Kulturmaterial	Richard's Medium (+ 0,5% Pepton)	KINOSHITA et al., 1972
<i>Alternaria kikuchiana</i>	Kulturmaterial (flüssig)	Richard's Medium (+ 0,5% Pepton)	KINOSHITA et al., 1972
<i>Alternaria longipeps</i>	Kulturmaterial	Schrägagar (Wasser, Kartoffel, Saccharose, Agar)	MIKAMI et al., 1971;
<i>Alternaria mali</i>	Kulturmaterial	Richard's Medium (+ 0,5% Pepton)	KINOSHITA et al., 1972
<i>Alternaria oryzae</i>	Kulturmaterial	Richard's Medium (+ 0,5% Pepton)	KINOSHITA et al., 1972
<i>Alternaria porri</i>	Kulturmaterial	Kartoffel-Dextrose- Agar; Reis-Nährmedium	BILGRAMI et al., 1994
<i>Alternaria radicina</i>	Karotten, Petersilie, Sellerie	Kartoffel-Dextrose Agar + 100 µg/g Strepto- mycinsulfat	BILGRAMI et al., 1994; SOLFRIZZO et al., 2005
<i>Alternaria tenuissima</i>	Baumwolle	Hefeextrakt- Saccharose-Medium	DAVIS et al., 1977; YOUNG et al., 1980: BOTTALICO und LOGRIECO, 1998
<i>Alternaria tomato</i>	Tomaten	Wasser/Reis- Substrat	MILSLIVEC et al., 1987
<i>Phoma sorghina</i>	Hirse	Mais-Nährmedium	STEYN und RABIE., 1976
<i>Pyricularia oryzae</i>	Kulturmaterial	Hefeextrakt und Spezialmedien	UMETSU et al., 1972
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	-	BRÄSE et al., 2009
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	BRÄSE et al., 2009
<i>Penicillium crustosum</i>	-	-	BRÄSE et al., 2009
<i>Penicillium expansum</i>	Getreide, Früchte, Gemüse	Malzextrakt-Agar	BRÄSE et al., 2009 KAČERIGUS et al., 2005
<i>Penicillium solitium</i>	-	-	BRÄSE et al., 2009
<i>Penicillium verrucosum</i>	-	-	BRÄSE et al., 2009
<i>Aspergillus</i> spp.	Kulturmaterial	-	MILLER et al., 1963
<i>Aspergillus rasperi</i>	Getreide, Früchte, Gemüse	Malzextrakt-Agar	KAČERIGUS et al., 2005
<i>Ulocladium oudemansii</i>	Getreide, Früchte, Gemüse	Malzextrakt-Agar	KAČERIGUS et al., 2005

2.1.5.2 Biosynthese und chemische Synthese von TeA

Die Biosynthese von TeA erfolgt durch Verbindung von L-Isoleucin und zwei Acetateinheiten (STICKINGS und TOWNSEND, 1961). Auch STINSON (1985) kam zu der Annahme, dass die Biosynthese von TeA über 5-sec-Butyl-tetramsäure oder Acetoacetylisoleucin ablaufen könnte. STICKINGS und TOWNSEND (1961) benutzten für ihre Studien fünf Tage alte Kulturen einer *Alternaria tenuis*-Kultur, zu der sie ^{14}C -markiertes Acetat gaben. Am Tag 13 untersuchten sie die Kultur und fanden 4,5% der Radioaktivität, den größten Teil davon (94 - 95%) an C2 und C6. Die restliche Radioaktivität verteilte sich gleichmäßig auf die Atome C4 bis C10, dieselben Atome, die bei einer Untersuchung von STRASSMANN et al. (1954) von *Torulopsis utilis* auf mit ^{14}C -markiertem Medium in Isoleucin gefunden wurden. Sie bauten TeA über eine Reihe von Reaktionen schrittweise ab und erhielten Acetat und Isoleucin.

Diese Art der Biosynthese von TeA erscheint bei Betrachtung der Totalsynthesen von Tetramsäuren plausibel. LACEY (1954) setzte Aminosäureester mit Diketen zu N-Acetoacetyl-Aminosäureestern um und erreichte einen Ringschluss durch Zugabe von Natrium-Methylat. Dadurch erhielt er die entsprechende 3-Acetyltetramsäure. HARRIS et al. (1965) modifizierten die Versuchsanordnung von LACEY (1954) geringfügig, durch Umsetzung von L-Isoleucin mit Diketen erhielten sie N-Acetoacetyl-L-Isoleucin, das durch Methylierung mit Diazomethan in etherischer Lösung zum N-Acetyl-L-Isoleucinmethylester umgesetzt wurde (siehe Abb. 3). Im letzten Reaktionsschritt folgte unter Zugabe von Natrium-Methylat (basisches Medium) der Ringschluss unter Bildung von TeA beziehungsweise TeA-Natriumsalz. Die Autoren konstatieren, dass das von ihnen synthetisierte Produkt in allen Eigenschaften mit natürlicher TeA identisch sei. JAGUSCH (2005) beschrieb eine neue Art der Herstellung von 3-Acetyltetramsäuren und optisch reiner TeA. Auch er setzte Aminosäureester mit Keten um, allerdings lag die Ketenkomponente als Ketylidentrephenylphosphonat vor. Einmal lag das Phosphonat frei und einmal gebunden an Polystyrol vor. Bei Verwendung letzterer Form erhielt er ein optisch reines Produkt mit lediglich einem H-NMR-Signal (Kernresonanzspektroskopie).

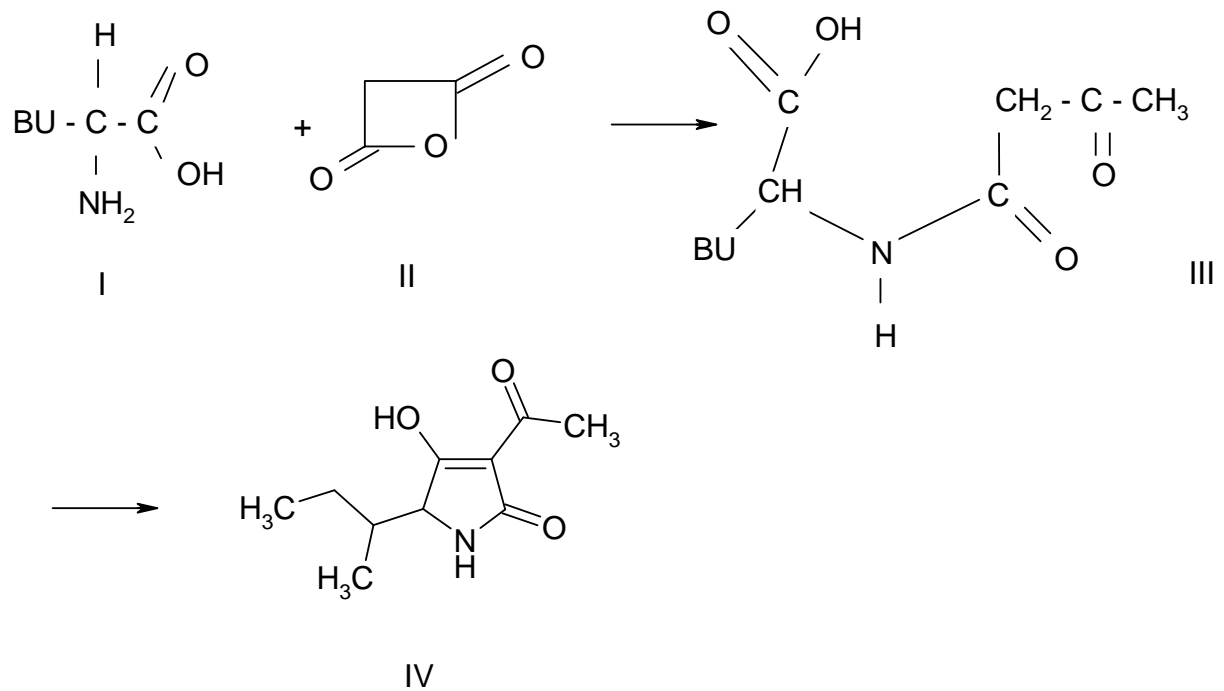


Abb. 3: Chemische Synthese von TeA, schematisiert nach HARRIS et al. (1965);
 (I) L-Isoleucin, (II) Diketen, (III) N-Acetoacetyl-Isoleucin, (IV) Tenuazon-
 säure
 BU = Sekundär-Butyl (C₄H₉)

2.1.5.3 Vorkommen von TeA in pflanzlichen Produkten

Zahlreiche Spezies der Gattung *Alternaria* stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen von Pflanzen. Insbesondere *Alternaria alternata* wurde aus vielen Pflanzen aus aller Welt isoliert (LOGRIECO et al., 2009). Die Gattung *Alternaria* ist dafür bekannt, dass sie pflanzenpathogene Spezies beinhaltet, die Erkrankungen während des Pflanzenwachstums hervorrufen (BOTTALICCO und LOGRIECO, 1998; LOGRIECO et al., 2003), sowie toxinogene Spezies, die Lebensmittelgrundstoffe wie Getreidekörner, Früchte oder Gemüse während der Lagerung befallen können (LOGRIECO et al., 2003). Eine hohe relative Feuchtigkeit während des Wachstums von anfälligen Grünpflanzen unterstützt dabei die TeA-Produktion (SAUER et al., 1978).

Die Schwarzfäule der Tomaten ist eine Erkrankung, die sowohl unreife als auch reife Früchte befallen kann. Die dominierende *Alternaria*-Spezies bezüglich des Befalls der Tomaten ist

Alternaria alternata, aber auch *Alternaria tenuissima* kann häufig isoliert werden (LOGRIECO et al., 2009). HARWIG et al. (1979) beimpften reife Tomaten mit toxinproduzierenden *Alternaria alternata*-Isolaten und fanden TeA bis zu einer Konzentration von 106.000 µg/kg. STINSON et al. (1980, 1981) untersuchten natürlich und künstlich kontaminierte Tomaten auf ihren Gehalt an TeA und fanden das Toxin in Konzentrationen bis zu 139.000 µg/kg Fruchtgewebe. In einer Untersuchung verfaulter Tomaten aus Tomatenketchup-Fabriken fanden STACK et al. (1985) bei 69 von 142 untersuchten Proben (48,6%) keine TeA, bei 28 Proben (19,7%) TeA in Konzentrationen bis zu 1,9 µg/g und in 45 Proben (31,7%) bis zu 45 µg/g. MISLIVEC et al. (1987) untersuchten 146 Tomatenproben aus Amerika zur Herstellung von Tomatenketchup. Sie fanden in 73 Proben à zehn Tomaten (50,0%) TeA in Bereichen zwischen 400 und 69.700 µg/kg (durchschnittlich 4.940 µg/kg). Sie konnten dabei aber aus 35 der 73 TeA-positiven Proben (47,9%) keine *Alternaria* spp. isolieren, woraus sie schlossen, dass TeA auch von anderen Schimmelpilz-Spezies gebildet wurde. LOGRIECO et al. (1988) untersuchten natürlich kontaminierte Tomaten aus einer Region in Süditalien auf ihre Toxingehalte und fanden in allen Proben TeA (bis zu 7.210 µg/kg), oftmals in Verbindung mit AME (bis zu 270 µg/kg) sowie AOH (bis zu 1.300 µg/kg). In einer Untersuchung von OZCELIK et al. (1990) konnten dagegen keine TeA-Verbindungen in beimpften Tomaten nachgewiesen werden. Neben den Früchten sind auch die daraus hergestellten Produkte wie z. B. geschälte Tomaten, Tomatenpüree, Tomatenmark, Ketchup und Tomatensaft mit *Alternaria*-Toxinen befallen, auch TeA ist dabei häufig nachweisbar (OSTRY, 2008, TERMINELLO et al., 2006). DA MOTTA und VALENTE SORAES (2001) untersuchten brasilianische Tomatenprodukte auf deren Gehalt an TeA, Alternariol, Alternariolmonomethylether und Cyclopiazonsäure. Von den 80 untersuchten Tomatenprodukten wurde in keiner der elf untersuchten Tomatensäfte, 24 Tomatenpasten und einer gedünsteten Tomatenprobe die vier Mykotoxine gefunden, allerdings wurden in sieben (31,8%) bzw. sechs (27,3%) von 22 Tomatenbrei-Proben TeA bzw. Cyclopiazonsäure detektiert. Bei 22 untersuchten Tomatenpüree-Proben wurden in vier (18,2%) TeA und in zwei (9,1%) der Proben Cyclopiazonsäure nachgewiesen. TeA wurde in Konzentrationen von 29-111 µg/kg und Cyclopiazonsäure in Konzentrationen von 36-178 µg/kg detektiert. Drei Proben (13,6%) enthielten beide Toxine. Kürzlich berichteten NOSER et al. (2011) sowie ASAM et al. (2012) von einer praktisch 100% igen Kontamination von Tomatenerzeugnissen des schweizer bzw. des deutschen Marktes. Die von diesen Autoren verwendeten LC-MS/MS Verfahren wiesen Nachweisgrenzen von ≤ 2 ng/g auf.

Äpfel werden häufig mit *Alternaria alternata* bzw. mit einem bestimmten *Alternaria alternata*-Pathotyp (auch als virulente Form von *Alternaria mali* bezeichnet) befallen. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Erkrankungstypen vor, einerseits die „*Alternaria*-Flecken“ und andererseits die „*Alternaria*-Kernfäule“ der Äpfel (LOGRIECO et al., 2009). VIÑAS et al. (1992) untersuchten 157 „Golden Delicious“-Äpfel mit Läsionen der Schale. Sie fanden als Hauptverursacher für den Befall der Äpfel nach der Ernte *Alternaria tenuis* (heute *Alternaria alternata*). Bei künstlicher Inokulation von Äpfeln mit *Alternaria*-Stämmen konnte nur bei einem Stamm bei 25 °C eine TeA-Produktion nachgewiesen werden, bei Anzucht auf Hefeextraktagar jedoch bei 97% der Stämme. OZCELIK et al. (1990) fanden TeA weder in künstlich noch in natürlich kontaminierten Äpfeln, die sie unter verschiedenen Bedingungen gelagert hatten.

Sehr häufig mit *Alternaria* befallen und damit potentiell mit *Alternaria*-Toxinen kontaminiert sind Zitrusfrüchte. Nach Beimpfung von Orangen bzw. Zitronen mit *Alternaria citri* konnte in den Früchten eine TeA-Konzentration von 61.100 µg/kg (Orangen) bzw. 48.800 µg/g (Zitronen) nachgewiesen werden (STINSON et al., 1981). LOGRIECO et al. (1990a) untersuchten Mandarinen (*Citrus reticulata*), die natürlicherweise mit *Alternaria alternata* befallen waren. Die Früchte zeigten dabei zwei unterschiedliche Fäulnisformen, die graue und die schwarze Kernfäule. Bei zwei mit der schwarzen Kernfäule befallenen Zitrusfrüchten wurde in hohem Maße TeA (21.000 und 87.200 µg/kg) detektiert, darüber hinaus auch noch AOH (1,0 und 5,2 mg/kg) sowie AME (0,5 und 1,4 µg/g). Bei der grauen Kernfäule wurde TeA als einziges *Alternaria*-Toxin mit einer Konzentration von 173.900 µg/kg isoliert. Neben Tomaten und Äpfeln können aber praktisch alle Obst- und Gemüsearten von toxinogenen *Alternaria* befallen werden. Insbesondere in mediterranen Ländern spielt dies eine sehr große Rolle, so dass viele Berichte zum Vorkommen von TeA z. B. aus Italien stammen.

Oliven werden ebenfalls häufig von *Alternaria alternata* befallen. VISCONTI et al. (1986) untersuchten sowohl die Früchte als auch daraus hergestellte Produkte. Bei der Untersuchung von 13 Proben (äußerlich unbeschädigter) Oliven konnten bei vier Proben (30,8%) zwei bis vier verschiedene *Alternaria*-Toxine gefunden werden. Bei schwer geschädigten Oliven wurden 262 µg/kg TeA, 290 µg/kg AME, 230 µg/kg AOH und 140 µg/kg ALT nachgewiesen. Neben den Früchten wurden auch sechs Olivenöle untersucht sowie drei Proben von Olivenschalen, die nach dem ersten Pressen in Olivenöl-herstellenden Mühlen genommen wurden. In keiner dieser Proben wurden *Alternaria*-Toxine gefunden.

SOLFRIZZO et al. (2004) untersuchten das Toxinbildungsvermögen von *Alternaria alternata*- und *Alternaria radicina*-Stämme, die sie aus Karotten isoliert hatten. Auf dem Nährmedium Reis produzierten fast alle Stämme TeA, wohingegen die auf Karotten angezüchteten Isolate kein TeA bildeten. In einer Untersuchung zum Vorkommen von TeA in Karottenwurzeln und daraus hergestellten Produkten konnte das Mykotoxin weder während der Herstellung noch während der Lagerung nachgewiesen werden (SOLFRIZZO et al., 2005).

LOGRIECO et al. (1988) untersuchten Melonen (*Cucumis melo*), die mit *Alternaria alternata* und *Alternaria cucumerina* befallen waren. Die Früchte stammten aus Süditalien. Es wurden vor allem diejenigen Früchte untersucht, auf deren Oberfläche schwarze Flecken erkennbar waren. Es wurde bei den Untersuchungen TeA (8 µg/kg) und AME (5,1 µg/kg) gefunden.

STINSON et al. (1981) inokulierten Blaubeeren mit einem *Alternaria alternata*-Isolat, das sie aus verfaulten Blaubeeren isoliert hatten. Sie konnten einen enorm hohen TeA-Gehalt von bis zu 2 g/kg nachweisen.

VISCONTI et al. (1992) untersuchten Raps-Proben (*Brassica napus*) aus verschiedenen Regionen Italiens. Sie fanden 11 *Alternaria*-Isolate, die sie jeweils aus den Schoten und den Samen gewonnen hatten. Bei Wachstum auf autoklaviertem Reis als Nährmedium produzierten diese Isolate TeA (bis zu 1.200.000 µg/kg), AOH (bis zu 200.000 µg/kg), AME (bis zu 200.000 µg/kg), ATX I (bis zu 250.000 µg/kg) und ATX II (bis zu 70 µg/g). Bei einer direkten Untersuchung von 16 Raps-Proben wurden dagegen keine *Alternaria*-Toxine gefunden, obgleich die Pflanzen mit *Alternaria alternata* kontaminiert waren, die bei Kultivierung auf einem Reismährmedium hohe Mengen an *Alternaria*-Toxinen bildeten. VIÑAS et al. (1994) untersuchten Rapsproben in Spanien und fanden dort ebenfalls einen Befall mit *Alternaria alternata*, jedoch konnten bei keiner der kontaminierten Proben *Alternaria*-Mykotoxine gefunden werden. AHMAD et al. (1996) untersuchten das Mykotoxinbildungsvermögen von *Alternaria alternata*-Isolaten, die sie aus Senf- und Raps-Proben erhalten hatten. Sie fanden dabei TeA in Konzentrationen bis zu 27.500 µg/kg. Darüber hinaus wurde AME in Konzentrationen bis 22.900 µg/kg detektiert.

LOGRIECO et al. (1988) untersuchten Pfeffer auf einen möglichen Befall mit *Alternaria*-Spezies und fanden dabei *Alternaria alternata*. Bei der Überprüfung des Mykotoxingehaltes

detektierten sie TeA (bis zu 54 µg/kg), AME (49 µg/kg) und AOH (640 µg/kg). CHUNG et al. (1998) fanden bei Untersuchungen von künstlich mit *Alternaria alternata* inokuliertem Pfeffer bis zu 342.000 µg/kg TeA. KWON et al. (2008) untersuchten das Mykotoxinbildungsvermögen von Schimmelpilzen, die sie von rotem Pfeffer aus Korea isoliert hatten. Sie fanden dabei *Alternaria alternata* und TeA-Gehalte von bis zu 1.570.000 µg/kg auf künstlich inokuliertem Reismedium sowie bis zu 1.050.000 µg/kg auf künstlich inokuliertem „Pfeffermedium“. In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichten ASAM et al. (2012) ebenfalls von TeA-Nachweisen in Gewürzen.

Neben Obst und Gemüse scheint der Befall von Getreide mit TeA-bildenden Schimmelpilzen ein weltweites Problem zu sein, wie zahlreiche Untersuchungen belegen. Die Schwarzfäule von Getreidekörnern wurde von mehreren Autoren untersucht. LOGRIECO et al. (1990b) untersuchten Getreidekörner (Weizen, Hirse, Reis, Hafer, Roggen und Mais), die aus unterschiedlichen Ländern (Ägypten, Griechenland, Libyen, Frankreich, Italien, Portugal, Türkei und dem früheren Jugoslawien) stammten, auf eine mögliche *Alternaria*-Infektion. Es stellte sich dabei heraus, dass insbesondere Hirse (bis zu 86%) mit *Alternaria* spp. befallen war, daneben auch Weizen und Hafer, wohingegen Reis- und Maiskörner seltener befallen waren. Die für den Befall „hauptverantwortlichen“ *Alternaria*-Spezies waren *Alternaria alternata*, mit einer vergleichsweise geringeren Häufigkeit auch *Alternaria tenuissima*. Auch von anderen Autoren wurde ein Befall von Getreide mit *Alternaria* und eine Kontamination mit *Alternaria*-Toxinen beschrieben. ANSARI et al. (1990) untersuchten Hirse und Fingerhirse aus Indien und fanden dabei TeA in Konzentrationen bis zu 5.600 µg/kg bzw. 5.700 µg/kg. CHELKOWSKI und VISCONTI (1992) untersuchten das Mykotoxinbildungsvermögen von acht *Alternaria tenuissima*-Isolaten aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Produkten in Polen. Alle Isolate produzierten TeA (22-270 mg/kg), AOH (8-56 mg/kg) und AME (2-200 mg/kg). WEBLEY et al. (1997) geben bei australischem Weizen hinsichtlich der Mykotoxinbelastung für TeA Werte bis zu 90 µg/kg an. In China untersuchten LI und YOSHIZAWA (2000) Weizenproben, wobei hier *Alternaria alternata* als Pilzspezies mit bis zu 87% am häufigsten gefunden wurde. Die produzierten Toxine waren TeA (bis zu 6.432 µg/kg), AOH (bis zu 731 µg/kg) und AME (bis 1.426 µg/kg). HÄGGBLOM et al. (2007) untersuchten Getreide (Hirse, Weizen, Hafer) in Schweden und fanden dort *Alternaria tenuissima* und *Alternaria arborescens* sowie *Alternaria infectoria*. TeA fand sich hauptsächlich in den Hafer- (3.000 µg/kg) und Triticale-Proben (2.200 µg/kg). PATRIARCA et al. (2007) untersuchten das Mykotoxinbildungsvermögen von *Alternaria*-

Stämmen, die sie aus argentinischem Weizen isolierten. Von 123 untersuchten Stämmen bildeten 72% TeA in Konzentrationen von 1.000-14.782.000 mg/kg. Durchschnittlich wurden 1.757.000 mg/kg TeA detektiert, was ungefähr der zehnfachen Konzentration von AOH (162 mg/kg) entsprach. AZCARATE et al. (2008) isolierten aus argentinischem Getreide *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima*. Die detektierten Toxine waren TeA (8.814 µg/kg) und AOH (1.338 µg/kg) sowie AME (7.451 µg/kg). SIEGEL et al. (2009) untersuchten 27 Getreideproben. In 13 Proben (48,1%) konnte TeA mit einem durchschnittlichen Gehalt von 49 µg/kg nachgewiesen werden. Zudem untersuchten sie 43 kommerziell erhältliche Biere des deutschen Marktes. TeA wurde in 37 Bieren (86,0%) qualitativ gefunden und in 16 davon (37,2%) auch quantifiziert. Die durchschnittliche Belastung lag bei 11 µg/kg. Bockbiere enthielten mit durchschnittlich 37 µg/kg die höchsten Konzentrationen. Alkoholfreie Biere wiesen insgesamt keine deutlich niedrigere Belastung mit TeA auf (SIEGEL et al., 2010).

Bei einer Untersuchung des Toxinbildungsvermögens von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria*, die aus CCM-Mais und Heu isoliert wurden, fand MÜLLER (1992) TeA in Konzentrationen von 0,02-42 mg/100 ml Kulturansatz.

DIENER et al. (1976) isolierten 47 Pilzkulturen aus Baumwolle, die sie in den US-Bundesstaaten Alabama, Georgia, Louisiana und Mississippi gesammelt hatten. Darunter befanden sich *Alternaria alternata* und *Alternaria tenuissima*, die eine hohe Toxizität im Brine shrimp-Test, im Hühner-Embryo-Test und in Fütterungsversuchen mit Ratten aufwiesen. Eine Untersuchung der möglicherweise enthaltenen *Alternaria*-Toxine wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht vorgenommen. DAVIS et al. (1977) berichteten von einer TeA-Produktion bei *Alternaria alternata*- und *Alternaria tenuissima*-Kulturen, die sie aus Baumwolle extrahierten. VIYAYALAKSHMI (1996) untersuchte *Alternaria macrospora*, einen Verursacher der Braunfleckenkrankheit bei Baumwolle. Er isolierte dabei TeA als eine der Komponenten, die diese Krankheit hervorruft. Eine Zusammenfassung zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Literaturübersicht zu TeA-Gehalten in verschiedenen pflanzlichen Produkten (natürliche Kontamination, künstliche Inokulation)

Pflanzliches Produkt	Kontamination	Land	Jahr	Probenanzahl	Nachweisgrenze TeA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n > NWG	Durchschnittsgehalt ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min./Max. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenz
Tomaten	künstlich	Kanada	n.a.	4 (<50 % Fäuln.) 3 (>50 % Fäuln.)	n.a.	n.a.	19.100 55.700	14.900/23.400 30.400-106.000	HARWIG et al., 1979
Tomaten	natürlich	n.a.	n.a.	19	<100	11	17.600	n.a./139.000	STINSON, 1981
Tomaten	natürlich	n.a.	n.a.	142	n.a.	73	n.a.	n.a./70.000	STACK et al., 1985
Tomaten	natürlich	Amerika	1983	146 à 10	n.a.	73	4.940	400-69.700	MISLIVEC et al., 1987
Tomaten	natürlich	Italien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./7,21	LOGRIECO et al., 1988
Tomatenprodukte	künstlich	Brasilien	1994-1995	22 Brei 22 Püree	11 11	7 4	n.a. n.a.	<11/111 <11/76	DA MOTTA, 2001
Tomaten	künstlich	Argentinien	2006	80	11	23	n.a.	<11/4.021	TERMINELLO et al., 2006
Äpfel	künstlich	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	800/9.600	SINGH und SUMBALAY, 2004
Mandarinen	natürlich	Italien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./173.900	LOGRIECO et al., 1988
Mandarinen	künstlich	Italien	1987	3	n.a.	3	94.033,30	21.000/173.900	LOGRIECO et al., 1990a
Zitrusfrüchte	künstlich	n.a.	n.a.	6 Orangen 6 Zitronen	<100 <100	6 6	266.000 161.000	1.400/61.000 <1.000/48.800	STINSON et al., 1981
Olivens	natürlich	Italien	n.a.	13	100	2	n.a.	109/262	VISCONTI et al., 1986
Olivens	natürlich	Italien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./262	LOGRIECO et al., 1988
Melonen	natürlich	Italien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./8	LOGRIECO et al., 1988
Blaubeeren	künstlich	n.a.	n.a.	9	n.a.	4	1.502.000	n.a./2.025.000	STINSON et al., 1980
Senf / Raps	natürlich	Pakistan	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./27.500	AHMAD et al., 1996
Pfeffer	natürlich	Italien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./54	LOGRIECO et al., 1988
Pfeffer	künstlich	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.n./342.000	CHUNG et al., 1998
Pfeffer	künstlich	Korea	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	520.000/1.570.000 (auf Reis) 115.000/1.050.000 (auf Pfeffer)	KWON et al., 2008

2 SCHRIFTTUM

Pflanzliches Produkt	Kontamination	Land	Jahr	Probenanzahl	Nachweisgrenze TeA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n > NWG	Durchschnittsgehalt ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Min./Max. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenz
Hirse und Fingergirse (ragi)	natürlich	Indien	1987-1988	Hirse Fingergirse	20 8	n.a. n.a.	5 3	n.a. n.a.	ANSARI und SHRIVASTAVA, 1990
Weizen	natürlich	Australien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a./90	WEBLEY et al., 1997
Weizen	natürlich	China	2003-2005	22	100	22	2.419	260/6.432	LI und YOSHIZAWA, 2000
Getreidekörner, Stroh	künstlich	Schweden	2006	18	n.a.	18	n.a.	980/4.310	HÄGGBLOM et al., 2007
Weizen	natürlich	Argentinien	2004-2005	41	11	n.a.	1.757.000	1/14.782.000	PATRIARCA et al., 2007
Weizen	künstlich	Argentinien	2004-2005	64	80	12	2313	1.001/8.814	AZCARATE et al., 2008
Getreide	natürlich	Deutschland		27	10	13	49	n.a./851±41	SIEGEL et al., 2009
Bier	natürlich	Deutschland		43	2	37	11	n.a./175±13	SIEGEL et al., 2010

2.1.5.4 Möglichkeiten der Verminderung eines *Alternaria*-Befalls in pflanzlichen Produkten

Eine Verminderung des Eintrages an *Alternaria*-Spezies ist u.a. durch chemische, biologische und physikalische Kontrollmechanismen realisierbar (BATTILANI et al., 2008).

Eingesetzte chemische Fungizide zur Bekämpfung der Schwarzfäulnis von Mandarinen sind Kupfersulfat, Zinksulfat oder Eisensulfat. Diese können entweder zum Besprühen von Bäumen oder zum Eintauchen ganzer Früchte verwendet werden. Konzentrationen von Kupfersulfat, Borsäure oder Ammoniummolybdat über 20 ppm führen zu einer signifikanten Wachstumsreduktion. Konidien des Pilzes waren bereits sehr empfindlich gegen niedrige Konzentrationen von Kupfer, Zink und Eisen (SINGH und KHANNA, 1969; BATTILANI et al., 2008). Azoxystrobin, Difenocinazol, Polyoxin B und Trifloxystrobin-Fungizide wurden in Apfelplantagen erfolgreich gegen einen *Alternaria*-Befall eingesetzt (REUVENI et al., 2002; REUVENI, 2006; BATTILANI et al., 2008). SHTIENBERG und DREISHPOUN (1991) berichten über den erfolgreichen Versuch, den Befall von Baumwoll-Plantagen mit *Alternaria*-Spezies durch den Einsatz von Maneb, Manozeb, Difenoconazol und Tebuconazol zu verhindern (BATTILANI et al., 2008). OLSEN et al. (1998) zeigten, dass die Blattläsionen bei Baumwollpflanzen durch Einsatz von Manozeb und Sulfur in Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe vermindert werden konnten (BATTILANI et al., 2008). DALCERO et al. (1996) untersuchten die Wirkung von Dichlorvos auf das Wachstum und die Mykotoxinproduktion von *Alternaria alternata*. Bei einer Konzentration von 600 mg/g zeigte Dichlorvos einen Effekt auf die lineare Wachstumsrate von *Alternaria alternata*. Bei 50 mg/kg zeigte sich bereits ein verändertes Koloniewachstum. Die Kolonien erschienen insgesamt luftiger als die unbehandelten. Auch Sonnenblumenkerne wurden mit Dichlorvos behandelt. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 200 mg/kg konnte keine TeA-Produktion nachgewiesen werden. COMBINA et al. (1999a) testeten die Wirkung von in der Lebensmittelproduktion eingesetzten Konservierungsmitteln auf das *Alternaria alternata*-Wachstum und die TeA-Produktion und stellten dabei fest, dass die TeA-Konzentration unter experimentellen Bedingungen stabil war, wenn als Konservierungsmittel organische Säuren (beziehungsweise deren Salze) zugegeben wurden. Gleiches gilt für die Zugabe von Natrium- und Kaliumbenzoat bis zu einer Menge von 10 mg/kg. Ab dieser Konzentration kam es zu einem Stillstand des Pilzwachstums und der TeA-Biosynthese. Zugabe von Natriumpropionat

fürhte erst bei Dosen von 10 mg/kg zu einer Verlangsamung des Pilzwachstums, aber bereits bei Wirkstoffgehalten von 10-25 µg/g zu einer Reduktion der TeA-Synthese.

Biologische Kontrollmechanismen des *Alternaria*-Befalles wurden von mehreren Autoren untersucht. JENSEN et al. (2004) untersuchten Pilzantagonisten gegen *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina*. Diese *Alternaria*-Spezies befallen typischerweise Karotten. Dabei stellten sie fest, dass Pilzisolat der Gattung *Clonostachys rosea* eine ähnliche Wirkung gegen die beiden *Alternaria*-Spezies aufwies, wie das üblicherweise verwendete chemische Fungizid Iprodion. FENG und ZHENG (2007) stellten bei Untersuchung der Wirkung ätherischer Öle auf das *Alternaria alternata*-Wachstum fest, dass Cassia-Öl das Wachstum des Schimmelpilzes in einer Konzentration von 300-500 µg/g inhibierte. Bei einer Konzentration von 500 µg/g nahm der prozentuale Anteil verschimmelter Tomaten deutlich ab. Thymianöl führte bei einer Konzentration von 500 µg/g zu einer Wachstumshemmung von 62%. Über mögliche sensorische Beeinträchtigungen berichten diese Autoren jedoch nicht. WANG et al. (2008) zeigten, dass Isolate der marinen Hefe *Rhodospodium paludigenum* einen Einfluss auf das Wachstum von *Alternaria alternata* auf chinesischen roten Datteln hatten. Von den behandelten Früchten wiesen 67,6% Fäulnis auf, wohingegen die unbehandelten zu 93,4% mit *Alternaria alternata* befallen waren.

Auch mögliche physikalische Kontrollmöglichkeiten des *Alternaria*-Befalles wurden beschrieben. MC DONALD et al. (2006) fanden heraus, dass ein einminütiges Eintauchen von Honigmelonen in 50-65 °C warmes Wasser einen lagerungsbedingten *Alternaria*-Eintrag im Vergleich zur Kontrollgruppe (22 °C) stark herabsetzte. Behandlungen mit Gammastrahlung, die Wasseraktivität und die Wärmebehandlung hatten einen deutlichen Einfluss auf die TeA-Produktion von *Alternaria alternata* bei Tomatenmark und Tomatensaft. Bei einer Erhöhung der Bestrahlungsdosis nahmen sowohl die Trockenmasse als auch die TeA-Konzentration stetig ab. Ab einer Bestrahlungsdosis von 4 kGy war keine TeA mehr nachweisbar. Die höchste TeA-Produktion war bei einer Temperatur von 25 °C und einem a_w -Wert von 0,98 mit Toxinkonzentrationen von 57,5 µg/g in Tomatenmark und 26,3 µg/g in Tomatensaft gegeben. Eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis, beziehungsweise eine niedrige Wasseraktivität senkten oder inhibierten die TeA-Produktion vollständig (AZIZ et al., 2006; BATTILANI et al., 2008).

Neben den genannten Kontrollmöglichkeiten spielt auch die Art der Verarbeitung von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs eine Rolle bei der Verminderung des *Alternaria*-Befalls. DALCERO et al. (1997) zeigten, dass eine Silierung von Sonnenblumenkernen den TeA-Gehalt herabsetzt. COMBINA et al. (1999b) untersuchten den Übergang von *Alternaria*-Toxinen aus Sonnenblumenmehl in Öl. Lediglich 2% des TeA-Gehaltes des Ausgangsmaterials wurden im Endprodukt gefunden. Eine Hitzebehandlung von Sonnenblumenmehl bei 100 °C über 90 Minuten führte zu einer Halbierung des TeA-Gehaltes (CHULZE et al., 1995; BATTILANI et al., 2008).

2.1.5.5 Übergang von TeA in Lebensmittel tierischen Ursprungs

Untersuchungen zu einem möglichen Übergang von TeA in Lebensmittel tierischen Ursprungs (carry-over) wurden bisher nicht publiziert. Ebenso liegen keine Daten zur Metabolisierung des Toxins im lebenden Organismus vor.

2.2 Verfahren zum Nachweis von TeA

Zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln wurden bisher zahlreiche Analysemethoden entwickelt, beziehungsweise modifiziert. So sind für fast alle „wichtigen“ Mykotoxine immunologische (MÄRTLBAUER, 1988; MÄRTLBAUER et al., 1988; BRÖSIGKE, 1999; USLEBER et al., 2008; LATIF et al., 2009), biologische (HRADEC und VESELY, 1989; SCHRADER et al., 2001; GAREIS, 2006) sowie physikalisch-chemische Nachweisverfahren (SCHNEIDER et al., 2004; MÜLLER et al., 2006; SCOTT, 2007) entwickelt worden. Zum Nachweis von TeA sind im Folgenden biologische und physikalisch-chemische Verfahren beschrieben. Immunologische Nachweisverfahren dagegen wurden für TeA bisher nicht beschrieben.

2.2.1 *Extraktion und Reinigung*

Um TeA möglichst vollständig aus der jeweiligen Probenmatrix zu isolieren, wurden verschiedene Extraktions- und Reinigungsverfahren angewandt (Tab. 6). SCHADE und KING

(1984) stellten die Löslichkeit von TeA in verschiedenen Lösungsmitteln unter Berücksichtigung der jeweiligen Form der TeA dar (Säure in Reinform, Kupfersalz, Magnesium- oder Calciumsalz). Als geeignete Lösungsmittel gaben sie für die freie Säure Aceton, Benzol, Chloroform, Ethanol, Ether, Ethylacetat, Hexan, Methanol, Petrolether, Pyridin, wässrige Natriumbicarbonatlösung und wässrige Natronlauge an, für das Kupfersalz Aceton, Chloroform, Ethanol und Methanol und für das Calcium- und Magnesiumsalz Ethanol und Methanol.

Bei der Untersuchung von Proben werden diese anfangs zumeist mit Wasser oder Methanol gemischt und anschließend mit einem nicht mischbaren Lösungsmittel wie Chloroform, Ethylacetat oder Dichlormethan extrahiert. HARVAN und PERO (1974) benutzten Ethylacetat als Extraktionsmittel bei der Untersuchung von Tabak, auch HARWIG et al. (1979) verwendeten Ethylacetat für die Extraktion von TeA aus Tomaten. DAVIS et al. (1977) und STINSON et al. (1980) verwendeten Chloroform für die Extraktion von TeA aus Baumwolle, beziehungsweise aus Apfel- und Tomatenprodukten.

Die Probenextrakte werden anschließend mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt (siehe Tabelle 6), da die Magnesium- und Calciumsalze von TeA in den oben genannten Lösungsmitteln im Vergleich zu freier TeA nicht löslich sind (STEYN und RABIE, 1976; SCHADE und KING, 1984). Die lipophilen Bestandteile des Extrakts können vor dem Ansäuern in einer Fraktion mit n-Hexan entfernt werden (SCHADE und KING, 1984). TeA löst sich als starke Säure im Unterschied zu anderen *Alternaria*-Toxinen bereits in Bicarbonat (NaHCO_3), weswegen manche Autoren den Schritt der „Bicarbonat-Purifikation“ verwenden (SCHADE und KING, 1984), Tab. 6. Bei dieser Aufreinigung wird TeA aus dem organischen Filtrat in die wässrige, alkalische Bicarbonatlösung extrahiert, diese dann auf einen pH-Wert von 2 angesäuert und die TeA in dasselbe oder ein weniger polares Lösungsmittel zurückextrahiert. Die so gewonnenen Extrakte werden eingeengt, mit wenig Lösungsmittel aufgenommen und zumeist chromatographisch auf den Gehalt an TeA untersucht. Eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) ist für TeA kürzlich beschrieben worden (ASAM et al., 2011; NOSER et al., 2011).

2 SCHRIFTTUM

Tab. 6: Methoden zur Extraktion und Aufreinigung von Tenuazonensäure aus verschiedenen Probenmaterialien

Probenmaterial	Extraktion	Aufreinigung	Nachweisverfahren	Referenz
Mycel <i>Alternaria</i>	Entfetten mit Leichtbenzin in Soxhlet	Trennung durch mehrfache Extraktion mit diversen Lösungsmitteln und Umkristallisierung	Farbreaktion mit FeCl ₃ Nachweis als Kupfersalz	ROSETT et al, 1957
Mycel <i>Alternaria</i>	Chloroform: Methanol; Entfetten mit n-Hexan, in Methanol lösen	k. A.	DC	STEYN und RABIE, 1976
Tomatenmark	Methanol-Hexan-10 N H ₂ SO ₄ - Dichlormethan	Bicarbonat-Purifikation mit 5 % Natriumbicarbonatlösung Acidifizierung, Rückextraktion in Methylenchlorid	RP-HPLC (mit Zn ²⁺) Best. mit GC-MS (SIM)	SCOTT und KANHERE, 1980
Baumwolle Baumwollsaat	bei pH 2 mit Chloroform mit Chloroform:Methanol:Ameisensäure	Bicarbonat-Purifikation mit Natriumbicarbonatlösung; Acidifizierung und Extraktion mit Hexan	DC	DAVIS et al., 1977
Äpfel, Tomaten, Blaubeeren	Einstellen auf pH 2, Extraktion mit Chloroform:Ethanol, trocknen mit Natriumsulfat	k. A.	RP-HPLC/UV	STINSON et al., 1980, 1981
Tomaten	Wasser-Chloroform	Vortrennung mit Silica-Gel -Säule; Fließmittel Methanol enthält ZnSO ₄	HPLC-UV Best. mit HPLC-MS	STACK et al., 1985
Oliven	Methanol-Wasser-Hexan mit HCl; Chloroform	k. A.	DC Bestätigung mit HPLC/UV	VISCONTI et al., 1986
Tomaten Oliven	Methanol-Hexan-HCl (pH 2), in Chloroform lösen	k. A.	DC und HPLC	LOGRIECO et al., 1988
Sonnenblumenkerne	Methanol-20 % Ammoniumsulfat- Hexan-HCl (pH 2)-Methylenchlorid in Chloroform lösen	k. A.	DC und HPLC	LOGRIECO et al., 1988
Mandarinen	HCl (pH 2)-Chloroform:Ethanol- trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat in Methanol lösen	k. A.	DC und HPLC	LOGRIECO et al., 1988
Pfeffer und Melonen	Methanol-Hexan-HCl-Chloroform in Chloroform lösen	k. A.	DC und HPLC	LOGRIECO et al., 1988

2 SCHRIFTTUM

Probenmaterial	Extraktion	Aufreinigung	Nachweis- verfahren	Referenz
Hirse und Fingerhirse	Methanol-Wasser-Hexan-HCl (pH 2)-Chloroform	k. A.	DC UV-Spektren	ANSARI et al., 1990
Tomaten- produkte	Methanol-Wasser-Hexan mit HCl; Chloroform in Chloroform lösen	k. A.	HPLC-DAD	Da MOTTA und VALENTE SOARES, 2001
Weizen	Acetonitril:4 % Kaliumchloridlösung: HCl (pH 2) Dichlormethan	Dichlormethan und Bicarbonat-Purification, auf pH 2 einstellen in Methanol lösen	HPLC	LI und YOSHIZAWA, 2000
Weizen	Acetonitril: 4 % Kaliumchloridlösung:HCl (pH 2) Chloroform	Bicarbonat-Purification mit Natriumbicarbonatlösung wiederholte Extraktion in Chloroform	HPLC-UV-DAD	AZCARATE et al., 2008
Getreide	Derivatisierung der Probe mit 2,4 Dinitrophenyl- hydrazin; Hydrazon in Ethylacetat	k. A.	HPLC-MS/MS	SIEGEL et al., 2009
Bier	Derivatisierung der Probe mit 2,4 Dinitrophenyl- hydrazin; Hydrazon in Ethylacetat	k. A.	HPLC-MS/MS	SIEGEL et al., 2010
Tomaten- produkte	Acetonitril-Wasser-Methanol (pH 3)	Festphasenextraktion (C18-Kartusche)	HPLC-MS/MS	NOSER et al., 2011
Tomaten- produkte	Derivatisierung der Probe mit 2,4 Dinitrophenyl- hydrazin nach Zugabe des internen Standards [¹³ C ₆ N ¹⁵]-TeA	Festphasenextraktion (C18-Kartusche)	HPLC-MS/MS mit SIDA	ASAM et al., 2011

2.2.2 *Biologische Nachweisverfahren*

Für den Nachweis von TeA wurde ein biologisches Nachweisverfahren auf Basis des MTT-Tests geprüft, das auf einem zytotoxischen Effekt des Mykotoxins basiert (GAREIS, 2006). Verglichen werden dabei die zytotoxischen Effekte von Rohextrakten aus Verdachtsproben mit denen entsprechender Kontrollen gegenüber der als Zielzellen eingesetzten Swine Kindney (SK)-Zelllinie, die sich gegenüber Matrixeffekten der unterschiedlichen Proben in Bereichen von 50 bis 1.000 mg Probenaliquot/ml Zellkulturmedium als unempfindlich erwiesen hat. Der IC₅₀-Wert (inhibitory concentration 50: Toxinkonzentration, welche die MTT-Spaltungsaktivität auf 50% der Kontrollwerte reduziert) für TeA liegt bei 52,08 µg/ml und ist damit als gering zytotoxisch zu bewerten.

GRIFFIN und CHU (1983) untersuchten die Toxizität von TeA mittels eines Hühnerembryo-Tests. Dazu geben sie an Tag sieben der Brütung 100 µl Toxin/Ei. An Tag 23 wurden die Eier zerstört und die Embryonen untersucht. Die LD₅₀-Dosis für TeA lag in diesem Testsystem bei 548 µg/Ei. PANIGRAHI und DALLIN (1994) beschreiben die Toxizität von TeA in einem Artemia-Salina-Test (SIEGFRIED, 1979). Sie stellten für TeA eine LD₅₀-Dosis von 75 µg/ml fest, was innerhalb der Gruppe der getesteten *Alternaria*-Toxine (AOH 100 µg/ml; ATX I 200 µg/ml und ALT 375 µg/ml) die höchste Toxizität darstellte. VISCONTI et al. (1992) ermittelten im Artemia-Salina-Test für TeA sogar eine noch niedrigere LD₅₀-Dosis von 20 µg/ml.

Eine mögliche Mutagenität von TeA wurde unter Einsatz des Ames-Salmonellen-Tests (AMES et al., 1973) untersucht (SCHRADER et al., 2001). Hierzu wurden nitrosylierte und nicht-nitrosylierte *Alternaria*-Toxine eingesetzt. Zur Anwendung kamen *Salmonella typhimurium*-Stämme (Stämme 98 und 100), die durch Punktmutation in einem Gen nicht mehr in der Lage sind, Histidin zu produzieren. Diese wurden mindestens im Dreifachansatz auf ein Histidin-freies Nährmedium gegeben und anschließend das Mutagen hinzugegeben. Als mutagen wurden solche Substanzen eingestuft, bei denen sich die Zahl der Bakterienkolonien im Gegensatz zur Kontrollkolonie mindestens verdoppelt hatten, was auf das Wiedererlangen der Fähigkeit zur Histidin-Produktion zurückzuführen ist. TeA zeigte weder in Reinform noch nitrosyliert mutagene Eigenschaften. REISS (1986) setzte einen „SOS-Chromotest“ zum Nachweis eventueller genotoxischer Effekte von Mykotoxinen ein. Das Testsystem ähnelt dem Ames-Test, allerdings unter Verwendung eines modifizierten

Escherichia coli-Stammes, in welchem das Gen für β -Galaktosidase an ein Operator-Gen gekoppelt ist, das für das intrazelluläre DNA-Reparatursystem verantwortlich ist. Auch in diesem Testsystem zeigte die TeA kein mutagenes Potential. HRADEC und VESELY (1989) untersuchten das mutagene Potential von 20 Mykotoxinen. Sie verwendeten dazu einen tRNA-Akzeptanz-Test, mit dessen Hilfe sowohl ein mutagenes als auch ein kanzerogenes Potential von Mykotoxinen erkennbar ist. Auf TeA traf keine der genannten Wirkungen zu. Schlussfolgernd kann aus diesen Befunden angenommen werden, dass TeA keine mutagenen Eigenschaften aufweist.

2.2.3 *Immunologische Nachweisverfahren*

Detektionsverfahren, welche auf Antikörpern basieren, hierbei insbesondere Enzymimmuntests, spielen heutzutage eine entscheidende Rolle in der Routinediagnostik zum Nachweis von Mykotoxinen. Mittlerweile sind eine Vielzahl solcher Tests in der Literatur beschrieben (MÄRTLBAUER, 1988; MÄRTLBAUER et al., 1988; USLEBER, 1991; BRÖSIGKE, 1999; USLEBER et al., 2008; LATIF et al., 2009).

Für TeA existiert bisher kein Enzymimmuntest – es wurden noch keine Antikörper gegen dieses Toxin hergestellt. JOHN et al. (1991) stellten mittels gemischter Anhydridmethode zwar ein O-Carboxylmethyloximderivat von TeA als Immunogen her, eine erfolgreiche Immunisierung von Versuchstieren zur Produktion von Antikörpern wurde von diesen Autoren jedoch nicht berichtet.

Da die vorliegende Arbeit über die Entwicklung eines Enzymimmuntests berichtet, soll im Folgenden noch einmal in kurzer Form auf das Prinzip immunologischer Nachweisverfahren eingegangen werden.

Das Nachweisprinzip immunologischer Nachweisverfahren beruht auf der Fähigkeit von Immunglobulinen (Antikörpern) Moleküle (Antigene) spezifisch zu erkennen und zu binden. Eine Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt mittels markierter Reaktionspartner (Antikörper oder Antigene), der Marker kann in Form eines radioaktiven Isotops (Radioimmuntests, RIA) oder, wie im Falle dieser Arbeit, eines enzymmarkierten

Antigens (Enzymimmuntest, ELISA), vorliegen (NGO und LENHOFF, 1982; EKINS, 1985; JACKSON und EKINS, 1986; NEWSOME, 1986; SMITH, 1989; WARSINKE et al., 2000).

Die mit Festphasen arbeitenden enzymimmunologischen Testverfahren (Enzymimmuntests) werden nach ENGVALL und PERLMANN (1971) als ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bezeichnet, wobei aber heute häufig der etwas allgemeinere Ausdruck EIA (Enzyme Immunoassay) verwendet wird.

Die EIA können kompetitiv (Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Antigen um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen) oder nicht-kompetitiv (Verwendung markierter Antikörper, die im Überschuss zum Antigen vorliegen) sein (EKINS, 1989). Nicht-kompetitive Verfahren finden hauptsächlich Anwendung bei Molekülen mit einer Molekülgröße von >5.000 Dalton (u.a. Bakteriennachweise mittels Sandwich-Enzymimmuntest). Kompetitive Verfahren hingegen werden bei niedermolekularen Verbindungen genutzt, z. B. für Mykotoxine (USLEBER, 1991). Kompetitive Verfahren werden in direkte und indirekte Verfahren unterteilt, wobei in Abhängigkeit verschiedener Charakteristika eine weitere Unterteilung erfolgen kann (GABALDON et al., 1999).

Beim direkten Verfahren erfolgt die Bindung einer begrenzten Zahl spezifischer Antikörper entweder unmittelbar an das Trägermaterial (meist Mikrotiterplatten) oder über einen zweiten Immunglobulin-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, double antibody solid phase, DASP). Um diese Antikörperbindungsstellen konkurrieren freies und enzymmarkiertes Antigen. Die ungebundenen Reagenzien werden nach ausreichender Inkubationszeit entfernt und Substrat hinzugegeben, wobei der Substratumsatz durch gebundenes Enzym umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen in der Probe ist. Je weniger enzymmarkiertes Antigen an die Festkörperphase gebunden ist, desto mehr freies Antigen ist in der Probe vorhanden. Die Inkubation des Antiserums (Antikörper) kann gleichzeitig (simultan) oder konsekutiv (nacheinander, durch Waschschriffe getrennt) mit freiem und mit enzymmarkiertem Antigen erfolgen, wobei letztere Anordnung den Vorteil aufweisen kann, dass störende Probenmatrixeinflüsse auf das enzymmarkierte Antigen ausgeschlossen werden und so die Testempfindlichkeit verbessert werden kann (GABALDON et al., 1999; SCHNEIDER et al., 2004).

Beim indirekten kompetitiven Enzymimmuntest wird das markierte Antigen (z.B. Antigen-Protein-Konjugat) zunächst an die Festphase (ebenfalls meist Mikrotiterplatten) gebunden. Die zu untersuchende Probe wird zusammen mit spezifischen Antikörpern inkubiert, es erfolgt ähnlich des direkten Enzymimmuntests eine Konkurrenz zwischen freiem und Festphasen-Antigen um die limitierte Anzahl freier Antikörperbindungsstellen. Nach Entfernung ungebundener Reagenzien erfolgt die Zugabe eines enzymmarkierten Sekundär-Antikörpers (gerichtet gegen Immunglobuline der entsprechenden Tierart, von der die entsprechenden Antikörper stammen). Nach einem weiteren Inkubationsschritt und nach einem erneuten Waschschrift wird Enzymsubstrat/Chromogen hinzugefügt, wobei der Substratumsatz durch gebundenes Enzym analog des direkten Testsystems wieder umgekehrt proportional zur Menge an freiem Antigen in der Probe ist. Bei den kompetitiven Enzymimmuntests kann eine Unterscheidung zwischen homologer und heterologer Testanordnung erfolgen. Bei der homologen Anordnung wird ein Hapten sowohl zur Immunisierung als auch für die Herstellung des enzymmarkierten Antigens verwendet, wohingegen bei der heterologen Anordnung für die Herstellung des enzymmarkierten Antigens entweder ein anderes (heterologes) Hapten, ein anderes Derivatisierungsreagenz (heterologe Brücke) oder eine andere Position am Molekül (heterologe Seite) zur Kopplung verwendet werden kann. Die heterologe Anordnung kann den Vorteil haben, dass sie bei geringer Affinität des Antikörpers für das heterologe, enzymmarkierte Antigen zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit des Testsystems führen kann (VAN WEEMEN und SCHUURS, 1975; MÄRTLBAUER, 1988; MÄRTLBAUER, 1993).

2.2.4 *Physikalisch-chemische Nachweisverfahren*

2.2.4.1 Chromatographische Verfahren

Chromatographische Verfahren dienen der Trennung von Stoffgemischen zur gezielten Isolierung des Analyten. Die Flüssigkeitschromatographie beruht in der Regel auf der Wechselwirkung des Analyten mit einer mobilen und einer stationären Phase. Der Transport erfolgt durch die mobile Phase. Die molekulspezifische Verzögerung und damit die Trennwirkung finden an der stationären Phase statt. Nach den verursachenden physikalisch-chemischen Effekten werden vereinfachend Adsorptions- und Verteilungschromatographie unterschieden (BÖCKER; 1997; GEY, 2008). Eine weitere übliche Einteilung geht von der Kombination der Phasenzustände (fest, flüssig, gasförmig) für die stationäre und die mobile Phase aus (BÖCKER, 1997).

2.2.4.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography, TLC) handelt es sich um ein adsorptionschromatographisches Verfahren. Es ist ein einfaches und schnelles Verfahren mit hoher Trennleistung (BÖCKER, 1997; GEY, 2008). Die stationäre Phase besteht aus einer dünnen Schicht von Kieselgel oder Aluminiumoxid, welches auf eine dünne Platte aus Aluminium, Kunststoff oder Glas aufgetragen ist. Neben diesen polaren Trägermaterialien gibt es auch solche, die mit neutralen oder apolaren „reversed-phase“ Materialien beschichtet sind. Die zu untersuchende Probe wird punktförmig am Startpunkt aufgetragen und dann die Chromatographie in einer konventionellen Trogkammer mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, durchgeführt. Durch die Kapillarwirkung des porösen Materials der stationären Phase steigt das Laufmittel (ein Lösungsmittel oder -gemisch) nach oben, transportiert die Probe mit und trennt die einzelnen Bestandteile je nach ihrer Polarität. Aus der Wanderung der getrennten Verbindungen und der Laufmittelfront ergibt sich als Quotient der Retentionsfaktor (Rf-Wert), der für gegebene Reaktionsbedingungen (annähernd) konstant ist und zur Charakterisierung der Komponenten dient:

$$R_f = \frac{\text{Wanderung der Komponente (in cm)}}{\text{Wanderung der Laufmittelfront (in cm)}}$$

Zur spezifischen Detektion von TeA wird von mehreren Autoren die Farbreaktion mit Eisenchlorid (FeCl_3) eingesetzt.

Die Dünnschichtchromatographie kann entweder als separates Analyseverfahren oder online kombiniert mit Detektionsmethoden wie Immunresonanz, NMR und Massenspektrometrie (GOCAN, 2009) konzipiert werden. Letzteres spielt für TeA jedoch derzeit keine Rolle.

SAUER et al. (1978) untersuchten Getreideextrakte mittels Dünnschichtchromatographie. Als mobile Phase verwendeten sie Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure in einem Verhältnis von 5:4:1 sowie aktivierte Brinkmann-SILG-HR-25-Platten. Sie erhielten für TeA einen Rf-Wert von 0,65 (siehe auch Tab. 7).

JANARDHANAN und HUSAIN (1983) untersuchten *Alternaria alternata*-Stämme auf deren TeA-Bildungsvermögen. Sie führten eine dünnschichtchromatographische Untersuchung von TeA mit verschiedenen Laufmitteln durch (siehe Tab. 7). Zur Anwendung kamen Kieselgelplatten – bei Besprühen mit ethanolischem FeCl_3 -Spray stellten sich die TeA-Spots orange dar. TeA zeigte keine Fluoreszenz unter UV-Licht.

LEBRUN et al. (1990) verwendeten bei ihren Untersuchungen als mobile Phase Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 9:1 und erhielten dabei Rf-Werte für TeA von 0,15 - 0,20. Bei Verwendung von Methanol und Wasser (Verhältnis 4:1) geben sie einen Rf-Wert für TeA von 0,6 an. Beim Besprühen der Kieselgelplatten mit Terbiumchlorid bildete sich ein grün-fluoreszierender Komplex.

MÜLLER und LEPOM (1992) verwendeten für den dünnschichtchromatographischen Nachweis von TeA Silufol-Folien (Kieselgel), die mit zehnprozentiger Oxalsäure in Methanol entwickelt, luftgetrocknet, und anschließend eine Stunde bei 110 °C aktiviert wurden. Die Entwicklung der DC-Folien erfolgte in einer gesättigten Kammer mit Benzol, Methanol und Eisessig (Verhältnis 90:5:5) über 12 cm. Die Auswertung erfolgte unter kurzwelligem (254 nm) UV-Licht und durch Besprühen mit einprozentiger ethanolischer FeCl_3 -Lösung. Als Bestätigungsreaktionen wurden die charakteristischen Farbreaktionen nach Besprühen mit Cer(IV)-Sulfatlösung, mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung und mit p-Anisaldehydlösung genutzt (SCHADE und KING, 1984). Der Rf-Wert lag unter diesen Bedingungen bei 0,47-0,52 (n = 124).

VIJAYALAKSHMI und RAO (1988) gaben bei Verwendung von Toluol, Ethylacetat (90%) und Ameisensäure in einem Verhältnis von 5:4:1 Rf-Werte für TeA von 0,25-0,36 an.

Tab. 7: Nachweis von TeA mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung verschiedener Fließmittel nach JANARDHAN und HUSAIN (1983), modifiziert und ergänzt*

Fließmittel	Retentions- faktor (Rf) TeA	Referenz
Toluol:Ethylacetat:Ameisensäure (5:4:1)	0,65	SAUER et al., 1978
Chloroform:Methanol (90:10)	0,40	JANARDHANAN und HUSAIN, 1983
Chloroform:Methanol (80:20)	0,63	„
Ethylacetat:Benzol (99:1)	0,21	„
Benzol:Aceton:Essigsäure (70:35:5)	0,55	„
Toluol:Ethylacetat (90%):Ameisensäure (5:4:1)	0,25-0,36	„
Benzol:Methanol:Eisessig (90:5:5)	0,25-0,36	VIJAYALAKSHMI und RAO, 1988
Chloroform:Methanol (9:1)	0,15-0,20	LEBRUN et al., 1990
Methanol:Wasser (4:1)	0,60	
Benzol:Methanol:Eisessig (90:5:5)	0,47-0,52	MÜLLER und LEPOM, 1992

* alle Verfahren basieren auf der Verwendung von Kieselgel als stationärer Phase

2.2.4.1.2 Gaschromatographie (GC) / Massenspektrometrie (MS)

Die Gaschromatographie ist ein Trennverfahren, bei dem ein Produktgemisch in einer chromatischen Säule von einer gasförmigen mobilen Phase (z.B. den Trägergasen Wasserstoff, Stickstoff oder Helium) durchströmt wird. Die stationäre Phase besteht aus einem inerten Material, das von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt (oder damit imprägniert) ist. Die Säulen sind meist Quarzkapillaren, die aus Stabilitätsgründen mit einer Schicht Polyimid überzogen sind. Diese Gasflüssigkeitschromatographie (gas liquid chromatography, GLC) wird heute überwiegend angewandt (BÖCKER, 1997). Die Gasfeststoffchromatographie (gas solid chromatography, GSC) kommt hingegen selten zum Einsatz (GEY, 2008).

Es können nur solche Substanzen mit Gaschromatographie getrennt werden, die leicht flüchtig sind oder sich bei der Betriebstemperatur der Chromatographen unzersetzt verdampfen lassen. Im Falle von TeA ist es notwendig, diesen Stoff durch Derivatisierung in eine flüchtige Verbindung umzusetzen. Es kommen dazu Derivatisierungsreagenzien wie Trimethylsilan oder Heptafluorbutyrat zum Einsatz (HARVAN und PERO, 1974; SCOTT et al., 1997). Aufgrund dieser Einschränkungen ist die Gaschromatographie heute in der Mykotoxinanalytik nur noch von untergeordneter Bedeutung, fast alle neueren Arbeiten basieren auf der High Performance-Flüssigkeitschromatographie (siehe nächstes Kapitel).

Als Detektoren werden beispielsweise Flammenionisationsdetektoren (flame ionisation detector, FID), Elektroneneinfangdetektoren (electron capture detector, ECD) oder massenspektrometrische Detektoren verwendet.

Moderne Verfahren verwenden jedoch meist die Massenspektrometrie zur Detektion. Hier werden Ionen im Hochvakuum nach dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/e) aufgetrennt. Im klassischen Magnetfeld-Sektorfeldgerät werden die zu analysierenden Komponenten in der Ionisationskammer (Ionenquelle) ionisiert und beschleunigt, danach in einem Magnetfeld (Analysator) aufgetrennt, detektiert und in einem Strichspektrum aufgezeichnet. Es gibt eine Vielzahl von Methoden der Ionisierung und ebenso viele Spektrometertypen mit entsprechenden Modifikationen wie z.B. doppelt fokussierende Massenspektrometrie oder Quadrupol-Massenspektrometrie (BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER 2005; GEY, 2008). Typische Ionisationsverfahren nach GEY (2008) sind Elektronenstoßionisation (EI),

chemische Ionisation (CI), Felddesorption (FD), Thermospray-Ionisation (TSI), Electro Spray Ionisation (ESI), Matrix assisted laser desorption/ionisation, (MALDI), Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) oder Atmospheric pressure photo ionisation (APPI).

HARVAN und PERO (1974) wiesen TeA gaschromatographisch als Trimethylsilyl (TMS)-Derivat nach. Das Derivat wurde dabei durch Erwärmen (zehn Minuten bei 50 °C) von TeA oder TeA-haltigem Probenextrakt mit N,O-bis (trimethylsilyl)acetamid, Trimethylchlorsilan und Pyridin (Verhältnis 6:2:9) hergestellt. Es wurde mit einem Gas-Chromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID) chromatographiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 µg. Diese Methode wurde auch von HARWIG et al. (1979) zum Nachweis von TeA in kontaminierten Tomaten verwendet.

SAUER et al. (1978) untersuchten Hirsekörner auf deren Gehalt an TeA mittels GC. Auch sie verwendeten das TMS-Derivat. Mittels Flammenionisation konnte eine Nachweisgrenze für TeA <1 µg/g erreicht werden.

LEBRUN et al. (1990) untersuchten die Bildung von TeA durch *Pyricularia oryzae*. Dabei wurden Filtrate der Pilzkulturen im sauren Medium ohne Derivatisierung mit Kapillar-Gaschromatographie nach der Methode von STACK et al. (1985) aufgetrennt. Sie arbeiteten bei einer Temperatur von 270 °C. Der Gaschromatograph wurde mit einem Massenspektrometer gekoppelt und bei Elektronenstoßionisation (GC-EI-MS) beziehungsweise chemischer Ionisation (GC-CI-MS) wurden die Peaks m/e 141 (M-56) bzw. m/e 198 (M + H) entdeckt. LEBRUN et al. (1990) geben keine Nachweisgrenzen für TeA an, STACK et al. (1985) einen Wert von 25 ng/g.

SCOTT et al. (1997) setzten erstmalig Heptafluorobutyrat (HFB) als Derivatisierungsreagens für die Analyse von *Alternaria*-Toxinen, einschließlich TeA, ein. Es bildete sich dabei ein tris-HFB-Derivat von TeA, das durch Umsetzung mit einer Mischung von HFB und Toluol/Acetonitril als Lösungsmittel sowie einer kleinen katalytischen Menge von 4-Dimethylaminopyridin als Katalysator gewonnen wurde. Bei der GC/MS wurde eine Kapillarsäule (Länge 10 m; Durchmesser 0,25 mm; Trägergas Helium) eingesetzt und das Massenspektrometer im EI-mode betrieben. Es wurden darüber hinaus auch die entsprechenden TMS-Derivate hergestellt. Es wurden Peaks für di- und tri-substituierte Derivate von TeA mit HFB und TMS gefunden. Nachweisgrenzen wurden nicht angegeben,

lagen aber bei Betrachtung der Spektren im Nanogramm-Bereich, da bei Einsatz dieser Mengen deutliche Peaks zu erkennen waren.

2.2.4.1.3 Flüssigkeitschromatographie (LC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der Flüssigkeitschromatographie (Liquid chromatography, LC) wird eine Probenlösung (Substanzgemisch) in eine mobile Phase eingebracht und über eine stationäre Phase (Säule) geleitet. Die „high performance liquid chromatography“, (HPLC) hat sich aus der klassischen Flüssigkeitschromatographie weiterentwickelt (EULITZ et al., 1965). Die HPLC erzielt eine höhere Trennleistung durch eine kleinere Partikelgröße der stationären Phase. Es kommen höhere Arbeitsdrücke zum Einsatz, die durch apparative Anpassungen (beispielsweise Hochdruckpumpen mit Pulsationsdämpfungen) ermöglicht werden (GEY, 2008). Für jede Substanz ergibt sich aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften, und damit verbundenen Absorptions- oder Verteilungskräften eine Elution in der für sie charakteristischen Retentionszeit. Für die Detektion der Substanzen ergeben sich eine Reihe von Möglichkeiten, u.a. die Messung der UV-Absorption und der Fluoreszenz oder die Massenspektrometrie (EULITZ et al., 1965).

In der Mykotoxinanalytik wurden in den letzten Jahren zumindest in Europa die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Gaschromatographie (GC) bei der *Alternaria*-Toxin-Analyse fast vollständig durch die Flüssigkeitschromatographie ersetzt (SCOTT, 2001). Die LC wurde darüber hinaus fast vollständig durch die HPLC verdrängt (SCOTT et al., 1997). In der Regel werden als stationäre Phase heute Umkehrphasen (RP) verwendet, häufig C18-Material.

SCOTT und KANHERE (1980) untersuchten TeA in Tomatenpaste mit HPLC und UV-Detektion bei 280 nm, dem für den Nachweis von TeA mittels UV-Absorption am besten geeigneten Wellenlängenbereich (SCOTT, 2001). Eine Detektion mittels eines Fluoreszenz-Verfahrens ist nicht durchführbar, da TeA keine Fluoreszenz aufweist (SCOTT, 2001). Sie setzten eine spezielle reverse phase (RP)-HPLC-Säule ein und setzten der mobilen Phase u.a. Zink-Acetat zu. Der Zusatz von Metallionen zur Verbesserung der Chromatographierfähigkeit ist bereits vorher beschrieben worden (COOKE et al., 1978). SCOTT (2001) konstatierte,

dass es für den Nachweis von TeA vorteilhaft sei, der mobilen Phase Zinkionen zuzusetzen. Ohne diese Maßnahme bleibt das Molekül bei Reverse-Phase-Systemen an aktiven Stellen des Säulenmaterials haften (SCOTT, 2001). Bei Einsatz dieses Verfahrens wurde TeA in Tomatenprodukten mit einer Nachweisgrenze von 0,01-0,1 µg/g Probe nachgewiesen. Die HPLC-Ergebnisse wurden mit Gas-Chromatographie/SIM (Single Ion MS) bestätigt. Dazu wurde TeA nach der Methode von HARVAN und PERO (1974) derivatisiert. Es wurde das Trimethylsilyl-Derivat von TeA (MG 413,2) gebildet. Die geschätzte Nachweisgrenze lag bei <6 ng/g.

LEBRUN (1989) wendete verschiedene Methoden (Ionenpaar, Anionenaustausch, Ligandenaustausch) der HPLC auf TeA und verschiedene 3-Acetyl-5-substituierte Pyrrolidin-2,4-Dione an. Das Ziel dieser Arbeit war die Trennung dieser Substanzen, nicht aber die Untersuchung von mit TeA kontaminiertem Probenmaterial. Es gelang, TeA und das Diastereomer d-allo-TeA zu trennen. SHEPHARD et al. (1991) verwendeten ein RP-HPLC-System mit einer C18-Säule und einem Dioden-Array-UV-Detektor (DAD). Auch ihnen gelang die Trennung von TeA und d-allo-TeA. Sie gaben eine Nachweisgrenze von 0,4 ng an.

MÜLLER und LEPOM (1992) verwendeten bei ihren Untersuchungen als stationäre Phase Hypersil ODS (5 µm) und als mobile Phase Methanol + Wasser (80 + 20 bzw. 65 + 35) + 300 mg Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ Wasser (H}_2\text{O)}$). Als Detektoren verwendeten sie UV-Vis (280 nm bzw. 235 nm). Diese Methode wurde von STACK et al. (1985) für den Nachweis von TeA in Tomatenproben verwendet. Es trat immer ein Signal auf, das sich nicht von TeA trennen ließ. Die Autoren diskutierten, dass es sich dabei möglicherweise um ein Isomer von TeA handeln könnte.

WEBLEY et al. (1997) untersuchten australisches Getreide auf dessen Mykotoxingehalt. Sie verwendeten eine RP-HPLC mit UV-DAD, als mobile Phase setzten sie Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 85:15 unter Zugabe von 300 mg/l ZnSO_4 ein. Sie verwendeten zur Messung einen Wellenlängenbereich von 280 nm. Es ergab sich eine Wiederfindungsrate von 78% und eine Nachweisgrenze von 10 µg/kg. Mit derselben Methode untersuchten LI und YOSHIZAWA (2000) Weizen und gaben eine Wiederfindungsrate von 71% und eine Nachweisgrenze von 100 µg/kg an.

SOLFRIZZO et al. (2004) untersuchten Karotten auf ihren *Alternaria*-Toxingehalt mittels RP-HPLC und UV-DAD-Detektion. Sie benutzten zur Trennung isokratische Gemische aus Acetonitril-Natriumdihydrogenphosphat-Lösung und erhielten eine Wiederfindungsrate für TeA von 69% mit einer Nachweisgrenze von 0,02 mg/kg.

PATRIARCA et al. (2007) untersuchten das Auftreten der *Alternaria*-Toxine AOH, AME und TeA in argentinischem Weizen mittels HPLC-DAD. Als mobile Phase verwendeten sie Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 80:20 mit Zusatz von 300 mg/l ZnSO₄. Auch DA MOTTA und VALENTE SOARES (2000) gaben – wie bereits erwähnt – Zinksulfat zur Verbesserung der Chromatographierbarkeit hinzu und erreichten eine Nachweisgrenze bei Tomatenprodukten von 11 ng/g.

SIEGEL et al. (2009) beschrieben eine neue Methode für die Bestimmung von TeA in Getreide. Die Proben wurden mit HPLC-MS nach vorheriger Derivatisierung mit DNHP (2,4 - Dinitro-Phenyl-Hydrazin) untersucht. DNHP wird in der LC-MS als Derivatisierungsreagenz verwendet, um die Trennung von Carbonylkomponenten zu verbessern, ohne dafür mit Zinkionenzusatz arbeiten zu müssen. TeA reagierte mit der Keto-Gruppe der Acetyl-Seitenkette zu dem entsprechenden TeA-Hydrason. Die Nachweisgrenze wurde mit 10 µg/kg angegeben. Mit derselben Methode der vorherigen Derivatisierung untersuchten SIEGEL et al. (2010) auch das Auftreten von TeA in verschiedenen Bieren. Die Nachweisgrenze gaben sie mit 2 µg/kg an.

NOSER et al. (2011) beschrieben eine HPLC-MS/MS für den Nachweis mehrerer *Alternaria*-Toxine sowie deren Auftreten in Tomaten und Tomatenprodukten aus der Schweiz. Für TeA gaben sie eine Nachweisgrenze von 2 µg/kg an.

ASAM et al. (2011) wendeten eine HPLC-MS/MS unter Einsatz isotoopenmarkierter Substanzen (Stable Isotope Dilution Assay, SIDA) als internem Standard an. Dabei wird eine definierte Menge der markierten Substanz der zu untersuchenden Probe zugesetzt. Das Massenverhältnis bleibt bei allen analytischen Prozeduren unverändert, da Analyt und Standard die gleichen Eigenschaften haben. In der MS ergeben sich zwei Peaks und aus dem Verhältnis der Intensitäten wird der Gehalt der Probe ermittelt. Als interner Standard wurde [¹³C₆-N¹⁵]-TeA eingesetzt. Die Nachweisgrenze gaben sie mit 0,1 µg/kg an.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND GERÄTE

3.1.1 *Chemikalien und Biochemika*

Aceton	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.15500)
Bernsteinsäureanhydrid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, 239690)
Bovines Serumalbumin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, A0281-250)
Casein, Natriumsalz	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, C8654)
Destilliertes Wasser	(Membra Pure)
4-(Dimethylamino)-pyridin	(Merck KGaA, 8.20499)
Dimethylformamid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, D8654)
Ethylacetat	(Merck KGaA, 1.09623)
Essigsäure 96%	(Merck KGaA, 1.00062.1000)
Essigsäure 100%	(Merck KGaA, 1.00056.2500)
Formaldehyd mind. 37%	(Merck KGaA, 1.04003.1000)
Freund'sches Adjuvans, komplett	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, F-5881)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	(Calbiochem-Novobiobiochem Corporation, 37485)
Meerrettichperoxidase (HRP)	(Roche Diagnostics, 92392525)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumborhydrid	(Aldrich, 21, 346-2)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.006404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
Natrium-meta-Perjodat (PJ)	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, S-1878)
N-Hydroxy-Succinimid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, H-7377)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	(Aldrich, D8, 000-2)
Pyridin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, P-3776)
Ringerlösung	(Oxoid BR 0052 G/101059-001)
Schwefelsäure	(Merck, KgaA, 1.00729)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, T-2885)
Tween [®] 20	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, P1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KgaA, 1.07209)
Xylol	(Merck KgaA, 1.08681)

Alle verwendeten Reagenzien lagen mindestens in der Reinheitsstufe p.a. vor.

3.1.2 Mykotoxine

TeA (Kupfersalz)	(Sigma Chemie GmbH, T3408)
TeA (Reinform)	(Alexis biochemicals, Alx-350-317-MC05)

3.1.3 Immunreagenzien

Anti-Kaninchen-IgG	(Sigma Aldrich GmbH, R2004)
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	(Dako, P0217)

3.1.4 Puffer und Lösungen

5% Acetonitril-PBS-Lösung: 50 ml Acetonitril/l PBS

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer: pH 9,6

1% Casein-PBS-Lösung: 10 g Natriumcaseinat/l PBS

2% Casein-PBS-Lösung: 20 g Natriumcaseinat/l PBS

Enzymsubstrat-/ Chromogenlösung für Meerrettichperoxidase (nach GALLATI und PRACHT, 1985): 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂- Zusatz und 1 Teil Tetramethylbenzidin- Lösung

Tetramethylbenzidinlösung: 1mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in einem Teil Aceton und 9 Teilen Methanol)

1mmol/l Natriumacetatpuffer: pH 4,4

1mol/l Schwefelsäure:

Waschlösung: 0,15mol/l Natriumchlorid mit Zusatz von 0,025% Tween[®] 20

Zur Durchführung der Enzymimmuntests wurden

- die Toxin-Lösungen in PBS mit 10% Methanolzusatz, respektive in PBS mit 5% Acetonitrilzusatz,
- die Toxin-Enzymkonjugat-Lösungen in PBS,
- die Anti-Kaninchen-IgG Peroxidase- Lösungen in 1% Casein/PBS und
- die Anti-Toxin-Serumverdünnungen in PBS

hergestellt.

Für den indirekten kompetitiven Enzymimmuntest wurde das Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat der Firma Dako in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

3.1.5 *Geräte und sonstige Materialien*

3.1.5.1 Hard- und Software

Computer	(Acer AL718)
Datenverarbeitungssoftware Magellan V 6.6	(Tecan Austria GmbH)
Datenverarbeitungssoftware RIDAWIN	(r-Biopharm, Darmstadt)

3.1.5.2 Photometer

Photometer UV-1601	(Shimadzu)
ELISA-Auro Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)

3.1.5.3 Enzymimmuntests

Mikrotiterplatten Nunc Immuno Plate 439454	(Nunc GmbH)
Mikrotiterplattentaumlergerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Variable 12-Kanalpipette 10-100 µl	(Eppendorf AG)
Variable 12-Kanalpipette 50-300 µl	(Finipette Labsystems)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl	(Eppendorf AG)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1.5.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Vorsäule:	Lichrospher RP 18 (5µm) 4x4mm	(Merck KgaA, 150957)
Säule:	Lichrospher RP 18 (5µm) 125x4 mm	(Merck KgaA, 150943)
Pumpenserie P 580		(DIONEX GmbH)
Probengeber Modell ASI 100/ASI 100 T		(DIONEX GmbH)
Photodiode PDA 100 Array detector		(DIONEX GmbH)
Fluoreszenzdetektor RF 2000		(DIONEX GmbH)
Säulenthermostat STH 583		(DIONEY GmbH)
Fraktionskollektor 202		(Gilson SAS)
Fraktionscontroller 201-202		(Gilson SAS)

3.1.5.5 Mykologische Untersuchung

Hefeextrakt-Glucose-Bouillon	Caseinpepton, pankreat. 10 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid 5 g Glucose Monohydrat 5 g
Malzextrakt-Agar	(Oxoid CM0059)
Binokulares Mikroskop Axioplan	(Zeiss)
Immersionsöl	(VWR 1.04699.0500)
Objektträger	(Carl Roth Aer.-Nr.H869)
Fotoapparat	(Olympus Camedia C-730 Ultra Zoom)

3.1.5.6 Sonstiges

Dialysierungsschläuche	(SERVA Electrophoresis GmbH)
Mehrstellenrührgerät	(IKA [®] Werke GmbH& Co. KG)
pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW-Elektrode	(WTW GmbH)
Sartorius Waage Basic plus	(Sartorius AG)
Sartorius Waage Master Pro LA	(Sartorius AG)

Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Laborota 4003)
Zentrifuge Kendro Multifuge 3S-R	(Heraeus Christ GmbH)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus Christ GmbH)

3.1.6 Probenmaterialien

3.1.6.1 Lebensmittel

Alle untersuchten Lebensmittel wurden im Zeitraum von 2009-2010 in Geschäften im Raum Gießen gekauft. Bei den Bezugsquellen wurden sowohl Supermärkte als auch Reformhäuser und Naturkostläden miteinbezogen. Die Verteilung der Proben auf verschiedene Waren-Gruppen ist in Tab. 8 zusammengestellt.

3.1.6.2 Pilzkulturen

Die folgenden Schimmelpilzkulturen wurden im Rahmen der Arbeit eingesetzt.

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus candidus*
- *Alternaria* spp.
- *Pencillium roqueforti*

Alle Kulturen stammten aus der Stammsammlung der Professur für Milchwissenschaften.

Tab. 8: Produktgruppen und Anzahl der Proben (n = 50)

Probenart	n	ADV-Code
Apfelsaft	7	001 310601
Tomatensaft	15	001 262601
Tomatenketchup	18	001 520101
Tomatenmark	10	001 26117 (einfach konzentriert), 001 26103 (zweifach konzentriert), 001 26104 (dreifach konzentriert)
Tomaten	7	001 250301

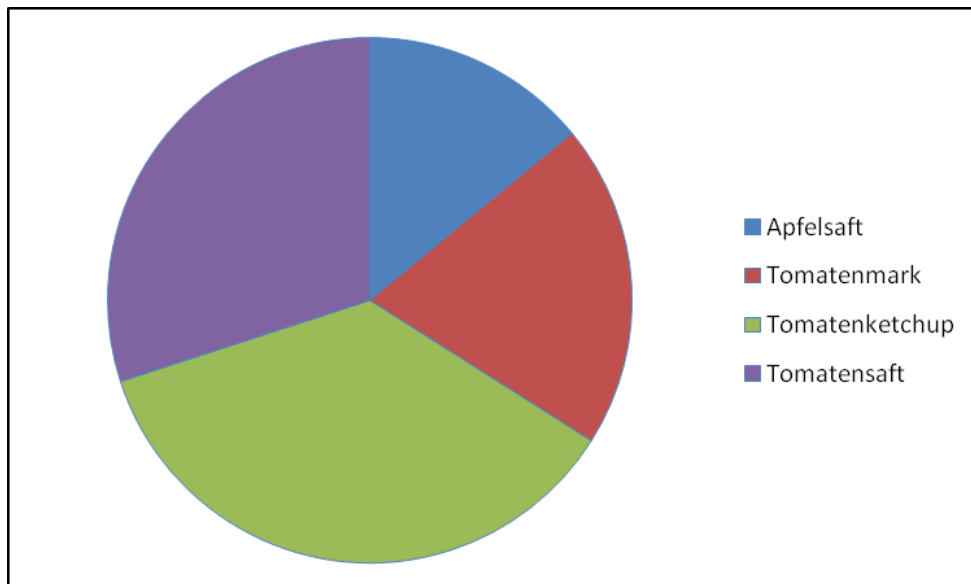


Abb. 4: Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtzahl der untersuchten Lebensmittelproben.

3.2 METHODIK

3.2.1 *Überprüfung des TeA-Standardmaterials*

TeA-Kupfersalz (Sigma) wurde in 2,5 ml Methanol gelöst, wodurch sich eine nominelle Konzentration an reiner TeA von 3,46 mg/ml ergab. Aus diesem Konzentrat wurden 11,56 µl in 4 ml Methanol verdünnt, um eine TeA-Stammlösung mit einem Gehalt von 10 µg/ml zu erhalten. Die zweite Toxinstandard-Präparation in Form eines rötlich-bräunlichen Öls vorliegende TeA (0,5 mg, Alexis) wurde in 1 ml Acetonitril gelöst (500 µg/ml). Hieraus wurde eine Arbeitsstandardlösung mit einem TeA-Gehalt von 10 µg/ml (Acetonitril) hergestellt.

Die Überprüfung der Standardlösung erfolgte spektrophotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm gemäß entsprechenden Angaben aus der Literatur (STICKINGS, 1959; STICKINGS und TOWNSEND, 1961; MERONUCK et al., 1972). Danach schloss sich eine Überprüfung von TeA mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an. Für die DC wurden mit Fluoreszenzindikator (F 254 nm) beschichtete Kieselgel-60-Platten verwendet. Als Fließmittel wurden Chloroform und Methanol (Verhältnis 90:10) und Chloroform und Methanol (Verhältnis 90:10) mit Zusatz von einem Milliliter Essigsäure verwendet. Die Analyse mittels HPLC erfolgte unter Verwendung von Methanol und A. dest. (+500 mg Zinksulfatmonohydrat/l) in einem Verhältnis von 70 zu 30 als Laufmittel und einer Merck Lichrospher 100, RP-18, 5 µm, 125-4 Säule mit entsprechender Vorsäule. Der Zusatz von Zinkionen kam bereits bei mehreren Autoren zur Anwendung (SCOTT und KANHERE, 1980; COOKE et al., 1978; MÜLLER und LEPOM, 1992; WEBLEY et al., 1997; LI und YOSHIKAWA., 2000). Die Säulentemperatur betrug 25 °C, der Druck 350 bar und die Flussrate 1 ml/min.

3.2.2 *Herstellung der Immunreagenzien*

3.2.2.1 Kopplungsmethoden

TeA ist aufgrund des niedrigen Molekulargewichts (197,2) *per se* nicht immunogen (Hapten), so dass sie zur Immunogenherstellung an Trägermoleküle mit ausreichender Größe (keyhole limpet hemocyanin, KLH; bovines Serumalbumin, BSA) zu koppeln ist. So gebunden können Haptene als antigene Determinanten (Epitope) fungieren und hierdurch die Bildung spezifischer Antikörper induzieren. Die Methoden der Herstellung der Mykotoxin-Makromolekül-Konjugate entstammen ursprünglich aus der Peptidsynthese, bei der die Kopplung des Haptens an das Trägermolekül durch ein homo- oder heterofunktionales Reagenz vermittelt wird (ERLANGER, 1980; PESTKA, 1989; USLEBER, 1991).

Für die Durchführung direkter kompetitiver Enzymimmuntests wurden enzymmarkierte Antigene hergestellt, hierzu wurde TeA an Meerettichperoxidase (HRP) gekoppelt.

Zur Etablierung kompetitiver indirekter Testverfahren wurde ein Festphasenantigen aus dem entsprechenden Zieltoxin (TeA) und einem Trägerprotein (BSA) synthetisiert.

Die in diesem Falle verwendeten Kopplungsmethoden werden im Folgenden näher beschrieben.

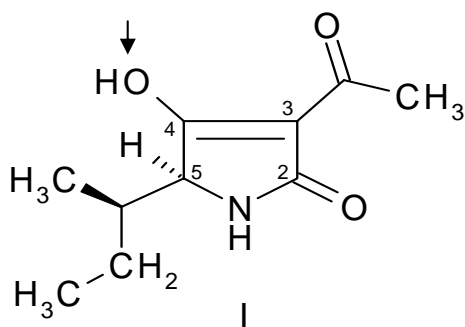


Abb. 5: Strukturformel von TeA (die zur Derivatisierung mit Bernsteinsäureanhydrid sowie zur direkten Kopplung mittels Formaldehyd-Kopplung verwendete Hydroxylgruppe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet).

3.2.2.1.1 Kopplung mittels aktiver Estermethode

Die Kopplung mittels aktiver Estermethode fand an die Proteine Bovines Serumalbumin (BSA), Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) sowie an das Enzym Meerettichperoxidase (HRP) statt. Der Einsatz natürlicher Proteine erscheint eine günstigere Auswirkung auf die Immunogensynthese zu haben als die Verwendung künstlich synthetisierter Polypeptide (JAFFE et al., 1970; WALKER et al., 1973).

Da diese Methode eine freie Carboxylfunktion im Hapten erfordert, musste zunächst eine selektive Derivatisierung von TeA an der OH-Position mit Bernsteinsäureanhydrid (Abb.6) durchgeführt werden. Die eigentliche Kopplung an das Protein, respektive die Peroxidase, erfolgt mittels aktiver Estermethode (ANDERSON et al., 1964; KITAGAWA et al., 1981). Diese Methode wurde bereits zur Herstellung von Roridin A-, Deoxynivalenol- und Mycophenolsäure-Protein-Konjugaten angewandt (MÄRTLBAUER et al., 1988; USLEBER, 1991; USLEBER et al., 2008).

Zur Derivatisierung von TeA zu TeA-Hemisuccinat wurden 870 µl einer TeA-Stammlösung (3,46 mg/ml) unter Stickstoff abgedampft. Das Toxin wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (30 mg), welches in Pyridin (500 µl) gelöst wurde, drei Stunden bei 97 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abdampfen des Pyridins unter Stickstoff wurde der Rückstand mit 1 ml Ethylacetat gelöst. Nach Zugabe von 2 ml 0,01 mol/l HCL und gründlichem Mischen (Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie) wurde die entstehende Phasentrennung abgewartet. Der Überstand (organische Phase) wurde entfernt und dann nochmals 1 ml Ethylacetat hinzugegeben. Daraufhin wurde das Ethylacetat unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit 1 ml Methanol gelöst.

Es folgte die Herstellung des Aktivesters, in dem TeA-Hemisuccinat, N-Hydroxy-Succinimid und Dicyclohexylcarbodiimid in einem molaren Verhältnis von 1:10:20 eingesetzt wurden. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt rührend inkubiert. Daraufhin folgte die Kopplung an HRP in einem molaren Verhältnis von TeA zu HRP von 10:1, TeA zu BSA von 20:1 und TeA zu KLH von 300:1. Dazu wurden im Falle des TeA-HRP 20,5 mg HRP in 1,7 ml 0,1 mol/l NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonatlösung, pH-Wert 8,4) gelöst. Die Zugabe von TeA-Hemisuccinat-Aktivester (300 µl) zu der HRP-Lösung erfolgte langsam und tropfenweise, anschließend rührte der Ansatz 1-2 Stunden auf dem

Magnetrührer. Für KLH wurden 51,3 mg in 1,7 ml 0,1 mol/l NaHCO₃ (pH-Wert 8,4) gelöst und TeA-HS-AE (300 µl) langsam zugetropft. Im Falle des BSA wurden 11,28 mg/ml BSA in 1,6 ml NaHCO₃ gelöst und 200 µl TeA-HS-AE hinzugegeben. Daraufhin wurde der Kopplungsansatz je dreimal mindestens sechs Stunden gegen 5 l PBS (pH-Wert 7,2) bei 4 °C dialysiert. Dieselbe Vorgehensweise wurde auch für die Kopplung an BSA und KLH verwendet. Der schematische Reaktionsablauf bei der aktiven Estermethode ist Abb. 6 zu entnehmen.

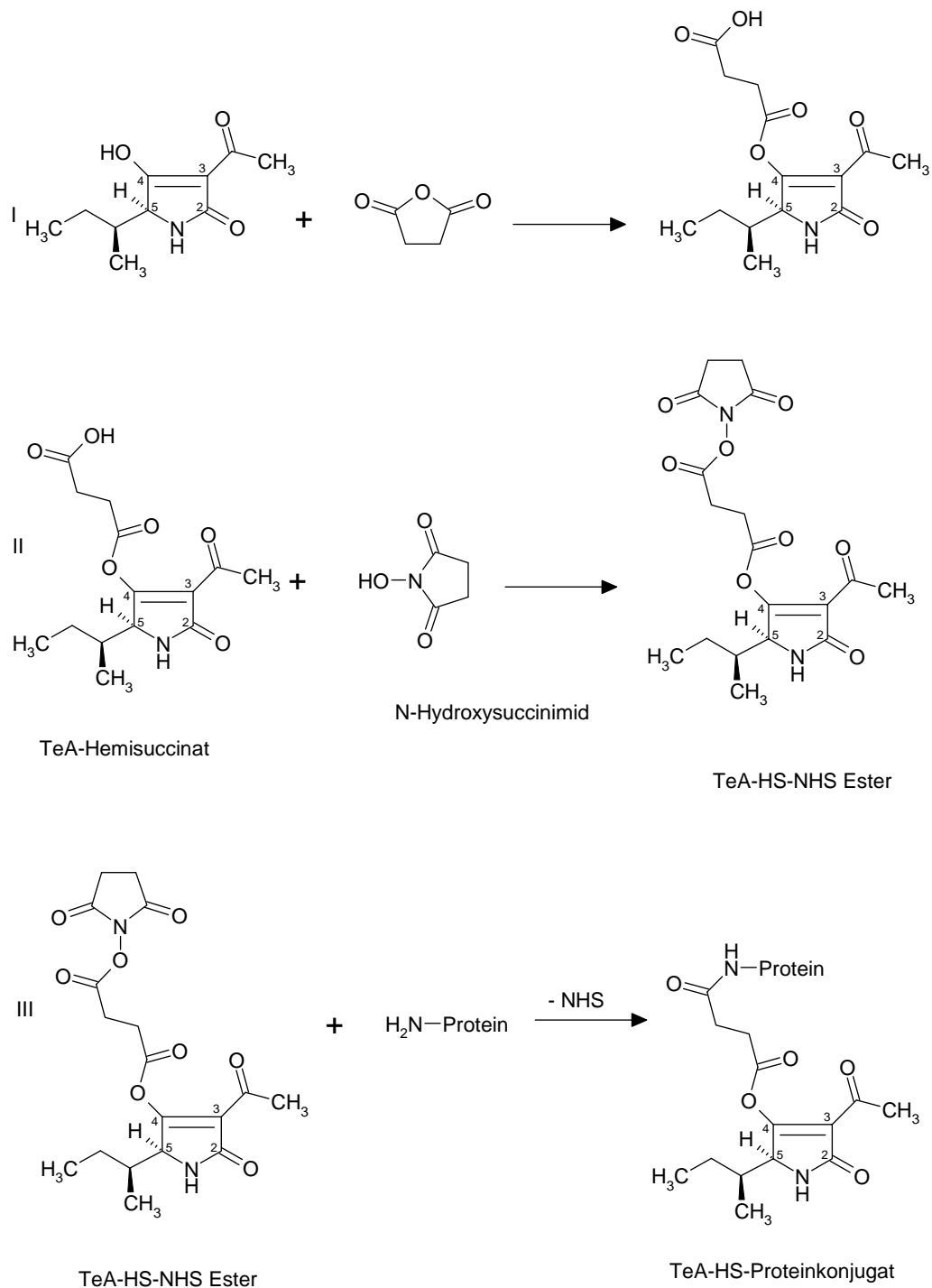


Abb. 6: Schematische Darstellung der Derivatisierung von TeA mit Bernsteinsäureanhydrid und Kopplung von TeA-HS an den Proteinträger mittels aktiver Estermethode. Im 1. Schritt (I) wird TeA mit Bernsteinsäureanhydrid zum Hemisuccinat. Im 2. Schritt (II) wird unter Einsatz von NHS aus TeA-HS ein aktiver Ester hergestellt. Dieses Intermediärprodukt reagiert nach Zugabe des Proteins (III) unter Ausbildung einer kovalenten Amidbindung.

3.2.2.1.2 Kopplung von TeA an BSA und KLH mittels Mannich-Kondensation

Als Kopplungsreagenz der Mannich-Reaktion dient Formaldehyd (MANNICH und KRÖSCHE, 1912). Mit dieser Methode waren für andere Mykotoxine (Citrinin, Fumigaclavin A) gute Erfahrungen gemacht worden (ABRAMSON et al., 1995; LATIF et al., 2009). Bei dieser Methode erfolgt die Kopplung über eine Methylenbrückenbindung an freie Aminogruppen des Trägerproteins. In der vorliegenden Arbeit wurde Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) verwendet. Als Beschichtungsantigen für den indirekten kompetitiven Enzymimmuntest erfolgte die Bindung von TeA an bovines Serumalbumin nach derselben Methode wie das Keyhole Limpet Hemocyanin (Abb. 7).

3.2.2.1.2.1 Kopplung von TeA an Keyhole Limpet Hemocyanin (TeA-KLH)

Zur Herstellung von TeA-KLH wurden 1 mg TeA (gelöst in Methanol) und 15 mg KLH (gelöst in 1,5 ml Natriumacetatpuffer, 0,1 mol/l, pH-Wert 4,2) gemischt. Nach Zugabe von 300 µl Formaldehyd (37%ig) rührte die Lösung lichtgeschützt sechs Stunden bei Raumtemperatur. Um eine Abtrennung nichtgebundener, niedermolekularer Bestandteile zu ermöglichen, wurde das Kopplungsprodukt gegen Phosphatpuffer (PBS, 0,01 mol/l mit 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH-Wert 7,3; ca. 30 Stunden bei 6-8 °C, 3 x 5 l) dialysiert und anschließend bei -18 °C gelagert.

3.2.2.1.2.2 Herstellung eines TeA-bovines Serumalbumin-Konjugates (TeA-BSA)

Parallel zu dem in 3.2.2.1.2.1 beschriebenen TeA-Keyhole Limpet Hemocyanin wurde TeA auch an bovines Serumalbumin gekoppelt. Hierzu wurden 1 mg TeA (gelöst in Methanol) und 3,35 mg BSA (gelöst in 1,5 ml Natriumacetatpuffer, 0,01 mol/l, pH-Wert 4,2) gemischt. Nach Zugabe von 300 µl Formaldehydlösung (37%ig) rührte der Ansatz sechs Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend folgte eine Dialyse gegen PBS ca. 30 Stunden bei 6-8 °C, 3 x 5 l.

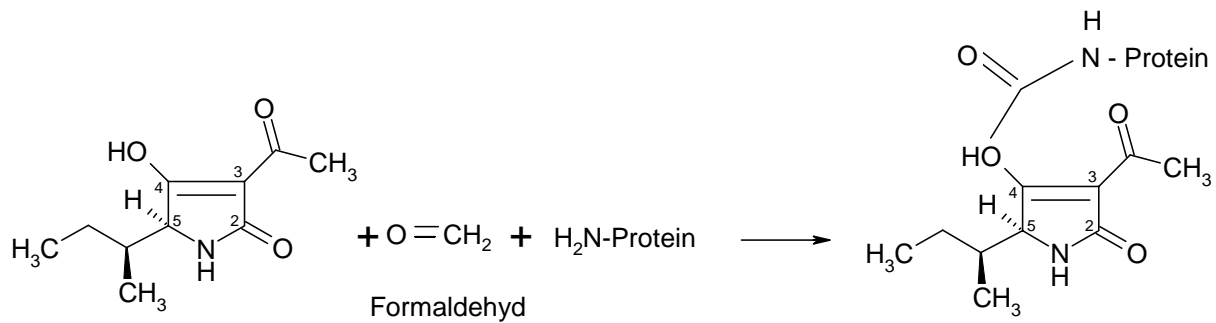


Abb. 7: Schematische Darstellung der Kopplung von TeA an einen Proteinträger mittels Mannich-Kondensationsreaktion.

3.2.2.1.3 Kopplung mittels reduktiver Alkylierung unter Verwendung von Natriumperjodat (PJ)

Bei dieser Kopplung wurde TeA in einer zweistufigen reduktiven Alkylierung unter Verwendung von Perjodat („Natriumperjodatmethode“, WILSON und NAKANE, 1976) an das Glykoprotein HRP gekoppelt. Dabei oxidiert Natriumperjodat die Kohlenhydratanteile der HRP, wodurch die dabei generierten freien Aldehydgruppen zunächst unter Bildung einer Schiff'schen Base mit der Aminogruppe der TeA reagieren. Durch die sich anschließende Reaktion mit Natriumborhydrid werden diese zu stabilen Aminen reduziert. Zur Durchführung der Reaktion wurden 4 mg HRP in 1 ml A. dest. gelöst. Dazu wurden 0,02 ml frisch angesetzte Natrium-meta-Perjodatlösung (c = 0,1 mol) gegeben, woraufhin ein Farbumschlag von rotbraun nach grün erfolgte. An eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich eine zweimalige zwölfstündige Dialyse gegen Natriumacetatpuffer (c = 1 mmol/l) bei 4 °C an. Zur aktivierten HRP-Lösung wurde 1 ml einer wässrigen TeA-Lösung (100 µl 3,46 mg/ml TeA in Methanol + 900 µl Bicarbonatpuffer, pH-Wert 9,85) gegeben und dann eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 0,1 ml einer frisch angesetzten Natriumborhydridlösung (4 mg/ml A. dest.) zum Ansatz gegeben und dieser dann 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Kopplungsprodukt (TeA-PJ-HRP) 24 Stunden gegen 6 l Phosphatpuffer (pH-Wert 7,39) dialysiert, portioniert und bei -18 °C gelagert.

3.2.2.1.4 Charakterisierung der hergestellten TeA-Konjugate

Eine qualitative Überprüfung des Kopplungserfolgs der hergestellten TeA-Protein (bzw. HRP)-Konjugate erfolgte mittels Messung deren UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm. Diese wurden verglichen mit den jeweiligen Spektren von TeA bzw. denen der nicht-konjugierten Proteine in äquimolarer Konzentration.

Die Überprüfung des Derivatisierungserfolgs von TeA zu TeA-Hemisuccinat erfolgte darüber hinaus chromatographisch zusammen mit dem von TeA. Dazu wurden mit Fluoreszenzindikator (F_{254 nm}) beschichtete Kieselgel-60-Platten verwendet. Das verwendete Fließmittel war Chloroform und Methanol (90:10) und Chloroform und Methanol (90:10) unter Zusatz von 1 ml Essigsäure.

Die hergestellten Konjugate wurden portioniert und bei -18 °C gelagert.

3.2.3 *Gewinnung spezifischer Anti-TeA-Antiseren*

Die durchgeführten Immunisierungen waren unter der Kenn-Nr. 265 (Az: V54-19c20/15c GI 18/5) von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) genehmigt worden.

3.2.3.1 Immunisierung

Es wurden insgesamt neun weibliche Kaninchen nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975) immunisiert. Bei acht Versuchstieren handelte es sich um Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Charles River, Kißlegg) und ein Tier war ein Dt. Riese/Holländer-Kaninchen (Fa Bauer, Neuenstein). Das Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Immunisierung ca. 2 kg.

Die Grundimmunisierung erfolgte jeweils mit 0,5-1 mg TeA-Proteinkonjugat in 0,5 ml PBS, emulgiert mit je 1,5 ml komplettem Freundschens Adjuvans, intracutan nach NIESCHLAG et al., (1975). Restimulierungen erfolgten zu den in Tab. 9 angegebenen Zeitpunkten mit der gleichen Immunogenzusammensetzung (intramuskulär).

Die Immunisierung erfolgte bei vier Kaninchen mit TeA-HS-KLH, bei drei Kaninchen mit TeA-KLH (Formaldehyd) und bei zwei Kaninchen mit TeA-HS-BSA. Ein Immunisierungsschema ist in Tab. 9 dargestellt.

Die Tiere wurden entsprechend der Versuchsreihenfolge mit den Nummern K1 bis K9 bezeichnet.

Tab. 9: Immunisierungsschema zur Gewinnung von Anti-TeA-Antisera

Tier (Nr.)	Toxin-Protein-Konjugat (Kopplungsmethode)	Zeitpunkte der i.m. Restimulierung (Woche nach Grundimmunisierung)
1	TeA-HS-KLH (aktive Estermethode)	10., 23.
2	TeA-HS-KLH (aktive Estermethode)	10., 17., 23.
3	TeA-HS-KLH (aktive Estermethode)	10., 17.
4, 5, 6	TeA-KLH (Mannich-Kondensation)	8., 17.
7, 9	TeA-HS-BSA (aktive Estermethode)	12., 17.
8	TeA-HS-KLH (aktive Estermethode)	12., 17.

3.2.3.2 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme begann ab der vierten Woche nach Grundimmunisierung der Tiere und erfolgte in ca. 2-wöchigem Abstand. Das Blut wurde aus der *Arteria auricularis rostralis* entnommen und das Serum mittels dreimaligen Zentrifugierens (15 Minuten bei 3000 U/min) gewonnen und nicht weiter aufgearbeitet. Das Serum wurde anschließend portioniert und bei -18 °C gelagert.

3.2.3.3 Kontrolle des Immunisierungsverlaufs

Der Verlauf der Serumtiter wurde bei den Kaninchen K1 bis K3 (Immunogen TeA-HS-KLH) sowie K7 bis K9 (Immunogen TeA-HS-BSA bei K 7 und K 9, TeA-HS-KLH bei K 8) mittels eines direkten, bei den Kaninchen K4 bis K6 mittels eines indirekten enzymimmunologischen Testverfahrens (Enzymimmuntest, ELISA) überprüft.

Im Falle des direkten Enzymimmuntests erfolgte die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) mit anschließender Inkubation über 24 Stunden bei Raumtemperatur beziehungsweise über 48 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach Ausschlagen der Platten wurde die Platte mit 2% Casein/PBS abgesättigt (200 µl/Kavität, 30 min). Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen der Mikrotiterplatten wurden die zu überprüfenden Antiseren in Serienverdünnungen (mindestens 1:100 in PBS verdünnt, dann jeweils sieben weitere 1:3-Verdünnungen) aufgetragen. Pipettiert wurde immer mindestens im Doppelansatz (50 µl/ Kavität). Auf das Antiserum wurde dann direkt das TeA-HS-HRP-Konjugat gegeben (50 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation im Taumler erfolgte eine mehrmalige Waschung der Platten mit anschließender Trocknung. Daraufhin wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung auf die Platte gegeben (100 µl/Kavität) und die Reaktion nach 20 Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) abgestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die gleiche Versuchsanordnung wurde für K 7 bis K 9 gewählt.

Bei den mit TeA-KLH (Mannich-Kondensation) immunisierten Kaninchen K4-K6 erfolgte die Überprüfung des Verlaufs der Serumtiter mittels eines indirekten Enzymimmuntests (ELISA/EIA). Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit TeA-BSA (Formaldehyd) in Bicarbonatpuffer 1:1.000 verwendet (100 µl/Kavität). Nach Lagerung der Platten in einem feuchten Behältnis bei Raumtemperatur für 24 Stunden wurden diese ausgeschlagen und mit 2%igem Casein/PBS abgesättigt (200 µl/Kavität, 30 Minuten). Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung und Ausschlagen wurden sie mit den zu testenden Antiseren versehen, in Serienverdünnungen (mindestens 1:100 in PBS verdünnt, dann jeweils sieben weitere 1:3 - Verdünnungen). Nach einstündigem Inkubieren im Taumlergerät und anschließendem Waschen und Ausschlagen wurde Enzymkonjugatlösung (Schwein Anti-Kaninchen-IgG HRP, 1:1.000, 100 µl/Kavität) auf die Platte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation und erneutem dreimaligen Waschen wurde die Platte mit Enzymsubstrat-Chromogenlösung versehen (100 µl/Kavität). Ein Abstoppen der Farbreaktion erfolgte nach 15 Minuten durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität), mit anschließender Messung der Extinktion bei 450 nm. Als Titer wurde die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab.

3.2.3.4 Auswahl geeigneter Antiseren durch parallele kompetitive Titration (Hemmtitration)

Um eine Aussagekraft bezüglich der Eigenschaften der Immunseren treffen zu können, wurde ein modifizierter direkter Enzymimmuntest (im Falle von K1-K3 sowie K7-K9) und ein modifizierter indirekter Enzymimmuntest (im Falle von K4-K6) durchgeführt. Die Nutzung eines solchen Testaufbaus ermöglicht die Betrachtung der einzelnen Komponenten zueinander, v.a. Variationen bezüglich Konzentrationen – wodurch die Festlegung der optimalen Antiserum-Konjugat-Kombination, die letztendlich die eingesetzten Konzentrationen bedingt, festgelegt werden kann. Darüber hinaus wurden die Extinktionswerte dieser Kombinationen noch mit und ohne Antigenzusatz vergleichend ermittelt.

Für den kompetitiven direkten Enzymimmuntest wurden Mikrotiterplatten mit Anti-Kaninchen-IgG (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität) beschichtet und anschließend über 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

inkubiert. Nach Absättigen der Platten mit 2% Casein/PBS (200 μ l/Kavität) und einer halbstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Waschschrift. Daraufhin wurden die Antiseren der Kaninchen K1-K3 1:100 in PBS verdünnt (zu einem späteren Zeitpunkt der Antiserum-Untersuchung 1:1.000 verdünnt), auf der Platte 1:2 weiterverdünnt und in die Kavitäten pipettiert (35 μ l/Kavität). Auf eine (positive) Hälfte der Platte wurde TeA-Stammlösung (10 μ g/ml, verdünnt in 10% MeOH/PBS, 35 μ l/Kavität), auf die andere (negative) Hälfte der Platte 10% MeOH/PBS pipettiert. Darüber wurde das TeA-HS-HRP-Konjugat pipettiert, auf jede Hälfte von rechts nach links beginnend mit einer Verdünnung von 1:100 (auch hier erfolgte später eine 1:1.000 Verdünnung), weiterverdünnt 1:3 (35 μ l/Kavität). Nach anschließender einstündiger Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift. Schließlich wurde Enzymsubstrat-Chromogen-Lösung (100 μ l/Kavität) zugegeben und die Reaktion nach 20 Minuten mittels 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Belegung der Platten ist in Abb. 8 dargestellt.

Diese Hemmtitrationen wurden jeweils nach der Blutabnahme im zweiwöchigen Rhythmus durchgeführt, außerdem nach Abschluss des Versuchs zusätzlich retrospektiv über den gesamten Versuchszeitraum – mit einer Antiserumverdünnung von 1:3.000 (1:3 weiterverdünnt in PBS) sowie einer Konjugatverdünnung von ebenfalls 1:3.000.

Für Kaninchen K7-K9 wurde eine ähnliche Testanordnung verwendet, das Antiserum (35 μ l/Kavität) 1:100 in PBS verdünnt, anschließend 1:3 auf der Platte weiter verdünnt, das Konjugat (35 μ l/Kavität) wurde anfänglich 1:100 in 1% Casein/PBS verdünnt, später dann 1:500. Auch für die Antiseren dieser Tiere eine retrospektive Untersuchung gemäß o.g. Schema.

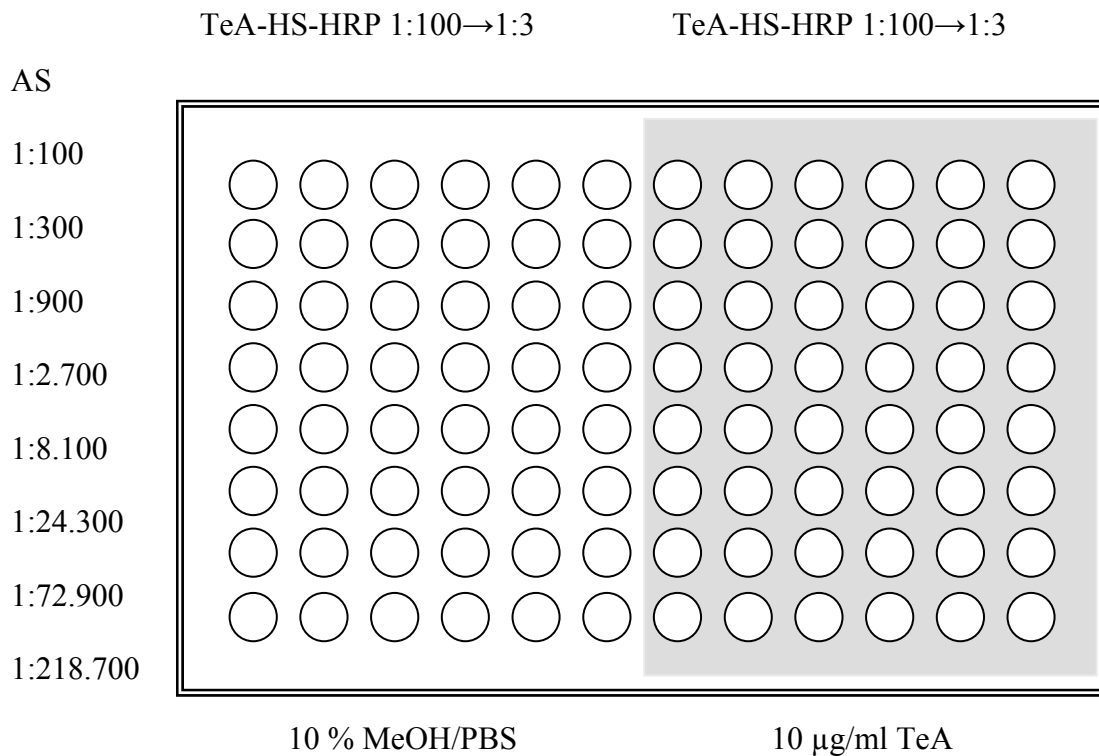


Abb. 8: Beispiel für die Plattenbelegung zur Durchführung der Hemmtitration (modifizierter direkter Enzymimmuntest) zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Immunreagenzien und Antiserumverdünnungen für TeA.

In analoger Weise erfolgte die Hemmtitration im indirekten Testsystem. Zur Durchführung dieses Testsystems wurden die Platten mit TeA-BSA (Formaldehyd) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität) und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden sie mit 2% Casein/PBS für 30 Minuten abgesättigt und anschließend dreimal gewaschen und ausgeklopft. Daraufhin folgte eine Belegung mit Antiserum, beginnend mit einer Verdünnung von 1:100 (jeweils 50 µl/Kavität), weiter 1:3 auf der Platte. Auf die positive Hälfte wurde Toxinstandardlösung (10 µg/ml in MeOH, 50 µl/Kavität), auf die andere (negative) Hälfte 10% MeOH/PBS (50 µl/Kavität) pipettiert. Nach einstündiger Inkubation und dreimaligem Waschen mit anschließendem Ausklopfen erfolgte eine Zugabe von Enzymkonjugat (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:1.000, 100 µl/Kavität). Nach einer letzten einstündigen Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurde Substratlösung (100 µl/Kavität) auf die Platten pipettiert und die Reaktion nach 20 Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt. Anschließend folgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.2.4 *Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests*

Für die Durchführung des kompetitiven indirekten Enzymimmuntests wurden Mikrotiterplatten mit TeA-HS-BSA (aktive Estermethode) oder TeA-BSA (Mannich-Kondensation) in Verdünnungen von 1:1000 (weitere Verdünnungen 1:3) beziehungsweise 1:10.000 (weitere Verdünnungen 1:2) in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/Kavität). Nach 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen mit 2% Casein/PBS (30 Minuten). Die Platten wurden mit Antiserum (K 1 Woche 22) in einer Verdünnung von 1:1.000 (weiter 1:3 in PBS), auf der Platte verdünnt, versehen (50 µl/Kavität). Daraufhin wurden toxischer Ansatz und TeA (10 µg/ml) aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und einem Waschschrift erfolgte die Zugabe des enzymmarkierten Sekundärantikörpers (Schwein-Anti-Kaninchen-IgG-HRP, 1:1.000, 100 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation und Waschschrift erfolgten die Zugabe von Substratlösung (100 µl/Kavität) und nach 15 Minuten 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität). Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm.

3.2.5 *Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntests (Doppelantikörpertechnik)*

In der Versuchsanordnung des kompetitiven direkten Enzymimmuntests in Doppelantikörpertechnik wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten mit einem gegen Kaninchen-Immunglobulin G gerichteten Antikörper beschichtet (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG) (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer, 100 µl/Kavität). Danach folgte eine Inkubation der Platte für 24 Stunden, mit darauf folgender Verwendung der Platte oder anschließender Lagerung im Kühlschrank bei 4-6 °C über einen Zeitraum von maximal vier Wochen. Vor Testbeginn wurden die Platten für 30 Minuten mit 2% Casein/PBS (200 µl/Kavität) abgesättigt, danach dreimal gewaschen und die in den Kavitäten verbliebene Restflüssigkeit ausgeklopft. Es wurden dann pro Kavität 35 µl Toxinstandard (Verdünnung in 5% Acetonitril/PBS), 35 µl Antiserum (Verdünnung in PBS) sowie 35 µl TeA-Enzymkonjugat (Verdünnung in 1% Casein/PBS) auf die Platte pipettiert. Nach einstündiger Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift. Daraufhin wurde Enzymsubstrat-Chromogenlösung (100 µl/Kavität) hinzugegeben und die Farbreaktion nach spätestens 20 Minuten durch Zugabe von

1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Es schloss sich eine Messung der Extinktion bei 450 nm an.

Zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit des kompetitiven direkten Testsystems wurden unter Verwendung des in Kapitel 3.2.3.4 beschriebenen Testprotokolls verschiedene Kombinationen aus Antiserum- beziehungsweise Enzymkonjugatverdünnung geprüft. Als optimal wurden diejenigen Kombinationen von Antiserum- und Enzymkonjugat-Verdünnungen angesehen, die bei einem Extinktionswert der Negativprobe von 0,5-1,0 den größten Extinktionsunterschied zwischen toxischer und toxischfreier Probe ergaben.

Die Acetylierung der TeA erfolgte unter Verwendung der von USLEBER und MÄRTLBAUER (1998) beschriebenen Reaktionsbedingungen. Dabei wurde das Toxin an der OH-Position mittels Essigsäureanhydrid acetyliert. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung des Acetylierungsreagenz. Hierzu wurden 16 mg Dimethylaminopyridin eingewogen und in 4 ml Acetonitril gelöst. Kurz vor Gebrauch wurden 980 µl der Lösung mit 20 µl Essigsäureanhydrid versetzt. Methanolische TeA-Stammlösung wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend in Acetonitril gelöst (Konzentration: 2 mg/ml). Daraufhin wurde das Acetylierungsreagenz zugegeben und der Acetylierungsansatz eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Verdünnung mit PBS (pH-Wert 7,3) im Verhältnis 1:20 gestoppt. Diese Lösung konnte direkt im Enzymimmuntest eingesetzt werden. Weitere Verdünnungen erfolgten mit 5% Acetonitril/PBS.

Zur Überprüfung der Stabilität der Lösung wurde sie am Tag der Herstellung, an den beiden Folgetagen, sowie bis zu 161 Tagen Lagerung untersucht. Strukturformeln von TeA, TeA-Acetat und TeA-Hemisuccinat sind in Abb. 9 dargestellt.

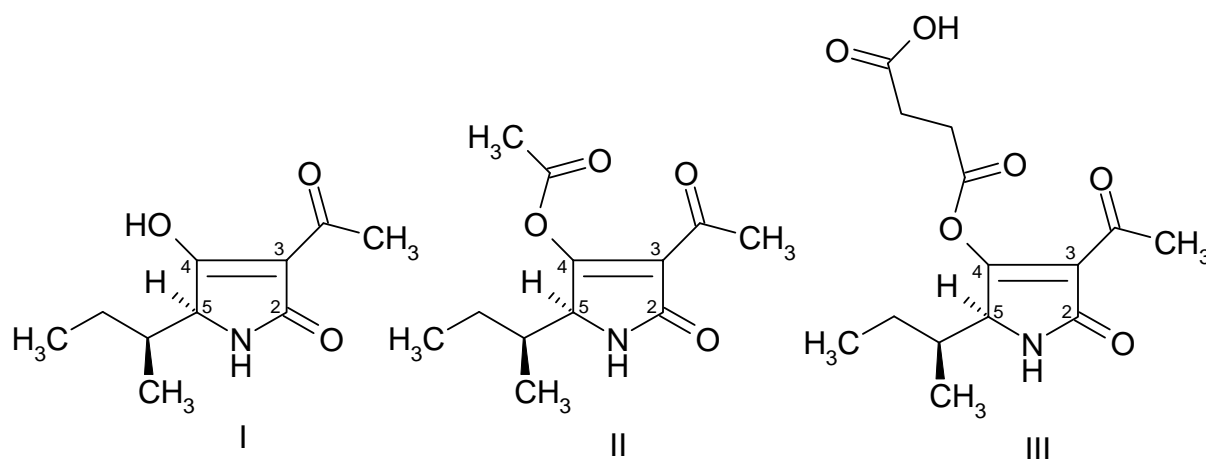


Abb. 9: Vergleichende Darstellung von TeA (I), TeA-Acetat (II) und TeA-Hemisuccinat (III). Die Strukturformeln wurden aufgrund des spezifischen Reaktionsmechanismus der Umsetzung mit Essigsäure- bzw. Bernsteinsäureanhydrid sowie aufgrund des Reaktionsverhaltens im Enzymimmuntest postuliert.

Unter Verwendung der am besten geeigneten Anti-TeA-Antiserum- sowie TeA-HRP-Konjugatverdünnung wurden für TeA, TeA-Acetat und TeA-Hemisuccinat Standardkurven in Konzentrationen von 1 µg/ml bis 10 µg/ml erstellt. Dabei wurde der Extinktionswert des toxinfreien Ansatzes gleich 100% gesetzt und die den jeweiligen Toxinkonzentrationen entsprechenden Extinktionen als Prozentwerte dieses „Leerwertes“ ausgedrückt. Um die Standardkurven miteinander vergleichen zu können, wurden die 50%-Dosis (Toxinkonzentration, die 50% der Extinktion des Nullwertes ergab) und die 70%-Dosis (TeA-Konzentration, die 70% der Extinktion des Nullwertes ergab), als Vergleichsgröße herangezogen. Zur vergleichenden Prüfung der TeA-Standards (Sigma bzw. Alexis) wurden Standardkurven, die entweder mit TeA-Kupfersalz (Sigma) oder mit TeA-Reinsubstanz (Alexis) erstellt worden waren, miteinander verglichen (siehe dazu auch Kapitel 3.2.1).

Zur Prüfung der Spezifität des kompetitiven direkten Enzymimmuntests wurden unter Verwendung des Antiserums K 1 (Woche 22) Wettbewerbsversuche mit verschiedenen Mykotoxinen der *Alternaria*-Gruppe (AOH, AME und ALT) in einer Konzentration von jeweils 100 µg/ml durchgeführt. Zusätzlich wurden TeA-Acetat sowie das zur Immunogensynthese verwendete TeA-Hemisuccinat geprüft. Für diese beiden Derivate wurden jeweils Standardkurven erstellt und die relative Kreuzreaktion ermittelt.

Die Berechnung der relativen Kreuzreaktion erfolgte anhand der ermittelten 50%-Dosis, unter Berücksichtigung des Molekulargewichts, nach folgender Formel:

$$\text{Relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50\text{-Dosis [TeA]} \times \text{Molekulargewicht}}{50\text{-Dosis [Testtoxin]} \times \text{Molekulargewicht}} \times 100$$

Aufgrund der Ergebnisse der Spezifitätsprüfung wurde ein Probenvorbereitungsverfahren entwickelt, das die Acetylierung von eventuell in der Probe vorhandenem TeA einschloss. Zunächst wurde TeA aus wässrigem Probenmaterial mittels Ethylacetat (Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie) extrahiert und dieser Extrakt bis zur Trockne eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand mit Acetylierungslösung aufgenommen, 1 h inkubiert und schließlich die Acetylierungsreaktion durch Zugabe von 19 Teilen PBS zu einem Volumenteil Extrakt gestoppt. Dieser acetylierte Extrakt lag somit in 5% Acetonitril/PBS und damit „gebrauchsfertig“ für die Untersuchung im Enzymimmuntest vor. Weitere Verdünnungen wurden erforderlichenfalls in 5% Acetonitril/PBS hergestellt.

3.2.6 Untersuchungen zur Anwendbarkeit des kompetitiven direkten Enzymimmuntests

Mit Hilfe des optimierten immunchemischen Testsystems zum Nachweis von TeA, dem kompetitiven direkten Enzymimmuntest unter Verwendung von Antiserum K 1 (Woche 22), eingesetzte Verdünnung: 1:3.000 und des TeA-HS-Konjugates (eingesetzte Verdünnung 1:3.000) wurden Versuche zum Nachweis von TeA in Lebensmitteln durchgeführt. Dazu erfolgten zunächst eine Überprüfung der Wiederfindungsrate und anschließend eine Untersuchung unterschiedlicher Lebensmittelproben auf eine mögliche TeA-Belastung.

Bei den Lebensmitteln handelt es sich um Apfelsaft, Tomatensaft, Tomatenmark und Tomatenketchup, gekauft in mittelhessischen Geschäften (Supermärkten, Naturkostläden, Reformhäusern) im Zeitraum von 2009-2010.

3.2.6.1 Nachweis von TeA in Apfelsaft

Zur Prüfung der Anwendbarkeit des TeA-Enzymimmuntests für den Nachweis dieses Toxins in Apfelsaft wurde zunächst die Effizienz der Probenvorbereitung sowie ein möglicher negativer Einfluß der Probenextrakt-Matrix auf das Testsystem anhand künstlich kontaminierter Proben untersucht. Nach Bestimmung der minimal erforderlichen Probenextraktverdünung sowie nach Ermittlung der Wiederfindungsraten wurden orientierend Apfelsaftproben aus dem Lebensmitteleinzelhandel auf ihren TeA-Gehalt untersucht.

Die Proben wurden am Tag des Einkaufs untersucht oder portioniert und bei -18 °C eingefroren. Gefrorene Proben wurden zum langsamen Auftauen über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

Apfelsaftproben wurden mit acetylierter TeA-Lösung jeweils in Konzentrationen von 50 - 500 ng/ml dotiert. Nach Zugabe von Ethylacetat (Verhältnis Probe zu Ethylacetat ist 1:2) und Schütteln der Mischung erfolgte ein Zentrifugierungsschritt (10 Minuten bei 4.000 x g und 4 °C). Nach Abheben der organischen Phase, einer wiederholten Zugabe von Ethylacetat und Abheben der organischen Phase und anschließendem Eindampfen im Rotationsverdampfer (Wasserbad: 42 °C) wurden die Proben mit 1 ml Acetylierungsreagenz gelöst. Der Einsatz von Ethylacetat zur Extraktion von TeA wurde bereits beschrieben (HARVAN und PERO, 1974; HARWIG et al., 1979). Anschließend wurden sie, analog des Protokolls zur Acetylierung, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS 1:20 verdünnt.

Die Proben wurden jeweils ohne Toxinzusatz bzw. versetzt mit acetylierter TeA im Konzentrationsbereich von 50-500 ng/ml untersucht. Für jeden Dotierungsbereich wurden jeweils unterschiedliche Probenmaterialien verwendet, z. B. klare und „naturtrübe“ Säfte sowie Saftkonzentrate. Für die Auswertung im EIA herangezogen wurden alle Extraktverdünnungen mit Extinktionswerten von $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes.

Die Testdurchführung erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Für eine orientierende Einschätzung der Anwendbarkeit des TeA-Enzymimmuntests zur Ermittlung der TeA-Belastung in Apfelsäften wurden sieben Proben untersucht. Es handelte sich dabei um drei naturtrübe Säfte, zwei Direktsäfte und zwei Fruchtsaftkonzentrate.

Für die Untersuchung wurde jeweils 4 ml Apfelsaft mit 8 ml Ethylacetat ausgeschüttelt (Vortex, 30 sec) und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (4000 x g, 10 min). Die organische Phase wurde mittels Pasteurpipette abgehoben und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ml Acetylierungsreagenz aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Verdünnung mit PBS (Verdünnung 1:20), woraufhin die Proben im Vierfachansatz eingesetzt wurden und auch hier nur die Proben mit Extinktionswerten $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes zur Auswertung herangezogen wurden.

3.2.6.2 Nachweis von TeA in Tomatenerzeugnissen

3.2.6.2.1 Tomatensaft

Die Tomatensäfte wurden ohne Toxinzusatz sowie mit acetylierter TeA-Lösung jeweils im Konzentrationsbereich von 50-1.000 ng/ml versetzt und anschließend analog der unter Punkt 3.2.6.1 beschriebenen Probenaufbereitung (mit einmaliger Ausschüttelung mit Ethylacetat) untersucht. Für die Wiederfindungsraten wurden unterschiedliche Tomatensäfte verwendet, darunter Direktsäfte und Säfte aus Konzentrat, darüber hinaus auch noch Produkte aus biologischem Anbau.

Für die Auswertung wurden Probenextrakte mit Extinktionswerten von $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes herangezogen.

Zur orientierenden Prüfung einer TeA-Belastung von Tomatensäften wurden 15 Proben untersucht. Es handelte es sich um fünf Säfte aus biologischer Herstellung (einer davon aus Konzentrat hergestellt), fünf Direktsäfte und fünf aus Konzentrat hergestellte Tomatensäfte. Die Untersuchung erfolgte analog der Apfelsaftuntersuchung (3.2.6.1). Die Proben wurden im Vierfachansatz pipettiert.

3.2.6.2.2 Tomatenketchup

Die Untersuchung der Ketchup-Proben erfolgte sowohl ohne als auch mit Zusatz acetylierter TeA in Konzentrationen von 100-2.000 ng/ml. Dazu wurden 5 g Ketchup mit 8 ml destilliertem Wasser verdünnt und 4 ml der verdünnten Probe mit 8 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach einminütiger Mischung der Probe erfolgte eine Zentrifugation (4.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Ethylacetatphase wurde abgehoben, in einen Rundkolben pipettiert und im Rotationsverdampfer bei 40 °C im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Acetylierungsreagenz gelöst, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS 1:20 verdünnt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit 5% Acetonitril/PBS mit Untersuchung der Proben mit den jeweiligen Verdünnungen im Vierfachansatz. Wie bei den Saftproben wurden auch bei den Ketchup-Proben zur Auswertung Proben mit Extinktionswerten von $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes herangezogen.

Für die Untersuchung wurden 18 Ketchup-Proben aus dem Einzelhandel herangezogen.

3.2.6.2.3 Tomatenmark

Die Probenaufbereitung für das Probenmaterial „Tomatenmark“ wurde grundsätzlich analog zu der von Ketchup durchgeführt. Zur Verdünnung des Tomatenmarks wurden 15 ml A. dest. verwendet. Ab da erfolgte die Extraktion analog dem Kapitel 3.2.6.2.2. Die Tomatenmarkproben wurden mit acetylierter TeA-Lösung jeweils in Konzentrationen von 500, 1000 und 2.000 ng/ml dotiert. Für die Wiederfindungsraten wurden sowohl einfach, als auch zwei- und dreifach konzentrierte Proben verwendet, unter anderem aus biologischer Konzentration sowie teilweise aus italienischer Produktion. Die Untersuchung der Proben mit den jeweiligen Verdünnungen erfolgte im Vierfachansatz. Zur Auswertung kamen Proben mit Extinktionswerten von $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes.

Bei der Durchführung eines Versuches zur Hitzestabilität von TeA in einem Tomatenmark-Fertiggericht wurde die Tomatensoße nach Herstellerangaben (1 Volumenteil Konzentrat und 1 Volumenteil Wasser) mit Leitungswasser aufgelöst und mit 2.000 ng/ml TeA dotiert. Ein Teil der mit TeA versetzten Probe wurde daraufhin verzehrsfähig erhitzt. Die Extraktion

erfolgte wie oben beschrieben. Die dotierte, nicht gekochte, sowie die dotierte gekochte Probe wurden daraufhin mit den jeweiligen Verdünnungen im Vierfachansatz untersucht.

Zehn Tomatenmarkproben wurden auf eine mögliche Toxinbelastung untersucht. Es handelte sich dabei um einfach, doppelt und dreifach konzentrierte Proben, darunter eine mit der Bezeichnung „Bio“ aus Deutschland und einige Standardprodukte aus italienischer Produktion.

3.2.6.3 Nachweis von TeA in schimmelbefallenen Tomaten nach verschiedener Lagerungszeit

Für den Nachweis einer TeA-Produktion in schimmelbefallenen Tomaten wurde bei sieben Tomatenproben die Verschimmelung durch Lagerung zusätzlich provoziert. Bei Einkauf der Proben wurden bereits solche Tomaten ausgewählt, die makroskopisch erkennbare schwarze, runde (präsumtiver Befall mit *Alternaria* spp.) Verfärbungen auf der Schale aufwiesen. Darüber hinaus wurden zwei „frische“ Tomaten untersucht und zwei Wochen im Brutschrank bei 25°C aufbewahrt, bis sich eine blau-weiße Schimmelbildung zeigte. Die anderen Tomaten wurden entweder bei Raumtemperatur, im Kühlschrank oder bei 20°C inkubiert, bis eine deutliche Schimmelbildung erkennbar war. Zur Untersuchung wurden die Früchte fein zerkleinert und 5 g Probe mit 8 ml A. dest. verdünnt und zentrifugiert (4.000 x g, 10 Minuten, 4 °C). Anschließend wurde die Mischung filtriert, der pH-Wert des Filtrates wurde gemessen und lag bei 4-4,5. Jeweils 4 ml des Filtrates wurden mit 8 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, die obere organische Phase gewonnen und im Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Acetylierungsreagenz gelöst, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit PBS verdünnt (1:20). Weitere Verdünnungen wurden mit 5% Acetonitril/PBS angefertigt. Die Proben wurden jeweils im Vierfachansatz pipettiert, als Negativkontrolle wurden frische Tomaten, die makroskopisch keine Veränderungen aufwiesen, eingesetzt. Zur Auswertung wurden alle Probenextraktverdünnungen herangezogen, die zu Extinktionswerten von $\geq 40\%$ unter $\leq 70\%$ des TeA-freien Leerwertes führten.

Bei vier ausgewählten Tomaten wurden zusätzlich von verschiedenen Stellen Mycelproben des deutlich sichtbaren Schimmels entnommen, unter Verwendung einer abgeflamten Öse. Dieses Pilzmaterial wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen viertelstarker Ringerlösung eingerieben, mit einem Deckplättchen versehen und als Nativpräparat

mikroskopisch ausgewertet. Ein zweites Präparat (Tesafilm-Präparat) wurde von diesen Tomaten mittels eines Streifens Tesafilm angefertigt. Der Tesafilm wurde auf die Pilzkultur gedrückt und anschließend auf einen Objektträger geklebt. Auch hier erfolgte die mikroskopische Beurteilung bei 40facher Vergrößerung. Von den Schimmelstellen der Tomate wurden darüber hinaus ca. 2-4 mm große Stücke jeweils auf eine Malzextrakt-Agarplatte gelegt und im Brutschrank bei 20 °C inkubiert. Nach sieben Tagen Bebrütung wurden die Platten zunächst mikroskopisch betrachtet und das Mycel anschließend im Enzymimmuntest auf TeA untersucht. Hierzu wurden etwa zehn mg des Mycels entnommen und zunächst mit 100 µl Acetonitril aufgenommen. Anschließend wurden 900 µl Acetylierungsreagenz zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 5 min zentrifugiert (13.000 U) und der Überstand mit PBS (1:20) verdünnt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit 5% Acetonitril-PBS, die Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt.

3.2.6.4 Orientierende Untersuchungen zum TeA-Bildungsvermögen verschiedener Schimmelpilze

Für die Überprüfung einer möglichen TeA-Produktion wurden Schimmelpilze verschiedener Gattungen (siehe Punkt 3.1.6.1) in eine Hefeextrakt-Glucose-Bouillon eingimpft und bei 25 °C sechs Tage lang bebrütet. Zusätzlich wurde eine Malzextraktagar-Platte mit dem jeweiligen Pilzmycel versehen und ebenfalls sechs Tage bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Untersuchung wurden jeweils 10 mg von der Malzextrakt-Agar Platte bzw. 10 mg des Pilzmaterials aus der Hefeextrakt-Bouillon in ein Eppendorf-Hütchen überführt, in das 100 µl Acetonitril vorgelegt waren. Hierzu wurden jeweils 900 µl Acetylierungsreagenz gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin mit PBS 1:20 verdünnt. Weitere Verdünnungen wurden mit 5% Acetonitril/PBS hergestellt, der Probeneinsatz erfolgte im Vierfachansatz.

4 ERGEBNISSE

4.1 Überprüfung des TeA-Standardmaterials

Die Messung des UV-Spektrums der in Methanol sowie der in Acetonitril gelösten TeA (Kupfersalz) ergab ein Absorptionsmaximum bei 290 nm (12,5 µg/ml) bzw. 291 nm (10 µg/ml). Das Spektrum für TeA (in Reinform) ergab ein Absorptionsmaximum bei 277 nm, entsprechend den Literaturangaben (SCOTT und KANHERE, 1980). Die UV-Spektren von TeA sind in den Abb. 10 und 11 dargestellt. Die Unterschiede dürften auf die Kupferionen zurückzuführen sein. Auf eine Entfernung des Kupfers wurde jedoch verzichtet, da dies für die eigenen Arbeiten zur Antikörperproduktion nicht notwendig war. Die Überprüfung von TeA (Kupfersalz) mittels HPLC ergab eine Retentionszeit von 4,15 Minuten. Das mittels UV-DAD gewonnene Spektrum des Peaks zeigte ein für TeA typisches Spektrum, mit Absorptionsmaxima bei 238 nm und 281 nm (Abb. 14).

Bei einer nach Erstellung des Enzymimmuntests durchgeführten vergleichenden Untersuchung der beiden kommerziell erhältlichen TeA in Form des Kupfersalzes und in Reinform als bräunliches Öl wurden keine Unterschiede bezüglich des 50%-Wertes der Standardkurve und der Nachweisgrenze (70%-Wert der Standardkurve) festgestellt, so dass im Folgenden alle sich anschließenden Untersuchungen ausschließlich mit der wesentlich kostengünstigeren an Kupfersalz gebundenen TeA durchgeführt wurden (siehe Abb. 17).

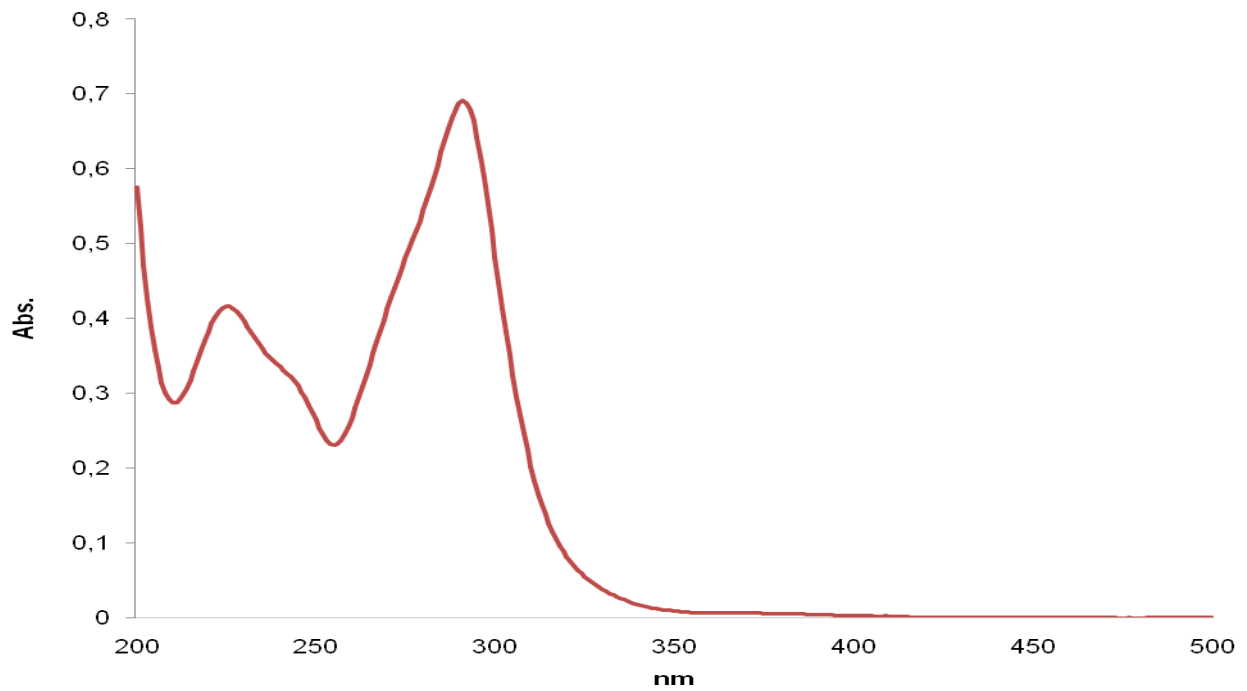


Abb. 10: Typisches UV-Absorptionsspektrum für TeA in Acetonitril (10 µg/ml, TeA in Form des Kupfersalzes). Die Maxima lagen bei 194 nm, 225 nm und 291 nm.

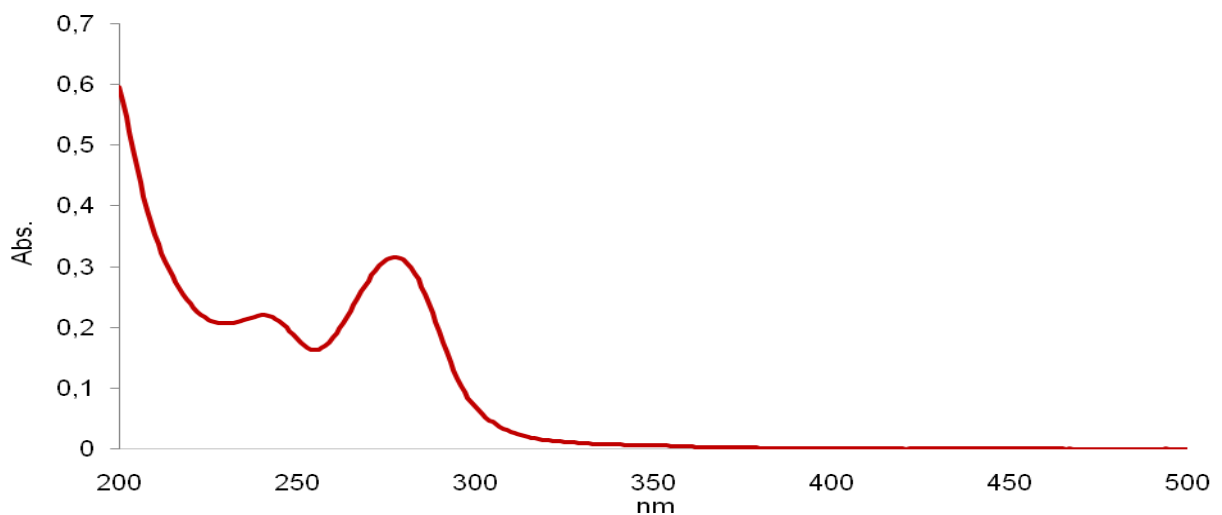


Abb. 11: Typisches UV-Absorptionsspektrum für TeA in Acetonitril (10 µg/ml, TeA in Reinform). Die Maxima lagen bei 194 nm, 241 nm und 277 nm.

4 ERGEBNISSE

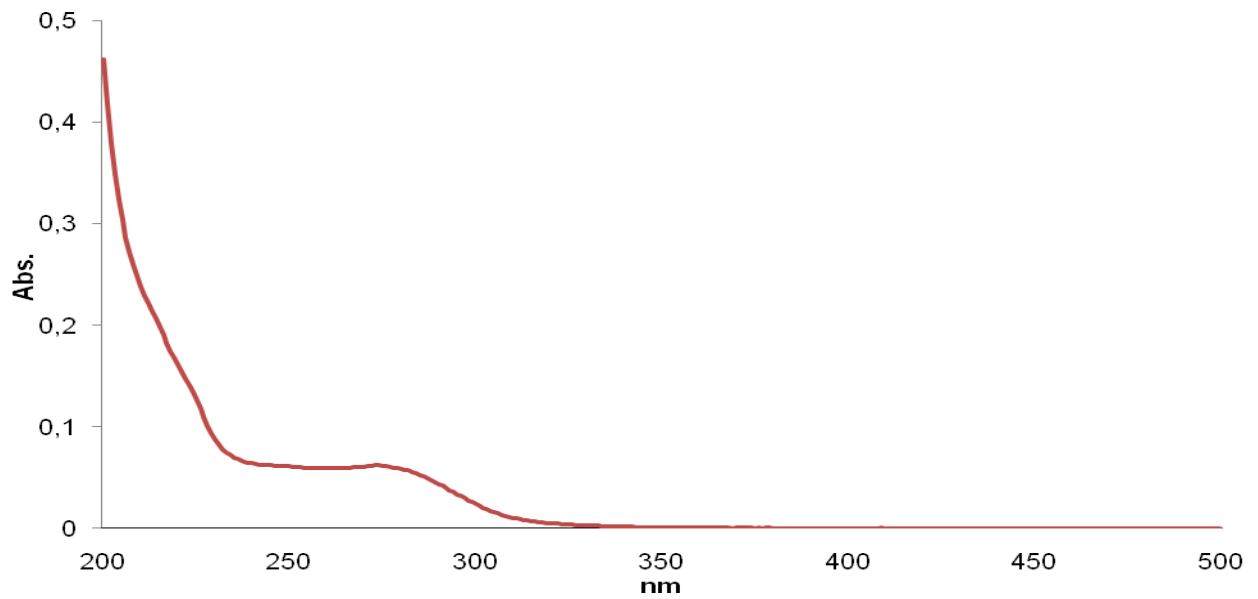


Abb. 12: UV-Absorptionsspektrum für acetylierte TeA in PBS (10 µg/ml). Die Maxima lagen bei 195 nm und 273 nm.

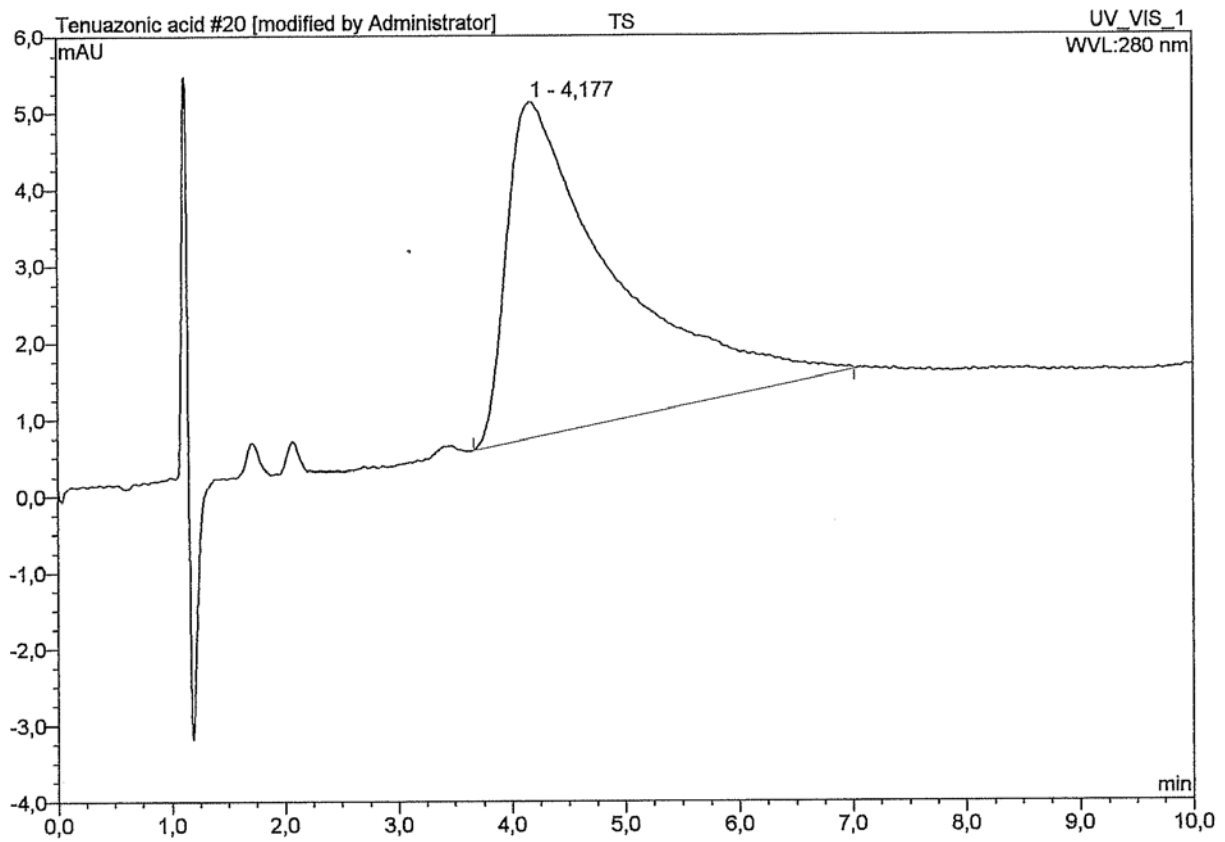


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm (280 nm) des TeA-Standards

4 ERGEBNISSE

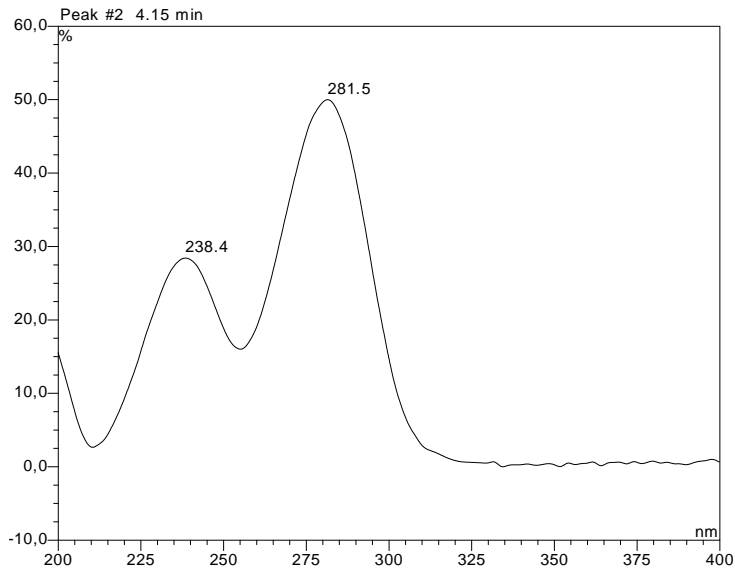


Abb. 14: Zum Zeitpunkt des Peakmaximums (4,15 min, Abb. 13) ergibt sich für TeA ein UV-Absorptionsspektrum (HPLC), das demjenigen des TeA-Standards entspricht (238 nm, 281 nm).

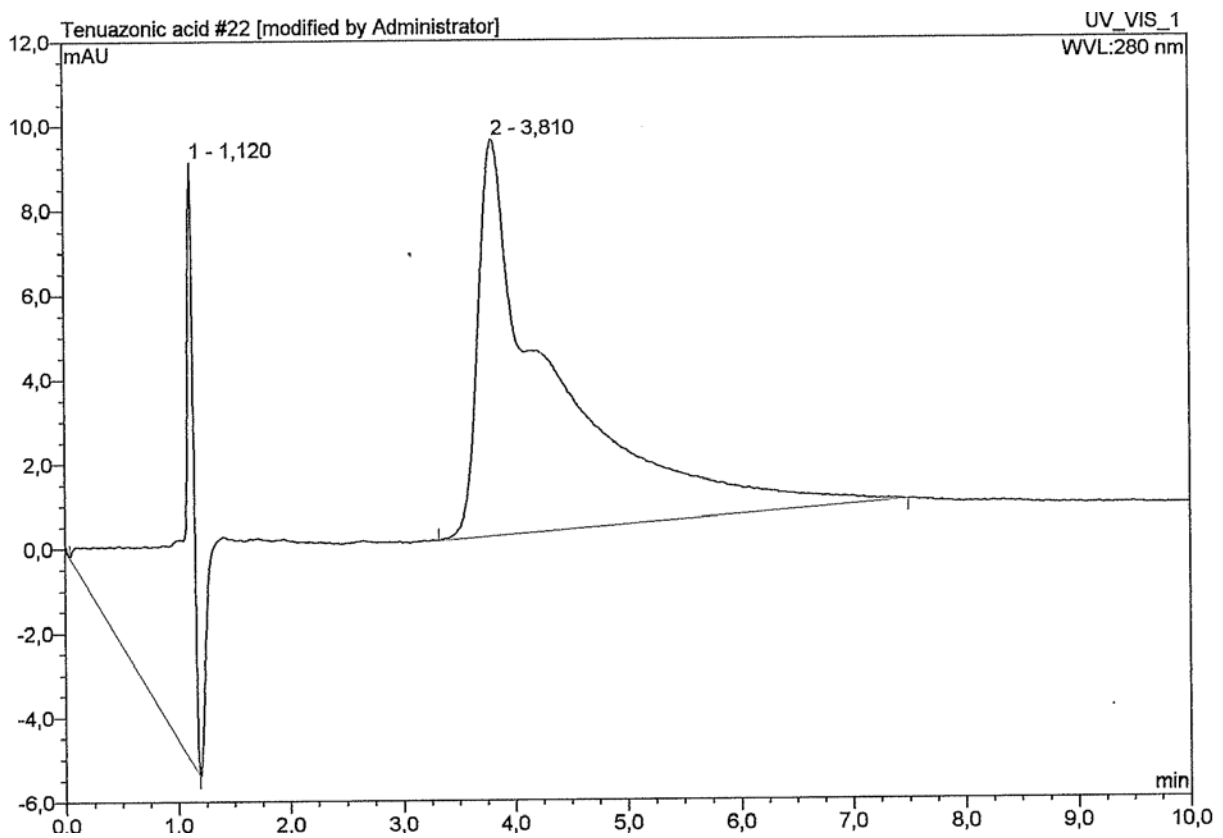


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm (280 nm) von TeA-HS-HRP (aktive Estermethode)

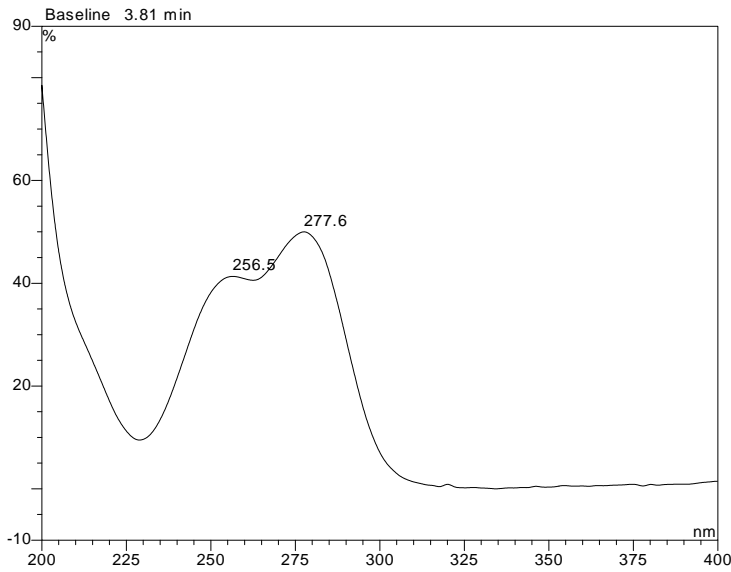


Abb. 16 Zum Zeitpunkt des Peakmaximums (3,81 min, Abb. 15) ergibt sich für TeA-HS ein UV-Absorptionsspektrum (HPLC) mit Maxima bei 256 nm und 278 nm.

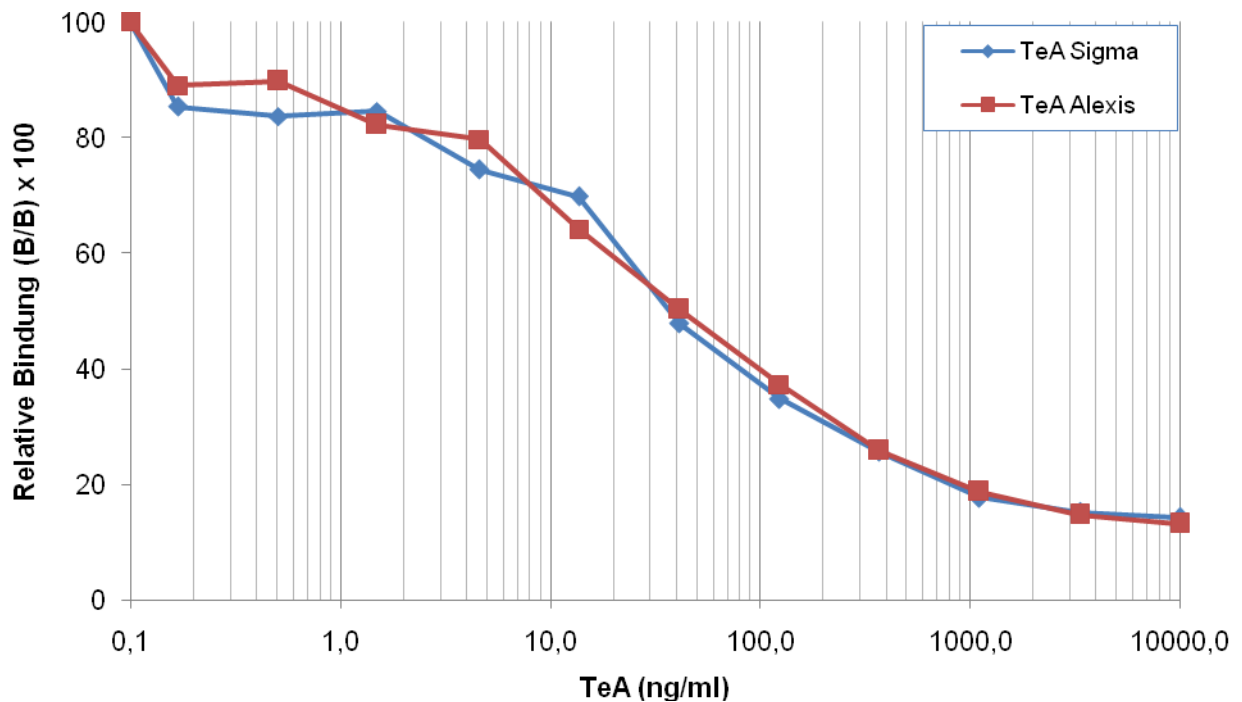


Abb. 17: Vergleich der Standardkurven für TeA im kompetitiven direkten Enzymimmuntest (die TeA der beiden Hersteller lieferten nahezu gleiche Kurven). Die 50%-Inhibitionsdosen lagen bei 37 ng/ml (TeA Sigma) und 42 ng/ml (TeA Alexis).

4.2 Herstellung der Immunreagenzien

In der wissenschaftlichen Literatur wurde bisher die Herstellung von TeA-Proteinkonjugaten noch nicht beschrieben. Deshalb wurden verschiedene, für andere Haptene mit ähnlichen Struktureigenschaften beschriebene Kopplungsreaktionen geprüft. Eine qualitative spektrophotometrische Überprüfung der hergestellten TeA-Proteinkonjugate zeigte, dass bei den drei mittels aktiver Estermethode hergestellten Konjugaten ein Absorptionsmaximum im Bereich von 275 nm erkennbar war. Das Spektrum des reinen Toxins liegt im Bereich von 280 nm, die der reinen Proteine in Bereichen zwischen 260 und 280 nm, weswegen es zu Überlagerungen der Spektren kam. Aufgrund dieser Tatsache war nur eine vorsichtige qualitative Abschätzung des Kopplungserfolgs möglich. Die TeA-Konjugate, die mittels Mannich-Kondensation hergestellt wurden, zeigten Absorptionsmaxima in Bereichen von 300 nm, auch hier war das Toxinspektrum überlagert durch die Eigenabsorption des Proteinträgers. Das mittels reduktiver Alkylierung gewonnene TeA-HRP-Konjugat zeigte Maxima in Bereichen von 400 und 257 nm, die denen des reinen HRP sehr gleichen.

Im Gegensatz zu den oben angeführten direkten Kopplungserfolgen wurde in einem zweistufigen Verfahren zunächst ein TeA-Derivat mit einer reaktiven Carboxylgruppe hergestellt und dieses dann mittels aktiver Esterkopplung an den Proteinträger bzw. das Enzym HRP gekoppelt. Eine weitere Überprüfung der Umwandlung von TeA zu TeA-HS erfolgte mittels HPLC. Dabei wurde eine Ausbeute von ca. 2,7 mg TeA-HS ermittelt. Für TeA-HS ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 277,6 nm die Retentionszeit lag bei 3,8 min (Abb. 16).

Die chromatographische Untersuchung des Toxinstandards und der Derivate ergab für TeA einen Rf-Wert von 0,38 und für TeA-HS von 0,48 unter Verwendung von Chloroform und Methanol (90:10) als Laufmittel. Bei Verwendung von Chloroform und Methanol (90:10) unter Zugabe von einem Milliliter Essigsäure ergab sich für TeA ein Rf-Wert von 0,44 und für TeA-HS von 0,50.

Sobald die ersten Immunisierungen durchgeführt worden waren und Antikörper vorlagen wurden die Konjugate im Enzymimmuntest eingesetzt. Die mittels aktiver Estermethode hergestellten Konjugate erwiesen hierbei ihre Funktionsfähigkeit, die mittels Mannich-

Kondensation hergestellten ebenfalls. Das mittels reduktiver Alkylierung hergestellte Konjugat lieferte allerdings keine brauchbaren Ergebnisse.

In den Abb. 18-23 sind die UV-Spektren für TeA-HS-HRP, TeA-HS-BSA und TeA-HS-KLH dargestellt, sowie die korrespondierenden Spektren der Reinproteine oder der Enzyme und das Toxinspektrum. Zusätzlich ist das berechnete Differenzspektrum (Spektrum Konjugat minus Spektrum Reinprotein/Enzym) aufgezeigt. Darüber hinaus sind auch die Spektren von TeA-BSA und TeA-KLH (Mannich-Kondensation) sowie TeA-PJ-HRP (Perjodatkopplung) mit den korrespondierenden Reinproteinen und dem Toxin- und Differenzspektrum abgebildet. Aufgrund der typischerweise bei diesen Verfahren zu erwartenden Ausbeuteverluste wurde der Gehalt an Protein und Peroxidase abgeschätzt (Tab. 10).

Tab.10: Proteingehalt der Immunogene bzw. Festphasenantigene

Kopplungsprodukt (Kopplungsmethode bzw. -reagenz)	Gehalt an Protein/Enzym (mg/ml)
TeA-HS-BSA (aktive Estermethode)	2,35
TeA-BSA (Mannich-Kondensation)	0,69
TeA-HS-KLH (aktive Estermethode)	8,41
TeA-KLH (Mannich-Kondensation)	3,52
TeA-HS-HRP (aktive Estermethode)	3,36
TeA-PJ-HRP (Perjodatkopplung)	0,87

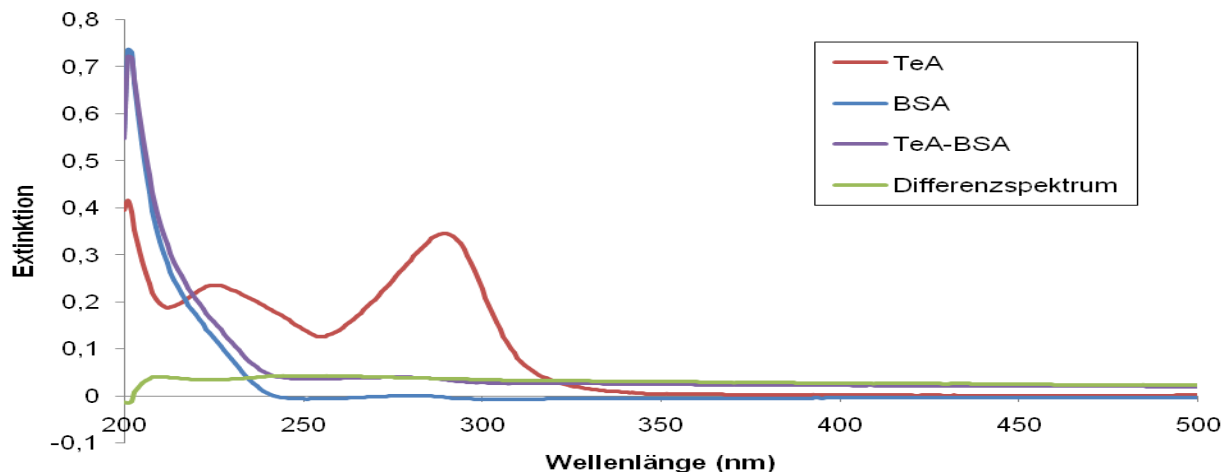


Abb. 18: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS unter Verwendung der aktiven Estermethode synthetisierten Toxin-BSA-Konjugates (1:100 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Protein (25 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

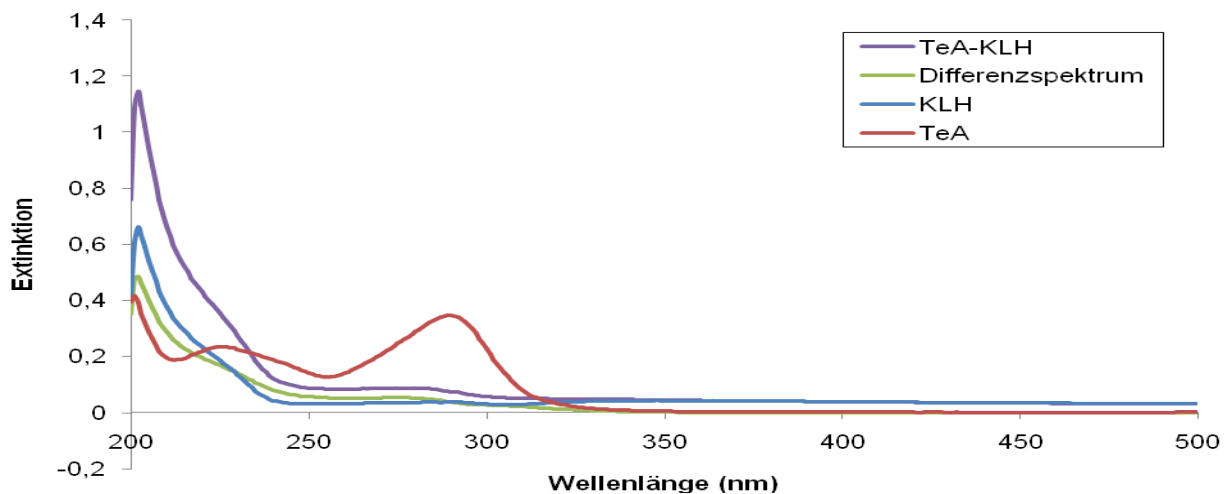


Abb. 19: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS unter Verwendung der aktiven Estermethode synthetisierten Toxin-KLH-Konjugates (1:100 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Protein (100 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

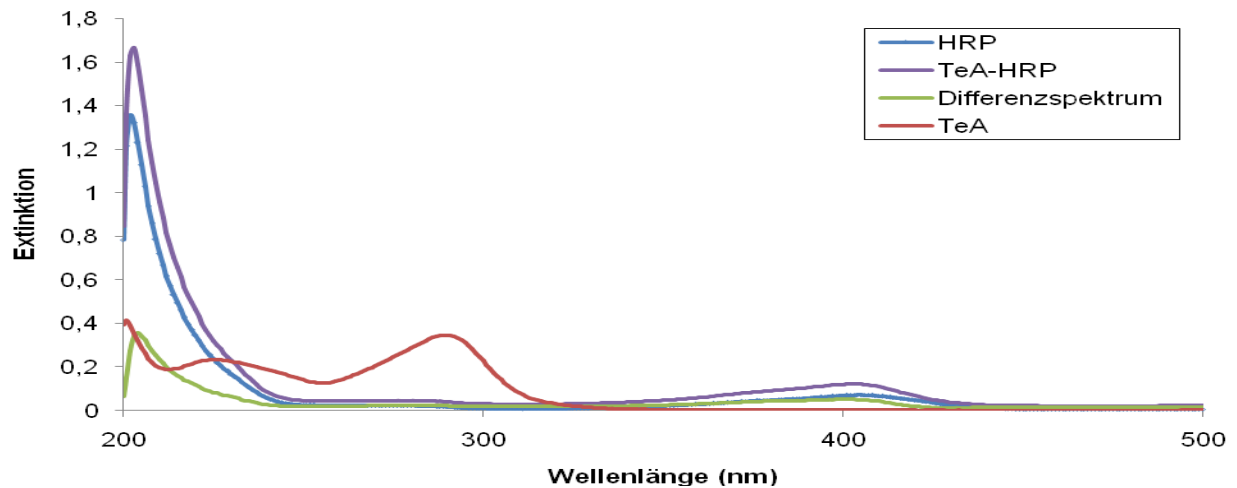


Abb. 20: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA-HS unter Verwendung der aktiven Estermethode synthetisierten Toxin-HRP-Konjugates (1:100 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Enzym (50 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

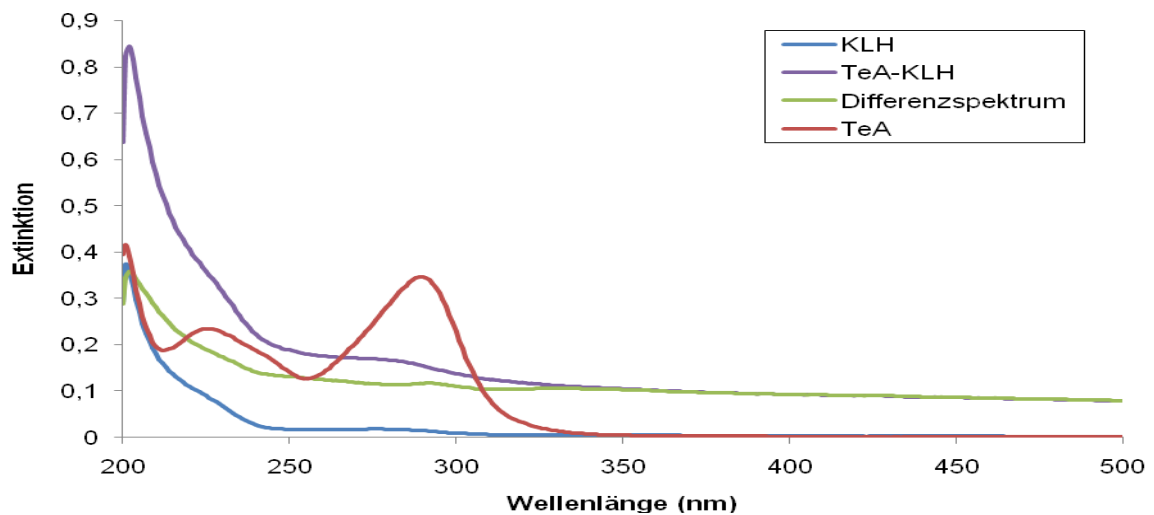


Abb. 21: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der Mannich-Kondensation synthetisierten Toxin-KLH-Konjugates (1:20 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Protein (50 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

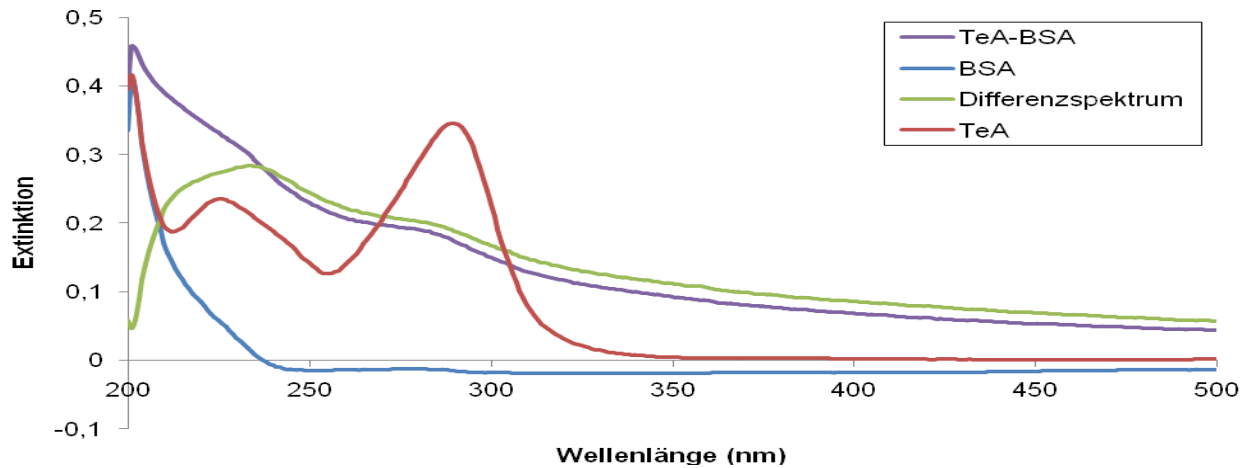


Abb. 22: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der Mannich Kondensation synthetisierten Toxin-BSA-Konjugates (1:20 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Protein (15 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

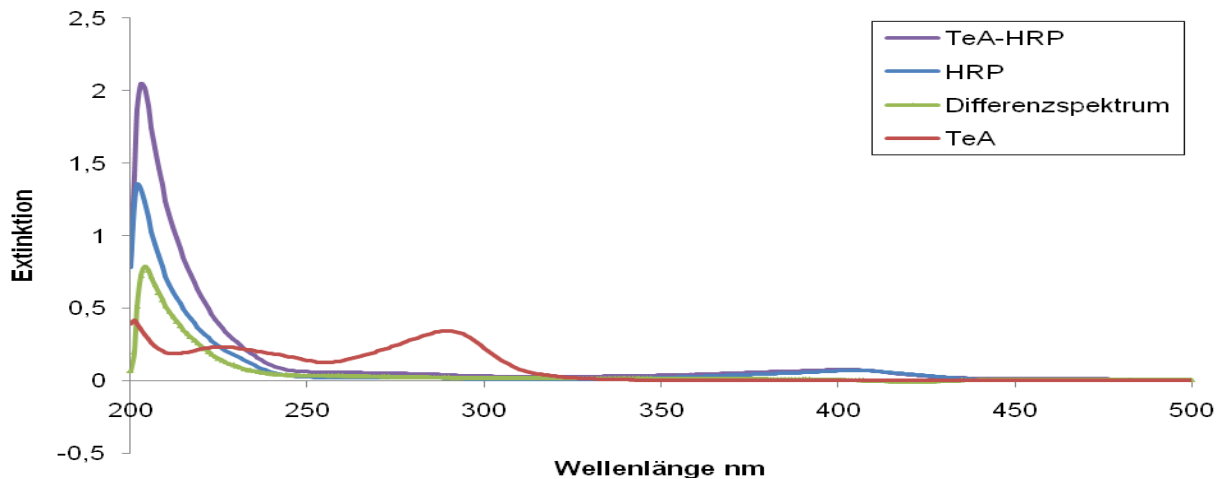


Abb. 23: UV-Absorptionsspektrum des mit TeA unter Verwendung der reduktiven Alkylierung synthetisierten Toxin-HRP-Konjugates (1:20 in PBS). Zum Vergleich sind jeweils das aus der Subtraktion der Spektren von Konjugat und reinem Enzym (50 $\mu\text{g/ml}$) ermittelte Differenzspektrum sowie das reine Toxin-Spektrum (6,25 $\mu\text{g/ml}$) eingezeichnet.

4.3 Gewinnung spezifischer Antiseren gegen TeA

4.3.1 *Antikörper-Titerverlauf*

Der Antikörper-Titerverlauf der mit den verschiedenen TeA-Proteinkonjugate immunisierten Kaninchen wurde über den gesamten Immunisierungsverlauf kontinuierlich untersucht. Dabei erfolgte die Untersuchung mittels eines direkten (K1-K3 und K7-K9) sowie indirekten (K4 - K6) Enzymimmuntests.

Bei Kaninchen K1 bis K3 führte die Immunisierung mit TeA-HS-KLH bei zwei Tieren zu einer spezifischen Immunantwort, wohingegen im Serum des dritten Tieres trotz dreimaliger Restimulierung keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten. Es wiesen zwar alle drei Kaninchen messbare Antikörpertiter ($>0,3$ Extinktionseinheiten bei Antiserumverdünnung ≥ 100) auf, allerdings mit deutlichen individuellen Unterschieden bezüglich der Titerhöhe (Abb. 24). Im Falle der Kaninchen mit der spezifischen Immunantwort (K1 und K2) waren bereits nach der sechsten Woche Antikörper gegen TeA nachweisbar. Kaninchen K1 reagierte auf die erste Restimulierung mit einem deutlichen Anstieg des relativen Antikörpertiters. Auch Kaninchen K2 reagierte mit einem Anstieg, der aber insgesamt verzögert und viel schwächer ausfiel als der bei Kaninchen K1. Maximale Titer lagen bei Kaninchen K1 im Bereich von $>1:80.000$, bei Kaninchen K2 $>1:20.000$. Im Falle von Kaninchen K1 fiel der relative Antikörpertiter nach einem steilen Anstieg bis Woche 15 stetig bis zum Zeitpunkt der zweiten Restimulierung in Woche 23. Ab da stieg er wieder deutlich an auf Werte $\geq 1:50.000$, um dann kontinuierlich abzufallen. Bei Kaninchen K2 führte die zweite Restimulierung zu einem Abfall des Titers, der dritten Restimulierung folgte ein Anstieg auf Werte $\geq 1:20.000$, danach ein Abfall des relativen Antiserumtiters. Im Falle von Kaninchen K2 lagen die maximal erreichten Titer in einem Bereich $>1:20.000$, insgesamt zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei Kaninchen K2, abgesehen davon, dass nach der dritten Restimulierung kein Titeranstieg mehr folgte. Für die mituntersuchten Präimmenserum wurden unter den beschriebenen Testbedingungen bei Kaninchen K1 und K2 Extinktionswerte von maximal 0,06 bzw. 0,05 Einheiten gemessen.

Die Immunisierung mit TeA-KLH (Mannich-Kondensation) bei Kaninchen K4 bis K6 führte bei keinem der drei getesteten Tiere zu einem signifikanten Titeranstieg (siehe Abb. 25). Bei Kaninchen K4 stieg der Titer nach der Grundimmunisierung bis auf Werte von $>1:4.000$, bei

Kaninchen K5 auf maximale Serumtiter von 1:3.000, wobei die Restimulierungen bei beiden Kaninchen zu einem leichten Anstieg des Titers führten, um dann aber etwa zwei Wochen nach der zweiten Restimulierung deutlich abzufallen. Bei Kaninchen K6 wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum relative Antiserumtiter $<1:500$ erreicht und auch die Restimulierungen führten nicht zu einem deutlichen Titeranstieg. Spezifische Antikörper konnten von keinem der drei immunisierten Tiere gewonnen werden.

Für die Immunisierung der Kaninchen K7 bis K9 wurden unterschiedliche Immunogene verwendet. Kaninchen K7 und K9 wurden mit TeA-HS-BSA, Kaninchen K8 mit TeA-HS-KLH immunisiert. Der Grund für die unterschiedliche Immunisierung lag darin, dass die Präimmunseren der Tiere auf einen möglichen relativen Antiserumtiter auf das Trägerprotein getestet wurden und Kaninchen K7 und K9 bei einer Plattenbeschichtung mit BSA (1 $\mu\text{g/ml}$) Extinktionswerte ≤ 1 Einheiten aufwiesen, wohingegen bei Kaninchen K8 Extinktionswerte ≥ 2 Einheiten detektiert wurden. Deshalb erfolgte bei Kaninchen K8 eine Immunisierung mittels TeA-HS-KLH.

Kaninchen K8 reagierte auf die Immunisierung mit einem deutlichen Titeranstieg auf maximale Antiserumtiter von 1:700. Daraufhin fiel der Titer deutlich ab, stieg nach der ersten Restimulierung noch einmal auf Werte $>1:200$ an, um dann wieder kontinuierlich abzufallen. Die zweite Restimulierung führte noch einmal zu einem leichten Anstieg auf Werte von 1:100, fiel dann aber direkt ab. Kaninchen K7 und K9 reagierten auf die Immunisierung mit einem Anstieg des relativen Antiserumtiters auf Werte von 1:400 (Kaninchen K7) beziehungsweise $<1:300$ (Kaninchen K9). Danach folgte ein Abfall bis zur ersten Restimulierung in Woche zwölf. Bei Kaninchen K7 fiel der Titer weiter ab, bei Kaninchen K9 stieg er noch einmal auf Werte $>1:300$ an, fiel dann aber kontinuierlich trotz zweiter Restimulierung in Woche 17. Bei Kaninchen K7 führte diese zweite Restimulierung zu einem minimalen Anstieg auf Werte bis 1:100, um dann aber auch wieder abzufallen (Abb. 26). Spezifische Antikörper konnten von keinem der Kaninchen gewonnen werden.

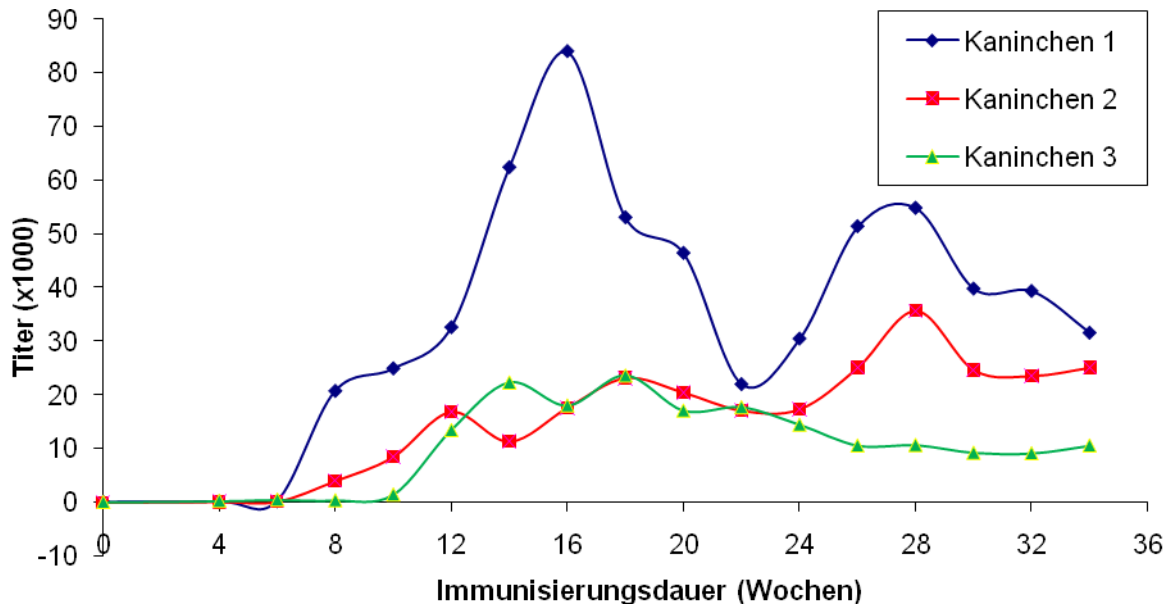


Abb. 24: Relative Antiserumtiter der mit TeA-HS-KLH immunisierten Kaninchen nach Überprüfung im kompetitiven direkten Testsystem unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG (K1, K2, K3).

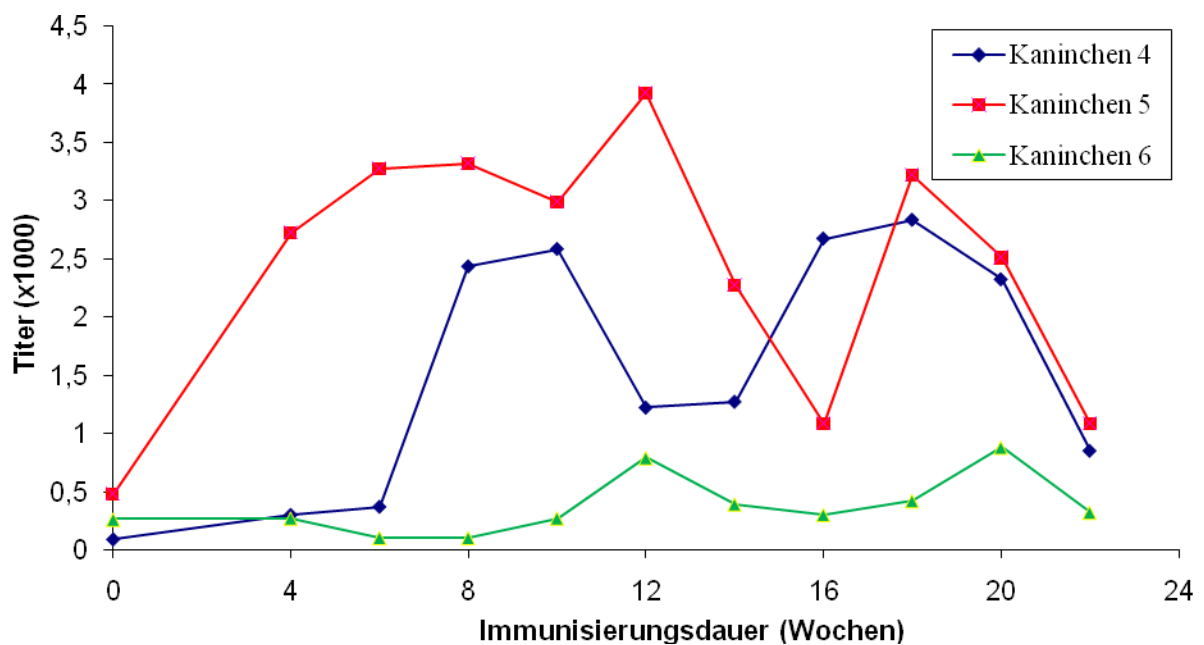


Abb. 25: Relative Antiserumtiter der mit Tenuazonäure-KLH (Mannich-Kondensation) immunisierten Tiere nach Überprüfung im kompetitiven indirekten Testsystem unter Verwendung von TeA- BSA als Festphasenantigen (K4, K5, K6).

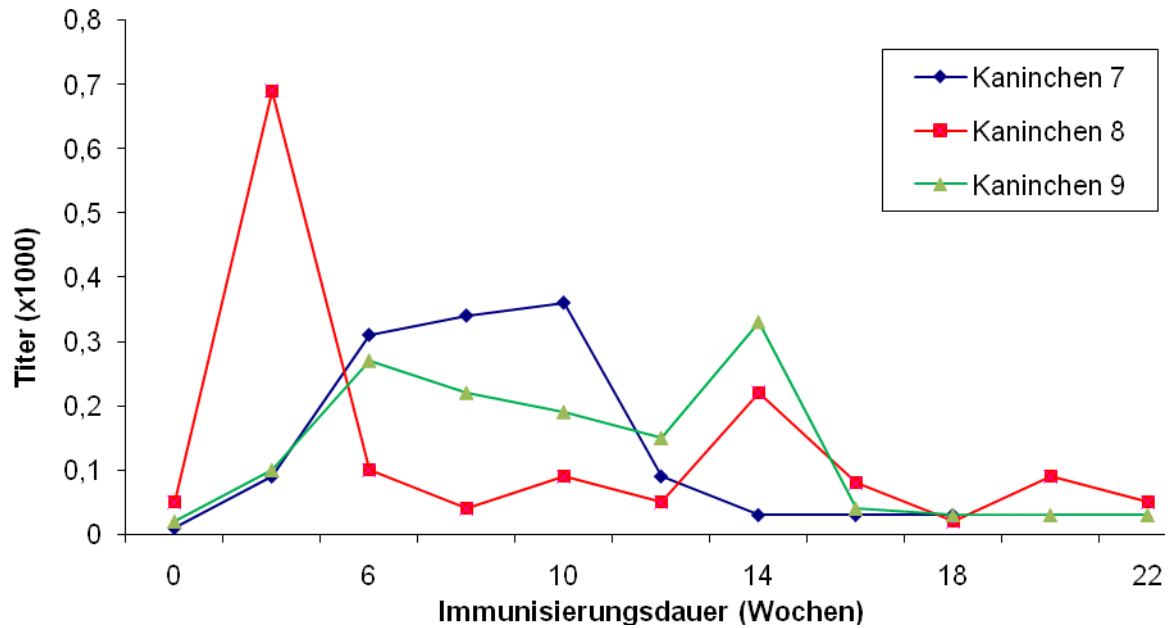


Abb. 26: Relative Antiserumtiter der beiden mit TeA-HS-BSA und des mit TeA-HS-KLH immunisierten Kaninchens nach Überprüfung im kompetitiven direkten Testsystem unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG (K7, K8, K9).

4.3.2 *Auswahl geeigneter Antiseren*

Die Antiseren wurden nach den in Kapitel 3.2.5 genannten Kriterien ausgewählt, wobei sich lediglich das Antiserum von Kaninchen K1 in der 22. Woche als geeignet erwies, da hier bei ausreichender Absorption für den Negativkontrollansatz (Leerwert) eine maximale Hemmung durch TeA erzielt werden konnte.

Alle anderen getesteten Antiseren erbrachten nur eine sehr geringe bis keine Spezifität bei hoher TeA-Konzentration (10 µg/ml), so dass diese nicht in die weiterführenden Untersuchungen mit einbezogen wurden.

4.4 Entwicklung eines kompetitiven indirekten Enzymimmuntests

Mit dem Antiserum von Kaninchen K1 (Woche 22) wurden bei der parallelen kompetitiven Titration (Hemmtitration) Versuche zur Anwendbarkeit einer indirekten Testanordnung durchgeführt (Abb. 8). Bei Verwendung von TeA-HS-BSA (aktive Estermethode) in eingesetzten Verdünnungen von 1:1.000 bis 1:96.000 sowie bei Verwendung von TeA-BSA (Mannich-Kondensation) in Verdünnungen von 1:1.000-1:31.250.000 als Beschichtungsantigene in der parallelen kompetitiven Titration (Hemmtitration) konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Zwar konnten bis zu hohen Verdünnungen der Immunreagenzien Extinktionswerte für den antigenfreien Ansatz von bis zu 3,5 Einheiten erreicht werden, es wurde jedoch keine spezifische kompetitive Inhibition durch TeA-Standardlösungen (bis 10 µg/ml Methanol) beobachtet. Geringgradige Reduktionen des Meßsignals auf höchstens 90% des Leerwertes wurden als unspezifische Reaktionen gewertet.

4.5 Entwicklung eines kompetitiven direkten Enzymimmuntestsystems (Doppelantikörpertechnik)

Bei Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit stellte sich heraus, dass lediglich bei Kaninchen K1 (Woche 22), eingesetzte Verdünnung 1:3.000 in Kombination mit TeA-HS-HRP-Konjugat (in einer Verdünnung von 1:3.000) nach Kapitel 3.2.5 praktikable Resultate erzielt werden konnten. Bei dieser Kombination wurde ein im Hinblick auf die Testrobustheit gewünschter Mindestextinktionswert von 0,5-1,0 für den toxinfreien Leerwert erreicht. Die mit diesen Verdünnungen erstellten Standardkurven für TeA, TeA-Acetat und TeA-Hemisuccinat (homologe Testanordnung) zeigten in ihren Meßbereichen deutliche Unterschiede. Die Nachweisgrenze (70%-Wert) des Tests lag für TeA-Acetat bei 5 ng/ml, die 50%-Dosis bei 23,3 ng/ml. Im Vergleich dazu lag der 50%-Wert für freie TeA (n = 5) bei 226 ng/ml (70%-Dosis: 85 ng/ml). Für TeA-Hemisuccinat (n = 2) lag der 50%-Wert bei 4,9 ng/ml (70%-Dosis: 1,89 ng/ml), Abb. 27.

Kein Unterschied zeigte sich bei Verwendung von TeA in Form des Kupfersalzes und in Reinform von verschiedenen Herstellern, wie Kapitel 4.1. Abb. 17 zu entnehmen ist.

Die Standardkurven wurden für die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit TeA-Acetat erstellt. Die Extinktion der Leerwerte lag zwischen 0,8-1,2 Einheiten, die maximale durch TeA erzielbare Inhibition lag bei ca. 0,15 Einheiten. Die Variationskoeffizienten lagen im ausgewerteten Bereich von ca. 40%-70% bei <10%.

Das Spektrum der acetylierten TeA ergab ein Absorptionsmaximum bei 195 nm und 273 nm (10 µg/ml), wobei sich das Spektrum deutlich von dem der nicht-acetylierten unterschied (Abb. 12).

Die Acetylierung der TeA erbrachte eine deutliche Verbesserung der 50%-Dosis von vorher ca. 226 ng/ml (70%-Dosis: ca. 85 ng/ml, n = 5) auf 23,3 ng/ml (70%-Dosis: 5 ng/ml, n = 25). Für das bei der Kopplung mittels aktiver Estermethode hergestellte Hemisuccinat ergab sich ein Wert von 4,9 ng/ml (70%-Dosis: 1,89 ng/ml, n = 2; Abb. 27). Bei Überprüfung der Stabilität des Acetats der TeA durch enzymimmunologische Untersuchung an verschiedenen Tagen nach der Herstellung stellte sich heraus, dass die Lösung bei Lagerung im Kühlschrank (4-7 °C) über mehrere Wochen stabil war (Tab. 11).

4 ERGEBNISSE

Tab. 11: Stabilität der TeA-Acetat-Lösung (in 5% Acetonitril/PBS) in Bezug auf den 50%-Wert der Standardkurve.

Lagerung (Tage)	50%-Wert der Standardkurve, ng/mL	
	Versuch 1	Versuch 2
0	22,1	21,6
1	21,5	–
2	18,3	–
7	–	36,0
16	–	38,1
43	–	25,8
49	–	20,2
59	–	37,4
70	–	24,4
114	–	15,7
133	–	14,5
161	–	18,6
Mittelwert ± Standardabweichung	20,6 ± 2	25,2 ± 8,9

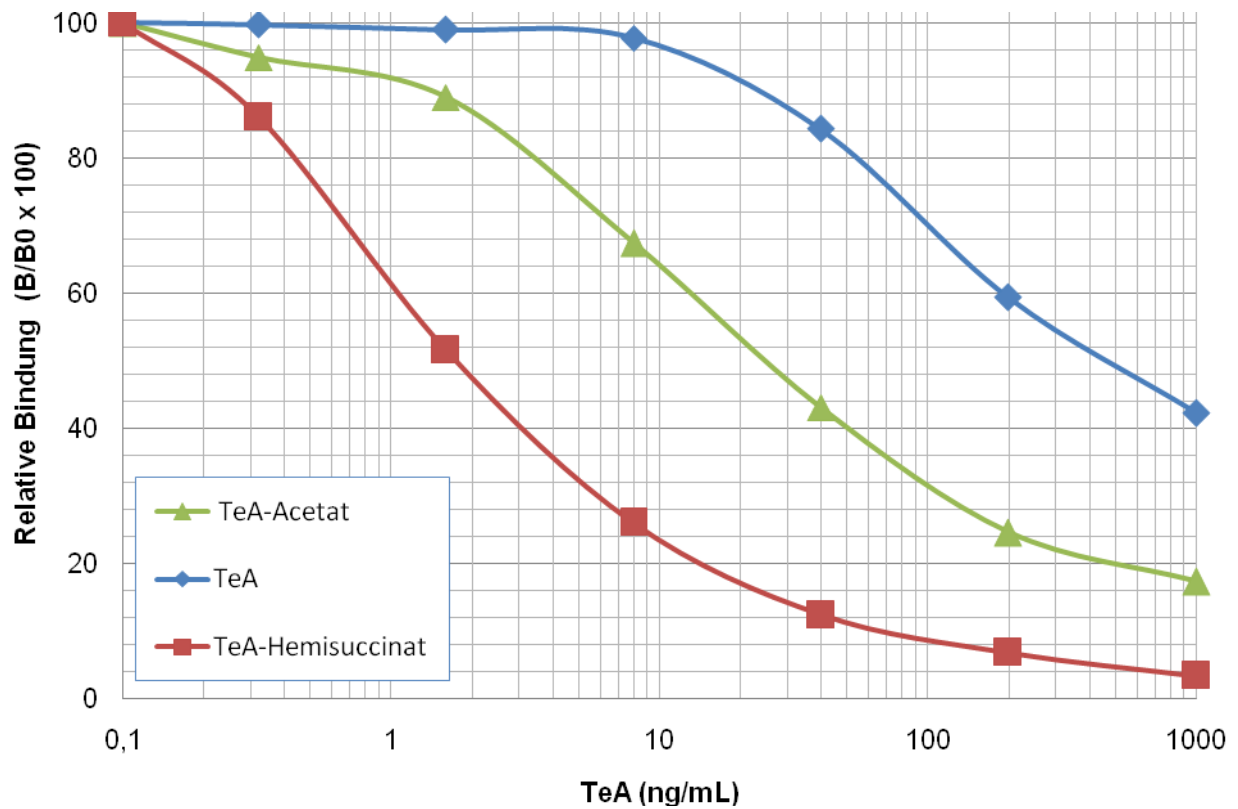


Abb. 27: Vergleich der Standardkurven des kompetitiven direkten Enzymimmuntests unter Verwendung von TeA, TeA-Acetat und TeA-HS als Standardantigenlösung (Konzentration jeweils: 1.000 ng/ml, weitere Verdünnungen in 5% Acetonitril/PBS). Die 50%-Dosen lagen bei 226 ng/ml (TeA), 23,3 ng/ml (TeA-Acetat) und 4,9 ng/ml (TeA-HS).

Tab. 12: Referenzdaten des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für TeA unter Verwendung der optimierten Kombination aus Antiserum (K1, Woche 22) und TeA-HS-HRP-Konjugat.

Parameter	
Antiserum, eingesetzte Verdünnung	1:3.000 (verdünnt in PBS)
TeA-HRP-Konjugat, eingesetzte Verdünnung	1:3.000 (verdünnt in 1% Casein/PBS)
50%-Wert der Standardkurve	
(Bereich min-max., ng/ml)	12,1-37,4
Mittelwert 50%-Wert (ng/ml)	23,3
Standardabweichung 50%-Dosis (ng/ml)	7,5
Variationskoeffizient 50%-Dosis (%)	32,2
Nachweisgrenze (70%-Wert) Standardkurve	
(ng/ml)	3-8
Mittelwert Nachweisgrenzen (ng/ml)	5,4
Standardabweichung Nachweisgrenze (ng/ml)	2
Variationskoeffizient Nachweisgrenze (%)	36,3
n	25

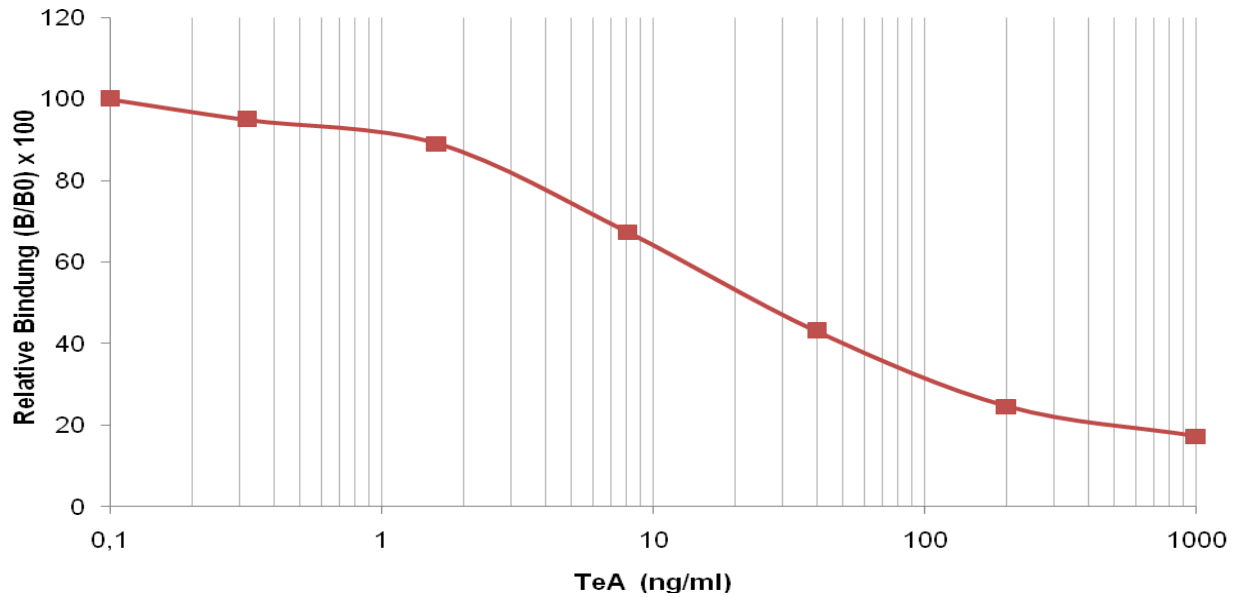


Abb. 28: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten Enzymimmuntests für TeA (nach Acetylierung) unter Verwendung von Antiserum K 1 (Woche 22), 1:3.000 in PBS und TeA-HS-Konjugat (1:3.000 in 1% Casein/PBS). Die Intra-assay-Standardabweichungen der einzelnen Standardkonzentrationen ($n = 4$) lagen bei $<10\%$, die 50%-Dosis lag bei 23,3 ng/ml. Die Nachweisgrenze lag bei 5 ng/ml. Die Extinktion des Leerwertes betrug 1,0 Einheiten, die höchste TeA-Konzentration (1 $\mu\text{g/ml}$) führte zu einem Extinktionswert von 0,13 Einheiten.

Die Untersuchung der Reaktivität des Enzymimmuntests unter Verwendung von K 1 (Woche 22) im direkten kompetitiven Testsystem ergab, dass der Test hochspezifisch für TeA (Acetat) war. Es konnte keine Kreuzreaktion mit AOH, AME und ALT (jeweils in Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$) festgestellt werden.

4.6 Anwendbarkeit des Nachweisverfahrens unter Verwendung von künstlich und natürlich kontaminierten Probenmaterialien

4.6.1 Nachweis von TeA in Apfelsaft

Bei der Extraktion wurde zu Beginn der Versuchsphase eine zweifache Ausschüttelung mit Ethylacetat durchgeführt, wobei in der ersten Phase bereits deutlich >85% der zugegebenen TeA gefunden wurde, weswegen danach mit einer einfachen Ausschüttelung gearbeitet wurde.

Die für den direkten simultanen EIA ermittelten Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Apfelsaft sind in Tab. 13 dargestellt. Die künstlich kontaminierten Proben wurden im Vierfachansatz eingesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen in Bereichen zwischen 77,5 und 129,7%. Die Variationskoeffizienten reichten von 24,6 bis 35,8% und damit in einem zufriedenstellenden Bereich.

Von den sieben untersuchten Apfelsaftproben wies eine Probe einen Wert von durchschnittlich 58 ng/ml TeA auf. In den anderen Proben konnte keine TeA nachgewiesen werden (Tab. 17). Hier ergab sich unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des Testsystems sowie des sich aus der Extraktion ergebenden Faktors eine Nachweisgrenze von 25 ng/ml.

Tab. 13: Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminierten Apfelsaftproben (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert).

TeA-Zusatz (ng/ml)*	Ergebnis TeA				n
	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
50	65,4	16,1	24,6	129,7	5
100	103,9	37,2	35,8	103,9	7
500	387,8	100,9	26,0	77,5	6

*Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde TeA-Acetat verwendet.

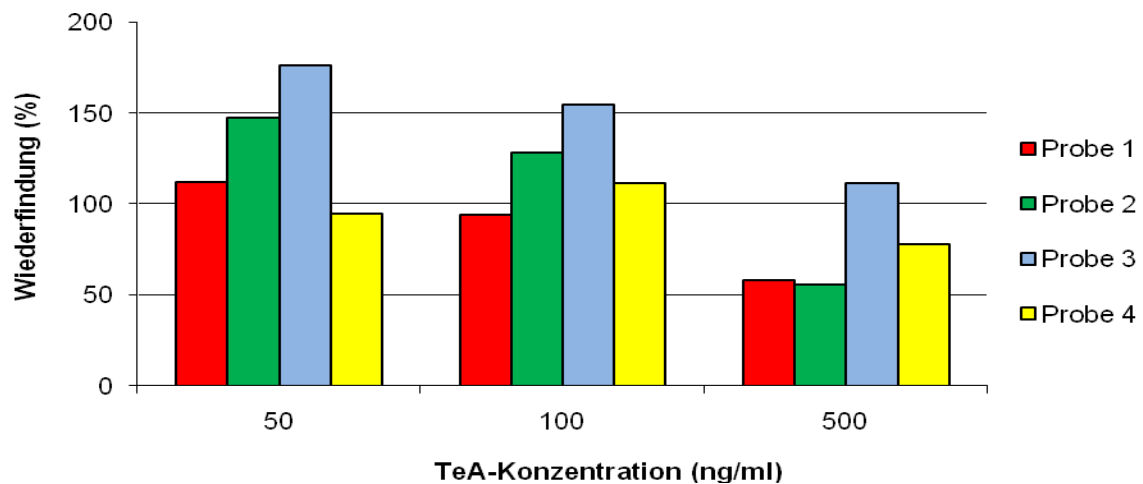


Abb. 29: Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in vier künstlich kontaminierten Apfelsaftproben.

4.6.2 Nachweis von TeA in Tomatenerzeugnissen

Die mit Hilfe des kompetitiven direkten Enzymimmuntests ermittelten Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Tomatensaft (Tab. 14) lagen zwischen 59,5% und 112,7%, die Variationskoeffizienten betragen 28,5% bis 56%.

Die Messergebnisse für acetylierte und nicht-acetylierte Tomatensaftproben unterschieden sich signifikant. Es wurde bei einer natürlich kontaminierten Probe nach Acetylierung (216,9) ein ca. fünffach höherer Wert als für die nichtacetylierten Probe (46,1 ng/ml) gefunden, was mit den Beobachtungen bezüglich der Nachweisgrenze von acetylierter TeA übereinstimmt. Demzufolge wurden die Proben grundsätzlich acetyliert eingesetzt, wodurch zwar die Extraktion aufwendiger wurde, allerdings ein Selektivitätsgewinn bezüglich der Aussagekraft zum tatsächlichen Vorhandensein von TeA in den Proben erzielt werden konnte.

Von den insgesamt 15 untersuchten Tomatensäften wiesen drei Proben TeA-Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze auf. Die Untersuchung der TeA-Belastung wurde mehrfach wiederholt, wobei jeweils Konzentrationen >50 ng/ml nachgewiesen werden konnten. Für die einzelnen Proben wurden durchschnittlich 61,3 ng/ml; 103,6 ng/ml und 226,8 ng/ml TeA nachgewiesen (Tab. 17). Die Nachweisgrenze für dieses Testsystem (wiederum

4 ERGEBNISSE

zusammengesetzt aus Nachweisgrenze des Tests und sich aus der Extraktion ergebendem Faktor) betrug für Tomatensaft 50 ng/ml.

Tab. 14: Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminierten Tomatensaftproben (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert).

TeA-Zusatz (ng/ml)*	Ergebnis TeA				n
	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
50	56,4	27,1	48,1	112,7	3
100	97,3	54,5	56	97,3	3
500	430,4	235,8	54,8	86	6
1.000	594,6	169,6	28,5	59,5	5

*Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde TeA-Acetat verwendet.

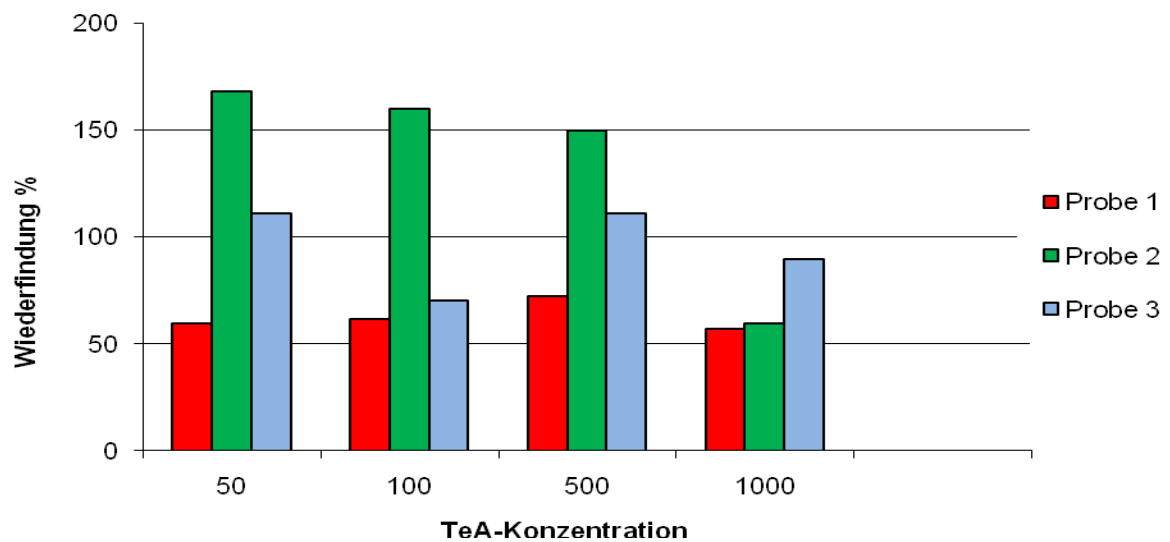


Abb. 30: Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/ml) in drei künstlich kontaminierten Tomatensaftproben.

4 ERGEBNISSE

Für die Tomatenketchup-Proben ergaben sich Wiederfindungsraten zwischen 34,2% und 136,1%, bei Variationskoeffizienten zwischen 23,9% und 42%. Die Wiederfindungsraten sind in Tab. 15 dargestellt. Die Nachweisgrenze für den Test bei Untersuchung von Ketchup-Proben lag bei 40 ng/g.

Von den insgesamt 18 untersuchten Tomatenketchup-Proben waren zwei Proben TeA-positiv, die Gehalte lagen bei durchschnittlich 55,2 ng/g und 67,3 ng/g (siehe auch Tab. 17).

Tab. 15: Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Tomatenketchup (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert).

TeA-Zusatz (ng/ml)*	Ergebnis TeA			Wiederfindung (%)	n
	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)		
100	136,1	32,6	23,9	136,1	3
500	227,1	95,4	42	45,2	4
1.000	435,8	127,5	29,3	43,6	4
2.000	683	215,1	31,5	34,2	3

*Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde TeA-Acetat verwendet.

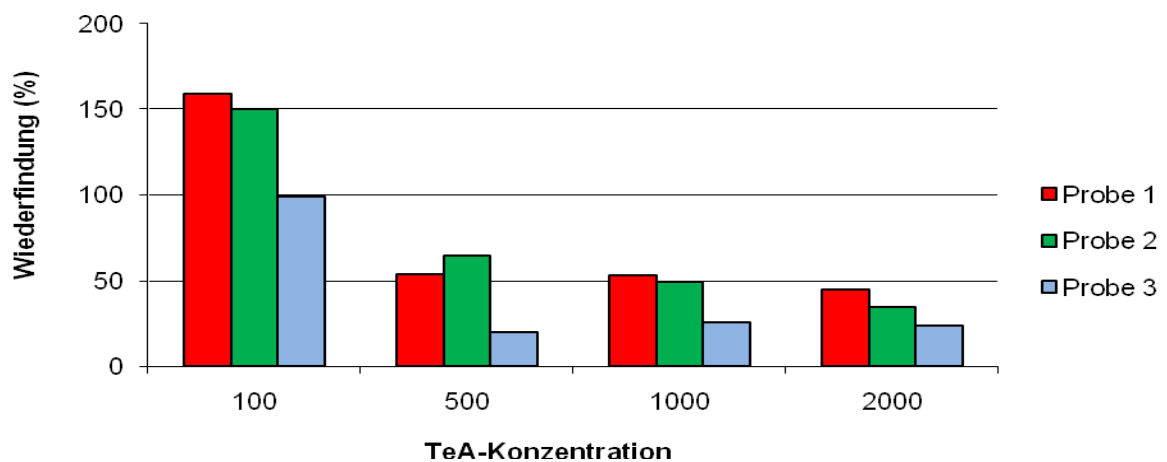


Abb. 31: Vergleich der prozentualen Wiederfindung (%) von TeA bei verschiedenen Dotierungsniveaus in künstlich kontaminiertem Tomatenketchup.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Versuche zur Wiederfindung in künstlich kontaminiertem Tomatenmark sind in Tab. 16 dargestellt. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 43,6% und 57,3% bei Variationskoeffizienten zwischen 16,7% und 32,3%.

Für die Untersuchung einer möglichen TeA-Belastung wurden zehn Tomatenmarkproben herangezogen. Es ergab sich für diese Probenmatrix eine sehr hohe Nachweisgrenze von ca. 150 ng/g, was vermutlich auf die starke (bis zur dreifachen) Aufkonzentration der Probe zurückzuführen war. Bei Auswertung der niedrigen Verdünnungen ergaben sich deutliche Probenmatrixeffekte. Keine der zehn Proben wies TeA-Gehalte von mehr als 154 ng/g auf.

Tab. 16: Wiederfindungsraten für TeA in künstlich kontaminiertem Tomatenmark (Messwert für den Toxingehalt des Ausgangsmaterials subtrahiert).

TeA-Zusatz (ng/ml)*	Ergebnis TeA				n
	Mittelwert (ng/ml)	s (ng/ml)	VK (%)	Wiederfindung (%)	
500	287	92,6	32,3	57,3	4
1.000	507,6	191,7	20	50,8	4
2.000	871	145,6	16,7	43,6	3

*Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde TeA-Acetat verwendet.



Abb. 32: Wiederfindung (%) von TeA bei unterschiedlichen Dotierungen (ng/g) in drei künstlich kontaminierten Tomatenmarkproben.

Tab. 17: Nachweis von TeA in verschiedenen Lebensmitteln

Probenart	n	n positiv	Mittlerer nachgewiesener Gehalt an TeA ng/ml bzw. ng/g
Apfelsaft	7	1	58
Tomatensaft	15	3	61,3; 103,6; 226,8
Tomatenketchup	18	2	55,2; 67,3
Tomatenmark	10	0	-

4.6.3 Untersuchung von natürlich verschimmelten Tomaten auf TeA

Alle frischen, makroskopisch einwandfreien Tomaten ergaben im Enzymimmuntest TeA-negative Ergebnisse. Bei einer frischen Tomate, die zwei Wochen im Brutschrank gelagert worden war und die in dieser Zeit einen weiß-grauen Schimmelrasen entwickelte, ergab sich nach mikroskopischer Untersuchung kein Hinweis auf *Alternaria*-Sporen, im Enzymimmuntest war keine TeA-Produktion nachweisbar. Bei den drei Tomatenproben, die bereits mit schwarzen Flecken gekauft worden waren und die weitere 2-4 Wochen gelagert worden waren, konnten im Enzymimmuntest teilweise sehr hohe TeA-Gehalte bestimmt werden. Sie lagen (bezogen auf das Fruchtfleisch) bei 82,9 ng/g bis zu 476,2 ng/g (Tab. 18). In diesen Fällen waren auch mikroskopisch *Alternaria*-Sporen erkennbar. Die aus den Tomaten mit erhöhten TeA-Gehalten angezüchteten Schimmelpilze (auf Malz-Agar, mindestens 7 Tage bebrütet bei 25 °C) wiesen TeA-Gehalte von 466 ng/g (Probe 5) bzw. von 210.000 ng/g Pilzmycel (Probe 7) auf. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung ist in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Übersicht der Ergebnisse der untersuchten Tomatenproben

	Probe	TeA-Konzentration der Frucht ng/g	TeA-Konzentration im angezüchteten Schimmel ng/g	Mikroskopischer Nachweis von <i>Alternaria</i> -Sporen
1	Tomate, schwarze Flecken, zwei Wochen gelagert bei Raumtemperatur	82,93	n. n.	n. d.
2	Tomate, frisch	n. n.	n. d.	n. d.
3	Tomate, kleine schwarze Stellen, drei Tage gelagert bei Raumtemperatur	n. n.	n. n.	n. n.
4	Tomate, frisch, zwei Wochen gelagert im Brutschrank	n. n.	n. n.	n. n.
5	Tomate, mit schwarzen Flecken, vier Wochen gelagert im Kühlschrank	439,53	466	+
6	Tomate, frisch	n. n.	n. d.	n. d.
7	Tomate, mit schwarzen Flecken, vier Wochen gelagert bei Raumtemperatur	476,23	210.000	+

n.n. = nicht nachweisbar

n.d. = nicht durchgeführt

+ = *Alternaria*-Sporen nachweisbar



Abb. 33a: Versimmelte Tomaten (Außenansicht, Probe 5). Der TeA-Gehalt lag bei 440 ng/g.



Abb. 33b: Versimmelte Tomate (Innenansicht, Probe 5)

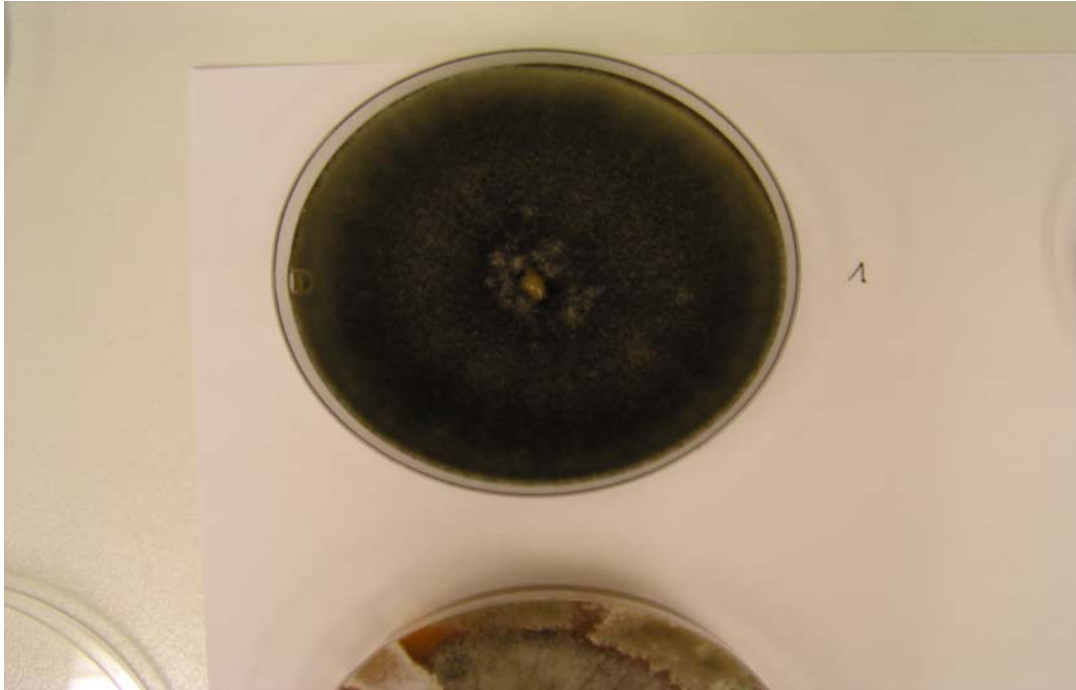


Abb. 34a: *Alternaria* spp. aus einer Probe der oben abgebildeten Tomaten (Probe 5), angezüchtet auf Malzextraktagar (acht Tage bebrütet bei 25 °C)



Abb. 34b: Konidiosporen von *Alternaria* spp., aus Pilzmycel, Isolat aus Probe 5 (40fache Vergrößerung)

4.6.4 Untersuchung von Schimmelpilz-Kulturmateriale auf TeA

Zur orientierenden Untersuchung des TeA-Bildungsvermögens verschiedener Schimmelpilzspezies bzw. zur Prüfung einer möglichen Beeinflussung des Enzymimmuntests durch unspezifische Schimmelpilzmetaboliten wurden fünf Spezies (Tab. 19) in Flüssigmedium bzw. auf Malzextrakt-Agar angezüchtet. In Flüssigmedium konnte für keine Spezies TeA-Bildung nachgewiesen werden, auch nicht für die geprüfte *Alternaria*-Kultur. Auf Festmedium ergab sich für *Alternaria* spp. ein positiver TeA-Befund, während die anderen Spezies ein TeA-negatives Ergebnis erbrachten. Bei der Untersuchung im Enzymimmuntest ergab sich für die *Alternaria* spp. ein TeA-Gehalt von ca. 130.000 ng/g Pilzmycel bei einer Nachweisgrenze von 4000 ng/g.

Tab. 19: Übersicht über die Ergebnisse des TeA-Nachweises in verschiedenen Schimmelpilzspezies

Pilzspezies	TeA-Produktion in Bouillon	TeA-Produktion auf Agar
<i>Alternaria</i> spp.	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
<i>Aspergillus candidus</i>	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	-	-

5 DISKUSSION

Ob oder ob nicht unter realen Bedingungen eine potentielle Gefährdung von Mensch und Tier durch die Aufnahme von *Alternaria*-Toxinen vorliegt, ist zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend unklar. Nur für wenige Toxine liegen brauchbare Daten vor (MILLER et al., 1963; WOODY und CHU, 1992; YEKELER et al., 2001). Im Vergleich zu anderen Mykotoxinen ist die akute Toxizität recht gering. So liegt auch eine Risikobewertung von TeA derzeit nicht vor.

Als problematisch ist jedoch die weite Verbreitung und die häufig hohe Kontamination von Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs mit TeA zu beurteilen. Die Bedeutung einer möglichen chronischen Belastung des Verbrauchers mit diesem Toxin ist zur Zeit noch nicht abschätzbar. Es wurde versucht, eine Verbindung zwischen *Alternaria*-befallener Hirse mit dem Auftreten mit Speiseröhrenkrebs in China herzustellen (LIU et al., 1991). Gestützt wird diese These durch einen Fütterungsversuch von YEKELER et al. (2001), die zeigten, dass eine Langzeitfütterung von TeA bei Mäusen zu präkanzerogenen Veränderungen der Mukosa der Speiseröhre führte. Darüber hinaus wurde von STEYN und RABIE (1976) das Auftreten der durch Thrombozytopenie gekennzeichneten Erkrankung „Onyalai“ in Afrika mit dem Verzehr mit TeA-kontaminierter Hirse in Verbindung gebracht.

In einer Stellungnahme des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) aus dem Jahr 2003 wird auf die möglichen Gefahren der *Alternaria*-Toxine verwiesen, gleichzeitig aber auch konstatiert, dass die Datenlage zur Zeit nicht ausreiche, um eine Risikoabschätzung vorzunehmen. So seien weitere Untersuchungen der Exposition sowie der Toxikologie dieser Toxine erforderlich. Auch dies zeigt die Notwendigkeit der Entwicklung schneller und einfacher Testsysteme für die Toxine der *Alternaria*-Gruppe. In einem Technical Report der EFSA (BATTILANI et al., 2008) mit Informationen über *Alternaria*-Toxine gaben die Autoren einen Ausblick über ein weiteres Vorgehen bezüglich dieser Schimmelpilze. Sie schlugen die Entwicklung validierter Methoden zum Nachweis von *Alternaria*-Metaboliten vor, ebenso wie Untersuchungen über das Auftreten von *Alternaria*-Toxinen, um ein Risiko des Verbrauchers soweit wie möglich zu minimieren (BATTILANI et al., 2008). Daneben wird von mehreren Autoren, die sich mit Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria* und deren Metaboliten auseinandersetzten, die Notwendigkeit der Überwachung von Lebensmitteln wegen des ubiquitären Vorhandenseins der Toxine in teilweise hohen Konzentrationen erwähnt (BARKAI-GOLAN und PASTER, 2008; LOGRIECO et al., 2009).

Die bisher zum Nachweis von TeA verwendeten Methoden sind hauptsächlich physikalisch-chemischer Natur, was neben teuren Materialien und einem hohen Zeitaufwand auch geschultes Personal verlangt. Eine schnelle vor-Ort-Analytik ist mit diesen Verfahren nicht möglich. Darüber hinaus ist der Verbrauch an organischen Lösungsmitteln verhältnismäßig hoch. Enzymimmunologische Verfahren erlauben einen großen Probendurchsatz bei hoher Sensitivität und sind dabei kostengünstig und einfach durchzuführen (CHU, 1996).

5.1 Synthese von TeA-Proteinkonjugaten

Für die Synthese von Toxin-Protein- beziehungsweise Toxin-Enzym-Konjugaten wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Verfahren in für eigene Zwecke angepasster Form eingesetzt. Hierbei handelte es sich um Methoden, mit denen normalerweise gute Kopplungsraten erzielbar sind (MÄRTLBAUER et al., 1988; USLEBER, 1991; ABRAMSON et al., 1995; USLEBER et al., 2008; LATIF et al., 2009).

Mittels UV-Spektrometrie erfolgte eine qualitative Beurteilung des Kopplungserfolges, die allerdings sehr vorsichtig zu interpretieren ist, da die Spektren der Toxinkonjugate durch eine Überlagerung der Spektren von Toxin und Protein „maskiert“ wurden. Zudem ist bereits durch die durchgeführten Kopplungsmethoden eine Veränderung der UV-Absorptionseigenschaften des Trägerproteins wahrscheinlich.

Aufgrund der Tatsache, dass die Orientierung von TeA am Trägermolekül unbekannt ist und bisher weder Kopplungsmethoden für TeA noch sich daraus ergebene Spektren beschrieben wurden, konnte ein praktisch relevanter Erfolg der Konjugation nur im Enzymimmuntest selbst gezeigt werden.

5.2 Antikörper gegen TeA und Entwicklung des enzymimmunologischen Nachweisverfahrens

Im Verlauf der Arbeit stellte sich eine relativ schwache Immunogenität von TeA-Protein-Konjugaten heraus. Da eine Nutzung von TeA-Protein-Immunogenen bisher nicht beschrieben wurde, lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob es sich hierbei um eine generelle, für TeA-Protein-Konjugate charakteristische Eigenschaft handelt. Die Schwierigkeiten bei der Immunisierung mit diesem Immunogen sind neben der geringen Größe des Moleküls unter Umständen auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass TeA *per se* ein sehr instabiles Molekül ist. Es sind verschiedene Umlagerungsreaktionen möglich, was auch bereits von ROSETT et al. (1957) und STICKINGS (1959) beschrieben wurde. Die Tatsache, dass TeA als Molekül nicht in Reinform, sondern in Form des Kupfersalzes vorlag, könnte auch Auswirkungen auf die Immunogenität gehabt haben, allerdings ist durch diese Form als Chelatkomplex eine größere Stabilität des Toxins gewährleistet (ROSETT et al., 1957). JOHN et al. (1991) beschrieben die Herstellung von TeA-Proteinkonjugaten. Sie verwendeten dazu eine gemischte Anhydridmethode. Eine Immunisierung von Versuchstieren zur Herstellung polyklonaler Antikörper ist in dem Zusammenhang auch später nicht beschrieben worden. Ob eine Immunisierung vorgenommen wurde, ist nicht bekannt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Herstellung von immunogenen TeA-Konjugaten schwierig ist.

In eigenen Untersuchungen scheiterten Versuche zur Produktion von Anti-TeA-Antikörpern in Kaninchen durch Immunisierung mit einem TeA-KLH (Mannich-Kondensation)-Konjugat ebenso wie die Immunisierung mit TeA-HS-KLH (bei drei von vier Tieren) und TeA-HS-BSA (bei zwei von zwei Tieren). Lediglich im Serum eines Tieres konnte ein Antikörpertiter nachgewiesen werden, der für die weiteren Untersuchungen ausreichend war.

Bei der vergleichenden Überprüfung von TeA und TeA-Derivaten im Enzymimmuntest fiel auf, dass die polyklonalen Antikörper gegen TeA nur mäßig empfindlich für freie TeA (50%-Dosis: 226 ng/ml; 70%-Dosis: 85 ng/ml, n = 5), aber sehr empfindlich für acetylierte TeA (50%-Dosis: 23,3 ng/ml, 70%-Dosis: 5 ng/ml, n = 25) waren. Die stärkste Reaktivität jedoch wurde für TeA-Hemisuccinat festgestellt (50%-Dosis: 4,9 ng/ml, 70%-Dosis: 1,89 ng/ml, n = 2). Als Kompromißlösung wurde für die Testetablierung das TeA-Acetat bzw. die Probenacetylierung eingesetzt. Hiermit konnte eine ausreichende Empfindlichkeit bei

gleichzeitigem Selektivitätsgewinn erzielt werden. Der Anti-TeA-Antikörper reagierte ca. zehnfach empfindlicher mit TeA-Acetat als mit freier TeA. Das Protokoll zur Acetylierung von in der Probe enthaltenem Toxin wurde in Anlehnung an frühere Arbeiten (USLEBER und MÄRTLBAUER, 1998) etabliert, es erwies sich für Tomaten- und Apfelprodukte als praktikabel. Die Verwendung des Hemisuccinates hätte zwar eine weitere Verbesserung der 50%-Dosis und damit auch der mittleren relativen Nachweisgrenze zur Folge gehabt, jedoch ist die Herstellung des Hemisuccinates deutlich aufwendiger. Aus diesen Gründen wurde der Acetylierung von TeA der Vorzug gegeben.

Bei der Durchführung eines Enzymimmuntests ist zu beachten, dass viele Parameter die Qualität des Tests beeinflussen können. So kann bereits derselbe Test bei Durchführung von unterschiedlichen Personen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Auch spielt bisweilen die Temperatur eine nicht unerhebliche Rolle. Um aber dennoch eine verlässliche Aussage treffen zu können, und einer Fehlinterpretation von Messergebnissen vorzubeugen, wurden nur Extinktionen $\geq 40\%$ und $\leq 70\%$ des toxinfreien Ansatzes herangezogen, die in beinahe allen Fällen Anfang und Ende des linearen Bereiches darstellten. Hierdurch ergab sich im Zuge der Untersuchung der Lebensmittelproben über einen Zeitraum von einem halben Jahr eine durchschnittliche Nachweisgrenze von 5 ng/ml Pufferlösung. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Faktoren bei der Probenaufbereitung ergaben sich unterschiedliche Nachweisgrenzen für die einzelnen Lebensmittelproben: 25 ng/ml für Apfelsaft, 40 ng/ml für Tomatenketchup, 50 ng/ml für Tomatensaft und 154 ng/ml für Tomatenmark.

Diskutiert man die Nachweisempfindlichkeit dieses Tests im Hinblick auf die zulässige „Höchstmenge“, ergeben sich einige Schwierigkeiten, da keine Risikobewertung der *Alternaria*-Toxine im Allgemeinen und von TeA im Speziellen vorliegt. TeA nimmt zudem durchaus eine Sonderstellung in der *Alternaria*-Mykotoxin Gruppe ein, da sie das einzige Tetransäurederivat ist (WEIDENBÖRNER, 2001). Für andere Mykotoxine sind bereits Grenzen festgelegt, beispielsweise für das Mykotoxin Patulin, welches von Pilzen der Gattung *Penicillium griseovulvum* gebildet wird. Dabei handelt es sich um eine Substanz mit einer verhältnismäßig niedrigen LD₅₀-Dosis von 35 ng/ml, für die ein Grenzwert in Apfelsaft- und Spirituosen aus Äpfeln von 50 ng/ml festgelegt wurde (ABRAMSON et al., 1995), für feste Apfelerzeugnisse, die für den direkten Verzehr bestimmt sind, 25 ng/ml, für Säuglingsnahrung von 10 ng/ml (VO (EG) Nr. 1881/2006). Da zunächst einmal nicht davon ausgegangen werden kann, dass TeA in seiner Wirkung wesentlich kritischer als Patulin zu

beurteilen ist, ergibt sich durch dessen Grenzwert eine zumindest hypothetische Bezugsgröße, von der aus sich die Gehalte von TeA in den untersuchten Proben beurteilen lassen.

Da TeA neben den pflanzlichen Ausgangsprodukten (u.a. Äpfel, Tomaten) auch in den daraus hergestellten Produkten wie Säften, Ketchup oder Tomatenmark auftritt (STACK et al., 1985; MISLIVEC et al., 1987; DA MOTTA und VALENTE SOARES, 2001; TERMINELLO et al., 2006; OSTRY, 2008), könnte das immunologische Nachweisverfahren für die Untersuchung von Obst- und Gemüse-basierenden Lebensmitteln eine wichtige Rolle spielen.

Die Anwendbarkeit des entwickelten Testsystems für TeA wurde zunächst anhand künstlich kontaminierter Apfelsäfte, Tomatensäfte, Tomatenmark- sowie Ketchup-Proben überprüft. Für die Untersuchung erfolgte zunächst eine Acetylierung, da sich bei Überprüfung der Toxinstandards und Einsatz von acetylierter TeA im Testsystem herausstellte, dass die Antikörper bis zu zehnfach empfindlicher auf acetylierte im Vergleich zu nichtacetylierter TeA reagierten. Zwar ist die Probenaufbereitung aufwendiger, allerdings ergibt sich dadurch ein Selektivitätsgewinn. Bei Einsatz acetylierter und nicht-acetylierter Proben ergaben sich im Enzymimmuntest stets ca. zehnfach höhere Toxingehalte für die acetylierten Proben, was die relative Kreuzreaktivität des Acetats widerspiegelt. Die Wiederfindungsraten für TeA (nach Acetylierung) in Apfelsaft in einem Dotierungsbereich von 50-500 ng/ml lagen zwischen 78% und 130%, die für Tomatensaft in einem Dotierungsbereich von 50-1.000 ng/ml zwischen 60% und 113%, die für Tomatenmark zwischen 44% und 57% in einem Dotierungsbereich zwischen 500-2.000 ng/g und die für Tomatenketchup zwischen 34% und 136% in einem Dotierungsbereich zwischen 100-2.000 ng/g.

Die praktische Anwendbarkeit des entwickelten EIA für TeA wurde darüber hinaus an einigen im Lebensmitteleinzelhandel erworbenen Proben untersucht, um eine Orientierung über das Vorhandensein und die Konzentration des Toxins zu erhalten.

Bei den Apfelsaftproben wies eine von sieben Proben ein positives Ergebnis für TeA von 58 ng/ml auf, was unter Verwendung der „Patulin-Nachweisgrenze“ als Bezugsgröße durchaus als relevant zu bewerten ist, wenn man davon ausgeht, dass der Pro-Kopf-Verbrauch in der Bundesrepublik Deutschland an Apfelsaft im Jahre 2009 bei 8,5 Liter lag (<http://www.fruchtsaft.net>). Bei den Tomatensäften wiesen drei von 15 untersuchten Proben ein Ergebnis in einem Konzentrationsbereich zwischen 61 ng/ml und 227 ng/ml auf, bei den

Ketchup-Proben waren zwei von 18 Proben mit Werten von 55 ng/g und 67 ng/g belastet. In keiner der zehn untersuchten Tomatenmarkproben war TeA nachweisbar. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Extraktionsmethode, die für die anderen Probenmatrices brauchbare Wiederfindungen lieferte, für die hoch konzentrierte Probenmatrix Tomatenmark nur eingeschränkt geeignet zu sein schien. Die Nachweisgrenze lag bei dieser Probenmatrix aus rechnerischen Gründen (höhere Probenextraktverdünnung) bei 154 ng/g, wodurch eine Aussage über das tatsächliche Vorhandensein von TeA in niedrigeren aber möglicherweise relevanten Konzentrationen nicht möglich war. Da Tomatensaft beispielsweise mit einem Absatz von ca. 46 Millionen Litern im Jahre 2008 (<http://www.fruchtsaft.net>) zu den beliebtesten Gemüsesäften zählt, sind die darin gefundenen, teilweise sehr hohen Werte durchaus als kritisch zu bewerten. In Untersuchungen von DA MOTTA und VALENTE SOARES (2001) wurden ebenfalls Tomatenprodukte auf deren Gehalte an TeA untersucht, es wurden dabei Toxingehalte bis zu 178 ng/g detektiert, was mit den eigenen Untersuchungen weitestgehend übereinstimmt. STINSON et al. (1980, 1981) stellten höhere TeA-Gehalte in Tomaten als in Apfelprodukten fest, was bei den eigenen Untersuchungen ebenfalls zu beobachten war. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen konnten OZCELIK et al. (1990) weder in Äpfeln noch in Tomaten TeA detektieren.

In einer Untersuchung über das Vorkommen von TeA in „natürlich“ verschimmelten Tomaten, die bereits mit schwarzen, punktförmigen Läsionen in Lebensmittelgeschäften des deutschen Einzelhandels gekauft worden waren, wurde das Toxin in den verschimmelten Früchten in Konzentrationen bis zu 480 ng/g Fruchtgewebe und in den auf Malzagar angezüchteten Schimmelpilzen in Konzentrationen von bis zu 210.000 ng/g Pilzmycel detektiert. Diese hohen Werte stimmen mit Ergebnissen anderer Autoren überein. So fanden STINSON et al. (1980, 1981) in natürlich und künstlich kontaminierten Tomaten TeA-Gehalte bis zu 1.373.000 ng/g, wobei diese sehr hohen Werte in künstlich kontaminierten Tomaten auftraten. LOGRIECO et al. (1988) untersuchten natürlich kontaminierte Tomaten aus einer Region in Süditalien und fanden dort TeA in Konzentrationen bis zu 7.200 ng/g.

Bei den auf Obst- und Gemüsebasis produzierten Lebensmitteln liegt die Gefahr der Toxinaufnahme weniger im Verzehr der ganzen Früchte, da der Verbraucher mit *Alternaria* befallene Lebensmittel aufgrund des unappetitlichen Aussehens nicht zu sich nehmen würde. Kritischer sind daraus hergestellte Produkte zu beurteilen, weil unter Umständen verschimmelte Früchte nach der Verarbeitung nicht mehr als solche erkannt werden, das

Toxin aber dennoch vorhanden ist (BARKAI-GOLAN und PASTER, 2008). Vor allem bei Äpfeln erscheint die Tatsache problematisch, dass der Fäulnisprozess zumeist vom Kern ausgeht. Somit ist ein Verderb von außen oftmals nicht ersichtlich, und da bei der Produktion von Apfelsaft ganze Äpfel verarbeitet werden, ist davon auszugehen, dass faule Früchte mitverarbeitet werden (JACKSON und AL TAHER, 2008). Bei Tomaten ist zwar der Fäulnisprozess von außen bereits erkennbar, aber die hohen Gehalte an TeA in einigen Tomatensaftproben lassen auf eine Mitverarbeitung verschimmelter Tomaten in diesen Produkten schließen. Bei Untersuchungen von STACK et al. (1985) und MISLIVEC et al. (1987) wurden Tomatenproben untersucht, die aus Ketchup-Fabriken stammten. Dabei konnte in den Tomaten regelmäßig TeA in Konzentrationen bis zu 69.700 µg/kg gefunden werden. Die Autoren sahen diese TeA-Gehalte als mögliche Indikatoren für eine Verarbeitung verfaulter Tomaten an, da sie davon ausgingen, dass auch im Endprodukt Tomatenketchup noch Mykotoxinrückstände gefunden werden könnten. In den eigenen Untersuchungen konnte in zwei der untersuchten Tomatenketchup-Proben TeA-Konzentrationen von 55,2 ng/g und 67,3 ng/g nachgewiesen werden. Insgesamt wurde bei den eigenen Untersuchungen zur Vorkommenshäufigkeit von TeA in Apfel- und Tomatenprodukten aus dem deutschen Einzelhandel regelmäßig TeA nachgewiesen, wenngleich nur in zwölf Prozent der 50 untersuchten Proben. Um eine Aussage bezüglich der Befallshäufigkeit und damit verbundenen Toxinaufnahme durch den Verbraucher treffen zu können, sollte eine wesentlich größere Probenanzahl untersucht werden. Die eigenen Untersuchungen bestätigen, dass hier offensichtlich Handlungsbedarf besteht. Die kürzlich von ASAM et al. (2012) veröffentlichten Daten bestätigen dies ebenfalls. Bei allen Spekulationen über ein mögliches Verbraucherrisiko sollte jedoch immer auch bedacht werden, dass keine ausreichenden toxikologischen Daten, gerade im Hinblick auf die Metabolisierung dieses Toxins im menschlichen Organismus, vorliegen. Inwieweit TeA überhaupt bei oraler Aufnahme die Darmschranke passiert und welche Wirkungen das Toxin im menschlichen Körper entfaltet, ist nicht bekannt. Diesbezügliche Studien wären für eine Risikobewertung dringend notwendig.

Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals die Herstellung von Antikörpern gegen das Mykotoxin TeA sowie die Entwicklung eines praktikablen enzymimmunologischen Nachweissystems. Die Anwendbarkeit für Rückstandsuntersuchungen in Lebensmitteln konnte mittels künstlich kontaminierter Lebensmittelproben (Apfelsaft, Tomatensaft, Tomatenmark, Tomatenketchup) sowie anhand

von Untersuchungen zum Auftreten des Mykotoxins in Apfel- und Tomatenprodukten des deutschen Einzelhandels belegt werden. Positive Toxinnachweise sollten aber dennoch zur Absicherung mit einer anderen Methode überprüft werden. Hierbei könnten z.B. flüssigkeitschromatographische Methoden, insbesondere die LC-MS/MS zum Einsatz kommen.

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Enzymimmuntest kann einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der analytischen Möglichkeiten für TeA leisten. Weitere Arbeiten sollten auf eine Verbesserung der Nachweisgrenze, beispielsweise durch Optimierung der Extraktionsmethoden (insbesondere für konzentrierte Probenmatrices wie Tomatenmark) abzielen. Weitere Untersuchungen natürlich kontaminierter Probenmaterialien wären für eine Aussage zur Belastung von Lebensmitteln mit diesem Toxin sinnvoll, auch um eine fundierte Expositionsabschätzung zu ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum quantitativen Nachweis von Tenuazonsäure (TeA), einem Mykotoxin der *Alternaria*-Gruppe, in Apfel- und Tomatenprodukten.

Zur Herstellung eines immunogenen Toxin-Protein-Konjugates und eines enzymmarkierten Antigens wurde TeA zunächst mittels Bernsteinsäureanhydrid derivatisiert. Für die Kopplung dieses Toxinderivates an Trägerprotein (Hämocyanin, KLH) zur Immunogensynthese sowie an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) zur Herstellung eines markierten Antigens wurde eine aktive Estermethode verwendet.

Nach Immunisierung von Kaninchen mit TeA-KLH konnten Antikörper gegen TeA gewonnen werden. Die Immunantwort wurde mittels eines kompetitiven direkten Enzymimmuntest (Doppelantikörpertechnik unter Verwendung von Anti-Kaninchen-IgG) untersucht. Die Spezifität wurde durch Vergleich von TeA-Standardlösung mit anderen relevanten Substanzen getestet. Das TeA-KLH-Konjugat induzierte eine TeA-spezifische Immunantwort. Vier Wochen nach Grundimmunisierung konnten bei drei von vier Tieren Antikörpertiter nachgewiesen werden. Das Antiserum eines Tieres (K1) erwies sich nach der Restimulation als ausreichend empfindlich. Ein kompetitiver direkter Enzymimmuntest (TeA-Enzymimmuntest) wurde entwickelt unter Verwendung von Anti-TeA-Antiserum und TeA-HRP-Konjugat.

Der TeA-Enzymimmuntest war mäßig empfindlich für freie TeA (50%-Inhibitionsdosis: 223 ng/ml), aber sehr empfindlich für acetylierte TeA (50%-Inhibitionsdosis 23,3 ng/ml; Nachweisgrenze (70%-Inhibitionsdosis): 5 ng/ml). Die Spezifität dieses direkten, simultanen Nachweisverfahrens für Tenuazonsäure wurde durch Einsatz anderer Toxine aus der *Alternaria*-Gruppe überprüft. Kreuzreaktionen mit anderen *Alternaria*-Toxinen (AOH, AME und ALT) lagen bei <1%. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da die chemische Struktur von TeA keinerlei Ähnlichkeit mit der der anderen Toxine der *Alternaria*-Gruppe aufweist. Aufgrund der circa zehnfach höheren Empfindlichkeit des Testsystems für TeA-Acetat als für freie TeA wurde ein Protokoll für die Probenaufbereitung erstellt, das die Acetylierung von eventuell in der Probe vorhandenem TeA-Toxin einschloss.

Für die Überprüfung der Anwendbarkeit dieses Tests wurden Apfel- und Tomatenproben verwendet. Zum Nachweis von TeA in Apfel- und Tomatenproben erfolgte eine Extraktion nach Aufreinigung mittels Flüssig-Flüssigverteilungschromatographie mit Ethylacetat entweder bei der unverdünnten Probe (Apfelsaft, Tomatensaft) oder bei der mit A. dest. verdünnten Probe (Tomatenketchup, Tomatenmark). Nach Verdampfen erfolgte die einstündige Acetylierung der Probe mit anschließender Verdünnung mit PBS 1:20. Weitere Verdünnungen wurden mit 5% Acetonitril/PBS angefertigt. Die Nachweisgrenzen für TeA in unterschiedlichen Probenmatrices lagen zumeist bei 25-50 ng/g, für Tomatenmark bei ~ 150 ng/g. Die Wiederfindungsraten in unterschiedlichen Probenmatrices waren zumeist zufriedenstellend (34-136%). Eine Probe von sieben untersuchten Apfelsäften enthielt TeA in einer Konzentration von 58 ng/ml. Drei von fünfzehn untersuchten Tomatensäften enthielten TeA in einem Konzentrationsbereich von 61-227 ng/ml, und zwei von achtzehn untersuchten Tomatenketchupproben enthielten TeA in Konzentrationen von 55,2 ng/g und 67,3 ng/g. In keiner der zehn untersuchten Tomatenmarkproben konnte TeA nachgewiesen werden.

In einer Untersuchung zum Vorkommen von TeA in natürlich mit Schwärzepilzen kontaminierten Tomaten aus dem deutschen Einzelhandel konnte gezeigt werden, dass nach längerer Lagerung hohe Gehalte (max. 480 ng/g) an TeA im Fruchtfleisch erreicht wurden. Mikroskopisch wurden in einigen dieser Proben *Alternaria* spp. festgestellt, im Enzymimmuntest konnte in diesen Proben TeA nachgewiesen werden.

Bei einer Untersuchung des Vorkommens von Tenuazonsäure bei verschiedenen Pilzspezies wurden unterschiedliche Schimmelpilze (*Penicillium* sp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* sp.) aus der Stammsammlung des Instituts geprüft. Lediglich im Mycel von *Alternaria* spp. wurde TeA nachgewiesen, hier allerdings in extrem hohen Konzentrationen (130.000 ng/g).

7 Summary

Enzyme Immunoassay for tenuazonic acid (TeA) in apple and tomato products

The present study describes the development and application of an enzyme immunoassay for the detection of tenuazonic acid (TeA), a mycotoxin of the *Alternaria* group, in apple and tomato products.

TeA was derivatized with succinic anhydride and conjugated to the proteins keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA) and to the enzyme horseradish peroxidase (HRP) via an activated ester method.

The KLH conjugate was used to produce polyclonal antibodies in rabbits. The immune response was screened in a competitive EIA using Anti-rabbit IgG in a double antibody solid phase system. The antibody specificity was determined by competitive binding inhibition of several other compounds compared with TeA standard solution. The TeA-KLH conjugate demonstrated an immunogenic activity. Four weeks after the first immunisation, antibody titers could be detected in three of four rabbits but only those of one rabbit were sufficiently specific after the first restimulation. The antisera of the other rabbits were not sufficiently sensitive for the development of an enzyme immunoassay. A competitive direct EIA was established with Anti-TeA antiserum and TeA-HRP conjugate.

The enzyme immunoassay was moderately sensitive for TeA (IC_{50} of the TeA standard curve: 223 ng/mL), but was very sensitive for acetyl-TeA (IC_{50} : 23.3 ng/mL; detection limit 5 ng/mL). Cross-reactivities with other *Alternaria* mycotoxins (AOH, AME, ALT) were < 1%. This was not surprising, since the chemical structure of TeA has no similarities with the other *Alternaria* toxins. Therefore a sample preparation protocol was established which includes an acetylation step of TeA.

For application studies apple and tomato products were examined. For the assessment of TeA in apple and tomato products, an extraction was used with a clean up step liquid-liquid partition with ethyl acetate either in the the undiluted sample (apple juice, tomato juice) or in the sample diluted with distilled water. (tomato ketchup, tomato paste). Detection limits for tenuazonic in different matrices were from 25-50 ng/g (apple juice: 25 ng/mL; tomato juice:

50 ng/mL; tomato ketchup: 40 ng/g), and tomato paste ~ 150 ng/g, respectively. The recoveries in various matrices were mostly satisfactory (34-136%). One of seven analyzed samples of commercial apple juices contained TeA, at a level of 58 mg/mL. Three out of 15 tomato juice samples contained TeA in a concentration range of 61-227 ng/mL, and two out of 18 tomato ketchup samples contained TeA at levels 55.2 ng/g and 67.3 ng/g. In the tomato paste samples, no TeA could be detected by EIA.

For the assessment of TeA in naturally contaminated, mouldy tomatoes from the German market it was shown that high levels of TeA (up to 480 ng/g) could be present in the pulp. In the microscopic examination, *Alternaria* spores could be detected in some of the samples, in all of these samples TeA was detected.

For a preliminary assessment of TeA in different fungal genera, mycelium of fungal species (*Penicillium* sp., *Aspergillus* spp., and *Alternaria* sp.) was analysed by enzyme immunoassay. TeA was only found in the mycelium extract of the *Alternaria* spp..

8 Literaturverzeichnis

ABRAMSON, D., E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1995):

An indirect enzyme immunoassay for the mycotoxin citrinin

Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2007-2009

ABRAMSON, A., G. LOMBAERT, R. M. CLEAR, P. SHOLBERG, R. TRELKA, E. ROSIN (2009):

Production of patulin and citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples

Mycotox. Res. **25**, 85-88

AHMAD, M. A., B. A. KHAN, Z. A. SHAMSUDDIN und A. AHMED (1996):

Mycotoxin producing potential of *Alternaria alternata* isolated from mustard/ rapeseeds

Pak. J. Sci. Ind. Res. **39**, 136-138

AMES, B. N., W. E. DURSTON, E. YAMASAKI, und F. D. Lee (1973):

Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70**, 2281-2285

ANDERSON, G. W., J. E. ZIMMERMANN und F. M. CALLAHAN (1964):

The use of esters of n-hydroxysuccinimide in peptide synthesis

J. Am. Chem. Soc. **86**, 1839-1842

ANONYM (ohne Jahr) Bund/Länder-Arbeitsgruppe „ADV in der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung“. ADV Kodierkataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittel-Monitoring.

Katalog Nr. 3: Matrixkodex. Verfügbar unter:

http://www.bvl.bund.de/cln_027/mn_520288/DE/01_Lebensmittel/01_Sicherheit_Kontrollen/09_datenmanagement/datenmanagement_node.html_nnn=true

ANSARI, A. A. und A. K. SHRIVASTAVA (1990):

Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, India

Food Addit. Contam. **7**, 815-820

ANTONY, M., Y. SHUKLA und K. K. JANARDHANAN (2002):

Protective effect of tenuazonic acid against dimethyl benz(a)anthracene-induced skin carcinogenesis in mice

Terat., Carciog., and Mutagen. **22**, 309-314

ASAM, S., Y. LIU, K. KONITZER und MICHAEL RYCHLIK (2011):

Development of a stable isotope dilution assay for tenuazonic acid

J. Agric. Food Chem. **59**, 2980-2987

ASAM, S., M. LICHTENEGGER, Y. LIU und MICHAEL RYCHLIK (2012):

Content of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in food commodities determined by a stable isotope dilution assay

Mycotoxin Res. **28**, 9-15

AZCARATE, M. P., A. PATRIARCA, L. TERMINELLO und V. F. PINTO (2008):

Alternaria toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest

J. Food Prot. **71**, 1262-1265

AZIZ, N. H., S. FARAG und M. A. HASSANIN (2006):

Effect of gamma irradiation and water activity on mycotoxin production of *Alternaria* in tomato paste and juice

Die Nahrung **35**, 359-362

BARKAI-GOLAN, R. und N. PASTER (2008):

Mycotoxins in fruits and vegetables, 1. Auflage

Academic Press (Elsevier)

BATTILANI, P., L. G. COSTA, A. DOSSENA, M. L. GULLINO, R. MARCHELLI, G. GALAVERNA, A. PIETRI, C. DALL`ASTA, P. GIORNI, D. SPADARO und A. GUALLA (2008):

Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants

EFSA Scientific/technical report: CFP/EFSA/CONTAM/2008

BEYER, H. und W. WALTER (1991):

Lehrbuch der organischen Chemie, 22. Auflage, 294-296

S. Hirzel Verlag Stuttgart

BILGRAMI, K. S., A. A. ANSARI, A. K. SINHA, A. K. SHRIVASTAVA und K. K. SINHA (1994):

Mycotoxin production by some Indian *Alternaria* species

Mycotox. Res. **10**, 56-59

BÖCKER, J. (1997):

Chromatographie

Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1.Auflage

Vogel Verlag, Würzburg, Deutschland

BOTTALICO, A. und A. LOGRIECO (1998):

Toxigenic *Alternaria* species of economic importance

In: SINHA, K. K. und D. BHATNAGAR

Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, 65-108

Marcel Dekker Verlag, New York,

BRÄSE, S., A. ENCINAS, J. KECK, und CARL F. NISING (2009):

Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites

Chem. Rev. **109**, 3903-2990

BRIAN, P. W., P. J. CURTIS, H. G. HEMMING, E. G. JEFFERYS, C. H. UNWIN und J. M. WRIGHT (1951):

Alternaric acid; a biologically active metabolic product of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout; its production, isolation and anti fungal properties

J. Gen. Microbiol. **5**, 619-632

BRÖSIGKE, K. N. (1999):

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis des Mykotoxins Roquefortin:

Diss. med. vet., München

BUDZIKIEWICZ, H. und M. SCHÄFER (2005):

Massenspektrometrie- Eine Einführung 5. Auflage, 7-10

Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2003):

Alternaria-Toxine in Lebensmitteln

Stellungnahme des BfR vom 30. Juli 2003

CAHN, R. S. und C. K. INGOLD (1951):

Specification of configuration about quadricovalent assymmetric c-atoms

J. Chem. Soc. 1951, 612-622

CARRASCO, L. und D. VASQUEZ (1973):

Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic

Biochim. Biophys. Acta **319**, 209-215

CHELKOWSKY, J. (1992):

In: CHELKOWSKY, J. und A. VISCONTI:

Alternaria Biology, plant disease and metabolites, Preface, IX

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

CHELKOWSKY, J. und A. VISCONTI (1992):

Alternaria: Biology, plant disease and metabolites, 514-515

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

CHU, F. S. (1981):

Isolation of altenuisol and altertoxins I and II, minor mycotoxins elaborated by *Alternaria*

J. Am. Oil Chem. Soc. **58**, 1006A-1008A

CHU, F. S. (1996):

Recent studies on immunoassays

In: BEIER, R. C. und L. H. STANKER:

Immunoassays for residue analysis **621**, 294-313

Am. Chem. Soc., Washington D. C.

CHULZE, S. N., A. M. TORRES, A. M. DALCERO, M. G. ETCHEVERRY, M. L. RAMÍREZ und M. C. FARNOCHI (1995):

Alternaria mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of toxins in oil and meal

J. Food Protect. **58**, 1133-1135

CHUNG, I. M., H. J. JU, S. C. SIM, S. B. PAIK und S. H. YU (1998):

Survey and control of the occurrence of mycotoxins from postharvest vegetables in Korea (II)

Detection of major mycotoxins from diseased vegetables (onions, garlicks and peppers)

Anal. Sci. Technol. **11**, 206-212

COMBINA, M., A. M. DALCERO und A. TORRES (1998):

Spectrometric studies on stability of tenuazonic acid (TeA) solution in organic solvents

Mycotox. Res. **14**, 54-59

COMBINA, M., A. M. DALCERO, E. VARVAVSKY und S. CHULZE (1999a):

Effects of food preservatives on *Alternaria alternata* growth and tenuazonic acid production

Food Addit. Contamin. **16**, 433-437

COMBINA, A., A. DALCERO, E. VARVAVSKY, A. TORRES, M. ETCHEVERRY, M. RODRIGUEZ und H. GONZALEZ QUINTANA (1999b):

Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour

Mycotox. Res. **15**, 33-38

COOKE, N. H. C., R. L. VIAVATTENE, R. EKSTEEN, W. S. WONG, G. DAVIES und B. L. KARGER (1978):

Use of metal ions for selective separations in high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr. **149**, 391-415

DALCERO. A., M. COMBINA, M. ETCHEVERRY, S. CHULZE und M. I. RODRÍGUEZ (1996):

Effect of dichlorvos on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata*

Food Addit. Contam. **13**, 315-320

DALCERO, A., M. COMBINA, M. ETCHEVERRY, E. VARSAVSKY und M. I. RODRÍGUEZ (1997):

Evaluation of *Alternaria* and its mycotoxins during ensiling of sunflower seeds

Natural Toxins **5**, 20-23

DA MOTTA, SILVANA und L. M. VALENTE SOARES (2000):

Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products

Food Chem. **71**, 111-116

DA MOTTA, S. und L. M. VALENTE SOARES (2001):

Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid

Food Addit. Contam. **18**, 630-634

DAVIS, V. M., U. L. DIENER, und G. MORGAN- JONES (1977):

Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* isolated from cotton

Appl. Environ. Microbiol. **34**, 155-157

DIENER, U. L., R. E. WAGENER, G. MORGAN-JONES und N. D. DAVIS (1976):

Toxigenic fungi from cotton

Phytopathology **66**, 514-516

EKINS, R. P. (1985):

Current concepts and future developments

In: COLLINS, W. P.: Alternative Immunoassays **13**, 219-237

Wiley & Sons, Chichester u.a.

EKINS, R. (1989):

A shadow over immunoassay

Nature **340**, 256-258

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Quantitative assay of immunoglobulin G

Immunochem. **8**, 871-874

ERLANGER, B. F. (1980):

The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey

Meth. Enzymol. **70**, 85-103

EULITZ, C.-M., S. SCHEUERMANN und H.-J. THIER (1965):

In: ABC Chemie 2. Auflage, 251-1318

Harri Deutsch Verlag, Frankfurt, Zürich

FENG, W. und X. D. ZHENG (2007):

Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*

Food Control **18**, 1126-1130

www.fruchtsaft.net

(zuletzt aufgerufen im Juli 2010)

GABALDON, J. A., A. MAQUIERA und R. PUCHADES (1999):

Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **39**, 519-538

GALLARDO, G. L., N. I. PENA, P. CHACANA, H. R. TERZOLO und G. M. CABRERA (2004):

L- tenuazonic acid, a new inhibitor of Paenibacillus Larvae

World J. Microbiol. Biotechnol. **20**, 609-612

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3'-5,5'- Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**, 453-460

GAREIS, M. (2006):

Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen

J. Verbr. Lebensm. **1**, 354-363

GATENBECK, S. und J. SIERANKIEWICZ (1973):

Microbial production of tenuazonic acid analogues

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **3**, 308-309

GEY, M. H. (2008):

Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, 2. Auflage

Springer-Verlag GmbH, Heidelberg

GITTERMAN, C. O., E. L. DULANEY, E. A. KACZKA, G. W. CAMPBELL, D. HENDLIN, und H. B. WOODRUFF (1964):

The human tumor-egg host system III. Tumor-inhibitory properties of tenuazonic acid

Cancer Res. **24**, 440-443

GITTERMAN, C. O. (1965):

Antitumor, cytotoxic and antibacterial activities of tenuazonic acid and congeneric tetramic acids

J. Med. Chem. **8**, 483-486

GOCAN, SIMION (2009):

Hyphenated techniques in thin-layer chromatography

In: GRUSHKA, E. und N. GRINBERG:

Advances in Chromatography **47**, 353-432

CRC Press Boca Raton, London, New York

GRIFFIN, G. F. und F. S. CHU (1983):

Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay

Appl. Environ. Microbiol. **46**, 1420-1422

HÄGGBLOM, P., A. S. STEPINSKA und A. SOLYAKOV (2007):

Abstracts 29. Mykotoxin Workshop vom 14. -16. Mai 2007, Stuttgart-Fellbach, Germany, 35

HARRIS, S. A., L. V. FISHER und K. FOLKERS (1965):

The synthesis of tenuazonic and cogeneric tetramic acids

J. Med. Chem. **8**, 478-482

HARVANAN, D. J. und R. W. PERO (1974):

Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid

J. Chromatogr. **101**, 222-224

HARWIG, J., P. M. SCOTT, D. R. STOLTZ und B. J. BLANCHFIELD (1979):

Toxins of molds from decaying tomato fruit

App. Environ. Microbiol. **38**, 267-274

HRADEC, J. und D. VESELY (1989):

The initiator tRNA acceptance assay as a short-term test for carcinogens.

4. Results with 20 mycotoxins

Carcinogenesis **10**, 213-215

HASAN, H. A. H. (1995):

Alternaria mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production

Mycopathologia **130**, 171-177

IWASAKI, S., H. MURO, S. NOZOE, S. OKUDA und Z. SATO (1972):

Isolation of 3, 4-dihydro-2,4,8-trihydroxy-1(2H)-naphthalenone and tenuazonic acid from

Pyricularia oryzae cavara

Tetrahedron Lett. 13-16

JACKSON, T. M. und R. P. EKINS (1986):

Theoretical limitations on immunoassay sensitivity

Current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-radioisotopic tracers

J. Immunol. Methods **87**, 13-20

JACKSON, L. S. und F. AL-TAHER (2008):

Factors affecting mycotoxin production in fruits.

In: BARKAI-GOLAN R. und N. PASTER:

Mycotoxins in fruits and vegetables edited by

Elsevier, 75-104

JAFFE, B. M., W. T. NEWTON und J. E. McGUIGAN (1970):

The effect of carriers on the production of antibodies to the gastrin tetrapeptide

Immunochemistry **7**, 715-725

JAGUSCH, C. (2005):

Synthese bioaktiver 3-Acyltetronsäuren und 3-Acyltetramsäuren

Diss. rer. nat., Bayreuth

JANARDHANAN, K. K. und A. HUSAIN (1983):

Studies on isolation, purification and identification of tenuazonic acid, a phytotoxin produced by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing leaf blight of *datura innoxia* Mill

Mycopathologia **83**, 135-140

JENSEN, B., M. B. INGE KNUDSEN, M. MADSEN und D. F. JENSEN (2004):

Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp.

Phytopathology **94**, 551-560

JOHN, A. E., R. D. COKER; G. BLUNDEN, D. J. ROGERS und T. A. CRABB (1991):

The synthesis of tenuazonic acid o-carboxymethyloxime and its conjugation to macromolecules

Food Agr. Immunol. **3**, 179-184

KAČERIGUS, A., A. LUGAUSKAS, L. LEVINSKAITĖ, R. VARNAITĖ, A. MANKEVIČINĖ, B. BAKUTIS, V. BALIUKONIENĖ und D. BRŪKŠTIENĖ (2005):

Screening of micromycetes producing substances under various conditions

Botanica Lithuanica **7**, 65-75

KAZCKA, E. A., C. O. GITTERMANN, E. L. DULANEY, M. C. SMITH, D. HENDLIN, H. B. WOODRUFF und K. FOLKERS (1964):

Discovery of inhibitory activity of tenuazonic acid for growth of human adenocarcinoma-1

Biochem. Biophys. Res. Commun. **14**, 54-57

KINOSHITA, T. Y., Y. RENBUTSU, I. D. KHAN, K. KOHMOTO und S. NISHIMURA (1972):

Distribution of tenuazonic acid production in the genus *Alternaria* and its pathological evaluation

Ann. Phytopath. Soc. Jpn. **38**, 397-404

KITAGAWA, T., T. SHIMOZONO, T. AIKAWA, T. YOSHIDA und H. NISHIMURA (1981):

Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications

Chem. Pharm. Bull. **29**, 1130-1135

KÜCK, U., M. NOWROUSIAN, B. HOFF und I. ENGH (2009):

Schimmelpilze Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, 3. Auflage

Springer Verlag Berlin Heidelberg

KWON, S. H., S. T. SHIM, E. J. PARK und K. J. KYUNG (2008):

Mycotoxin production and animal toxicity of molds isolated from discolored sun-dried red pepper (*capsicum annuum l.*)

J. Fd. Hyg. Safety **23**, 177-181

LACEY, R. N. (1954):

Derivates of acetoacetic acids. Part VII α -acetyltetramic acids

J. Chem. Soc. **1954**, 850-853

LARONE, D. H. (1995):

Medically important fungi - a guide to identification, 3. Auflage, 152

ASM Press, Washington, D. C.

LATIF, H., V. CURTUI, Y. ACKERMANN, M. GROß und E. USLEBER (2009):

Production and characterization of antibodies against fumiclavine a

Mycotox. Res. **25**, 159-164

LEBRUN, M. H., P. DUVERT., F. GAUDENER, A. GAUDENER. und A. DEBALLON (1985):

Complexation of the fungal metabolite tenuazonic acid with copper (II), iron (III), nickel (II) and magnesium (II) ions

J. Inorg. Biochem. **24**, 67-181

LEBRUN, M. H. (1989):

Ion-Pair, Anion-Exchange and Ligand-Exchange high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and 3-cetyl 5-substituted pyrrolidine-2,4 diones

J. Chromatogr. **464**, 307-322

LEBRUN, M. H., F. DUTFOY, F. GAUDEMER, G. KUNESCH und A. GAUDEMER (1990):

Detection and quantification of the fungal phytotoxin tenuazonic acid produced by *Pyricularia oryzae*

Phytochemistry **29**, 3777-3783

LI, F.Q., und T. YOSHIZAWA (2000):

Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China

J. Agric. Food Chem. **48**, 2920-2924

LIU, G. T., Y. Z. QUIAN, P. ZHANG, Z. M. DONG, Z. Y. SHI, Y. Z. ZHEN, J. MIAO und Y. M. XU (1991):

Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer

IARC Science Publ. **105**, 258-262

LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, A. VISCONTI und M. VURRO (1988):

Natural occurrence of *Alternaria*-mycotoxins in some plant products

Microb. Alim. Nutr. **6**, 13-17

LOGRIECO, A., A. VISCONTI und A. BOTTALICO (1990a):

Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins

Plant Disease **74**, 415-417

LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, M. SOLFRIZZO und G. MULÉ (1990b):

Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins

Mycologia **82**, 501-505

LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, G. MULÉ, A. MORETTI und G. PERRONE (2003):
Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some
Mediterranean crops
Europ. J. Plant Pathol. **109**, 645-667

LOGRIECO, A., A. MORETTI and M. SOLFRIZZO (2009):
Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks
World Mycotoxin Journal **2**, 129-140

LURIE, A., J. KATZ, S. K. LUDWIN, H. C. SEFTEL, J. METZ und M. C. PATH (1969):
Platelet life-span and sites of platelet sequestration in onyalai
Br. Med. J. **4**, 146-148

MÄRTLBAUER, E. P. (1988):
Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen
(Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene) in Lebensmitteln
Diss. med. vet., München

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):
Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin a: production, properties, and
use of antibodies
Appl. Environ. Microbiol. **54**, 225-230

MÄRTLBAUER, E. (1993):
Enzymimmuntests für antimikrobiell wirksame Stoffe
Enke Verlag, Stuttgart

MANNICH, C. und W. KRÖSCHE (1912):
Über ein Kondensationsprodukt aus Ammoniak, Formaldehyd und Antipyrin
Mitteilung aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin, 647-667

Mc DONALD, K. L., M. R. Mc CONCHIE, A. BOKSHI, und S. C. MORRIS (2006):
Heat treatment: a natural way to inhibit postharvest diseases in rockmelon
Acta Horticulturae **682**, 2029-2033

MERONUCK, R. A., J. A. STEELE, C. J. MIROCHA und C. M. CHRISTENSEN (1972):

Tenuazonic acid, a toxin produced by *Alternaria alternata*

Appl. Microbiol. **23**, 613-617

MIKAMI, Y., Y. NISHIJIMA, H. IIMURA, A. SUZUKI und S. TAMURA (1971):

Chemical studies on brown-spot disease of tobacco plants. I. Tenuazonic acid as a vivotoxin of *Alternaria longipeps*

Agric. Biol. Chem. Tokyo **35**, 611-618

MILLER, F. A., W. A. RIGHTSEL, B. J. SLOAN, J. EHRLICH, J. C. FRENCH, Q. R. BARTZ und G. J. DIXON (1963):

Antiviral activity of tenuazonic acid

Nature **200**, 1338-1339

MISLIVEC, P. B., V. R. BRUCE, M. E. STACK und R. BANDLER (1987):

Molds and tenuazonic acid in fresh tomatoes used for catsup production

J. Food Protect. **50**, 38-41

MORRISON, V. A., R. J. HAAKE und D. J. WEISDORF (1993):

The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation

Medicine (Baltimore) **72**, 78-89

MÜLLER, M. (1992):

Toxinbildungsvermögen von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria*

Zentralbl. Mikrobiol. **147**, 207-213

MÜLLER, M. und P. LEPOM (1992):

Nachweis von *Alternaria*- Mykotoxinen in Laborkulturen

Zentralbl. Mikrobiol. **147**, 197-206

MÜLLER, C., H. S. KLAFFKE, W. KRAUTHAUSE und R. WITTKOWSKI (2006):

Determination of ergot alkaloids in rye and rye flour

Mycotox. Res. **22**, 197-200

NEWSOME, W. H. (1986):

Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69**, 919-923

NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1982):

Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions

Mol. Cell. Biochem. **44**, 3-12

NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of steroid antisera in rabbits

In: CAMERON, E. H. D.; S. G. HILLIER und K. F. GRFFITH: Steroid Immunoassay

5th Tenovus Workshop Proc., 87-96

NOSER, J., P. SCHNEIDER, M. ROTHER und H. SCHMUTZ (2011):

Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market

Mycotox. Res. **27**, 265-271

OLSEN, M. W., L. CLARK und H. MOSER (1998):

Fungicide treatment and varietal effects on *Alternaria* leaf spot of pima cotton

In: Silvertooth J.:

Cotton: A college of agriculture report for 1998

<http://ag.arizona.edu/pubs/crops/az1006/az100610a.html>

OSTRY, V. (2008):

Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs

World Mycotoxin Journal **1**, 175-188

OTANI, H. und K. KOHMOTO (1992):

Host specific toxins of *Alternaria* species

In: CHELKOWSKY, J. und A. VISCONTI

Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites, 123-156

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

OTTO, M. (1995):

Analytische Chemie, 1.Auflage, 647

Wiley-VCH Verlag, Weinheim

OVIEDO, M. S., M. L. RAMÍREZ, G. G. BARROS, und S. N. CHULZE (2009):

Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media

J. Appl. Microbiol. **107**, 1186-1192

OZCELIK, S., N. OZCELIK und L. R. BEUCHAT (1990):

Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantification of the toxins by high-performance liquid chromatography

Int. J. Food Microbiol. **11**, 187-194

PANIGRAHI, S. und S. DALLIN (1994):

Toxicity of the *Alternaria* spp. metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-I, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp (*Artemia salina* L) larvae

J. Sci. Food Agric. **66**, 493-496

PATRIARCA, A., M. P. AZCARATE, L. TERMINELLO und V. FERNANDEZ-PINTO (2007):

Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat

Int. J. Food Microbiol. **119**, 219-222

PERO, R. W., R. G. OWENS, S. W. DALE und D. HARVAN (1971):

Isolation and identification of a new toxin, altenuene, from the fungus *Alternaria tenuis*

Biochim. Biophys. Acta **230**, 170-179

PERO, R. W., H. POSNER, M. BLOIS, D. HARVAN und J. N. SPALDING (1973):

Toxicity of metabolites produced by the "*Alternaria*"

Environ. Health Perspect. **4**, 87-94

PESTKA, J. J. (1989):

Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 1075-1081

POSE, G., A. PATRIARCA, V. KYANKO, A. PARDO und V. FERNÁNDEZ PINTO (2009):

Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium

Int. J. Microbiol. **135**, 60-63

RANDRIAMANANTANY, Z. A, I. ANNESI-MAESANO, D. MOREAU, C. RAHERISON, D. CHARPIN, C. KOPFERSCHMITT, F. LAVAUD, A. TAYTARD, F. DE BLAY, D. CAILLAUD (2010):

Alternaria sensitization and allergic rhinitis with or without asthma in the french six cities study

Allergy **65**, 368-375

RAISTRICK, H., C. E. STICKINGS und R. THOMAS (1953):

Studies on the biochemistry of microorganisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolite products of *Alternaria tenuis*

Biochem. J. **55**, 421-433

REISS, J. (1986):

Detection of genotoxic properties of mycotoxins with the sos chromotest

Naturwissenschaften **73**, 677-678

REISS, J. (1998):

Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, 2. Auflage, 16

Springer-Verlag, Berlin

REUVENI, M., D. SHEGLOV, N. SHEGLOV, R. BEN-ARIE und D. PRUSKY (2002):

Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control

Europ. J. of Plant Pathol. **108**, 421-427

REUVENI, M. (2006):

Inhibition of germination and growth of *Alternaria alternata* and mouldy-core development in Red Delicious apple fruit by bromuconazole and syngnum
Crop Protection **25**, 253-258

ROSETT, T., R. H. SANKHALA, C. E. STOCKINGS, M. E. U. TAYLOR und R. THOMAS (1957):

Studies in the biochemistry of microorganisms 103. Metabolites of *Alternaria tenuis auct.*: culture filtrate products
Biochem. J. **67**, 390-400

ROYLES, B. J. L. (1995):

Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation, and synthesis
Chem. Rev. **95**, 1981- 2001

SAUER, D. B., L. M. SEITZ, R. BURROUGHS, H. E. MOHR, J. L. WEST, R. J. MILLERET, und H. D. ANTHONY (1978):

Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest
J. Agric. Food Chem. **26**, 1380-1383

SCHEFFER, R. P. (1992):

Ecological and evolutionary roles of toxins *Alternaria* species pathogenic to plants.
In: CHELKOWSKY, J. und A. VISCONTI:
Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites, 101-122
Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

SCHADE, J. E. und Jr. A. D. KING (1984):

Alternaria toxins and their importanc in food
J. Food Prot. **47**, 978-995

SCHNEIDER, E., V. CURTUI, C. SEIDLER, E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (2004):

Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes
Toxicol. Lett. **153**, 113-121

SCHRADER, T. J., W. CHERRY, K. SOPER; I. LANGLOIS und H. M. VIJAY (2001):
Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames salmonella test

Terat. Carcinog. Mutagen. **21**, 261-274

SCOTT, P. M. und S. R. Kanhere (1980):

Liquid chromatographic detection of tenuazonic acid in tomato paste

J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 612-621

SCOTT, P. M., D. WEBER und S. R. KANHERE (1997):

Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins

J. Chromatogr. **765**, 255-263

SCOTT, P. M. (2001):

Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins

J. AOAC Int. **84**, 1809-1817

SCOTT, P. M. (2007):

Analysis of ergot alkaloids-a review

Mycotox. Res. **23**, 113-121

SHEPHARD, G. S., P. G. THIEL, E. W. SYDENHAM, R. VLEGGGAAR und W. F. O. MARASAS (1991):

Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids

J. Chromatogr. **566**, 195-205

SHIGEURA, H. T. und C. N. GORDON (1963):

The biological activity of tenuazonic acid

Biochem. **2**, 1132- 1137

SHTIENBERG, D. und J. DREISHPOUN (1991):

Suppression of *Alternaria* leaf spot in Pima cotton by systemic fungicides

Crop Protection **10**, 381-385

SIEGEL, D., T. RASENKO, M. KOCH, und I. NEHLS (2009):

Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-pressure liquid chromatography electrospray ionization ion-trap multiphase mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylarazime

J. Chromatogr. **1216**, 4582-4588

SIEGEL, E., S. MERKEL, M. KOCH und I. NEHLS (2010):

Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer

Food Chem. **120**, 902-906

SIEGFRIED, R. (1979):

Artemia-Salina-Test als einfacher Nachweis von Toxinen bei pflanzlichen Erzeugnissen

In: Abstracts der 15. Vortrags-Tagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) (DGQ) am 23. Mai 1979, Geisenheim, Deutschland (Qual.Plant.-Pl.Fds.Hum.Nutr.**XXIV**, 281-285)

SINGH, Y. P. und G. SUMBALAY (2004):

Occurrence of tenuazonic acid producing strains of *Alternaria alternata* in natural rots of apples

Indian Phytopathology **57**, 68-69

SINGH, R. S. und R. N. KHANNA (1969):

Effect of certain inorganic chemicals on growth and spore germination of *Alternaria tenuis* auct., the fungus causing core rot of mandarin oranges in India

Mycopathologia **37** (1), 89-96

SMITH, E. R., T. N. FRIDRICKSON und Z. HADIDIAN (1968):

Toxic effects of the sodium and the N-N'-dibenzylethylenediamine salts of tenuazonic acid

Cancer Chemother. Rep. **52**, 579-585

SMITH, C. J. (1989):

Evolution of the immunoassay

in: RITTENBURG., J. H.:

Development and application of immunoassay for food analysis, Kap. 1, 3-27

Elsevier Appl. Science, London

SOLFRIZZO, M., A. DE GIROLAMO, C. VITTI, A. VISCONTI und R. VAN DEN BULK
(2004):

Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots.

J. AOAC Int. **87**, 101-106

SOLFRIZZO, M., A. DE GIROLAMO, C. VITTI, K. TYLKOWSKA, J.
GRABARKIEMICZ- SZCZSNA, D. SZOPISKA, H. DORNA (2005):

Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous
plants

Food Add. Contam. **22**, 302-308

Species Fungorum

(www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp.) (Stand: Juli 2010)

STACK, M. E., P. B. MISLIVEC, J. A. G. ROACH und A. E. POHLAND (1985):

Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol monomethyl ether in
tomatoes and tomato products

J. AOAC Int. **68**, 640-642

STACK, M. E. und M. J. PRIVAL (1986):

Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II and III

Appl. Environ. Microbiol. **52**, 718-722

STEYN, P. S. und C. J. RABIE (1976):

Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*

Phytochemistry **15**, 1977-1979

STICKINGS, C. E. (1959):

Studies in the biochemistry of micro-organisms.106. Metabolites of *Alternaria tenuis auct.*:
The structure of tenuazonic acid
Biochem. J. **72**, 332-340

STICKINGS, C. E. und R. J. TOWNSEND (1961):

Studies in the biochemistry of micro-organisms.108. Metabolites of *Alternaria tenuis auct.*:
The biosynthesis of tenuazonic acid
Biochem. J. **78**, 412-418

STINSON, E. E., D. D. BILLS, S. F. OSMAN, J. SICILIANO, M. J. CEPONIS und E. G. HEISLER (1980):

Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries
J. Agric. Food Chem. **28**, 960-963

STINSON E. E., S. F. OSMAN, E. G. HEISLER, J. SICILIANO, und D. D. BILLS (1981):

Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons
J. Agric. Food Chem. **29**, 790-792

STINSON. E. E. (1985):

Mycotoxins - their biosynthesis in *Alternaria*
J. Food Prot. **47**, 80-91

ST.-GERMAIN, G. und R. SUMMERBELL (1996):

Identifying filamentous fungi. A clinical laboratory handbook 1. Auflage **16**, 56-57
Star Publishing Company, Belmont, California

STRASSMAN, M., A. J. THOMAS, L. A. LOCKE und S. WEINHOUSE (1954):

Intramolecular migration and isoleucin synthesis
J. Am. Chem. Soc. **76**, 4241-4242

TAKANO, Y., Y. KUBO, C. KAWAMURA, T. TSUGE und I. FURUSAWA (1997):
The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores apperial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of colletotrichum lagenarium

Fungal Genetics and Biology **21**, 131-140

TERMINELLO, L, A. PATRIARCA, G. POSE und V. FERNÁNDEZ PINTO (2006):
Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree

Mycotox. Res. **22**, 236-240

UMETSU, N, J. KAJI und K. TAMARI (1972):

Investigation on the toxin production by several blast fungus strains and isolation of tenuazonic acid as a novel toxin

Agr. Biol. Chem. **36**, 859-866

USLEBER, E. P. (1991):

Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Deoxynivalenol und 3-Acetyldeoxynivalenol

Diss. med. vet. , München

USLEBER, E. und E. MÄRTLBAUER (1998):

A limited survey of cereal foods from the German market for fusarium toxins (deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins)

Archiv für Lebensmittelhygiene **49**, 42-45

USLEBER, E., M. DADE, E. SCHNEIDER, R. DIETRICH, J. BAUER und E. MÄRTLBAUER: (2008):

Enzyme immunoassay for mycophenolic acid in milk and cheese

J. Agric. Food. Chem. **56**, 6857-6862

VAN WEEMEN, B. K. und A. W. SCHUURS (1975):

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays

Immunochemistry **12**, 667-670

VARTIVARIAN, S. E., E. J. ANAISSIE und G. P. BODEY (1993):

Emerging fungal pathogens immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America **17**, 487-491

VIJAYALAKSHMI, M. und A. S. RAO (1988):

Toxin production by *Alternaria alternata* pathogenic to brinjal (solanum melongea l.)

Current Science **57**, 150

VIJAYALAKSHMI, M. (1996):

Toxigenic potential of *Alternaria macrospora* pathogenic to cotton

Microbiol. Res. **151**, 239-241

VIÑAS, I., J. BONET und V. SÁNCHEZ (1992):

Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuis* in decayed apples

Lett. Appl. Microbiol. **14**, 284-287

VIÑAS I., J. PALMA, S. GARZA, A. SIBILIA, V. SÁNCHEZ und A. VISCONTI (1994):

Natural occurrence of aflatoxin and *Alternaria* mycotoxins in oilseed rape from Catalonia (Spain)

Mycopathology **128**, 175-179

VISCONTI, A., A. LOGRIECO und A. BOTTALICO(1986):

Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives, their production and possible transfer into the oil

Food Add. Contam. **3**, 323-330

VISCONTI, A., A. SIBILIA und C. SABIA (1992):

Alternaria alternata from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedling

Mycotox. Res. **8**, 9-16

WALKER, C. S., S. J. CLARK und H. H. WOTITZ (1973):

Factors involved in the production of specific antibodies to estriol and estradiol

Steroids, **21** 259-283

WANG, Y., Y. BAO, S. SHEN, W. FENG, T. YU, J. ZHANG und X. D. ZHENG (2008):

Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman

Int. J. Food Microbiol. **123**, 234-239

WARSINKE, A. A. BENKERT und F. W. SCHELLER (2000):

Electrochemical immunoassays

Fresenius J. Anal. Chem. **366**, 622-634

WEBLEY, D. J., K. L. JACKSON, J. D. MULLINS, A. D. HOCKING, und J.I. PITT (1997):

Alternaria toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest

Austr. J. Agric. Res. **48**, 1249-55

WEIDENBÖRNER, M. (2001):

Encyclopedia of food mycotoxins, 238-239

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

WILSON, B. M. und P. K. NAKANE (1976):

The covalent coupling of proteins to Periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoabsorbent preparation

J. Immunol. Methods **12**, 171-181

WOODY, M. A. und F. S. CHU (1992):

Toxicology of *Alternaria* mycotoxins

In: CHELKOSWKY, J. und A. VISCONTI:

Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites, 409-434

Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam

YEKELER H., K. BITMIS, N. OZCELIK, M. Z. DOYMAZ und M. CALTA (2001):

Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy

Environment. pathology **29**, 492-497

YOUNG, A. B., N. D. DAVIS und U. L. DIENER (1980):

Effect of temperature and moisture on tenuazonic acid production by *Alternaria tenuissima*

Physiol. Biochem. **70**, 607-609

YUKI, H., Y. KAIZU, S. YOSHIDA, S. HIGUCHI, S. HONDA und K. TAKIURA (1971):

Studies of tenuazonic acid analogs. I. Synthesis of 5- substituted 3- (1`- anilinoethylidene) pyrrolidine-2,4-dione

Chem. Pharm. Bull. **19**, 1664-1668

ZHOU, B. und S. QUIANG (2008):

Environmental. Genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*

J. of Biotechnology **7**, 1151-1156

Zitierte Gesetze, Verordnungen, Richtlinien

Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Amtsblatt der Europäischen Union L364/5 vom 20.12.2006

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. habil. Ewald Usleber danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die jederzeit gewährte freundliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Valeriu Curtui für die engagierte Betreuung zu Beginn dieser Arbeit.

Bei Frau und Herrn Professor Gedek bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation durch die Brigitte und Wolfram Gedek Stiftung, Ismaning.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, insbesondere Frau Renate Stumpf, Frau Margit Keßler, Frau Yvonne Ackermann, Herrn Hadri Latif und Frau Christa Zeidler möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Danke auch an Herrn Dipl. Chemiker Henning Petri für die Unterstützung und Hilfe bei allen Fragen chemischer Art.

Abschließend möchte ich ganz besonders meinen „Leiningern“ für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr Verständnis danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Madeleine Groß

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

GROSS, M., V.CURTUI und E. USLEBER (2009):

Production and characterization of antibodies against tenuazonic acid

Abstracts 31. Mykotoxin-Workshop, Münster, 15.-17.06.2009, 59

GROSS, M. (2010):

Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products

Abstracts 32. Mykotoxin-Workshop, Lyngby/Dänemark, 14.-16.06.2010, 18

GROSS, M., V. CURTUI, Y. ACKERMANN, H. LATIF und E. USLEBER (2010):

Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmuntests zum Nachweis von Tenuazonsäure in Lebensmitteln

51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V., Garmisch Partenkirchen.

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe: 28.09.-01.12.2010, 132

GROSS, M., V. CURTUI, Y. ACKERMANN, H. LATIF und E. USLEBER (2011):

Enzyme Immunoassay for Tenuazonic Acid in Apple and Tomato Products

J. Agric. Food Chem. **59**, 12317-12322



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5913-2



9 783835 959132