



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

**LC-MS/MS basierte Multimykotoxinanalytik zur Bestimmung des Verhaltens  
von *Alternaria* Toxinen während des Mälzungs- und Brauprozesses**

Sophie Scheibenzuber

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Rychlik

2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 01.08.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Life Sciences am 22.12.2022 angenommen



## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Rychlik, für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie die Betreuung in den vergangenen 4 Jahren bedanken. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die wissenschaftlichen Diskussionen und die vielen Möglichkeiten meine Arbeit auf (internationalen) Konferenzen zu präsentieren.

Desweiteren möchte ich mich bei meinen Projektpartnern Marina Bretträger und Dr. Martina Gastl vom Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch zu Malz und Bier bedanken.

Liebe Anja, danke für deine Unterstützung und deinen Einsatz bei den ganzen bürokratischen Hürden, die leckeren Kuchen und die vielen schönen Gespräche.

Vielen Dank auch an Dr. Stefan Asam für die vielen fachlichen Diskussionen, Mauskriptkorrekturen und Tipps während meiner gesamten Zeit am Lehrstuhl. Danke auch an Christopher Zeck für das Lösen aller technischen Probleme und die unzähligen Wartungen an allen von mir verwendeten Geräten.

Ein großer Dank geht auch an meine (ehemaligen) Kolleginnen und Kollegen Nadine Weber, Dr. Marina Gotthardt, Dr. Lisa Striegel, Dr. Lena Schillert, Dr. Thomas Bachmann, Eva Biehl, Fabian Dick, Mengle Wang, Lance Buckett, Stefan Pieczonka, Simone Schinko, Lisa Obermaier, Christian Schnurr und Sarah Schneidemann für das gute Arbeitsklima, die Unterstützung bei jeglichen Problemen, den Diskussionen zu mehr oder weniger wissenschaftlichen Fragestellungen und darüber wer den nächsten Kuchen mitbringen muss, aber natürlich auch für die vielen schönen Momente außerhalb des Labores. Insbesondere Danken möchte ich an dieser Stelle Nadine und Eva, die mich bereits seit dem ersten bzw. zweiten Bachelorsemester auf meinem Weg begleiten und immer für eine Tee- oder Eis(kaffee)pause offen waren, sowie Marina für die Einarbeitung in die *Alternaria*-Thematik und die viele Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei allen meinen Studenten bedanken, die bei mir ihre Bachelor- und Masterarbeiten sowie Forschungspraktika durchgeführt haben. Danke an Fabian Dick, Franziska Hesse, Anna Reitsam und Alexa Wachtler für euren Einsatz und eure Unterstützung bei der Literaturrecherche sowie den Aufarbeitungen der vielen Proben.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit!

## Publikationen

Scheibenzuber S, Hoffmann T, Effenberger I, Schwab W, Asam S, Rychlik M (2020) Enzymatic Synthesis of Modified *Alternaria* Mycotoxins Using a Whole-Cell Biotransformation System. *Toxins (Basel)* 12(4), S. 264, DOI: 10.3390/toxins12040264

Scheibenzuber S, Dick F, Asam S, Rychlik M (2021) Analysis of 13 *Alternaria* mycotoxins including modified forms in beer. *Mycotoxin Res* 37:149–159. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00424-0>

Scheibenzuber S, Dick F, Bretträger M, Gastl M, Asam S, Rychlik M (2022) Development of analytical methods to study the effect of malting on levels of free and modified forms of *Alternaria* mycotoxins in barley. *Mycotoxin Res*, DOI: 10.1007/s12550-022-00455-1.

## Abkürzungsverzeichnis

### A

A.	<i>Alternaria</i>
ACN	Acetonitril
ALT	Altenuen
ALTP	Alterperylenol
AME	Alternariol monomethylether
AME-3-G	Alternariol monomethylether-3-Glucosid
AME-3-S	Alternariol monomethylether-3-Sulfat
AME-3S-7G	Alternariol monomethylether-3-Sulfat-7-Glucosid
AOH	Alternariol
AOH-3-G	Alternariol-3-Glucosid
AOH-3-S	Alternariol-3-Sulfat
AOH-3S-9G	Alternariol-3-Sulfat-9-Glucosid
AOH-9-G	Alternariol-9-Glucosid
AOH-9S-3G	Alternariol-9-Sulfat-3-Glucosid
ATX I	Altertoxin I
ATX II	Altertoxin II
$a_w$	Wasseraktivität

### B

BG	Bestimmungsgrenze
b.w.	Body weight (Körpergewicht)

### C

cm	Zentimeter
----	------------

### D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol

### E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECB	Farbstärke von Bier und Würze (European Brewery Convention)
EFSA	European Food Safety Authority
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray Ionisation

EU	Europäische Union
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
<b>F</b>	
<b>G</b>	
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
<b>H</b>	
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High performance liquid chromatography/Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektor
HT-2	
<b>I</b>	
IAC	Ion affinity chromatography
IS	Isotopenmarkierter Standard
iso-ALT	Iso-Altenuen
<b>J</b>	
J	Kopplungskonstante
<b>K</b>	
kg	Kilogramm
<b>L</b>	
L	Liter
LC	Liquid Chromatography/Flüssigchromatographie
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/ Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Triple Quadrupol LC-MS
LC-Q-TOF-MS	Quadrupol Time of Flight LC-MS
LD <sub>50</sub>	Mittlere letale Dosis
LLE	Liquid liquid extraction
log	Logarithmus
<b>M</b>	
mAB	Monoklonale Antikörper
MeOH	Methanol
min	Minute

---

MIP	Molecular Imprinted Porous Polymers
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mL	Milliliter
MS	Mass Spectrometry/ Massenspektrometrie
<b>N</b>	
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance/ Kernspinresonanz
NWG	Nachweisgrenze
<b>O</b>	
OG	Obere Grenze
OTA	Ochratoxin A
<b>P</b>	
°P	Grad Plato (Einheit der Stammwürze)
pAB	Polyclonale Antikörper
ppm	Parts per million
<b>Q</b>	
qNMR	Quantitative Kernspinresonanz
QuEChERS	Quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe/ schnell, einfach, günstig, effizient, robust, sicher
<b>R</b>	
rpm	Rotationen pro Minute
<b>S</b>	
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Solid Phase Extraction/Festphasenextraktion
Spp.	Spezies
STE III	Stemphytoxin III
<b>T</b>	
T-2	
TC	Trichothecene
TeA	Tenuazonensäure
TEN	Tentoxin
TTC	Threshold of Toxicological Concern
<b>U</b>	

UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UGT	UDP-Glykosyltransferasen
UG	Untere Grenze
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
<b>V</b>	
v/v	Volumenanteil
<b>W</b>	
<b>X</b>	
<b>Y</b>	
<b>Z</b>	
z.B.	Zum Beispiel
ZeA	Zearalenon



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Publikationen .....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis .....	XVI
Abbildungsverzeichnis .....	XXII
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Genus <i>Alternaria</i> spp. ....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Mykologische Charakteristika.....	1
1.1.2 Krankheiten induziert durch <i>Alternaria</i> spp. ....	2
1.1.2.1 Humanerkrankungen.....	2
1.1.2.2 Pflanzenbefall .....	3
1.1.3 Mykotoxinbildung.....	5
<b>1.2 <i>Alternaria</i> Mykotoxine – Vorkommen und Toxizität .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Dibenzo- $\alpha$ -Pyrone .....	8
1.2.2 Perylenquinone.....	10
1.2.3 N-haltige Verbindungen.....	12
1.2.4 Modifizierte <i>Alternaria</i> Toxine .....	13
<b>1.3 Risikobewertung der <i>Alternaria</i> Toxine .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen .....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Anforderungen an die Probennahme.....	20
1.4.2 Aufarbeitungsmethoden .....	21
1.4.2.1 Extraktion.....	21
1.4.2.2 Probenaufreinigung.....	24
1.4.3 Überblick über etablierte Messmethoden für die Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen	27
1.4.4 Vorgaben für die Methodvalidierung.....	30
1.4.5 Aktueller Wissensstand zu <i>Alternaria</i> Toxinen in Braugerste und Malz.....	31
<b>1.5 Der Brauprozess als potenziell kritischer Produktionsschritt .....</b>	<b>34</b>
1.5.1 Mälzungsprozess .....	34
1.5.2 Brauprozess .....	35
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S aus <i>A. alternata</i> Kulturen.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Pilzkultivierung .....	40

3.1.2 Extraktion und Aufreinigung von AOH-3-S und AME-3-S.....	40
3.1.3 Quantifizierung von AOH-3-S und AME-3-S.....	42
3.1.4 Spektroskopische Charakterisierung.....	44
3.1.5 Diskussion: Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S aus <i>A. alternata</i> Kulturen .....	45
<b>3.2 Enzymatische Synthese der modifizierten <i>Alternaria</i> Toxine AOH-3-Glucosid, AOH-9-Glucosid und AME-3-Glucosid .....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Wahl der Ausgangsmaterialien .....	47
3.2.2 Enzymscreening .....	47
3.2.3 Biotransformation in <i>E. coli</i> Zellen .....	49
3.2.4 Isolierung der Glucoside.....	50
3.2.5 Quantifizierung mittels qNMR und HPLC .....	52
3.2.5.1 HPLC-UV .....	53
3.2.5.2 qNMR .....	53
3.2.6 Spektroskopische Charakterisierung von AOH-3-G und AOH-9-G .....	55
3.2.7 Diskussion: Enzymatische Synthese der modifizierten <i>Alternaria</i> Toxine AOH-3-Glucosid, AOH-9-Glucosid und AME-3-Glucosid.....	56
<b>3.3 Referenzverbindungen und isotopenmarkierte Standards .....</b>	<b>60</b>
3.3.1 Reinheit der Referenzstandards und isotopenmarkierten Verbindungen .....	60
3.3.2 Qualitätssicherung der Konzentrationen vorhandener Standards.....	60
3.3.3 Diskussion: Referenzverbindungen und isotopenmarkierte Standards.....	65
<b>3.4 Entwicklung einer Multimykotoxin-LC-MS/MS-Methode zur Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen .....</b>	<b>67</b>
3.4.1 Einstellung der Messparameter .....	67
3.4.1.1 Multimethode.....	67
3.4.1.2 Tenuazonsäure .....	69
3.4.2 Kalibrierung .....	69
3.4.2.1 Responsegeraden.....	69
3.4.2.2 Matrixkalibrierung von Getreideproben.....	70
3.4.2.3 Matrixkalibrierung von Bierproben .....	71
3.4.3 Diskussion: Entwicklung einer Multimykotoxin-LC-MS/MS-Methode zur Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen.....	72
<b>3.5 Methodenentwicklung und -optimierung zur Bestimmung von <i>Alternaria</i> Toxinen in Gersten- und Bierproben.....</b>	<b>76</b>
3.5.1 Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Gersten- und Malzproben .....	76
3.5.1.1 Dilute and Shoot Versuche .....	77
3.5.1.2 Matrixreduktion durch Proteinfällung .....	77
3.5.1.3 Extraktionsoptimierung .....	81

---

3.5.1.4 Wahl der SPE – Kartusche .....	84
3.5.1.5 Optimieren des SPE – Ablaufes .....	86
3.5.1.6 Wahl des Aufnahmelösungsmittels .....	87
3.5.1.7 Zugabe an internem Standard .....	89
3.5.1.8 Sonstige Optimierungsversuche .....	89
3.5.2 Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Bierproben .....	90
3.5.2.1 Dilute and Shoot Methode .....	90
3.5.2.2 QuEChERS Aufreinigung .....	90
3.5.2.3 Direkte SPE Aufreinigung .....	90
3.5.2.4 Matrixfällung und Wahl des Probenvolumens .....	92
3.5.2.5 Rückstandsextraktion .....	93
3.5.2.6 Matrixreduktion durch Cyclohexan .....	94
3.5.2.7 Interner Standard .....	96
3.5.3 Diskussion: Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Gersten- und Malzproben .....	96
3.5.4 Diskussion: Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Bierproben .....	99
<b>3.6 Methodvalidierungen .....</b>	<b>102</b>
3.6.1 Methodvalidierung der Gerstenmethode .....	102
3.6.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	102
3.6.1.2 Wiederfindungsrate .....	103
3.6.1.3 Präzisionen .....	103
3.6.1.4 Probennahme .....	105
3.6.2 Methodvalidierung der Biermethode .....	105
3.6.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	105
3.6.2.2 Wiederfindungsrate .....	106
3.6.2.3 Präzisionen .....	107
3.6.3 Diskussion: Methodvalidierung der Gerstenmethode .....	109
3.6.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Gerstenmethode .....	109
3.6.3.2 Wiederfindungen der Gerstenmethode .....	110
3.6.3.3 Präzisionen der Gerstenmethode .....	111
3.6.4 Diskussion: Methodvalidierung der Biermethode .....	112
3.6.4.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Biermethode .....	112
3.6.4.2 Wiederfindungen der Biermethode .....	113
3.6.4.3 Präzisionen der Biermethode .....	114
<b>3.7 Anwendung der entwickelten LC-MS/MS Methoden .....</b>	<b>116</b>
3.7.1 Vergleichende Analyse diverser Praxismuster aus den Jahren 2016 - 2021 .....	116

---

3.7.1.1 Analytik von 56 Gerstenproben.....	116
3.7.1.2 Analytik von 56 Malzproben.....	118
3.7.1.3 Vergleich der Toxingehalte von 6 verschiedenen Standorten in vier Erntejahren .....	121
3.7.1.4 Diskussion: Vergleichende Analyse diverser Praxismuster aus den Jahren 2016 – 2021 .....	124
3.7.2 Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die Toxinbildung in Gerste sowie deren Auswirkungen auf die Mälzung.....	131
3.7.2.1 Toxingehalte in Gerste nach 3 und 8 Monaten.....	131
3.7.2.2 Toxingehalte nach Vermälzen der gelagerten Gerste .....	133
3.7.2.3 Diskussion: Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die Toxinbildung in Gerste sowie deren Auswirkungen auf die Mälzung .....	136
3.7.3 Verfolgung der <i>Alternaria</i> Toxine über den Mälzungsverlauf.....	141
3.7.3.1 Mälzungsverlauf.....	141
3.7.3.2 Variation der Mälzungsparameter .....	143
3.7.3.3 Diskussion: Verfolgung von <i>Alternaria</i> Toxinen über den Mälzungsverlauf...	146
3.7.4 Verhalten der <i>Alternaria</i> Toxine während des Brauprozesses.....	151
3.7.4.1 Vorversuch zur Beurteilung der Wirksamkeit des Aussortierens schwarzer Körner.....	151
3.7.4.2 Einfluss des Anteils schwarzer Körner auf den Toxingehalt während des Brauens .....	152
3.7.4.3 Bilanzierung der Toxine über den Brauprozess.....	160
3.7.4.4 Diskussion: Verhalten der <i>Alternaria</i> Toxine während des Brauprozesses ...	165
3.7.5 Analytik diverser nationaler und internationaler Biere .....	171
3.7.5.1 Screening diverser Biersorten .....	171
3.7.5.2 Diskussion: Analytik diverser nationaler und internationaler Biere.....	173
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>176</b>
<b>5. Abstract .....</b>	<b>180</b>
<b>6. Material und Methoden.....</b>	<b>182</b>
<b>6.1 Chemikalien.....</b>	<b>182</b>
6.1.1 Referenzsubstanzen und isopenmarkierte Standards .....	182
6.1.2 Laborchemikalien .....	183
6.1.3 NMR Lösungsmittel.....	184
<b>6.2 Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte.....</b>	<b>184</b>
<b>6.3 Herstellung der Standardlösungen.....</b>	<b>187</b>
<b>6.4 Stabilitätstests der Standards.....</b>	<b>187</b>
<b>6.5 Messgeräte und -methoden.....</b>	<b>188</b>
6.5.1 Semi-präparative HPLC-UV .....	188

---

6.5.1.1 Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S.....	188
6.5.1.2 Isolierung und Aufreinigung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G .....	189
6.5.2 Analytische HPLC-UV .....	190
6.5.2.1 Matrixüberprüfung während der Methodenentwicklung.....	190
6.5.2.2 Stabilitätstests .....	191
6.5.2.3 Quantifizierung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G .....	191
6.5.3 LC-(ESI)-MS/MS.....	192
6.5.3.1 Multimykotoxinanalytik von <i>Alternaria</i> Toxinen .....	194
6.5.3.2 Analytik von Tenuazonsäure .....	194
6.5.4 LC-MS Q-TOF .....	195
6.5.5 NMR-Messungen .....	195
<b>6.6 Isolierung von AOH-3-Sulfat und AME-3-Sulfat aus Kulturen von <i>A. alternata</i> ..</b>	<b>196</b>
6.6.1 Inokulation von Reis mit <i>A. alternata</i> .....	196
6.6.2 Extraktion und Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S .....	196
6.6.3 qNMR der Sulfate.....	197
6.6.4 Spektroskopische Charakterisierung von AOH-3-S und AME-3-S .....	197
<b>6.7 Enzymatische Synthese von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G .....</b>	<b>198</b>
6.7.1 Herstellung des Pilzextraktes .....	198
6.7.2 Enzymscreening .....	198
6.7.3 Biotransformation.....	198
6.7.4 Isolierung der Glucoside nach der Biotransformation.....	198
6.7.5 qNMR der Glucoside.....	199
6.7.6 Quantifizierung an der HPLC-UV.....	199
6.7.7 Spektroskopische Charakterisierung der modifizierten Toxine .....	199
<b>6.8 Methodenentwicklung LC-MS/MS.....</b>	<b>200</b>
<b>6.9 Kalibrierung der LC-MS/MS Methoden .....</b>	<b>201</b>
6.9.1 Responsegeraden .....	201
6.9.2 Matrixkalibrierung für Gersten- und Malzproben .....	202
6.9.3 Matrixkalibrierung für Bierproben .....	204
<b>6.10 Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen in Gersten- und Malzproben .....</b>	<b>207</b>
6.10.1 Ausgangsmethode .....	207
6.10.2 Methodenoptimierung für Getreidematrix.....	207
6.10.2.1 Dilute and Shoot Versuche.....	207
6.10.2.2 Proteinfällung.....	208
6.10.2.3 Extraktionsoptimierung .....	209
6.10.2.4 Test diverser SPE Kartuschen.....	210
6.10.2.5 Optimieren des SPE Waschschrilles.....	211

---

6.10.2.6 Aufnahmelösungsmittel.....	212
6.10.2.7 Zugabe an internem Standard .....	212
6.10.2.9 Weitere Optimierungsversuche .....	212
6.10.3 Finale Methode zur Aufarbeitung von Gersten- und Malzproben.....	213
<b>6.11 Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen in Bierproben .....</b>	<b>214</b>
6.11.1 Methodenoptimierung von Bierproben .....	214
6.11.1.1 Dilute and Shoot .....	214
6.11.1.2 QuEChERS Aufreinigung.....	214
6.11.1.3 Direkte SPE Aufreinigung.....	214
6.11.1.4 Matrixfällung und Probenvolumen .....	215
6.11.1.5 Matrixreduktion durch Cyclohexan .....	215
6.11.1.6 Rückstandsextraktion .....	216
6.11.1.7 Zugabe der internen Standards .....	216
6.11.2 Finale Methode zur Aufarbeitung von Bierproben .....	217
<b>6.12 Methodvalidierung der Gersten- und Malzmethode.....</b>	<b>218</b>
6.12.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Gersten- und Malzproben.....	218
6.12.2 Wiederfindung von Gersten- und Malzproben.....	218
6.12.3 Präzisionen von Gersten- und Malzproben.....	219
<b>6.13 Methodvalidierung der Biermethode .....</b>	<b>220</b>
6.13.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Biermethode.....	220
6.13.2 Wiederfindung .....	220
6.13.3 Präzision der Biermethode .....	221
<b>6.14 Versuchsaufbau .....</b>	<b>222</b>
6.14.1 Gersten- und Malzscreening .....	222
6.14.1.1 Probennahme Gerste.....	222
6.14.1.2 Mälzungsprozess nach MEBAK R-110.00.008 [2016-03].....	222
6.14.2 Lagerversuch.....	223
6.14.2.1 Probenmaterial.....	223
6.14.2.2 Lagerbedingungen .....	223
6.14.2.3 Probennahme .....	223
6.14.3 Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess.....	224
6.14.3.1 Probenmaterial.....	224
6.14.3.2 MEBAK Mikromälzungsverfahren.....	224
6.14.3.3 Probennahme .....	224
6.14.3.4 Veränderungen der Mälzungsparameter .....	224
6.14.5 Brauprozess im Kleinsudwerk .....	226
6.14.4.1 Probenmaterial und -vorbereitung .....	226

---

6.14.4.2 Ablauf .....	226
6.14.4.3 Probennahme .....	226
6.14.5 Analytik diverser nationaler und internationaler Biere .....	227
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>228</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>249</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1</b> Übersicht über durch <i>Alternaria</i> spp. verursachte Pflanzenkrankheiten (Bottalico und Logrieco 1998). .....	4
<b>Tabelle 1.2</b> Überblick über Toxinkonzentrationen in Lebensmitteln der EU. UG = untere Grenzen, OG = obere Grenzen, Max = Maximale Konzentrationen in µg/kg (European Food Safety Authority (EFSA) 2011). .....	17
<b>Tabelle 1.3</b> Aktualisierte Expositionsbeurteilung von AOH, AME, TeA und TEN. Angaben in µg/kg. (Arcella et al. 2016). .....	18
<b>Tabelle 3.1</b> Tabellarische Auflistung der quantitativen <sup>1</sup> H-NMR Messungen von AOH-3-S und AME-3-S. s = Singulett, d = Doublet, m = Multiplet. ....	44
<b>Tabelle 3.2</b> Extinktionskoeffizienten AOH-3-S und AME-3-S in MeOH. ....	45
<b>Tabelle 3.3</b> Erhaltene Analytmengen sowie Biotransformationsraten der enzymatischen Synthese. Berechnung der Biotransformationsrate: Erhaltene Menge/Eingesetzte Menge · 100. ....	53
<b>Tabelle 3.4</b> Tabellarische Auflistung der quantitativen <sup>1</sup> H-NMR Messungen von AOH-3-S und AME-3-S. s = Singulett, d = Doublet, m = Multiplett. ....	55
<b>Tabelle 3.5</b> Extinktionskoeffizienten AOH-3-G und AOH-9-G (gemessen in ACN). ....	56
<b>Tabelle 3.6</b> Überblick über die für Stabilitätstests verwendeten Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten. Alle Daten wurden am Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie generiert. ....	61
<b>Tabelle 3.7</b> Geradengleichungen der Responsegeraden von AOH, AME und TeA. ....	70
<b>Tabelle 3.8</b> Matrixkalibriergeraden der Getreidemethode von ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G. ....	71
<b>Tabelle 3.9</b> Matrixkalibriergeraden der Biermethode von ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G. ....	72
<b>Tabelle 3.10</b> Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben. ....	102
<b>Tabelle 3.11</b> Wiederfindungsraten der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben angegeben als Mittelwert und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion. ....	103
<b>Tabelle 3.12</b> Gerätepräzision der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus sechs aufeinanderfolgenden Injektionen. ....	104
<b>Tabelle 3.13</b> Intra- und Inter-Day Präzisionen der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus drei (Intra-Day) bzw. neun (inter-day) Aufarbeitungen und jeweils einer Dreifachinjektion. ....	105



<b>Tabelle 3.14</b> Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Multimykotoxinanalytik in Bierproben. .....	106
<b>Tabelle 3.15</b> Wiederfindungsraten der Multimykotoxinanalytik in Bierproben angegeben als Mittelwert und Standardabweichung einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion. ....	107
<b>Tabelle 3.16</b> Gerätepräzision der Multimykotoxinanalytik in Bierproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) einer Sechsfachinjektion.....	108
<b>Tabelle 3.17</b> Intra- und Inter-Day Präzisionen der Multimykotoxinanalytik in Bierproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus drei (Intra-Day) bzw. neun (inter-day) Aufarbeitungen und jeweils einer Dreifachinjektion. ....	109
<b>Tabelle 3.18</b> Zusammenfassung der Analytik von 56 Gerstenproben aus den Erntejahren 2016 – 2021. Toxinkonzentrationen sind als Mittelwert und Standardabweichung einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben,.....	117
<b>Tabelle 3.19</b> Zusammenfassung der Analytik von 56 Malzproben aus den Erntejahren 2016 – 2021. Toxinkonzentrationen sind als Mittelwert und Standardabweichung einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben,.....	120
<b>Tabelle 3.20</b> Analytik der Malze vor und nach SORTEX Sortierung. ....	152
<b>Tabelle 3.21</b> Konzentrationen von TeA und TEN in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in $\mu\text{g}$ (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$ mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7). ....	154
<b>Tabelle 3.22</b> Konzentrationen von AOH, AME und AOH-3-S in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. In den Proben Heißtrub, Geläger und Bier konnte keines der Toxine nachgewiesen werden. Zur Berechnung des Toxingehaltes in $\mu\text{g}$ (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$ mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).....	156
<b>Tabelle 3.23</b> Konzentrationen von ALTP und ATX I in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in $\mu\text{g}$ (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$ mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).....	157
<b>Tabelle 3.24</b> TeA Konzentrationen dreier verschiedener Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Malzes Avangard während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in $\mu\text{g}$ (absolut)	

---

wurden die Mittelwerte der Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ bzw. $\mu\text{g}/\text{L}$ mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7). .....	159
<b>Tabelle 3.25</b> Prozentualer Verbleib der Tenuazonsäure während des Brauens.....	163
<b>Tabelle 3.26</b> Überblick über weitere im Brauprozess vorkommende Toxine (Pilsener Malz). .....	164
<b>Tabelle 3.27</b> Überblick über weitere im Brauprozess vorkommende Toxine in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Malz Avangard). Zur besseren Übersicht ist im Fall Replikat 1 = Replikat 2 nur ein Wert angegeben. .....	164
<b>Tabelle 3.28</b> Ergebnisse der analysierten Bierproben in $\mu\text{g}/\text{L}$ , angegeben als Mittelwert und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion. ....	171
<b>Tabelle 3.29</b> Ergebniszusammenfassung der Bieranalytik. ....	172
<b>Tabelle 6.1</b> Auflistung aller Referenzsubstanzen inklusive Summenformel, Molekulargewicht und Herkunft. ....	182
<b>Tabelle 6.2</b> Molekulargewicht und Herkunft der verwendeten stabilisotopenmarkierten Standards.....	183
<b>Tabelle 6.3</b> Verwendete Laborchemikalien. ....	183
<b>Tabelle 6.4</b> NMR-Lösungsmittel. ....	184
<b>Tabelle 6.5</b> Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte. ....	184
<b>Tabelle 6.6</b> Bestandteile der semi-präparativen HPLC-UV .....	188
<b>Tabelle 6.7</b> Messparameter zur Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S an der semi-präparativen HPLC.....	188
<b>Tabelle 6.8</b> Methode 1 zur Trennung der AOH-Gluoside von AME-3-Glucosid. ....	189
<b>Tabelle 6.9</b> Aufreinigung von AME-3-G und Trennung von AOH-3-G und AOH-9-G (Methode 2).....	189
<b>Tabelle 6.10</b> Bestandteile der analytischen HPLC-UV. ....	190
<b>Tabelle 6.11</b> Messparameter zur Matrixüberprüfung der Proben an der analytischen HPLC-UV. ....	190
<b>Tabelle 6.12</b> Messparameter zur Messung der Stabilitätstests an der analytischen HPLC-UV. .....	191
<b>Tabelle 6.13</b> Messparameter zur Quantifizierung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G an der analytischen HPLC-UV.....	191
<b>Tabelle 6.14</b> Bestandteile des LC-(ESI)-MS/MS. ....	192
<b>Tabelle 6.15</b> MS Parameter. ....	192
<b>Tabelle 6.16</b> Verwendete Massenübergänge und Geräteeinstellungen. ....	193
<b>Tabelle 6.17</b> Messparameter zur Messung der <i>Alternaria</i> Toxine am LC-MS/MS.....	194
<b>Tabelle 6.18</b> Messparameter zur Messung von Tenuazonsäure am LC-MS/MS.....	194

---

<b>Tabelle 6.19</b> Gerätebestandteile und Einstellungen LC-MS QTOF. ....	195
<b>Tabelle 6.20</b> Toxinkonzentrationen zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der modifizierten Toxine AOH-3-S und AME-3-S. ....	198
<b>Tabelle 6.21</b> Toxinkonzentrationen zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der modifizierten Toxine AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G.....	199
<b>Tabelle 6.22</b> Getestete Parameter für die Chromatographische Trennung der Analyten am LC-MS/MS. ....	200
<b>Tabelle 6.23</b> Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von AOH mit [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AOH. ....	201
<b>Tabelle 6.24</b> Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von AME mit [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AME. ....	201
<b>Tabelle 6.25</b> Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von TeA mit [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N] - TeA.....	202
<b>Tabelle 6.26</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ALTP und ALT in Gerste. ....	202
<b>Tabelle 6.27</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ATX I und ATX II in Gerste.....	203
<b>Tabelle 6.28</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für TEN und AME-3-G in Gerste.....	203
<b>Tabelle 6.29</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-G und AOH-9-G in Gerste.....	203
<b>Tabelle 6.30</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-S und AME-3-S in Gerste. ....	204
<b>Tabelle 6.31</b> Herstellung der tagesaktuellen Matrixkalibrierpunkte in Gerste.....	204
<b>Tabelle 6.32</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ALTP und ALT in Bier.....	205
<b>Tabelle 6.33</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ATX I und ATX II in Bier.....	205
<b>Tabelle 6.34</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für TEN und AME-3-G in Bier. ....	205
<b>Tabelle 6.35</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-G und AOH-9-G in Bier.....	206
<b>Tabelle 6.36</b> Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-S und AME-3-S in Bier. ....	206
<b>Tabelle 6.37</b> Dotierniveaus von AOH, AME, TEN, ALTP und TeA beim Testen einer Dilute and Shoot Methode. ....	208

<b>Tabelle 6.38</b> Dotierniveaus einer Malzprobe zur Überprüfung von Verlusten durch die Carrez-Fällung. ....	209
<b>Tabelle 6.39</b> Variation des Aufnahmelösungsmittels.....	212
<b>Tabelle 6.40</b> Übersicht veränderter Zentrifugationsbedingungen und Membranfilter.....	212
<b>Tabelle 6.41</b> Dotierniveaus zum Testen der Dilute and Shoot Aufarbeitung.....	214
<b>Tabelle 6.42</b> Dotierniveaus zum Überprüfen von Toxinverlusten durch Matrixfällung. ....	215
<b>Tabelle 6.43</b> Dotierniveau zur Überprüfung von Toxinverlusten durch Cyclohexanextraktion. ....	216
<b>Tabelle 6.44</b> Dotierniveaus zur Überprüfung der Rückstandsextraktion. ....	216
<b>Tabelle 6.45</b> Dotierniveaus der Getreideproben zur Bestimmung der NWG und BG. ....	218
<b>Tabelle 6.46</b> Dotierniveaus der Gerstenproben zur Bestimmung der Wiederfindungsraten. ....	219
<b>Tabelle 6.47</b> Dotierniveaus der Bierproben zur Bestimmung der NWG und BG. ....	220
<b>Tabelle 6.48</b> Dotierniveaus der Bierproben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate. ....	221
<b>Tabelle 6.49</b> Variierte Parameter während der Mälzung.....	225
<b>Tabelle 8.1</b> Detaillierte Ergebnisse der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Toxinstandards (in µg/kg) nach Lagerung im Kühlschrank (+ 6 °C). ....	255
<b>Tabelle 8.2</b> Detaillierte Ergebnisse der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Toxinstandards (in µg/kg) nach Lagerung im Kühlschrank (- 18 °C). ....	255
<b>Tabelle 8.3</b> Detaillierte Auflistung der Mykotoxinkonzentrationen in µg/kg von 56 analysierten Gersten- und deren Malzproben, sortiert nach Erntejahr. Nicht in der Tabelle aufgelistete Toxine konnten in keiner Probe detektiert werden. G = Gerste, M = Malz, F = Forschungsmuster, BP = Probe aus Berliner Programm, BG = Bestimmungsgrenze. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben. ....	256
<b>Tabelle 8.4</b> Detaillierte Ergebnisse der gelagerten Gerste (unvermälzt) in µg/kg. BP = Muster mit niedriger Symptomatik, RH = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.....	259
<b>Tabelle 8.5</b> Detaillierte Ergebnisse der gelagerten Gerste (vermälzt) in µg/kg. BP = Muster mit niedriger Symptomatik, RH = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben. ....	261
<b>Tabelle 8.6</b> Aufbau und Probennahmeprotokoll des Lagerversuchs.....	264
<b>Tabelle 8.7</b> Detaillierte Ergebnisse des Mälzungsverlaufes in µg/kg. Muster 1 = Muster mit niedriger Symptomatik, Muster 2 = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.....	267
<b>Tabelle 8.8</b> Detaillierte Mykotoxinkonzentrationen der Mälzungsvariationen in µg/kg. Muster 1 = Niedrige Symptomatik, Muster 2 = mittlere Symptomatik und Muster 3 = hohe	

---

Symptomatik. Kombination = CO <sub>2</sub> -Rast + 3. Nassweiche. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.....	268
<b>Tabelle 8.9</b> Mykotoxinbilanzierung der Brauversuche des Pilsener Malzes in %.....	269
<b>Tabelle 8.10</b> Mykotoxinbilanzierung der Brauversuche des Avangard Malzes in %.....	271
<b>Tabelle 8.11</b> Probenmenge und Entnahmepunkte für die Berechnung der Bilanzierung. ..	273

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b> Strukturformeln freier <i>Alternaria</i> Toxine. ....	7
<b>Abbildung 1.2</b> Strukturformeln modifizierter <i>Alternaria</i> Toxine. ....	8
<b>Abbildung 3.1</b> HPLC Chromatogramm der Trennung von AOH-3-S (A) und AME-3-S (B). Nicht markierte Signale stammen von der verbliebenen Pilzmatrix. ....	41
<b>Abbildung 3.2</b> Semi-präparative Nachreinigung von AOH-3-S. A = AOH-3-S, C = unbekannte Matrixkomponente. ....	41
<b>Abbildung 3.3</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von AME-3-S, gemessen in CD <sub>3</sub> OD. ....	42
<b>Abbildung 3.4</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von AOH-3-S, gemessen in CD <sub>3</sub> OD. ....	43
<b>Abbildung 3.5</b> UV-Spektrum von (A) AOH-3-S (leicht kontaminiert mit AOH) und (B) AME-3- S (je 1 µg/mL; MeOH). ....	44
<b>Abbildung 3.6</b> Relative Biotransformationsrate der im Enzymscreening der Umsetzung von AOH zu AOH-Glucosid getesteten Enzyme. ....	48
<b>Abbildung 3.7</b> Enzyme mit einer Umsetzungsrate von AOH zu AOH-Glucosid von mindestens 10 %. ....	48
<b>Abbildung 3.8</b> Relative Biotransformationsraten der Umsetzung von AME zu AME-3-G und von AOH zu AOH-Glucosiden. ....	49
<b>Abbildung 3.9</b> Trennung der AOH-Glucoside (1) von AME-3-G (2) und verbliebenen Matrixbestandteilen (Methode 1). ....	50
<b>Abbildung 3.10</b> Semipräparative Trennung von AOH-3-G (3) und AOH-9-G (4) sowie weitere Aufreinigung von AME-3-S (5) (Methode 2). ....	51
<b>Abbildung 3.11</b> Ergebnisse der Q-TOF Scans für AOH-3-G (A), AOH-9-G (B) und AME-3-G (C). ....	51
<b>Abbildung 3.12</b> Chromatographische Trennung und eindeutige Identifizierung von AOH-3-G (A) und AOH-9-G (B) mittels LC-MS/MS. ....	52
<b>Abbildung 3.13</b> <sup>1</sup> H-NMR des isolierten AOH-3-Glucosids aus dem Pilzextrakt. ....	54
<b>Abbildung 3.14</b> <sup>1</sup> H-NMR des isolierten AOH-9-Glucosids aus dem Pilzextrakt. ....	54
<b>Abbildung 3.15</b> UV-Spektren von (A) AOH-3-G und (B) AOH-9-G (je 1 µg/mL; in ACN). ....	55
<b>Abbildung 3.16</b> Schematische Darstellung der Ganzzell-Biotransformation in <i>Escherichia coli</i> . R = H: AOH/ AOH-3-G, R = CH <sub>3</sub> : AME/ AME-3-G. ....	57
<b>Abbildung 3.17</b> Grafische Auswertung der Ergebnisse der Photometer-Messungen bei -18 °C und +6 °C von AOH, AME, AOH-3-G und TEN. ....	62
<b>Abbildung 3.18</b> Grafische Auswertung der Ergebnisse der Photometer-Messungen bei -18 °C und +6 °C von ATX I, ATX II, ALTP und APML. ....	63

<b>Abbildung 3.19</b> HPLC Messungen (254 nm) des APMI zum Zeitpunkt 0 (A) und nach vier Wochen (B).....	64
<b>Abbildung 3.20</b> Ergebnisse der photometrischen Quantifizierung (Einzelbestimmung) des Stabilitätstestes unter Hitzeeinfluss (40 °C).....	65
<b>Abbildung 3.21</b> LC-MS/MS Chromatogramm der entwickelten Mykotoxinmethode. a: AOH-3-S, b: AME-3-S, c: AOH-9-G, d: AOH-3-G, e: ALT, f: AME-3-G, g: ATX I, h: ALTP, i: AOH, j: TEN, k: ATX II, l: AME.....	68
<b>Abbildung 3.22</b> LC-MS/MS Chromatogramme von AOH (A), AME (B) und TeA (C), sowie ihren korrespondierenden stabilisotopenmarkierten Analoga.....	69
<b>Abbildung 3.23</b> HPLC-Chromatogramm einer Gersten- (oben) und einer Malzprobe (unten) nach Aufarbeitung mit einer bereits etablierten Methodik zur Analytik von <i>Alternaria</i> Toxinen (190 nm). Entstandene Signale wurden durch Matrixkomponenten erzeugt, enthaltene Toxine waren aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht im UV sichtbar. In blau: Kritischer Matrixbereich aufgrund Co-Elution mit den modifizierten Toxinen. ....	76
<b>Abbildung 3.24</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Carrez-Klärung mit je 100 µL (A) bzw. 500 µL (B) Carrez-Lösung I und II. ....	78
<b>Abbildung 3.25</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). C: 100 µL TCA, D: 250 µL TCA. In blau: Kritischer Matrixbereich.....	79
<b>Abbildung 3.26</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Fällung mit verschiedenen Volumina an Carrez I und Carrez II Lösung. Die Fällung mit 750 µL ist nicht dargestellt, zeigte aber keine Unterschiede zur Fällung mit 500 µL und 1000 µL. ....	80
<b>Abbildung 3.27</b> Veranschaulichung der relativen Peakflächen mit und ohne Carrez-Klärung; die größere Peakfläche wurde hierbei als 100 % betrachtet. ....	80
<b>Abbildung 3.28</b> HPLC-UV Messung (190 nm) der Einzelnextraktionen der Ausgangsmethode. A: 1. Extraktion mit ACN/H <sub>2</sub> O (84/16, v/v), B: 2. Extraktion mit ACN/H <sub>2</sub> O (84/16, v/v), C: 3. Extraktion mit ACN/MeOH/H <sub>2</sub> O (50/25/25, v/v/v). In Blau: kritischer Matrixbereich.....	81
<b>Abbildung 3.29</b> Färbung der Proben nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln. a: erste Extraktion, b: zweite Extraktion, c: dritte Extraktion. ....	82
<b>Abbildung 3.30</b> HPLC-UV Messung (190 nm) der Extraktionen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen. A: 1. Extraktion mit ACN/H <sub>2</sub> O (50/50, v/v), B: 2. Extraktion mit ACN/H <sub>2</sub> O (75/25, v/v), C: 3. Extraktion mit ACN/MeOH/H <sub>2</sub> O (84/16, v/v). In Blau: kritischer Matrixbereich. ....	83
<b>Abbildung 3.31</b> Relativer Toxingehalt bei variierenden Extraktionsmittelzusammensetzungen und Extraktionszeiten. Berechnung des relativen Toxingehaltes durch Bezug auf die jeweils höchste Toxinkonzentration (= 100 %). ....	84

<b>Abbildung 3.32</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) des ersten Extraktionsschrittes mit 6 mL Methanol nach Aufreinigung mit verschiedenen Kartuschen. A: Discovery DSC-18, B: Strata-X Reversed Phase, C: Supelclean ENVI-Chrom P, D: Discovery DSC-CN, E: Chromabond HLB, F: Discovery DSC-8.....	85
<b>Abbildung 3.33</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) der Waschschrift Variation mit MeOH (A) und ACN (B). Oben: 1. Waschschrift, Mitte: zweiter Waschschrift, Unten: Elution. ....	86
<b>Abbildung 3.34</b> HPLC-Chromatogramm (190 nm) der SPE-Optimierung: A: nach Waschen mit zwei Säulenvolumen (12 mL) H <sub>2</sub> O, B: nach Waschen mit 6 mL H <sub>2</sub> O und 6 mL ACN/H <sub>2</sub> O (15/85, v/v). In blau: kritischer Matrixbereich. ....	87
<b>Abbildung 3.35</b> HPLC-Chromatogramme (190 nm) vier verschiedener Aufnahmelösungsmittel. A: ACN/H <sub>2</sub> O (3/7, v/v), B: ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v), C: ACN/H <sub>2</sub> O (7/3, v/v), D: ACN. ....	88
<b>Abbildung 3.36</b> LC-MS/MS Vergleich vier verschiedener Aufnahmelösungsmittel. ....	88
<b>Abbildung 3.37</b> Vergleich der erhaltenen Signalfächen für AOH-3-G und AME-3-S nach Matrixfällung und nach direktem Probenauftrag auf die SPE-Kartusche, jeweils bezogen auf den größten Wert. ....	91
<b>Abbildung 3.38</b> HPLC-Chromatogramme nach Matrixfällung im Verhältnis 1:1 (A) und 2:1 (B) (ACN/Bier, v/v).....	92
<b>Abbildung 3.39</b> Relativer Toxingehalt in dotiertem Bier nach Fällung mit ACN sowie nach direktem Auftrag des Bieres auf die SPE-Kartusche. ....	93
<b>Abbildung 3.40</b> HPLC Chromatogramme (190 nm) einer Bierprobe ohne Cyclohexan-Extraktion (A) und mit Cyclohexanreduktion (2,5 mL Cyclohexan, B). Blau: kritischer Matrixbereich. ....	94
<b>Abbildung 3.41</b> Vergleich des relativen Toxingehaltes nach Extraktion mit drei verschiedenen Volumina Cyclohexan.....	95
<b>Abbildung 3.42</b> Relative Toxinausbeute einer dotierten Probe mit und ohne Cyclohexan-Extraktion bezogen auf die Signalfächen der Extraktion ohne Cyclohexan. ....	95
<b>Abbildung 3.43</b> Anbauggebiete der Gerstenproben für den Standortvergleich über 4 Erntejahre hinweg (2018 – 2021). ....	121
<b>Abbildung 3.44</b> Toxinvergleich von Gerste und Malz sechs verschiedener Standorte aus den Jahren 2018 – 2021.....	122
<b>Abbildung 3.45</b> Toxingehalte in drei gelagerten Gerstenmustern vor der Lagerung, sowie nach 3 und 8 Monaten. ....	132
<b>Abbildung 3.46</b> Toxingehalte der drei gelagerten Gerstenmuster nach Mälzung.....	134
<b>Abbildung 3.47.</b> Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess – Muster mit niedriger (optischer) Symptomatik. ....	142



<b>Abbildung 3.48</b> Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess – Muster mit hoher (optischer) Symptomatik. Die Probe des Grünmalzes (= vor Darre) lag für dieses Muster nicht vor.....	142
<b>Abbildung 3.49</b> Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit niedriger Symptomatik.....	143
<b>Abbildung 3.50</b> Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit mittlerer Symptomatik.....	144
<b>Abbildung 3.51</b> Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit hoher Symptomatik.....	144
<b>Abbildung 3.52</b> Malz Avangard vor SORTEX Reinigung (a), als saubere Batch (b) und als aussortierter Abputz (c).....	151
<b>Abbildung 3.53</b> Pilsener Malz nach SORTEX Sortierung. A: Saubere Batch, B: aussortierter Abputz.....	151
<b>Abbildung 3.54</b> Bilanzierung der <i>Alternaria</i> Toxine AOH, AME und TeA über den Brauprozess (Pilsener Malz, je zwei Replikate).....	161
<b>Abbildung 3.55</b> Bilanzierung der <i>Alternaria</i> Toxine ALTP, ATX I, TEN und AOH-3-S über den Brauprozess (Pilsener Malz, je zwei Replikate).....	162
<b>Abbildung 3.56</b> Bilanzierung der <i>Alternaria</i> Toxine AOH und TeA über den Brauprozess (Malz Avangard, je zwei Replikate).....	163
<b>Abbildung 3.57</b> Darstellung der TeA Konzentrationen und der jeweiligen Stammwürze...173	
<b>Abbildung 6.1</b> Aufbau des Lagerversuches.....	223
<b>Abbildung 6.2</b> Darstellung des Mälzungsverlaufes inklusive der durchgeführten Variationen. ....	225
<b>Abbildung 8.1</b> <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD) von AOH-3-S (Verbindung 1, isoliert aus Pilzextrakt). $\delta$ 7.92 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 2.82 (s, 3H).....	250
<b>Abbildung 8.2</b> <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD) von AOH (Verbindung 2, Verunreinigung im isolierten AOH-3-S). $\delta$ 7.39 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 2.86 (s, 3H).....	251
<b>Abbildung 8.3</b> <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, MeOD) von AME-3-S (isoliert aus Pilzextrakt). $\delta$ 7.40 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.86 (s, 3H).....	252
<b>Abbildung 8.4</b> <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, MeOD) von AOH-3-G (enzymatisch synthetisiert aus Pilzextrakt). $\delta$ 7.32 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.95 – 3.90 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.55 – 3.51 (m, 1H), 3.50 – 3.47	

(m, 2H), 3.42 – 3.37 (m, 1H), 2.82 (s, 3H). Eine exakte Zuordnung der Glucosidsignale war nicht möglich, da die vorliegende Menge nur für ein  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum gereicht hat. ....253

**Abbildung 8.5**  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz, MeOD) von AOH-9-G (enzymatisch synthetisiert aus Pilzextrakt).  $\delta$  7.50 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.67 – 3.59 (m, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 3H), 2.79 (s, 3H). Eine exakte Zuordnung der Glucosidsignale war nicht möglich, da die vorliegende Menge nur für ein  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum gereicht hat. ....254

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Genus *Alternaria* spp.

### 1.1.1 Mykologische Charakteristika

Schimmelpilze des Genus *Alternaria* spp. wurden anhand eines *A. alternata* Isolats (früher *A. tenuis*) von Nees im Jahr 1817 entdeckt und gehören systematisch dem Stamm der Ascomyceten sowie der Klasse der Dothideomyceten an, in welcher sie zur Ordnung der Pleosporales zählen und in die Familie der Dematiaceae eingestuft werden (Bottalico und Logrieco 1998; Thomma 2003; Nagrale et al. 2016). Aufgrund der Asexualität diverser *Alternaria* Species, zählt *Alternaria* spp. auch zu den sogenannten Fungi Imperfecti (Thomma 2003). Die von diesem Genus gebildeten Kolonien werden meist als braun bis schwarz bezeichnet, die Konidiophoren sind dunkel, kurz und unverzweigt (Reiß 1998; Bottalico und Logrieco 1998). Zudem werden charakteristische Quer- und Längswände gebildet, die als elliptisch oder eiförmig beschrieben werden (Reiß 1998; Thomma 2003). Konidien von *Alternaria* spp. bilden charakteristische Ketten aus, die sowohl verzweigt als auch unverzweigt vorkommen können und an ihrem Ursprung breiter als am Kettenende sind (Thomma 2003).

Der Genus *Alternaria* spp. ist ubiquitär vorhanden und kann in über 100 Arten unterschieden werden, von denen in Europa ca. 40 als phytopathogene Arten bekannt sind (Thomma 2003; Lee et al. 2015; Simmons 1992). Einige der bekanntesten Spezies sind *A. alternata* (Fr.) Keissler, *A. tenuissima*, *A. solani*, *A. brassicicola*, *A. citri*, *A. longipes* und *A. capisci-annui* (Reiß 1998). Die verschiedenen Spezies werden meistens anhand ihrer charakteristischen Konidien identifiziert, wobei vor allem die Größe, der Konidienschnabel und die Kettenlänge beurteilt werden (Logrieco et al. 2009; Rotem 1998). Spezies mit kurzen Ketten sind z.B. *A. tenuissima* und *A. japonica*, wohingegen Spezies wie *A. alternata*, *A. brassicicola* und *A. citri* Ketten mit mehr als fünf Konidien ausbilden und somit als langkettig bezeichnet werden (Bottalico und Logrieco 1998; Rotem 1998). Da sich einige Spezies aber in ihrer Konidienstruktur stark ähneln, ist eine Identifizierung zwischen eng verwandten Spezies anhand ihrer morphologischen Eigenschaften unzuverlässig. Ebenso kann es leicht zu Verwechslungen mit anderen Genera, wie zum Beispiel *Stemphylium* oder *Ulocladium*, kommen, da deren Konidienstruktur denen von *Alternaria* spp. ähnelt. Als eindeutiges Identifizierungsmerkmal von *Alternaria* spp. zeigen sich der typische Konidienschnabel sowie die verketteten Konidien, welche bei den anderen Pilzarten nicht vorliegen. (Bottalico und Logrieco 1998; Thomma 2003).

Pilze des Genus *Alternaria* spp. bilden Sporen, deren starke Pigmentierung vermutlich für die UV-Resistenz verantwortlich ist und somit die Kolonisierung auf verschiedenen Pflanzenarten fördert (Lee et al. 2015). Hauptverantwortlich für die Pigmentierung ist Melanin, welches den Pilz auch vor Stress oder ungünstigen klimatischen Bedingungen sowie mikrobiellen Antagonisten schützt (Thomma 2003). Pilze des Genus *Alternaria* spp. sind somit sehr robust gegen äußere Bedingungen, sodass die Sporen sowie auch das Mycel über einen sehr langen Zeitraum bei extremen Temperaturen überleben können (Thomma 2003). Gefunden werden kann diese Pilzgattung nahezu überall, vor allem in der Atmosphäre, in der Erde, auf Saatgut und in landwirtschaftlichen Produkten (Bottalico und Logrieco 1998; Rotem 1998). *Alternaria* Spezies sind Pflanzenpathogene, die hauptsächlich die Oberfläche diverser Nutzpflanzen entweder direkt auf dem Feld oder auch erst während des Lagerns befallen (Bottalico und Logrieco 1998). Beim Lagern unter trockenen Bedingungen können über 40 % der Konidien über ein Jahr überleben, sodass *Alternaria* Pilze aus diesem Grund oftmals auch als Lagerpilze bezeichnet werden, wobei sie prinzipiell den Feldpilzen zugehörig sind (Bottalico und Logrieco 1998; Flannigan 1969; Noots et al. 1999).

Hauptvertreter ist hierbei die Spezies *A. alternata*, welche über 100 verschiedene Pflanzenarten befallen kann und somit vor allem auf Obst und Gemüse sowie auf fast allen Getreidearten zu finden ist, was teilweise hohe Ertragseinbußen zur Folge hat (Bottalico und Logrieco 1998; Thomma 2003). *A. alternata* bevorzugt Temperaturen um die 25 °C, kann aber auch extreme Temperaturen bis 36 °C bzw. zwischen 2,5 – 6,5 °C überleben. Um ein Pilz- und Sporenwachstum zu ermöglichen, sollte zudem mindestens ein  $a_w$  Wert von 0,84 - 0,88 und ein pH-Wert zwischen 2,7 und 8 vorliegen. Das Optimum für ideale Wachstumsbedingungen liegt hierbei bei einem  $a_w$ -Wert von 0,98 – 1,0 sowie einem pH von 4-6,6 vor; ein Wachstum ohne Sauerstoff ist für *Alternaria* spp. nicht möglich (Bottalico und Logrieco, 1998).

### **1.1.2 Krankheiten induziert durch *Alternaria* spp.**

#### *1.1.2.1 Humanerkrankungen*

Schimmelpilzsporen werden klassischerweise über die Luft verbreitet und können sowohl draußen in der Natur als auch innerhalb von Gebäuden nachgewiesen werden (Breitenbach und Simon-Nobbe 2002). Einige Menschen entwickeln aufgrund dieser Sporen eine Sensitivität bzw. allergische Reaktionen, welche sich hauptsächlich in Form von Atembeschwerden oder asthmatischen Anfällen äußern (Unger et al. 1999; Rotondo et al. 2018; Gergen et al. 1987; Salo et al. 2006). Das Vorkommen von Sensitivitäten gegenüber einzelnen Schimmelpilzen, wie zum Beispiel *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum* oder

auch *Aspergillus fumigatus*, liegt meist bei unter 1 % der Bevölkerung, kann jedoch auf über 30 % steigen, sofern die geografischen und klimatischen Bedingungen das Schimmelpilzwachstum fördern, wie es in einigen Teilen Südamerikas der Fall ist (Unger et al. 1999; Halonen et al. 1997; Salo et al. 2006). Vor allem Sporen der Gattung *Alternaria spp.* sind in der Lage verschiedene Allergene zu bilden, die auch in einzelnen Strängen stark variieren können. Als Hauptallergen wurde das Protein Alt a1 identifiziert, jedoch ist hier wie bei allen anderen Allergenen unklar welche Rolle diese für die biologischen Abläufe im Leben des Schimmelpilzes spielen (Unger et al. 1999). Die meisten identifizierten Allergene haben jedoch gemein, dass es sich um intrazelluläre Proteine handelt, welche nicht sporenspezifisch sind (Breitenbach und Simon-Nobbe 2002). Die große Anzahl an Allergenen sorgt zudem für Probleme bei Allergietests, da Hauttests mit käuflich erworbenen Pilzextrakten aus nur einem Stamm hergestellt werden und somit zu unspezifisch sind sowie eine sehr geringe Sensitivität besitzen (Unger et al. 1999; Rotondo et al. 2018). Aktuell werden für Allergietests keine Pilzextrakte, sondern die Hauptallergene in Reinform eingesetzt, wodurch die Diagnose deutlich verbessert werden konnte (Unger et al. 1999; Breitenbach und Simon-Nobbe 2002), jedoch ist es immer noch schwierig die effektive Dosis und Zusammensetzung zu ermitteln, die für eine Immuntherapie nötig ist (Rotondo et al. 2018).

Neben den Allergien können noch weitere Krankheiten von Pilzen der Gattung *Alternaria spp.* verursacht werden, die bisher jedoch fast ausschließlich bei immungeschwächten Personen nach Knochenmarkspenden oder Organtransplantationen aufgetreten sind. Bisher stellen kutane und subkutane Infektionen das Hauptkrankheitsbild dar, ebenso verbreitet sind aber auch Augenerkrankungen, Entzündungen der Nasenschleimhaut und Nasennebenhöhlen, sowie Pilzkrankungen der Nägel (Pastor und Guarro 2008). Zusammenfassend werden alle von *Alternaria spp.* verursachten Krankheitssymptome auch als Alternariose bezeichnet, wobei nicht *A. alternata* bzw. *A. tenuissima* – wie lange angenommen – die Hauptauslöser sind, sondern *A. infectoria*. Dadurch dass diese Gattung nicht gut auf Agarplatten sporuliert und zudem auch einen Pigmentmangel besitzt, ist hier die Identifizierung einer vorliegenden Alternariose meist nur durch Experten möglich. Bis zum Jahr 2007 wurde weltweit von 210 Alternariose-Erkrankungen berichtet; die Behandlung verläuft meistens problemlos mit konventionellen Antipilz-Medikamenten, wie zum Beispiel Itraconazole (Pastor und Guarro 2008).

#### 1.1.2.2 Pflanzenbefall

Pilze der Gattung *Alternaria spp.* können eine Vielzahl von Pflanzen befallen, was besonders im landwirtschaftlichen Sektor zu hohen Ernteeinbußen führen kann. Vor allem feuchte klimatische Bedingungen sind für das Wachstum von *Alternaria spp.* förderlich, wodurch je

nach Pflanzenart verschiedene Befallssymptome auf den Blättern, Blüten und Früchten auftreten können (Bottalico und Logrieco 1998; Logrieco et al. 2009). Die meisten Spezies sind Pathogene für nur eine oder wenige Pflanzen, wohingegen vor allem *A. alternata* ortsunabhängig eine Vielzahl an Pflanzen befallen kann (Bottalico und Logrieco 1998). Einige Krankheitssymptome, sowie die verantwortlichen *Alternaria* Spezies sind beispielhaft zusammen mit den am stärksten betroffenen Pflanzen in Tabelle 1.1 dargestellt (Bottalico und Logrieco 1998; Logrieco et al. 2009). Ein Befall äußert sich oftmals durch braune Nekrosen, welche sich konzentrisch um den Pilz herum ausbreiten (Agarwal et al. 1997), oder wie im Falle von Getreide durch eine Schwarzfärbung der Körner (Bottalico und Logrieco 1992; Williamson 1997; Walker et al. 2008).

**Tabelle 1.1** Übersicht über durch *Alternaria* spp. verursachte Pflanzenkrankheiten (Bottalico und Logrieco 1998).

Spezies	Pflanzenart	Symptome
<i>A. alternata</i>	z.B. Getreide	Schwarzfärbung des Korns
<i>A. alternata f.so. lycopersici</i>	Tomate	Schwarze Flecken am Stamm, Fruchtfäule
<i>A. brassicae</i>	Salat, Brokkoli, Blumenkohl	Braune Flecken auf den Blättern, Keimlingsfäule
<i>A. capsici-annui</i>	Paprika	Schwarze Flecken auf der Frucht
<i>A. dauci</i>	Karotten	Wurzel- und Keimlingsfäule, Mehltau
<i>A. porri</i>	Zwiebel, Knoblauch, Lauch	Lila Blattflecken
<i>A. solani</i>	Kartoffel, Tomate, Paprika	Blattflecken, Stammnekrose, Fruchtfäule

Bei einem Befall mit *Alternaria* spp. dringen die Sporen in das Pflanzengewebe ein und verbleiben so lange in einem Ruhezustand, bis die äußeren Gegebenheiten das Wachstum fördern (Rotem 1998). Aus diesem Grund kann *Alternaria* spp. auch oftmals auf gesund aussehenden Pflanzen zu einem späteren Zeitpunkt eine Infektion auslösen, wobei Pflanzen mit durch Stress geschwächtem Gewebe meist häufiger befallen werden (Agarwal et al. 1997).

*A. alternata* ist aufgrund seines unspezifischen Befalls diverser Nutzpflanzen der bedeutendste Vertreter der Gattung *Alternaria* spp. Pflanzenkrankheiten werden zudem oft zusätzlich von Mykotoxinbildung begleitet, vor allem bei Befall mit *A. alternata* und *A. tenuissima* (Bottalico und Logrieco 1998; Vučković et al. 2013). Die Bildung dieser kann die

Stärke der Krankheitssymptome verstärken und stellt ein potenzielles Gesundheitsrisiko für den Menschen dar (Thomma 2003).

### 1.1.3 Mykotoxinbildung

Mykotoxine sind von diversen Pilzen gebildete toxische Sekundärmetaboliten, die in der Regel ein niedriges Molekulargewicht besitzen und sich in ihrer chemischen Struktur zum Teil stark unterscheiden, zum Teil aber auch strukturell sehr ähnlich sein können (Vučković et al. 2013; Thomma 2003). Die Funktion von Mykotoxinen ist bisher noch nicht ausreichend erforscht, jedoch wird aktuell angenommen, dass diese für das Wachstum des Pilzes nicht zwingend notwendig sind, aber bei der Abwehr konkurrierender Organismen vorteilhaft sein können.

Auch Pilze der Gattung *Alternaria* spp. sind in der Lage Mykotoxine zu bilden, wobei die Anzahl der verschiedenen gebildeten Toxine stark von der jeweiligen Spezies beeinflusst wird. Vor allem *A. alternata* (Fr.) Keissler und *A. tenuissima* sind bekannte Toxinbilder, die somit durch ihre unspezifischen Befallsmuster eine ganze Bandbreite an Pflanzen und Landwirtschaftsgütern mit Toxinen kontaminieren können, was besonders durch feuchte klimatische Verhältnisse begünstigt wird (Vučković et al. 2013; Bottalico und Logrieco 1998). Generell kann bei *Alternaria* Toxinen zwischen wirtsspezifischen und nicht-wirtsspezifischen Toxinen unterschieden werden. Letztere besitzen im Vergleich zu den wirtsspezifischen Toxinen meistens eine geringere Phytotoxizität, sind jedoch auf einer größeren Anzahl an Pflanzen zu finden, wohingegen wirtsspezifische Toxine nur von bestimmten Spezies auf bestimmten Pflanzen gebildet werden und stärkere Effekte hervorrufen (Thomma 2003). Von *Alternaria* spp. sind mindestens 12 Spezies mit wirtsspezifischen Toxinen bekannt, wobei die meisten von *A. alternata* abstammen. Bekanntester Vertreter sind hier die AAL Toxine, die von *A. lycopersici* auf Tomaten gebildet werden, weitere bekannte wirtsspezifische Toxine sind die AF – Toxine (*A. alternata* auf Erdbeere, Nashi Birne), ACT – Toxine (*A. citri* auf Mandarinen, Nashi Birne), AM – (*A. mali* auf Nashi Birne) und ACR – Toxine (*A. citri* auf rauer Zitrone) sowie das AK-Toxin (*A. kikuchiana* auf Nashi Birne) und AT-Toxin (*A. longipes* auf Tabak) (Thomma 2003; Otani und Kohmoto 1992). Die wichtigsten Vertreter der wirtsunabhängigen Toxine werden im nächsten Kapitel weiter erläutert.

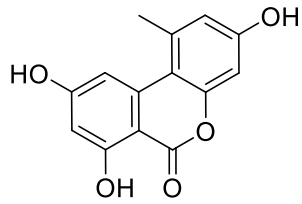
## 1.2 *Alternaria* Mykotoxine – Vorkommen und Toxizität

Die bekanntesten Vertreter unter den *Alternaria* Toxinen sind Alternariol (AOH), Alternariol monomethylether (AME), Tenuazonsäure (TeA), Tentoxin (TEN), Alvertoxin I (ATX I) und Alvertoxin II (ATX II), sowie Alterperyleneol (ALTP), Altenuen (ALT) und Stemphytoxin III (STE III). Zudem ist in den letzten Jahren auch die Bedeutung modifizierter Toxine gestiegen, von denen bei *Alternaria* Toxinen bislang AOH-3-Sulfat (AOH-3-S) und AME-3-Sulfat (AME-3-S) sowie die glykosylierten Formen AOH-3-Glucosid (AOH-3-G), AOH-9-Glucosid (AOH-9-G) und AME-3-Glucosid (AME-3-G) am bekanntesten sind. Anhand ihrer chemischen Struktur können die Toxine in mehrere Gruppen eingeteilt werden: So gehören AOH, AME und ALT zur Gruppe der Dibenzo- $\alpha$ -pyrone, wohingegen ATX I, ATX II, STE III und ALTP den Perylenquinonen zugeordnet werden. Die Toxine TeA und TEN unterscheiden sich in ihren Strukturen stark von den anderen und können als Gruppe der stickstoffhaltigen Toxine zusammengefasst werden; ebenso werden alle Toxine mit modifizierten Seitengruppen als modifizierte Toxine bezeichnet. Die Strukturformeln aller genannten Toxine, sowie die zugehörigen Summenformeln sind in Abbildung 1.1 (freie Toxine) und Abbildung 1.2 (modifizierte Toxine) dargestellt.

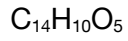
Nicht jedes Toxin kann jedoch von allen *Alternaria* Spezies gebildet werden, sodass in befallenen Pflanzen meist nur einzelne oder wenige Toxine nachgewiesen werden können. Auch innerhalb einer Spezies kommt es zu Unterschieden der verschiedenen Isolate, sodass eine Speziesbestimmung nicht ausreichend ist, um Aussagen über die Toxinbildung zu treffen (Grabarkiewicz-Szczesna und Chełkowski 1992; Andersen et al. 2015; Zwickel et al. 2018).

Die Eigenschaften der jeweiligen Toxine sowie ihre Toxizität soll anhand der einzelnen Gruppen in den nächsten Unterkapiteln erläutert werden.

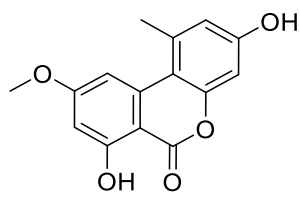




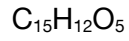
AOH



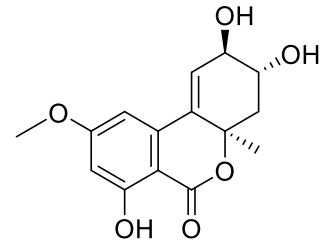
258,2 g/mol



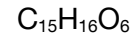
AME



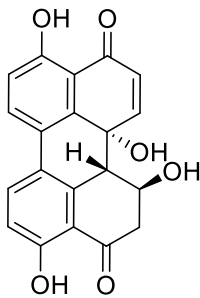
272,3 g/mol



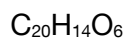
ALT



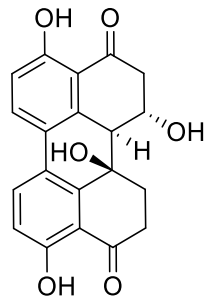
292,3 g/mol



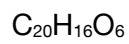
ALTP



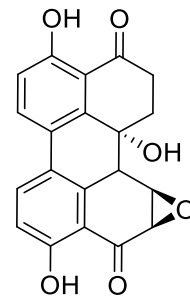
350,3 g/mol



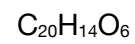
ATX I



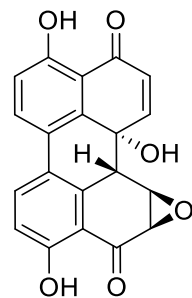
352,3 g/mol



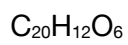
ATX II



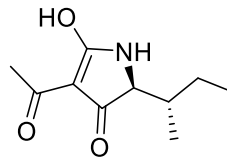
350,3 g/mol



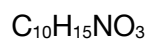
STE III



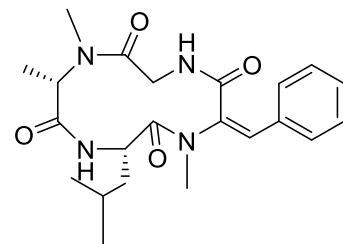
348,3 g/mol



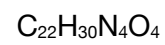
TeA



197,2 g/mol

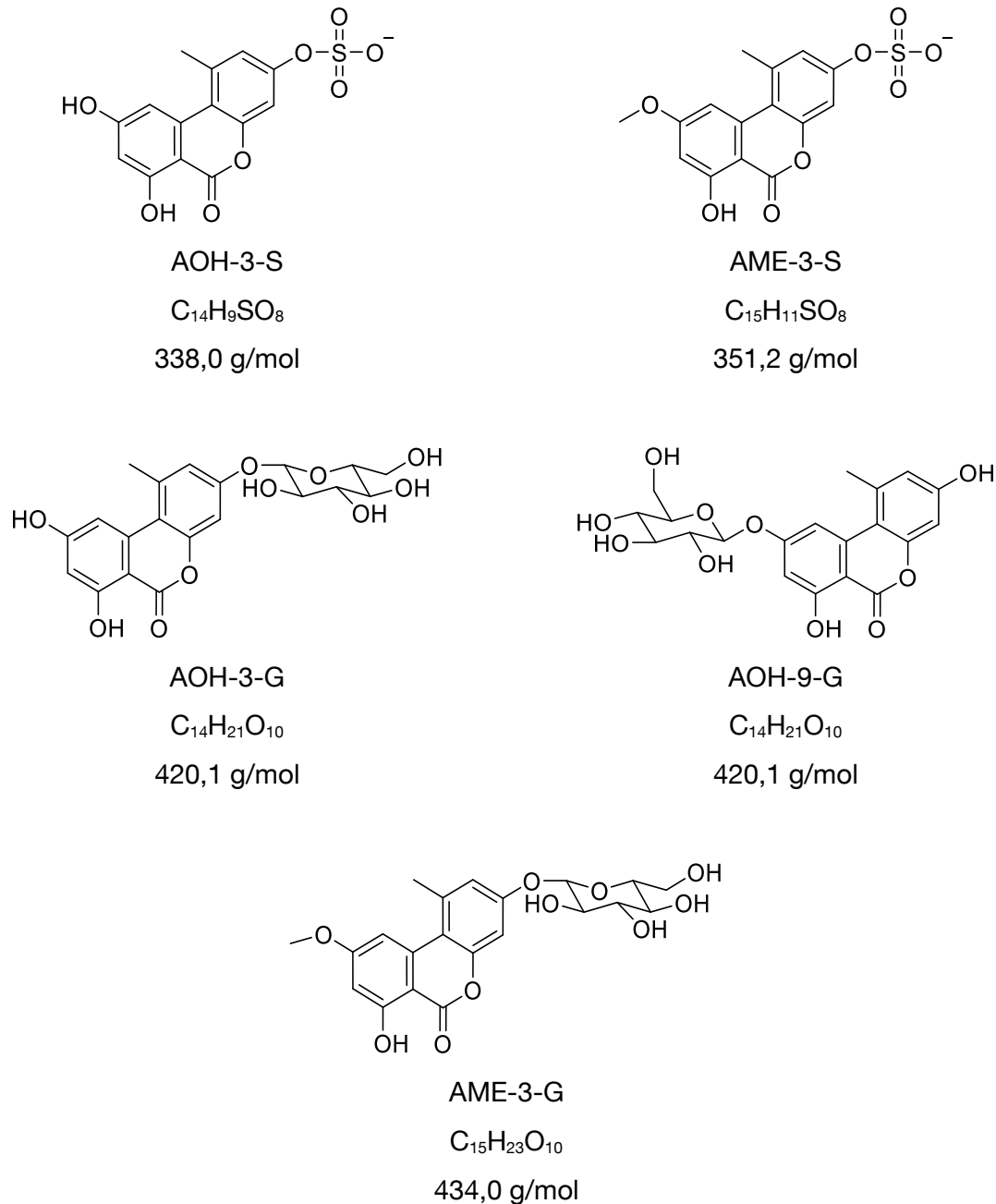


TEN



414,5 g/mol

Abbildung 1.1 Strukturformeln freier *Alternaria* Toxine.



**Abbildung 1.2** Strukturformeln modifizierter *Alternaria* Toxine.

### 1.2.1 Dibenzo- $\alpha$ -Pyrone

Die Toxine AOH (= 3,7,9-trihydroxy-1-methyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on) und AME (= 3,7-dihydroxy-9-methoxy-1-methyl-6H-dibenzo-[b,d]pyran-6-on) waren unter den ersten *Alternaria* Metaboliten, die im Jahr 1953 von Raistrick et al. (1953) aus einer Kultur von *A. tenuis* isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden konnte. Beide Toxine sind strukturell fast identisch, jedoch besitzt AME an Position C-9 eine Methoxygruppe, wodurch sich auch die toxikologischen Eigenschaften zum Teil unterscheiden (Raistrick et al. 1953).

ALT (= 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,4 $\alpha\beta$ -tetrahydro-2,3,7-trihydroxy-9-methoxy-4 $\alpha$ -methyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on) zählt ebenso wie AOH und AME zur Gruppe der Dibenzo- $\alpha$ -pyrone, jedoch sind toxikologische Daten für dieses Toxin nur spärlich vorhanden. Dieser Metabolit sowie das iso-ALT wurden im Jahr 1971 von Pero et al. (1971a) analog zu AOH und AME aus Kulturen von *A. tenuis* isoliert.

Generell sind diese drei Dibenzo- $\alpha$ -pyrone nicht akut toxisch, zeigen aber in mehreren Assays eine genotoxische, cytotoxische und mutagene Wirkung, welche wiederum eine Kanzerogenität mit sich bringen kann (Pero et al. 1973; Logrieco et al. 2009; Yekeler et al. 2001; Ostry 2008). Beim Vergleich verschiedener Tests ist jedoch aufgefallen, dass die Ergebnisse nicht immer eindeutig sind. So hing zum Beispiel die mutagene Aktivität von AOH und AME vom verwendeten Assay ab, da beide Toxine zwar eine starke Mutagenität in *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* ND-160 Assays aufzeigen, jedoch bei den Ames *Salmonella* Strängen TA98 und TA100 keine bzw. kaum eine Aktivität zu beobachten war. Aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Toxine entweder nur bestimmte Genome oder DNA-Sequenzen angreifen oder in den verwendeten Extrakten noch bisher unbekannte mutagene Verbindungen enthalten waren (Schrader et al. 2001; An et al. 1989).

In mehreren Zelltests wurde zudem festgestellt, dass AOH genotoxischer als AME ist, und auch in Tierversuchen mit Mäusen wurde bei AME ein geringerer toxischer Effekt beobachtet, der sich vor allem in einer geringeren Sterblichkeit der Versuchstiere äußerte (Pero et al. 1973; Logrieco et al. 2009; Yekeler et al. 2001; Bottalico und Logrieco 1998). Bei diesen Tierversuchen wurde die Karzinogenität beider Toxine bestätigt, da beide ein Plattenepithelkarzinom in Mäusen verursacht haben, wobei für AME eine höhere Dosis als für AOH nötig war (Logrieco et al. 2009; Yekeler et al. 2001). Zudem wurden eine durch AOH ausgelöste teratogene/fetotoxische Aktivität in schwangeren Mäusen festgestellt, bei AME zeigte sich dieser Effekt in schwangeren Goldhamstern mit einem signifikanten Anstieg an Fehlgeburten und Fehlbildungen (Bottalico und Logrieco 1998).

AOH wirkt nachweislich auch als Inhibitor der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I sowie Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ . Auch hier zeigt AME erst in höheren Konzentrationen die gleiche Wirkung wie AOH (Fehr et al. 2009; Burkhardt et al. 2012). Pfeiffer et al. (2007) konnten zudem in drei verschiedenen Zelltypen nachweisen, dass AOH und AME in der Lage sind DNA-Stränge aufzubrechen, was wiederum durch die Hemmung der Topoisomerase Aktivität begünstigt wird, und folglich schwere DNA Schäden verursachen kann.

Desweiteren wurde herausgefunden, dass in Caco-2 Zellen neben Glucuronidierungs- auch Sulfatierungsreaktionen von AOH und AME stattfinden, wobei AOH hauptsächlich unkonjugiert in das Blut übergeht und AME nur konjugiert basolateral nachgewiesen werden konnte. Folglich wird davon ausgegangen, dass die intestinale Absorption von AOH sehr schnell erfolgt, wohingegen AME lediglich langsam und in geringem Umfang absorbiert wird (Burkhardt et al. 2009). Die Umwandlung von AOH und AME in Glucuronide scheint ein effektiver Weg zur Abschwächung des genotoxischen Potentials zu sein, da diese modifizierten Formen scheinbar inaktiv sind oder sehr schnell aus den Zellen eliminiert werden (Burkhardt et al. 2012).

ALT verhielt sich im Ames *Salmonella* Test ähnlich wie AOH und AME und zeigte eine geringe Mutagenität, jedoch besitzen weder ALT noch iso-ALT eine Topoisomerase I und II hemmende Wirkung (Schrader et al. 2001). Zudem wurde in einer Studie mit Rattenlebermikrosomen die Tendenz zu Modifizierungen beider Toxine festgestellt, was in beiden Fällen durch eine oxidative Hydroxylierung an Position 8 erfolgte (Pfeiffer et al. 2009b). Durch die hier vorliegende Catecholform sind auch in diesem Bereich noch mehr toxikologische Studien zwingend erforderlich.

Um weitere Einblicke in die metabolischen in vivo Vorgänge zu bekommen, wurde von Puntscher et al. (2019) eine Vorstudie mit Mäusen durchgeführt, bei der festgestellt wurde, dass nur ein Bruchteil des eingesetzten AOHs in den Ausscheidungen gefunden werden konnte (6-10 % im Urin und 9 % in den Fäzes), wohingegen AME zu einem großen Teil als AME-3-Sulfat ausgeschieden wurde. Da diese Vorgänge für zukünftige Risikobewertungen von großer Wichtigkeit sind, soll demnächst eine größere Studie durchgeführt werden, die neben dem Metabolismus auch die Genotoxizität, eine potenzielle Östrogenität sowie den Einfluss von Stressfaktoren aufklären soll (Puntscher et al. 2019).

### 1.2.2 Perylenquinone

Die Perylenquinone ATX I (= 1,2,7,8,12b-pentahydro-1,4,6b,10-tetrahydroxyperylene-3,9-dion), ATX II (= [perylo(1,2-b)oxirene-7,11-dione,7a,8a,8b,8c,9,10hexahydro-1,6,8c-trihydroxy-, (7aR,8aR,8bS,8cR)-]), STE III (= Perylo(1,2-b)oxirene-7,11-dione,7a,8a,8b,8c-tetrahydro-1,6,8c-trihydroxy-,(7aR-(7a,8a,8b,8c)) und ALTP (= Alteichin; (1S,12aR,12bS)-1,4,9,12a-tetrahydroxy-2,12b-dihydro-1H-perylene-3,10-dione) unterscheiden sich in ihren Strukturen nur minimal, weswegen es zu Beginn zu einigen Fehlidentifikationen und Überschneidungen kam. So wurden im Jahr 1973 zum ersten Mal ATX I und ATX II aus Kulturen von *Alternaria* spp. isoliert (Pero et al. 1973), ein Strukturvorschlag für ATX I wurde jedoch erst 1982 von Stinson et al. (1982) publiziert, welcher sich im Nachhinein als inkorrekt

herausstellte. Dies wurde im Jahr 1983 festgestellt, als japanische Wissenschaftler die zwei neuen *Alternaria* Metaboliten Alterperylenol und Dihydroalterperylenol isoliert und deren Struktur ebenfalls aufgeklärt haben. Die Struktur von Alterperylenol war hierbei identisch zu dem von Stinson et al. (1982) publizierten Strukturvorschlag für ATX I, allerdings stimmten die chemischen Eigenschaften nicht mit diesem überein. Zusätzlich wurde von Robeson et al. (1984) über ein weiteres neues Toxin namens Alteichin berichtet, welches jedoch identisch zum bereits vorher entdeckten Alterperylenol war, sodass in der Literatur immer noch beide Bezeichnungen für dasselbe Toxin zu finden sind. Die finale Strukturaufklärung von ATX I und ATX II, sowie die Entdeckung von ATX III, erfolgte dann im Jahr 1986 durch Stack et al. (1986), bei welcher auch erkannt wurde, dass ATX I und Dihydroalterperylenol dasselbe Toxin beschreiben (Stack und Prival 1986). Das Toxin STE III wurde zum ersten Mal im Jahr 1986 aus Kulturen des Pilzes *Stemphylium botryosum* var. *Lactutum* isoliert, bevor es dann im Jahr 1991 auch in Kulturen von *A. alternata* gefunden werden konnte (Arnone et al. 1986; Stack und Mazzola 1989).

Perylenquinone sind generell eher Minormetabolite von *Alternaria* spp., die jedoch aufgrund ihrer mutagenen Wirkung im Ames Test nicht zu vernachlässigen sind. Diese Mutagenität äußerte sich bei den Toxinen ATX I, ATX II und STE III stärker als bei AOH und AME, sodass das Vorkommen dieser Toxingruppe in Lebensmitteln besser untersucht werden sollte als bisher (Schrader et al. 2001; Fraeyman et al. 2017; Fleck et al. 2016; Stack et al. 1986; Davis und Stack 1991; Stack und Prival 1986). Auffallend war, dass STE III wesentlich weniger mutagen reagierte als ATX II, obwohl sich beide Toxine lediglich durch eine Doppelbindung unterscheiden. Daraus wurde abgeleitet, dass diese Doppelbindung durch ihr Potenzial als zusätzliche reaktive Gruppe für die Bildung eines weniger mutagenen Derivats verantwortlich sein könnte (Davis und Stack 1991).

Weitere Zellstudien ergaben zudem, dass ATX II und STE III ebenso wie AOH die Topoisomerase II $\alpha$  inhibieren können, jedoch im Unterschied zu AOH nicht als Topoisomerasegift, sondern lediglich als katalytische Inhibitoren wirken. Aufgrund ihrer Epoxidgruppen wird zudem angenommen, dass ATX II und STE III DNA - Schäden verursachen, indem sie Addukte oder Intermediate mit den aufgebrochenen Strängen bilden (Fraeyman et al. 2017). Dies wird durch Studien unterstützt, die aufzeigen konnten, dass durch ATX II und STE III gebrochene DNA-Stränge nicht gänzlich repariert werden konnten (Fleck et al. 2016). Im Gegensatz zu AOH und AME wurden für ATX I und ALTP bislang keine Metabolisierungsreaktionen zur Detoxifikation, wie z.B. Glucuronidierungen, nachgewiesen, wohingegen bei ATX II und STE III zumindest in kleinen Mengen Umwandlungen in ATX I bzw. ALTP durch Reduktion des Epoxids zum Alkohol stattfanden (Schwarz et al. 2012; Escrivá et

al. 2017; Fleck et al. 2014). Zusätzlich hierzu wurde bei ATX II die Konjugation mit Glutathion in Caco-2-Zellsystemen beobachtet, welche ebenso wie die De-Epoxidierung zum Alkohol die Genotoxizität dieses Toxins herabsenkt (Fleck et al. 2014).

In Tierversuchen mit Laborratten sowie *in vitro* wurde zudem die akute Toxizität von ATX I bewiesen (Logrieco et al. 2009; Schrader et al. 2001; Schrader et al. 2006) und in einer Vorstudie zum *in vivo* Multi-Toxin Metabolismus konnten zum ersten Mal ATX I und ALTP in Urin- und Kotproben von Versuchsratten nachgewiesen werden, wenn auch in sehr geringen Mengen (0.5 % bzw. 0.2 % im Urin und 15 % bzw. 3 % im Kot) (Puntscher et al. 2019). ATX II und STE III konnten bislang nicht detektiert werden, was erneut eine metabolische Umwandlung in ATX I bzw. ALTP vermuten lässt.

Generell sind bislang nur wenige Informationen über das Vorkommen der Perylenquinone in Lebensmitteln sowie deren toxischer Wirkung vorhanden, sodass noch mehr Studien nötig sind, um das Risikopotenzial dieser Toxingruppe besser einschätzen zu können.

### 1.2.3 N-haltige Verbindungen

Tenuazonsäure (= 3-acetyl-5-sec-butyl-4-hydroxy-3-pyrrolin-2-on) ist ein Tetramsäurederivat und wurde im Jahr 1957 aus Kulturen von *A. tenuis* isoliert, wobei die exakte Strukturaufklärung erst im Jahr 1958 durch Stickings erfolgte (Rosett et al. 1957; Stickings 1959).

Unter den *Alternaria* Toxinen ist Tenuazonsäure das am häufigsten und in den größten Mengen produzierte Mykotoxin, welches nachweislich auch von den Pilzen *Pyricularia oryzae* und *Phoma sorghina* gebildet werden kann (Rychlik et al. 2016; Bottalico und Logrieco 1998; Stickings 1959; Motoyama et al. 2021; Steyn und Rabie 1976). In mehreren Studien zeigten sich bereits früh die antiviralen, antitumor, antibakteriellen, cytotoxischen und phytotoxischen Eigenschaften dieses Toxins (Pero et al. 1973; Rychlik et al. 2016; Bottalico und Logrieco 1998). Zudem wurde anhand von Tierversuchen mit Mäusen, Hühnern und Hunden festgestellt, dass TeA zwar eine höhere akute Toxizität als die Dibenzo- $\alpha$ -pyrone besitzt, jedoch im Ames *Salmonella* Test keine mutagene Wirkung zeigt (Ostry 2008; Stickings 1959; Scott und Stoltz 1980; Schrader et al. 2001). Bei Mäusen wurden zudem Krebsvorstufen an der Speiseröhre diagnostiziert, nachdem diese über einen Zeitraum von 10 Monaten mit 25 mg/kg b.w. TeA gefüttert wurden (Yekeler et al. 2001). Der LD<sub>50</sub>-Wert bei mündlicher Verabreichung von TeA liegt bei 81 mg/kg für weibliche Mäuse, und bei 186 mg/kg bei männlichen Mäusen, wodurch TeA die höchste akute Toxizität unter den *Alternaria* Toxinen besitzt (Pero et al. 1973; Rychlik et al. 2016). Wird TeA in sublethalen oder lethalen Mengen an Hühner verfüttert, sinken zum einen die Futteraufnahme und somit die Gewichtszunahme

der Versuchstiere, zum anderen wurden vermehrt starke innere Blutungen beobachtet (Bottalico und Logrieco 1998; Meronuck et al. 1972). In Pflanzen äußert sich die phytotoxische Wirkung dieses Toxins durch ein gehemmtes Wachstum der Wurzeln und Keimlinge, welches durch eine starke Chlorose und Nekrose auf den Blättern begleitet wird (Bottalico und Logrieco 1998; Stickings 1959). In mehreren Zellsystemen wurde zudem beobachtet, dass TeA die Proteinbiosynthese negativ beeinträchtigt, in dem die Freisetzung von den von Ribosomen neu gebildeten Proteinen unterdrückt und somit der Gesamtproteingehalt verringert wird (Bottalico und Logrieco 1998; Logrieco et al. 2009; Escrivá et al. 2017; Shigeura und Gordon 1963). Tenuazonsäure steht zudem im Verdacht der Auslöser für die Krankheit Onyalai in Afrika, sowie für das vermehrte Auftreten von Speiseröhrenkrebs in der chinesischen Provinz Linxian zu sein; ein endgültiger toxikologischer Nachweis hierfür fehlt aber bislang (Escrivá et al. 2017).

Tentoxin (=cyclo[N-methyl-L-alanyl-L-leucyl(Z)- $\alpha,\beta$ -dehydro-N-methylphenylalanyl-glycyl]) wurde zum ersten Mal im Jahr 1967 von Templeton et al. (1967) beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein Phytotoxin, welches hauptsächlich eine Chlorose in mit *Alternaria* spp. befallenen Pflanzen verursacht (Durbin und Uchytel 1977, Arntzen et al. 1972). Es wird angenommen, dass TEN die Photophosphorylierung sowie in einigen Pflanzen die Chlorophyllsynthese inhibiert, jedoch fehlen weitere toxikologische Studien, sodass kaum etwas über die Toxizität in menschlichen Zellen bekannt ist (Bottalico und Logrieco 1998; Liu und Rychlik 2013; Saad et al. 1970; Halloin et al. 1970, Arntzen et al. 1972).

#### 1.2.4 Modifizierte *Alternaria* Toxine

Nach einer im Jahr 2014 vorgeschlagenen Definition wird neben den freien Mykotoxinen auch zwischen matrixgebundenen und modifizierten Toxinen unterschieden, wobei letztere sich wiederum in biologisch-modifizierte und chemisch-modifizierte Toxine trennen lassen (Rychlik et al. 2014). In die Gruppe der matrixgebundenen Formen fallen alle Toxine, die entweder an Matrixkomponenten gebunden beziehungsweise in diesen eingeschlossen sind, Komplexe mit diesen eingehen oder mehrere dieser Eigenschaften erfüllen. Als chemisch-modifizierte Toxine zählen zum Beispiel thermische Abbauprodukte oder Modifikationen, die während der Lebensmittel- und Futtermittelverarbeitung z.B. beim Backen, Kochen oder Fermentieren entstehen können, zum anderen werden mit dieser Bezeichnung auch nicht-thermische Abbauprodukte umfasst, die zum Beispiel durch UV-initiierte Reaktionen entstanden sind (Rychlik et al. 2014; Berthiller et al. 2009). Als biologisch-modifiziert werden alle Toxine bezeichnet, die während des Phase-I Metabolismus verändert oder während des Phase-II Metabolismus konjugiert wurden. Dies schließt sowohl Konjugationen innerhalb von

Pflanzensystemen als auch Konjugationen im menschlichen oder tierischen Körper ein. Ebenso fallen Modifikationen, die durch den Schimmelpilz selbst bewirkt werden, in diese Kategorie (Berthiller et al. 2009; Rychlik et al. 2014). Vor allem von Pflanzen ist bereits bekannt, dass diese Modifikationen mit Glucose, Malonsäure und Glutathion zur Detoxifizierung von Xenobioten einsetzen, wodurch die Polarität dieser erhöht und der Abtransport in andere Pflanzenteile, primär die Vakuole, vereinfacht wird. In menschlichen bzw. tierischen Organismen findet die Metabolisierung vermutlich zum größten Teil in der Leber und Niere statt, von wo aus die polarer gewordenen Toxine aktiv ausgeschieden werden können (Berthiller et al. 2013). Da die Substanzen durch die Modifikationen an Polarität gewinnen und somit wasserlöslicher werden, ändert sich hier auch die Bioaktivität, wobei generell angenommen wird, dass modifizierte Toxine weniger toxisch als ihr Ursprungstoxin sind. Diese Aussage muss jedoch in Bezug auf den Verbraucherschutz kritisch betrachtet werden, da eine potenzielle Zunahme der Bioverfügbarkeit durchaus wahrscheinlich ist und zudem die Ursprungstoxine während der Verdauung wieder freigesetzt werden könnten (Berthiller et al. 2013; Dellafiora und Dall'Asta 2016; EFSA 2011).

Modifizierte Formen der *Alternaria* Toxine sind nach jetzigem Stand nur wenige bekannt, jedoch ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren unter anderem durch vermehrten Einsatz ultrahochauflösender Massenspektrometrie noch weitere modifizierte Formen entdeckt werden.

Zu den wichtigsten bisher bekannten modifizierten *Alternaria* Toxinen gehören AOH-3-sulfat, AME-3-sulfat, sowie die glykosylierten Verbindungen AOH-3-Glucosid, AOH-9-Glucosid und AME-3-Glucosid. Erstmals beschrieben wurden die beiden Sulfatverbindungen im Jahr 2008 (Aly et al. 2008), als diese erfolgreich aus Pilzkulturen isoliert und die chemischen Strukturen mittels intensiver NMR Studien aufgeklärt wurden. Da im Bereich der Mykotoxanalytik Reinformen der Toxine für die Methodenentwicklung essenziell sind, entwickelte Mikula et al. (2013) eine chemische Totalsynthese zur Gewinnung von AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G sowie AOH-3-S und AME-3-S aus dem Startmaterial 5-bromo-1,3-dimethoxybenzen. Durch diese Arbeit konnten die fünf modifizierten Toxine als Reinsubstanz gewonnen werden, welche anschließend von verschiedenen Forschungsgruppen verwendet wurden, um erstmals die modifizierten *Alternaria* Toxine in LC-MS/MS Messungen zu integrieren (Walravens et al. 2014; Puntcher et al. 2018).

Da die Bildung von Sulfaten und Glucosiden bis dato noch unbekannt war, beschäftigten sich Soukup et al. (2016) unter anderem damit, die bei der Bildung modifizierter Toxine stattfindenden Prozesse aufzuklären. In ihrer Studie konnten sie schließlich erfolgreich zeigen, dass die Sulfatierung von AOH und AME vom Schimmelpilz selbst vorgenommen wird,



wohingegen die Glykosylierung dieser beiden Toxine erst in der Pflanze stattfindet. Zudem konnten sie die Bildung weiterer modifizierter *Alternaria* Toxine beweisen, die durch Glykosylierung von AOH-3-S und AME-3-S in Tomaten entstanden sind, wodurch letztendlich die Sulfoglucoside AOH-3S-9G, AOH-9S-3G sowie AME-3S-7G erhalten wurden. Insbesondere die Relevanz der Sulfatverbindungen zeigte sich in einer kanadischen Studie, in der 108 von 148 *Alternaria* Isolaten positiv auf Sulfokonjugate getestet wurden (Kelman et al. 2015).

Ebenfalls nachgewiesen, jedoch für die Lebensmittel- und Futtermittelanalytik vernachlässigbar, ist die *in vitro* Bildung der Glucuronide AOH-3-Glucuronid, AOH-9-Glucuronid und AME-3-Glucuronid sowie in geringen Mengen AME-7-Glucuronid in Caco-2-Zellen und nach Inkubation mit hepatischen und intestinalen Mikrosomen aus Ratten, Schweinen und Menschen (Burkhardt et al. 2009; Pfeiffer et al. 2009a). Auch die Sulfatierung von AOH und AME an der C-3 Position konnte in diesen Zellstudien nachgewiesen werden. Die modifizierte Form AOH-9-S konnte bisher nur in einer Studie mit Rattenlebercytosol gebildet werden, wohingegen in Caco-2-Zellen diese Verbindung nicht nachweisbar war (Pfeiffer et al. 2009a; Burkhardt et al. 2009). Die Glucuronidierungsreaktion erfolgt allen Anschein nach durch enzymatische Prozesse, da AOH durch neun von insgesamt zehn getesteten menschlichen UDP-Glucuronosyltransferasen gebildet werden konnte, von denen wiederum acht Enzyme ebenfalls eine Aktivität für AME zeigten (Pfeiffer et al. 2009a). Zudem wurde die bevorzugte Bildung von AOH Glucuroniden über AME Glucuroniden um den Faktor 4 beobachtet, wobei die exakten quantitativen Mengen zwischen den getesteten Zelltypen variierten (Burkhardt et al. 2012).

Weitere, bisher kaum erforschte, Metaboliten sind Malonyl-Derivate, Gentobiose-Derivate (Soukup et al. 2016), sowie die durch ultrahochauflösende Massenspektrometrie entdeckten Verbindungen Altenusin-Sulfat, Dehydroaltenusin-Sulfat, Altenuen-Sulfat, Desmethylaltenusin-Sulfat sowie Altersetin-Sulfat. Mit einer Massengenauigkeit von unter 2 ppm konnten in letzterer Studie zusätzlich 30 Sulfokonjugate gefunden werden, deren Massen bisher noch keiner entsprechenden Strukturformel zugeordnet werden konnten (Kelman et al. 2015).

Toxikologische Studien zu allen bisher erwähnten modifizierten *Alternaria* Toxinen sind aktuell kaum vorhanden, was vor allem dem Mangel an verfügbaren Reinsubstanzen geschuldet ist. In den wenigen bereits durchgeführten Tests wurde jedoch festgestellt, dass die Zytotoxizität einer Verbindung vermutlich auf die freie Hydroxylgruppe am C-4' zurückzuführen ist, da eine Substitution an dieser Stelle die Aktivität in einem zytotoxischen Assay herabsetzte (Aly et al. 2008). Da bisher alle bekannten modifizierten *Alternaria* Toxine diese freie Hydroxylgruppe

besitzen, muss somit erst einmal von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden, welche für AOH-3-S bereits mit Lymphomzellen getestet und bestätigt wurde (Aly et al. 2008).

Insgesamt betrachtet ist das Feld der modifizierten *Alternaria* Toxine gerade erst in den Anfängen und muss in den nächsten Jahren noch weiter erforscht werden, besonders im Hinblick auf die toxikologischen Relevanz dieser Verbindungen. Des Weiteren ist es noch unklar welchen Nutzen Pilze der Gattung *Alternaria* spp. aus der Sulfatierung ziehen, sodass eine Aufklärung des (Sulfat-) Stoffwechsels nötig wäre. Zudem müssen weitere Wege gefunden werden alle bisher bekannten sowie neu entdeckten Metaboliten als Reinsubstanz zu gewinnen, da aktuell keine dieser modifizierten Formen als Standard käuflich erhältlich ist, wodurch die Entwicklung von Nachweismethoden und die Erstellung einer Risikobewertung der modifizierten Formen bislang schwierig ist.

### **1.3 Risikobewertung der *Alternaria* Toxine**

Im Vergleich zu anderen bekannten Mykotoxingruppen, wie zum Beispiel Aflatoxine aus *Aspergillus flavus* oder Fusarientoxine aus *Fusarium* spp., stellen die *Alternaria* Toxine eine Minorgruppe dar, für die es trotz der bewiesenen mutagenen und teratogenen Effekte einiger Metaboliten noch keine gesetzlichen Regelungen gibt. Dies erkannte auch die Europäische Kommission und trat an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) heran, um ein wissenschaftliches Statement zu dieser Kontaminantengruppe aufstellen zu lassen. Diese befasste sich folglich intensiv mit den am häufigsten beschriebenen Toxinen AOH, AME, TeA, TEN, ATX I, ALT und den AAL-Toxinen in Lebens- und Futtermitteln, bevor sie im Jahr 2011 eine erste Risikoabschätzung zu *Alternaria* Toxinen veröffentlichte (EFSA 2011).

Problematisch bei der Datenevaluierung waren hier zum einen die große Anzahl an Daten, die unter den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen und somit keine eindeutigen quantitativen Werte lieferten, zum anderen die fehlenden laborübergreifenden Validierungsstudien und die nur bedingt verfügbaren Referenzsubstanzen. Nach Sichtung aller zur Verfügung gestellten Daten, sowie bereits in der Literatur veröffentlichten Studien, blieben für eine Risikoabschätzung 11730 Ergebnisse übrig, die vor allem aus Getreide/Getreideprodukten, Tomaten/Tomatenprodukten, Sonnenblumenkerne/Sonnenblumenkernöl sowie Früchten und Fruchtprodukten inklusive Saft, Wein und Bier stammten. Aufgrund der bereits erwähnten Problematik der Daten unter der NWG oder BG, wurde die gesamte Risikobewertung mit unteren und oberen Grenzen durchgeführt: die untere Grenze (UG) ergab sich lediglich aus quantitativen Werten oberhalb der BG, für die obere Grenze (OG) wurden die entsprechenden Werte der NWG bzw. BG zu den zuvor ausgeschlossenen Werten annotiert. Die daraus resultierenden Werte aus

Lebensmittelproben sind zur besseren Übersichtlichkeit in Tabelle 1.2 aufgeführt (EFSA 2011).

**Tabelle 1.2** Überblick über Toxinkonzentrationen in Lebensmitteln der EU. UG = untere Grenzen, OG = obere Grenzen, Max = Maximale Konzentrationen in µg/kg (EFSA 2011).

	AOH	AME	TeA	TEN
UG [µg/kg]	22	11	333	40
OG [µg/kg]	26	12	349	47
Max [µg/kg]	1200	440	5400	880

Die Anzahl der belasteten Proben aus dem Futtermittelsektor lag bei 31 % für AOH, 6 % für AME, 73 % für ALT und 15 % für TeA.

Durch die limitierte Anzahl an Daten konnte die EFSA nur eingeschränkt eine Expositionsbeurteilung für Erwachsene im Alter von 18-65 Jahren aufstellen, wobei lediglich die Toxine AOH, AME, TEN und TeA berücksichtigt wurden und die Ergebnisse nur indikativ sind. Laut dieser Beurteilung lag die geschätzte mittlere Exposition unter dem Einsatz der unteren und oberen Grenzen bei 1,9 – 39 µg/kg<sub>b.w.</sub>/Tag für AOH, 0,8 – 4,7 µg/kg<sub>b.w.</sub>/Tag für AME, 0,01 – 7 µg/kg<sub>b.w.</sub>/Tag für TEN und 36 – 141 µg/kg<sub>b.w.</sub>/Tag für TeA. Die geschätzten Werte für hohe Verbraucher (95 % Perzentil) lagen um den Faktor 2 bis 3 über den gemittelten Werten. Die Exposition von Kindern wurde aufgrund der höheren Lebensmittelaufnahme pro Körpergewicht ebenso um den Faktor 2 bis 3 höher geschätzt; zudem wäre es möglich, dass die Werte für Vegetarier aufgrund der vermehrten Aufnahme pflanzlicher Nahrung erhöht sein könnten. Für den Futtermittelbereich war eine Expositionsbeurteilung aufgrund mangelnder Daten nur für Hühner und nur für AOH möglich; die hier geschätzten Werte lagen bei 3 – 6 µg/Tag (EFSA 2011).

Als Folge der limitierten Datenlage zum Metabolismus der *Alternaria* Toxine in Menschen und Tieren, insbesondere bezüglich Absorption, Verteilung und Ausscheidung, sowie der nachgewiesenen Genotoxizität von AOH und AME in Bakterien- und Säugetierzellen, hat sich das CONTAM Panel der EFSA dazu entschieden das relative Gefährdungspotential der untersuchten Toxine anhand des „Threshold of toxicological concern“ zu beurteilen. Mit diesem Prinzip kann auch ohne spezifische toxikologische Daten ein Grenzwert für alle chemischen Stoffe geschätzt werden, da lediglich die chemischen Strukturen benötigt werden. Diese werden hierbei anhand deren Ähnlichkeit zu bereits bekannten Verbindungen in eine von vier Gruppen eingestuft, denen jeweils ein Grenzwert zugeordnet wurde. Liegt die Exposition unterhalb des Grenzwertes wird davon ausgegangen, dass die Exposition hier unbedenklich ist, wohingegen bei einer Exposition oberhalb des Grenzwertes weitere

toxikologische Studien dringend notwendig sind (Kroes et al. 2005). Die Beurteilung der *Alternaria* Toxine erfolgte anhand der oberen Grenzen der geschätzten mittleren Exposition, sowie der geschätzten Exposition der Vielkonsumierer. Für TeA und TEN, deren TTC Wert aufgrund fehlender Mutagenität bei 1500 ng/kg<sub>b.w.</sub>/Tag liegt, lagen die Expositionswerte weit unter diesem Richtwert, sodass diese beiden Toxine höchstwahrscheinlich kein Risiko für den Konsumenten darstellen. Anders sieht es bei AOH und AME aus, deren Mutagenität einen TTC-Wert von 2,5 ng/kg<sub>b.w.</sub>/Tag ergab, welcher mit den Daten der oberen Grenze sowie den Vielkonsumierern überschritten wurde. In diesem Fall werden nun weitere substratspezifische toxikologische Studien gebraucht, um das tatsächliche Gefahrenpotential einordnen zu können (EFSA 2011).

Fünf Jahre nach dieser ersten Risikoeinschätzung wurde eine ausführlichere, Expositionsbeurteilung durchgeführt, die nun auch zwischen verschiedenen Altersklassen unterscheidet. Hierfür wurden 15563 quantitative Ergebnisse für AOH, AME, Ten und TeA aus insgesamt 4249 Proben aus den Jahren 2010 - 2015 verwendet, die hauptsächlich aus Ölsaaten und Getreideprodukten stammten. Die neuen geschätzten Daten sind zur besseren Übersichtlichkeit in Tabelle 1.3 zusammengefasst (Arcella et al. 2016).

**Tabelle 1.3** Aktualisierte Expositionsbeurteilung von AOH, AME, TeA und TEN. Angaben in µg/kg. (Arcella et al. 2016).

	AOH	AME	TeA	TEN
Risikogruppe	Kleinkinder	Kleinkinder	Kleinkinder Säuglinge	Kleinkinder
Kritische Lebensmittel	Getreide, Tomatensauce, getrocknete Tomaten Früchte	Ölsaaten, Birnen	Tomaten und Tomatenprodukte, Getreide	Sonnenblumenkerne, Tomaten
Mittlere Exposition [ng/kg <sub>b.w.</sub> /Tag]	3,8-71,6 (Kleinkind)	3,4-38,8 (Kleinkind)	100-1614 (Kleinkind)	1,6-33,4 (Kleinkind) 0,7-30,1 (Kind)
	2,0-54,4 (Kind)	1,6-34,4 (Kind)	37-1490 (Säugling)	

Trotz der größeren Datenmenge sind die Schätzungen noch ungenau, da ein Großteil der Daten (70 %) aus einem einzigen Mitgliedsland kam, und erneut wieder viele Werte unter den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen. Diese neue Schätzung lieferte höhere Expositionen für AME, TEN und TeA als der EFSA Bericht von 2011, was zum einen an der

größeren Datenmenge lag, aber zum anderen auch sensitiveren Messmethoden geschuldet war (Arcella et al. 2016).

Eine weitere Studie von Rychlik et al. (2016) aus dem Jahr 2016 ergab jedoch, dass die Exposition mit TeA immer noch unterschätzt wird, da sich Hirseprodukte als hochbelastet herausstellten und dies in der EFSA Einschätzung von 2011 noch nicht berücksichtigt wurde. Dies ist vor allem für Säuglinge und Kleinkinder kritisch, da für diese Gruppen mit den neuen Daten der TTC-Wert bis zum 2,5-fachen überschritten und somit ein Gesundheitsrisiko nicht ausgeschlossen werden kann. Anlässlich dieser Studie hatte sich das Bayrische Landesamt für Lebensmittelsicherheit als erste Behörde weltweit dazu entschlossen den Tenuazonsäuregehalt in Babynahrung auf Hirsebasis zu regulieren (Rychlik et al. 2016).

Um die Schätzunsicherheiten zu minimieren, müssen zunächst noch mehr analytische Daten erfasst und Messmethoden optimiert werden, damit eine neue Risikoabschätzung durchgeführt werden kann. Außerdem wäre es dringend nötig auch die modifizierten *Alternaria* Toxine in die Risikobewertung zu inkludieren, da diese ein zusätzliches Risiko für den Verbraucher bergen können. Hierfür werden jedoch noch vermehrt Studien zur Bioverfügbarkeit und zum toxikologischen Verhalten - wie Absorption, Verteilung, Ausscheidung und Metabolismus - benötigt, da die Toxizität modifizierter Verbindungen stark von metabolischen Veränderungen während der Verdauung und Biotransformation abhängig ist (EFSA 2011). Bei matrixgebundenen Toxinen ist zusätzlich die potenzielle Freisetzung von der Matrix zu beachten (Rychlik et al. 2014).

## 1.4 Analytik von *Alternaria* Toxinen

### 1.4.1 Anforderungen an die Probennahme

Die Probennahme stellt in vielen Fällen eine sehr große Fehlerquelle analytischer Methoden dar, die teilweise einen weitaus größeren Einfluss auf das Endergebnis zu haben scheint als die eigentliche Probenaufarbeitung. Die Dringlichkeit eines speziellen Probenahmeplans wird durch immer strengere Grenzwerte für diverse Kontaminanten unterstrichen, wie z.B. Pestizid-, Mykotoxin- und Schwermetallgehalte in diversen landwirtschaftlichen Gütern, um irrtümlich zu hoch bestimmte Toxingehalte zu vermeiden (Blanc 2006; Tittlemier et al. 2019).

Insbesondere Aflatoxine treten in Lebensmittelproben oft heterogen verteilt auf, sodass eine nicht repräsentative Probennahme das Endergebnis verfälschen und zu erhöhten Toxingehalten führen kann (Blanc 2006). Dieses Phänomen tritt vor allem bei Lebensmittelgruppen mit einer größeren Partikelgröße auf, z.B. in Nüssen, Trockenfrüchten oder Getreide, und ist weithin als „Hot-Spot“-Problematik bekannt (Streit et al. 2012; Shotwell et al. 1975). Besonders kritisch ist hierbei, dass beispielhaft bereits eine einzige hoch belastete Erdnuss in einer 10 kg Probe, bestehend aus ca. 20 000 Erdnüssen, einen über dem Grenzwert liegenden Aflatoxingehalt verursachen kann. Die inhomogene Verteilung weiterer Mykotoxine in einer Gesamtprobe wurde auch bereits für andere Toxine wie Ochratoxin A und einige *Fusarium* Toxine beobachtet (Hart und Schabenberger 1998; Whitaker et al. 1998), somit ist davon auszugehen, dass die heterogene Verteilung auch bei anderen Toxinen eine Rolle spielt (Blanc 2006). Dies trifft somit auch auf *Alternaria* Toxine zu, die ebenso wie Aflatoxine in die Gruppe der Lagertoxine eingestuft werden und bei denen vor allem schwarze Körner ein Indiz auf hohe Toxingehalte sein könnten. Eindeutige Studien hierzu sind aber zum aktuellen Zeitpunkt nicht vorhanden.

Um Fehler bereits bei der Probennahme gering zu halten, gibt es innerhalb der EU spezifische Vorgaben zur Probenahme von Lebensmitteln, um die Genauigkeit bei der Mykotoxinbestimmung zu erhöhen. Die Kriterien für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehaltes in Lebensmitteln wurden von der Europäischen Kommission in der EU-Verordnung (EG) Nr. 401/2006 festgehalten (European Commission 2006) und sollten prinzipiell auch für die Probennahme zu Forschungszwecken angewendet werden.

Generell gilt, dass eine Probennahme und anschließende Weiterverarbeitung so erfolgen sollte, dass weder der Toxingehalt verändert noch die Repräsentativität der Probe beeinträchtigt wird. Um eine homogene Probe zu gewährleisten, sollten mehrere, an verschiedenen Stellen der Probenpartie entnommene Einzelproben zu einer Sammelprobe vereint werden. Die genaue Anzahl sowie das Gewicht der Einzelproben ist dabei abhängig

von der Art der Lebensmittelprobe, sodass bei flüssigen Proben aufgrund der besseren Homogenisierbarkeit generell weniger Einzelproben nötig sind als bei festen Proben (Blanc 2006; European Commission 2006). Zudem ist zu beachten, dass die gezogenen Einzelproben, sowie die Sammelprobe in saubere und inerte Behältnisse überführt werden sollten, welche den Inhalt vor weiteren Kontaminationen schützen und eine konstante Zusammensetzung der Probe garantieren. Um Nachkontrollen zu ermöglichen, sollte zusätzlich ein Teil der Sammelprobe entnommen und als Parallelprobe für Referenz- oder Rechtfertigungsproben getrennt gelagert werden (European Commission 2006).

Bevor eine weitere Verarbeitung der Proben erfolgen kann, muss die gesamte Probe aufgrund des heterogenen Auftretens der Mykotoxine mit einer geeigneten Methode homogenisiert werden, was in der Regel durch Mahlen und Vermischen erzielt wird (European Commission 2006). Dieser Schritt ist ebenfalls als kritisch zu betrachten, da die Partikelgröße der gemahlten Probe Einfluss auf das Endergebnis haben könnte. Studien hierzu wurden zum einen von Grusie et al. (2017) mit Ergotalkaloiden und zum anderen von Ylie-Mattila et al. (2017) mit DON und *Fusarium graminearum* DNA in Getreide durchgeführt. Auch wenn diese zum Teil aufgrund inkonsistenter Probenkonzentrationen (Grusie et al. 2017) keine eindeutigen und repräsentativen Ergebnisse liefern konnten, war in diesen Studien ein Trend dahingehend zu erkennen, dass die Mahlmethode und damit unterschiedliche Partikelgrößen durchaus einen Einfluss auf Schwankungen des Toxingehaltes haben können. Dieser Aspekt sollte jedoch noch eingehender untersucht werden, wobei es plausibel scheint, dass die Zugänglichkeit der Toxine bei einer geringeren Partikelgröße besser ist als bei gröber gemahlten Proben und somit genauere Ergebnissen erzielt werden könnten.

#### **1.4.2 Aufarbeitungsmethoden**

Im Bereich der Mykotoxinanalytik und somit auch der *Alternaria* Analytik besteht die Probenaufarbeitung in der Regel aus einem Extraktionsschritt, um die Toxine von der Matrix zu lösen, und einem Reinigungsschritt, bei dem Matrixeffekte reduziert werden sollen (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Da es bei beiden Schritten eine Vielzahl an Möglichkeiten gibt, werden diese in den nächsten Unterkapiteln getrennt voneinander beschrieben (Krska et al. 2005; Agriopoulou et al. 2020).

##### *1.4.2.1 Extraktion*

Die Extraktion der Toxine aus einer Matrix erfolgt in der Regel durch Schütteln der (festen) Probe mit organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril, Aceton oder Methanol (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Die Wahl des Lösungsmittels ist dabei abhängig von den physikalischen Eigenschaften der zu analysierenden Toxine, sodass für die Extraktion polarer Toxine wie

DON ein gewisser Wasseranteil nötig ist, während unpolare Toxine wie AME hauptsächlich mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden müssen (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011; Agriopoulou et al. 2020). Da in der Regel mehrere Toxine gleichzeitig bestimmt werden sollen, werden meist Lösungsmittelgemische aus variierenden Verhältnissen von Wasser und organischen Lösungsmitteln verwendet, welche im Idealfall effizient alle Toxine extrahieren und zeitgleich wenig Matrix lösen. Hierbei wurde mehrfach beobachtet, dass sich die Wiederfindungen von Acetonitril/Wasser-Mischungen und Methanol/Wasser-Kombinationen stark unterscheiden können, was vermutlich auf Matrixinterferenzen oder Wasserabsorption der Matrix zurückzuführen ist (Stroka et al. 1999; Razzazi-Fazeli und Reiter 2011).

In der Vergangenheit wurden neben den oben genannten Lösungsmitteln auch Ethylacetat mit Ameisensäure, 1-Oktanol und Toluol, Dichlormethan und Chloroform für die Toxinanalytik verwendet, insbesondere wenn Fette oder Pigmente die Extraktion erschweren (Somsuhsin et al. 2018; Delmule et al. 2006; Alshannaq und Yu 2017). Mittlerweile spielen jedoch für die Wahl des Lösungsmittels und der physischen Extraktionsmethode auch immer öfter Faktoren wie Umweltverträglichkeit, Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit eine Rolle, sodass heutzutage weitestgehend auf toxische und chlorhaltige Lösungsmittel, wie z.B. Chloroform oder Dichlormethan, verzichtet wird (Somsuhsin et al. 2018; Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Für die Analytik von *Alternaria* Toxinen überwiegt generell die Verwendung von Acetonitril/Wasser der von Methanol/Wasser, wobei die Zusammensetzung sowie ein Säurezusatz je nach Methode variiert (Scott 2001; Agriopoulou et al. 2020).

Neben der Zusammensetzung des Extraktionsmittels ist zudem das Verhältnis von Probe zu Lösungsmittel wichtig, welches im Mykotoxinbereich oftmals bei 1:5 liegt, wobei je nach Matrix auch ein höherer Lösungsmittelanteil nötig sein kann. Als Extraktionsdauer wird ein Minimum von 10 Minuten empfohlen, aber auch eine längere Extraktionsdauer von bis zu einer Stunde findet häufig Anwendung, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011).

Auch die Art der physikalischen Extraktionsmethode hat oftmals einen Einfluss auf die Effektivität der Extraktion, sodass sich neben der klassischen Extraktion auf einem Magnetrührer oder einem Horizontalschüttler ebenfalls Extraktionen mittels Ultraschallbad oder Mikrowelle in der Mykotoxinanalytik etabliert haben (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011; Tittlemier et al. 2019). Bei der Verwendung einer Mikrowellenextraktion wird elektromagnetische Energie in Wärmeenergie umgewandelt, wodurch die Toxinextraktion durch die resultierenden erhitzten Lösungsmittel teilweise erheblich verbessert werden kann. Vorteilhaft sind zudem die reduzierte Extraktionsdauer sowie die geringere Menge an benötigten Lösungsmitteln, jedoch können mit dieser Methode nur hitzestabile Toxine



analysiert werden (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Dies ist vor allem bei *Alternaria* Toxinen kritisch zu sehen, da die Stabilität mehrerer Toxine unter Hitzeeinfluss noch nicht ausreichend untersucht wurde. Somit hat die Mikrowellenextraktion in der *Alternaria* Analytik aktuell noch einen geringeren Stellenwert, was sich aber ändern könnte, sobald mehr Daten zur Hitzestabilität verfügbar sind. AOH und AME konnten jedoch bereits erfolgreich mittels Mikrowellenextraktion und anschließender QuEChERS Aufreinigung bestimmt werden (Kalogiouri et al. 2021). Eine Ultraschallextraktion stellt hier für die *Alternaria* Toxine somit in der Theorie eine bessere Alternative dar, da durch die Schallwellen ein konstanter Austausch zwischen Matrix und Lösungsmittel gefördert wird, jedoch wurde in der Praxis oftmals eine geringere Ausbeute im Vergleich zu vorher genannten Methoden festgestellt (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Somit wird vor allem bei den gering konzentrierten *Alternaria* Toxinen meist weiterhin auf eine physikalische Extraktion mittels Schüttler oder Magnetrührer zurückgegriffen (Gotthardt et al. 2019; Puntcher et al. 2018; Walravens et al. 2014).

Bei flüssigen Proben wird oftmals die Flüssig-Flüssig Extraktion verwendet, bei der ein nicht mit dem Probenmaterial mischbares Lösungsmittel zur Extraktion verwendet wird. Durch Schütteln in z.B. einem Scheidetrichter werden dann die Analyten von einer Phase in die andere transferiert und im Idealfall von Störkomponenten abgetrennt. Aufgrund des hohen Lösungsmittelverbrauches, sowie der Impraktikabilität im Laboralltag und der Gefahr der Emulsionsbildung, wird diese Methode immer seltener verwendet und flüssige Proben oftmals ohne zusätzlichen Extraktionsschritt direkt aufgereinigt (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011; Krška et al. 2005).

In den letzten Jahren wurden zudem immer mehr QuEChERS („Quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe“) Methoden für die Mykotoxinanalytik entwickelt. Das Prinzip hierbei ist eine auf ACN und Wasser basierende Extraktion, bei der durch Zugabe von MgSO<sub>4</sub> und NaCl eine Phasentrennung zwischen wässriger und organischer Phase induziert wird. Sehr polare Analyten sind somit in der wässrigen Phase zu finden, wohingegen die Zielanalyten in die organische Phase übergehen sollten. Diese Methode wurde ursprünglich für die Pestizidanalytik entwickelt (Anastassiades et al. 2003), konnte aber in den letzten Jahren in Kombination mit Festphasenextraktionen auch erfolgreich auf die Analytik von einigen *Alternaria* Toxinen übertragen werden (Agriopoulou et al. 2020; Dzuman et al. 2014). Während die Validierungsergebnisse einer QuEChERS Multimethode mit 38 Toxinen aufgrund zu hoher Bestimmungsgrenzen von Tenuazonsäure sowie schlechter Wiederfindungen für AOH und AME (50 %) als eher ungeeignet für *Alternaria* Toxine betrachtet werden kann (Rausch et al. 2020), gelang es Guo et al. (2019) eine QuEChERS basierte Methode für AOH, ALT, TEN, TeA, AME und Altenusin zu entwickeln, welche mit Verwendung von 0,5 g Natriumchlorid und 0,5 g

Magnesiumsulfat gute Validierungsergebnisse für die untersuchte Traubenmatrix erzielte. Ebenso gelang es Hickert et al. (2015) unter Verwendung von QuEChERS und Stabilisotopenverdünnungsanalytik eine Methode zu entwickeln, welche die Trennung beider Tenuazonsäureisomere ermöglichte und somit die allo-Tenuazonsäure in Tomatenmatrix quantifiziert werden konnte. In dieser Methode wurden ebenfalls Natriumchlorid und Magnesiumsulfat verwendet, jedoch unter Einsatz der vierfachen Menge Magnesiumsulfat im Vergleich zu Natriumchlorid. Diese entwickelten QuEChERS Ansätze zeigen vielversprechende Resultate und werden aufgrund der voraussichtlich besseren Genauigkeit und Reproduzierbarkeit vermutlich in naher Zukunft häufiger Anwendung für die *Alternaria* Toxinanalytik finden (Agriopoulou et al. 2020).

#### 1.4.2.2 Probenaufreinigung

Dem Extraktionsschritt folgt in der Regel ein Aufreinigungsschritt, sowie aufgrund der teilweise geringen Toxinkonzentrationen ein Aufkonzentrierungsschritt, um mögliche Matrixinterferenzen zu reduzieren und folglich die Signalintensität bei der Messung zu erhöhen (Woo et al. 2019).

Für die Analytik von *Alternaria* Toxinen, sowie generell den meisten Mykotoxinen, hat sich die Verwendung einer Festphasenextraktion (Solid phase extraction, SPE) bewährt, jedoch werden vor allem im Rahmen von Multimykotoxinmethoden immer öfter auch sogenannte Dilute and Shoot Verfahren angewendet.

Dilute and shoot Methoden bestehen aus einem simplen Verdünnungsschritt nach der Extraktion, sodass weitere Aufreinigungsschritte entfallen. Entwickelt wurde dieses Verfahren für Multimethoden mit LC-MS/MS Messung, da aufgrund der geringen Anzahl an Aufarbeitungsschritten Verluste an Analyten meist geringgehalten und eine Vielzahl verschiedener Toxine gleichzeitig analysiert werden können (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011; Tittlemier et al. 2019). Ziel hierbei ist es eine Verdünnungsstufe zu finden, bei der alle gewünschten Analyten sinnvolle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen besitzen und zeitgleich möglichst wenig Matrixbestandteile ins Massenspektrometer gebracht werden. Signalsuppressionen durch Matrixeffekte sind in LC-MS/MS Messungen generell ein limitierender Faktor, sodass auch leicht falsch positive oder falsch negative Ergebnisse erzielt werden können. Um dies zu vermeiden, muss jede Matrix neu untersucht und für Dilute and Shoot optimiert werden, um das am besten geeignete Lösungsmittel und die nötige Verdünnungsstufe zu ermitteln (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Proben mit zu hohem Matrixanteil sorgen zudem oft für eine Kontamination des Messgerätes, wodurch die Routineanalytik negativ beeinflusst werden kann (Tittlemier et al. 2019). Auch wenn

Matrixeffekte durch den Einsatz von Stabilisotopenverdünnungsmethoden weitestgehend kompensiert werden können, hängt eine erfolgreiche Dilute and Shoot Methode am meisten von den verwendeten Geräten ab. Besonders für niedrigkonzentrierte Toxine werden aufgrund der zusätzlichen Verdünnung sehr sensitive, hochentwickelte Massenspektrometer benötigt, um akzeptable Nachweisgrenzen zu erhalten (Tittlemier et al. 2019; Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Dies ist auch der Grund, warum in der reinen *Alternaria* Analytik oft auf Dilute and Shoot Methoden verzichtet werden muss, jedoch konnten von Puntscher et al. (2018) auch für diese Toxine sensitive Methoden entwickelt werden. Auch in Multitoxinmethoden mit über 100 Toxinen konnten die wichtigsten *Alternaria* Toxine bereits mit Dilute and Shoot Ansätzen erfolgreich mitbestimmt werden (Vishwanath et al. 2009).

Die SPE fungiert neben der Probenaufreinigung auch als Aufkonzentrierungsschritt und stellt eine schnellere und mit einem geringerem Lösungsmiteleinsetz verbundene Alternative zu anderen Aufreinigungen, z.B. LLE, dar (Huertas-Pérez et al. 2017). Bei der SPE werden die Mykotoxinextrakte auf eine in einer Kartusche gepackte Festphase gegeben, an der die Toxine nun absorbieren. Da je nach Säulenmaterial auch Matrixbestandteile an der Säule haften bleiben, wird die Säule mit einem Lösungsmittel gewaschen, welches stark genug ist die Matrix, aber nicht die Zielanalyten zu eluieren. Im Anschluss werden die Analyten mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert und können dann direkt gemessen oder weiter eingengt werden (Huertas-Pérez et al. 2017; Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Durch die Vielzahl an verfügbaren Festphasen können SPE Methoden für diverse Matrices und Analyten optimiert werden und sind somit ein fester Bestandteil der Lebensmittel- und Umweltanalytik sowie im pharmazeutischen Bereich. Die am weitesten verbreiteten Festphasen für die Mykotoxinanalytik sind Silica, modifiziertes Silica (C18, C8), Polymerphasen, Phenyl- oder Aminopropylphasen sowie HLB (hydrophilic- lipophilic balance) – Phasen (Agriopoulou et al. 2020; Scott 1993; Poole 2003). Es werden aber stetig auch neuere Phasen entwickelt, bei denen z.B. magnetische Carbon-Nanomaterialien (Aflatoxin, TCs) oder reduziertes Graphenoxid und Gold Nanopartikel (Aflatoxine, OTA, *Fusarium* Toxine) eingesetzt werden (Zhang et al. 2018; Ran et al. 2017; Dong et al. 2015; Jiang et al. 2018). Auch in der *Alternaria* Analytik wird aufgrund der niedrigen Konzentrationen häufig mit SPE gearbeitet, z.B. in der Analytik von Karotten (Solfrizzo et al. 2004), Tomatenprodukten (Fente et al. 1998), Apfelsaft (Delgado et al. 1996) sowie von Babynahrung (Gotthardt et al. 2019).

Eine neue Variante der SPE stellen sogenannte Molecularly Imprinted Porous Polymers (MIPs) dar, welche als synthetische Rezeptoralternative Antikörper nachahmen und somit die teure Immunoaffinitätschromatographie ablösen sollen (Krska et al. 2005). MIPs werden aus Monomeren synthetisiert, welche durch eine Polymerisierungsreaktion quervernetzt werden.

Dieser Vorgang wird in Anwesenheit des später zu analysierenden Moleküls durchgeführt, um die Bindungsstellen zu formen, an denen der Analyt und dem Analyten strukturell ähnliche Substanzen später binden sollen (= Molecular Imprinting). Am Ende der Polymerisierungsreaktion können die eingesetzten Analytvorlagen mit Hilfe organischer Lösungsmittel heruntergewaschen werden, sodass die analytspezifischen Bindungsstellen frei werden und das MIP einsatzbereit ist (Baggiani et al. 2008; Krska et al. 2005). Für die Herstellung der MIPs können verschiedene Matrices verwendet werden; am weitesten verbreitet sind aktuell Acryl- und Vinylpolymere, aber auch organische Polymere sowie solche auf Silica- oder Titandioxid-Basis sind möglich. Vorteile dieser Aufreinigungsmethode sind die Wiederverwendbarkeit sowie die im Vergleich zur IAC günstige Herstellung und die gute Lagerstabilität (Baggiani et al. 2008; Mahony et al. 2005). Neben der Aufreinigung von OTA (Maier et al. 2004; Jodlbauer et al. 2002; Zhou et al. 2004), ZeA (Urraca et al. 2006) und DON (Pascale et al. 2008) konnten auch für *Alternaria* Toxine bereits erfolgreich MIPs entwickelt werden: Rico-Yuste et al. (2018) gelang es unter Verwendung von Ersatzstoffen für AOH und AME MIPs für diese beiden Toxine zu generieren, welche im Anschluss erfolgreich für die Analyse diverser Tomaten und Sesamölproben eingesetzt wurden. Zum Vergleich wurden die Proben einmal mit und einmal ohne den Einsatz von MIPs aufgereinigt, wobei mit den MIPs Störkomponenten deutlich reduziert werden konnten. Letztendlich wurden aber mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt, was zusammen mit der Tatsache, dass analog der IAC nur wenige Analyten simultan bestimmt werden können, die Praktikabilität der MIPs in der *Alternaria* Analytik in Frage stellt.

Eine für *Alternaria* Toxine eher selten verwendete Methode ist die Aufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie (IAC), welche für andere Toxingruppen, insbesondere Aflatoxine, bereits erfolgreich eingesetzt wird. Bei der IAC enthält das aus Silica oder Sepharose-Gel bestehende Säulenmaterial immobilisierte Antikörper, welche spezifisch für bestimmte Mykotoxine wirken, sodass diese Methodik nur dann möglich ist, wenn für das zu analysierende Mykotoxin bereits Antikörper entwickelt wurden (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011; Agriopoulou et al. 2020). Die verwendeten Antikörper können hierbei monoclonal (mABs) oder polyclonal (pABs) eingesetzt werden. Während die Produktionskosten von pABs aufgrund der eingesetzten Antikörpermischung niedriger sind als die von mABs, agieren letztere spezifischer und zeigen keinerlei Schwankungen zwischen verschiedenen Produktionsbatches, sodass je nach vorliegender Fragestellung abgewogen werden muss, welche Art der IAC sinnvoller ist (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Sobald die Mykotoxine auf das Säulenmaterial aufgetragen werden, interagieren diese mit den auf der Säule befindlichen Antikörpern, während andere Substanzen, z.B. Matrixverunreinigungen, nicht an die Säule binden und somit herausgewaschen werden. Die gebundenen Mykotoxine können dann

durch eine Denaturierung mit Methanol oder Acetonitril eluiert werden (Al-Jaal et al. 2019). Durch diese sehr spezifische Aufreinigung werden sehr saubere Extrakte erhalten und folglich bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt (Delaunay-Bertoncini und Hennion 2004), jedoch sind IACs in der Regel sehr teuer, zeitaufwendig und stellen aufgrund der eingeschränkten Stabilität der Antikörper nicht in jedem Fall eine gute Alternative dar (Castegnaro et al. 2006). Anwendung finden IACs aktuell bei der Analytik von Aflatoxinen, DON, T-2 und HT-2 Toxinen, sowie Ochratoxin A (Razzazi-Fazeli und Reiter 2011). Zudem wird bei der Entwicklung von IACs auch immer mehr die Nachfrage nach Multimethoden berücksichtigt, sodass bereits IACs für die simultane Bestimmung von OTA, ZeA, Aflatoxinen und *Fusarium* Toxinen produziert werden (Lattanzio et al. 2007; Irakli et al. 2017). Auch für die *Alternaria* Toxine AOH und AME konnten bereits mABs und pABs entwickelt werden, welche allerdings aktuell nicht für IACs sondern im Rahmen von indirekt kompetitiven ELISA Verfahren eingesetzt werden (Singh et al. 2018; Wang et al. 2018b).

#### **1.4.3 Überblick über etablierte Messmethoden für die Analytik von *Alternaria* Toxinen**

Immer niedrigere gesetzliche Grenzwerte für Mykotoxine erfordern weltweit präzise und sensitive Messmethoden, mit denen die Einhaltung der erlaubten Grenzwerte überwacht werden kann (Pereira et al. 2014; EFSA 2011). Auch wenn es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Regelungen für *Alternaria* Toxine gibt, ist es bereits jetzt erforderlich analytische Methoden zu etablieren, um mit den so erhaltenen Daten einen Beitrag zur Risikobewertung von *Alternaria* Toxinen und somit zu einem zukünftigen gesetzlichen Grenzwert leisten zu können.

Klassische Chromatographiemethoden zur Auftrennung der einzelnen Toxine zählen nach wie vor zu den beliebtesten Analysetechniken in der *Alternaria* Analytik, jedoch wurden auch in anderen Bereichen, wie z.B. Immunoassays bereits große Fortschritte gemacht. Auch weitere Entwicklungen in Richtung Biosensoren sind zukünftig zu erwarten, da diese durch ihre einfache Verwendung auch für on-site Bestimmungen geeignet und somit besonders für die industrielle Anwendung interessant sind (Stroka und Maragos 2016; Alshannaq und Yu 2017; Burkin und Kononenko 2011; Tothill 2011; Piriñci et al. 2018; Slaughter 2006).

Während zu Beginn oft mit Gaschromatographie (GC) gearbeitet wurde, ist diese Methode heutzutage kaum noch zur Bestimmung von *Alternaria* Toxinen zu finden. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass Mykotoxine von Natur aus schlecht flüchtig und oftmals polar sind, wohingegen für die GC-Analytik flüchtige und eher unpolare Analyten benötigt werden (Alshannaq und Yu 2017; Pereira et al. 2014; Köppen et al. 2010). Eine Analytik von AOH, AME, ALT, TeA sowie ATX I war somit nur nach vorheriger Derivatisierung mittels

Trimethylsilan (TMS) oder Acylierung möglich (Zhang et al. 2018; Man et al. 2017; Harvan und Pero 1974). Scott et al. (1997) und Pero et al. (1971b) konnten unter Verwendung eines an das GC gekoppelten Massenspektrometers (MS) zwar sensitive Methoden mit Nachweisgrenzen von bis zu 0,1 µg erreichen, jedoch führten die aufwendige Derivatisierung mit teuren Reagenzien, sowie starke Matrixinterferenzen und Memory-Effekte der vorher gemessenen Probe dazu, dass GC-MS Methoden heutzutage kaum noch für die *Alternaria* Analytik eingesetzt werden (Man et al. 2017).

Eine verbreitetere Methode in der Mykotoxinanalytik ist somit die Verwendung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). In der *Alternaria* Analytik wird hier aufgrund der hohen Sensitivität meist ein Ultraviolett (UV)- Detektor verwendet, aber auch Diodenarray-Detektoren (DAD) wurden bereits erfolgreich angewandt (Man et al. 2017). Unter Verwendung von HPLC-UV konnten so Methoden zur Analytik von TeA in Tomaten (Stack et al. 1985) und von AOH, AME, ATX I und TeA in Karotten (Solfrizzo et al. 2004) entwickelt werden; ebenso wurden 64 Weizenproben auf ihren *Alternaria* Toxingehalt analysiert (Azcarate et al. 2008). Bei der Bestimmung von TeA mittels HPLC ist zudem zu beachten, dass dieses Toxin ein starker Chelatbildner ist, weswegen meist Zinksulfat ( $ZnSO_4$ ) der mobilen Phase zugesetzt werden muss (Man et al. 2017; Ostry 2008).

Da heutzutage präferiert eine Vielzahl von Toxinen in einer einzigen Methode bestimmt werden sollen, ist dies aufgrund ähnlicher Retentionszeiten der Analyten oftmals nicht mittels HPLC-UV möglich (Pascale et al. 2019), sodass seit langem die Massenspektrometrie (MS) als sensitiver Detektor eingesetzt wird (Man et al. 2017). Mittels der für *Alternaria* Toxine häufig verwendeten Elektrospray Ionisierung (ESI) können hier zeitgleich mehrere Toxine ohne vorherige Derivatisierung identifiziert und quantifiziert werden. Die Verwendung eines LC-MS/MS ermöglicht hierbei neben einer akkuraten Masseninformation auch wesentlich sensitivere und verlässlichere Ergebnisse als reine HPLC Messungen (Woo et al. 2019; Bessaire et al. 2019). LC-MS/MS Bestimmungen gelten somit aktuell als „state-of-the-art“ Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen und finden eine breite Anwendung in der Lebensmittelanalytik diverser Matrices (Stroka und Maragos 2016; Agriopoulou et al. 2020; Ostry 2008). Für Mykotoxine mit verfügbarem isotoopenmarkiertem Standard bietet die Verwendung eines Stabilisotopenverdünnungsassays (SIVA) zusätzlich die Möglichkeit Aufarbeitungsverluste auszugleichen und zeitgleich die bei der LC-MS/MS häufig auftretende Ionensuppression zu verringern (Asam und Rychlik 2015).

Als Alternative zu den doch eher zeitaufwendigen und hinsichtlich der Geräteanschaffung teuren chromatographischen Methoden wurden in den letzten Jahren auch vermehrt an immunochemischen Assays geforscht, welche nicht nur schneller Resultate liefern, sondern

auch einfacher in der Anwendung sind (Alshannaq und Yu 2017; Agriopoulou et al. 2020). ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Methoden werden bereits häufig für die Analytik anderer Toxine eingesetzt und basieren analog zur IAC auf der Bildung eines Antikörper-Antigen Komplexes (Pereira et al. 2014). Die hierfür benötigten Antikörper konnten für AOH bereits erfolgreich von Ackermann et al. (2011) produziert werden. Ihnen gelang es sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper herzustellen, deren Leistungsfähigkeit im Anschluss in zwei verschiedenen indirekt kompetitiven ELISA Tests sowie mit HPLC Daten anhand diverser Lebensmittelproben verglichen wurden. Die Übereinstimmung zwischen den HPLC-Daten und ELISA Ergebnissen war zwar sehr hoch, jedoch zeigte das mABs ELISA konstant leicht erhöhte Werte, was von den Autoren dadurch erklärt wurde, dass die mABs vermutlich noch ein dem AOH strukturell ähnliches Molekül erfassen. Mit einer Nachweisgrenze von 35 ng/L zeigten sich die hier entwickelten ELISA Methoden dennoch als eine schnelle und vielversprechende Alternative zu klassischen Chromatographiemethoden, was ebenfalls durch eine weitere Studie von Burkin und Kononenko (2011) bestätigt wurde, bei der unter Verwendung von pABs eine Nachweisgrenze von 0,4 µg/L in Futtermittelproben und Mais erzielt werden konnte. Weitere ELISA Nachweise für AOH und auch AME wurden von Wang et al (2018b) mit Nachweisgrenzen von 0,7 µg/L (AOH) und 1,0 µg/L (AME) für die Weizenanalytik, sowie von Singh et al (2018) zur Bestimmung von AOH in Backwaren entwickelt. Auch ELISA Methoden für die Quantifizierung von TeA und dem AAL-Toxin TA konnten bereits erfolgreich angewandt werden (Yu et al. 1999; Man et al. 2017). Eine weitere immunochemische Methode zur Bestimmung von TeA erfolgte durch Verwendung eines Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays (FPIA), welcher auf polyklonalen Antikörpern basiert und erfolgreich für die TeA Bestimmung in Weißbier und Apfelsaft angewandt werden konnte (Wang et al. 2018a). Ein Nachteil von ELISA Methoden ist jedoch, dass in der Regel nur ein Toxin bestimmt werden kann und zuerst aufwendig nach passenden Antikörpern geforscht werden muss. Dennoch könnten ELISA Nachweise auch in der *Alternaria* Analytik weiterhin an Bedeutung gewinnen, insbesondere wenn zunächst nur für einzelne Toxine Grenzwerte festgelegt werden und somit immunochemische Methoden schnelle Ergebnisse liefern können.

Auch die Verwendung von Biosensoren könnte in Zukunft eine Rolle bei der Bestimmung einzelner *Alternaria* Toxine spielen, da diese ebenfalls leicht zu bedienen sind und schnelle sowie kostengünstige und reproduzierbare Ergebnisse liefern können. Zudem wären on-site Messungen möglich, sodass direkt am Feld die Toxingehalte bestimmt werden könnten, was vor allem für Unternehmen von Interesse wäre (Pirinçi et al. 2018; Slaughter 2006). Diese Methode basiert meist auf elektrochemischen oder optischen Signalwandlern, welche unter anderem Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren oder auch Aptamere als Erkennungselemente

nutzen können (Santana Oliveira et al. 2019; Tothill 2011; Schulz et al. 2019). Biosensoren werden bereits erfolgreich für die Bestimmung des Aflatoxins B1 und OTA verwendet (Agriopoulou et al. 2020) und auch wenn bisher für *Alternaria* Toxine noch kein Biosensor entwickelt wurde, gelang hier bereits ein erster Durchbruch, als von Moressi et al. (1999) die Pilztyrosinase als Enzym mit einer hohen Affinität für AOH und AME identifiziert wurde. Dieses Wissen könnte in Zukunft zur Entwicklung eines enzymatischen Biosensors beitragen, jedoch müssen zunächst weitere Studien hierzu durchgeführt werden.

#### **1.4.4 Vorgaben für die Methodvalidierung**

Die Entwicklung genauer und reproduzierbarer Messmethoden ist vor allem in der Spurenanalytik unerlässlich, insbesondere wenn es um die Einhaltung gesetzlich vorgegebener Höchstwerte geht. Als Maß für die Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit einer entwickelten Methode sollte deswegen eine Methodvalidierung durchgeführt werden im Rahmen welcher Faktoren wie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, Präzision, Wiederfindungsrate und Richtigkeit bestimmt werden sollten (Kromidas 2011; Thompson et al. 2002). In der Rückstandsanalytik liegen zudem oft sehr niedrige Konzentrationen vor, sodass in einigen Fällen ebenfalls die Probenhomogenität in die Validierung integriert werden sollten, da Fehler bei der Probennahme zu nicht repräsentativen Ergebnissen führen könnten (Kromidas 2011). Zudem muss für jede analysierte Matrix eine separate Validierung vorgenommen werden, da verschiedene Matrixeffekte die Resultate beeinflussen können (Thompson et al. 2002; European Commission 2002).

Zur Ermittlung der Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) wird eine Blankmatrix mit den zu bestimmenden Analyten dotiert. Der als Nachweisgrenze bestimmte Wert gibt nun die geringste Konzentration an, die qualitativ erfasst werden kann. Fällt ein errechneter Wert unter die NWG, so wird dieser als „nicht nachgewiesen“ angegeben, wohingegen ein Wert unter der BG als „nachgewiesen“ bezeichnet wird (Kromidas 2011; Hädrich und Vogelgesang 1999). Die Bestimmungsgrenze gibt die Konzentration an, ab der quantitative Werte bestimmt werden können. Für die Bestimmung der NWG und BG gibt es mehrere wissenschaftlich akzeptierte Methoden, eine davon ist die Bestimmung beider Werte über das Signal/Rauschverhältnis. Hierbei wird die Intensität des entstandenen Signals durch die Intensität des Grundrauschens geteilt und die NWG mit einem Signal/Rauschverhältnis von 3 festgelegt, wohingegen die BG ein Signal/Rauschverhältnis von 10 erfordert (Kromidas 2011; Thompson et al. 2002). Eine genauere, jedoch aufwändigere Methode ist die Bestimmung der NWG und BG nach Vogelgesang und Hädrich (1998), bei der der Analyt in vier ansteigenden Konzentrationen einer Blank Matrix zugegeben wird; das unterste Konzentrationslevel sollte hierbei der geschätzten NWG und das höchste Level idealerweise 10 x BG entsprechen.



Jedes Konzentrationsniveau wird in Mehrfachbestimmung vorbereitet und gemessen, die erhaltenen Signalintensitäten gegen die enthaltene Konzentration aufgetragen und eine Kalibriergerade erstellt. Durch Verwendung von Vorhersageintervallen mit  $\alpha = 0,05$  über und unter der Kalibriergerade ergibt sich die Nachweisgrenze als Konzentration der maximalen Peakintensität einer Blankmatrix am oberen Vorhersageintervall. Für die BG werden drei verschiedene Werte erhalten: BG1 berücksichtigt hierbei den Abstand zwischen NWG und BG, da dieser Auskunft über den Einfluss der Störkomponenten gibt und dieser ausreichend klein sein sollte. Bei BG2 wird ebenfalls eine Wiederfindungsrate von 70-120 % gefordert, wohingegen BG3 die Streuung der Messwerte betrachtet. Der größte für BG1 – BG3 erhaltene Wert legt nun die BG fest, da an diesem Punkt alle nötigen Kriterien erfüllt sind (Hädrich und Vogelgesang 1999).

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem verschiedene Konzentrationslevel an Analyten in eine Blankmatrix dotiert und jeweils mindestens dreifach aufgearbeitet werden. Die Division aus experimentell bestimmter Konzentration und theoretisch enthaltener Konzentration ergibt die Wiederfindungsrate, die zwischen 70 und 120 % liegen sollte. Liegt die Wiederfindungsrate unter 70 %, kommt es während der Aufarbeitung zu nicht vernachlässigbaren Verlusten und die Methode sollte optimiert werden (Kromidas 2011; Hädrich und Vogelgesang 1999; Thompson et al. 1999).

Ein weiterer wichtiger Validierungsbestandteil ist die Bestimmung verschiedener Präzisionen. Für die Messpräzision werden die durch das Gerät bedingten Schwankungen ermittelt, indem eine Probe mehrfach injiziert wird. Die Wiederholpräzision innerhalb eines Tages (intra-day) ergibt sich aus der Messung verschiedener identischer Proben, die innerhalb eines Tages vorbereitet wurden, wohingegen die Wiederholpräzision von Woche zu Woche (inter-day) durch verschiedene Aufarbeitungen einer Probe über mehrere Tage/Wochen hinweg ermittelt wird. Die Präzision ist hierbei immer als relative Standardabweichung der entsprechenden Messungen angegeben (Kromidas 2011).

#### **1.4.5 Aktueller Wissensstand zu *Alternaria* Toxinen in Braugerste und Malz**

Der Rohstoff Gerste (*Hordeum vulgare*) zählt aufgrund des hohen industriellen Bedarfs zu einer der ökonomisch wichtigsten Getreidearten Europas und wird vorwiegend in Bäckereien, Mälzereien und Brauereien eingesetzt. Da Getreide bekanntermaßen anfällig für Schimmelpilze und somit für Mykotoxine ist, gibt es auch für den Rohstoff Gerste bereits einige Studien zum Befall mit *Alternaria* spp., welche in diesem Kapitel zusammengefasst werden sollen.

Zu den am häufigsten in Braugerste analysierten *Alternaria* Toxinen zählen AOH, AME und TeA, welche entweder einzeln oder zusammen auftreten. Beim Vergleich der verfügbaren Daten aus den Ländern Spanien, Schweden, Estland, Norwegen, Italien, USA, Ägypten, Russland und Argentinien fällt zunächst auf, dass vor allem AOH und TeA im Durchschnitt in über 50 % der analysierten Proben nachweisbar waren, was erneut die Relevanz der Analytik von *Alternaria* Toxinen unterstreicht (Medina et al. 2006; Burkin und Kononenko 2011; Uhlig et al. 2013; Beccari et al. 2016; Castañares et al. 2020; Kütt et al. 2010; Häggblom et al. 2007). An dieser Stelle ist jedoch ebenfalls anzumerken, dass die aktuell verfügbaren Daten oftmals lückenhaft oder ohne Angabe von Mittelwerten sowie minimal und maximal gefundenen Konzentrationen sind. Auch meteorologische Daten wurden nur in einer Studie berücksichtigt (Castañares et al. 2020), sodass wichtige bekannte Einflüsse für die Bildung von *Alternaria* Toxinen wie Temperatur und Niederschlagsmenge nicht dokumentiert sind (Janić Hajnal et al. 2015).

Die laut Literatur maximal gefundenen Konzentrationen betragen 6812 µg/kg AME, 4310 µg/kg TeA und 1254 µg/kg AOH, welche mit Ausnahme der Tenuazonsäure im Rahmen einer argentinischen Studie bestimmt wurden (Castañares et al. 2020; Häggblom et al. 2007).

Erwähnenswert ist ebenfalls die große Variabilität der Anzahl kontaminierter Proben sowie das Auftreten der Mykotoxine in Abhängigkeit von Erntejahr und Anbaugebiet. So konnten im Jahr 2007 in einer schwedischen Studie diverser Gersten, Weizen und Haferproben Werte für TeA zwischen 980 und 4310 µg/kg gefunden werden (Häggblom et al. 2007), wohingegen im benachbarten Norwegen einige Jahre später lediglich maximal 247 µg/kg detektiert werden konnten (Uhlig et al. 2013). Eine argentinische Studie über zwei Erntejahre hinweg zeigte für TeA zwar hohe (630 bis 3600 µg/kg), jedoch konstante Werte, sodass hier auf keinen Einfluss des Erntejahres geschlossen werden konnte (Castañares et al. 2020).

Ähnliches war für das Toxin AOH zu beobachten: die Werte lagen abhängig vom Anbauort in stark variierenden Konzentrationsbereichen vor: 78 – 687 µg/kg (Spanien, Medina et al. 2006), 9 – 335 µg/kg (Schweden, Häggblom et al. 2007, 130 µg/kg (Estland, Kütt et al. 2010), 20 – 126 µg/kg (Russland, Burkin und Kononenko 2011), 37,7 µg/kg (Norwegen, Uhlig et al. 2013), 14,7 µg/kg (Italien, Beccari et al. 2016) und 391 – 1254 µg/kg bzw. 368 – 1254 µg/kg (Argentinien, Castañares et al. 2020).

AME konnte generell zwar in weniger Proben nachgewiesen werden, lag aber ebenfalls mit Mittelwerten von 152 µg/kg (Medina et al. 2006) in nicht zu vernachlässigenden Mengen vor. Auch in Schweden konnten in Gerste, Weizen und Hafer Gehalte von 1 – 184 µg/kg in 40 % aller Proben nachgewiesen werden (Häggblom et al. 2007), wohingegen die norwegischen

Werte mit 0,5 – 5,2 µg/kg AME (Uhlig et al. 2013) zwar gering waren, jedoch in 95 % aller getesteten Gerstenproben AME nachgewiesen wurde.

Die Toxine ATX I und TEN wurden bisher nur in wenigen Studien berücksichtigt, lagen aber in der norwegischen Studie in 95 % (ATX I) bzw. 25 % (TEN) aller Proben in Konzentrationen zwischen 2,7 – 5,6 µg/kg (ATX I) und 0,2 – 0,4 µg/kg (TEN) vor und sollten somit in weiteren Studien berücksichtigt werden (Uhlig et al. 2013).

Aufgrund der bevorzugten Verwendung des Rohstoffes Gerste als Malz sind die Toxingehalte nach dem Mälzen generell besser für zukünftige Risikobewertungen und Expositionsabschätzungen geeignet, allerdings liegen hierfür zum aktuellen Zeitpunkt nahezu keine Daten vor. Lediglich eine Studie aus dem Jahr 2021 konnte im Rahmen eines durchgeführten Brauversuches zeigen, dass vor allem AOH, AME und TeA während des Mälzens gebildet werden können, was sich in Anbetracht der Toxinbelastungen des Rohstoffes als kritisch erweisen könnte (Prusova et al. 2021). Welche Rolle modifizierte Toxine in Gerste und im Malz spielen ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden.

## 1.5 Der Brauprozess als potenziell kritischer Produktionsschritt

Gerste (*Hordeum vulgare*) wird hauptsächlich als Gerstenmalz in Bäckereien und Brauereien verwendet und ist aufgrund seiner Nährwertzusammensetzung anfällig für das Wachstum diverser Schimmelpilze, wie zum Beispiel *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Aspergillus* und *Penicillium* (Krasauskas 2017; Kocic-Tanackov et al. 2005; van Nierop et al. 2006). Die Zusammensetzung der Mikroflora ist hierbei neben klimatischen Unterschieden auch vom Anbauort und den Anbaubedingungen sowie dem Stresszustand der befallenen Pflanze und der Lagerung abhängig (van Nierop et al. 2006; Noots et al. 1999; Tangni und Larondelle 2002) und kann sich während weiterer Verarbeitungsschritte verändern. Studien von Kocic-Tanackov (2005) identifizierten zudem *A. alternata* als häufigsten Feldpilz auf Braugerste und als dominierenden Pilz während der Mälzung.

### 1.5.1 Mälzungsprozess

Malz entsteht durch die kontrollierte Keimung von Gerstenkörnern unter festgelegten Bedingungen und ist in die Schritte Weiche, Keimung und Darre unterteilt (Wolf-Hall 2007; Narziß und Back 2019; Belitz et al. 2008).

Für die Malzherstellung wird die gereinigte Gerste zunächst durch einen Wechsel aus Nass- und Trockenweichen bei einer Temperatur von 13 – 18 °C auf einen Wassergehalt von 42 – 48 % gebracht, um optimale Keimungsbedingungen zu schaffen. Bei der Keimung handelt es sich um einen wichtigen physiologischen Vorgang, bei dem sich zum einen der Wurzel- und Blattkeim entwickeln und zum anderen wichtige Gerstensenzyme gebildet werden (Noots et al. 1999; Narziß und Back 2019). Der während der Mälzung stattfindende Stärkeabbau ist hierbei auf eine Aktivität der gebildeten Endo- und Exo-Amylasen zurückzuführen, wohingegen der Proteinabbau zu Aminosäuren und Polypeptiden durch die entwickelten proteolytischen Enzyme erfolgt. Generell lässt sich die Keimphase durch Steuerung der Temperatur und des Wassergehaltes, sowie des zugeführten Sauerstoffes und der Keimdauer je nach gewünschtem Resultat steuern. Nach mehreren Tagen der Keimung sollte im sogenannten Grünmalz ein charakteristisches Gurkenaroma wahrnehmbar sein, welches auf das durch enzymatische Spaltung von Linolensäure entstandene Molekül (E,Z)-2,6-Nonadienal zurückzuführen ist (Narziß und Back 2019). Zur besseren Lagerfestigkeit erfolgt nach der Keimung die Darre, bei der dem gekeimten Korn Wasser entzogen wird und zeitgleich das je nach Malzart typische Malzaroma entsteht. Zu Beginn der Darre findet die sogenannte Schwelkphase statt, bei welcher für 10-12 Stunden und Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C der Wassergehalt auf ca. 10 % gebracht wird. Darauf folgt die 5-stündige

Darrphase bei Temperaturen von 80-105 °C, wodurch der Wassergehalt im Korn je nach Malzart (hell/dunkel) auf 1,5 bis 4,5 % gesenkt wird (Narziß und Back 2019; Belitz et al. 2008).

Der Mälzungsprozess bietet somit bezüglich Temperatur, Wassergehalt und Sauerstoffzufuhr ideale Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen, welche die resultierende Malzqualität negativ beeinflussen und somit zu Ertragseinbußen führen können (van Nierop et al. 2006; Felšöciová et al. 2021; Tangni und Larondelle 2002; Kumar Dikkala et al. 2018). Auch bei mikrobiologisch unauffälliger Gerste können ruhende Sporen während der Mälzung aktiviert werden und somit belastetes Malz ergeben, was den Weichschritt zu Beginn der Mälzung voraussichtlich zum kritischsten Punkt des Mälzungsprozesses macht (Laitila et al. 2007; Kocic-Tanackov et al. 2005; Noots et al. 1999; O'Sullivan et al. 1999). Neben der ursprünglichen Kontamination der Gerste tragen der Weichgrad sowie die Nährstoffverfügbarkeit ebenso zum Schimmelpilzwachstum bei, wie die während der Mälzung gewählten Prozessparameter (Temperatur und Belüftung) (Krasauskas 2017; Kocic-Tanackov et al. 2005), sodass vor allem die Weiche und die Keimung aufgrund der besseren Nährstoffverfügbarkeit und erhöhten Enzymaktivität ein Schimmelpilzwachstum fördern können (Noots et al. 1999; Tangni und Larondelle 2002).

### **1.5.2 Brauprozess**

Bier ist eines der beliebtesten alkoholischen Getränke Deutschlands und wird nach den Vorgaben des Reinheitsgebotes aus dem Jahre 1516 aus den Ausgangsmaterialien Wasser, Gerstenmalz, Hopfen und Hefe hergestellt. Zusätzlich können auch andere Getreidearten wie Weizen und Roggen verwendet werden, jedoch ist Gerste das am häufigsten zur Bierherstellung eingesetzte Getreide (Kunze et al. 2016). Der Brauprozess untergliedert sich in mehrere Prozessschritte: Schroten, Maischen, Würzekochen, Abläutern und Lagerung (Belitz et al. 2008).

Beim Schroten wird das Malz zunächst mit physikalischen Methoden zerkleinert. Dieser Schritt ist essenziell, da hier der Mehlkörper vermahlen wird, der den Großteil des späteren Extraktes darstellen wird. Die Schrotung sollte so erfolgen, dass die Spelzen intakt bleiben, um während des Läuterprozesses als natürliche Filterschicht genutzt werden zu können (Narziß et al. 2017). Zum Maischen wird dem Schrot heißes Wasser (70 °C) im Verhältnis 1:4 oder 1:5 (Malz/Wasser; zur Herstellung hellen Bieres) bzw. 3:1 oder 3,5:1 (Malz/Wasser, zur Produktion von dunklem Bier) zugegeben, wodurch die während der Keimung gebildeten Enzyme erneut aktiviert werden, und der enzymatische Stärkeabbau starten kann (Wolf-Hall 2007; Narziß et al. 2017).

Die auf das Maischen folgende Würzegewinnung kann in zwei Schritte untergliedert werden: das Abläutern der Würze und das Auswaschen des Trebers. Zunächst wird die Maische in einen Läuterbottich überführt, in welchem die unlöslichen Bestandteile sedimentieren und somit eine natürliche Filterschicht darstellen. Nach Abläutern der Vorderwürze wird der zurückbleibende Treber mit temperiertem Wasser nachgespült, um die Extraktausbeute zu erhöhen (Wolf-Hall 2007; Narziß et al. 2017). Beim darauffolgenden Würzekochen wird der Wasseranteil der Würze reduziert und schließlich Hopfen zugegeben. Durch die beim Kochen gegebenen hohen Temperaturen werden verbliebene Malzenzyme denaturiert und Mikroorganismen abgetötet, sodass die Würzezusammensetzung ab diesem Schritt konstant bleibt (Wolf-Hall 2007). Weitere durch das Kochen entstehende Effekte sind die Sterilisation der Würze, die bessere Löslichkeit der Hopfenbestandteile, das Ausfallen von Eiweißbestandteilen und die Entfernung ungewünschter Aromastoffe. Nach dem Würzekochen erfolgt das Ausschlagen der Würze, bei der die Hopfenbestandteile und weitere Trubstoffe im sogenannten Whirlpool abgetrennt werden. Sobald die Ausschlagwürze abgekühlt ist, kann Hefe zugegeben und alles in einen Gärbehälter zur alkoholischen Gärung überführt werden. Auf die fünf bis siebentägige Hauptgärung folgt eine Nachgärung und Reifung des Bieres. In diesen Schritten sollen Fehleraromen und unerwünschte Gärungsnebenprodukte biochemisch abgebaut werden. Bei der Lagerung wird das Bier zudem mit Kohlensäure angereichert, natürlich geklärt und veredelt. Eine weitere Klärung zur Entfernung von Eiweißgerbstoffen, Hopfen und Hefen erfolgt unmittelbar vor dem Abfüllen (Wolf-Hall 2007; Narziß et al. 2017).

Mit unerwünschten Mikroorganismen kontaminiertes Bier äußert sich oftmals an einem Fehleraroma und – geschmack, Gushing (= Überschäumen beim Öffnen der Flasche), einer Trübung sowie der Anwesenheit diverser Mykotoxine (Laitila et al. 2007; Doran und Briggs 1993). Da die neben Malz eingesetzten Inhaltsstoffe Wasser, Hefe und Hopfen in der Regel unbelastet vorliegen, wird das Malz als Hauptbelastungsquelle beim Bierbrauen eingestuft (Lancova et al. 2008).

Aufgrund der Hitzestabilität der meisten Mykotoxine sowie der hohen Polarität einiger *Alternaria* Toxine ist es denkbar, dass ein Teil der im Malz vorliegenden Toxine über den Brauprozess hinweg ins Bier übertragen werden, so wie es bereits für Toxine anderer Schimmelpilzgattungen gezeigt wurde (Kocic-Tanackov et al. 2005; Scott 1996; van Nierop et al. 2006). Auch AOH, TeA und AME konnten bereits in diversen Bierproben entdeckt werden, was auf einen Transfer dieser Toxine durch den Brauprozess hindeutet (Siegel et al. 2010b; Prella et al. 2013; Bauer et al. 2016). Für unpolare Toxine ist es jedoch wahrscheinlich,

dass diese über den Treber und die Trubstoffe dem Brauprozess entzogen werden, Studien hierzu sind aber kaum vorhanden.

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

In Deutschland werden pro Jahr über 1,8 Millionen Tonnen Malz für Bäckereien, Brauereien und andere Industrien produziert, sodass der Rohstoff Gerste auf dem stark volatilen Markt einen hohen wirtschaftlichen Wert besitzt (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung 2021). Kritisch hierbei ist die hohe Anfälligkeit von Gerste für Schimmelpilze, vor allem wenn es durch den Klimawandel zu immer drastischeren klimatischen Verhältnissen kommt. Insbesondere ein nasser Sommer kann hier erheblichen Schaden und Verluste anrichten, da in diesem Fall ideale Wachstumsbedingungen für Schwärzepilze, wie z.B. *Alternaria* spp., herrschen und durch Mykotoxinbildung die Rohstoffqualität erheblich gemindert werden kann (Logrieco et al. 2009). Umso wichtiger ist es den Toxingehalt im Rohstoff sowie in den weiteren Verarbeitungsschritten regelmäßig zu überprüfen, um ein potenzielles Risiko für die menschliche Gesundheit frühzeitig erkennen zu können. Da durch eine im Jahr 2011 durchgeführte Risikobewertung der EFSA (2011) festgestellt wurde, dass speziell für *Alternaria* Toxine noch nicht genügend Daten zur Toxizität und zum Vorkommen bzw. Verhalten der Toxine vorhanden sind, müssen zunächst sensitive analytische Messmethoden entwickelt werden, mit denen dann weitere, vor allem quantitative, Werte bestimmt werden können, um eine bessere Risikobewertung zu ermöglichen. In dieser sollten dann ebenfalls die modifizierten Formen (u.a. Glucosid- und Sulfatformen von AOH und AME) berücksichtigt werden, da diese nach aktuellem Kenntnisstand während der Verdauung ihre Ausgangstoxine freisetzen und somit teilweise erheblich zur Exposition beitragen können (EFSA 2011).

Ziel dieser Arbeit war es deswegen zunächst die modifizierten Toxine AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G, sowie AOH-3-S und AME-3-S in Reinform zu gewinnen und anschließend mit diesen sowie den bereits bekannten Toxinen AOH, AME, TeA, ATX I, ATX II, ALT und ALTP eine LC-MS/MS Multimethode zu entwickeln, welche unter Anwendung von SIDA Techniken sowie Matrixkalibrierungen validiert werden sollte. Hierfür war zudem die Entwicklung einer geeigneten Probenaufarbeitung zur Extraktion der Toxine aus verschiedenen Matrices erforderlich, wobei hier zwischen festen (Gerste/Malz) und flüssigen Proben (Bier) unterschieden werden musste.

Anhand dieser Methoden sollte dann die *Alternaria* Belastung von Gerstenproben aus den Jahren 2016 bis 2021 überprüft und durch Analytik der zugehörigen Malze ebenso ein erster Einblick in die Toxinbildung während des Mälzungsprozesses gewonnen werden. Des Weiteren sollten die einzelnen Stufen des Mälzungsverlaufes sowie die Auswirkungen der verschiedenen Temperaturen und Weichgraden auf den Toxingehalt während des Mälzens untersucht werden und im Anschluss zwei Gerstenmalze in kleinem Maßstab zu Bier gebraut



werden, um das Verhalten der *Alternaria* Toxine während des Brauprozesses verfolgen und somit kritische Verarbeitungspunkte identifizieren zu können. Hierbei sollten jeweils drei verschiedene Mischungsverhältnisse von schwarzen und optisch unauffälligen Körnern verwendet, um zeitgleich zu überprüfen, ob eine Entfernung der schwarzen Körner mittels optischen Sortiergeräten den *Alternaria* Toxingehalt reduzieren kann. Abschließend sollten 50 kommerziell erhältliche Biere auf ihre Belastung mit *Alternaria* Toxinen überprüft werden, um eine Risikoabschätzung durch Bierkonsum vornehmen zu können.

Da sich die Lagerung von Getreide in der Vergangenheit als kritischer Punkt für das Wachstum diverser Feld- und Lagerpilze gezeigt hat, war zudem ein Lagerversuch geplant, um optimale Lagerbedingungen für Braugerste zu ermitteln. Hierfür waren insbesondere Untersuchungen der Parameter Wassergehalt, Lagertemperatur und Durchlüftung erforderlich, da diese für das Wachstum von *Alternaria* spp. entscheidend sein könnten. Die verschieden gelagerten Gerstenproben sollten im Anschluss an die Lagerung vermälzt werden, um die Auswirkungen der getesteten Parameter auf das Mälzungsverhalten ermitteln zu können.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S aus *A. alternata* Kulturen

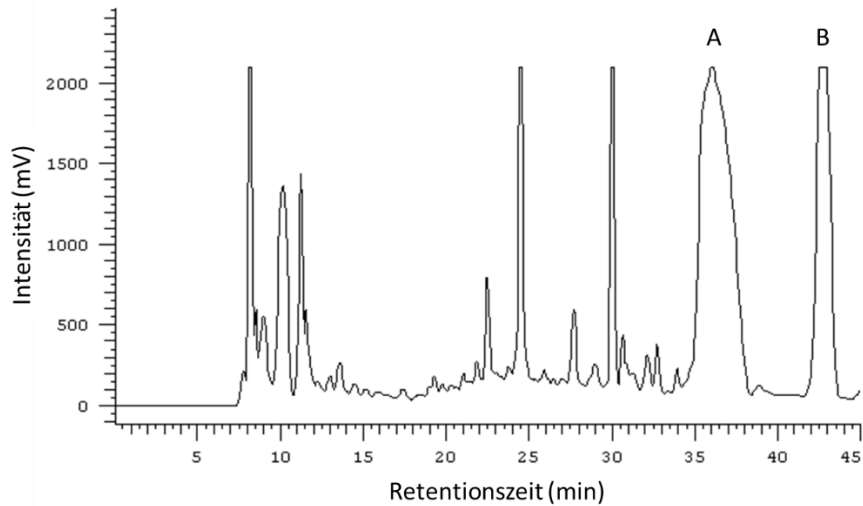
Die hier beschriebene Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S wurde bereits zum Teil von Scheibenzuber et al. (2021) publiziert.

#### 3.1.1 Pilzkultivierung

Die Pilzkultivierung erfolgte auf einem Reismedium analog der Vorgehensweise von Gotthardt et al. (Gotthardt et al. 2020) mit einem *A. alternata* Isolat des Lehrstuhls für Phytopathologie (TU München), welches von Kartoffelblättern isoliert wurde (Uelzen, Deutschland). Aus diesem Isolat wurde eine Sporenlösung hergestellt, welche wiederum mehreren Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit autoklaviertem Reis zugesetzt wurde (siehe 6.6.1). Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage im Dunkeln bei einer konstanten Temperatur von 26 °C im Schüttelwasserbad (110 rpm), wobei täglich für 30 Minuten eine UV-Lampe eingeschaltet wurde.

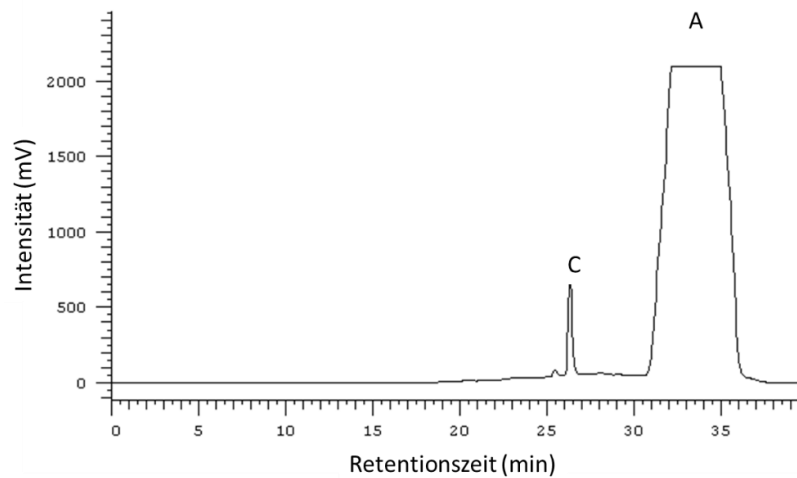
#### 3.1.2 Extraktion und Aufreinigung von AOH-3-S und AME-3-S

Die bewachsenen Reiskolben wurden vereint, in einem Mixer homogenisiert und extrahiert (siehe 6.6.2). Unter Anwendung eines Lösungsmittelgradienten aus Dichlormethan und Methanol wurden mittels Säulenchromatographie verschiedene Fraktionen gesammelt, am LC-MS/MS gemessen (siehe 6.6.2 und 6.5.3) und die Fraktionen mit den Sulfaten vereint. Um bereits im Vorfeld den Großteil der Pilzmatrix, sowie die große Menge an AOH und AME zu reduzieren, wurde die Sulfatfraktion erneut über eine zweite Silica Säule getrennt. Die hier erhaltenen Sulfatfraktionen zeigten zum einen in LC-MS/MS Messungen eine deutliche Reduzierung an AOH und AME, zum anderen änderte sich die Farbe der erhaltenen Fraktion von dunkelbraun zu Rot, wodurch eine weitere Entfernung der Pilzmatrix angenommen werden konnte. Da anhand der Silica Säule keine Trennung von AOH-3-S und AME-3-S erfolgen konnte, wurden alle sulfathaltigen Fraktionen vereint und in HPLC Vials membranfiltriert. Für die weitere Isolierung mittels semi-präparativer HPLC-UV musste dieser Sulfatextrakt erneut im Verhältnis 1:4 mit Methanol verdünnt werden, um eine Überladung der Säule aufgrund der hohen Sulfatkonzentration zu vermeiden. Die Isolierung und Aufreinigung beider Analyten erfolgte nun wie in 6.5.1.1 beschrieben in mehreren präparativen HPLC Läufen mit Ammoniumformiat (5 mM) und Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure (siehe Abbildung 3.1), woraus nach Verdampfen des Lösungsmittels ein gelber (AOH-3-S) bzw. weißer (AME-3-S) Rückstand erhalten wurde.



**Abbildung 3.1** HPLC Chromatogramm (254 nm) der Trennung von AOH-3-S (A) und AME-3-S (B). Nicht markierte Signale stammen von der verbliebenen Pilzmatrix.

Aufgrund der Gelbfärbung von Fraktion 1 (AOH-3-S) wurde diese erneut mit Methanol + 0.1 % Ameisensäure und 5 mM Ammoniumformiat präparativ mit der HPLC-UV aufgereinigt (siehe Abbildung 3.2, Kap. 6.5.1.1), woraufhin nach Entfernen des Lösungsmittels ebenfalls ein weißer Feststoff zurückblieb.

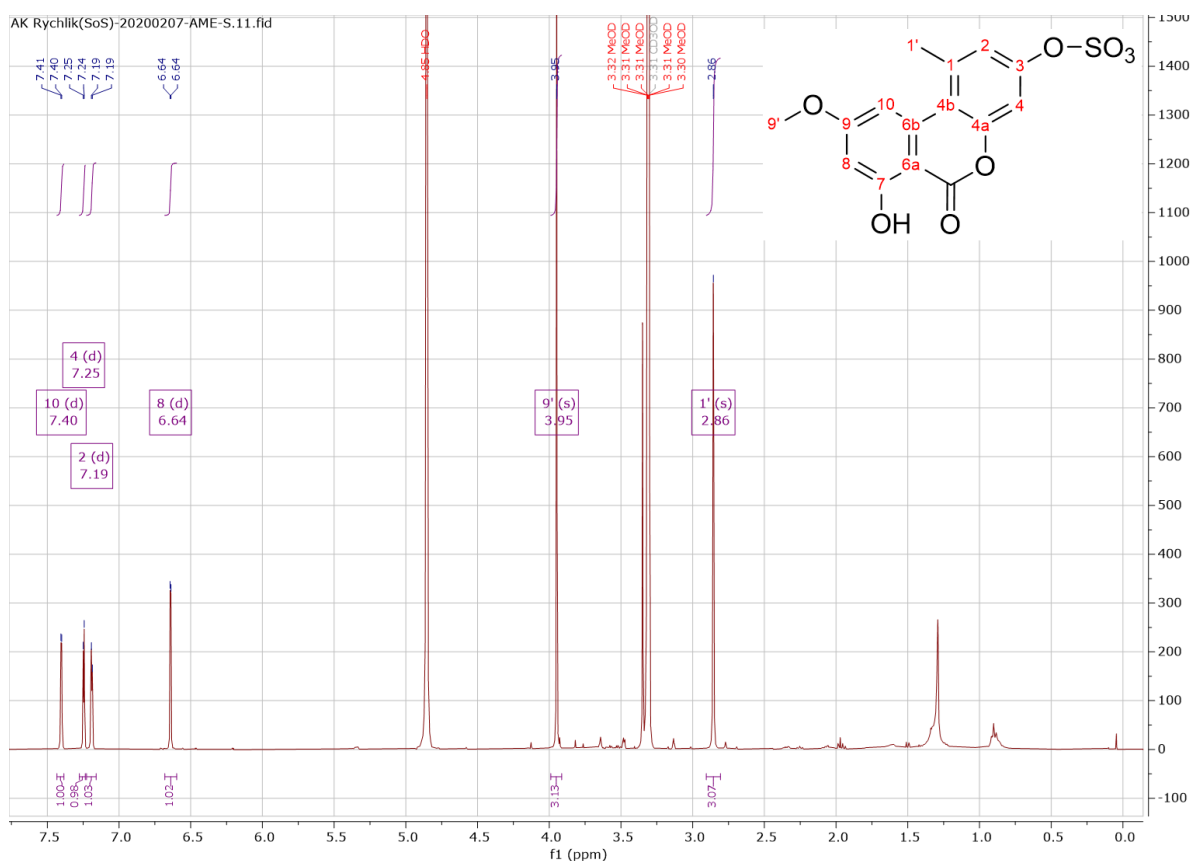


**Abbildung 3.2** Semi-präparative Nachreinigung von AOH-3-S. A = AOH-3-S, C = unbekannte Matrixkomponente.

### 3.1.3 Quantifizierung von AOH-3-S und AME-3-S

Die Quantifizierung beider Analyten erfolgte mittels quantitativer NMR-Messungen am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik (TU München) wie in Frank et al. (2014) beschrieben. Beide Analyten wurden in Methanol- $d_4$  gelöst und ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum gemessen.

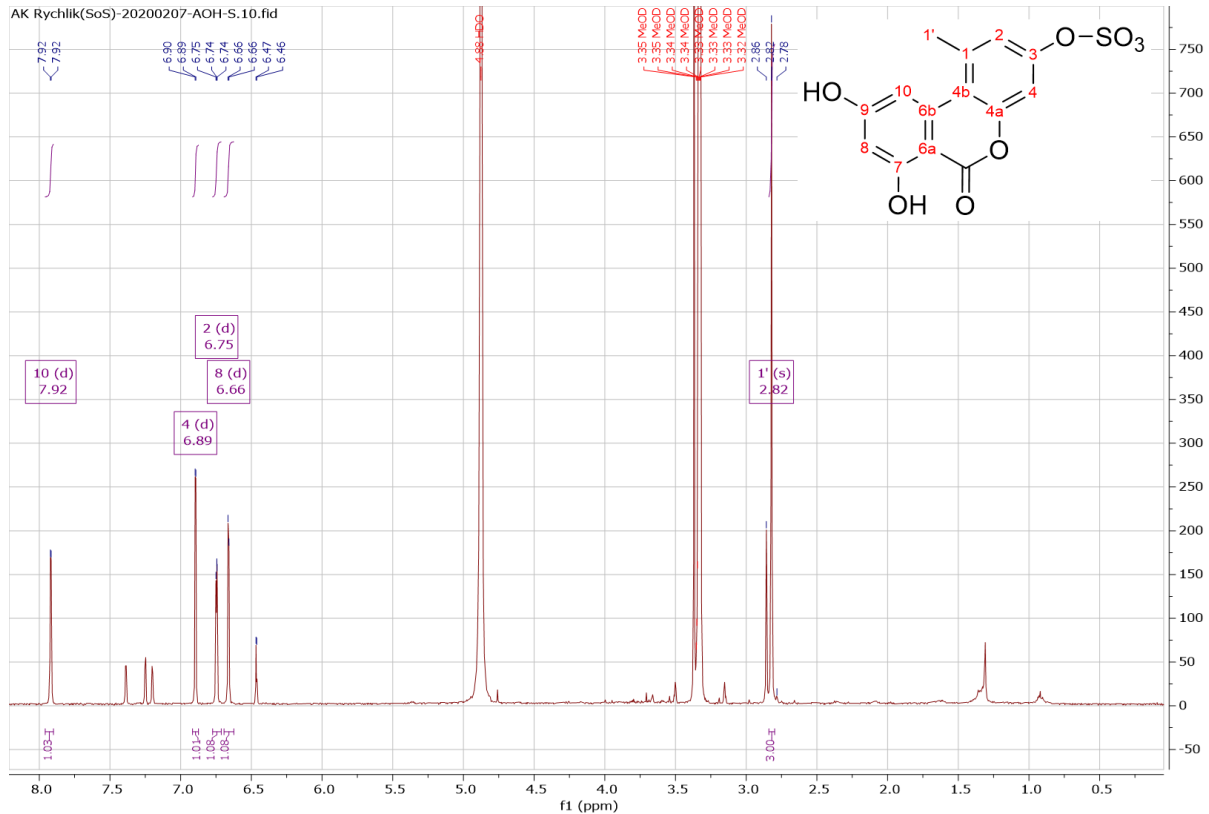
Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand eines Literaturvergleiches zu bereits publizierten  $^1\text{H}$ -NMR Daten der Sulfate sowie AOH und AME, da die Sulfatgruppe selbst kein Signal erzeugt, sondern lediglich für eine Tieffeldverschiebung sorgt (Soukup et al. 2016, Mikula et al. 2013). Das erhaltene  $^1\text{H}$  Spektrum für AME-3-S (Abbildung 3.3 und Anhang 1) zeigte neben den erwarteten Analyt- und Lösungsmittelsignalen nur wenige weitere Signale, was ein erstes Anzeichen für die Reinheit des Analyten ist. Darauf folgende HPLC und LC-MS/MS Messungen (siehe 6.5.2 und 6.5.3) bestätigten die Abwesenheit weiterer Toxine.



**Abbildung 3.3**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von AME-3-S, gemessen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Das in Abbildung 3.4 dargestellte  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von AOH-3-S zeigte, dass in dieser Probe eine Mischung zweier Substanzen im Verhältnis 1:5 vorlag. Da durch LC-MS/MS Analytik des stark verdünnten Extraktes die Anwesenheit von AOH zunächst ausgeschlossen wurde, lag erst die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine Mischung von AOH-3-S und AOH-9-S handeln könnte, da die Positionierung der Sulfatgruppe am C-9 möglicherweise

eine Verschiebung der Signale bewirkt. Weitere LC-MS/MS Messungen in einem höheren Konzentrationsbereich bestätigten dann jedoch die Anwesenheit von AOH und zusätzlich stimmten die  $^1\text{H-NMR}$  Signale des niedriger konzentrierten Metaboliten mit Literaturwerten von AOH überein (Soukoup et al. 2016).



**Abbildung 3.4**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von AOH-3-S, gemessen in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Die Konzentration von AME-3-S und AOH-3-S wurde anhand des externen Kalibrierstandards L-Tyrosin bestimmt. Aufgrund der gegebenen Tieffeldverschiebung von AOH-3-S und AOH konnten beide Analyten getrennt voneinander quantifiziert werden. Die hierfür verwendeten Protonensignale der Analyten sowie die dazugehörigen berechneten Konzentrationen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die erhaltenen Konzentrationen der Sulfate wurden im Anschluss mittels Ein-Punkt-Kalibrierungen der Referenzverbindungen an der analytischen HPLC überprüft und für beide Toxine bestätigt. Bei der Messung des Substanzgemisches von AOH-3-S wurde nur ein Peak detektiert, da in der gewählten Konzentration von AOH-3-S ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) zu wenig AOH enthalten war, um ein Signal zu erzeugen.

**Tabelle 3.1** Tabellarische Auflistung der quantitativen  $^1\text{H-NMR}$  Messungen von AOH-3-S und AME-3-S. s = Singulett, d = Doublet, m = Multiplet.

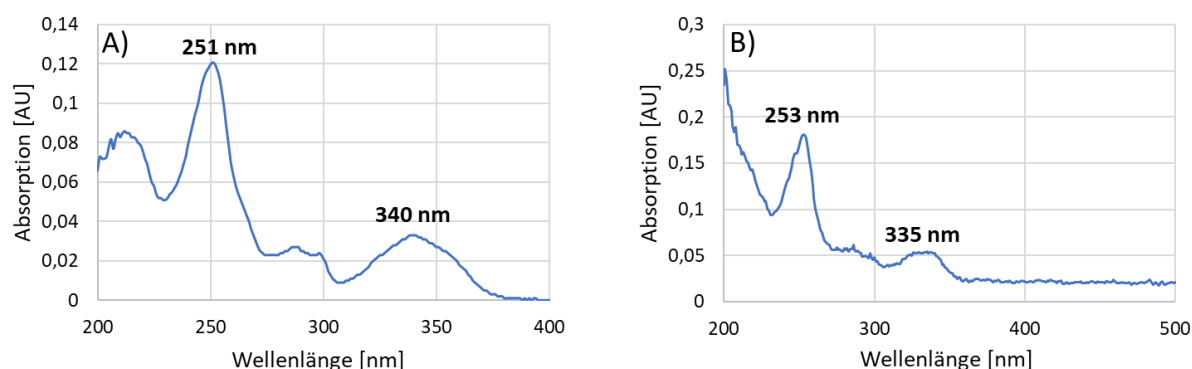
Analyt	$\delta$ ppm	Integral	Multiplizität	J (Hz)	qNMR (mmol/600 $\mu\text{L}$ )
AOH-3-S	7,92	1H	d	2,1	2,60
	6,89	1H	d	2,7	2,62
	6,75	1H	d	2,7	2,70
	6,66	1H	d	2,1	2,67
	2,82	3H	s	-	2,64
AME-3-S	7,40	1H	d	2,2	3,08
	7,25	1H	d	2,6	3,10
	7,19	1H	d	2,6	3,11
	6,64	1H	d	2,2	3,10
	3,95	3H	s	-	3,15
	2,86	3H	s	-	3,08

-, keine Messdaten verfügbar

Insgesamt konnten so bei der Isolierung aus mit *A. alternata* inokuliertem Reis 671  $\mu\text{g}$  AOH-3-Sulfat und 655  $\mu\text{g}$  AME-3-Sulfat gewonnen werden.

### 3.1.4 Spektroskopische Charakterisierung

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima von AOH-3-S und AME-3-S wurden an einem UV/Vis-Spektrometer Vollscans im Wellenlängenbereich 200 nm bis 500 nm in Methanol durchgeführt (siehe Abbildung 3.5); die verwendete Konzentration jedes Toxins betrug 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Da die Sulfatgruppe selbst keine UV-Aktivität besitzt, sollte die minimale Verunreinigung von AOH-3-S mit AOH in der gewählten Konzentration in diesem Fall vernachlässigbar gering sein.



**Abbildung 3.5** UV-Spektrum von (A) AOH-3-S (kontaminiert mit AOH) und (B) AME-3-S (je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; in MeOH).

Zudem wurde der molare Extinktionskoeffizient beider Toxine am Absorptionsmaximum bei 251 nm (AOH-3-S) bzw. 253 nm (AME-3-S) in Methanol bestimmt (siehe 6.6.4); die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

**Tabelle 3.2** Extinktionskoeffizienten AOH-3-S und AME-3-S in MeOH.

Analyt	$\log_{\epsilon}$ in $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon$ in $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
AOH-3-S	$4,6674 \pm 0,026$	$46571 \pm 2794$
AME-3-S	$4,7411 \pm 0,011$	$55116 \pm 1380$

### 3.1.5 Diskussion: Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S aus *A. alternata* Kulturen

Die Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S aus mit *A. alternata* inokuliertem Reis stellte sich als gute Methode zur Gewinnung reiner Standards dar, die im Vergleich zur chemischen Vollsynthese von Mikula et al. (2013) schneller und ökonomischer durchzuführen war. Bereits in der Vergangenheit wurden auf diese Art diverse *Alternaria* Toxine entdeckt und im Anschluss in größeren Mengen isoliert, wobei neben einer Inokulation auf Reismedium auch oft ein Flüssigmedium nach Czapek-Dox, oder Kartoffel-Dextrose-Agar zur Kultivierung eingesetzt wurden (Kelman et al. 2015; Soukup et al. 2016; Stack und Mazzola 1989; Raistrick et al. 1953). Zu beachten ist hierbei, dass die Toxinbildung zwischen verschiedenen Medien variieren kann und somit die gewählte Kultivierungsmethode an die Fragestellung angepasst werden muss. Soukup et al. (2016) fanden zum Beispiel in ihrer Studie eine erhöhte Bildung von AOH und AME auf einem Medium aus Hefeextrakt und Sucrose, wohingegen die Sulfatkonjugate von AOH und AME hier nicht zu detektieren waren, sondern vor allem auf Kartoffel-Dextrose Agar gebildet wurden. Liu et al. (2015) verwendete für die Synthese von  $^{13}\text{C}_{20}$  ATX – Standards Flüssigkulturen, da hier gezielt (markierte) Nährstoffquellen eingesetzt werden können, ohne dass unbekannte Faktoren das Endergebnis beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kultivierung auf Reis gewählt, da sich dieses Medium bereits in der Vergangenheit als geeignet erwiesen hat (Liu und Rychlik 2015) und die Vorbereitung kostengünstiger und schneller erfolgen konnte als entsprechende Flüssigmedien.

Die durchgeführten Säulenchromatographien eigneten sich gut um einen Großteil der Matrix sowie größere Mengen der beiden Haupttoxine AOH und AME zu entfernen. Da im Anschluss bei der semipräparativen HPLC dennoch viele Matrixpeaks enthalten waren, wäre es vermutlich hilfreich statt der zweiten Silicasäule eine Säulenchromatographie mit einem anderen Trennmaterial, z.B. Sephadex oder C18, zu benutzen. Durch Verwendung eines Ammoniumformiatpuffers in Kombination mit Methanol sowie einer Gradientendauer von 40 Minuten konnte mit der semipräparativen HPLC jedoch eine gute Trennbarkeit erzielt und beide Analyten getrennt voneinander gesammelt werden. Das gesammelte Eluat des AOH-3-Sulfats war im Gegensatz zur Fraktion mit AME-3-Sulfat nicht farblos, sondern gelblich, sodass testweise ein weiterer Lauf mit Ammoniumformiat und angesäuertem Methanol durchgeführt wurde. Da nun durch diese Fließmittelkombination ein weiterer Peak vor dem

AOH-3-S eluierte, wurde die gesamte gesammelte Fraktion aus dem ersten Lauf erneut aufgereinigt, was in einer farblosen Lösung resultierte.

Bei den NMR-Messungen war zu beachten, dass Sulfatgruppen im  $^1\text{H-NMR}$  kein Signal erzeugen, sodass lediglich die Signale von AOH und AME zu erwarten waren. Für die eindeutige Identifizierung musste deswegen auf LC-MS sowie LC-MS/MS Messungen zurückgegriffen werden. Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von AME-3-S zeigte die für AME charakteristischen Signale und lag nahezu ohne Matrixverunreinigung vor, sodass eine Quantifizierung problemlos durchgeführt werden konnte. Beim AOH-3-S konnten ebenfalls kaum Matrixverunreinigungen gesehen werden, jedoch sah es hier aus als würden zwei Verbindungen mit gleichem Signalmuster vorliegen. Da die Signale einer Verbindung tieffeldverschoben vorlagen, konnten beide Substanzen getrennt voneinander quantifiziert und das Verhältnis zueinander als 5:1 bestimmt werden. Auffallend war, dass beide Analyten das Signalmuster von AOH aufzeigten, sodass weitere LC-MS und LC-MS/MS Messungen nötig waren. Durch Scannen einer  $0,1 \mu\text{g/mL}$  Lösung des isolierten Standards war lediglich die Masse des AOH-3-Sulfats zu sehen, wodurch zunächst vermutet wurde, dass neben AOH-3-Sulfat eventuell AOH-9-Sulfat gebildet wurde, da diese nicht anhand ihrer Masse unterschieden werden können. Eine LC-MS/MS Messung des gleichen Standards in einer höheren Konzentration widerlegte diese Theorie jedoch, da neben AOH-3-S nun ebenfalls AOH detektiert werden konnte. Somit wurde gezeigt, dass AOH-3-S zwar dominierend vorlag, jedoch in der Standardlösung noch Reste des AOH enthalten waren. Da diese Kontamination in den verwendeten geringen Konzentrationsbereichen kaum einen Einfluss auf die Ergebnisse folgender Versuche haben sollte, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet und die Methodvalidierungen von AOH-3-S und AOH sicherheitshalber getrennt voneinander durchgeführt, um falsche Ergebnisse zu vermeiden.

Zur weiteren Charakterisierung wurden beide Analyten zusätzlich mittels UV-Spektrometrie weiter analysiert. Zu beachten ist auch hier, dass im AOH-3-S Sulfat geringe Mengen an AOH enthalten waren. Da diese Verunreinigung in der verwendeten Konzentration jedoch zu gering gewesen sein sollte, um eine Extinktion hervorzurufen, sollte das Ergebnis dadurch nicht verfälscht worden sein. Die durch einen am Photometer durchgeführten Fullscan bestimmten Absorptionsmaxima entsprachen mit  $251 \text{ nm}$  (AOH-3-S) bzw.  $253 \text{ nm}$  (AME-3-S) in etwa dem für AOH und AME ermittelten Maximum (je  $256 \text{ nm}$ ). Dies erklärt sich mitunter damit, dass die Sulfatgruppe aufgrund des fehlenden chromophoren Systems keinen Einfluss auf die UV-Aktivität des Toxins haben sollte, was sich ebenfalls bei den bestimmten Extinktionskoeffizienten bemerkbar machte. Diese lagen für beide Sulfatverbindungen in einem ähnlichen Bereich wie die ihrer Ursprungstoxine.



## 3.2 Enzymatische Synthese der modifizierten *Alternaria* Toxine AOH-3-Glucosid, AOH-9-Glucosid und AME-3-Glucosid

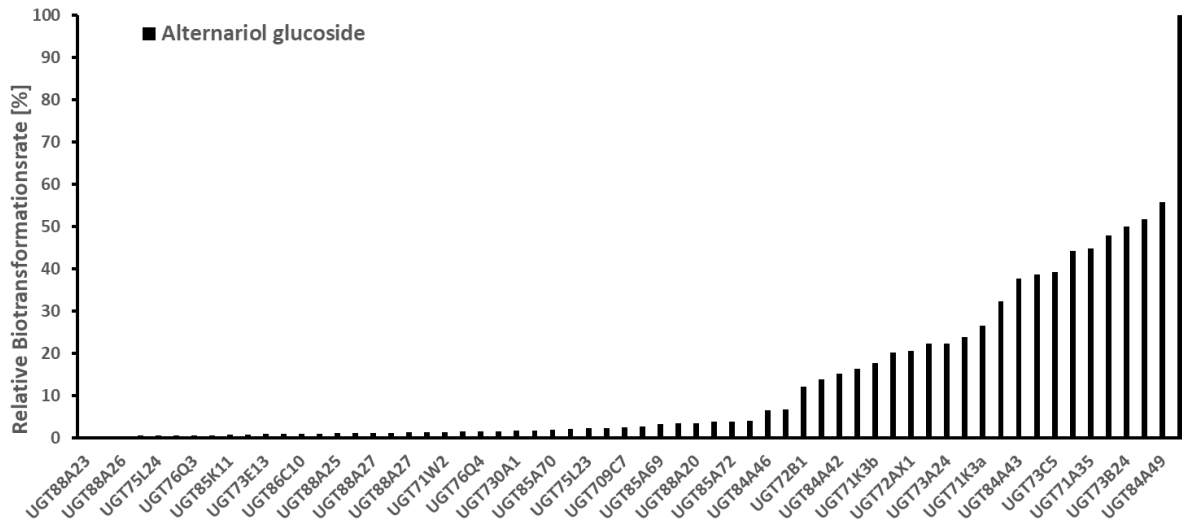
Die im folgenden Kapitel beschriebene enzymatische Synthese der modifizierten *Alternaria* Toxine AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G wurde bereits z.T. von Scheibenzuber et al. (2020) veröffentlicht. Das Enzymscreening sowie die Ausführung der Biotransformation wurden in Kooperation mit Isabelle Effenberger, Thomas Hoffmann und Wilfried Schwab an der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe (TU München) durchgeführt.

### 3.2.1 Wahl der Ausgangsmaterialien

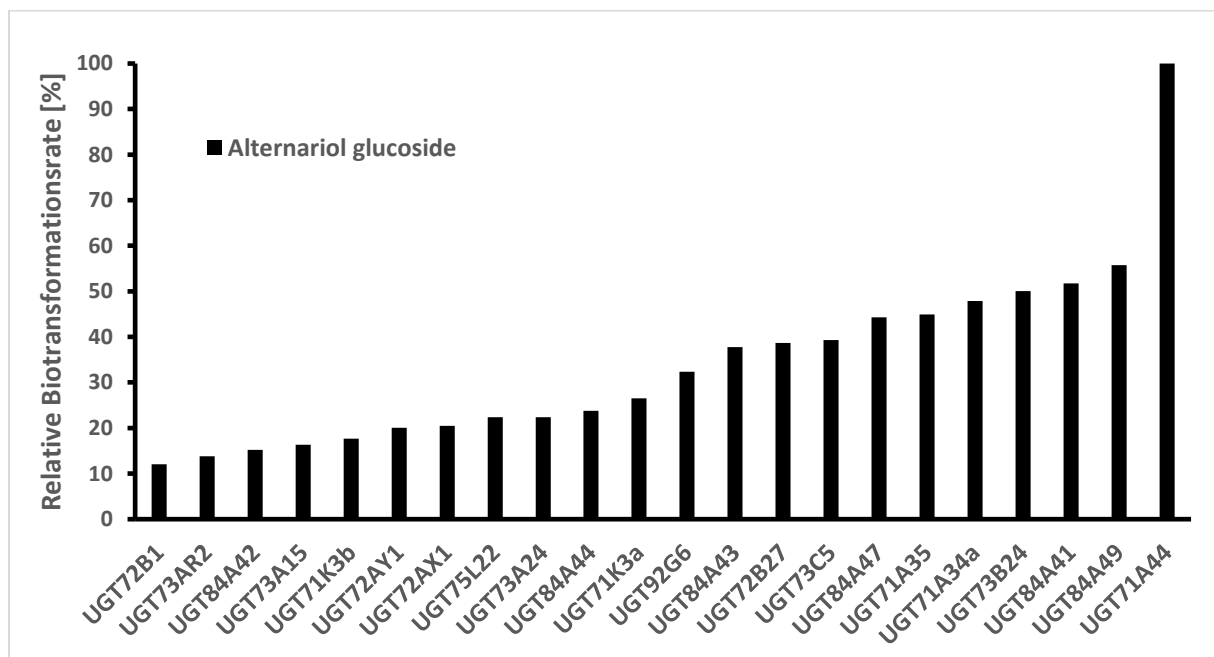
Für die enzymatische Synthese wurden zwei verschiedene Ausgangsmaterialien gewählt: zum einen wurde aus wirtschaftlichen Gründen ein Pilzextrakt aus einer parallellaufenden Studie verwendet, der nachweislich viel AOH und AME enthielt, zum anderen wurden AOH und AME als Reinstoffe eingesetzt. Letzteres ermöglichte es aufgrund der bekannten Konzentration beider Analyten die exakten Biotransformationsraten der Umsetzung zu bestimmen, wohingegen der Pilzextrakt die Gewinnung größerer Mengen erlaubte.

### 3.2.2 Enzymscreening

Um eine geeignete Glycosyltransferase für die enzymatische Synthese von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G zu identifizieren, wurden *E. coli* Waksman Bakterien mit 61 verschiedenen UDP-Glycosyltransferasen (UGT)-Genen zunächst auf ihre Glykosylierungsstärke der Umsetzung von AOH zu AOH-Glucosid getestet. Die verwendeten UGT's stammten aus Trauben (*Vitis vinifera*), Himbeeren (*Rubus idaeus*), Tabak (*Nicotiana benthamiana*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Erdbeeren (*Fragaria* spp.), Tee (*Camelia sinensis*), Hefe (*Starmerella bombicola*), Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*) und Pfefferminze (*Mentha x piperita*). Das Enzymscreening wurde in einem Mikro-Ansatz in 5 mL Kulturen des entsprechenden *E. coli* W:pGEX-4T1:UGT Klons unter Verwendung des Pilzextraktes durchgeführt (siehe 6.7.2). Um die beste UGT zu identifizieren, wurde die relative Biotransformationsrate berechnet, wobei AOH-3-G und AOH-9-G als Summe betrachtet wurden (siehe Abbildung 3.6). In diesem Screening war das Enzym UGT71A44 aus Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) am besten für die Glykosylierung von AOH geeignet, wobei insgesamt 22 Enzyme mit einer Biotransformationsrate größer als 10 % in der Lage waren AOH-Glucoside zu bilden (siehe Abbildung 3.6 – 3.7).



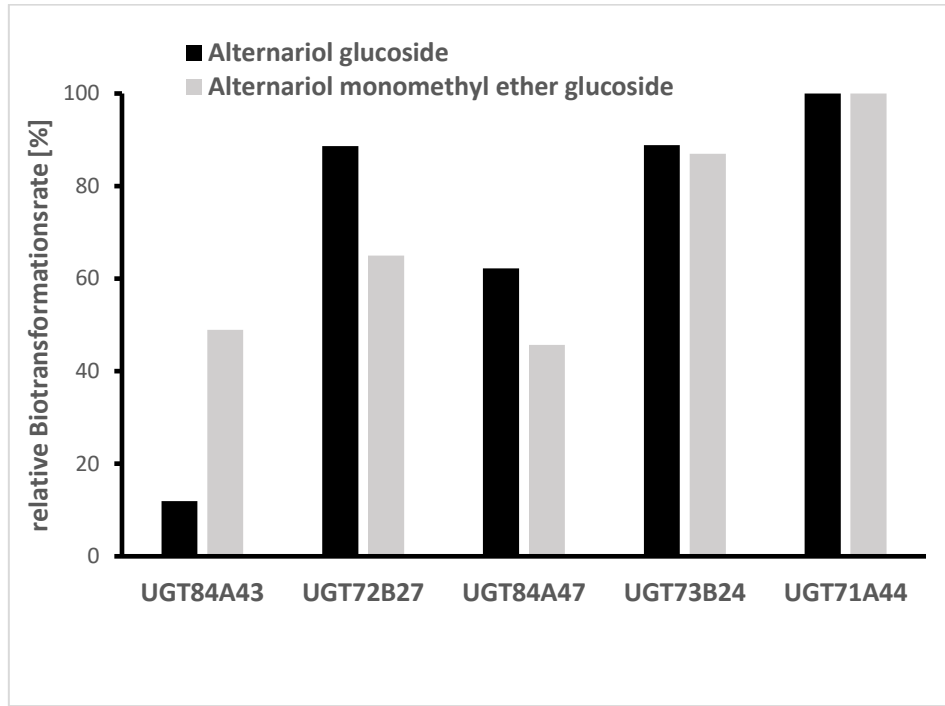
**Abbildung 3.6** Relative Biotransformationsrate der im Enzymscreening der Umsetzung von AOH zu AOH-Glucosid getesteten Enzyme.



**Abbildung 3.7** Enzyme mit einer Umsetzungsrate von AOH zu AOH-Glucosid von mindestens 10 %.

Um zeit- und kostensparend arbeiten zu können, wurde nun nach einer UGT gesucht, die neben den AOH-Glucosiden auch das AME-3-Glucosid bildet. Hierfür wurden in einem erneuten Enzymscreening die fünf UGTs mit der höchsten Biotransformationsrate des AOHs auf ihre Glykosylierungsstärke der Umsetzung von AME zu AME-3-Glucosid getestet. Aufgrund der geringeren Konzentration des AMEs in dem Pilzextrakt, sowie der allgemein schlechteren Löslichkeit von AME, wurde hierfür ein mittelgroßer Ansatz in 50 mL Kulturen

gewählt. Analog dem ersten Screening wurden alle Kulturen nach zwei Tagen am LC-MS auf AME-3-Glucosid getestet, mit dem Ergebnis, dass alle für die Umsetzung von AOH zu AOH-G verwendeten UGTs in der Lage waren AME-3-G zu bilden, jedoch wie in Abbildung 3.8 erkennbar in unterschiedlichen Verhältnissen.



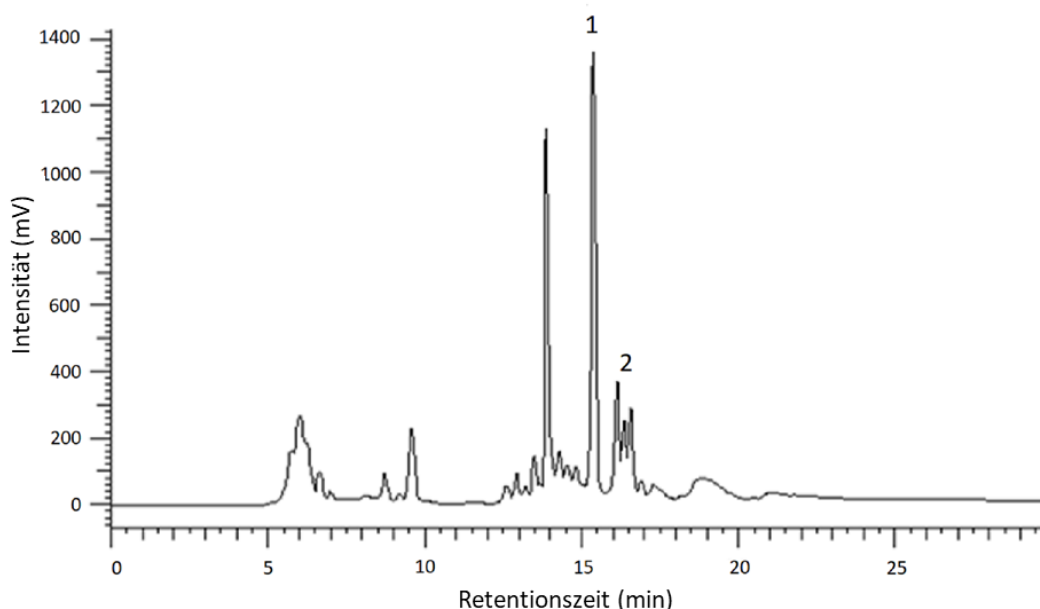
**Abbildung 3.8** Relative Biotransformationsraten der Umsetzung von AME zu AME-3-G und von AOH zu AOH-Glucosiden.

### 3.2.3 Biotransformation in *E. coli* Zellen

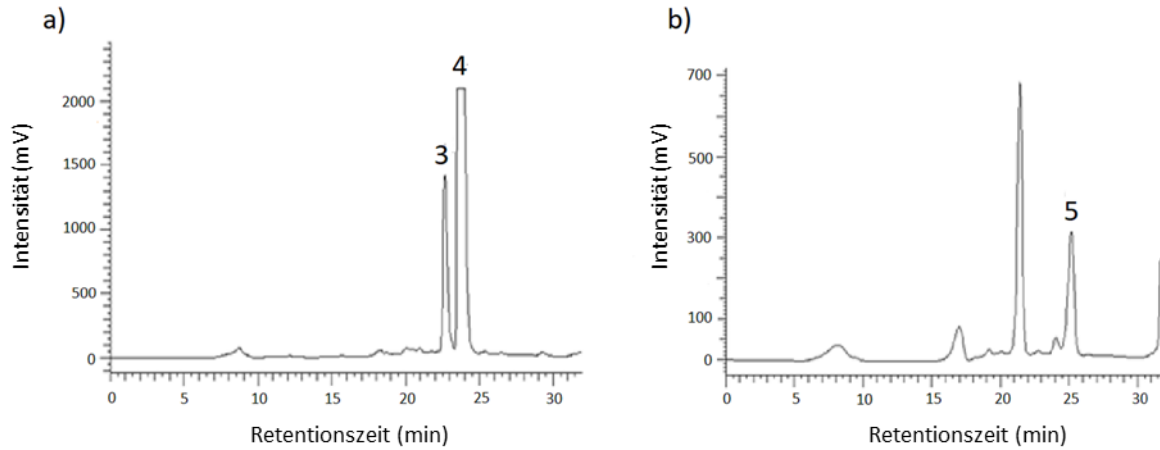
Für den großen Ansatz, aus dem letztendlich die Glucoside isoliert werden sollten, wurde das Enzym UGT71A44 aus Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) verwendet, da dieses im Enzymscreening die höchsten Biotransformationsraten sowohl für AOH als auch für AME ergeben hat. Die Ganzzell-Biotransformation wurde in 100 mL Kulturen durchgeführt, und zwar je einmal mit dem Pilzextrakt, einmal mit 288 µg reinem AOH und einmal mit 160 µg reinem AME. Die enzymatische Glykosylierung mit den reinen Standards und deren separate Aufreinigung sollte am Ende die exakte Bestimmung der Umsetzungsrate ermöglichen. Sobald LC-MS Messungen das Maximum der Umsetzung der Ausgangstoxine zu den respektiven Glucosiden verdeutlichten, wurden die Kulturen sterilfiltriert und für die weitere Isolierung der Toxine verwendet.

### 3.2.4 Isolierung der Glucoside

Das steril gefilterte Medium wurde mit dem Festphasensorbens Purosorb™ PAD600 gemischt und über Nacht auf dem Horizontalschüttler bei 225 rpm inkubiert, um eine höchstmögliche Bindung der Glucoside an das Medium zu ermöglichen (siehe 6.7.4). Die verschiedenen Ansätze wurden während der ganzen Aufreinigung getrennt voneinander behandelt. Aufgrund der vermuteten geringen Stabilität von AOH-9-G in Methanol (Mikula et al. 2013), wurde das Filtrat nach der Elution am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt und der Rückstand in einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (3:2; v/v) aufgenommen. Durch die gelbliche Färbung des erhaltenen Extrakts wurde die Anwesenheit mehrerer Matrixbestandteile vermutet, welches sich durch die Messung an der semipräparativen HPLC-UV bestätigte. Nach Sammeln eines jeden Peaks und dessen Messung am LC-MS/MS, konnten die den Glucosiden zugehörigen Peaks identifiziert und in weiteren Läufen gesammelt werden. Aufgrund überlagernder Matrixpeaks sowie der Co-Elution von AOH-3-G mit AOH-9-G (siehe Abbildung 3.9), erfolgte die Isolierung aller Analyten in zwei Phasen: als erstes wurden mit einem Gradienten aus Acetonitril/Wasser und einer Flussrate von 1 mL/min (Methode 1, siehe 6.5.1.2) die beiden AOH-Glucoside von AME-3-G getrennt, danach erfolgte – wie in Abbildung 3.10 dargestellt – eine Trennung von AOH-3-G und AOH-9-G, sowie die Aufreinigung von AME-3-G mit den Fließmitteln Methanol/Wasser und einer Flussrate von 0,8 mL/min (Methode 2, siehe 6.5.1.2).

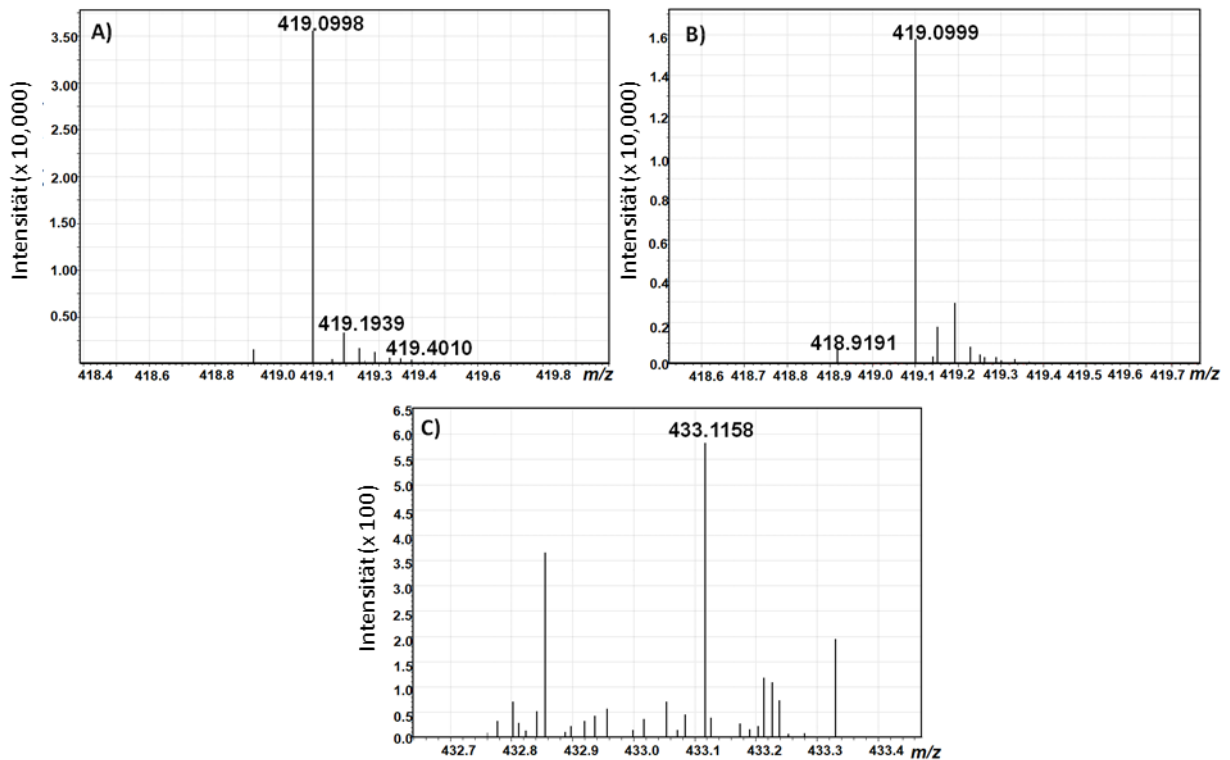


**Abbildung 3.9** Trennung der AOH-Glucoside (1) von AME-3-G (2) und verbliebenen Matrixbestandteilen (Methode 1).

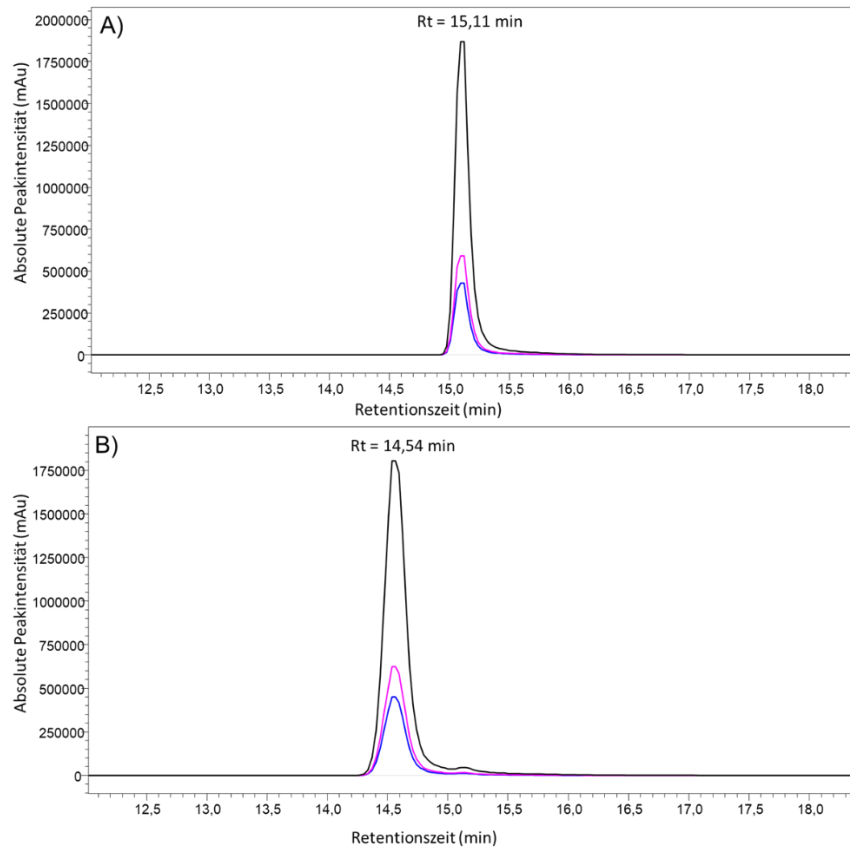


**Abbildung 3.10** Semipräparative Trennung von AOH-3-G (3) und AOH-9-G (4) sowie weitere Aufreinigung von AME-3-S (5) (Methode 2).

Zur Bestätigung der Identität der gesammelten Analyten wurden diese am LC-Q-TOF-MS gescannt (siehe 6.5.4) und am LC-MS/MS gemessen (siehe 6.5.3), da die AOH-Glucoside zwar nicht anhand ihrer Masse unterscheidbar sind, jedoch bei der verwendeten LC-MS/MS Methode andere Retentionszeiten besitzen. Die Resultate hiervon sind in den Abbildungen 3.11 und 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.11** Ergebnisse der Q-TOF Scans für AOH-3-G (A), AOH-9-G (B) und AME-3-G (C).



**Abbildung 3.12** Chromatographische Trennung und eindeutige Identifizierung von AOH-3-G (A) und AOH-9-G (B) mittels LC-MS/MS.

Die Massengenauigkeit des LC-Q-TOF-MS lag für beide AOH Glucoside bei unter 4 ppm, wohingegen bei AME-3-G eine Massengenauigkeit von unter 5 ppm erreicht wurde, wodurch die Identität dieser Analyten bestätigt wurde. Ebenso konnten AOH-9-G und AOH-3-G anhand ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten durch einen Abgleich mit Referenzstandards eindeutig zugeordnet werden.

Im Massenscan von AME-3-G konnten neben dem gewünschten Analyten noch weitere Störmassen detektiert werden. Da diese aber keinen *Alternaria* Toxinen zugeordnet werden konnten und es sich somit höchstwahrscheinlich um Matrixverunreinigungen handelte, wurde zur Vermeidung weiterer Verluste auf eine erneute Aufreinigung verzichtet.

### 3.2.5 Quantifizierung mittels qNMR und HPLC

Die gewonnenen Toxine aus der Pilzumsetzung sowie aus den Umsetzungen der reinen Analyten wurden an der HPLC-UV mit einer externen 3-Punkt Kalibrierung quantifiziert (siehe 6.7.6). Hierfür wurden Referenzstandards verwendet, welche von Hannes Puntcher, (Universität Wien) zur Verfügung gestellt wurden. Da AOH-3-G und AOH-9-G aus der Pilzumsetzung in ausreichenden Mengen für ein  $^1\text{H-NMR}$  und somit für ein quantitatives NMR

(qNMR) gewonnen werden konnten, wurde diese Quantifizierungsmethode als Absicherung ebenfalls durchgeführt.

### 3.2.5.1 HPLC-UV

Die Quantifizierung erfolgte an der HPLC-UV analog der Methode aus 6.5.2.3 mit drei externen Kalibrierstandards von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G der Konzentration 1 µg/mL, 5 µg/mL und 10 µg/mL. Folglich wurden die zu quantifizierenden Toxine so weit verdünnt, bis diese im Kalibrierbereich lagen, und der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt.

Die bei der Umsetzung der Reinstoffe AOH und AME entstandenen Glucoside wurden an der HPLC-UV quantifiziert und somit die Biotransformationsrate bestimmt. Auch das aus dem Pilzextrakt isolierte AME-3-G wurde mit dieser Methode quantifiziert, da für eine qNMR-Messung noch zu viele Matrixverunreinigungen enthalten waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3** Erhaltene Analytmengen sowie Biotransformationsraten der enzymatischen Synthese. Berechnung der Biotransformationsrate: Erhaltene Menge/Eingesetzte Menge · 100.

Ansatz	Analyt	Eingesetzte Menge AOH bzw. AME	Erhaltene Menge	Biotransformationsrate
Reine	AOH-3-G	288 µg	160 µg	58 %
Standards	AOH-9-G	288 µg	15 µg	5 %
	AME-3-G	150 µg	36 µg	24 %
Pilzextrakt	AME-3-G	-	11,6 µg	-

### 3.2.5.2 qNMR

Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren von AOH-3-G und AOH-9-G aus dem Pilzextrakt (siehe Abbildung 3.13 und 3.14, sowie Anhang 1) zeigten nur geringe Verunreinigungen, welche bei der Quantifizierung jedoch nicht störten. Die Signale konnten anhand von Literaturdaten zugeordnet (Soukup et al. 2016; Mikula et al. 2013) und die Konzentration durch Messung von L-Tyrosin als externen Standard für jedes Signal mit einem Signal/Rausch-Verhältnis größer als 50 berechnet werden (siehe Tabelle 3.4).

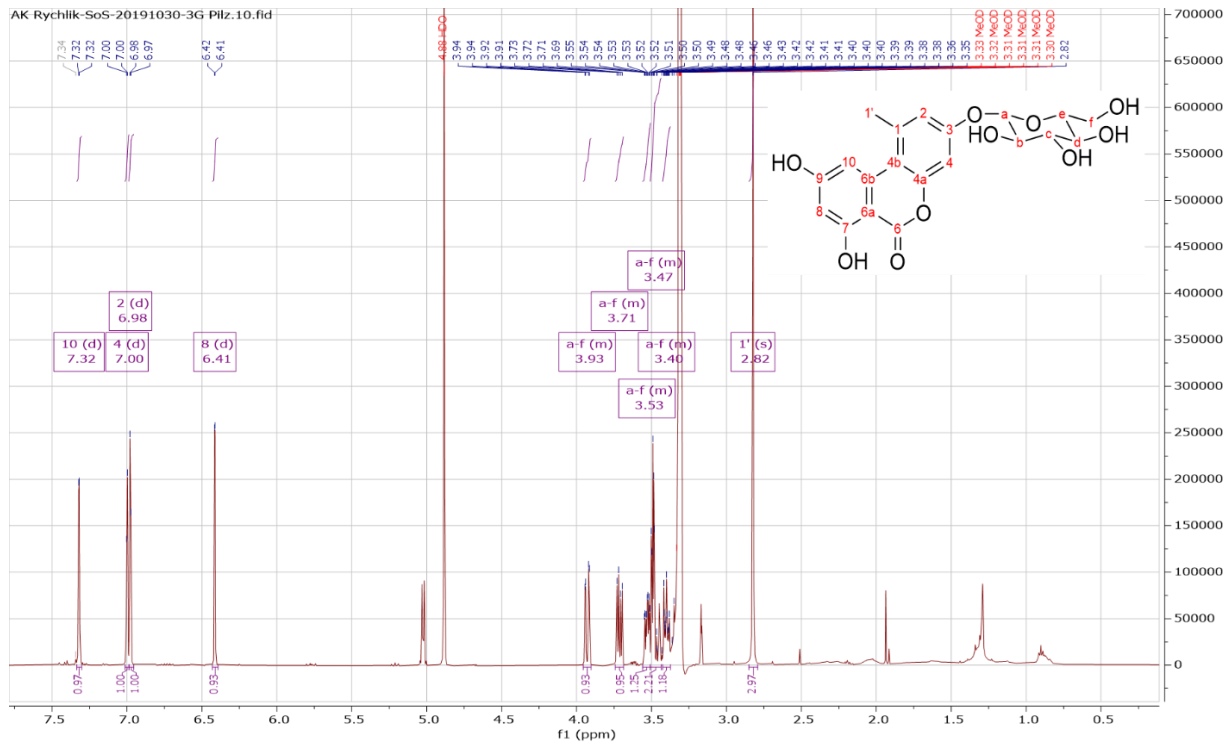


Abbildung 3.13  $^1\text{H-NMR}$  des isolierten AOH-3-Glucosids aus dem Pilzextrakt.

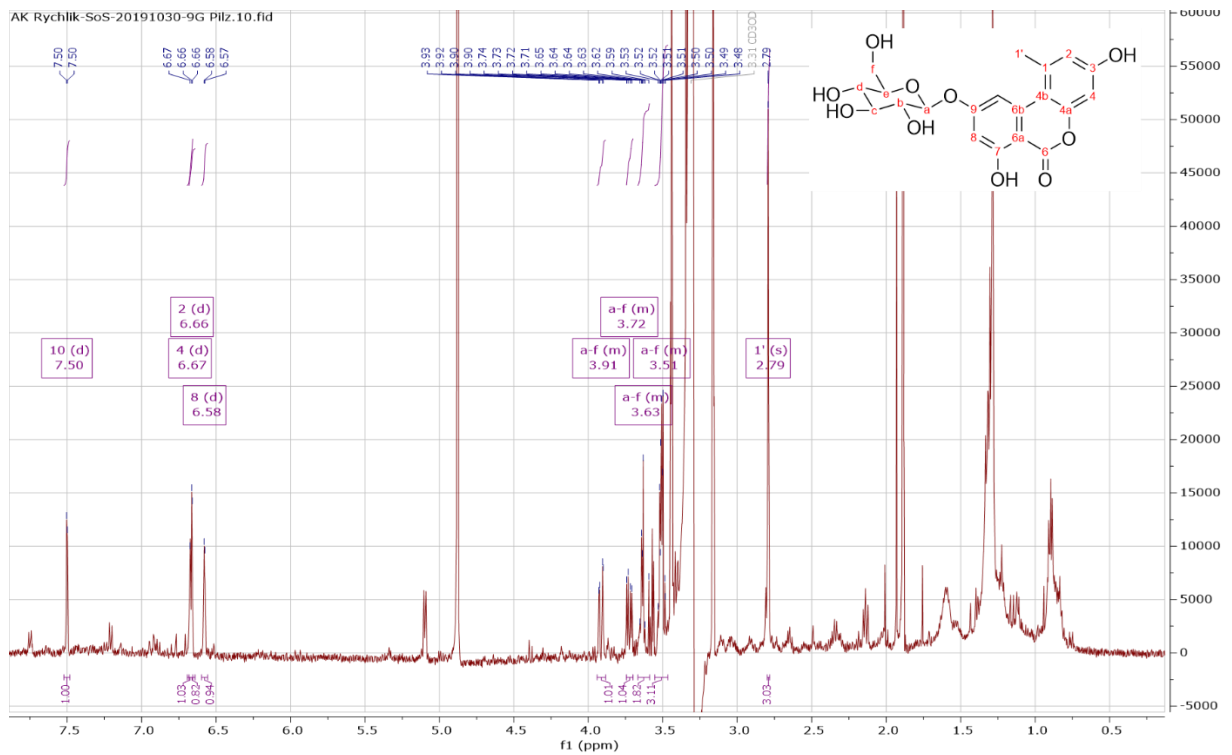


Abbildung 3.14  $^1\text{H-NMR}$  des isolierten AOH-9-Glucosids aus dem Pilzextrakt.



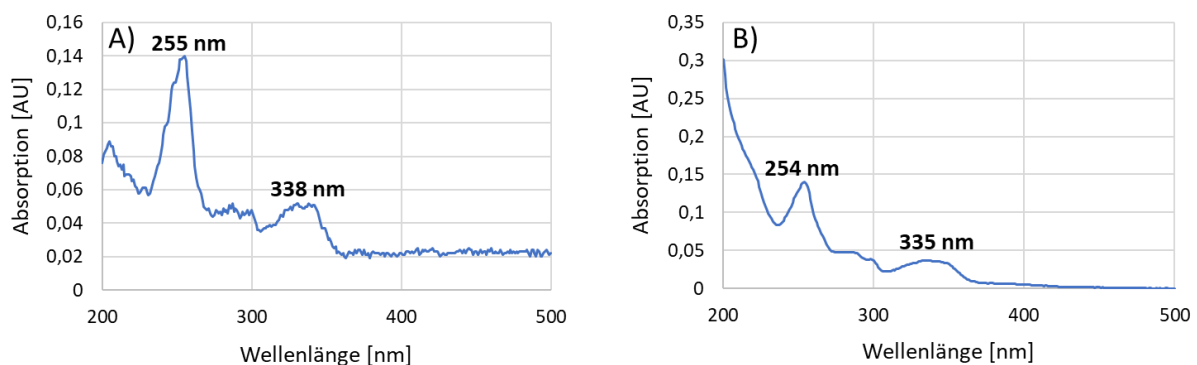
**Tabelle 3.4** Tabellarische Auflistung der quantitativen  $^1\text{H-NMR}$  Messungen von AOH-3-S und AME-3-S. s = Singulett, d = Doublett, m = Multiplett.

Analyt	$\delta$ ppm	Integral	Multiplizität	J (Hz)	qNMR (mmol/600 $\mu\text{L}$ )
AOH-3-G	7,32	1H	d	2,1	-
	7,00	1H	d	2,7	0,924
	6,98	1H	d	2,7	0,917
	6,41	1H	d	2,1	-
	3,95 – 3,90	1H	m	-	0,919
	3,74 – 3,67	1H	m	-	-
	3,55 – 3,51	1H	m	-	-
	3,50 – 3,47	2H	m	-	-
	3,42 – 3,37	1H	m	-	-
	2,82	3H	s	-	-
AOH-9-G	7,50	1H	d	2,2	0,070
	6,67	1H	d	2,7	0,068
	6,66	1H	d	2,7	-
	6,58	1H	d	2,2	0,065
	3,94 – 3,88	1H	m	-	0,066
	3,74 – 3,70	1H	m	-	-
	3,67 – 3,59	2H	m	-	-
	3,55 – 3,47	3H	m	-	-
	2,79	3H	s	-	-

Nach Umrechnung der in mmol/600  $\mu\text{L}$  angegebenen Konzentrationen ergaben sich aus dem Pilzextrakt 231,1  $\mu\text{g}$  AOH-3-G und 17,8  $\mu\text{g}$  AOH-9-G.

### 3.2.6 Spektroskopische Charakterisierung von AOH-3-G und AOH-9-G

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der isolierten AOH-Glucoside wurden an einem UV/Vis-Spektrometer Vollscans im Wellenlängenbereich 200 nm bis 500 nm durchgeführt; die verwendete Konzentration jedes Toxins betrug hierfür 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die erhaltenen Spektren von AOH-3-G und AOH-9-G sind in Abbildung 3.15 dargestellt.



**Abbildung 3.15** UV-Spektren von (A) AOH-3-G und (B) AOH-9-G (je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; in ACN).

Im Anschluss wurden die molaren Extinktionskoeffizienten für beide Analyten am Absorptionsmaximum bei 255 nm (AOH-3-G) bzw. 254 nm (AOH-9-G) bestimmt (siehe Tabelle 3.5).

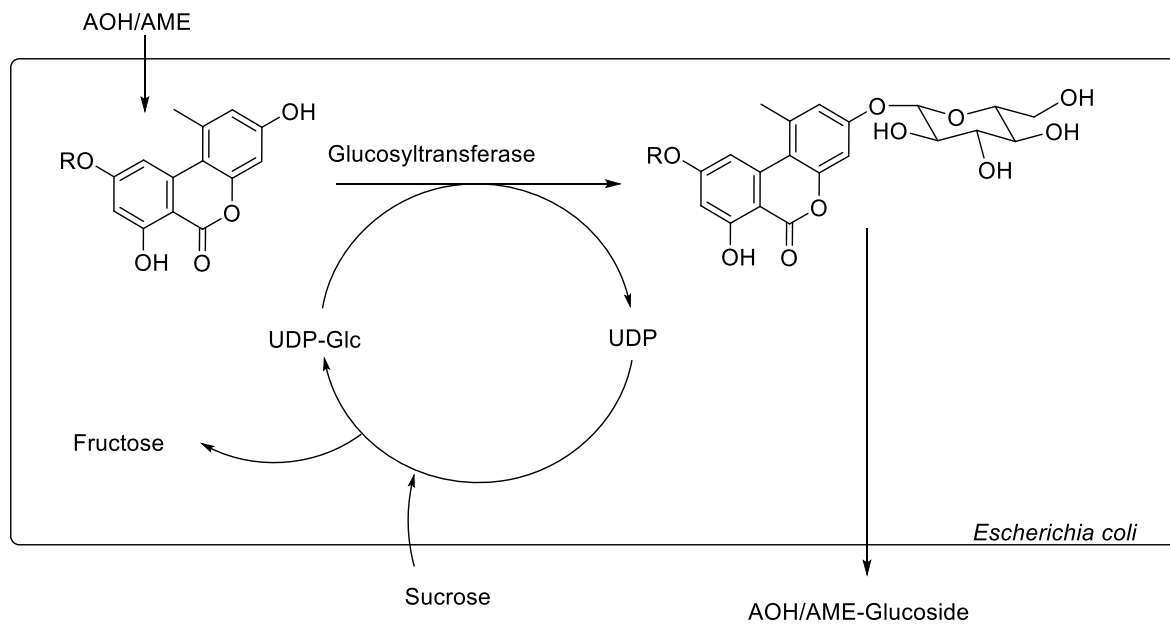
**Tabelle 3.5** Extinktionskoeffizienten AOH-3-G und AOH-9-G (gemessen in ACN).

Analyt	$\log_{\epsilon}$ in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\epsilon$ in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
AOH-3-G	$4,6778 \pm 0,0045$	$47632 \pm 497$
AOH-9-G	$4,7394 \pm 0,0051$	$54881 \pm 649$

Aufgrund der Matrixverunreinigung des Analyten AME-3-G wäre hier eine spektroskopische Charakterisierung sehr ungenau gewesen, da die Kontaminationen zur Extinktion beitragen könnten. Aus der Charakterisierung der AOH-Glucoside könnte jedoch übertragen werden, dass die Absorptionsmaxima des AME-3-Glucosids mit denen des Ausgangstoxins AME höchstwahrscheinlich übereinstimmen und auch der Extinktionskoeffizient voraussichtlich nicht stark abweichen wird.

### 3.2.7 Diskussion: Enzymatische Synthese der modifizierten *Alternaria* Toxine AOH-3-Glucosid, AOH-9-Glucosid und AME-3-Glucosid

Das Prinzip der hier beschriebenen Biotransformation ist schematisch in Abbildung 3.16 dargestellt. Das Ausgangssubstrat geht aus dem Medium in die Wirtszelle über und wird durch die verwendete Glucosyltransferase unter Abspaltung von UDP glykosyliert, woraufhin das entstandene Produkt wieder ins Kulturmedium abgegeben wird. Die dem Kulturmedium zugesetzte Saccharose ermöglichte eine Wiederverwertung von UDP ohne weitere Zugabe des Enzyms Sucrase, indem das Disaccharid unter Abspaltung von Fructose mit UDP reagiert und somit erneut UDP-Glukose bildet. Somit steht dem System eine konstante Menge UDP-Glukose zur Verfügung, wodurch gleichzeitig aus Gründen der Wirtschaftlichkeit der Verbrauch an eingesetzter UDP-Glukose reduziert werden kann (Härtl et al. 2017).



**Abbildung 3.16** Schematische Darstellung der Ganzzell-Biotransformation in *Escherichia coli*. R = H: AOH/ AOH-3-G, R = CH<sub>3</sub>: AME/ AME-3-G.

Das Enzymscreening mit 61 verschiedenen Glycosyltransferasen zeigte eine generell hohe Aktivität dieser Enzymklasse gegenüber AOH, wodurch fast alle getesteten Enzyme in der Lage waren, AOH zu glykosylieren. Die fünf Enzyme mit der höchsten Umsetzung wurden im Anschluss ebenfalls auf ihre Aktivität gegenüber AME getestet, da es aus wirtschaftlichen Gründen vorteilhaft erschien alle drei Metaboliten aus einer einzigen Biotransformation gewinnen zu können. In allen Vorversuchen zeigte das Enzym UGT71A44 aus Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) die höchste Aktivität gegenüber AOH und auch AME, sodass diese Glycosyltransferase für die eigentliche Biotransformation verwendet wurde. Zu beachten ist jedoch, dass AME nur mit den fünf besten Enzymen der Glykosylierung von AOH umgesetzt wurde, sodass hier nicht auszuschließen ist, dass die Umsatzrate von AME zu AME-3-Glucosid bei einem anderen Enzym höher sein könnte. Zur Zeitersparnis wurde hier jedoch auf weitere Tests verzichtet, da durch den Einsatz eines einzigen Enzym alle gewünschten Analyten synthetisiert werden konnten.

Für die Isolierung der Analyten wurde nach Vorreinigung mit Hilfe eines Festphasensorbens eine semipräparative C18 Säule verwendet. Aufgrund der ähnlichen Polarität von AOH-3-G und AOH-9-G und der noch vorhandenen Matrixbelastung, waren zwei Läufe für die Trennung von diesen beiden Toxinen möglich, wohingegen das AME-3-G bereits im ersten Lauf gesammelt werden konnte. Da durch die Messung mit Methode 2 hier jedoch noch ein weiterer Matrixpeak abtrennbar war, wurde auch dieser Analyt mit beiden Methoden aufgereinigt.

Durch Verwendung eines Injektionsvolumens von 50  $\mu\text{L}$  statt 100  $\mu\text{L}$  konnte eine Säulenüberladung vermieden werden und speziell in Methode 2 war dadurch auch eine bessere Trennung von AOH-9-G und AOH-3-G zu beobachten. Die Trennbarkeit dieser beiden Toxine hing zudem stark von der Umgebungstemperatur ab, sodass die Verwendung eines Säulenofens für eine reproduzierbare Trennleistung zu empfehlen wäre. Da dieser an dem verwendeten Gerät nicht verfügbar war, veränderten sich die Retentionszeiten von Tag zu Tag minimal, wobei die Trennung beider Peaks immer gegeben war und die gesammelten Fraktionen regelmäßig via LC-MS/MS überprüft wurden.

Durch die getrennte Biotransformation eines Pilzextraktes und den Reinsubstanzen AOH bzw. AME war es einerseits möglich kostengünstig größere Mengen der Glucoside zu produzieren, wohingegen andererseits die Umsetzungsrate von AOH und AME zu den entsprechenden Glucosiden berechnet werden konnte. Bei dem hier verwendeten Enzym konnte somit mit einer Umsatzrate von 58 % AOH-3-G gebildet werden, jedoch lediglich 5 % AOH-9-G. Diese Favorisierung eines Glucosids ist höchstwahrscheinlich von Enzym zu Enzym unterschiedlich und sollte bei zukünftigen Tests im vorausgehenden Enzymscreening berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde im Screening lediglich die Summe beider Glucoside zur Abschätzung der Transformationsrate verwendet, sodass das Verhältnis beider Glucoside zueinander für die Wahl des Enzymes nicht berücksichtigt wurde. Generell betrachtet waren die Umsatzraten für alle drei Glucoside jedoch akzeptabel, insbesondere im Vergleich zur chemischen Totalsynthese (Mikula et al. 2013), welche neben einem hohen Chemikalieneinsatz und einer langen Versuchsdauer ebenfalls geringere Ausbeuten erzielen konnte. Dies verdeutlicht die gute Anwendbarkeit der *in vivo* Biotransformation in *E. coli* Zellen im Vergleich zu einer rein chemischen Synthese.

Die Quantifizierung der drei isolierten modifizierten Toxine erfolgte für alle drei Analyten über eine quantitative HPLC-Messung unter Verwendung von Referenzstandards als externe Kalibrierpunkte, wobei die beiden AOH-Glucoside zusätzlich über ein qNMR bestimmt wurden. Da im isolierten AME-3-Glucosid noch zu viel Matrix vorhanden war, wäre eine qNMR-Messung in diesem Fall nicht sinnvoll gewesen, sodass dieser Analyt ausschließlich über eine HPLC-Messung quantifiziert wurde. Der Vergleich der Ergebnisse des qNMRs und der HPLC-Daten zeigte jedoch nahezu identische Konzentrationen auf, sodass der Wert für AME-3-G als verlässlich eingestuft und zur Vermeidung von weiteren Analytverlusten auf eine erneute Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC verzichtet wurde.

Zur weiteren Charakterisierung wurden für AOH-3-G und AOH-9-G UV-Spektren zur Bestimmung der Absorptionsmaxima aufgenommen und im Anschluss die Extinktionskoeffizienten ermittelt. Die erhaltenen Absorptionsmaxima lagen bei 254 nm

(AOH-9-G) bzw. 255 nm (AOH-3-G) und waren somit fast identisch zu dem Absorptionsmaximum von AOH (256 nm). Das gleiche Resultat konnte bei den Extinktionskoeffizienten erzielt werden, da auch die hier bestimmten  $\epsilon$  Werte nahe an dem für AOH bestimmten Wert lagen, wobei AOH nicht in ACN, sondern in MeOH bestimmt wurde. Da der strukturelle Unterschied zwischen AOH und AOH-3-G bzw AOH-9-G lediglich eine Glucosidgruppe an Position 3 oder 9 ist, waren diese Ergebnisse zu erwarten, da Glucose nicht UV-aktiv ist und somit nicht zur Absorption beitragen sollte. Aufgrund einer möglichen Verfälschung durch Matrixkomponenten wurde auf eine spektroskopische Charakterisierung von AME-3-G verzichtet, jedoch ist davon auszugehen, dass die Absorptionsmaxima sowie der Extinktionskoeffizient ebenfalls sehr ähnlich zu den für AME ermittelten Daten sein wird.

### 3.3 Referenzverbindungen und isotoopenmarkierte Standards

#### 3.3.1 Reinheit der Referenzstandards und isotoopenmarkierten Verbindungen

Die Toxine AOH, AME, ATX I, ATX II, ALTP und das von Gotthardt et al. (2020) neu entdeckte APML wurden Anfang 2019 im Rahmen einer anderen Arbeit aus mit *A. alternata* inokuliertem Reis extrahiert, mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und anhand von qNMR-Messungen quantifiziert. Die NMR-Spektren zeigten außer den Analytsignalen keine weiteren Verunreinigungen, jedoch wurde nun in LC-MS/MS Messungen eine geringfügige Kontamination der Analyten AME, ATX I und ALTP mit AOH gefunden, was bei der Methodvalidierung berücksichtigt wurde, um korrekte Ergebnisse zu erhalten.

Die Konzentration und Reinheit der Toxine ALT, TeA und TEN wurde nun für diese Arbeit ebenfalls mit qNMR-Messungen und L-Tyrosin als externem Standard bestimmt (siehe 6.5.5). Hierfür wurden 100 µg TEN in einer vom Hersteller angegebenen Reinheit von  $\leq 99$  % käuflich erworben, wohingegen die restlichen Toxine bereits in ausreichender Menge am Lehrstuhl vorhanden waren. Bei diesen Toxinen zeigten die NMR-Spektren keine Verunreinigungen auf und auch in LC-MS/MS Messungen konnten ebenfalls keine Kontaminationen mit anderen Toxinen erkannt werden, sodass diese Analyten als rein betrachtet werden können.

Die isotoopenmarkierten Standards [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH, [ $^2\text{H}_4$ ] - AME sowie [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ ] - TeA wurden vor einigen Jahren am Lehrstuhl synthetisiert und seitdem bei  $-18$  °C gelagert (Asam et al. 2011b; Asam et al. 2011a; Asam et al. 2009). Eine Messung am LC-MS/MS zeigte keine Verunreinigung mit dem unmarkierten Analogon oder mit anderen Toxinen, sodass diese Standards ebenfalls als rein betrachtet werden können. Auf eine erneute Konzentrationsbestimmung wurde aufgrund der bekannten Stabilität dieser drei Toxine (Asam et al. 2009; Combina et al. 1998) verzichtet.

#### 3.3.2 Qualitätssicherung der Konzentrationen vorhandener Standards

Die Toxine AOH, AME, TEN, ATX I, ATX II, ALTP, APML sowie AOH-3-G wurden in einer Konzentration von 5 µg/mL bei  $+6$  °C und  $-18$  °C in MeOH (AOH und AME) bzw. ACN (TEN, ATX I, ATX II, ALTP, APML, AOH-3-G) gelagert und die Stabilität über ein Jahr lang verfolgt.

Hierfür wurde in regelmäßigen Abständen ein Aliquot der Standards entnommen, in einer Doppelbestimmung und Dreifachmessung photometrisch quantifiziert und anhand von HPLC-Messungen auf Abbauprodukte untersucht. Für die Bestimmung mittels UV/Vis-Spektrometer wurden in vorherigen Arbeiten am Lehrstuhls die Absorptionsmaxima sowie die Extinktionskoeffizienten der Toxine AOH, ALTP, ATX I, ATX II und APML bestimmt, ebenso erfolgte bereits die Gewinnung dieser Daten für AOH-3-G und AOH-3-S bzw. AME-3-S wie in

Kapiteln 3.1 und 3.2 beschrieben. Für die noch nicht am Lehrstuhl charakterisierten Toxine TEN und AME wurden durch einen Scan im Bereich 200 bis 500 nm die Absorptionsmaxima ermittelt und der Extinktionskoeffizient anhand der Messung drei verschiedener Konzentrationen in Triplikaten und Dreifachmessung bestimmt (siehe 6.6.4). Die nun vollständig vorliegenden photometrischen Daten zur Quantifizierung der einzelnen Toxine sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

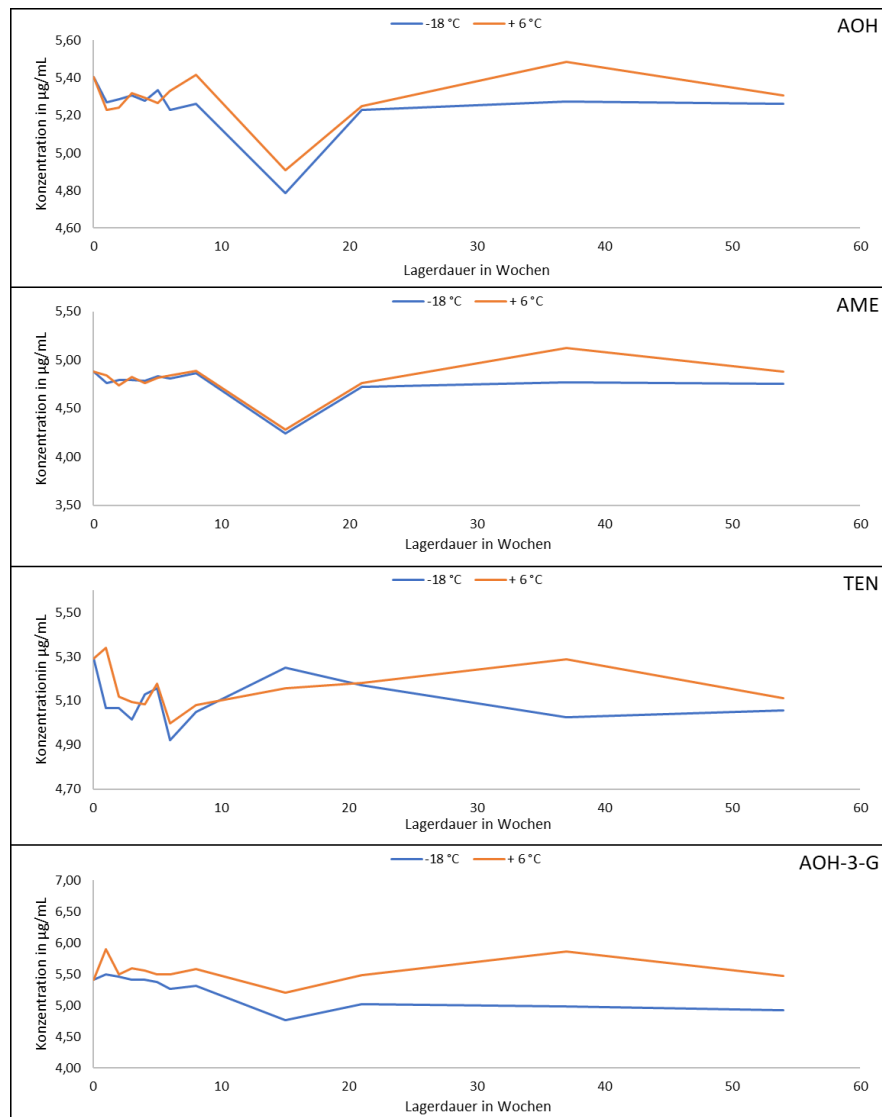
**Tabelle 3.6** Überblick über die für Stabilitätstests verwendeten Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten. Alle Daten wurden am Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie generiert.

Toxin	Lösungsmittel	Absorptionsmaxima	Extinktionskoeffizient [L/(mol*cm)]
AOH	MeOH	256 nm	46559
AME	MeOH	256 nm	45781
ATX I	ACN	257 nm	31989
ATX II	ACN	259 nm	31117
APML	ACN	258 nm	19815
ALTP	ACN	255 nm	29854
TEN	ACN	279 nm	19338
AOH-3-G	ACN	255 nm	47635

Die Messungen am Photometer erfolgten im Zeitraum vom 13.01.2020 bis zum 13.01.2021 und wurden zunächst wöchentlich, dann in immer größeren Abständen wiederholt. Ebenso erfolgte taggleich eine qualitative Bestimmung an der HPLC, um potenziell entstandene Abbauprodukte zu detektieren, da diese nicht zwangsweise an der Extinktion erkennbar sind. Zusätzlich wurde mit jeder HPLC-Messung eine Koffein-Lösung (5 µg/mL) als stabile Referenz mitanalysiert, um als zweites Stabilitätskriterium das Flächenverhältnis Analyt/Koffein beobachten zu können. Für die HPLC-Bestimmungen wurde der Analyt aus den Küvetten der photometrischen Bestimmung in ein HPLC-Vial überführt und auf einer Hyperclone ODS C18 Säule mit einem ACN/Wasser Gradienten und einem Fluss von 0.4 mL/min gemessen (siehe 6.5.2.2).

Die im Laufe der so durchgeführten Stabilitätstests erhaltenen photometrischen Ergebnisse für die Dibenzo- $\alpha$ -pyrone AOH und AME, sowie das Toxin TEN und die modifizierte Form AOH-3-G, sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

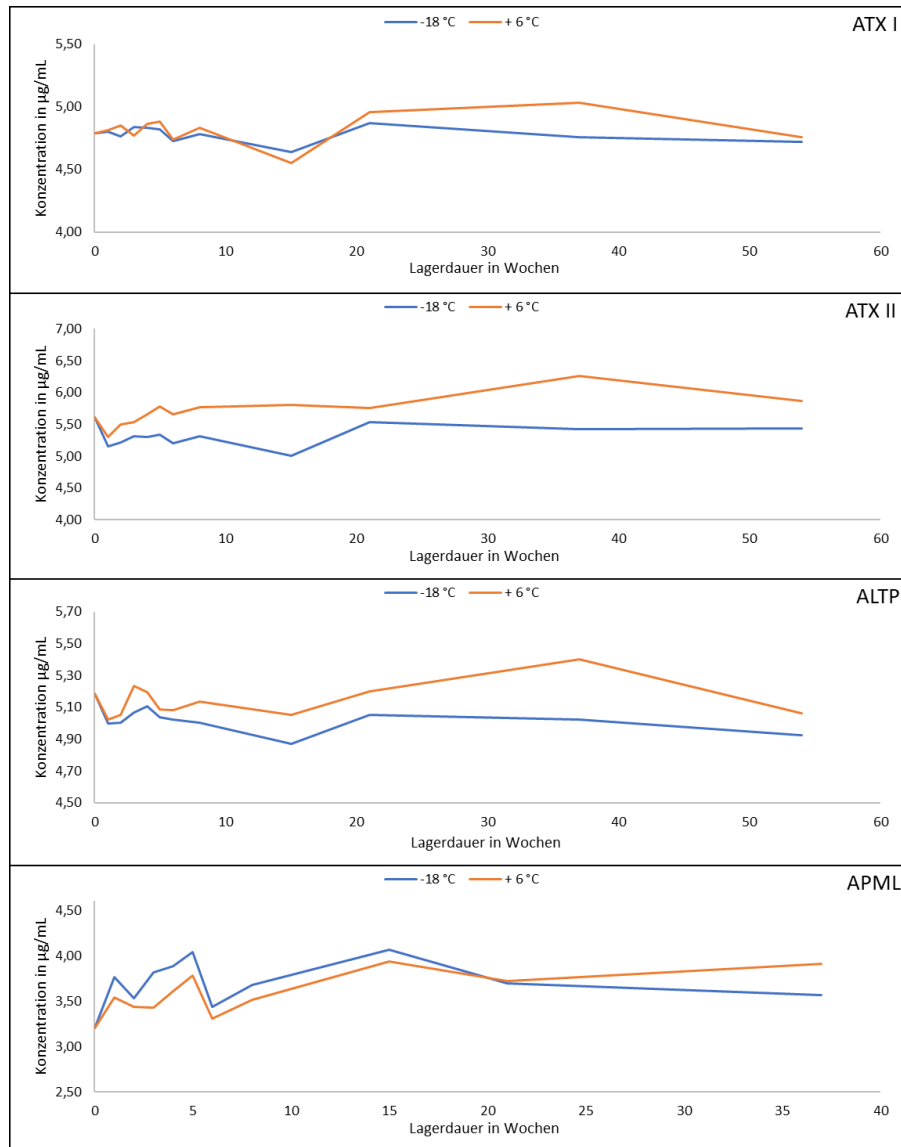
Die Toxine AOH, AME, AOH-3-G und TEN zeigten keine großen Konzentrationsunterschiede zwischen der Lagerung bei  $-18\text{ °C}$  und  $+6\text{ °C}$ . Ebenso stimmte die Anfangskonzentration in allen Fällen mit der Konzentration nach 12 Monaten gut überein, sodass die Stabilität dieser vier Toxine als gegeben betrachtet werden kann. Der beobachtete Konzentrationseinbruch bei Woche 15 der Toxine AOH, AME und AOH-3-G konnte im Nachhinein auf zwei defekte Messpositionen des Photometers zurückgeführt werden, alle weiteren Konzentrationsschwankungen lagen im Rahmen der normalen Standardabweichung.



**Abbildung 3.17** Grafische Auswertung der Ergebnisse der Photometer-Messungen bei  $-18\text{ °C}$  und  $+6\text{ °C}$  von AOH, AME, AOH-3-G und TEN.

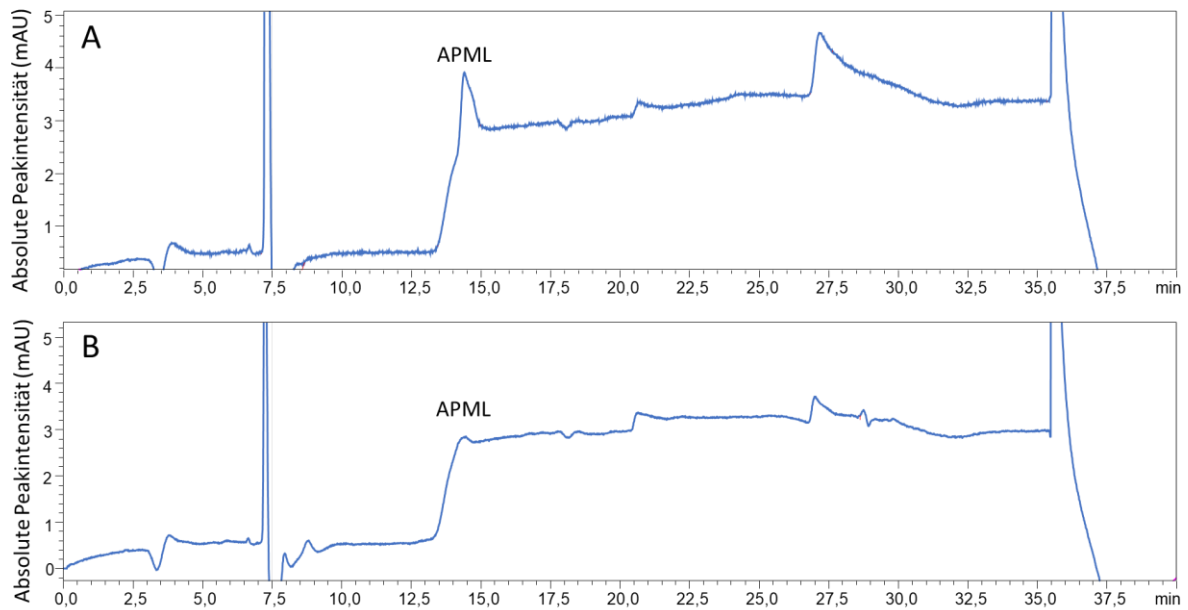
Ein ähnliches Bild ergab sich für die Perylenquinone ATX I, ATX II, ALTP sowie APML (siehe Abbildung 3.18).





**Abbildung 3.18** Grafische Auswertung der Ergebnisse der Photometer-Messungen bei -18 °C und +6 °C von ATX I, ATX II, ALTP und APML.

Auch bei diesen Toxinen konnten keine großen Unterschiede zwischen der Lagerung bei -18 °C und +6 °C beobachtet werden. Generell entsprachen die Anfangskonzentrationen dieser Toxine ebenfalls den nach 12 Monaten gefundenen Konzentrationen, jedoch konnte bereits in den ersten Woche mittels HPLC ein Abbau von APML beobachtet werden, sodass die photometrische Bestimmung hier nach 40 Wochen abgebrochen wurde. Durch die scheinbar dennoch konstant bleibende Konzentration des APML wurde angenommen, dass das Abbauprodukt ein ähnliches Absorptionsmaximum besitzt und somit zur Extinktion beiträgt.



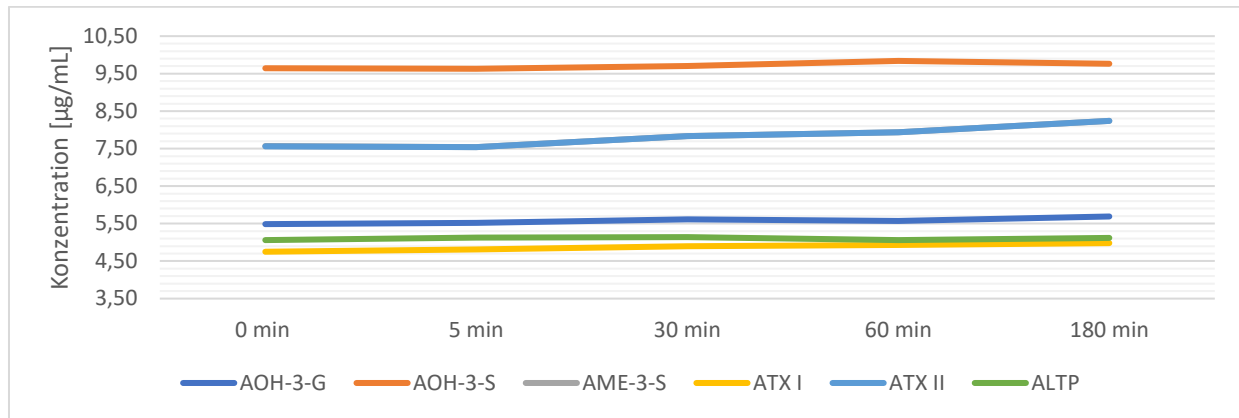
**Abbildung 3.19** HPLC Messungen (254 nm) des APML zum Zeitpunkt 0 (A) und nach vier Wochen (B).

In Abbildung 3.19 ist deutlich erkennbar, dass das eingesetzte APML bereits nach 4 Wochen vollständig abgebaut wurde. Zuvor konnte bereits bei LC-MS/MS Messungen von APML Standards verschiedener Konzentrationen ein Rückgang der Signalfäche beobachtet werden, wobei dafür zusätzlich ALTP detektiert wurde. Auch wenn die Bildung von ALTP in den HPLC-Chromatogrammen aufgrund der niedrigen Konzentrationen nicht bestätigt werden konnte, verdeutlicht dies die Notwendigkeit der im Rahmen der Stabilitätstests zusätzlich durchgeführten HPLC Messungen, da ohne diese die Stabilität des APML als gegeben betrachtet worden wäre.

Zusammenfassend konnte die Stabilität für alle getesteten Toxine außer APML sowohl bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $+6\text{ }^{\circ}\text{C}$  bewiesen werden. Die modifizierten Toxine AOH-3-S und AME-3-S wurden aufgrund nicht ausreichender Standardverfügbarkeit zu Beginn des Experiments nicht geprüft, jedoch sind über die Stabilität dieser Toxine bereits Literaturdaten verfügbar (Mikula et al. 2013).

Als weitere Qualitätssicherungsmaßnahme wurde für einige Toxine auch die Stabilität bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  ermittelt, da Standardlösungen im Zuge der Probenaufarbeitung regelmäßig einige Stunden bei Raumtemperatur stehen und zudem die Extraktionsmittel von Probenextrakten bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  am Rotationsverdampfer entfernt werden. Hierfür wurden die Toxine AOH-3-G, AOH-3-S, AME-3-S, ATX I, ATX II sowie ALTP für einen Zeitraum von 3 Stunden in einem Heizblock auf  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Probenahme erfolgte nach 5 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten, sowie zum Zeitpunkt 0 vor Beginn des Experiments. Analog

den oben genannten Langzeitstabilitätstests wurde die Quantifizierung mittels Photometer durchgeführt, gefolgt von HPLC-Messungen (siehe 6.5.2) zur Überprüfung der Bildung von Abbauprodukten.



**Abbildung 3.20** Ergebnisse der photometrischen Quantifizierung (Einzelbestimmung) des Stabilitätstestes von AOH-3-G, AOH-3-S, AME-3-S, ATX I, ATX II und ALTP unter Hitzeeinfluss (40 °C).

Wie Abbildung 3.20 zu entnehmen ist, zeigte eine Erhitzung auf 40 °C keine signifikanten Konzentrationsänderungen und auch aus den dazugehörigen HPLC-Daten ging keine Bildung von Abbauprodukten hervor. Der leichte Konzentrationsanstieg von ATX II nach 3 Stunden müsste somit auf die durch die Einzelbestimmung hervorgerufene Messunsicherheit oder eine Aufkonzentrierung des Standards durch Verdampfen des Lösungsmittels zurückzuführen sein.

### 3.3.3 Diskussion: Referenzverbindungen und isotoenmarkierte Standards

Die Reinheit sowie die Konzentrationen der benötigten Toxinstandards konnten zuverlässig mittels qNMR, UV/Vis-Spektroskopie sowie LC-MS/MS Messungen bestimmt werden und sind für die weitere Arbeit ausreichend. Auch die geringe Verunreinigung der Analyten AME, ATX I und ALTP mit AOH ist nicht weiter kritisch, solange diese drei Toxine nicht zusammen mit AOH validiert werden. Eine erneute präparative HPLC Aufreinigung wäre hier nicht zielführend gewesen, da es sich nur um eine Spurenkontamination handelte, die im UV-Spektrum vermutlich nicht sichtbar gewesen wäre. Zudem eluieren ALTP, ATX I und AOH aufgrund ihrer Polarität fast gleichzeitig, sodass eine vollständige Trennung auch bei einer höheren Kontamination schwierig gewesen wäre.

Bei den qNMR-Messungen wurden alle Signale mit einem Signal/Rauschverhältnis größer als 50 integriert und mit L-Tyrosin als externem Standard quantifiziert. Die berechneten Werte für jedes Signal zeigten eine geringe Standardabweichung auf und stimmten - wo bekannt - mit den erwarteten Konzentrationen der Toxine überein, sodass sich diese Methode als zuverlässige Quantifizierungsmethode erwiesen hat.

Die genaue Konzentration von Standards ist für spurenanalytische Messmethoden unerlässlich, sodass Informationen über die Stabilität der zu untersuchenden Analyten nötig sind, um gegebenenfalls Maßnahmen zur genauen Konzentrationsbestimmung in das Messprotokoll aufnehmen zu können. Aus diesem Grund verlangen meist auch wissenschaftliche Journals im Mykotoxinbereich eine Erläuterung über die durchgeführten Qualitätssicherungsmaßnahmen, sodass diese für Publikationen fast zwingend erforderlich geworden sind.

Aufgrund mangelnder Literaturdaten zu deren Stabilität betrifft dies insbesondere die *Alternaria* Toxine. Da diese jedoch aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften, wie die Epoxidgruppe von ATX II, anfällig für chemische Reaktionen sind, wurde ein einjähriger Stabilitätstest mit ausgewählten Toxinen bei Lagerung bei -18 °C und +6 °C durchgeführt. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurden aufgrund der im niedrigen Wellenlängenbereich angesiedelten Absorptionsmaxima Mikro-Quarzglasküvetten verwendet, da die Eigenabsorption anderer Küvettenmaterialien in diesem Bereich zu hoch war. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden die Küvetten nach jeder Messung mindestens zehn Mal mit Methanol ausgewaschen und unter Stickstoff getrocknet. Nach Verfolgung der Stabilität über ein Jahr hinweg konnte die Stabilität der getesteten Toxine bei beiden Temperaturen als gegeben betrachtet werden. Lediglich für das Toxin APML konnte durch die zusätzlich durchgeführten HPLC-Messungen ein Abbau beobachtet werden, was durch eine reine photometrische Bestimmung unentdeckt geblieben wäre. Die genauen Vorgänge des Abbaus von APML bzw. dessen Umwandlung in einen anderen Metaboliten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt werden, stellen aber ein spannendes Forschungsgebiet für zukünftige Studien dar.

Ein Hitzetest bei 40 °C zeigte konstante Konzentrationen der getesteten Toxine, sodass während der hier durchgeführten Aufarbeitung mit keinen hitzebedingten Verlusten zu rechnen ist. Literaturdaten hierzu sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht verfügbar, jedoch konnte bei Backversuchen und hitzebehandeltem Sonnenblumenkernmehl bereits die Stabilität von AOH, AME und ALT bei bis zu 230°C bewiesen werden (Siegel et al. 2010a, Combina et al. 1999), sodass hier auch bei den reinen Standards von einer Hitzestabilität auszugehen ist.

### 3.4 Entwicklung einer Multimykotoxin-LC-MS/MS-Methode zur Analytik von *Alternaria* Toxinen

Die im Folgenden beschriebene Methodenentwicklung wurde bereits z.T. von Scheibenzuber et al. (2021) publiziert. Die Methodenentwicklung sowie alle darauffolgenden Messungen wurden an einem Shimadzu 8050 LC-MS/MS Triple Quadrupol durchgeführt (siehe 6.5.3).

#### 3.4.1 Einstellung der Messparameter

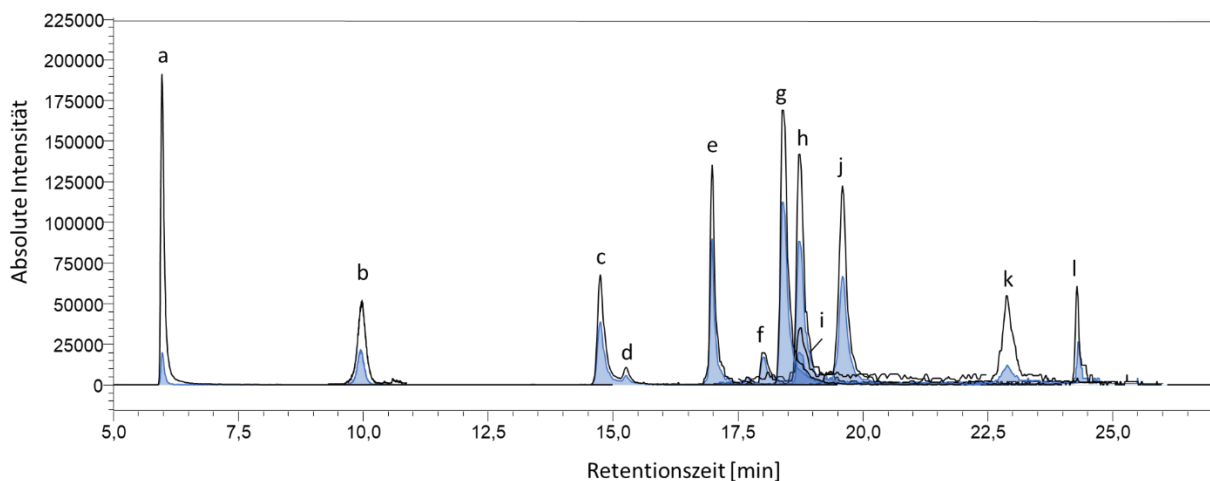
##### 3.4.1.1 Multimethode

Die 12 *Alternaria* Toxine AOH, AME, ALTP, TEN, ALT, ATX I, ATX II, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G wurden in eine LC-MS/MS Multimethode integriert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer SIVA für die Toxine AOH und AME, wohingegen die restlichen Toxine über externe Matrixkalibrierungen bestimmt wurden. Um die Sensitivitäten und Messgenauigkeit jedes Analyten zu erhöhen, wurden diese als Reinsubstanz am LC-MS/MS getunt, um das Zerfallsmuster der einzelnen Toxine zu identifizieren und die hierfür benötigten optimalen Geräteeinstellungen zu ermitteln. Aus den sechs bestimmten MS/MS-Fragment-Ionen-Muster wurden jeweils die zwei Übergänge mit der höchsten Empfindlichkeit gewählt. Der größere Massenübergang wurde daraufhin als „Quantifier“ zur Quantifizierung der Toxine festgelegt, der andere Übergang diente als „Qualifier“ zur eindeutigen Identifizierung des Analyten. Zusätzlich wurden ein bis zwei weitere reproduzierbare Fragment-Ionen in die Methode integriert, damit beim eventuellen Auftreten von Störionen dennoch eine eindeutige Identifizierung des Analyten möglich ist. Um teure isotoopenmarkierte Standards zu sparen, wurden diese aufgrund des identischen Fragmentierungsverhaltens zu ihrem unmarkierten Analogon nicht optimiert, sondern die Einstellung der korrespondierenden Toxine unter Berücksichtigung der veränderten Masse übernommen.

Nach einer Literaturrecherche sowie eigenen Versuchen stellte sich die Messung im negativen ESI Modus als die am besten geeignete Methode dar, auch wenn das Toxin ALT im positiven ESI Modus eine weit höhere Sensitivität zeigte. Da jedoch vor allem die modifizierten Toxine bei Zusatz von Säure zum Fließmittel kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal zeigten und dieses Additiv für eine Messung im positiven ESI Modus meist unerlässlich ist, wurde die geringere Sensitivität des ALT zu Gunsten der Multimethode akzeptiert. Auf eine Methode mit Polaritätenwechsel wurde aufgrund der negativen Auswirkungen eines Säurezusatz auf die Signalform sowie der ähnlichen Retention zu AME-3-G verzichtet.

Für die vorausgehende Trennung mittels HPLC zeigte ein Gradient aus Wasser und Acetonitril die besten Ergebnisse für die Multimethode. Wurde Methanol anstelle von Acetonitril

verwendet, so verschlechterte sich die Peakform der früh eluierenden Toxine AOH-3-S und AME-3-S erheblich. Auch die Fließmittelkombination von Acetonitril/2-Propanol/Wasser (17,5/17,5/65, v/v/v) und Methanol, welches für eine andere bereits am Lehrstuhl etablierte *Alternaria* Methode verwendet wurde, erwies sich für die Detektion der sehr polaren modifizierten Toxine aufgrund des hohen Organikanteils als ungeeignet, ebenso verschlechterte ein Säurezusatz in allen getesteten Fließmittelkombinationen die Peakform mehrerer Analyten. Auf die restlichen Toxine hatte die Wahl des organischen Lösungsmittels kaum einen Einfluss, auch wenn die Toxine ALTP, ATX I, AOH und TEN mit den gewählten Fließmitteln die beste Trennung zeigten. Da diese aufgrund ihrer Molekülmasse und ihrer Fragmentationen jedoch auch bei Co-Elution sehr gut zu unterscheiden wären, hatte diese Tatsache nur bedingt Einfluss auf die Wahl des Lösungsmittels. Eine Ausnahme hiervon waren die Toxine ALTP und ATX II, da diese die gleiche Masse und gleichen Fragmentationen besitzen und somit eine chromatographische Trennung gegeben sein musste. Diese Trennung war jedoch durch die unterschiedliche Polarität beider Toxine mit allen Fließmittelkombinationen gegeben. Auch bei den modifizierten Formen AOH-3-G und AOH-9-G war aufgrund identischer Massen und Zerfallsmuster eine chromatographische Trennung zwingend notwendig, was letztendlich durch die Verwendung der Säule Hyperclone C18 und durch eine Umstellung des verwendeten Gradienten auf einen Stufengradienten gelang. Ein Lauf mit dieser Methode im negativen ESI Modus betrug inklusive Equilibrierungszeit 32 Minuten.



**Abbildung 3.21** LC-MS/MS Chromatogramm der entwickelten Mykotoxinmethode. a: AOH-3-S, b: AME-3-S, c: AOH-9-G, d: AOH-3-G, e: ALT, f: AME-3-G, g: ATX I, h: ALTP, i: AOH, j: TEN, k: ATX II, l: AME.

### 3.4.1.2 Tenuazonsäure

Aufgrund der starken Acidität des Toxins Tenuazonsäure konnte dieses Toxin nicht in die Multimethode integriert werden, sodass hier auf eine bereits am Lehrstuhl etablierte Messmethode zurückgegriffen wurde (Asam et al. 2011b).

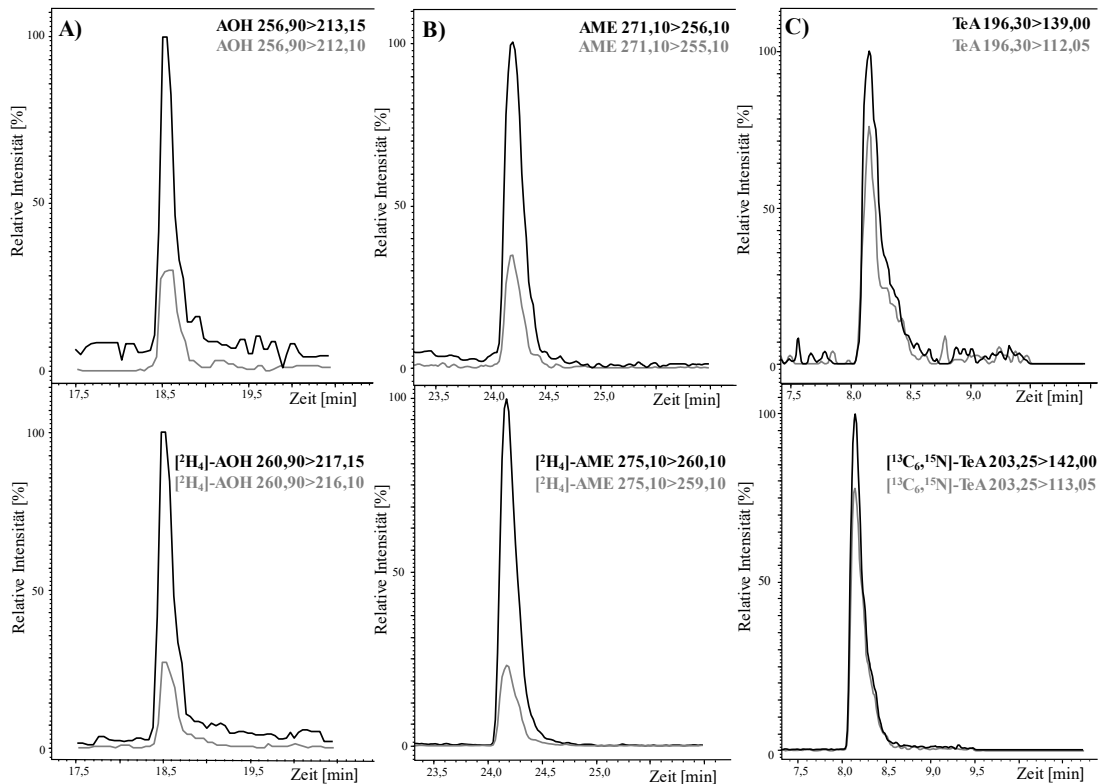
Für die Analytik wurde die pH-stabile Gemini-NX Säule verwendet, die die Verwendung eines basischen Ammoniumformiatpuffers (5 mM, pH 9) erlaubte, wodurch eine angemessene Retentionszeit und eine gute Peakform erzielt werden konnten (Siehe Abbildung 3.22).

Die Messdauer betrug inklusive Equilibrierungszeit 24 Minuten und wurde im negativen ESI Modus durchgeführt.

## 3.4.2 Kalibrierung

### 3.4.2.1 Responsegeraden

Die Toxine AOH, AME und TeA wurden im Rahmen der durchgeführten SIVA in Getreide- und Bierproben über die jeweils korrespondierenden isotopenmarkierten Standards [ $^2\text{H}_4$ ] – AOH, [ $^2\text{H}_4$ ] – AME und [ $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$ ] – TeA quantifiziert.



**Abbildung 3.22** LC-MS/MS Chromatogramme von AOH (A), AME (B) und TeA (C), sowie ihren korrespondierenden stabilisotopenmarkierten Analoga.

Hierfür wurde für jeden der drei Analyten eine Responsegerade aufgestellt, indem Standardlösungen von Analyt und markiertem Standard in verschiedenen Verhältnissen im Bereich 1/100 – 100/1 gemischt und in einer Dreifachinjektion am LC-MS/MS gemessen wurden. Da das Aufnahmelösungsmittel bei Gersten- und Bierproben identisch war, reichte die Bestimmung einer Responsegeraden für beide Methoden. Um die Gerade zu ermitteln, wurden die erhaltenen Peakflächen ins Verhältnis gesetzt ( $A(A)/A(S)$ ) und gegen die Stoffmengenverhältnisse ( $n(A)/n(S)$ ) aufgetragen. Für TeA wurde die Gerade für beide Massenübergänge des markierten Standards aufgestellt, da in einigen Malzproben Störpeaks der Matrix mit dem Quantifier des internen Standards interferiert haben. Die erhaltenen Geradengleichungen, sowie die verwendeten Massenübergänge, die Bestimmtheitsmaße und die linearen Bereiche sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

**Tabelle 3.7** Geradengleichungen der Responsegeraden von AOH, AME und TeA.

Analyt	Interner Standard	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß	Linearer Bereich $n(A)/n(S)$
AOH	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AOH	0,4947x + 0,1057	0,9999	1/100 – 100/1
AME	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AME	0,721x + 0,8491	0,9978	1/100 – 100/1
TeA	[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N] - TeA	1,2301x + 0,125	0,9993	1/100 – 100/1
139 → 113				
TeA	[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N] - TeA	1,4149x + 0,1136	0,9999	1/10 – 50/1
139 → 142				

#### 3.4.2.2 Matrixkalibrierung von Getreideproben

Für die Toxine ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G wurden Matrixkalibrierungen verwendet, da hier keine isotope markierten Standards zur Verfügung standen. Hierfür wurden als Matrix für die Gerstenmethode toxischfreie Gerstengraupen verwendet, welche mit mindestens acht verschiedenen Toxinkonzentrationen versetzt wurde. Der niedrigste Punkt wurde hierbei bei der geschätzten Bestimmungsgrenze angesetzt, und dann analog der Gerstenmethode aufgearbeitet (siehe 6.10.3). Da die zu erwarteten Konzentrationen in natürlich befallenen Getreideproben für die meisten Toxine relativ gering waren, wurde als oberster Punkt der Matrixkalibrierungen meist die zehnfache Konzentration der Bestimmungsgrenze gewählt. Alle Dotierniveaus wurden am LC-MS/MS in einer Dreifachinjektion gemessen. Die nach Auftragen der Peakfläche gegen die jeweilige Analytkonzentration erhaltene Geradengleichung, sowie die Bestimmtheitsmaße und der nach Mandeltest (Mandel und Mansfield 1964) erhaltene lineare Bereich sind in Tabelle 3.8 angegeben.



**Tabelle 3.8** Matrixkalibriergeraden der Getreidemethode von ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G.

Analyt	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß	Linearer Bereich [µg/kg]
ALT	$1397,1x + 3391,6$	0,9988	10 – 100
ALTP	$76969x - 142794$	0,9928	3 – 22
ATX I	$31603x + 15951$	0,9987	2 – 10
ATX II	$141786x - 103205$	0,9985	3,6 – 17,5
TEN	$57526x + 5901$	0,9984	0,2 – 10
AOH-3-S	$628291x + 159277$	0,9963	2,2 – 15
AME-3-S	$809921x - 191996$	0,9916	1,5 – 15
AOH-3-G	$91933x - 137779$	0,9971	3 – 20
AOH-9-G	$198942x - 800942$	0,9961	4 – 20
AME-3-G	$695,81 + 1185,5$	0,9955	4,9 – 15

#### 3.4.2.3 Matrixkalibrierung von Bierproben

Die Erstellung der Matrixkalibrierung für Bierproben erfolgte für ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G analog zu den Getreideproben (3.4.2.2). Als toxisfreie Matrix wurde ein analytfreies, kommerziell erhältliches Bier verwendet, welchem mindestens acht verschiedene Toxinkonzentrationen zugesetzt wurden. Da in den zuvor getesteten Bieren keines dieser 10 Toxine nachgewiesen werden konnte, orientierte sich die Konzentrationsspanne der Geraden erneut auf den Bereich zwischen geschätzter Bestimmungsgrenze und maximal zehnfacher Konzentration der Bestimmungsgrenze. Die Aufarbeitung erfolgte analog der Bieraufarbeitung (6.11.2) und jedes Dotierniveau wurde am LC-MS/MS dreifach injiziert. Nach der Messung wurden die Peakflächen der Analyten gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen und die Geradengleichungen ermittelt. Diese sind zusammen mit den Bestimmtheitsmaßen und den nach Mandeltest (Mandel und Mansfield 1964) erhaltenen linearen Bereichen in Tabelle 3.9 angegeben.

**Tabelle 3.9** Matrixkalibriergeraden der Biermethode von ALT, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G.

Analyt	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß	Linearer Bereich [µg/kg]
ALT	3855,2x - 6474,5	0,9988	6 – 100
ALTP	81331x + 229855	0,9966	3,2 – 32
ATX I	61687x + 17025	0,9982	0,6 – 10
ATX II	268608x + 187428	0,9958	1 – 10
TEN	145235x + 11549	0,9973	1 – 10
AOH-3-S	1875268x - 842296	0,9900	2 – 20
AME-3-S	1777157x - 3248350	0,9920	3 – 20
AOH-3-G	142303x + 93119	0,9971	1,3 – 14
AOH-9-G	142885x + 12875	0,9964	1,35 – 14
AME-3-G	2012x + 1589,7	0,9888	1,5 – 13

### 3.4.3 Diskussion: Entwicklung einer Multimykotoxin-LC-MS/MS-Methode zur Analytik von *Alternaria* Toxinen

Die entwickelte Methode umfasst die 12 bekanntesten *Alternaria* Toxine AOH, AME, ALTP, TEN, ALT, ATX I, ATX II, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G, wobei zusätzlich der Analyt STE III aufgrund mangelnder Stabilität qualitativ in die Methode integriert wurde. Über das Auftreten der modifizierten Toxine AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G ist bis dato sehr wenig bekannt, sodass durch die gelungene Integration dieser Analyten in die Multimethode das Modifikationspotential von AOH und AME beobachtet und bisher unentdeckte Expositionsquellen identifiziert werden können.

Da in Multimethoden oft eine Vielzahl an Verbindungen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften integriert werden, ist es bei der Methodenentwicklung meist nötig Kompromisse einzugehen, um jeder Substanzklasse gerecht zu werden. In diesem Fall lag die Schwierigkeit an den modifizierten Formen, die aufgrund ihrer hohen Polarität sehr früh eluieren, und dem AME, welches das unpolarste aller hier analysierten Toxine ist. Durch die stark unterschiedlichen Elutionseigenschaften musste der Anteil an organischem Lösungsmittel zu Beginn der Methode sehr niedrig gehalten werden, um eine Elution der Sulfat- und Glucosidverbindungen in der Totzeit zu verhindern und eine akzeptable Peakform zu erhalten. Gleichzeitig musste der Gradient im weiteren Verlauf so angepasst werden, dass das AME nicht zu spät von der Säule eluiert und die Methode somit eine akzeptable Laufzeit

aufweist, während gleichzeitig die chromatographische Trennung von AOH-3-G und AOH-9-G, sowie ALTP und ATX II gegeben sein musste.

Zu Beginn wurden zudem verschiedene HPLC Säulen getestet, wobei der Fokus auf C18 Säulen mit unterschiedlichen Säulenlängen und Partikeldurchmessern lag. Da die Trennbarkeit der getesteten Säulen ähnlich war, wurde eine Hyperclone C18 Säule verwendet, die sich in vergangenen Projekten bereits als für *Alternaria* Toxine geeignet erwiesen hat.

Die entwickelte Methode wurde im negativen ESI Modus gemessen, nachdem dieser für alle Toxine außer ALT die beste Empfindlichkeit zeigte. Auf eine Methode mit Polaritätswechsel wurde verzichtet, da ALT und AME-3-G ähnliche Retentionszeiten besitzen und Sensitivitätseinbußen bezüglich des noch relativ unbekanntes AME-3-G's vermieden werden sollten. Zusätzlich wäre für eine Messung im positiven Modus ein Säurezusatz zu den Fließmitteln nötig gewesen, was sich wiederum nachteilig auf die Peakform mehrerer Analyten ausgewirkt hätte.

Neben dem Säurezusatz zeigte auch die Verwendung eines Ammoniumformiatpuffers keine zufriedenstellenden Ergebnisse, sodass eine Integration aller Analyten in die TeA-Methode scheiterte. Bei Verwendung eines Gradienten aus Methanol und Wasser konnten zwar gute Peakformen und die beste Trennung der Toxine erzielt werden, jedoch eluierten die modifizierten Toxine AOH-3-S und AME-3-S nach bereits 2 bzw. 4 Minuten, was aufgrund zeitgleich eluierender Matrixbestandteile als kritisch betrachtet wurde. Das gleiche Ergebnis wurde bei Verwendung eines Acetonitril/2-Propanol/Wasser-Gemisches mit Methanol erzielt, bei welchem zudem eine Peakformverschlechterung auftrat. Als bester Kompromiss wurde deswegen ein Gradient aus Wasser und Acetonitril gewählt, da hier die Retentionszeiten der Sulfatverbindungen in einem angemessenen Bereich lagen und die Peakform sowie die Auftrennung der Analyten zufriedenstellend war.

Eine chromatographische Trennung war lediglich für die Toxine AOH-3-G und AOH-9-G sowie für ALTP und ATX II nötig. Während die Trennung letzterer aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur und Polarität auf jeder getesteten Säule mit allen Fließmittelkombinationen gegeben war, musste ein Stufengradient für die Basislinientrennung von AOH-3-G und AOH-9-G entwickelt werden, um die Alternariol-Glucoside eindeutig identifizieren und quantifizieren zu können. Bei allen anderen Toxinen war eine chromatographische Trennung aufgrund der unterschiedlichen Molekülmassen und resultierenden Fragment-Ionen nicht zwingend notwendig, sodass die Co-Elution von ALTP und AOH sowie deren leichte Peaküberlappung mit ATX I kein weiteres Problem darstellte.

Das Toxin Tenuazonsäure war aufgrund seiner starken Acidität nicht mit der Multimethode kompatibel und musste weiterhin mit einer bereits etablierten Methode gemessen werden. Hier ist zudem zu beachten, dass neben TeA auch die nicht cytotoxische *allo*-TeA detektiert wird und somit beide Formen als Summe bestimmt werden. Eine Integration der anderen Toxine in die TeA – Methode scheiterte an der schlechten Peakform, die vermutlich durch den basischen Ammoniumformiatpuffer verursacht wurde. Die Geräteausstattung des verwendeten LC-MS/MS ermöglichte es jedoch beide Methoden in Reihe zu schalten und direkt hintereinander zu messen.

Zur Kalibrierung der beiden Methoden wurden für die Toxine AOH, AME und TeA Responsegeraden aufgenommen, indem Lösungen von Analyt und ihrem stabilisotopenmarkiertem Analogon in verschiedenen Verhältnissen hergestellt wurden. Nach Vermessung am LC-MS/MS wurden die jeweiligen Stoffmengenverhältnisse  $n(A)/n(IS)$  gegen die resultierenden Peakflächenverhältnisse  $A(A)/A(IS)$  aufgetragen. Um einen möglichst großen Kalibrierbereich zu erhalten, der somit auch unvorhergesehene hohe Probenkonzentrationen abdeckt, wurde das Verhältnis von Analyt und Standard in der Spannbreite 1:100 bis 100:1 gewählt. Mit Hilfe des Linearitätstests nach Mandel (Mandel und Mansfield 1964) konnte für alle drei Toxine die Linearität im gewählten Bereich verifiziert werden.

Für alle anderen Toxine musste aufgrund nicht vorhandener isotopenmarkierter Standards auf eine externe Matrixkalibrierung zurückgegriffen werden. Da je nach Beschaffenheit der Matrix bei LC-MS/MS Messungen unterschiedlich starke Ionensuppressionen auftreten können, ist es bei externen Kalibrierungen nötig eine dem Probenmaterial ähnliche Matrix zu verwenden. Hierfür konnte für die Analytik der festen Proben eine toxische Gerstengraupenprobe gefunden werden, wohingegen für die Bieranalytik ein toxisches irisches Bier verwendet wurde, sodass Matrixeffekte auch ohne Verwendung eines stabilisotopenmarkierten Standards bestmöglich kompensiert werden sollten. Da *Alternaria* Toxine hauptsächlich in niedrigen Konzentrationsbereichen vorliegen, wurde der Konzentrationsbereich entsprechend angepasst: als niedrigstes Dotierniveau wurde die Bestimmungsgrenze gewählt, als höchstes Niveau diente zur Orientierung der zehnfache Wert des niedrigsten Dotierniveaus, wodurch auch untypische, höhere Konzentrationen noch im Kalibrierbereich liegen sollten. Nach Durchführung des Mandeltests wurden die Kalibrierbereiche von ATX I und AOH-3-S (Gerstenmethode) sowie ATX II (Biermethode) eingeschränkt, um im linearen Bereich zu liegen.

Die einzelnen Kalibrierpunkte schwankten teilweise nur gering zwischen verschiedenen Aufarbeitungstagen und Messungen, jedoch wurden zur Sicherheit bei jeder Aufarbeitung

---

zwei Kalibrierpunkte zusammen mit den Proben aufgearbeitet und vermessen, um tagesaktuelle äußere Umstände sowie Sensitivitätsschwankungen des LC-MS/MS bestmöglich zu kompensieren. Die Quantifizierung wurde folglich anhand der tagesaktuellen Peakflächen und nicht über die Geradengleichung durchgeführt, wodurch genauere Ergebnisse erzielt werden konnten.

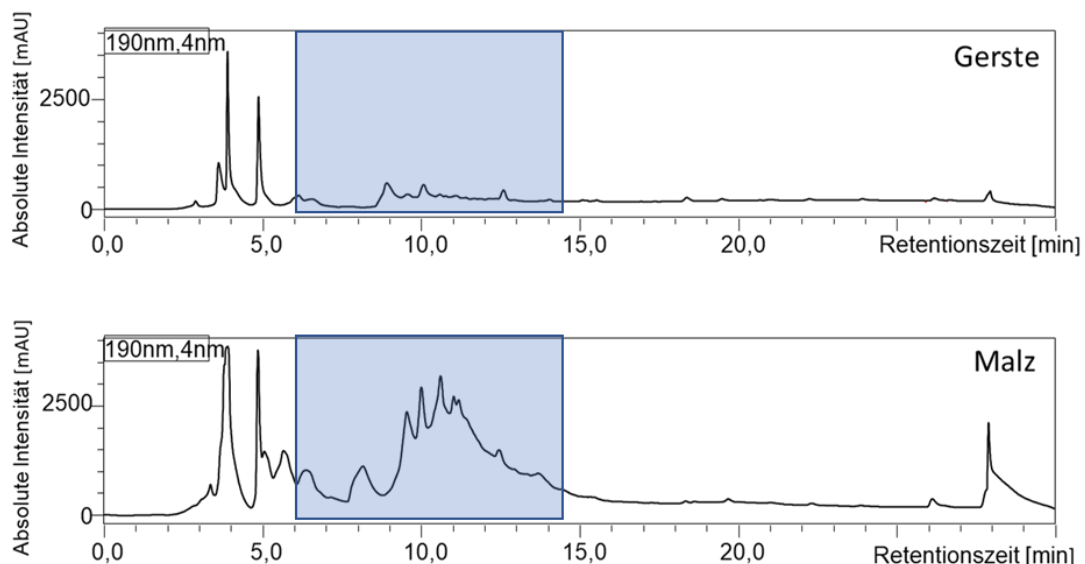
### 3.5 Methodenentwicklung und -optimierung zur Bestimmung von *Alternaria* Toxinen in Gersten- und Bierproben

Die in diesem Kapitel beschriebenen Punkte wurden bereits zum Teil von Scheibenzuber et al. (2021) und von Scheibenzuber et al. (2022) publiziert.

#### 3.5.1 Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Gersten- und Malzproben

Für diese Arbeit sollte eine bereits vorhandene Methodik zur Analytik von AOH, AME, TeA, TEN und ATX I in Babynahrung für alle Toxine, insbesondere der modifizierten Formen, angepasst werden. Die Hauptschritte dieser Methodik bestanden hierbei aus einer dreifachen Probenextraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 0,2 mL Ameisensäure bzw. ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O (50/25/25, v/v/v) + 0,3 mL Ameisensäure, einer Festphasenextraktion mit Discovery DSC-18 Kartuschen, sowie einer Wiederaufnahme der Toxine in MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) (Gotthardt et al. 2019).

Bei einer testweisen Analytik einer dotierten Gersten- und einer Malzprobe konnten mit dieser Methode ebenfalls die anderen Toxine ALTP, ATX II, ALT, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G sowie AME-3-G gefunden werden, jedoch zeigte sich eine erhöhte Matrixbelastung in Malzproben (siehe Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23** HPLC-Chromatogramm einer Gersten- (oben) und einer Malzprobe (unten) nach Aufarbeitung mit einer bereits etablierten Methodik zur Analytik von *Alternaria* Toxinen (190 nm). Entstandene Signale wurden durch Matrixkomponenten erzeugt, enthaltene Toxine waren aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht im UV sichtbar. In blau: Kritischer Matrixbereich aufgrund Co-Elution mit den modifizierten Toxinen.

Da die neue LC-MS/MS Methode bereits mit einem Organikanteil von 10 % startet, und nicht wie bei Gotthardt et al. (2019) mit 35 % Organik, eluieren die Matrixpeaks später und zum Teil zeitgleich mit den Analyten. Um neben störenden Matrixeffekten während der Messung zusätzlich auch eine Verschmutzung der Ionenquelle des LC-MS/MS zu vermeiden, musste die ursprüngliche Aufarbeitung weiter optimiert werden, um die Matrix bestmöglich abzutrennen, ohne dabei die Wiederfindungen der Toxine zu verringern. Da alle Messungen erst nach 5 Minuten ins MS/MS geleitet werden, lag der Fokus auf einer Reduktion der Störsignale im Bereich 5 – 25 Minuten. Zusätzlich wurden alternative Aufarbeitungsmöglichkeiten mittels Dilute and Shoot- Ansätzen getestet.

#### 3.5.1.1 Dilute and Shoot Versuche

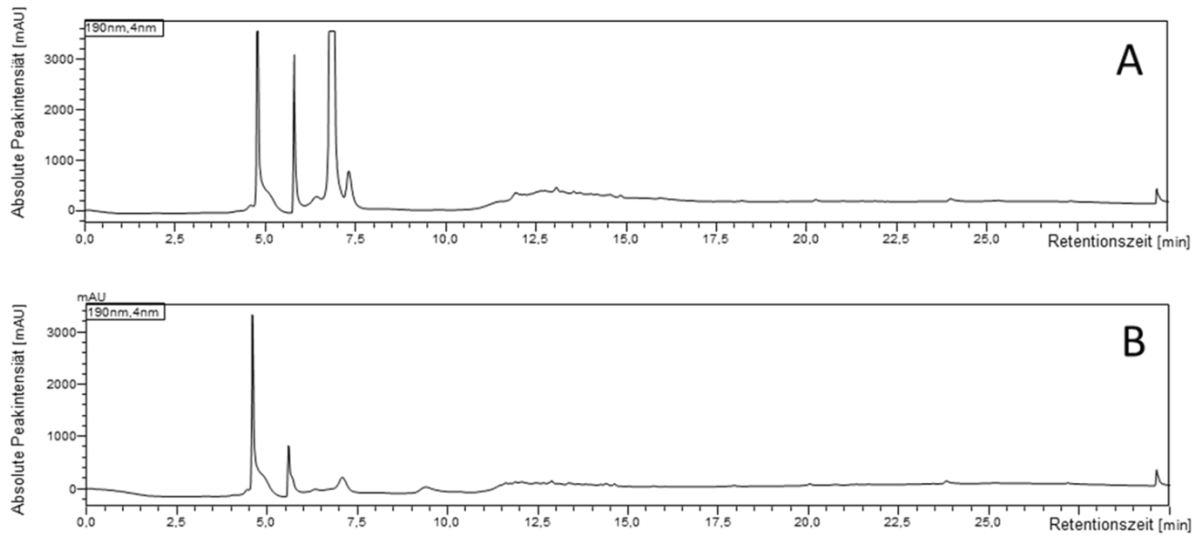
Um die Anwendbarkeit von Dilute & Shoot Methoden zu testen, wurde versuchsweise eine an eine publizierte *Alternaria* Methode angelehnte Aufarbeitung getestet (Walravens et al. 2014). Hierfür wurden je 2,5 g einer Gersten- und einer Malzprobe in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit den Toxinen AOH, AME, TEN, ALTP und TeA dotiert und mit 10 mL einer ACN/Wasser/Essigsäure (79/19,5/1,5; v/v/v) Lösung für 60 Minuten extrahiert. Zum Testen einer weiteren Verdünnungsstufe wurde der Versuch ebenfalls mit 15 mL Extraktionsmittel durchgeführt. Nach Filtration wurden je 1 mL des Eluats in Klarglasvials überführt und am LC-MS/MS gemessen.

Im UV-Spektrum war eine hohe Matrixbelastung zu erkennen, die auch durch eine weitere 1:10 Verdünnung nicht ausreichend minimiert werden konnte, sodass eine 1:50 Verdünnung notwendig gewesen wäre. Da jedoch in allen verdünnten Proben keine Toxine detektierbar waren, wurde dieser Ansatz aufgrund mangelnder Sensitivität des Messgerätes nicht weiterverfolgt.

#### 3.5.1.2 Matrixreduktion durch Proteinfällung

Es wurden testweise Proteinfällungen durchgeführt, um deren Einfluss auf die Matrixbelastung der Proben, insbesondere des Malzes, zu ermitteln.

Für die klassische Carrez-Fällung wurde in Anlehnung an Gökmen et al. (2005) und Ramírez-Jiménez (2000) zweimal ein Gramm Malz eingewogen, extrahiert und abrotiert (siehe 6.10.2). Der Rückstand wurde mit 8 mL Wasser versetzt und geschüttelt. Im Anschluss wurde je 100 µL (Probe 1) bzw. 500 µL (Probe 2) einer frisch angesetzten Carrez I (= 15 %-ige Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung) und Carrez II Lösung (= 30 %-ige Zinksulfat-Lösung) zur Probe gegeben, 4 mL Wasser hinzugefügt und die Proben anschließend für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Festphasenextraktion des Überstandes sowie Abrotieren des Lösemittels und Wiederaufnahme in ACN/H<sub>2</sub>O wurden die Proben am LC-MS/MS gemessen.

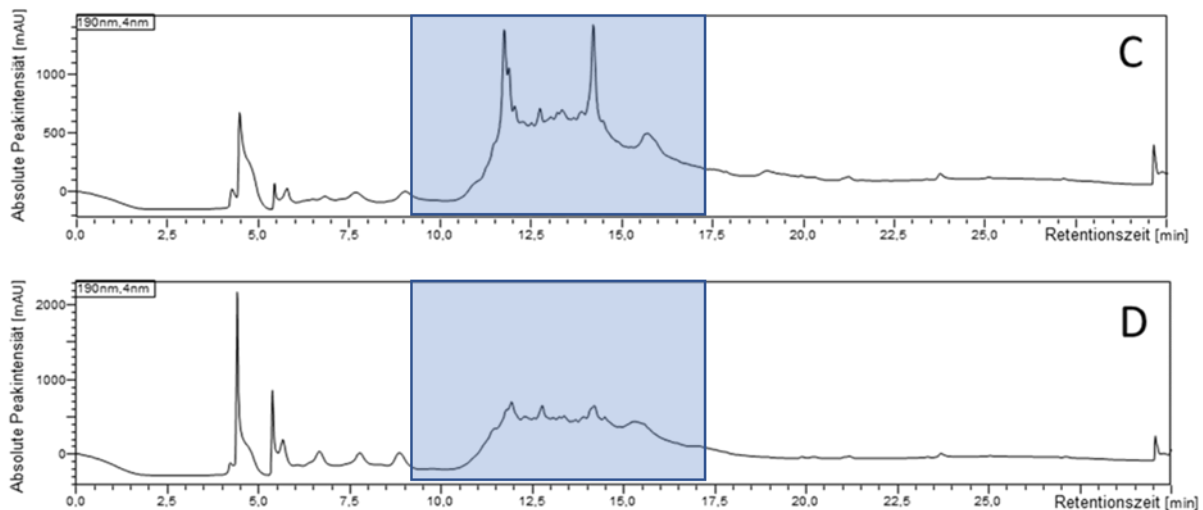


**Abbildung 3.24** HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Carrez-Klärung mit je 100  $\mu$ L (A) bzw. 500  $\mu$ L (B) Carrez-Lösung I und II.

Aus diesen Chromatogrammen ging hervor, dass die Carrez-Klärung eine deutliche Verringerung der Matrixpeaks bewirkte, wobei der Einsatz von mehr Carrez-Lösung I und II auch mehr Peaks im Zielbereich ab 5 Minuten entfernen konnte.

Als zweiter Ansatz wurde eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure in Anlehnung an Greenberg & Shipe (1979) durchgeführt. Hierfür wurden erneut zwei Proben mit je 1 Gramm Malz extrahiert, abrotiert und nach Wiederaufnahme in 12 mL Wasser mit 100  $\mu$ L bzw. 250  $\mu$ L einer methanolischen 30 %-igen Trichloressigsäure versetzt. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben zentrifugiert, der pH-Wert mit Ammoniak auf 5,5 eingestellt und die Probe analog dem Standardschema weiterbehandelt. Die HPLC-Chromatogramme zeigten zwar eine Reduktion der Matrix vor allem bei der Zugabe von 250  $\mu$ L TCA, jedoch waren immer noch viele Matrixverunreinigungen zu sehen (siehe Abbildung 3.25).



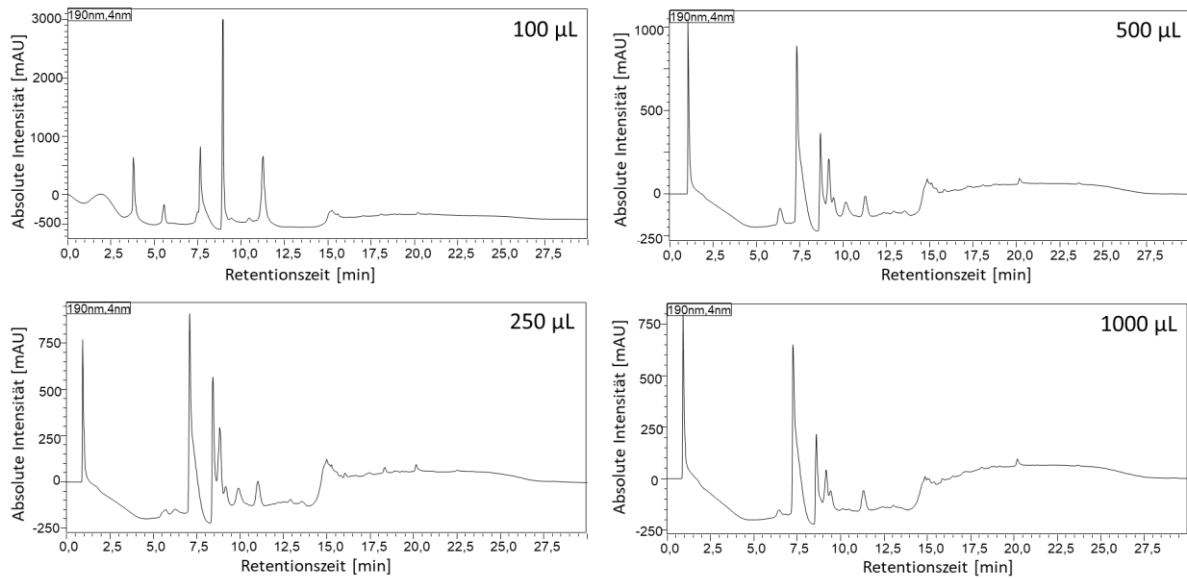


**Abbildung 3.25** HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). C: 100 µL TCA, D: 250 µL TCA. In blau: Kritischer Matrixbereich.

Den aufgenommenen HPLC-Chromatogrammen aller vier Proben des Erstversuches war zu entnehmen, dass im Zielbereich ab Minute 5 vor allem die Carrez-Klärung die zuvor vorhandenen Matrixpeaks nahezu vollständig entfernen konnte, wohingegen die Fällung mit Trichloressigsäure zwar ebenfalls zur Matrixreduktion beigetragen hat, aber immer noch einige Verunreinigungen im Chromatogramm zu sehen waren, welche mit den Analyten co-eluieren würden.

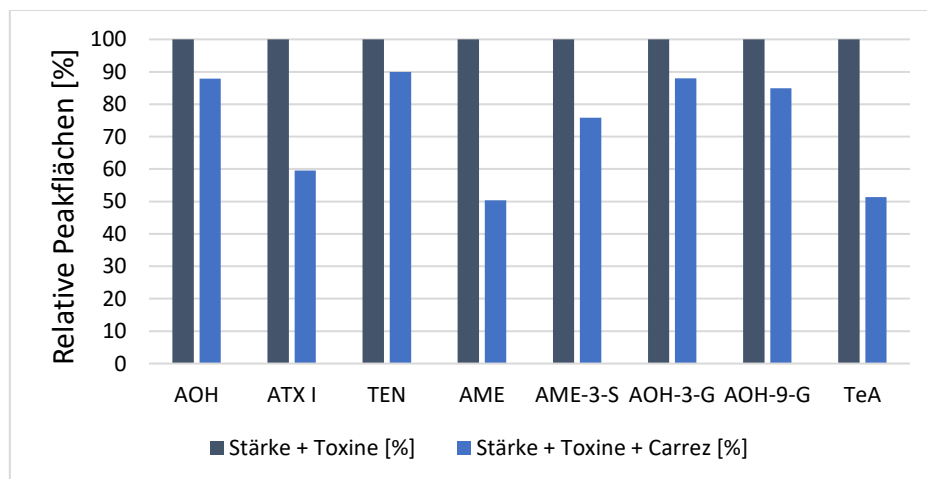
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Weiteren nur mit der Carrez Klärung gearbeitet. Die Fällung mit Carrez I und Carrez II Lösung wurde zum einen mit mehreren verschiedenen Volumina (100 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL und 1000 µL) an Carrez I und Carrez II Lösung durchgeführt, zum anderen wurden Toxinstandards dotiert, um mögliche Aufarbeitungsverluste zu überprüfen.

Die Zugabe verschiedener Volumina der Fällungsreagenzien zeigte, dass die Matrix durch ein Volumen von 250 µL anstatt 100 µL Carrez I und Carrez II weiter reduziert werden konnte, wohingegen höhere Volumina keinen weiteren Einfluss zu haben schienen (vgl. Abbildung 3.26). Die HPLC-Spektren bestätigten zudem die Reproduzierbarkeit der Matrixentfernung durch die Carrez-Klärung und zeigten zusätzlich, dass eine Zugabe von mehr als 250 µL der Fällungsreagenzien keine weiteren Vorteile bringt.



**Abbildung 3.26** HPLC-Chromatogramme (190 nm) nach Fällung mit verschiedenen Volumina an Carrez I und Carrez II Lösung. Die Fällung mit 750 µL ist nicht dargestellt, zeigte aber keine Unterschiede zur Fällung mit 500 µL und 1000 µL.

Zur Überprüfung der Eignung einer Carrez-Klärung wurden zwei Stärkeproben mit AOH, AME, TeA, ATX I, TEN, AME-3-S AOH-3-G und AOH-9-G versetzt und eine davon mit testweise 1000 µL Carrez-I und Carrez-II geklärt. Eine Auswertung der durch LC-MS/MS Messungen erhaltenen Peakflächen zeigte Verluste von fast allen Toxinen, die unter diesen Bedingungen vor allem für AME zu groß erschienen, um eine Carrez-Klärung weiterhin in Betracht zu ziehen.



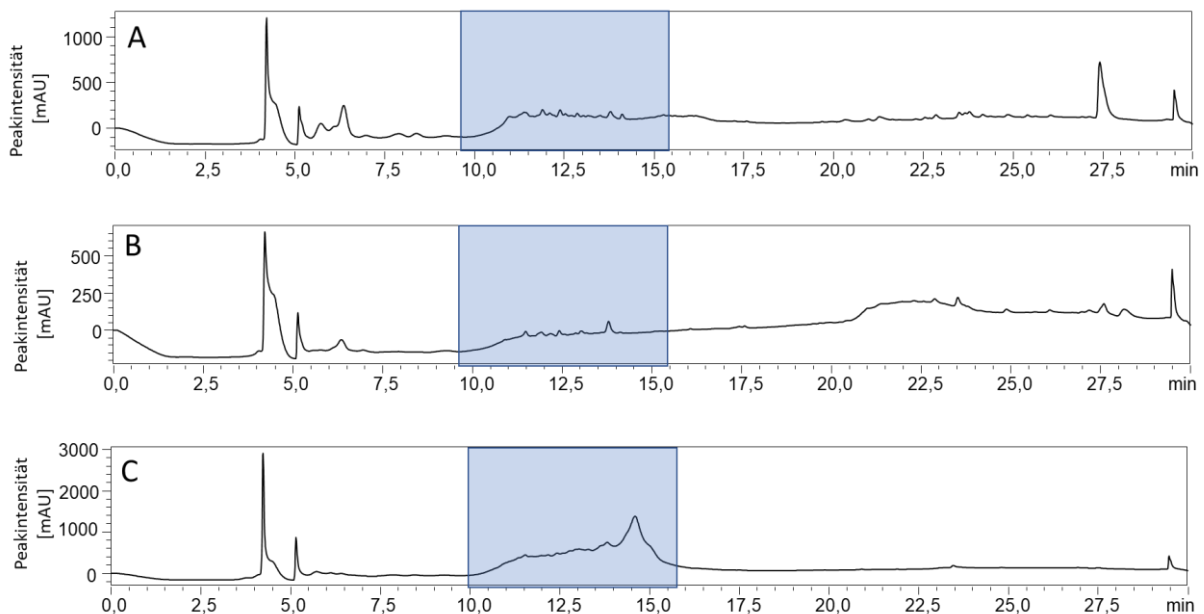
**Abbildung 3.27** Veranschaulichung der relativen Peakflächen mit und ohne Carrez-Klärung; die größere Peakfläche wurde hierbei als 100 % betrachtet.

Da *Alternaria* Toxine meistens in sehr kleinen Konzentrationen vorkommen, wurde auf weitere Optimierungen, sowie einen Dotierungsversuch mit 250 µL Fällungsreagenzien zu Gunsten anderer Modifikationen verzichtet.

### 3.5.1.3 Extraktionsoptimierung

Die Extraktionsoptimierung erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurde getestet, inwiefern verschiedene Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische Matrixbestandteile mitextrahieren, um bereits in diesem Schritt eine Vorauswahl für weitere Versuche treffen zu können. Geeignete Lösungsmittel wurden dann im nächsten Schritt auf ihre Extraktionsfähigkeit der *Alternaria* Toxine getestet und der Einfluss verschiedener Extraktionsdauern untersucht.

Eine Malzprobe wurde analog der Ausgangsmethode extrahiert (siehe 6.10.1), wobei jede der drei Extraktionen einzeln weiterbearbeitet wurde. Eine Auswertung der HPLC-Chromatogramme (siehe Abbildung 3.28) zeigte einen erhöhten Matrixanteil im dritten Extraktionsschritt, welcher neben Acetonitril und Wasser auch Methanol enthielt.

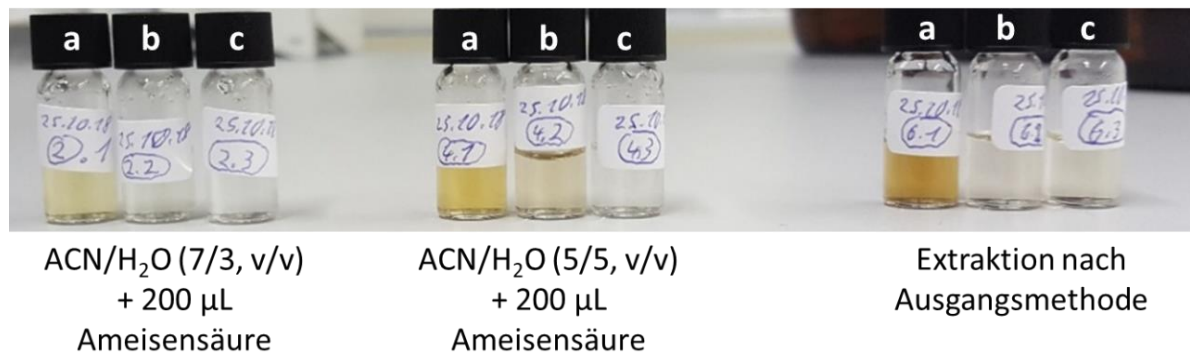


**Abbildung 3.28** HPLC-UV Messung (190 nm) der Einzelnextraktionen der Ausgangsmethode. A: 1. Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v), B: 2. Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v), C: 3. Extraktion mit ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O (50/25/25, v/v/v). In Blau: kritischer Matrixbereich.

Basierend auf diesen Ergebnissen, sowie der Tatsache, dass die Glucosidverbindungen AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G nach aktuellem Stand möglicherweise nicht in Methanol stabil sind (Mikula et al. 2013), wurde im Folgenden eine Extraktionsmethode gesucht, die ohne Verwendung von Methanol reproduzierbare Ergebnisse mit hohen Wiederfindungsraten liefert.

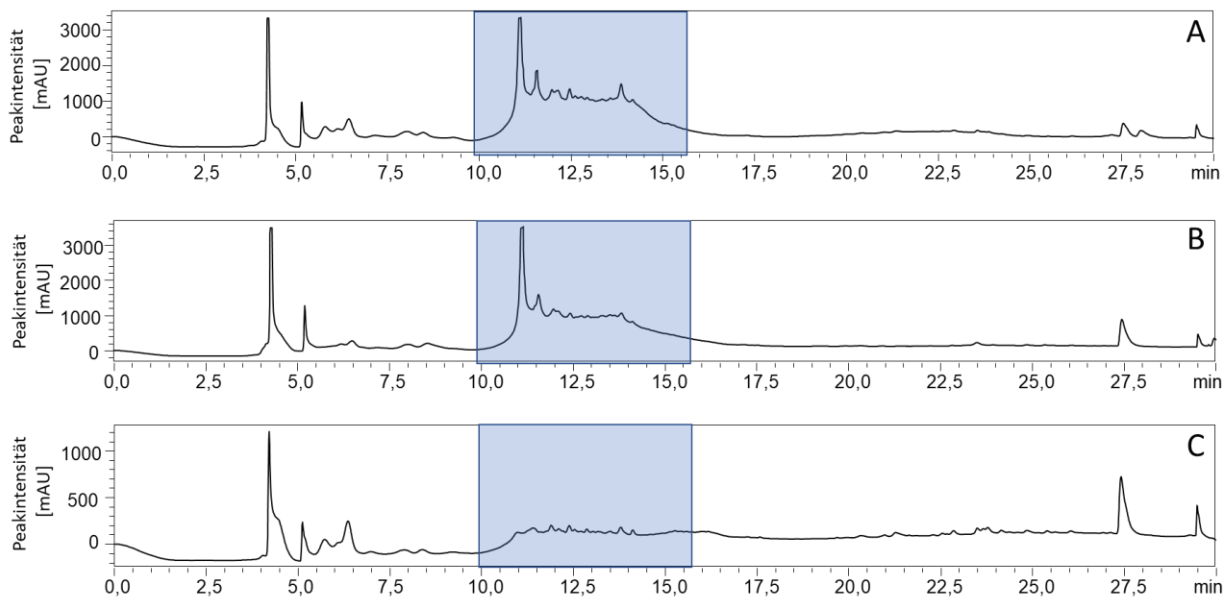
Somit wurde zunächst eine Probe in Doppelbestimmung dreimal mit ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) + 200 µL Ameisensäure und eine weitere Probe in Doppelbestimmung mit ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v) + 200 µL Ameisensäure extrahiert. Hierbei wurde je eine Bestimmung vereint als

Gesamtextraktion analysiert, wohingegen bei der anderen Bestimmung die drei Extraktionsschritte einzeln betrachtet wurden. Zur Überprüfung des Säureanteils an der Matrixextraktion wurde zudem noch einmal die Extraktion der Ausgangsmethode ohne Säurezusatz untersucht.



**Abbildung 3.29** Färbung der Proben nach Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln. a: erste Extraktion, b: zweite Extraktion, c: dritte Extraktion.

Wie in Abbildung 3.29 zu sehen ist, hatte die Wahl des Extraktionsmittels einen erheblichen Einfluss auf die Farbe der zu messenden Probe, was ein Indikator für die Menge an mitextrahierter Matrix sein könnte. Zu beobachten war vor allem, dass während der ersten Extraktion die größten Verfärbungen auftraten und somit vermutlich die meiste Matrix in diesem Schritt mitextrahiert wurde. Des Weiteren zeigte sich die Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) als nicht praktikabel, da es hier beim Entfernen des Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zu einer starken Schaumbildung kam, welche auch in zwei Wiederholungsversuchen an anderen Tagen auftrat, sodass es sich hierbei wohl um eine ungünstige Zusammensetzung des Extraktionsgemisches für diese Matrix handelt. Auch die gemessenen HPLC-Chromatogramme bei 190 nm zeigten bei dieser Lösungsmittelvariation mehr Matrixpeaks als die anderen Kombinationen, sodass der Fokus auf einem geringeren Wasseranteil im Extraktionsmittel lag.

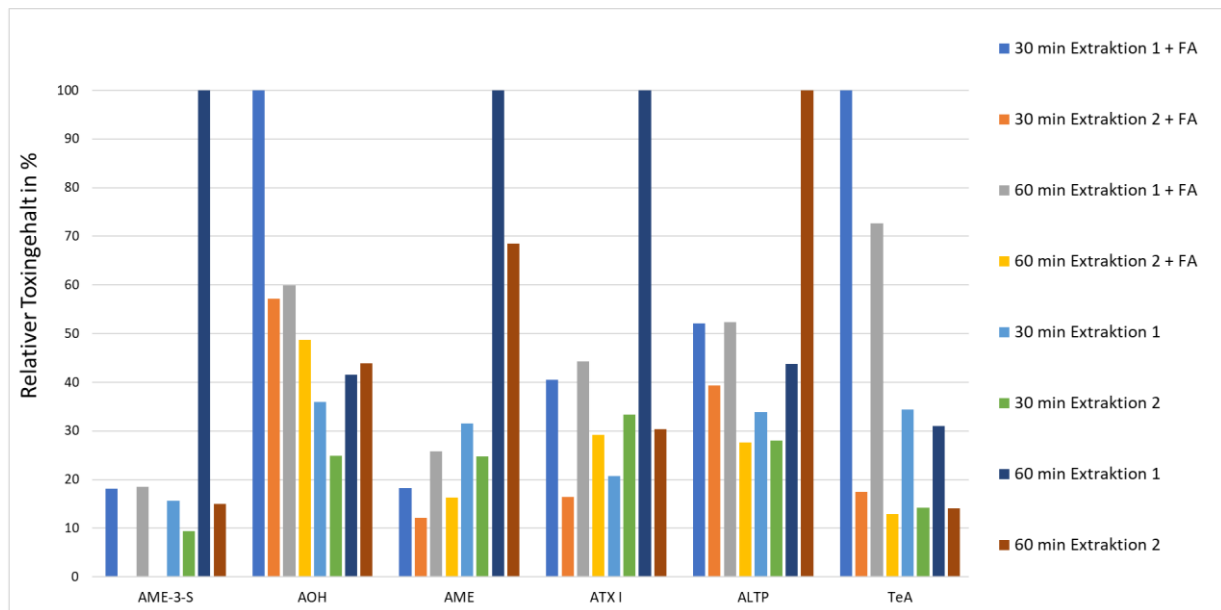


**Abbildung 3.30** HPLC-UV Messung (190 nm) der Extraktionen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen. A: 1. Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (50/50, v/v), B: 2. Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (75/25, v/v), C: 3. Extraktion mit ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v). In Blau: kritischer Matrixbereich.

Bis auf die dritte Extraktion der Ausgangsmethode zeigten die anderen Variationen geringe Matrixanteile, sodass im Weiteren die Extraktionen mit ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v) und ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) jeweils mit und ohne Säurezugabe im Fokus standen.

Neben der Lösungsmittelwahl beeinflussen auch Faktoren wie die Extraktionsdauer, die Anzahl der Extraktionen sowie der Säureanteil den Matrixanteil in der Probe, aber auch die Menge an extrahierten *Alternaria* Toxinen. Erste Versuche zeigten hier ein höheres Extraktionspotential von ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) als ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v), sodass die weiteren Optimierungsschritte mit diesem Lösungsmittel erfolgten.

Getestet wurden für dieses Lösungsmittel nun Schütteldauern von 30 min bzw. 60 min, sowie einmal ein Säurezusatz (200 µL Ameisensäure) und einmal kein Säurezusatz. Die Extraktionsanzahl wurde zunächst auf zwei Extraktionen festgelegt, sodass durch die Einzelanalytik eines jeden Schrittes insgesamt 8 Proben gemessen werden konnten. Nach LC-MS/MS Messung jeder Probe konnte zunächst festgestellt werden, dass die Säurezugabe keinen Einfluss auf die extrahierte Matrix, aber auf die extrahierten Toxine zu haben schien: Während für AME-3-S, AME, ATX I sowie ALTP nach 60 Minuten Extraktion ohne Säurezusatz die besten Resultate erzielt werden konnten, benötigten vor allem AOH und TeA ein saures Extraktionsmittel, wohingegen die Schütteldauer einen geringeren Einfluss zu haben schien.



**Abbildung 3.31** Relativer Toxingehalt bei variierenden Extraktionsmittelzusammensetzungen und Extraktionszeiten. Berechnung des relativen Toxingehaltes durch Bezug auf die jeweils höchste Toxinkonzentration (= 100 %).

Somit wurde für den ersten Extraktionsschritt eine Dauer von 60 min ohne Säurezusatz zu ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) festgelegt, wohingegen für einen zweiten Extraktionsschritt ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure und eine Dauer von 30 min verwendet wurde. Die Menge an Säurezusatz wurde bereits für die Ausgangsmethode optimiert, sodass hier keine weiteren Variationen getestet wurden.

Um eine vollständige Extraktion der Toxine zu gewährleisten, wurden zwei natürlich belastete Malzproben noch ein drittes und viertes Mal analog dem zweiten Extraktionsschritt extrahiert. Die LC-MS/MS Messungen zeigten hierbei im 3. Extraktionsschritt noch geringe Mengen an *Alternaria* Toxinen, wohingegen im vierten Extraktionsschritt keine Toxine mehr detektiert wurden. Da *Alternaria* Toxine nur in geringen Mengen auftreten, wurde beschlossen den dritten Extraktionsschritt in die Aufarbeitung aufzunehmen, um bestmögliche Wiederfindungen der Toxine zu erzielen.

Da es bei der Optimierung der Extraktion nicht möglich war die Matrix ausreichend zu reduzieren und zeitgleich möglichst effizient alle *Alternaria* Toxine zu extrahieren, sollte im weiteren Verlauf der Aufarbeitung die störende Matrix mittels SPE entfernt werden.

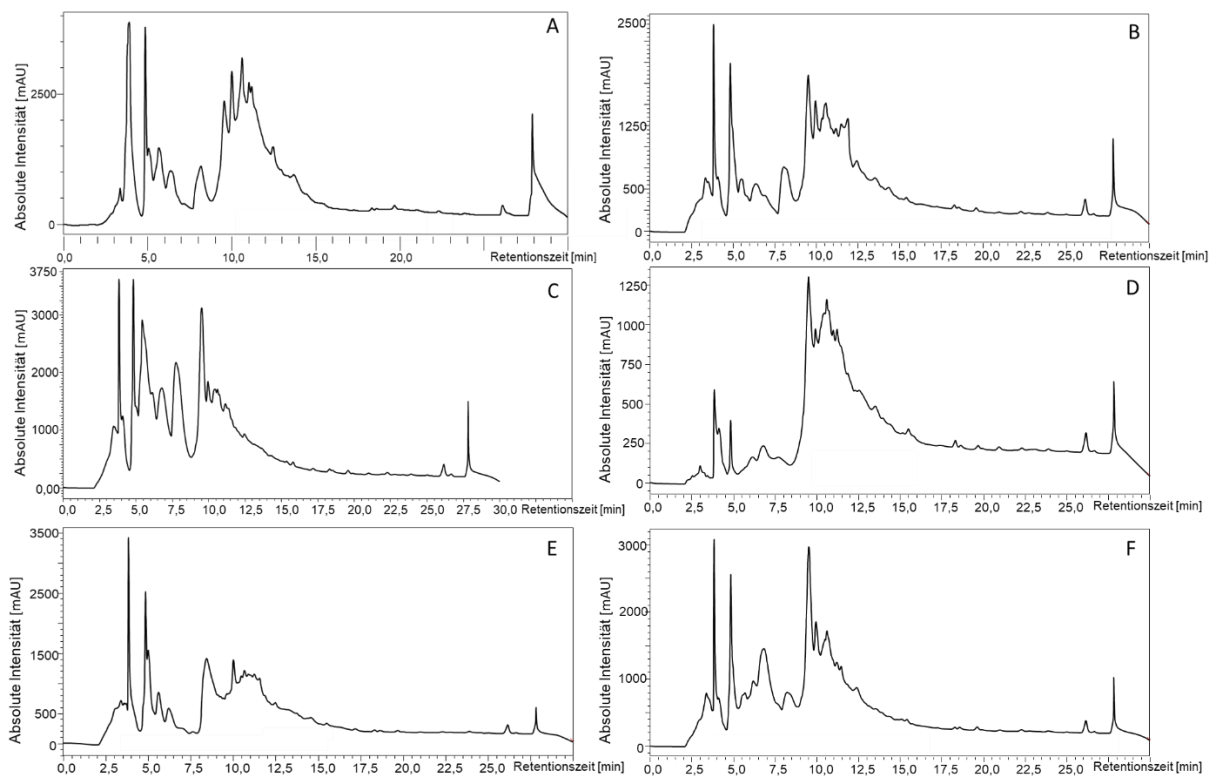
#### 3.5.1.4 Wahl der SPE – Kartusche

Im Gegensatz zu einigen *Fusarium* Toxinen gibt es nach aktuellem Stand noch keine speziell für die *Alternaria* Analytik entwickelten SPE-Kartuschen oder Säulenmaterialien, sodass auf herkömmliche Produkte zurückgegriffen werden musste. Bei der Wahl der SPE Kartusche lag

deswegen hauptsächlich die jeweilige Matrixbelastung im Fokus der Analytik, da die Retention der *Alternaria* Toxine an den meisten herkömmlichen Säulenmaterialien als gegeben betrachtet werden konnte.

Getestet wurden zusätzlich zur Discovery DSC-18 (500 mg/6 mL) Kartusche aus der Ausgangsmethode folgende Kartuschentypen: Discovery DSC-8 (500 mg/3 mL), Discovery DSC-CN (500 mg/3 mL), Strata-X Reversed Phase (500 mg, 6 mL), Supelclean ENVI-Chrom P (500 mg/6 mL) und Chromabond HLB (500 mg/3 mL).

Für die SPE Aufreinigung wurden die Kartuschen nach bisherigem *Alternaria* Standardprotokoll mit einem Säulenvolumen Methanol und einem Säulenvolumen Wasser konditioniert, nach Probenauftrag mit zwei Säulenvolumina Wasser gewaschen und letztendlich mit zwei Säulenvolumina Methanol eluiert. Alle Schritte wurden einzeln aufgefangen und mittels HPLC-UV gemessen (siehe Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32** HPLC-Chromatogramme (190 nm) des ersten Elutionsschrittes mit 6 mL Methanol nach Aufreinigung mit verschiedenen Kartuschen. A: Discovery DSC-18, B: Strata-X Reversed Phase, C: Supelclean ENVI-Chrom P, D: Discovery DSC-CN, E: Chromabond HLB, F: Discovery DSC-8.

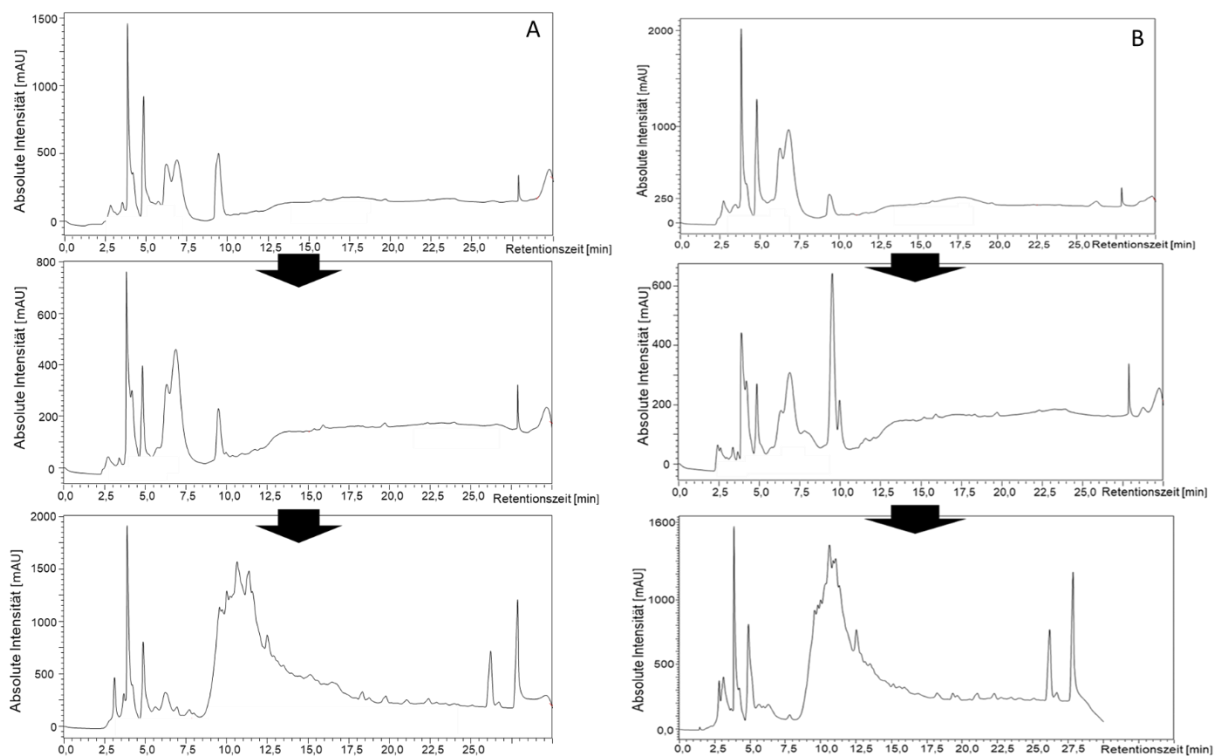
Die Matrixbelastung des Elutionsschrittes war zwar bei der Discovery DSC-CN, Discovery DSC-8 und Chromabond HLB am geringsten, jedoch zeigte keine der neu getesteten SPE-Säulen eine signifikant bessere Abtrennung der Matrix als die bereits etablierte Discovery

DSC-18 Kartusche. Aus diesem Grund wurde der Ansatz ein anderes Trennmateriale zu verwenden nicht weiterverfolgt und stattdessen weitere Optimierungsversuche mit der Discovery DSC-18 durchgeführt.

### 3.5.1.5 Optimieren des SPE – Ablaufes

In dem vorausgehenden Kartuschentest konnte gezeigt werden, dass die aktuell verwendeten Waschschriffe mit Wasser nicht in der Lage sind die Matrix ausreichend zu entfernen, weswegen diese nun genauer betrachtet und optimiert werden sollten.

Im ersten Schritt wurden zwei Proben analog der Standardmethode aufgearbeitet, jedoch wurden die Waschschriffe mit 5 % MeOH bzw. 5 % ACN anstatt mit Wasser durchgeführt. Der geringe Organikanteil im Wasser sollte hierbei die Matrix von der Säule entfernen ohne zeitgleich die polaren Toxine AOH-3-S und AME-3-S zu eluieren. Die Waschschriffe sowie die Elution wurden getrennt gesammelt und bis zur HPLC Analytik weiterbearbeitet.

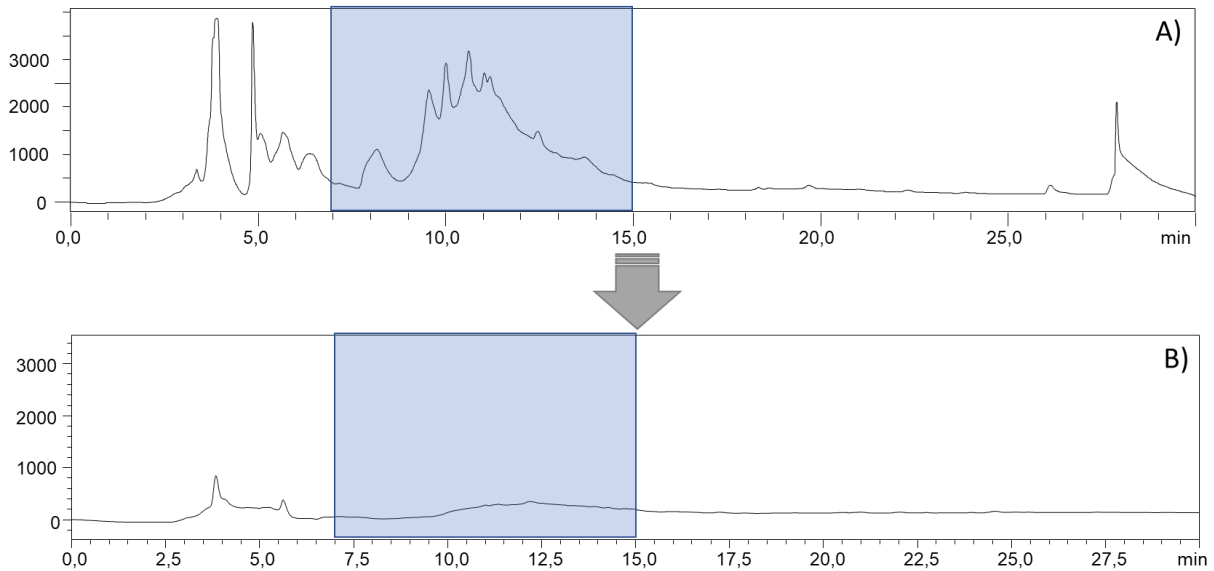


**Abbildung 3.33** HPLC-Chromatogramme (190 nm) der Waschschriff Variation mit MeOH (A) und ACN (B). Oben: 1. Waschschriff, Mitte: zweiter Waschschriff, Unten: Elution.

Die HPLC-Chromatogramme (siehe Abbildung 3.33) zeigten, dass mit beiden Lösungsmitteln bereits im Waschschriff Matrix zu sehen ist, der Großteil jedoch weiterhin im Elutionsschriff zu finden bleibt. Generell war die Elutionskraft für Acetonitril geringfügig besser als für Methanol, sodass in Versuchen der Fokus auf diesem Lösungsmittel lag.



Durch Verwendung von 15 % bzw. 20 % ACN in Wasser als zweiten Waschschritt konnte die Matrix fast vollständig entfernt werden (siehe Abbildung 3.34), jedoch wurden beim Waschen einer dotierten Probe mit dem höheren Organikanteil Rückstände der AOH-Sulfate in der Waschlösung gefunden, sodass sich die Verwendung von 15 % ACN als beste Möglichkeit zur Reduktion der Matrix ohne Verluste der polaren *Alternaria* Toxine erwies.



**Abbildung 3.34** HPLC-Chromatogramm (190 nm) des Elutionsschrittes der SPE-Optimierung: A: nach Waschen mit zwei Säulenvolumen (12 mL) H<sub>2</sub>O, B: nach Waschen mit 6 mL H<sub>2</sub>O und 6 mL ACN/H<sub>2</sub>O (15/85, v/v). In blau: kritischer Matrixbereich.

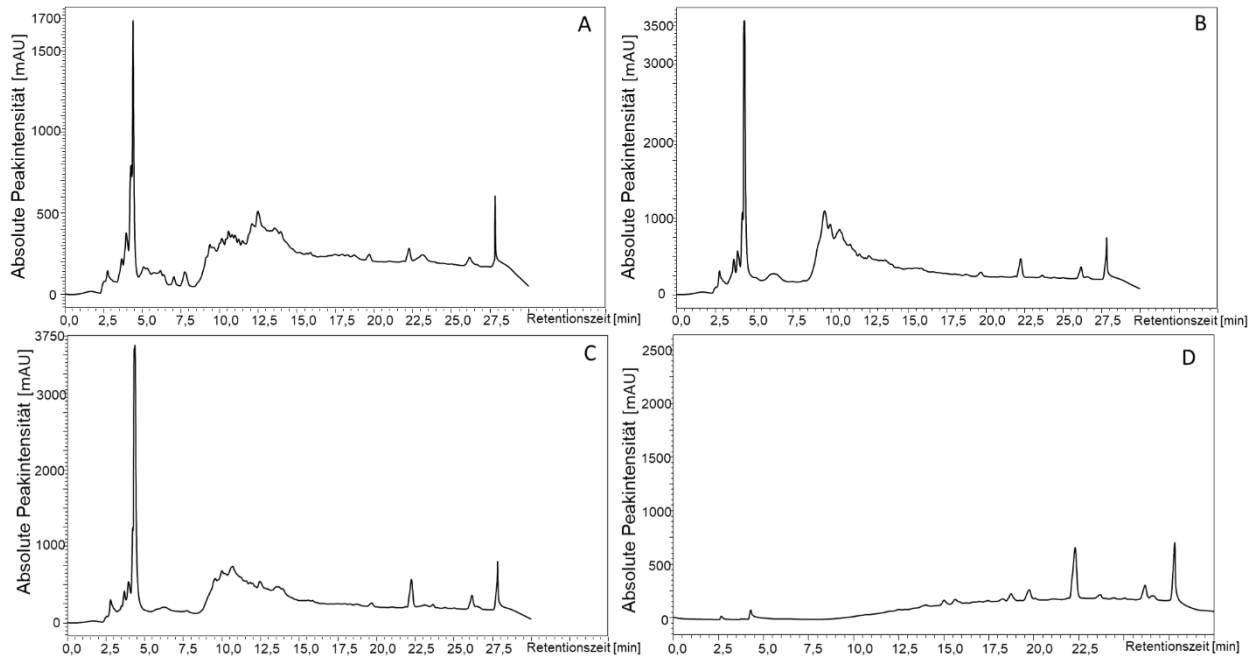
### 3.5.1.6 Wahl des Aufnahmelösungsmittels

Parallel zu den anderen Optimierungsversuch sollte der Einfluss des Aufnahmelösungsmittels für die LC-MS/MS Messungen untersucht werden. Da die Lösungsmittelkombination der ursprünglichen Methode mit MeOH und Wasser (1/1, v/v) nicht den verwendeten LC-MS/MS Fließmitteln entsprach und auch der Organikanteil der neuen LC-MS/MS Methode bei 10 % lag, schien es sinnvoll andere Lösungsmittelgemische zu testen, vor allem da nach aktuellem Forschungsstand die Stabilität der Glucoside in Methanol noch unklar ist (Mikula et al. 2013).

Getestet wurden anhand einer Malzprobe folgende Aufnahmelösungsmittel: 100 % Acetonitril, Acetonitril/Wasser (7/3, v/v), Acetonitril/Wasser (1/1, v/v), Acetonitril/Wasser (3/7, v/v). Die Aufarbeitung der Probe wurde bereits mit der optimierten Extraktionsmethode durchgeführt, jedoch mit der ursprünglichen SPE-Aufreinigung. Die Aufnahme der Toxine erfolgte mit 1 mL des jeweiligen Lösungsmittelgemisches.

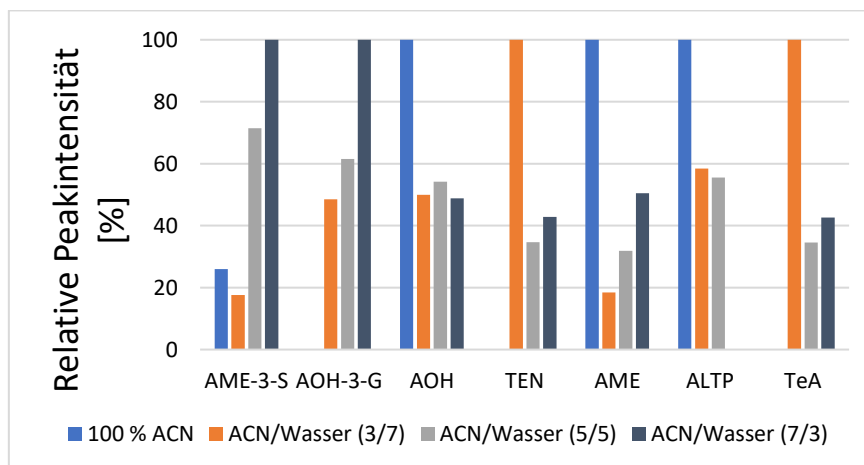
Bezüglich der Matrixbelastung kann Abbildung 3.35 entnommen werden, dass vor allem die Verwendung von reinem Acetonitril kaum Matrixreste löst und diese Proben direkt am LC-

MS/MS gemessen werden könnten. Bei den anderen Proben war festzustellen, dass das Lösungsmittelgemisch ACN/H<sub>2</sub>O (3/7) eine geringere absolute Peakintensität im Bereich um 10 Minuten hervorrief als die anderen beiden Mischungen, wobei der Unterschied nur minimal zu sein scheint.



**Abbildung 3.35** HPLC-Chromatogramme (190 nm) vier verschiedener Aufnahmelösungsmittel. A: ACN/H<sub>2</sub>O (3/7, v/v), B: ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v), C: ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v), D: ACN.

Zum Testen des Toxinverhaltens wurde eine natürlich belastete Gerstenprobe viermal aufgearbeitet, in den oben genannten Lösungsmitteln gelöst und am LC-MS/MS vermessen. Die erhaltenen Peakflächen wurden, wie in Abbildung 3.36 dargestellt, miteinander in Relation gesetzt und der maximal gemessene Toxingehalt als 100 % definiert.



**Abbildung 3.36** LC-MS/MS Vergleich vier verschiedener Aufnahmelösungsmittel.

Wie erwartet konnte in der Probe in reinem ACN keine Tenuazonsäure gefunden werden, da sich dieses Toxin bereits in anderen Versuchen als in ACN unlöslich gezeigt hat. Die anderen drei Fließmittel waren grundsätzlich relativ ähnlich, vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass lediglich eine Einfachbestimmung in Einfachinjektion durchgeführt wurde, sodass die erhaltenen Werte natürlicherweise Schwankungen unterliegen. Auch die Tatsache, dass ALTP nicht in dem ACN/Wasser Verhältnis von 7/3 detektierbar war, sollte an anderen Faktoren liegen, da dieses Toxin in allen anderen Kombinationen, sowie in reinem ACN ein gutes Signal erzeugte. Zu erwähnen ist zudem, dass die Signale bei allen Toxinen relativ niedrig waren, da *Alternaria* Toxine meist nur in geringen Mengen vorkommen, sodass kleine Peakflächenunterschiede bereits größere prozentuale Abweichungen bewirken können. Auf eine Reduzierung des Aufnahmevolumens von 1 mL auf z.B. 200 µL zur Aufkonzentrierung der Toxine wurde aufgrund der Matrixproblematik verzichtet.

Letztendlich fiel die Wahl auf das Lösungsmittel ACN/Wasser (3/7, v/v), da dies ein guter Kompromiss aus reduzierter Matrixbelastung und Toxinausbeute schien. Auch die Peakformen waren mit diesem Lösungsmittel am symmetrischsten, was durch die Ähnlichkeit des Organikanteil zu dem der Messmethode erklärt werden könnte.

#### 3.5.1.7 Zugabe an internem Standard

Zur Ermittlung der geeigneten Menge an internem Standard wurde eine Probe dreifach eingewogen, mit je 50 µL, 100 µL und 150 µL [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N] - TeA (0,1 µg/mL), [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AOH (0,1 µg/mL) und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AME (0,01 µg/mL) versetzt und aufgearbeitet. Nach LC-MS/MS Messung wurden die Peaks bezüglich Form und Intensität beurteilt. Für [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AOH und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AME schienen 50 µL nicht ausreichend zu sein, um eine gute Peakform und angemessene Intensitäten zu erzielen, wohingegen sich sowohl 100 µL und 150 µL Zugabe als geeignet erwiesen haben. Aufgrund der erwarteten niedrigen Konzentrationen, sowie den teuren markierten Standards, wurde das Zugabevolumen für AOH und AME in der Routineanalytik auf 100 µL festgelegt. Für TeA wären bereits 50 µL Zugabe für eine angemessene Peakform und -intensität ausreichend gewesen, jedoch fiel auch hier die Wahl des Zugabevolumens auf 100 µL, um auch bei den erwarteten hohen Konzentrationen Stoffmengenverhältnisse im Bereich der Responsegeraden zu erzielen.

#### 3.5.1.8 Sonstige Optimierungsversuche

Zusätzlich wurden verschiedene Membranfilter mit Porengrößen zwischen 0,1 µm und 0,45 µm getestet, jedoch konnte die Matrix auch durch Verwendung eines 0,1 µm Filters mit definierter konstanter Porengröße nicht reduziert werden, sodass die Wahl letztendlich auf den 0,22 µm PVDF-Filter fiel. Auch Veränderungen der Zentrifugationstemperatur und -dauer,

sowie die Verwendung eines Filtrationsschrittes anstelle der dritten Zentrifugation zeigten keine weiteren Verbesserungen bezüglich Toxinausbeute und Matrixbelastung.

### **3.5.2 Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Bierproben**

Für die Entwicklung einer Methode zur *Alternaria* Toxinanalytik in Bier wurden verschiedene Methoden aus Publikationen zur Bestimmung von *Fusarium* Toxinen herangezogen, da *Alternaria* Toxine in dieser Matrix bisher kaum berücksichtigt wurden.

#### *3.5.2.1 Dilute and Shoot Methode*

Da flüssige Proben generell eine bessere Basis für Dilute and Shoot Methoden bilden, wurde eine Bierprobe analog der Vorgehensweise für Aflatoxine und *Fusarium* Toxine von Al-Taher et al. (2013) entgast, verdünnt und mittels LC-MS/MS gemessen. Wie erwartet lieferte dieser Ansatz erneut keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da auch hier aufgrund mangelnder Geräteempfindlichkeit die Nachweisgrenzen der *Alternaria* Toxine weit über den zu erwarteten Gehalten liegen würden. Positiv hervorzuheben wäre lediglich, dass es durch die Verdünnungsstufe zu keinen im UV sichtbaren Matrixverunreinigungen kam.

#### *3.5.2.2 QuEChERS Aufreinigung*

Testweise wurde ebenfalls eine QuEChERS Extraktion in Anlehnung an Miró-Abella et al. (2017) und Juan et al. (2017) ausprobiert, indem 1,8 g Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) und 1 g Natriumchlorid (NaCl) zu 4 mL einer Bierprobe gegeben wurden (siehe 6.11.2).

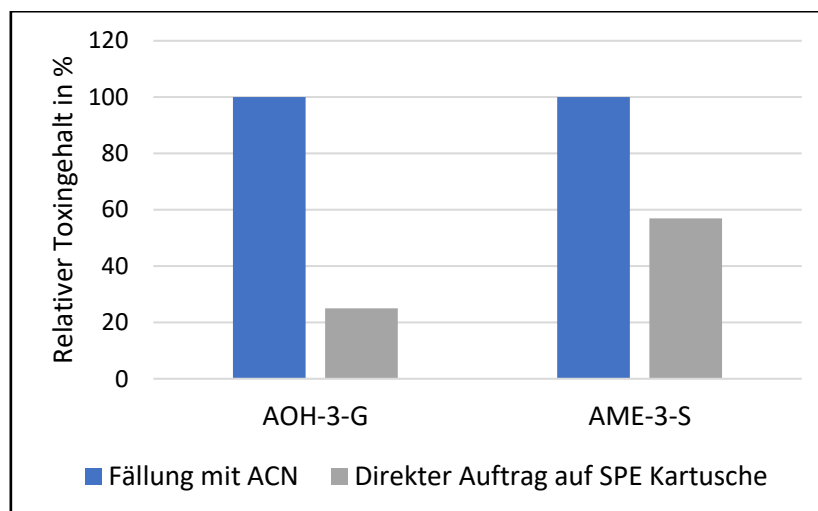
Dieser Ansatz zeigte zwar vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Toxinextraktion, jedoch war die Matrixbelastung dieser Proben um einiges höher als bei Fällungsversuchen (siehe 3.5.1.4). Da bei den Ansätzen mittels Matrixfällung ebenfalls zufriedenstellende Wiederfindungen der Toxine erhalten wurden, wurde auf weitere Tests mit QuEChERS-Aufarbeitung verzichtet.

#### *3.5.2.3 Direkte SPE Aufreinigung*

Ein weiterer, zunächst vielversprechender Ansatz war der direkte Auftrag des Bieres auf eine SPE-Kartusche. Hierfür wurden erneut analog der Gerstenmethode die Discovery DSC-18 Kartuschen verwendet, welche zunächst mit Methanol und Wasser konditioniert wurden, bevor verschiedene Volumina (5, 10, 15 und 20 mL) einer entgasten Bierprobe aufgetragen wurden. Die Durchlässigkeit der SPE-Kartusche nahm im Verlauf des Probenauftrags vor allem bei den höheren Volumina schnell ab, da die vorher nicht entfernte Matrix vermutlich die Säule verstopfte und es somit lange dauerte, bis die komplette Probe durchgelaufen war.

Spätere chromatographische Analysen zeigten zudem eine zu hohe Matrixbelastung bei allen getesteten Volumina außer dem Ansatz mit 5 mL Probe.

Anhand eines Dotierversuches mit AOH, AME, TEN und TeA wurde nun das direkte Auftragen von 5 mL Bier auf die SPE-Kartusche weiter untersucht und mit den in 3.5.2.4 beschriebenen Methoden verglichen. Hier konnten zunächst gute Ergebnisse erzielt werden, da vor allem für AOH, TEN und TeA nahezu identische Ergebnisse im Vergleich zu einer Matrixfällung mit ACN erhalten wurden und auch AME nur geringfügig niedrigere Signalflächen erzeugte, welche letztendlich durch die Verwendung des isotopenmarkierten Standards kompensiert worden wären. Eine Wiederholung dieses Versuches mit höheren Dotiervolumina bestätigte diese Ergebnisse und zeigte sogar eine höhere Wiederfindung für AOH als nach vorausgehender Matrixfällung. Erst ein weiterer Dotierversuch mit den modifizierten Toxinen AOH-3-G und AOH-3-S führte zu der Entscheidung, den Ansatz der direkten Probenaufgabe auf die SPE-Kartusche nicht weiter zu verfolgen, da es hier zu gravierenden Verlusten kam (siehe Abbildung 3.37).



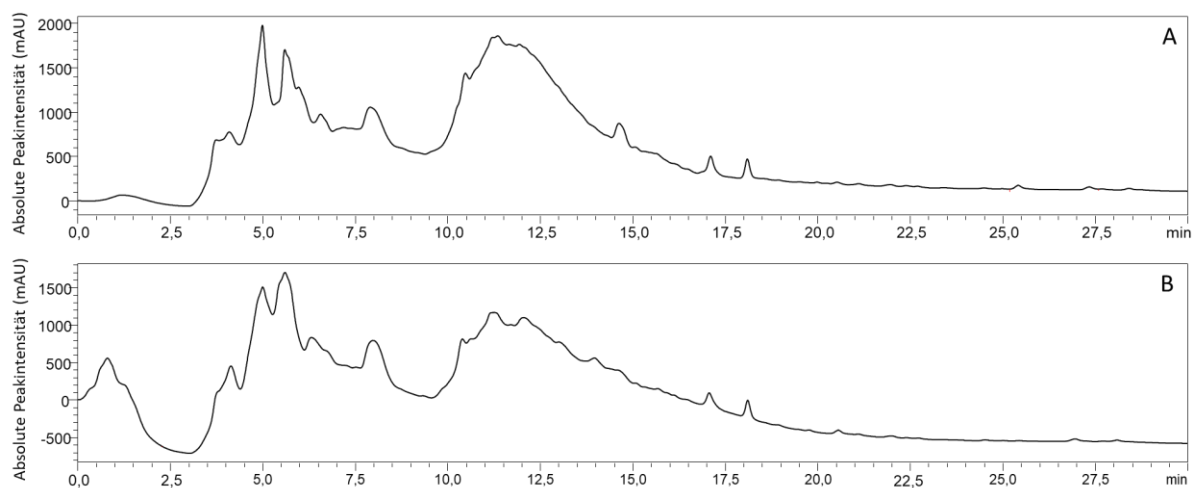
**Abbildung 3.37** Vergleich der erhaltenen Signalflächen für AOH-3-G und AME-3-S nach Matrixfällung und nach direktem Probenauftrag auf die SPE-Kartusche, jeweils bezogen auf den größten Wert.

Diese Verluste weisen darauf hin, dass sich der im Bier enthaltene Alkohol womöglich nachteilig auf die Bindung der stark polaren modifizierten Toxine an die C18-Phase auswirkt oder dass andere Interferenzen zwischen Analyt, Matrixbestandteilen und Säulenmaterial vorliegen. Auch Versuche den Alkohol im Voraus durch Destillation aus der Probe zu entfernen scheiterten, sodass dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt wurde.

### 3.5.2.4 Matrixfällung und Wahl des Probenvolumens

Analog der Probenaufarbeitung zur Bestimmung von *Fusarium* Toxinen in Bier von Habler et al. (2017), wurde eine Matrixfällung in Betracht gezogen.

Um zeitgleich eine geeignete Probenmenge zu bestimmen, wurden fünf verschiedene Volumina Bier (1 mL; 2,5 mL; 5 mL; 7,5 mL und 10 mL) einmal mit der identischen und einmal mit der doppelten Menge ACN versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war der Überstand bei allen im Verhältnis 2:1 (ACN/Bier, v/v) gefällten Proben klar, wohingegen bei den im Verhältnis 1:1 (ACN/Bier, v/v) gefällten Proben der Überstand noch leicht trüb bzw. gelblich war und somit nicht die komplette Matrix gefällt werden konnte. Diese optische Beobachtung konnte durch HPLC-Messungen nur bedingt belegt werden, da die maximale Intensität der im Verhältnis 1:1 (ACN/Bier, v/v) gefällten Proben nur geringfügig höher war als in der anderen Probe (siehe Abbildung 3.38).



**Abbildung 3.38** HPLC-Chromatogramme nach Matrixfällung im Verhältnis 1:1 (A) und 2:1 (B) (ACN/Bier, v/v).

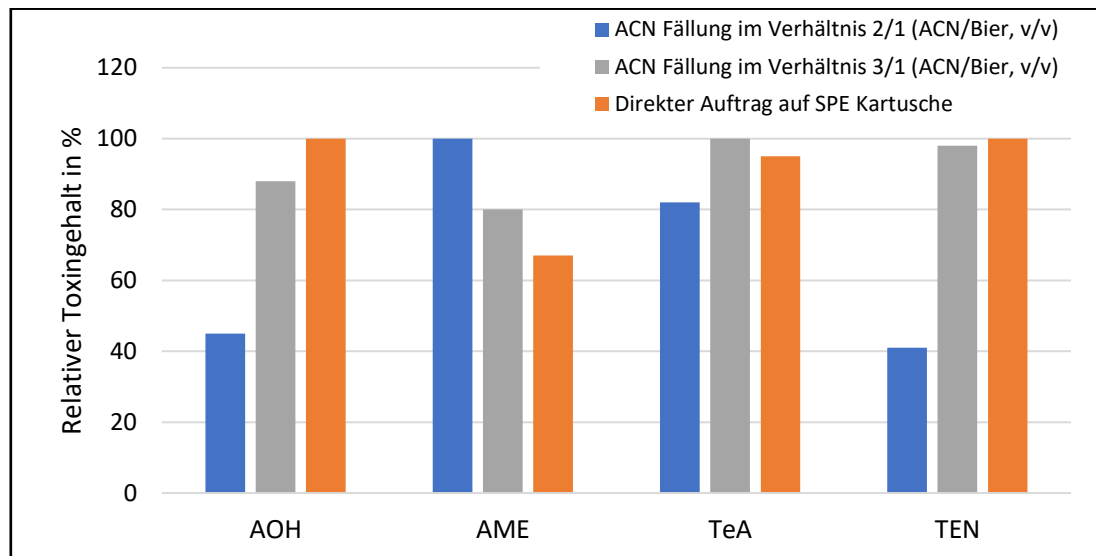
Da die verwendeten Probenvolumina von 7,5 mL und 10 mL in beiden Fällen eine zu große Matrixbelastung zeigten und zudem der höhere Verbrauch an Acetonitril nicht gerechtfertigt gewesen wäre, wurden 5 mL als Probenvolumen festgelegt.

Neben Acetonitril wurden auch Fällungen mit iso-Propanol, Methanol und Aceton im Verhältnis 2:1 (Lösungsmittel/Bier, v/v) getestet, jedoch gelang die Matrixabtrennung mit Acetonitril am besten.

Ebenso wurde ein höheres Volumen von Acetonitril getestet, mit dem Ergebnis, dass ein Verhältnis von 3:1 (ACN/Bier, v/v) bessere Ergebnisse bezüglich Störkomponenten lieferte als

ein Verhältnis von 2:1 (ACN/Bier, v/v) und noch höhere ACN Mengen keinen weiteren Einfluss auf die Probe zu haben scheinen.

Um durch die Matrixfällung induzierte Toxinverluste zu überprüfen, wurde die Fällung mit ACN in den Verhältnissen 2:1 und 3:1 (Lösungsmittel/Bier, v/v) anhand von mit AOH, AME, TeA und TEN dotierten Bierproben wiederholt, die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 3.39 dargestellt.



**Abbildung 3.39** Relativer Toxingehalt in dotiertem Bier nach Fällung mit ACN sowie nach direktem Auftrag des Bieres auf die SPE-Kartusche.

Generell konnten mit einer Fällung im Verhältnis 3:1 (ACN/Bier, v/v) die besseren Toxinausbeuten erzielt werden können, insbesondere für AOH und TEN. Im Rahmen dieses Versuches war nur der AME Gehalt bei der Fällung mit weniger ACN höher, jedoch ist der Unterschied hinsichtlich Messunsicherheiten der Einfachbestimmung als gering einzustufen. Auch ein erneutes Dotierexperiment mit den modifizierten Formen AOH-3-G und AME-3-S lieferte zufriedenstellende Resultate für das ACN/Bierverhältnis von 3:1 (v/v), sodass in den nächsten Optimierungsschritten stets zuerst eine Matrixfällung mit 15 mL ACN auf 5 mL Bier durchgeführt wurde.

#### 3.5.2.5 Rückstandsextraktion

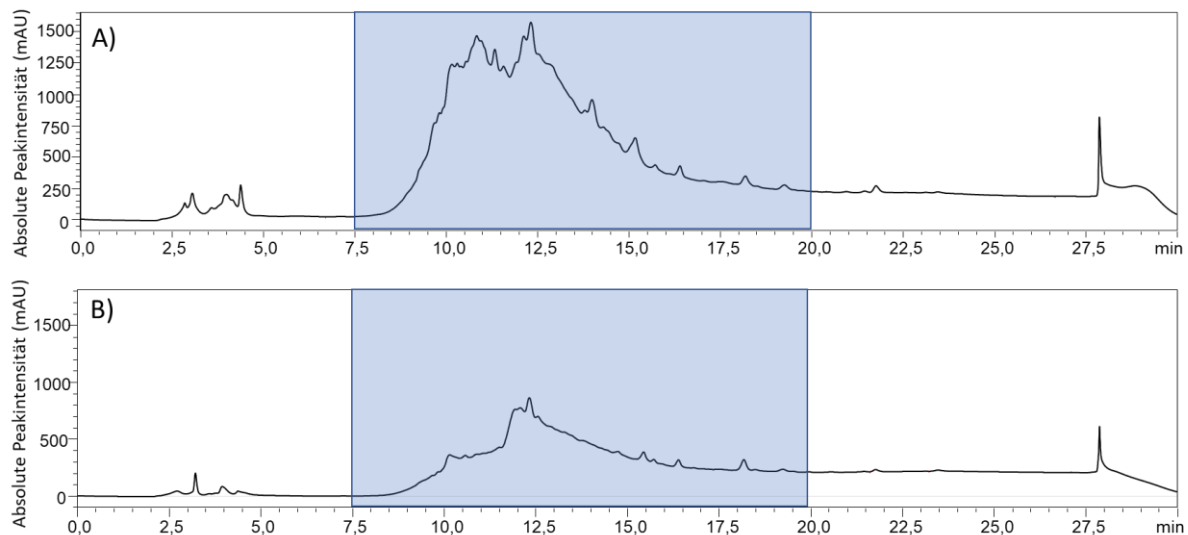
Da in vorherigen Dotierversuchen oftmals ein reduzierter Toxingehalt nach dem Fällen beobachtet wurde, wurde nun testweise der nach dem Zentrifugieren erhaltene Rückstand zweier verschieden dotierter Proben mit je 10 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) für 15 Minuten auf dem Horizontalschüttler extrahiert, zentrifugiert und der Überstand separat weiterbehandelt. Qualitative LC-MS/MS Messungen zeigten Rückstände von AME, TeA und AOH-3-G, sodass dieser Extraktionsschritt in der finalen Aufarbeitungsmethode beibehalten wurde, um die

Wiederfindungen dieser Toxine zu erhöhen. Auf eine weitere Optimierung wurde aufgrund der Ergebnisse der Gerstenextraktion (siehe 3.5.1.3) verzichtet.

### 3.5.2.6 Matrixreduktion durch Cyclohexan

Der in der Gerstenaufarbeitung eingeführte SPE-Waschschrift mit 15 % ACN reichte für die Bierproben nicht aus, um die Matrix vollständig zu entfernen, jedoch war die Matrixbelastung hier wesentlich geringer als bei Durchführung des Waschschriftes mit Wasser. Um eine weitere Reinigung der Probe zu erzielen, wurde eine Flüssig-Flüssig Extraktion mit Cyclohexan getestet, welche in der Lebensmittelanalytik oftmals mit Hexan als Entfettungsschritt verwendet wird (Walravens et al. 2014; Puntcher et al. 2018; Escobar et al. 2013; Giménez et al. 2013).

Zunächst wurden 5 mL der entgasten Bierprobe mit je 2,5 mL, 5 mL und 7,5 mL Cyclohexan versetzt und dann gründlich geschüttelt. Im Anschluss wurde die obere Cyclohexanphase abgetrennt und die untere Phase weiter unter Verwendung der Matrixfällung mit ACN und anschließender SPE weiterbearbeitet. HPLC-Messungen der mit Cyclohexan extrahierten Proben zeigten eine vielversprechende Reduktion an Störkomponenten bereits ab einem zugesetzten Volumen von 2,5 mL Cyclohexan. (siehe Abbildung 3.40).

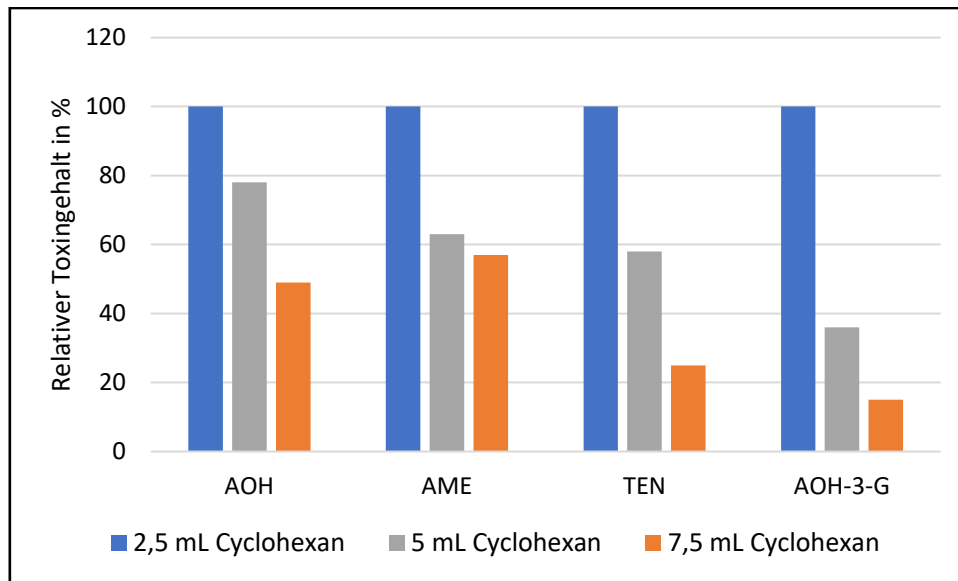


**Abbildung 3.40** HPLC Chromatogramme (190 nm) einer Bierprobe ohne Cyclohexan-Extraktion (A) und mit Cyclohexanreduktion (2,5 mL Cyclohexan, B). Blau: kritischer Matrixbereich.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und zeitgleich die Auswirkungen der Extraktion auf den Toxingehalt zu ermitteln, wurde der Versuch mit drei dotierten Bierproben wiederholt.

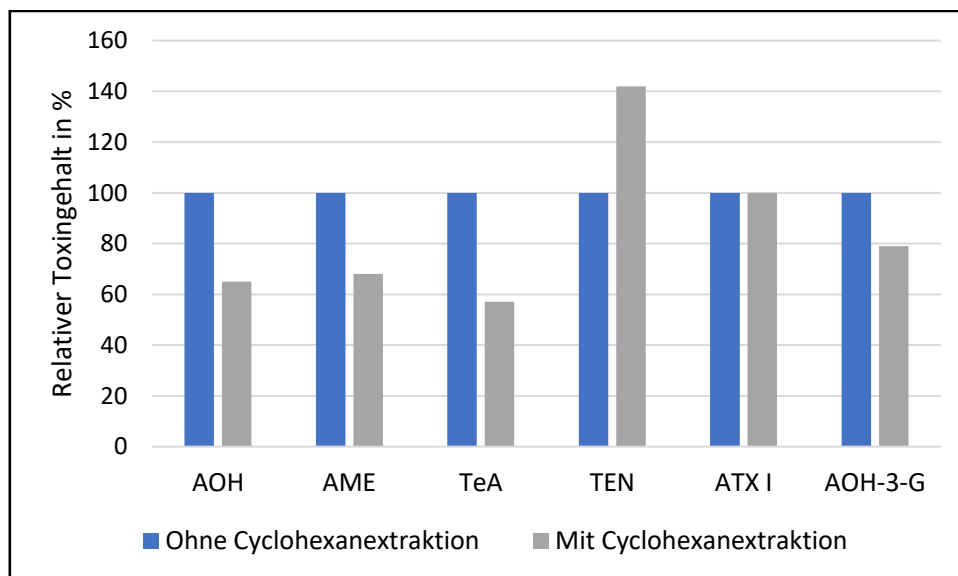
LC-MS/MS Messungen zeigten hierbei einen Verlust an Toxinen, der mit ansteigendem Cyclohexan Volumen größer wurde (siehe Abbildung 3.41).





**Abbildung 3.41** Vergleich des relativen Toxingehaltes nach Extraktion mit drei verschiedenen Volumina Cyclohexan.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass einige Toxine in Cyclohexan löslich sind und somit in die zu verwerfende Phase übergehen. Um prinzipiell die Eignung des Einsatzes von 2,5 mL Cyclohexan zu überprüfen, wurde der Toxingehalt einer dotierten Bierprobe mit und ohne Cyclohexan Extraktion verglichen. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 3.42 dargestellt.



**Abbildung 3.42** Relative Toxinausbeute einer dotierten Probe mit und ohne Cyclohexan-Extraktion bezogen auf die Signalfächen der Extraktion ohne Cyclohexan.

Die beobachteten Verluste von TeA, AOH und AME sind zwar mit bis zu 56 % (TeA) als vergleichsweise hoch einzustufen, jedoch werden diese Analyten über stabilisotopenmarkierte interne Standards quantifiziert, sodass dieser Verlust ausreichend kompensiert werden sollte. Aus dem konstanten ATX I Gehalt können zudem auch

Rückschlüsse auf die Toxine ATX II und ALTP gezogen werden, da sich diese Toxine strukturell sehr ähnlich sind und somit die Cyclohexan Extraktion hier voraussichtlich auch keinen Einfluss haben wird. Für TEN hat sich die Cyclohexan Extraktion sogar positiv ausgewirkt, da hier vermutlich aufgrund der reduzierten Matrixeffekte während der Ionisierung eine reduzierte Ionensuppression stattfand und somit das Signal intensiviert wurde. Die Verluste an AOH-3-G sind mit ca. 80 % als eher gering einzustufen und könnten auch durch Messunsicherheiten der Einfachbestimmung und Einfachinjektion bedingt sein.

Nach Abwägen aller erhaltenen Ergebnisse wurde der Extraktionsschritt mit 2,5 mL Cyclohexan beibehalten, um eine geringe Matrixbelastung und somit geringere Matrixeffekte während den LC-MS/MS Messungen zu erzielen.

#### 3.5.2.7 Interner Standard

Um das benötigte Zugabevolumen der isotopenmarkierten Standards [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH, [ $^2\text{H}_4$ ] - AME sowie [ $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] - TeA zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Volumina getestet: eine Bierprobe wurde zu Beginn mit je 50  $\mu\text{L}$  und eine mit je 100  $\mu\text{L}$  Standard der Konzentration 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH, 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [ $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] - TeA und 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [ $^2\text{H}_4$ ] - AME versetzt. Die Biere wurden anschließend analog der vorher entwickelten Methodik aufgearbeitet, jedoch zunächst ohne den Extraktionsschritt mit Cyclohexan. Als Resultat konnten bei dem niedriger dotierten Bier bereits gute Signalformen und -intensitäten für [ $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] - TeA und [ $^2\text{H}_4$ ] - AME erhalten werden, wohingegen für [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH ein Volumen von 100  $\mu\text{L}$  benötigt wurde, um einen gut sichtbaren Peak zu erhalten. Im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung mussten die hier optimierten Volumina an internem Standard von [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH und [ $^2\text{H}_4$ ] - AME auf 150  $\mu\text{L}$  bzw. 100  $\mu\text{L}$  erhöht werden, um auch nach der Extraktion mit Cyclohexan ein sichtbareres Signal zu erzeugen. Die Zugabe von [ $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] - TeA wurde ebenfalls sicherheitshalber auf 100  $\mu\text{L}$  erhöht, da dieses Toxin in nahezu allen Bierproben enthalten war und nun auch hohe Konzentrationen sicher im linearen Bereich der Responsegerade liegen. Somit erfolgte für [ $^2\text{H}_4$ ] - AME und [ $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ] - TeA die Zugabe an internem Standard analog der Gerstenmethode (siehe 3.5.1.7), wohingegen die Konzentration von [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH aufgrund des Reinigungsschrittes mit Cyclohexan und den damit bekannten einhergehenden Verlusten an AOH leicht erhöht werden musste.

### 3.5.3 Diskussion: Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Gersten- und Malzproben

Die zugrunde liegende Ausgangsmethode (siehe 6.10.1) zeigte bereits gute Ergebnisse, jedoch mussten durch die Integration der modifizierten Toxine weitere Optimierungsschritte vorgenommen werden, um diese reproduzierbar analysieren zu können. Zudem zeigte sich

die Gersten- bzw. Malzmatrix als problematisch, da die hier entwickelte LC-MS/MS Methode bei einem geringeren Organikanteil (10 % Organik) startete als die zuvor verwendete Methode (35 % Organik). Als Folge eluierte ein Großteil der Matrix nicht mehr zu Beginn der Messung, sondern erst ab 10 Minuten, wodurch nicht nur die Sensitivität der zeitgleich eluierenden Toxine AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G und AOH-9-G beeinträchtigt, sondern auch eine Verschmutzung des MS riskiert wurde, da der Großteil der Matrix ins MS geleitet werden musste.

Um diese beiden Problematiken zu lösen, wurde zunächst die Extraktion genauer betrachtet. Hier konnte durch HPLC-UV Messungen bei 190 nm festgestellt werden, dass Methanol deutlich mehr Matrix löste als Acetonitril, sowohl in Kombination mit Wasser als auch als reines Elutionsmittel. Da keine größeren Unterschiede des Elutionsvermögens von MeOH und ACN ermittelt werden konnten, wurde zugunsten der geringeren Matrixbelastung auf eine Extraktion mit Methanol verzichtet. Durch Zusatz von Säure zum Extraktionsmittel konnte zwar ebenfalls ein Anstieg der Matrixbelastung beobachtet werden, allerdings war dieser Zusatz nötig, um vor allem die Toxine AOH und TeA in ausreichenden Mengen aus der Matrix zu lösen. Da sich der Säurezusatz jedoch nachteilig auf die Extraktion der modifizierten Toxine auswirkte, wurde zunächst eine Extraktion ohne Säure und anschließend zwei Extraktionen mit Säure durchgeführt. Als Extraktionsmittel erwies sich hierbei das azeotrope Gemisch aus ACN und Wasser (84/16, v/v) als der beste Kompromiss zwischen Extraktionsstärke und Matrixbelastung, und war zudem am schnellsten mit dem Rotationsverdampfer zu entfernen. Eine Untersuchung der Schütteldauer ergab zusätzlich, dass vor allem für die erste Extraktion eine Zeit von 60 Minuten die höchsten Toxingehalte lieferte, wohingegen für die beiden folgenden Extraktionen bereits eine Dauer von 30 Minuten ausreichend war.

Die nun vollständig optimierte Extraktionsmethode ist in ähnlicher Weise auch in der Literatur zu finden. So wählten Walravens et al. (2014) ebenfalls eine Mischung aus ACN und Wasser in Kombination mit Säure für die Extraktion (modifizierter) *Alternaria* Toxine aus Hafer, Gerste und Reis. Nach einstündiger Extraktion wurden die Proben hier jedoch nicht erneut extrahiert, sondern die Überstände eingeeengt und direkt am LC-MS/MS eingesetzt. Auch Asam et al. (2011a) und Babič et al. (2021) wählten ein Extraktionsmittel aus ACN/Wasser im Verhältnis 84/16 (v/v), jedoch ohne Säurezusatz, wohingegen Uhlig et al. (2013) das gleiche Extraktionsmittel mit Säure wählte. In der Studie von Beccari et al. (2016) wurden verschiedene Verhältnisse von ACN und Wasser (mit Säurezusatz) gewählt, sodass insgesamt zwei Extraktionen durchgeführt wurden, von denen eine 60 Minuten und eine 30 Minuten dauerte, wodurch in diesem Fall die besten Ergebnisse für AOH und AME, sowie die ebenfalls analysierten *Fusarium* Toxine erhalten werden konnten. Neben den bereits beschriebenen

Extraktionen sind jedoch auch Methoden mit abweichenden Extraktionsmitteln zu finden: so verwendeten Castañares et al. (2020) eine Mischung aus ACN und 40 g/L Kaliumchlorid für die Extraktion der *Alternaria* Toxine, wohingegen Puntsher et al. (2018) bei der Entwicklung ihrer Methode zur Analyse von Weizen Methanol anstelle von Acetonitril wählten. Letztendlich sind bei der Wahl des Extraktionsmittels immer auch die weiteren Aufarbeitungsschritte sowie die Sensitivität der verwendeten Messgeräte zu berücksichtigen.

Aufgrund der immer noch erhöhten Matrixbelastung wurde die Festphasenextraktion der Ausgangsmethode beibehalten, da sich diese auch in anderen Publikationen bereits als geeignet erwiesen hat (Asam et al. 2011a; Solfrizzo et al. 2004), jedoch wurden verschiedene Variationen getestet, um den in der Probe enthaltenen Matrixanteil weiter zu reduzieren. Die Verwendung eines anderen Säulenmaterials zeigte sich nach ein paar Vorversuchen jedoch nicht zielführend, sodass mit dem in der Ausgangsmethode beschriebenen Kartuschentyp weitere Optimierungsversuche durchgeführt wurden. Durch die Verwendung zweier Waschschrte mit Wasser, wie es in der Ausgangsmethode beschrieben wurde, konnte nicht ausreichend viel Matrix entfernt werden, sodass der zweite Waschschrte experimentell auf einen Organikanteil von 15 % ACN eingestellt wurde. Diese Menge reichte aus, um den Großteil störender Matrixkomponenten zu entfernen, während sie zeitgleich nicht polar genug war um bereits einen Teil der modifizierten Toxine von der Säule zu eluieren.

Der Anteil an Matrix in der Probe könnte prinzipiell auch über das Aufnahmelösungsmittel am Ende der Aufarbeitung reduziert werden. So zeigte hier eine Aufnahme der Probe in reinem ACN nahezu keine Matrixkomponenten, wohingegen mit steigendem Wasseranteil auch die Matrixbelastung zunahm. Hier ist jedoch zu beachten, dass das Aufnahmelösungsmittel ähnlich den Startbedingungen der LC-MS/MS Methode gewählt werden sollte (10 % ACN), um ein Peaktailing zu vermeiden. Zudem ist vor allem Tenuazonsäure nicht in reinem ACN löslich, sodass eine Mischung von ACN mit Wasser zwingend erforderlich war. Da auch die modifizierten Toxine besser in Wasser löslich waren als in ACN, konnte als Kompromiss zwischen Wiederfindung der Toxine und Matrixbelastung ein Verhältnis von 3/7 (ACN/H<sub>2</sub>O, v/v) festgelegt werden.

In den letzten Jahren wurde im Falle der *Alternaria* Toxine eine große Abhängigkeit der Wiederfindungen von dem verwendeten Filtermaterial beobachtet (Aichinger et al. 2020). Die in dieser Arbeit verwendeten PVDF-Filter wurden zwar in der von Aichinger et al. (2020) durchgeführten Studie als ungeeignet identifiziert, jedoch wurden die Tests in deren Studie mit Phosphatpuffer (0,04 % Ethanol) als Aufnahmelösungsmittel durchgeführt. Ein Nachwaschen der Filter mit MeOH/ACN konnte in etwa 50 % des verlorenen AME aus dem zuvor verwendeten PVDF-Filter herunterwaschen, wohingegen AOH in dieser Studie nicht und

die Perylenquinone ATX I, ATX II, ALTP und STE III nur in sehr geringem Maße (< 8 %) vom PVDF Material wiedergewonnen werden konnten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch die Eignung der PVDF-Filter für die Analytik von *Alternaria* Toxinen, solange das Lösungsmittel neben Wasser auch noch organische Lösungsmittel enthält. Die hauptsächlich von der Absorption ans Filtermaterial betroffenen Toxine AOH und AME wurden in dieser Arbeit zudem über stabilisotopenmarkierte Standards quantifiziert, sodass hier Verluste gut kompensiert werden konnten. Auch für die Perylenquinone sowie die übrigen Toxine konnten gute Wiederfindungsraten ermittelt werden (siehe 3.6.1.2), sodass auch hier das PVDF Material als geeignet betrachtet wurde. Aichinger et al. (2020) merkten zudem an, dass das verwendete Filtermaterial in fast allen publizierten Studien nicht angegeben wird, sodass unklar ist, ob hier verschiedene Materialien getestet wurden. Dies könnte aktuell zu einer Unterschätzung der Gehalte an AOH und AME führen, sodass bereits publizierte Daten stets kritisch evaluiert werden sollten. Zudem sollten in Zukunft vor allem bei Publikationen zu *Alternaria* Toxinen die verwendeten Filtermaterialien angegeben werden, um publizierte Toxindaten besser interpretieren zu können.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden auch weitere Verfahren getestet, welche sich dann jedoch bezüglich der *Alternaria* Analytik als ungeeignet herausgestellt haben. Die durchgeführten Proteinfällungen konnten zwar die störende Matrix entfernen, jedoch wurden ebenfalls Toxine entfernt, was letztendlich zu einer niedrigeren Wiederfindungsrate geführt hätte. Zudem erwies sich dieser Aufreinigungsschritt als zeitaufwendig und unwirtschaftlich, was für die geplanten Experimente als nachteilig betrachtet wurde. Als Alternative zur Festphasenextraktion wurden zu Beginn ebenfalls diverse Dilute & Shoot Ansätze getestet, welche zur Zeit aufgrund der einfachen Aufarbeitung und des daraus resultierenden hohen Probendurchsatzes häufig verwendet werden (Puntscher et al. 2018), jedoch konnte hier aufgrund mangelnder Gerätesensitivität in Kombination mit störenden Matrixkomponenten keine geeignete Verdünnungsstufe ermittelt werden, sodass dieser Ansatz ebenfalls verworfen wurde.

### **3.5.4 Diskussion: Methodenentwicklung und -optimierung für die Analytik von Bierproben**

Methoden zur Bestimmung von *Alternaria* Toxinen in Bier sind bisher nur vereinzelt zu finden, sodass ebenfalls Methoden der *Fusarium* Analytik in dieser Matrix getestet wurden. In allen Studien war hierbei die Entfernung der Kohlensäure aus dem Bier ein wichtiger Schritt vor der eigentlichen Probenaufbereitung und wird in der Regel wie auch in dieser Arbeit durch

Entgasen der Probe im Ultraschallbad in die Aufarbeitungsmethode integriert (Siegel et al. 2010b; Rodríguez-Carrasco et al. 2015; Prella et al. 2013).

Die Probenmenge wurde nach einigen Tests auf 5 mL festgelegt, da hier der beste Kompromiss aus Matrixbelastung und Toxingehalte vorzuliegen schien. Zudem entspricht das gewählte Volumen bei einem durchschnittlichem Stammwürzegehalt von ca. 15 - 20 % in etwa 1 Gramm Malz, welches ausreichende Toxinkonzentrationen für die Analytik enthalten sollte. Diese Menge wurde ebenfalls von Habler et al. (2017) für die Analytik von *Fusarium* Toxinen verwendet, wohingegen Prella et al. (2013) und Rodríguez-Carrasco et al. (2015) jeweils ein Probenvolumen von 10 mL verwendeten. In anderen Studien lieferten auch geringere Mengen Bier vielversprechende Ergebnisse (Siegel et al. 2010b), jedoch konnten mit diesen Volumina in dieser Arbeit aufgrund der gering konzentrierten Toxine und nicht ausreichender Sensitivität des verwendeten LC-MS/MS keine guten Ergebnisse erzielt werden.

Die Anwendung der Cyclohexan-Extraktion zur Reduktion von Matrixbestandteilen ist häufig in der Analytik von fettigen Proben, z.B. Sonnenblumenöl, zu finden (Puntscher et al. 2018; Escobar et al. 2013; Giménez et al. 2013), und ist in der Getränkeanalytik eher unüblich. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Cyclohexan durch eine flüssig-flüssig Extraktion auch hier störende Matrixkomponenten effektiv entfernen kann. Das zuzugebende Extraktionsvolumen sollte hierbei aber geringgehalten werden, um größere Toxinverluste zu vermeiden. So wurden bei diesem Schritt hauptsächlich Verluste an AME beobachtet, was jedoch durch die Quantifizierung dieses Toxins über den isotoopenmarkierten Standard vernachlässigbar war.

Die im Anschluss durchgeführte Matrixfällung mit ACN war ebenfalls an Literaturdaten angelehnt und wurde bereits häufig erfolgreich für die Bieranalytik angewandt (Bertuzzi et al. 2011; Zachariasova et al. 2010; Habler et al. 2017; Rodríguez-Carrasco et al. 2015). Hier zeigte sich das Verhältnis 3/1 (ACN/Probe) als bester Kompromiss zwischen ausreichender Matrixfällung und Lösungsmittelverbrauch, sodass auch dieser Schritt in die Aufarbeitung integriert wurde.

Ebenso wurde die erneute Extraktion der ausgefällten Matrix bereits von Habler et al. (2017) durchgeführt, da in ihrer Studie einige *Fusarium* Toxine zusammen mit der Matrix ausgefallen sind. Auch wenn die *Alternaria* Toxine AME, TeA und AOH-3-G nur in geringen Mengen im Matrixrückstand zu finden waren, wurde eine erneute Extraktion mit ACN/H<sub>2</sub>O (84/16) für 15 Minuten als sinnvoll erachtet, um möglichst hohe Wiederfindungsraten zu erzielen. Der Schritt der Matrixfällung und anschließenden Rückstandsextraktion kann bei Dilute and Shoot

Methoden durch ausreichende Verdünnung umgangen werden (Al-Taher et al. 2013), jedoch war dies in dieser Arbeit aufgrund zu geringer Sensitivität des Messgerätes nicht möglich. Da auch nach Matrixfällung noch störende Matrixkomponenten enthalten waren, musste zudem ein weiterer Aufreinigungsschritt eingefügt werden.

Hierfür wurde analog der zuvor entwickelten Gerstenmethode (siehe 3.5.1) eine Festphasenextraktion durchgeführt, welche eine weitere Aufreinigung der Probe ermöglichte. Dieser Schritt wurde ebenfalls von Bertuzzi et al. (2011) angewandt, als sie in ihrer Studie OTA, Trichothecene, Fumonisine und Aflatoxine in Bier untersucht haben, wobei für die gewählten Analyten spezifische Toxinkartuschen vorhanden waren. Habler et al. (2017) verwendeten zur Analytik von *Fusarium* Toxinen in Bier ebenfalls spezifische Toxinkartuschen, und auch Prella et al. (2013) nutzten die SPE Aufreinigung für ihre Bieranalytik, wobei sie C18 Säulen für Lagerbier und Bitterbier, und polymerbasierte Kartuschen (LiChrolut EN) für Stoutbier verwendeten. In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen verschiedenen Biersorten beobachtet werden, sodass für alle Biertypen die gleiche SPE-Aufreinigung mittels C18 Kartuschen erfolgte.

Das Entfernen des Lösungsmittels sowie die Aufnahme in ACN/H<sub>2</sub>O wurde aus der Gerstenaufarbeitung übernommen und musste durch die ausreichende Probenaufreinigung nicht mehr an die vorliegende Matrix angepasst werden.

## 3.6 Methodvalidierungen

### 3.6.1 Methodvalidierung der Gerstenmethode

Die entwickelte Methode zur Bestimmung von 13 *Alternaria* Toxinen wurde nach der Vorschrift von Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) validiert und bereits in Scheibenzuber et al. (2022) publiziert.

#### 3.6.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde eine toxische Gerstenmatrix in vier verschiedenen Konzentrationen mit den Analyten dotiert und in Dreifachbestimmung aufgearbeitet. Die anschließende Messung erfolgte in Dreifachinjektion. Die gemessenen Gehalte von AOH, AME und TeA wurden über die SIVA bestimmt, wohingegen die anderen Toxine über zwei Matrixkalibrierpunkte quantifiziert wurden.

Die ermittelten Nachweisgrenzen lagen für alle Toxine außer ALT und AME-3-G unter 1 µg/kg. Mit 1,63 µg/kg betrug die NWG von AME-3-G fast das Zweifache der NWGs von AOH-3-G und AOH-9-G, wohingegen ALT mit 2,45 µg/kg die höchste NWG aufzeigte. Die Bestimmungsgrenzen von AME und TEN lagen unter 1 µg/kg, was sie zu den beiden empfindlichsten *Alternaria* Toxine in dieser Methode machte. Alle weiteren BG's lagen im Bereich zwischen 1,46 µg/kg (AOH) und 4,91 µg/kg (AME-3-G), nur ALT zeigte analog der NWG mit 8,75 µg/kg eine noch höhere BG auf. Die exakten Werte für jedes Toxin sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 3.10** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Multimyko toxinanalytik in Gerstenproben.

<b>Analyt</b>	<b>NWG [µg/kg]</b>	<b>BG [µg/kg]</b>
AOH	0,50	1,64
AME	0,05	0,16
TeA	0,64	2,26
TEN	0,10	0,41
ATX I	0,73	2,13
ATX II	0,99	3,56
ALTP	0,64	2,12
ALT	2,45	8,75
AOH-3-G	0,78	2,96
AOH-9-G	0,95	3,85
AME-3-G	1,63	4,91
AOH-3-S	0,54	2,18
AME-3-S	0,62	2,22



### 3.6.1.2 Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde eine toxinfreie Gerstenprobe in drei verschiedenen Konzentrationen dotiert und dreifach aufgearbeitet. Die fertigen Proben wurden im Anschluss je dreimal mittels LC-MS/MS gemessen. Die verwendeten Konzentrationslevel sowie die erhaltenen Wiederfindungen sind in Tabelle 3.11 dargestellt. Die Konzentrationen wurden hierbei so gewählt, dass sie den Toxingehalten in natürlich belastetem Probenmaterial ähnlich sind. Aufgrund der zu erwartenden niedrigen *Alternaria* Toxinkonzentrationen, wurden die Dotierlevel für alle Toxine außer TeA nahe der Bestimmungsgrenze gewählt, wohingegen für die meist höher konzentrierte TeA ein größerer Konzentrationsbereich gewählt wurde.

Die bestimmten Wiederfindungen lagen alle im von Hädrich und Vogelgesang geforderten Bereich von 70 – 120 % (Vogelgesang und Hädrich 1998). Für die mittels SIVA bestimmten Toxine AOH, AME und TeA lagen die Wiederfindungen bei fast 100 %, aber auch die über Matrixkalibrierung bestimmten Toxine zeigten zufriedenstellende Wiederfindungen im Bereich von 84 – 112 %.

**Tabelle 3.11** Wiederfindungsraten der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben angegeben als Mittelwert und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion.

Toxin	Dotierniveau 1		Dotierniveau 2		Dotierniveau 3	
	Konzentration [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Konzentration [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Konzentration [µg/kg]	Wiederfindung [%]
AOH	2,5	96 ± 2	4	97 ± 4	5,5	95 ± 1
AME	0,3	107 ± 4	0,75	100 ± 1	1,5	98 ± 3
TeA	10	96 ± 3	100	99 ± 5	500	96 ± 4
TEN	0,7	104 ± 5	1	106 ± 3	2	112 ± 3
ATX I	2,1	93 ± 7	3,5	92 ± 12	8	93 ± 8
ATX II	3,6	90 ± 3	5	89 ± 5	7	95 ± 2
ALTP	2,1	90 ± 4	3,5	92 ± 7	5	94 ± 6
ALT	13	84 ± 2	16	92 ± 7	18	94 ± 7
AOH3G	5	93 ± 1	7,5	91 ± 3	9	87 ± 8
AOH9G	7,5	84 ± 2	9	85 ± 4	12	91 ± 4
AME3G	5	95 ± 1	6	97 ± 4	7,5	98 ± 2
AOH3S	2,5	87 ± 2	4	106 ± 7	5,5	103 ± 7
AME3S	4	103 ± 2	5,5	98 ± 2	8	93 ± 4

### 3.6.1.3 Präzisionen

#### Gerätepräzision

Die Gerätepräzision, auch inter-injection Präzision, gibt vom Messgerät bedingte Schwankungen zwischen mehreren Messungen an. Zur Bestimmung dieser wurde eine dotierte Gerstenprobe fünfmal hintereinander am LC-MS/MS gemessen und die Toxingehalte jeder Messung über SIVA (AOH, AME, TeA) bzw. Matrixkalibrierung bestimmt. Die gewählten Dotierlevel sowie die resultierenden Gerätepräzisionen sind in Tabelle 3.12 dargestellt.

Durch die verwendete SIVA für AOH, AME und TeA konnten hier mit einem Varianzkoeffizienten von 2 % die niedrigsten Werte erhalten werden, wohingegen die über Matrixkalibrierung bestimmten Toxine im Bereich zwischen 3 und 5 % lagen.

**Tabelle 3.12** Gerätepräzision der Multimykotoxinanalytik in Gerstenproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus fünf aufeinanderfolgenden Injektionen.

Analyt	Dotierniveau [µg/kg]	Gerätepräzision (n=5), [RSD, %]
AOH	4	2
AME	0,3	2
TeA	100	2
TEN	1,5	4
ATX I	8	4
ATX II	5	5
ALTP	3,5	5
ALT	16	4
AOH3G	4	4
AOH9G	9	5
AME3G	6	3
AOH3S	5,5	4
AME3S	8	5

#### Intra- und Inter-Day Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Day Präzision wurde eine dotierte Gerstenprobe dreifach aufgearbeitet und dreifach injiziert, wohingegen für die Inter-Day Präzision eine dotierte Gerstenprobe an drei Tagen innerhalb von drei Wochen in Dreifachbestimmung aufgearbeitet und ebenfalls in Dreifachinjektion am LC-MS/MS gemessen wurde. Die verwendeten Dotierniveaus der einzelnen Toxine, sowie die erhaltenen Intra- und Inter-Day Präzisionen sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Die Varianzkoeffizienten für AOH, AME und TeA, welche über eine SIVA bestimmt wurden, entsprachen oder lagen bei beiden Präzisionen nur gering über der Gerätepräzision. Die Intra-Day Präzisionen der über Matrixkalibrierung bestimmten Toxine lagen zwischen 4 und 9 %, die der Inter-Day Präzisionen im Bereich von 4 – 10 %.

**Tabelle 3.13** Intra- und Inter-Day Präzisionen der Multimykotoxanalytik in Gerstenproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus drei (Intra-Day) bzw. neun (inter-day) Aufarbeitungen und jeweils einer Dreifachinjektion.

Analyt	Dotierniveau [µg/kg]	Intra-Day Präzision (n=3), [RSD, %]	Inter-Day Präzision (n=9), [RSD, %]
AOH	4	2	3
AME	0,3	2	3
TeA	100	4	5
TEN	1,5	5	9
ATX I	8	7	9
ATX II	5	5	10
ALTP	3,5	7	5
ALT	16	9	10
AOH3G	4	4	4
AOH9G	9	5	6
AME3G	6	5	9
AOH3S	5,5	6	6
AME3S	8	9	10

#### 3.6.1.4 Probennahme

Aufgrund der bekannten Problematik der inhomogenen Mykotoxinbelastung in Getreideproben, war es für die Validierung der Gerstenmethode ebenfalls nötig die angewandte Probennahme (siehe 6.14.1) zu validieren. Hierzu wurden zwei unabhängig voneinander gezogene Proben (je 50 Gramm) von drei Gerstenproben sowie deren zugehörigen Malzen verwendet, welche jeweils in Doppelbestimmung aufgearbeitet und doppelt am LC-MS/MS gemessen wurden. Die Toxinwerte zeigten angemessene Schwankungen im Toxingehalt: für die Toxine AOH, ATX I und ALTP konnten in diesen Realproben Variationskoeffizienten von unter 10 % erhalten werden, wohingegen bei den niedrig konzentrierten (< 2 µg/kg) Toxinen AME und TEN Abweichungen von bis zu 30 % ermittelt wurden. Für TeA lag der Variationskoeffizient bei bis zu 20 % für Konzentrationen nahe der BG, und bei unter 12 % für Konzentrationen über 10 µg/kg.

### 3.6.2 Methodvalidierung der Biermethode

Analog der Gerstenmethode aus Punkt 3.6.1 wurde die Methode zur Analytik von Bierproben nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) validiert. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in Scheibenzuber et al. (2021) publiziert.

#### 3.6.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der 13 in der LC-MS/MS Methode enthaltenen *Alternaria* Toxine wurde ein zuvor als toxinfrei identifiziertes Bier als Blankmatrix

verwendet. Diese wurde mit den zu analysierenden Toxinen, sowie die für die SIVA benötigten internen Standards [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH, [ $^2\text{H}_4$ ] - AME sowie [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}$ ] - TeA in vier verschiedenen Konzentrationen dotiert und jeweils dreifach aufgearbeitet (siehe 6.13.1). Die dotierten Proben wurden analog der Bieraufarbeitung (siehe 6.11.2) vorbereitet und am LC-MS/MS in einer Dreifachinjektion gemessen. Die so ermittelten Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,03  $\mu\text{g/L}$  (AME) und 5,48  $\mu\text{g/L}$  (ALT), wohingegen die Bestimmungsgrenzen im Bereich zwischen 0,09  $\mu\text{g/L}$  (AME) und 16,24  $\mu\text{g/L}$  (ALT) lagen. Die exakten Werte aller Toxine sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Die niedrigsten Nachweisgrenzen wurden für AOH (0,15  $\mu\text{g/L}$ ), AME (0,03  $\mu\text{g/L}$ ) und TeA (0,15  $\mu\text{g/L}$ ) bestimmt, wobei alle Nachweisgrenzen mit Ausnahme des ALT bei unter 1  $\mu\text{g/L}$  lagen. Bei den Bestimmungsgrenzen konnten für AOH, AME, TeA, TEN und ATX I ebenfalls Werte unter 1  $\mu\text{g/L}$  erreicht werden, wohingegen die BG von ALTP und ATX II sowie den modifizierten Toxinen AOH-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-S und AME-3-G im Bereich zwischen 1,28  $\mu\text{g/L}$  (AOH-9-G) und 3,84  $\mu\text{g/L}$  (AME-3-S) lag. Die mit Abstand höchsten Werte wurden mit 5,48  $\mu\text{g/L}$  (NWG) bzw. 16,24  $\mu\text{g/L}$  (BG) für das Toxin ALT bestimmt. Im positiven ESI Modus konnten hier deutlich niedrigere Werte erzielt werden, jedoch wurde zu Gunsten der Multimethode auf eine weitere Methode verzichtet.

**Tabelle 3.14** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Multimykotoxinanalytik in Bierproben.

Analyt	NWG [ $\mu\text{g/L}$ ]	BG [ $\mu\text{g/L}$ ]
AOH	0,15	0,52
AME	0,03	0,09
TeA	0,15	0,46
TEN	0,24	0,93
ATX I	0,2	0,62
ATX II	0,43	1,73
ALTP	0,68	2,84
ALT	5,48	16,24
AOH-3-G	0,45	1,32
AOH-9-G	0,32	1,28
AME-3-G	0,72	2,32
AOH-3-S	0,46	1,67
AME-3-S	0,78	3,42

### 3.6.2.2 Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die zu analysierenden *Alternaria* Toxine in drei verschiedenen Konzentrationen einer analytfreien Biermatrix zugegeben und analog der Biermethode aufgearbeitet. Die Konzentrationslevel wurden aufgrund der erwarteten niedrigen *Alternaria* Toxingehalte in Realproben nahe der Bestimmungsgrenzen gewählt,

lediglich für ALT wurden aufgrund der hohen Bestimmungsgrenze höhere Konzentrationslevel verwendet. Jedes Dotierniveau wurde in Dreifachbestimmung vorbereitet und dreifach am LC-MS/MS gemessen. Die Toxingehalte wurden über den jeweiligen internen Standard oder über zwei Matrixkalibrierpunkte berechnet. Die ermittelten Wiederfindungsraten, sowie die verwendeten Dotierlevel sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 72 und 113 % und entsprachen somit dem von Hädrich und Vogelgesang vorgegeben Bereich von 70 – 120 % (Vogelgesang und Hädrich 1998). Die mittels SIVA bestimmten Toxine AOH, AME und TeA wiesen Wiederfindungsraten zwischen 87 und 102 % auf und zeigten geringe relative Standardabweichungen (maximal 5%). Für die mittels Matrixkalibrierung quantifizierten Toxine konnten ebenfalls gute Wiederfindungsraten zwischen 72 und 114 % erreicht werden. Die relativen Standardabweichungen lagen bei diesen Toxinen in der Regel bei unter 10 %, lediglich die Wiederfindungsrate des ALT hatte eine relative Standardabweichung von 14 %.

**Tabelle 3.15** Wiederfindungsraten der Multimykotoxinanalytik in Bierproben angegeben als Mittelwert und Standardabweichung einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion.

Toxin	Dotierniveau 1		Dotierniveau 2		Dotierniveau 3	
	Konzentration [µg/L]	Wiederfindung [%]	Konzentration [µg/L]	Wiederfindung [%]	Konzentration [µg/L]	Wiederfindung [%]
AOH	1,2	95 ± 4	2,6	95 ± 1	4	92 ± 3
AME	0,15	102 ± 1	0,33	100 ± 5	0,5	96 ± 3
TeA	1,5	87 ± 2	3,25	91 ± 1	5	86 ± 4
TEN	1,3	92 ± 5	2	105 ± 6	2,5	105 ± 8
ATX I	0,9	114 ± 4	1,95	111 ± 6	3	107 ± 7
ATX II	2,5	103 ± 7	4	98 ± 5	5	87 ± 2
ALTP	3,9	99 ± 3	4,5	110 ± 4	6	101 ± 7
ALT	24	107 ± 14	52	104 ± 8	80	106 ± 3
AOH3G	1,5	72 ± 3	3	94 ± 8	4	104 ± 8
AOH9G	1,5	101 ± 3	3	98 ± 10	4,5	101 ± 3
AME3G	5	113 ± 9	7,5	101 ± 2	9	103 ± 2
AOH3S	3	87 ± 7	5	84 ± 9	7	88 ± 5
AME3S	5	86 ± 1	7,5	96 ± 3	10	94 ± 5

### 3.6.2.3 Präzisionen

#### Gerätepräzision

Zur Bestimmung der Gerätepräzision wurde eine natürlich mit TeA belastete Bierprobe mit allen anderen Toxinen dotiert, aufgearbeitet und fünfmal direkt hintereinander am LC-MS/MS injiziert. Die Konzentration der Toxine wurde über die zugesetzten internen Standards oder über zwei externe Matrixkalibrierpunkte berechnet. Die ermittelten Gerätepräzisionen sind in Tabelle 3.16 aufgelistet.

Die Gerätepräzisionen lagen zwischen 2 und 5 %, wobei ATX II mit 5 % am meisten variierte.

**Tabelle 3.16** Gerätepräzision der Multimykotoxinanalytik in Bierproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) einer Sechsfachinjektion.

Analyt	Dotierniveau [µg/L]	Gerätepräzision (n=5), [RSD, %]
AOH	0,8	2
AME	0,33	2
TeA	8,74	3
TEN	0,5	3
ATX I	0,9	4
ATX II	4	5
ALTP	1,8	4
ALT	24	2
AOH3G	3	2
AOH9G	3	3
AME3G	4	3
AOH3S	5	4
AME3S	7,5	4

#### Intra- und Inter-Day Präzision

Zur Bestimmung der Intra- und Inter-Day Präzision wurde eine natürlich mit TeA belastete Bierprobe mit den anderen Toxinen dotiert und einmal in Dreifachbestimmung (Intra-Day) bzw. an drei verschiedenen Tagen innerhalb von drei Wochen in Dreifachbestimmung (Inter-Day) aufgearbeitet. Die Messung am LC-MS/MS erfolgte erneut in Dreifachinjektion. Die Mykotoxinkonzentrationen wurden über die zugesetzten internen Standards oder über zwei externe Matrixkalibrierpunkte bestimmt und die daraus berechneten Präzisionen sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst dargestellt.

Die gemessenen Präzisionen lagen im Bereich von 2 – 10 %, wobei sich die Inter- und Intra-day Präzisionen der über die SIVA bestimmten Toxine AOH, AME und TeA nur minimal von der Gerätepräzision unterschieden. Die über eine Matrixkalibrierung quantifizierten Toxine zeigten hier teils größere Abweichungen von der Gerätepräzision, wobei die Varianzkoeffizienten von AME-3-G und AME-3-S mit 10 % für die Inter-Day Präzision am höchsten lagen.

**Tabelle 3.17** Intra- und Inter-Day Präzisionen der Multimykotoxinanalytik in Bierproben, angegeben als relative Standardabweichung (RSD) aus drei (Intra-Day) bzw. neun (inter-day) Aufarbeitungen und jeweils einer Dreifachinjektion.

Analyt	Dotierniveau [µg/L]	Intra-Day Präzision (n=3), [RSD, %]	Inter-Day Präzision (n=9), [RSD, %]
AOH	0,8	5	5
AME	0,33	2	3
TeA	8,74	4	4
TEN	0,5	7	8
ATX I	0,9	6	9
ATX II	4	5	8
ALTP	1,8	8	8
ALT	24	6	9
AOH3G	3	5	9
AOH9G	3	6	7
AME3G	4	8	10
AOH3S	5	5	8
AME3S	7,5	9	10

### 3.6.3 Diskussion: Methodvalidierung der Gerstenmethode

#### 3.6.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Gerstenmethode

Die Bestimmung der NWG und BG erfolgte durch Dotieren einer mykotoxinfreien Gerstenmatrix.

Für alle Toxine außer ALT und AME-3-G konnten Nachweisgrenzen von unter 1 µg/kg erzielt werden, wobei das mittels SIVA bestimmte Toxin AME mit einer Nachweisgrenze von 0,05 µg/kg und einer Bestimmungsgrenze von 0,16 µg/kg am sensitivsten gemessen wurde. Unter den fünf modifizierten Toxinen konnten die besten Nachweisgrenzen für AOH-3-S (0,54 µg/kg) und AME-3-S (0,62 µg/kg) erzielt werden, aber auch die Werte für AOH-3-G und AOH-9-G lagen in einem ähnlichen Bereich (0,78 µg/kg bzw. 0,95 µg/kg). Das Toxin AME-3-G zeigte mit einer NWG von 1,63 µg/kg und einer BG von 4,91 µg/kg vergleichsweise hohe Werte. Das am wenigsten empfindliche Toxin war jedoch ALT, für welches eine NWG von 2,45 µg/kg und eine BG von 8,75 µg/kg erzielt werden konnte. Dies ist dadurch bedingt, dass ALT als einziges *Alternaria* Toxin von einer Messung im positiven ESI Modus profitieren würde, worauf jedoch zu Gunsten der Multimethode verzichtet wurde. Eine Methode unter Verwendung der Polarity Switching Option wurde nicht verwendet, um damit eingehende Sensitivitätseinbußen des fast zeitgleich eluierende AME-3-G zu vermeiden.

Die hier erzielten Ergebnisse lagen im Vergleich zu bisher publizierten Studien zur Gerstenanalytik in ähnlichen oder besseren Bereichen vor. So konnten hier im Vergleich zu Walravens et al. (2014) bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die modifizierten

Toxine AOH-3-G, AME-3-G und AOH-3-S, sowie die Toxine AME, TEN und ATX I erzielt werden. ALT konnte jedoch von Walravens et al. (2014) durch Verwendung des positiven ESI Modus deutlich sensitiver gemessen werden als in der hier vorliegenden Arbeit. Siegel et al. (2009) erzielte für TeA mittels Derivatisierung eine NWG von 10 µg/kg und eine BG von 50 µg/kg, welche über den hier mittels SIVA erhaltenen Werten liegen. Auch Babič et al (2021) konnten für TeA, AOH und AME im Rahmen einer Multimethode lediglich eine NWG von 4 µg/kg und eine BG von 12,5 µg/kg erzielen.

### 3.6.3.2 Wiederfindungen der Gerstenmethode

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten erfolgte nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) und sollten demnach in einem Bereich zwischen 70 % und 120 % liegen. Dies war für alle Toxine auf allen drei getesteten Dotierniveaus gegeben, sodass in den späteren Analysen auf eine Wiederfindungskorrektur verzichtet wurde. Die Dotierniveaus wurden so gewählt, dass sie den in der Natur zu erwartenden Ergebnisse entsprachen. Somit wurden für die häufig in höheren Konzentrationen auftretende TeA Konzentrationsniveaus zwischen der BG und 1000 µg/kg gewählt, wohingegen die Niveaus aller anderen Toxine nahe der Bestimmungsgrenze lagen.

Die über ihren isotoopenmarkierten Standard quantifizierten Toxine AOH, AME und TeA zeigten hier auf allen drei Konzentrationsniveaus Wiederfindungen von 95 – 107 % und lagen somit nahe an den 100 %. Die Wiederfindungen der über externe Matrixkalibrierung berechneten Toxine lagen jedoch ebenfalls im Bereich zwischen 84 % und 112 %, sodass sich auch diese Quantifizierungsmethode als geeignet erwies. TEN war hierbei das einzige Toxin, bei welchem auf allen drei Konzentrationsniveaus ein leichter Überbefund festgestellt wurde. Mit Wiederfindungsraten von 84 % und 85 % auf den unteren zwei Dotierniveaus, wurden die größten Verluste für AOH-9-G erhalten, jedoch lagen auch diese Ergebnisse noch weit über dem nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) geforderten Minimum von 70 %. Somit konnten alle hier erzielten Wiederfindungen als zufriedenstellend betrachtet werden.

In der Literatur sind für *Alternaria* Toxine bereits ähnliche Wiederfindungswerte zu finden. So erzielten Walravens et al. (2014) für alle gemessenen *Alternaria* Toxine Wiederfindungen um die 100 %, wobei ebenfalls für einige Toxine ein leichter Überbefund festgestellt wurde. In einem nahezu identischen Bereich lagen mit Wiederfindungsraten von 99 % bis 103 % die Toxine AOH, AME und TeA, welche im Rahmen einer Multimyko-toxinmethode von Babič et al. (2021) bestimmt wurden. Eine im Jahr 2016 mittels hochauflösender LC-MS entwickelte Multitoxinmethode von Beccari et al. (2016) erzielte größere Überbefunde für AME



(110 % - 119 %) und deutlich schlechtere Wiederfindungen für AOH (40-50 %). Für Tenuazonsäure konnte mittels Derivatisierung in einer anderen Studie eine Wiederfindungsrate von ca. 80 % erzielt werden (Siegel et al. 2009).

### 3.6.3.3 Präzisionen der Gerstenmethode

Präzisionen liefern Aussagen über Geräteschwankungen sowie die Ergebnisreproduzierbarkeit und somit zeitgleich über die Probenhomogenität.

Die hier erzielten Gerätepräzisionen lagen für die mittels SIVA bestimmten Toxine AOH, AME und TeA bei 2 % und für die restlichen Toxine zwischen 3 – 5 %, sodass die vorliegende Messmethode als präzise betrachtet werden kann. Die intra- und inter-day Präzisionen (= Wiederholpräzisionen innerhalb eines Tages bzw. innerhalb mehrerer Wochen), lagen für AOH, AME und TeA unter 5 %, und für die mittels externer Matrixkalibrierung bestimmten Toxine unter 10 %, sodass die Reproduzierbarkeit als gegeben betrachtet werden kann. In der Literatur lassen sich ebenfalls vergleichbare Präzisionen finden (Siegel et al. 2009; Walravens et al. 2014), lediglich bei der Multitoxinmethode von Babič et al. (2021) lagen höhere Werte zwischen 7 % und 22 % für TeA, AOH und AME vor.

### 3.6.3.4 Probennahme

Die für AOH, ATX I und ALTP erhaltenen Variationskoeffizienten zeigten beim Vergleich zweier unabhängig voneinander gezogener Proben nur geringe Schwankungen im Toxingehalt von je drei Gerstenproben und deren Malzen, welche somit vergleichbar mit den für diese Toxine erhaltenen Inter-Day Präzisionen waren. Für AME und TEN wurden Variationskoeffizienten von bis zu 30 % erhalten, wobei hierbei zu beachten ist, dass beide Toxine in Konzentrationen von unter 2 µg/kg vorlagen, sodass geringe Abweichungen bereits höhere prozentuale Werte verursachen können. Für TeA waren die erhaltenen Ergebnisse abhängig von der Konzentration: während im Konzentrationsbereich um die BG Variationskoeffizienten von bis zu 20 % erhalten wurden, lagen diese bei Konzentrationen über 10 µg/kg bei unter 12 %. Da die erhaltenen Ergebnisse mit den im Rahmen der allgemeinen Messunsicherheit bei spurenanalytischen Methoden entstehenden Schwankungen vergleichbar waren, wurde die gewählte Methode zur Probennahme als geeignet betrachtet, um mit der inhomogenen Toxinverteilung in Getreide umgehen zu können.

### 3.6.4 Diskussion: Methodvalidierung der Biermethode

#### 3.6.4.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Biermethode

Für die Bestimmung der NWG und BG wurde eine toxinfreie, kommerziell erhältliche Bierprobe verwendet.

Die Dibenzo- $\alpha$ -pyrone AME und AOH sowie die TeA zeigten sich hier mit NWGs von 0,03  $\mu\text{g/L}$  (AME) und 0,15  $\mu\text{g/L}$  (AOH und TeA) als die empfindlichsten Analyten, was auf die für diese drei Toxine angewandte SIVA zurückzuführen sein könnte. Die NWGs der mittels Matrixkalibrierung quantifizierten Toxine lagen jedoch mit Werten unter 0,5  $\mu\text{g/L}$  (TEN, ATX I, ATX II, AOH-3-G, AOH-9-G, AOH-3-S) bzw. unter 1  $\mu\text{g/L}$  (ALTP, AME-3-G und AME-3-S) ebenfalls in einem sehr niedrigen Bereich. Dies zeigte sich auch in den Bestimmungsgrenzen, welche für AOH, AME, TeA, TEN und ATX I bei unter 1  $\mu\text{g/L}$  lagen. Unter den modifizierten Toxinen konnten die niedrigsten BGs für AOH-3-G (1,32  $\mu\text{g/L}$ ) und AOH-9-G (1,28  $\mu\text{g/L}$ ) erzielt werden, wohingegen das Toxin AME-3-S mit einer BG von 3,42  $\mu\text{g/L}$  weniger sensitiv bestimmt werden konnte. Das mit Abstand am wenigstens empfindliche Toxin war hier erneut ALT, welches eine NWG von 5,48  $\mu\text{g/L}$  und eine BG von 16,24  $\mu\text{g/L}$  besaß. Aus eigenen Versuchen sowie diversen Literaturdaten (Walravens et al. 2014; Zachariasova et al. 2010) ging hervor, dass diese Werte durch eine Messung im positiven ESI Modus deutlich geringer ausgefallen wären, jedoch wurde zu Gunsten der Multimethode auf eine weitere Methode verzichtet. Auch auf eine Verwendung der Polarity Switching Funktion, bei der während des Laufes zwischen positiven und negativem ESI Modus gewechselt wird, wurde aufgrund der ähnlichen Retention zu dem unbekanntem AME-3-G verzichtet, um Sensitivitätsverluste zu vermeiden.

Biere wurden in der Vergangenheit bisher kaum auf den *Alternaria* Toxingehalt untersucht und in Multitoxinmethoden wurden meist nur AOH und AME integriert, sodass hier kaum Vergleichsdaten vorliegen. Puangkham et al (2017) konnten bei ihrer Toxinanalytik in Bier Nachweisgrenzen von 0,53  $\mu\text{g/L}$  (AOH) und 0,3  $\mu\text{g/L}$  (AME) sowie Bestimmungsgrenzen von 1,75  $\mu\text{g/L}$  (AOH) und 1,0  $\mu\text{g/L}$  (AME) erzielen, was schlechter als die hier mittels SIVA erhaltenen Werte ist. Zachariasova et al. (2010) inkludierten neben AOH und AME auch ALT in ihre U-HPLC-orbitrapMS Multimethode, welche insgesamt 32 Toxine detektieren konnte. Da klassische Verfahren zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wie über das Signal/Rauschverhältnis bei hochauflösender Massenspektroskopie oftmals nicht anwendbar sind, wurde hier das Verfahren des niedrigsten Kalibrierungspunktes (lowest calibration level) angewandt und Bestimmungsgrenzen von 1,5 – 2  $\mu\text{g/L}$  (AOH), 1 – 3  $\mu\text{g/L}$  (AME) und 0,5  $\mu\text{g/L}$  (ALT) erreicht. Die Werte für AOH und AME waren dabei zudem von der

untersuchten Matrix abhängig (Helles Lagerbier, alkoholfreies Bier, Dunkles Lagerbier), wohingegen die Werte für ALT konstant blieben. Ähnliche Matrixunterschiede wurden auch von Prella et al (2013) gefunden, die für die Aufarbeitung von Lagerbier, Bitterbier und Stoutbier jeweils andere Methoden gewählt haben. Große Unterschiede konnten hier zum Beispiel bei AOH entdeckt werden, welches in Lagerbier eine NWG von 0,62 µg/l und eine BG von 2,08 µg/L besaß, wohingegen in Stoutbier etwa zehnfach höhere Werte als in Lagerbier erzielt wurden. Bei AME waren die Matrixunterschiede gering und die für Lagerbier erhaltenen Werte lagen bei 0,46 µg/L (NWG) bzw. 1,53 µg/L (BG). Somit konnten sowohl für AOH als auch für AME durch die in dieser Arbeit angewandte SIVA bessere Werte erzielt werden. Erwähnenswert sind aus dieser Studie ebenfalls die Analyten ALT und TEN, welche mit NWGs von 4 µg/L (ALT) bzw. 0,39 µg/L (TEN) und BGs von 13,35 µg/L (ALT) bzw. 1,29 µg/L (TEN) gut vergleichbar mit den hier erzielten Werten waren. In der hier vorliegenden Arbeit konnten zudem bei der Methodenentwicklung keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Biersorten festgestellt werden, sodass während der Aufarbeitung und Validierung nicht zwischen verschiedenen Bierarten unterschieden wurde.

Die NWG und BG für TeA betragen bei Prella et al. (2013) 0,39 µg/L bzw. 10,39 µg/L und lagen somit über den in dieser Arbeit erzielten Werten, was vermutlich erneut auf die hier verwendete SIVA zurückzuführen ist. Auch Siegel et al. (2010b), welche ebenfalls TeA in Bier analysiert haben, konnten mit ihrer Derivatisierungsmethode lediglich eine Nachweisgrenze von 2 µg/L und eine Bestimmungsgrenze von 8 µg/L erzielen.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit im Vergleich zu anderen publizierten Methoden bessere oder vergleichbare NWGs und BGs erzielt werden, sodass die hier vorliegende Empfindlichkeit als gut eingestuft werden kann. Dies liegt zum einen an der für AOH, TeA und AME verwendeten SIVA, welche hier zum ersten Mal zur Bestimmung von *Alternaria* Toxinen in Bier angewandt wurde, zum anderen könnte es an der im Vergleich zur Literatur zum Teil höheren Probenmenge von 5 mL liegen, was zu einer Aufkonzentrierung der Toxine führte. Die modifizierten Toxine AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G sowie AOH-3-S und AME-3-S wurden hier zum ersten Mal in eine Methode zur Analytik von Bieren inkludiert, sodass kein Literaturvergleich durchführbar war.

#### 3.6.4.2 Wiederfindungen der Biermethode

Die Wiederfindungen wurden nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) bestimmt und sollten somit im Bereich zwischen 70 % und 120 % liegen. Dies konnte für alle Toxine auf den drei verschiedenen getesteten Konzentrationsniveaus erreicht werden, sodass auf eine Wiederfindungskorrektur der erhaltenen Ergebnisse verzichtet wurde. Die

gewählten Dotierniveaus lagen für alle Toxine in einem niedrigen Bereich um die Bestimmungsgrenze, da *Alternaria* Toxine eher in geringeren Mengen auftreten und somit die Messgenauigkeit in dem zu erwarteten Konzentrationsbereich beurteilt werden konnte. Auch für TeA wurden diesmal aufgrund der Resultate vorheriger Messungen sowie bereits zur Verfügung stehender Literaturdaten niedrigere Dotierniveaus für die Wiederfindung gewählt.

Die mittels SIVA quantifizierten Toxine AOH, AME und TeA zeigten wie erwartet mit Wiederfindungsraten bei allen drei Konzentrationen zwischen 90 % und 100 % die besten Ergebnisse, aber auch für die mittels Matrixkalibrierung erhaltenen Werte für TEN, ATX II, ALTP und AOH-9-G konnten Wiederfindungen nahe 100 % erreicht werden. Für die Toxine ATX I, ALT und AME-3-G wurde ein leichter Überbefund bei allen drei Dotierniveaus festgestellt, mit einer maximalen Wiederfindungsrate von 114 % für ATX I. Die modifizierten Toxine AOH-3-S und AME-3-S zeigten mit Werten von 84 – 88 % (AOH-3-S) und 86 – 94 % durchschnittlich niedrigere Wiederfindungen, welche jedoch aufgrund der verwendeten Matrixkalibrierung immer noch als zufriedenstellend beurteilt werden können. Auch die Wiederfindung von AOH-3-G auf dem Niveau der Bestimmungsgrenze betrug lediglich 72 %, konnte jedoch in höheren Konzentrationen genauer bestimmt werden. Die Wiederfindungsraten konnten somit auch für alle Toxine ohne isotopenmarkierten Standard als ausreichend betrachtet werden, sodass die externe Quantifizierung über zwei tagesaktuelle Matrixkalibrierpunkte als geeignet angesehen werden konnte und eine gute Alternative zur SIVA darstellte.

Auch die in der Literatur gegebenen Wiederfindungen sind mit den hier erhaltenen Daten vergleichbar. So ermittelten Siegel et al. (2010b) unter Verwendung einer Derivatisierungsmethode eine durchschnittliche Wiederfindung von  $90,4 \pm 22,2$  % für TeA in Bier, wohingegen Prella et al. (2013) ohne Derivatisierung oder SIVA nur ungefähr 70 % der enthaltenen TeA wiederfinden konnte. Für AOH, AME und ALT konnten Wiederfindungen um die 100 % in drei verschiedenen Biersorten erzielt werden (Zachariasova et al. 2010); auch hier wurde für die meisten Toxine ein leichter Überbefund beobachtet. Prella et al. (2013) konnte für AOH, AME, ALT und TEN ebenfalls Wiederfindungen zwischen 80 und 90 % erzielen, ebenso Puangkham et al. (2017). Die anderen *Alternaria* Toxine wurden bisher noch nicht in dieser Matrix bestimmt, sodass kein weiterer Literaturvergleich möglich war.

#### 3.6.4.3 Präzisionen der Biermethode

Die Präzisionen liefern Informationen über Geräteschwankungen, die Homogenität der Probe sowie die Reproduzierbarkeit der gewählten Aufarbeitung. Bei flüssigen Proben kann die Homogenität bei der Probennahme jedoch als gegeben angenommen werden.

Die gerätebedingten Schwankungen lagen bei der hier vorliegenden Messmethode zwischen 2 % und 5 %, sodass die Messungen als präzise betrachtet werden können. Auch die intra- und inter-day Präzisionen, welche Auskunft über die Wiederholpräzision innerhalb eines Tages bzw. innerhalb mehrerer Wochen geben, lagen bei unter 10 %, was erneut die Präzision der Methode bestätigt. Vor allem AOH, TeA und AME, welche über eine SIVA quantifiziert wurden, zeigten hier Varianzkoeffizienten von unter 5 %, wohingegen die Messunsicherheit bei Quantifizierung über eine externe Matrixkalibrierung zwischen 8 % und 10 % lag. Diese Werte sind mit in der Literatur gegebenen Werten vergleichbar oder sogar besser, wobei vor allem bei AOH, AME und TeA in Methoden ohne SIVA eine höhere relative Standardabweichung von teilweise bis zu 15 % vorlag (Puangkham et al. 2017; Prella et al. 2013; Siegel et al. 2010b).

### 3.7 Anwendung der entwickelten LC-MS/MS Methoden

Die zuvor entwickelten und validierten Methoden wurden nun angewandt, um das Verhalten der *Alternaria* Toxine während des Mälzens, der Lagerung sowie während des Brauprozesses zu ermitteln. Da *Alternaria* Toxine oft gering konzentriert auftreten, lagen auch in dieser Arbeit viele Werte unter den jeweiligen Bestimmungsgrenzen der Toxine, was eine Interpretation der Ergebnisse oftmals erschwerte. Um diese Werte dennoch mit auszuwerten, wurde in diesem Fall für grafische Darstellungen der Wert von  $\frac{1}{2}$  x BG verwendet. Werte unter der NWG wurden in dieser Arbeit als "nicht detektiert" (= n.d., in Tabellen) bzw. als 0 µg/kg (in Abbildungen) eingetragen. Für statistische Berechnungen wurde das sogenannte middle-bound Szenario angewandt, bei welchem Werte unter der BG als  $\frac{1}{2}$  x BG, und Werte unter der NWG als  $\frac{1}{2}$  x NWG angegeben werden.

#### 3.7.1 Vergleichende Analyse diverser Praxismuster aus den Jahren 2016 - 2021

Da die aktuelle Belastung von Gerste mit *Alternaria* Toxinen in Deutschland noch weitgehend unbekannt ist, sollte durch Toxinbestimmung diverser Gersten- und Malzproben aus verschiedenen Erntejahren der aktuelle „Status Quo“ ermittelt werden. Zudem sollte anhand einiger Proben der Standorteinfluss auf die Toxinbildung sowie die generelle Toxinentwicklung in vier aufeinanderfolgenden Erntejahren untersucht werden. Teile dieses Kapitels wurden bereits in Scheibenzuber et al. (2022) publiziert.

##### 3.7.1.1 Analytik von 56 Gerstenproben

Um einen ersten Überblick über die Belastung mit *Alternaria* Toxinen zu erhalten, wurden 56 Gerstenproben aus den Erntejahren 2016 – 2021 nach 6.10.3 aufgearbeitet und auf ihren Toxingehalt untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.18 dargestellt, eine detaillierte Auflistung aller Proben und Toxingehalte ist in Anhang 3 zu finden.

Von den 56 analysierten Gerstenproben konnten in 51 Proben *Alternaria* Toxine nachgewiesen werden, sodass lediglich 5 Proben als toxfrei identifiziert wurden.

Als dominierendes Toxin lag die Tenuazonsäure vor, welche über alle sechs Erntejahre hinweg in nahezu allen Proben präsent war. Die Toxine AOH und AME wurden nur in einigen wenigen Proben detektiert, wobei hier vor allem das Jahr 2017 auffiel, in welchem beide Toxine in allen vorliegenden Proben gefunden werden konnten. Auch ATX I konnte mit Ausnahme einer Probe aus dem Jahr 2021 nur in den Proben aus dem Jahr 2017 nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.18** Zusammenfassung der Analytik von 56 Gerstenproben aus den Erntejahren 2016 – 2021. Toxinkonzentrationen sind als Mittelwert und Standardabweichung einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben,

	Erntejahr	Positive Proben <sup>(1)</sup>	Proben < BG <sup>(2)</sup>	Minimale Konzentration [µg/kg] <sup>(3)</sup>	Maximale Konzentration [µg/kg] <sup>(3)</sup>
AOH	2016	3/15	2	3,20 ± 0,15	3,20 ± 0,15
	2017	8/8	0	1,91 ± 0,07	20,6 ± 1,2
	2018	0/6	-	-	-
	2019	1/15	0	2,69 ± 0,21	2,69 ± 0,21
	2020	1/6	0	11,9 ± 0,9	11,9 ± 0,9
	2021	1/6	0	5,54 ± 0,31	5,54 ± 0,31
AME	2016	0/15	-	-	-
	2017	8/8	0	1,15 ± 0,08	6,62 ± 0,66
	2018	0/6	-	-	-
	2019	0/15	-	-	-
	2020	1/6	0	5,39 ± 0,17	5,39 ± 0,17
	2021	2/6	0	0,93 ± 0,01	3,68 ± 0,16
TeA	2016	10/15	3	2,52 ± 0,14	40,5 ± 2,7
	2017	7/8	4	2,86 ± 0,02	3,19 ± 0,1
	2018	6/6	3	3,57 ± 0,34	8,82 ± 0,21
	2019	13/15	2	3,24 ± 0,25	51,2 ± 1,0
	2020	6/6	1	2,93 ± 0,2	165 ± 9
	2021	6/6	5	45,5 ± 3,7	45,5 ± 3,7
ALTP	2016	1/15	0	4,24 ± 0,38	4,24 ± 0,38
	2017	0/8	-	-	-
	2018	0/6	-	-	-
	2019	2/15	2	-	-
	2020	2/6	0	4,53 ± 0,47	6,73 ± 0,44
	2021	3/6	2	2,78 ± 0,49	2,78 ± 0,49
ATX I	2016	0/15	0	-	-
	2017	7/8	5	3,12 ± 0,23	3,12 ± 0,49
	2018	0/6	-	-	-
	2019	0/15	-	-	-
	2020	0/6	-	-	-
	2021	1/6	0	2,63 ± 0,41	2,63 ± 0,41
TEN	2016	3/15	1	0,56 ± 0,08	0,60 ± 0,04
	2017	8/8	7	0,54 ± 0,06	0,54 ± 0,06
	2018	2/6	3	0,55 ± 0,06	0,55 ± 0,06
	2019	11/15	5	0,50 ± 0,04	3,09 ± 0,52
	2020	5/6	0	0,57 ± 0,09	1,65 ± 0,24
	2021	4/6	3	0,63 ± 0,15	0,63 ± 0,15
AOH-3-S	2016	0/15	-	-	-
	2017	0/8	-	-	-
	2018	0/6	-	-	-
	2019	0/15	-	-	-
	2020	1/6	0	6,23 ± 0,49	6,23 ± 0,49
	2021	0/6	-	-	-

<sup>(1)</sup> x/x: Anzahl positiver Proben/Anzahl Gesamtmenge an Proben; <sup>(2)</sup> Anzahl der Proben mit Gehalten > NWG und < BG; <sup>(3)</sup> Bei nur einer positiven Probe minimale und maximale Konzentration identisch

Während ALTP in lediglich 8 der 56 analysierten Gerstenproben zu finden war, konnte TEN mit 33 positiven Proben in mehr als der Hälfte der untersuchten Gersten gefunden werden. Hierbei zu jedoch zu beachten, dass der Gehalt an TEN für 19 Proben unter der Bestimmungsgrenze, also unter  $0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ , lag. Von den modifizierten Toxinen konnte AOH-3-S in einer Gerstenprobe mit einem Gehalt von  $6,23 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert werden. Die gefundenen Konzentrationen lagen generell in einem niedrigen Bereich meist nahe der Bestimmungsgrenze, lediglich für TeA wurden gelegentlich höhere Werte bis zu  $165 \pm 9 \mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden. Als Maximalkonzentrationen konnten für AOH im Jahr 2017  $20,6 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{kg}$  und für AME  $6,62 \pm 0,66 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert werden, bei ALTP konnte das Maximum mit  $6,73 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{kg}$  in einer Probe aus dem Jahr 2020 bestimmt werden. Für ATX I lag der Maximalwert mit  $3,12 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{kg}$  (2017) nur knapp über der Bestimmungsgrenze von  $2,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , und auch für TEN konnten mit einigen wenigen Ausnahmen meist nur Konzentrationen  $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden werden; der Maximalwert lag hier bei  $3,09 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{kg}$  TEN in einer Probe aus dem Jahr 2019 vor.

### 3.7.1.2 Analytik von 56 Malzproben

Die in Kapitel 3.7.1.1 analysierten Gerstenproben wurden nach MEBAK (siehe 6.14.1.2) vermälzt und erneut auf ihren Toxingehalt untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.19 zusammengefasst und in Anhang 3 detailliert dargestellt.

Nach dem Mälzen wurden in 55 von 56 Proben *Alternaria* Toxine nachgewiesen, sodass lediglich eine Probe aus dem Jahr 2018 als toxfrei identifiziert werden konnte. Als dominierend auftretendes Toxin zeigte sich erneut die Tenuazonsäure, welche nun in 55 Malzproben in Gehalten bis zu  $247,1 \pm 16,2 \mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden werden konnte. Somit wurde TeA im Malz in vier Proben mehr detektiert als in der Gerste, was ein erstes Indiz für eine Toxinbildung während des Mälzens darstellte. Zudem wurde für TeA in fast allen Proben eine deutliche Konzentrationszunahme beobachtet, welche meist mehrere Mikrogramm ausmachte. In einigen Proben konnten jedoch auch deutlich höhere Konzentrationsanstiege gefunden werden, wie zum Beispiel in einer Gerstenprobe aus dem Jahr 2018, bei welcher der TeA Gehalt von  $6,98 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Gerste) auf  $126,38 \pm 3,63 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Malz) anstieg, und auch im Jahr 2019 wurde in einer Probe ein Konzentrationsanstieg von fast  $230 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert. AOH konnte nun in 29 statt zuvor in 19 Proben gefunden werden; hier war die Konzentrationszunahme jedoch gering und zuvor negative Proben lagen meist unter der Bestimmungsgrenze, sodass nur geringe Unterschiede zwischen dem AOH Gehalt in Gerste und Malz zu erkennen waren. Auch bei AME konnte eine leichte Zunahme beobachtet werden: statt zuvor 11 positiven Proben konnte dieses Toxin nun in 17 Malzproben nachgewiesen werden. Analog dem AOH waren die Konzentrationsunterschiede auch hier nur gering. Am



auffallendsten bei der Malzanalytik waren jedoch die Toxine ALTP und ATX I, welche in der Gerste lediglich in jeweils 8 Proben nachgewiesen werden konnten. Unter den Malzproben zeigten nun 36 bzw. 26 Proben eine Belastung mit ALTP bzw. ATX I. Bei ALTP lagen 19 der 36 Malze unter der Bestimmungsgrenze und maximale Konzentrationen wurden mit  $15,56 \pm 2,54 \mu\text{g}/\text{kg}$  in einer Probe aus dem Jahr 2019 detektiert. Bei ATX I lagen sogar 21 der 26 positiven Proben unter der Bestimmungsgrenze, sodass die Toxinzunahme während des Mälzens nach aktuellem Stand als gering einzustufen ist. Für dieses Toxin lag der höchste gefundene Wert bei  $4,19 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{kg}$  und somit nur  $2 \mu\text{g}$  über der Bestimmungsgrenze. Für TEN blieb die Anzahl der positiven Proben nahezu gleich und auch die erhaltenen Konzentrationen entsprachen in der Regel im Rahmen der Standardabweichung den in der Gerste detektierten Gehalten. Beim modifizierten Toxin AOH-3-S stieg der Gehalt der Probe aus dem Jahr 2020 von  $6,23 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{kg}$  auf  $15,66 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{kg}$  an, wohingegen zeitgleich ein Rückgang der AOH Konzentration von  $11,89 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{kg}$  auf  $6,94 \pm 0,33 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert wurde und somit Modifizierungsreaktionen während des Mälzens angenommen werden können.

Zusätzlich konnte AOH-3-S in zwei weiteren Malzproben aus dem Jahr 2016 mit Gehalten von  $3,18 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $6,72 \pm 0,66 \mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden werden. Hier war jedoch in beiden Proben ebenfalls ein Anstieg von AOH zu beobachten, was wiederum auf eine erhöhte Pilzaktivität hindeuten könnte und eine Modifizierung während des Mälzens nicht eindeutig bestätigt.

Zur weiteren Ergebnisauswertung wurde ein Paardifferenzentest abhängiger Stichproben durchgeführt, um zu ermitteln, ob die Konzentrationsunterschiede zwischen den Gersten und ihren korrespondierenden Malzen signifikant verschieden sind. Da die bisherige Auswertung höhere Toxingehalte im Malz vermuten lässt, wurde der Test einseitig durchgeführt. Diese statistische Auswertung zeigte signifikant höhere Konzentrationen im Malz für die Toxine AOH, AME, TeA, ATX I und ALTP ( $\alpha = 0,05$ ) und keine signifikanten Unterschiede bei den Toxinen TEN und AOH-3-S, was die zuvor beschriebenen Beobachtungen bestätigte.

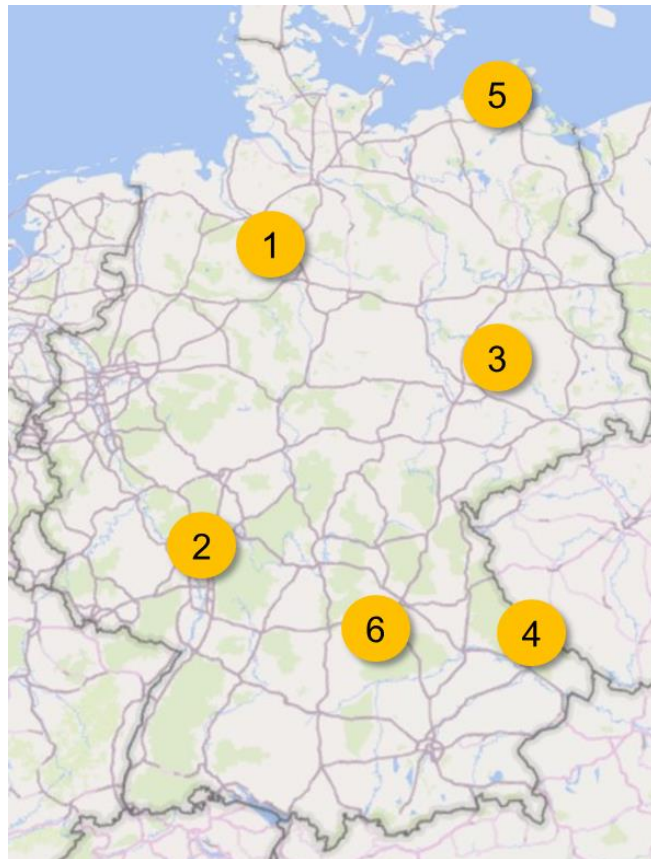
**Tabelle 3.19** Zusammenfassung der Analytik von 56 Malzproben aus den Erntejahren 2016 – 2021. Toxinkonzentrationen sind als Mittelwert und Standardabweichung einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben,

	Erntejahr	Positive Proben <sup>(1)</sup>	Proben <BG <sup>(2)</sup>	Minimale Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] <sup>(3)</sup>	Maximale Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] <sup>(3)</sup>
AOH	2016	4/15	0	1,87 ± 0,15	6,30 ± 0,64
	2017	8/8	1	2,30 ± 0,20	15,6 ± 1,3
	2018	0/6	-	-	-
	2019	10/15	6	2,16 ± 0,05	12,9 ± 0,4
	2020	2/6	0	2,45 ± 0,28	5,24 ± 0,15
	2021	5/6	2	1,69 ± 0,17	4,96 ± 0,59
AME	2016	0/15	-	-	-
	2017	8/8	0	1,06 ± 0,06	5,56 ± 0,34
	2018	0/6	-	-	-
	2019	2/15	0	1,57 ± 0,11	5,41 ± 0,37
	2020	3/6	0	2,15 ± 0,16	6,53 ± 0,4
	2021	4/6	0	0,96 ± 0,01	1,71 ± 0,14
TeA	2016	15/15	2	3,42 ± 0,33	87,0 ± 2,8
	2017	8/8	0	8,55 ± 0,60	186 ± 11
	2018	5/6	1	4,28 ± 0,4	102 ± 7
	2019	14/15	0	5,10 ± 0,14	247,1 ± 16,2
	2020	6/6	0	7,67 ± 0,36	156 ± 11
	2021	6/6	2	3,38 ± 0,28	11,2 ± 0,7
ALTP	2016	9/15	5	4,15 ± 0,41	7,28 ± 0,70
	2017	0/8	-	-	-
	2018	3/6	3	-	-
	2019	13/15	4	2,95 ± 0,12	15,6 ± 2,5
	2020	5/6	3	3,07 ± 0,38	3,35 ± 0,38
	2021	6/6	4	2,56 ± 0,33	5,64 ± 0,58
ATX I	2016	8/15	7	2,40 ± 0,19	2,40 ± 0,19
	2017	7/8	5	3,02 ± 0,36	4,19 ± 0,44
	2018	0/6	-	-	-
	2019	7/15	6	3,53 ± 0,32	3,53 ± 0,32
	2020	1/6	1	-	-
	2021	3/6	2	3,04 ± 0,49	3,04 ± 0,49
TEN	2016	3/15	2	0,49 ± 0,06	0,49 ± 0,06
	2017	7/8	5	0,51 ± 0,06	0,54 ± 0,22
	2018	3/6	1	0,46 ± 0,04	0,48 ± 0,04
	2019	11/15	7	0,49 ± 0,02	2,35 ± 0,06
	2020	5/6	1	0,59 ± 0,11	1,43 ± 0,27
	2021	2/6	2	-	-
AOH-3-S	2016	2/15	0	3,18 ± 0,20	6,72 ± 0,66
	2017	0/8	-	-	-
	2018	0/6	-	-	-
	2019	0/15	-	-	-
	2020	1/6	0	15,66 ± 0,91	15,66 ± 0,91
	2021	0/6	-	-	-

<sup>(1)</sup> x/x: Anzahl positiver Proben/Anzahl Gesamtmenge an Proben; <sup>(2)</sup> Anzahl der Proben mit Gehalten >NWG und <BG; <sup>(3)</sup> Bei nur einer positiven Probe minimale und maximale Konzentration identisch

### 3.7.1.3 Vergleich der Toxingehalte von 6 verschiedenen Standorten in vier Erntejahren

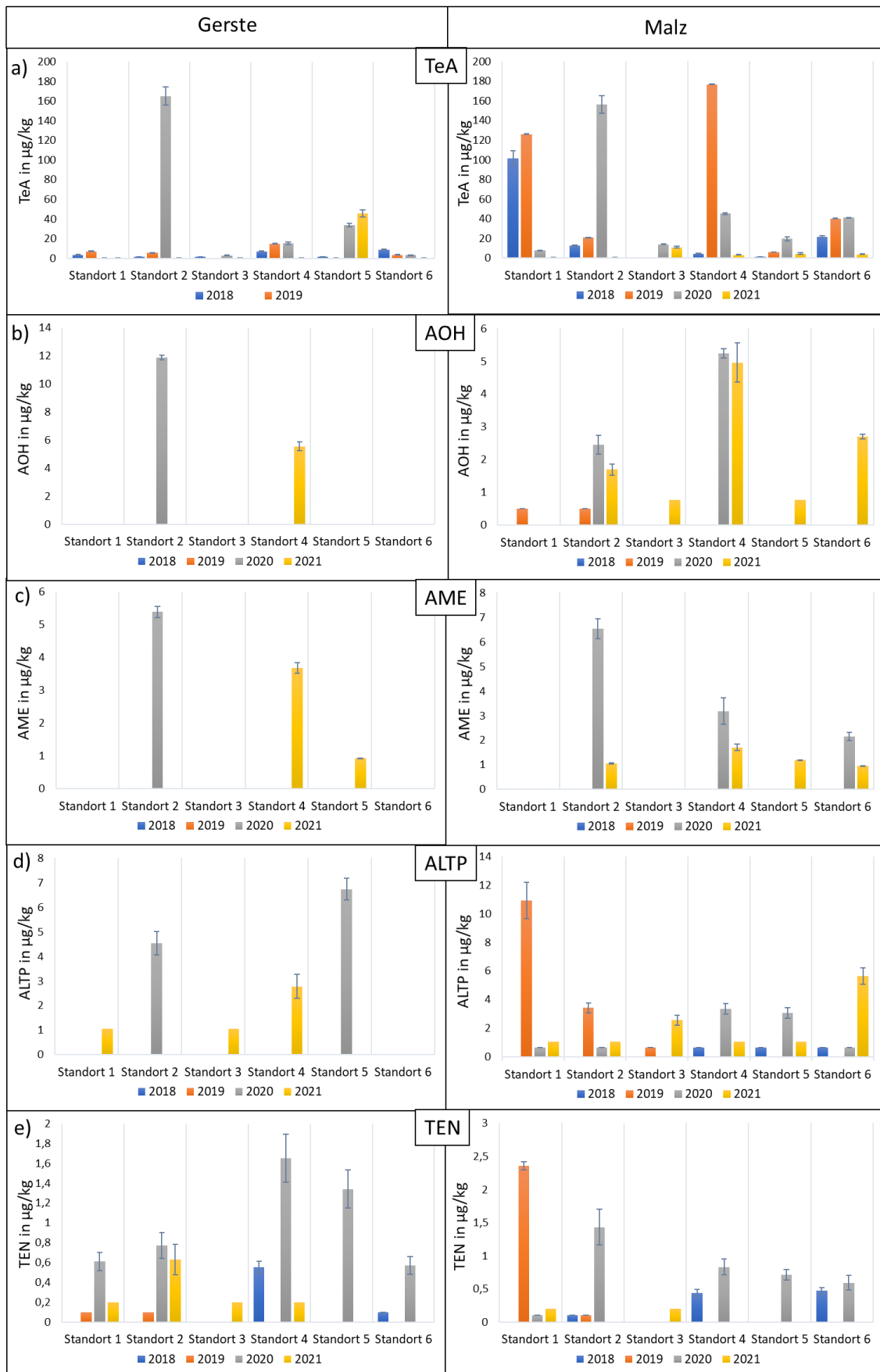
Unter den in 3.7.1.1 und 3.7.1.2 analysierten Gersten- und Malzen lagen in den Jahren 2018 – 2021 jeweils sechs Proben vor, welche jährlich an sechs verschiedenen Standorten in Deutschland unter identischen Bedingungen (gleiches Saatgut, identische Aussaat- und Erntezeit) angebaut wurden (Siehe Anhang 3). Hierbei wurde die Gerstensorte Avalon verwendet (Saatzucht Breun, Herzogenaaurach, Deutschland) und die verschiedenen Anbauggebiete sind in Abbildung 3.43 grafisch dargestellt.



**Abbildung 3.43** Anbauggebiete der Gerstenproben für den Standortvergleich über 4 Erntejahre hinweg (2018 – 2021).

Anhand der Toxingehalte dieser Proben sollte nun ermittelt werden, wie das Toxinspektrum über vier Erntejahre hinweg an verschiedenen Standorten variiert.

Für TeA konnten in den Gerstenproben meist sehr geringe Konzentrationen von unter 20 µg/kg gefunden werden, nur an Standort 5 wurden im Jahr 2020 und 2021 zwei Jahre in Folge höhere Werte von  $33,67 \pm 1,95$  µg/kg beziehungsweise  $45,49 \pm 3,68$  µg/kg detektiert.



**Abbildung 3.44** Toxinvergleich von Gerste und Malz sechs verschiedener Standorte aus den Jahren 2018 – 2021.

Der Höchstwert von TeA wurde im Jahr 2020 an Standort 2 beobachtet, an welchem  $165 \pm 9 \mu\text{g}/\text{kg}$  in der Gerstenprobe vorlagen. Bei dieser Probe blieb der Wert während des Mälzens konstant, sodass auch durch das hier gewonnene Malz keine Gefährdung für den Konsumenten entstanden ist. An den anderen Standorten konnte wie zuvor bereits beobachtet nach dem Mälzen ein deutlicher Anstieg des TeA Gehaltes mit einem Maximalwert von  $177 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert werden. Insgesamt war TeA nur in einer Gerstenprobe und zwei Malzproben nicht nachweisbar. Bei den Toxinen AOH und AME fiel die Belastung der Gerstenproben deutlich geringer aus: im Jahr 2020 wurden beide Toxine lediglich an Standort 2 gefunden, im Jahr 2021 war Standort 4 mit beiden Toxinen und zusätzlich Standort 5 mit AME belastet. Maximale Konzentrationen wurden mit  $11,89 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{kg}$  AOH bzw.  $5,39 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{kg}$  AME im Jahr 2020 an Standort 2 gefunden. An den Standorten 1, 3, 5 und 6 konnte in keinem der vier untersuchten Erntejahre AOH nachgewiesen werden, jedoch waren mehrere Malzproben mit diesem Toxin belastet. So war AOH im Jahr 2019 im Malz der Standorte 1 und 2 zu finden, wohingegen im Jahr 2020 die Malze von Standort 2 und 4 kontaminiert waren. Im Jahr 2021 konnte AOH in allen Malzen außer dem von Standort 1 nachgewiesen werden. Die erhaltenen Konzentrationen lagen in allen Erntejahren generell im Bereich der Bestimmungsgrenze und konnten als gering eingestuft werden. Auffallend waren jedoch die Proben aus dem Jahr 2020 (Standort 2), da hier die Malzprobe deutlich geringer mit AOH belastet war als die Gerstenprobe. Bei AME konnten sowohl die Gersten- als auch die Malzproben von Standort 1 und 3 in allen untersuchten Erntejahren als unbelastet identifiziert werden, wohingegen es an Standort 6 im Jahr 2020 und 2021 zu einer Bildung von AME während des Mälzens gekommen ist. Auch an Standort 2 konnte im Jahr 2020 eine Konzentrationszunahme beobachtet werden, sodass der in Gerste vorliegende Maximalgehalt von  $5,39 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{kg}$  nach dem Mälzen auf  $6,53 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  gestiegen ist. Zusätzlich konnte AME im Jahr 2021 an diesem Standort detektiert werden. An Standort 4 erfolgte während des Mälzens eine Bildung von AME im Jahr 2020, wohingegen im Malz aus dem Jahr 2021 ein niedrigerer Gehalt detektiert wurde als in der zugehörigen Gerste. An Standort 5 lag im Jahr 2021 vor und nach dem Mälzen eine ähnliche AME Konzentration vor.

Das Toxin ALTP konnte in den Gerstenproben lediglich vereinzelt in den Jahren 2020 und 2021 nachgewiesen werden. Hierbei waren im Jahr 2020 die Standorte 2 und 5 mit einem Maximalgehalt von  $6,73 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{kg}$  belastet, wohingegen im Jahr 2021 die Standorte 1, 3 und 4 mit Konzentrationen nahe oder unter der Bestimmungsgrenze befallen waren. Bei den Malzproben wird erneut die eindeutige Bildung von ALTP während des Mälzens deutlich: hier konnte ALTP im Jahr 2018 und 2019 an jeweils drei Standorten, 2020 an fünf Standorten und 2021 an allen sechs Standorten bestimmt werden. Die gefundenen Konzentrationen lagen hierbei jedoch erneut nahe oder unter der Bestimmungsgrenze, lediglich an Standort 1 und 6

konnten mit  $10,93 \pm 1,28 \mu\text{g/kg}$  (Standort 1, 2019) und  $5,64 \pm 0,58 \mu\text{g/kg}$  (Standort 6, 2021) höhere Mengen ALTP gefunden werden.

Tentoxin wurde an mehreren Standorten und in allen Erntejahren detektiert, jedoch lagen alle Werte unter  $2 \mu\text{g/kg}$  (Gerste) bzw. unter  $2,5 \mu\text{g/kg}$  (Malz). Bei den Gerstenproben waren im Jahr 2018 und 2019 je zwei Standorte betroffen, im Jahr 2020 waren es fünf und im Jahr 2021 vier Standorte. In den jeweils korrespondierenden Malzproben lagen die erhaltenen Konzentrationen für TEN unter Einbezug der jeweiligen Standardabweichungen in einem ähnlichen Bereich, lediglich im Jahr 2019 konnte an Standort 1 im Malz ein erhöhter Wert von  $2,35 \pm 0,06 \mu\text{g/kg}$  gemessen werden, wohingegen die Konzentration in der zugehörigen Gerstenprobe unter der Bestimmungsgrenze lag.

Zusätzlich zu den in Abbildung 3.44 dargestellten Toxinen konnten vereinzelt auch ATX I und AOH-3-S gefunden werden. In Gerste lag ATX I im Jahr 2021 an Standort 4 in einer Konzentration nahe der Bestimmungsgrenze vor, im Malz konnte ATX I zusätzlich in vier weiteren Proben nachgewiesen werden, von denen die Konzentrationen in drei Proben unter der Bestimmungsgrenze lagen. Die maximal gefundene Konzentration wurde im Malz mit  $3,53 \pm 0,32 \mu\text{g/kg}$  im Jahr 2019 an Standort 2 gefunden. AOH-3-S konnte lediglich in der Gersten- und Malzprobe aus dem Jahr 2020 an Standort 2 gefunden werden. Die Konzentrationen lagen hierbei in der Gerste bei  $6,23 \pm 0,49 \mu\text{g/kg}$  und im Malz bei  $15,66 \pm 0,91 \mu\text{g/kg}$ .

#### *3.7.1.4 Diskussion: Vergleichende Analyse diverser Praxismuster aus den Jahren 2016 – 2021*

##### Gerstenscreening

Pilze der Gattung *Alternaria* spp. wurden in der Vergangenheit mehrfach als ein häufig vorkommender Kontaminant von Gerste beschrieben und die Toxine AOH und AME wurden bereits im Jahr 1988 von Gruber-Schley und Thalmann (1988) in diesem Lebensmittel nachgewiesen. Generell sind Daten zu *Alternaria* Toxinen in Braugerste jedoch nur eingeschränkt verfügbar und speziell Daten zu deutschen Gerstenproben sind bisher noch nicht publiziert worden, sodass das hier durchgeführte Gerstenscreening einen Einblick über den aktuellen Status quo liefern sollte.

Untersucht wurden in dieser Arbeit stichprobenartig insgesamt 56 Gerstenproben aus den Erntejahren 2016 – 2021, von denen lediglich fünf Proben als toxinfrei eingestuft werden konnten. Das vorherrschende Toxin war hierbei Tenuazonsäure, welche in 48 der 56 analysierten Gerstenproben in Konzentrationen bis zu  $165 \mu\text{g/kg}$  vorlag. AOH konnte in 25 %, AME in 19,6 % und TEN in 59 % aller Proben gefunden werden. Die Toxine ALTP und ATX I

kamen mit jeweils 14 % positiver Proben eher selten vor, ebenso wie das modifizierte Toxin AOH-3-S, welches lediglich in einer Gerstenprobe (1,7 %) detektiert werden konnte. Die Toxine ALT, ATX II, STE III sowie die modifizierten Formen AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G konnten in keiner Probe nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der einzelnen Erntejahre konnte beobachtet werden, dass im Jahr 2017 die höchste Toxinvielfalt sowie die höchste Anzahl positiver Proben vorlag. Dies könnte auf den im Vergleich zu den anderen Erntejahren nassen Sommer zurückzuführen sein (Deutscher Wetterdienst 2020), bei dem ein vermehrtes Wachstum von *Alternaria* spp. aufgetreten sein könnte.

Zum Vorkommen einzelner *Alternaria* Toxine in Gerste sind bereits Daten vorhanden, jedoch wurden hier meist nur AOH, AME und TeA, sowie in einigen Fällen ATX I, ALT und TEN berücksichtigt, sodass die Datenlage hierzu noch unvollständig ist und die hier erzielten Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zur Einschätzung der Relevanz dieser Toxine leisten. In einer Studie aus dem Jahr 2013 analysierten Uhlig et al. (2013) neben Gerste auch Weizen und Hafer und konnten in 98 % aller Proben AME, in 80 % AOH und in 95 % ATX I detektieren, wohingegen TeA lediglich in 15 % der Proben enthalten war. Dies widerspricht den in dieser Arbeit gefundenen Werten, da TeA in 85,7 % der Gerstenproben vorkam und somit deutlich häufiger auftrat als in den Jahren 2012/2013 in Norwegen. Im Gegensatz dazu wurde AOH und AME in weniger Proben nachgewiesen als bei Uhlig et al. (2013), jedoch ist zu berücksichtigen, dass die norwegische Studie in zwei regenreichen Erntejahren durchgeführt wurde, wohingegen die hier vorliegenden Ergebnisse überwiegend von Proben aus eher trockenen Sommern stammen.

Die Konzentrationen der in dieser Arbeit detektierten Toxine waren insgesamt betrachtet sehr niedrig und lagen oftmals unter der Bestimmungsgrenze des jeweiligen Toxins. Uhlig et al. (2013) bestimmten in ihrer Studie als maximale Konzentrationen für AOH 37,7 µg/kg, für AME 5,2 µg/kg und für TeA 247 µg/kg, was mit den in dieser Arbeit erzielten Werten vergleichbar ist. Für TeA wurde zudem angegeben, dass die meisten Proben sehr niedrig konzentriert waren und meist weniger als 100 µg/kg enthielten, was ebenfalls mit den hier erzielten Ergebnissen vereinbar ist. Auch die maximalen Konzentrationen von ATX I (5,6 µg/kg) und TEN (0,4 µg/kg) weichen nur geringfügig von den hier ermittelten Maximalwerten ab, jedoch konnte ATX I in dieser Arbeit nur in 14 % Proben und nicht in 95 % detektiert werden. Asam et al. (2011a) analysierten ebenfalls diverse Getreidesorten auf AOH und AME, konnten in dem einzigen untersuchten Gerstenmehl jedoch keines der beiden Toxine nachweisen. In einer Studie zu Alternariol in Getreide aus Estland konnte unter vier Gerstenproben in nur einer Probe AOH mit einer Konzentration von 130 µg/kg gefunden werden (Kütt et al. 2010). In Schweden wurde AOH in 16 von 18 analysierten Getreideproben in Gehalten zwischen 9 und

335 µg/kg nachgewiesen, ebenso wurde AME in 7 der 18 Getreideproben in Gehalten zwischen 1 und 184 µg/kg gefunden, wohingegen das Toxin TeA in jeder der analysierten Proben bestimmt werden konnte (Hägglom et al. 2007). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2021 analysierte 87 Pilzmetaboliten in Gerste, von denen die am häufigsten nachweisbaren Toxine von *Fusarium* spp. und *Alternaria* spp. stammten. Im Fall von *Alternaria* spp. konnten 12 verschiedene Metaboliten gemessen werden, unter anderem das selten berücksichtigte Infectopyron, welches in über 50 % der Proben auftrat. AOH konnte hier in Konzentrationen von 0,2 – 50 µg/kg gemessen werden, wohingegen die Konzentrationsbereiche für AME bei 0,3 – 4,8 µg/kg, für ATX I bei 2,4 – 40 µg/kg, für TEN bei 0,2 – 8,4 µg/kg und für TeA bei 15 – 922 µg/kg lagen und somit prinzipiell ähnlich zu den in dieser Studie erhaltenen Werten waren (Drakopoulos et al. 2021). Burkin und Kononenko (2011) untersuchten in ihrer Studie 56 Hafer – und 62 Gerstenproben auf das Toxin AOH und konnten mittels EIA Gehalte von 20 – 126 µg/kg finden, was deutlich über den hier vorliegenden Ergebnissen liegt. Ebenfalls höhere Werte konnten von Castañares et al. (2020) in argentinischen Gersten gefunden werden. Hier wurde in 50 der 60 analysierten Proben mindestens ein *Alternaria* Toxin detektiert, von denen AOH dominierend vorlag und TeA die höchsten Durchschnittsgehalte aufzeigte. So konnten für TeA durchschnittlich 1646 µg/kg (2014) bzw. 1397 µg/kg (2015) gefunden werden, wohingegen AOH im Jahr 2014 durchschnittlich mit 623 µg/kg und 2015 mit 801 µg/kg vorlag. Während AME im Jahr 2014 nicht detektiert werden konnte, lag der durchschnittliche Maximalwert der fünf positiven Proben bei 2201 µg/kg (Castañares et al. 2020). Ebenfalls hohe Konzentrationen konnten in Slovenien für die Toxine TeA, AME und AOH beobachtet werden (Babič et al. 2021). Hier konnte in 12 % der untersuchten Gerstenproben TeA und in 4 % AOH detektiert werden, wohingegen AME und TEN in keiner Probe nachgewiesen wurden. Somit lagen die Befallsraten für Gersten und auch Weizen deutlich unter denen der anderen analysierten Getreidesorten (Hafer, Roggen und Triticale) (Babič et al. 2021). Eine italienische Studie aus dem Jahr 2016 zeigte die AOH und AME Gehalte in 43 Gerstenproben und fand als Maximalwerte 14,7 µg/kg AOH und 28,3 µg/kg AME, was erneut mit den in dieser Arbeit erzielten Werten vergleichbar ist. Auch die Anzahl der positiven Proben lag mit 28 % AOH bzw. 21 % AME in einem ähnlichen Bereich wie in dieser Arbeit vor (Beccari et al. 2016).

Zusammenfassend können die in dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen als niedrig eingestuft werden und sind mit einigen bereits publizierten Daten gut vergleichbar. Anhand der verfügbaren Literaturdaten ist jedoch erkennbar, dass sich Toxingehalte verschiedener Länder deutlich unterscheiden können, sodass die hier analysierten Proben aus Deutschland und Dänemark zur Einstufung der Gesamtbelastung in Europa beitragen. Die doch große Anzahl belasteter Proben in dieser sowie bereits publizierten Studien verdeutlichen zudem



die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen dieser Matrix, insbesondere da aktuell Daten über das Verhalten der *Alternaria* Toxine während der Gerstenverarbeitung fehlen.

### Malzscreening

Aufgrund mangelnder Daten zur Belastung von Malz mit *Alternaria* Toxinen, wurden alle 56 Gerstenproben aus dem Gerstenscreening nach dem MEBAK Standardmälzungsverfahren vermälzt und erneut analysiert. Durch den Vergleich der Konzentrationen im Malz mit denen in der Gerste konnten somit bereits erste Erkenntnisse über das Verhalten der *Alternaria* Toxine während des Mälzens getroffen werden.

Unter allen 56 analysierten Proben konnte nur eine einzige Malzprobe als toxinfrei eingestuft werden, sodass bereits hier anhand der Anzahl belasteter Proben auf eine Toxinbildung während des Mälzens geschlossen werden kann. Prinzipiell konnten alle in den jeweiligen Gerstenproben detektierten Toxine auch in den korrespondierenden Malzen gefunden werden. Abweichende Ergebnisse gab es nur in vier Probenpaaren für die Toxine TEN (F 58, 2017; F 50, 2019), TeA (BP 23, 2018) und ATX I (F 55, 2017), welche hier lediglich in der Gerste detektiert werden konnten. Bei einer dieser vier Proben lag die ermittelte Konzentration der Gerstenprobe unter der BG, sodass es sich hier um normale Messunsicherheiten handeln könnte, wobei bei den anderen drei Proben eher von einem Übergang der Toxine ins Weichwasser oder von der Bildung anderer Metaboliten ausgegangen werden muss. Als dominantes Toxin lag im Malz analog den Gerstenproben die Tenuazonsäure vor, wobei in den meisten Proben ein deutlich höherer Wert im Malz als in der Gerste messbar war. Der gefundene Maximalwert für TeA kann mit 247 µg/kg jedoch immer noch als unkritisch betrachtet werden. Für AOH stieg die Anzahl positiver Proben von 19 auf 29 an, allerdings war die Konzentrationszunahme sehr gering, sodass während der Mälzung eher von einer geringfügigen AOH Bildung ausgegangen werden kann. Ähnliches konnte bei AME beobachtet werden, bei dem der Mälzungsverlauf ebenfalls zur Neubildung und somit im Vergleich zur Gerste zu zusätzlichen sechs belasteten Proben beigetragen hat. Den größten Einfluss hatte der Mälzungsprozess jedoch auf die Toxine ALTP und ATX I, welche nun in ca. der Hälfte aller Proben nachweisbar waren. Auch wenn die meisten Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze von je 2,1 µg/kg lagen und die hier erhaltenen Ergebnisse somit auch auf Messunsicherheiten zurückzuführen sein könnten, sollte das hohe Auftreten dieser beiden Toxine nach dem Mälzen nicht vernachlässigt werden. Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigte signifikant höhere Toxingehalte im Malz für die Toxine ALTP, ATX I, AME, AOH und TeA ( $\alpha=0,05$ ), sodass detailliertere Untersuchungen des Mälzungsprozesses benötigt werden, um potenzielle Maßnahmen zur Toxinreduktion testen zu können. Aus mykologischer Sicht erkannten Sanchis et al. (1993) und Medina et al. (2006)

in ihren Studien zu *Alternaria* spp. in Gerste bereits, dass aufgrund des häufigen Auftretens und der hohen Pilzbelastung ein Anstieg während des Mälzens wahrscheinlich ist. Vor allem die Weiche zu Beginn der Mälzung sowie die anschließende Keimung sind aufgrund der erhöhten Feuchtigkeit sowie die durch die Keimung induzierte Nährstoffvielfalt für das Wachstum diverser Mikroorganismen förderlich (Schwarz et al. 1995; Petters et al. 1988; Noots et al. 1999). Im Gegensatz dazu konnten Bretträger et al. (2022) mittels qPCR Messungen eine geringere *Alternaria* Inzidenz auf Malz als auf Gerste finden, was damit begründet wurde, dass ein Teil der Pilzsporen ins Weichwasser übergeht und somit während des Mälzens entfernt wird. Inwieweit dies jedoch die Toxinbildung beeinträchtigt, wurde bisher noch nicht ausreichend untersucht, obwohl dies für eine Gefährdungsbeurteilung wichtig wäre. Bisher ist hierzu nur eine Studie von Prusova et al. (2021) verfügbar, bei welcher im Rahmen eines Brauversuches die Toxine AOH, AME, TeA und TEN auch über den Mälzungsvorgang verfolgt wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sind mit den hier erzielten Beobachtungen des Gersten- und Malzscreening für diese Toxine vereinbar, für ALTP und ATX I liegen zum aktuellen Zeitpunkt keine Vergleichsdaten vor.

Die in dieser Arbeit analysierten Malzproben lieferten somit im Vergleich zu den jeweiligen unvermälzten Proben einen ersten Blick in das Toxinbildungsverhalten während des Mälzungsverlaufes und sind mit den erzielten Ergebnissen von Prusova et al. (2021) vergleichbar, welche ebenfalls einen Anstieg von AOH, AME, TeA und TEN während des Mälzens beobachten konnten.

### Standorte

Das Pilzwachstum und die damit einhergehende Mykotoxinproduktion hängen maßgeblich von Umwelteinflüssen, insbesondere der Temperatur und der Feuchtigkeit, ab, werden aber auch durch den Anbauort, den Ernte- und Lagerbedingungen sowie der Gerstensorte an sich beeinflusst (Medina et al. 2006; Castañares et al. 2020). Auch die vorliegende Pilz Spezies ist hierbei relevant, da bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Wachstumsoptima vorliegen können, und auch nicht jede Spezies in der Lage ist mehrere verschiedene Mykotoxine zu bilden. Aufgrund all dieser Einflusskriterien ist davon auszugehen, dass der Pilzbefall sowie die in Gerste vorliegenden Mykotoxingehalte zwischen verschiedenen Erntejahren stark variieren (Castañares et al. 2020). In Anbetracht des stattfindenden Klimawandels sind hierfür Hypothesen aufgestellt worden, laut welchen Klimaveränderungen das Pilzwachstum und die Vielfalt bzw. die Konzentration der gebildeten Mykotoxine beeinflussen werden (Magan et al. 2011; van de Perre et al. 2015; Paterson und Lima 2010). So wird erwartet, dass einige Regionen mit aktuell idealen Wachstumsbedingungen für Pathogene bei fortschreitendem Klimawandel zu warm für Schimmelpilze sein werden und somit geringere Mykotoxingehalte

aufweisen werden, wohingegen andererseits Orte, die aktuell zu kalt für Pilzbefall sind, in einigen Jahren von ansteigende Mykotoxingehälter betroffen sein könnten (van de Perre et al. 2015; Paterson und Lima 2011; Miraglia et al. 2009). Ebenso wird angenommen, dass die durch den Klimawandel häufiger auftretenden Extremwetterern (z.B. Stürme, Überschwemmungen) zusätzlich einen Pilzbefall fördern könnten, da beschädigte Pflanzen in der Regel anfälliger für Pathogenbefälle sind (Marvin et al. 2013).

Da insbesondere für *Alternaria* spp. die genauen Einflüsse diverser Umweltfaktoren auf Wachstum und Mykotoxinbildung noch nicht vollständig geklärt sind, diese jedoch für zukünftige Mykotoxinvoraussagen wichtig wären (Vaquera et al. 2016), wurden in dieser Arbeit die Mykotoxingehalte in Gerste von sechs verschiedenen Standorten über vier Erntejahre (2018 – 2021) hinweg verfolgt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden hierfür Gerstensamen der Sorte Avalon zeitgleich an alle sechs Standorte verteilt und die genauen Anbau- und Erntezeitpunkte vorgegeben, sodass als Variablen neben den am jeweiligen Standort vorliegenden klimatischen Bedingungen nur noch unterschiedliche Bodenqualitäten gegeben waren.

Aus den erhaltenen Ergebnissen konnten bisher keine eindeutigen Trends erkannt werden, sodass die Versuchsreihe in den nächsten Jahren weitergeführt werden sollte. Auch das Fehlen detaillierter Klimadaten der einzelnen Standorte machte eine Auswertung der Ergebnisse schwierig. Auffallend war jedoch, dass Standort 5 in zwei aufeinander folgenden Erntejahren höhere TeA Gehalte aufzeigte als die anderen Standorte, an denen die Konzentrationen dieses Toxins in jedem Jahr ähnlich niedrig blieben. Die Toxine AOH, AME und ALTP konnten an mehreren Standorten in den Erntejahren 2020 und 2021 detektiert werden, wohingegen diese Toxine in den Erntejahren 2017-2019 an keinem Standort nachgewiesen werden konnten. Auch TEN wurde vorwiegend in den Erntejahren 2020 und 2021 gefunden, konnte in den Jahren davor jedoch ebenfalls vereinzelt nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich deuteten die erhaltenen Daten vorerst darauf hin, dass die klimatischen Bedingungen der Jahre 2020 und 2021 die Toxinbildung stärker begünstigt haben könnten als in den Jahren zuvor, wobei lokale Wetterdaten der einzelnen Standorte nötig wären, um Ursachen für die unterschiedliche Toxinvielfalt an den sechs verschiedenen Standorten zu ermitteln. Die Ergebnisse aus der DNA-Analytik dieser Proben zeigten zusätzlich eine *Fusarium*-Dominanz an Standort 4 und Standort 6, wohingegen Standort 1 und 3 überwiegend mit *Alternaria* spp. belastet waren (Bretträger et al. 2022). Diese Ergebnisse sind anhand der Toxindaten nicht zu bestätigen, was die Komplexität der noch nicht geklärten Beziehung von Pilzwachstum und Mykotoxinbildung unterstreicht.

Eine vergleichbare Studie wurde bis jetzt lediglich von Castañares et al. (2020) durchgeführt, in welcher sich die Autoren mit der Mykotoxinbelastung (AOH, AME und TeA) von Gerste an unterschiedlichen argentinischen Produktionsorten in zwei aufeinanderfolgenden Erntejahren befasst haben. Um Einflüsse des Wetters näher untersuchen zu können, wurden hierfür die Niederschläge und Durchschnittstemperaturen der Anbauggebiete aufgezeichnet, welche dann mit den Mykotoxinwerten verglichen wurden. Während die Durchschnittstemperaturen in etwa konstant blieben, konnte an allen Standorten eine höhere Niederschlagsrate im Jahr 2014 im Vergleich zu 2015 beobachtet werden. Castañares et al. (2020) fanden in beiden Erntejahren eine ähnliche Anzahl kontaminierter Proben, jedoch waren im regenreicheren Jahr 2014 mehr Proben mit AOH kontaminiert als im darauffolgenden Jahr (81 % im Jahr 2014 zu 47 % im Jahr 2015), wohingegen die Toxine AME und TeA häufiger im trockeneren Erntejahr 2015 vorlagen. Ebenso konnte in beiden Erntejahren beobachtet werden, dass die AOH Gehalte in kälteren Anbaugebieten durchschnittlich niedriger waren als an wärmeren Orten. Zusätzlich wurde für TeA ein starker Zusammenhang zwischen Standort, Klimaeinfluss und Gerstensorte ermittelt. Eine slovenische Studie von Babič et al. (2021) untersuchte 433 gemahlene Getreideproben aus drei Erntejahren (2014 – 2016) auf deren Mykotoxingehalte. In die Probenauswahl fielen neben Gerste auch Weizen-, Roggen-, Hafer- und Triticaleproben; insgesamt konnten in jedem Erntejahr in 51 – 57 % aller Proben Mykotoxine nachgewiesen werden. Am häufigsten konnten hier unter den *Alternaria* Toxinen AOH, TEN und AME detektiert werden. TeA und AME kamen hierbei im Erntejahr 2014 in einer häufigeren Anzahl als im Jahr 2015 vor, wohingegen TEN und AOH vorwiegend im Jahr 2015 auftraten. Für TEN, AOH und TeA konnten jedoch im Jahr 2016 die höchsten Konzentrationen gemessen werden, wohingegen AME im Jahr 2015 sein Maximum erreichte. Aufgrund fehlender Wetterdaten konnten hierzu jedoch ebenfalls keine weiteren Hypothesen aufgestellt werden.

Generell lassen weitere Daten darauf schließen, dass warme Temperaturen in Kombination mit erhöhter Luftfeuchtigkeit vor allem zwischen der Blütezeit und Ernte einen Befall mit *Alternaria* spp. begünstigen, was jedoch aufgrund anderer benötigter Bedingungen sowie anderen konkurrierenden Mikroorganismen nicht automatisch auf verstärkte Mykotoxinbildung schließen lässt (Müller et al. 2012; Janić Hajnal et al. 2015; Castañares et al. 2020, Kosiak et al. 2003). Um die Einflüsse äußerer Umweltfaktoren und somit die durch den Klimawandel verursachten Auswirkungen auf die Mykotoxinbelastung in Gerste näher bestimmen zu können, sollte das in dieser Arbeit durchgeführte Monitoring noch weitere Jahre durchgeführt werden, da in den vier untersuchten Erntejahren noch kein eindeutiger Trend erkennbar war.

### **3.7.2 Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die Toxinbildung in Gerste sowie deren Auswirkungen auf die Mälzung**

Drei Gerstenmuster der Sorte Avalon mit verschiedenem natürlichem Pilzbefall (Referenz ohne Symptomatik, Muster mit niedriger Symptomatik, Muster mit hoher Symptomatik) wurden über einen Zeitraum von acht Monaten bei verschiedenen Parametern gelagert (siehe 6.14.2). Variiert wurden die Lagertemperatur (4 °C, 12 °C), die Belüftung (gut oder schlecht) sowie der Wassergehalt der eingelagerten Gerste (13-14 %, 17-18 %). Die Probennahme erfolgte zu Beginn der Lagerung sowie nach drei und acht Monaten. Ein Teil der entnommenen Probe wurde zudem nach MEBAK (siehe 6.14.1.2) vermälzt und ebenfalls analysiert.

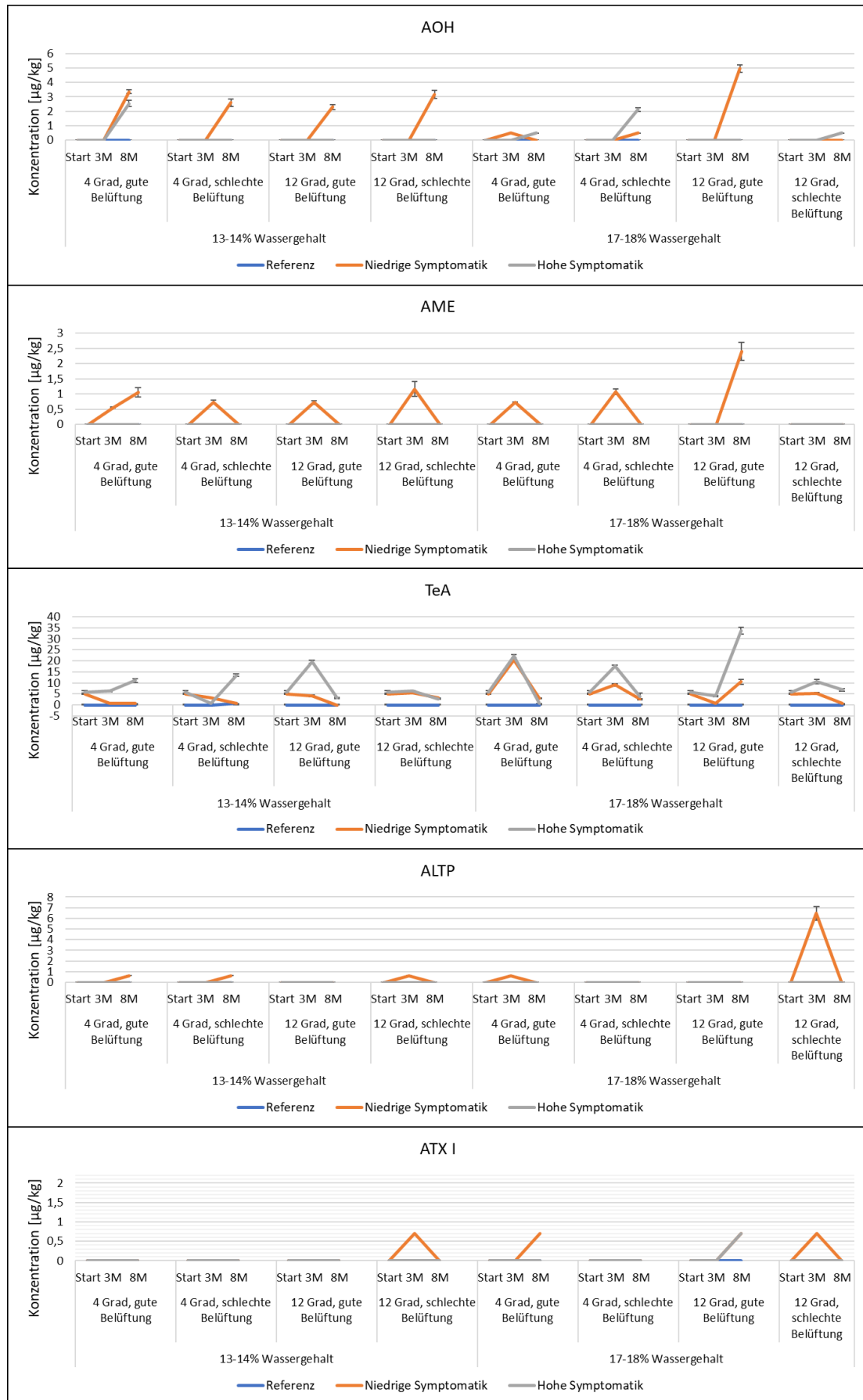
#### *3.7.2.1 Toxingehalte in Gerste nach 3 und 8 Monaten*

Alle Proben wurden mit der zuvor entwickelten LC-MS/MS Methode sowie der TeA-Messmethode analysiert (siehe 6.5.3). Die erhaltenen Ergebnisse der drei Probennahmen sind in Abbildung 3.45 dargestellt.

Die als Referenz gewählte Gerste blieb über die gesamte Lagerdauer toxfrei und auch bei den Mustern mit niedriger bzw. hoher Symptomatik waren keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Lagerungsbedingungen zu erkennen.

Für AOH konnte im Muster mit niedriger Symptomatik bei den meisten Lagerbedingungen eine Toxinbildung nach 8 Monaten beobachtet werden. Bei Lagerung mit 4 °C, guter Belüftung und 17-18 % Wassergehalt war hier bereits nach 3 Monaten AOH mit einem Gehalt unter der Bestimmungsgrenze nachweisbar, konnte jedoch nach 8 Monaten nicht mehr detektiert werden. Der Maximalgehalt lag mit  $4,95 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{kg}$  bei 12 °C, guter Belüftung und dem Wassergehalt von 17-18 % vor, wohingegen bei der gleichen Probe mit schlechter Belüftung kein AOH gefunden werden konnte. Bei den Proben mit einem Wassergehalt von 17-18 %, die bei 4 °C gelagert wurden, lagen die gefundenen Konzentrationen bei beiden Belüftungsarten unter der Bestimmungsgrenze und waren somit ebenfalls geringer belastet als die bei anderen Bedingungen gelagerten Gerstenproben. Bei dem Gerstenmuster mit hoher Symptomatik konnte lediglich in vier der acht Variationen eine AOH-Bildung nach 8 Monaten beobachtet werden, von denen drei bei 4 °C gelagert wurden und die Konzentration bei zwei der vier Proben unter der Bestimmungsgrenze lag.

AME konnte in fünf Lagerungsproben der Gerste mit niedriger Symptomatik nach drei Monaten und in zwei weiteren Proben nach 8 Monaten detektiert werden, lediglich die bei mit



**Abbildung 3.45** Toxingehalte in drei gelagerten Gerstenmustern vor der Lagerung, sowie nach 3 und 8 Monaten.

schlechter Belüftung gelagerte Gerste konnte bei einem Wassergehalt von 17-18 % als unbelastet eingestuft werden. Bei sechs der sieben belasteten Proben war die vorliegende Konzentration mit ca. 0,7 bis 1,2 µg/kg eher gering, wohingegen bei der Lagerung der Probe mit einem Wassergehalt von 17-18 % bei 12 °C und guter Belüftung mit  $2,4 \pm 0,29$  µg/kg der Maximalwert erzielt wurde. Das Gerstenmuster mit hoher Symptomatik konnte bei allen Lagerbedingungen als unbelastet eingestuft werden.

Für TeA konnte bei beiden Gerstenmustern mit Symptomatik eine Aktivität während der Lagerung festgestellt werden. Bei den mit 17-18 % Wassergehalt gelagerten Proben konnte bei beiden bei 4 °C gelagerten Proben, sowie bei der bei 12 °C mit schlechter Belüftung gelagerten Probe für beide verwendeten Gerstenmuster ein Toxinanstieg nach 3 Monaten beobachtet werden, wohingegen nach 8 Monaten ein Rückgang der TeA-Konzentration festgestellt werden konnte. Ähnliches wurde für die Muster mit Symptomatik auch in den bei 12 °C gelagerten Proben mit einem Wassergehalt von 13-14 % gefunden, wohingegen in den übrigen Proben des Musters mit hoher Symptomatik ein weiterer Toxinanstieg bei 8 Monaten bestimmt wurde. Der höchste gemessene Wert lag mit  $33,7 \pm 1,6$  µg/kg in der bei 12 °C und guter Belüftung gelagerten Probe mit 17-18 % Wassergehalt vor (hohe Symptomatik) und kann somit als gering eingestuft werden.

Die Toxine ALTP und ATX I konnten in dem Muster mit niedriger Symptomatik in drei (ALTP) bzw. zwei (ATX I) Proben nach drei Monaten und in zwei (ALTP) bzw. einer (ATX I) Probe nach 8 Monaten detektiert werden. Im Muster mit hoher Symptomatik konnte lediglich einmal ATX I nachgewiesen werden (17-18 %, 12 °C, gute Belüftung). Der maximal gefundene Wert für ALTP lag bei der Probe, die bei 12 °C und einem Wassergehalt von 17-18 % mit schlechter Belüftung gelagert wurde, bei  $6,46 \pm 0,7$  µg/kg, wohingegen alle anderen Konzentrationen von ALTP und ATX I unter der Bestimmungsgrenze lagen, sodass aktuell keine weiteren Aussagen zu den verschiedenen Lagerbedingungen gemacht werden können.

#### *3.7.2.2 Toxingehalte nach Vermälzen der gelagerten Gerste*

Die in 3.7.2.1 analysierten Proben wurden nach MEBAK vermälzt und ebenfalls analysiert, um zu untersuchen ob verschiedene Lagerungsbedingungen Einfluss auf die Mälzung haben.

Die als Referenz verwendete Gerste war erneut bei fast allen Bedingungen toxfrei, jedoch konnten in einer Probe ALTP und in drei Proben ATX I in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gemessen werden.

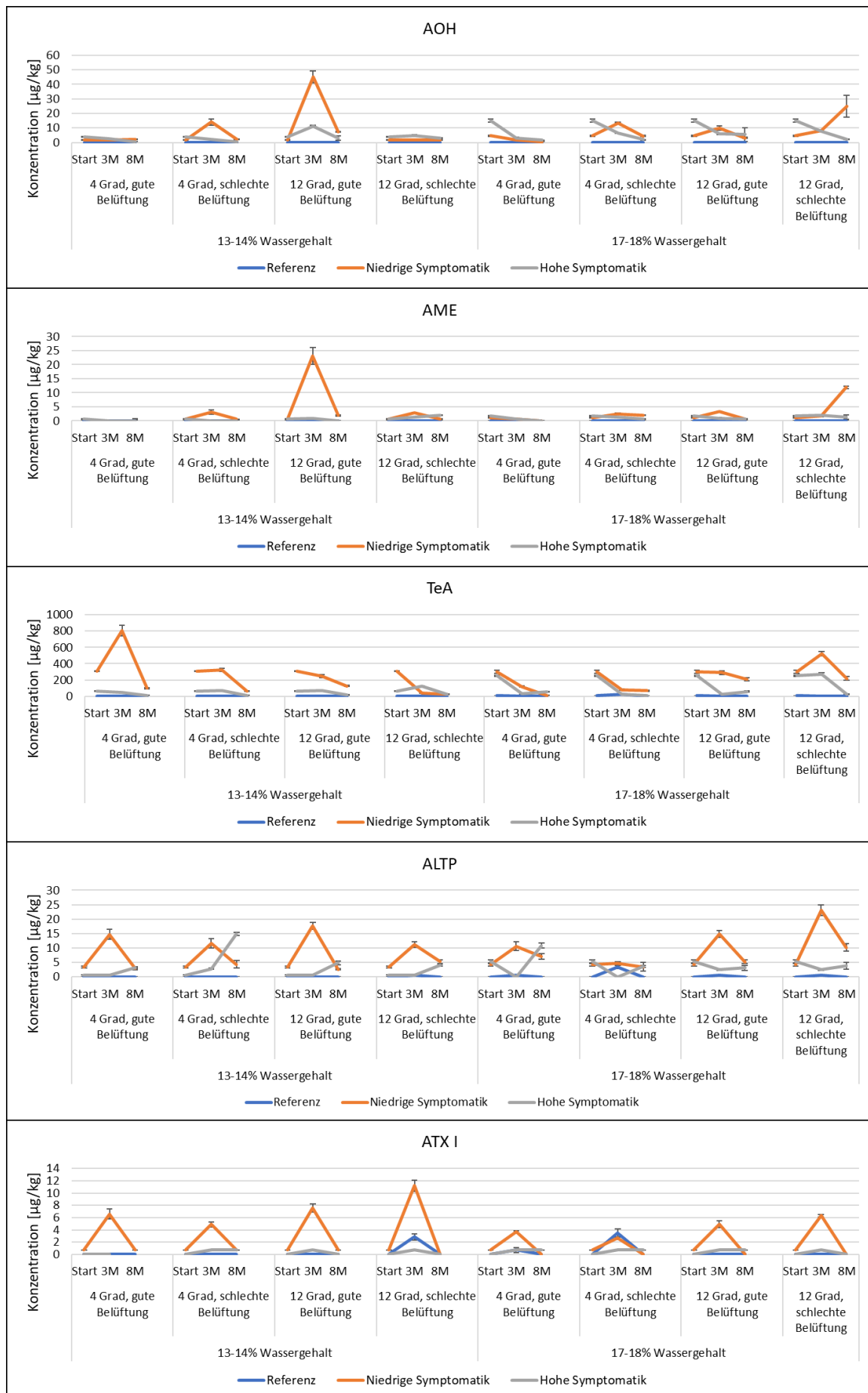


Abbildung 3.46 Toxingehalte der drei gelagerten Gerstenmuster nach Mälzung.



Für AOH lag der höchste Wert im Malz nach 3 Monaten im Muster niedriger Symptomatik und Lagerung bei 12 °C, 13-14 % Wassergehalt und guter Belüftung bei  $45,0 \pm 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ , nach 8 Monaten konnten jedoch nur noch weniger als  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  AOH detektiert werden. Mit einem durchschnittlichen Gehalt von unter  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  enthielten die restlichen Proben des Musters niedriger Symptomatik nach dem Mälzen höhere Werte als die zugehörigen Gersten, was bereits in 3.7.1 beobachtet wurde. Des Weiteren ist erkennbar, dass bei fast allen Proben der AOH-Gehalt mit der Lagerdauer abfällt und lediglich die bei 12 °C und schlechter Belüftung gelagerte Probe des Musters niedriger Symptomatik (17-18 % Wassergehalt) nach 8 Monaten erneut deutlich anstieg.

Ähnliches wurde für das Toxin AME beobachtet: auch hier konnte nach 8 Monaten oftmals eine geringere Toxinkonzentration als nach 3 Monaten festgestellt werden. Analog dem AOH konnte ebenfalls in der bei 12 °C und schlechter Belüftung gelagerte Probe des Musters niedriger Symptomatik (17-18 % Wassergehalt) ein Toxinanstieg in Monat 8 beobachtet werden, die mit einem Gehalt von  $11,88 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{kg}$  den zweithöchsten AME-Wert aufzeigte. Das Maximum lag in Monat 3 bei der Probe mit 13-14 % Wassergehalt und Lagerung bei 12 °C in Kombination mit schlechter Belüftung vor; hier konnte eine AME-Konzentration von  $23,0 \pm 3,0 \mu\text{g}/\text{kg}$  gemessen werden. Alle anderen Proben niedriger Symptomatik wiesen Konzentrationen unter  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  auf und lagen somit geringfügig über den in der Gerste bestimmten Werten. Bei den Proben hoher Symptomatik konnten nur geringe Konzentrationen detektiert werden, was im Vergleich zu den Gersten dennoch eine Toxinbildung während des Mälzens darstellte.

Bei TeA konnte in zwei Proben niedriger Symptomatik ebenfalls ein Maximum nach 3 Monaten gefunden werden, bei den anderen Proben fiel die Konzentration über die gesamte Lagerdauer ab. Das Maximum war hierbei bei einem Wassergehalt von 13-14 % und einer Lagerung bei 4 °C und guter Belüftung zu finden und lag mit  $805 \pm 66 \mu\text{g}/\text{kg}$  in einem deutlich höheren Bereich als die restlichen Proben, welche durchschnittlich Konzentrationen von unter  $300 \mu\text{g}/\text{kg}$  aufzeigten. Für die Proben hoher Symptomatik konnte ebenfalls ein Abfall der TeA-Konzentration über die Lagerungsdauer beobachtet werden, jedoch waren die Konzentrationen hier generell niedriger als in den Proben niedriger Symptomatik.

Für ALTP konnte bei den Malzen hoher Symptomatik nach 8 Monaten ein Konzentrationsanstieg mit einem Maximalwert von  $14,88 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{kg}$  in der Probe mit einem Wassergehalt von 13-14 % und Lagerung bei 4 °C und schlechter Belüftung beobachtet werden. Bei den Proben des Musters niedriger Symptomatik wurden in allen Proben nach 3 Monaten höhere Konzentrationen gemessen als nach 8 Monaten; hier konnte ein Maximalwert von  $230,3 \pm 1,88 \mu\text{g}/\text{kg}$  bei Lagerung mit schlechter Belüftung, 12 °C und einem

Wassergehalt von 17-18 % gefunden werden. Bei 4 °C, schlechter Belüftung und einem Wassergehalt von 17-18 % war der Wert nach 3 Monaten nur minimal höher als zum Start oder nach 8 Monaten, sodass die Konzentration in dieser Probe nahezu konstant geblieben ist.

ATX I konnte in den Proben der hohen Symptomatik lediglich in sieben Proben unter der Bestimmungsgrenze detektiert und in einer Probe nicht nachgewiesen werden. Bei den Proben des Musters mit niedriger Symptomatik wurde erneut ein Maximum nach 3 Monaten beobachtet, wohingegen die ATX I Konzentrationen nach 8 Monaten wieder unter der Bestimmungsgrenze lagen. Die erhaltenen Konzentrationen waren sich insgesamt sehr ähnlich, wobei der Maximalwert konnte mit  $11,19 \pm 0,94 \mu\text{g/kg}$  in der Probe mit 13-14 % Wassergehalt gefunden werden, die bei 12 °C und schlechter Belüftung gelagert wurde.

### *3.7.2.3 Diskussion: Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die Toxinbildung in Gerste sowie deren Auswirkungen auf die Mälzung*

Die in der gelagerten Gerste enthaltenen Toxinkonzentrationen waren im Allgemeinen sehr niedrig und lagen oftmals unter den jeweiligen Bestimmungsgrenzen. Generell erwies sich die als Referenz verwendete Probe zuverlässig, da hier nur nach dem Mälzen geringe Mengen an ALTP und ATX I nachgewiesen werden konnten, ansonsten jedoch alle Proben toxinfrei waren. Die eingelagerten Muster mit niedriger und hoher Symptomatik verhielten sich meistens ähnlich und auch die Ergebnisse der vermälzten Proben konnten die Trends der Gerstenanalytik bestätigen. Eine zusätzliche Beobachtung während dieses Versuches war jedoch die Fehleinteilung der Proben mittels optischer Beurteilung: So zeigten die Muster mit niedriger Symptomatik meist eine höhere oder ähnliche Toxinanzahl und -konzentration als die Muster mit hoher Symptomatik, bei welcher ursprünglich eine höhere Belastung erwartet wurden. Somit scheint allein die Beurteilung der Anzahl schwarzer Körner einer Probe keine verlässliche Methode zur Abschätzung des Mykotoxingehaltes zu sein, da offensichtlich auch unverfärbte Muster hoch belastet sein können. Diese Beobachtung wurde auch schon in anderen Studien beschrieben (Hanson und Christensen 1953; Roháčik und Hudec 2008; Toklu et al. 2008), sodass auch hier gezeigt werden konnte, dass eine mykologische Bestimmung mittels qPCR eine bessere Methode zur Einschätzung des Pilzbefalles darstellt als eine rein optische Beurteilung (Bretträger et al. 2022).

Zwischen den verschiedenen Parametern der Lagerung gab es ebenfalls keine sichtbaren Trends, auch wenn eine geringere Toxinbildung bei 4 °C im Vergleich zu 12 °C zu erwarten gewesen wäre. Da *Alternaria* spp. jedoch in der Lage ist auch bei sehr niedrigen Temperaturen (bis 0 °C) Toxine zu bilden, sind die hier erzielten Ergebnisse durchaus sinnvoll. Auch die Wahl

der Belüftung (gut bzw. schlecht) hatte nur auf einige wenige Proben Einfluss, sodass auch hierzu keine Aussagen getroffen werden konnten.

In den untersuchten Gerstenproben wurden für AOH, AME und TeA zwar bei 12 °C und guter Belüftung Maximalwerte für die Gerste mit einem Wassergehalt von 17-18 % gemessen, jedoch waren diese immer noch vergleichbar mit den bei anderen Lagerbedingungen detektierten Toxinmengen. Für ALTP schien dagegen eine Lagerung der Proben mit Wassergehalt von 17-18 % bei 12 °C und schlechter Belüftung die Bildung anzuregen, wohingegen bei den sonst gleichen Bedingungen und guter Belüftung keine Toxinbildung zu beobachten war. Bei einigen Lagerbedingungen konnte vor allem bei AME und TeA nach dreimonatiger Lagerung ein höherer Toxingehalt detektiert werden als nach acht Monaten. Da *Alternaria* Toxine bei allen gewählten Bedingungen stabil sein sollten, ist ein Toxinabbau eher nicht zu erwarten, jedoch wären Metabolisierungsreaktionen, z.B. zu Diglucosiden, Disulfaten oder Sulfoglucosiden denkbar (Soukup et al. 2016). Somit ist es möglich, dass trotz Integration der modifizierten Toxine AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G, AOH-3-S und AME-3-S in die Messmethode weitere relevante Formen unentdeckt geblieben sind, was in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

Da bereits herausgefunden wurde, dass bei höheren Temperaturen ein niedrigerer Wassergehalt nötig ist, um Schimmelpilzwachstum während der Lagerung von Gerste zu unterdrücken, wurden zunächst niedrigere Toxingehalte in den bei 4 °C statt 12 °C gelagerten Proben erwartet (Noots et al. 1999; Fleurat-Lessard 2017; Felšöciová et al. 2021). Ebenso wird es in der Literatur empfohlen den Wassergehalt der gelagerten Gerste bei unter 13 % zu halten, um die Wasseraktivität herabzusetzen und somit die Pilzsporulation und das Wachstum zu unterdrücken (Krasauskas 2017; Noots et al. 1999; Fleurat-Lessard 2017). Da die Wasseraktivität ebenfalls durch höhere Temperaturen begünstigt wird (Noots et al. 1999), wurden die niedrigsten Toxinkonzentrationen eigentlich in der Probe mit 13-14 % Wassergehalt und einer Lagertemperatur von 4 °C erwartet. Die in der Literatur gegebenen Lagerempfehlungen beziehen sich aktuell jedoch lediglich auf mykologische Studien zu *Alternaria* spp., und nicht auf die Toxinbildung, sodass die in dieser Arbeit abweichenden Ergebnisse darauf hindeuten könnten, dass sich der Pilz bei schlechten Wachstumsbedingungen eher auf Toxinbildung fokussiert. Auch die Tatsache, dass bereits nach 3 Monaten Toxine detektierbar waren, könnte darauf hinweisen, dass sich *Alternaria* spp. zunächst auf die Toxinbildung konzentriert, um mögliche Konkurrenzspezies abzuwehren, bevor dann der Fokus auf das Wachstum gelegt wird. Hierzu sind jedoch keine eindeutigen Studien bekannt, sodass zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht eindeutig feststeht unter welchen Bedingungen der Pilz wächst und unter welchen er Toxine produziert. Folglich

weichen die empfohlenen Lagerbedingungen auch zwischen verschiedenen Ländern ab: während in Deutschland eine Kornfeuchte von 14 % empfohlen wird, werden Proben in Dänemark bei 14,5 %, und in Frankreich sowie Großbritannien bei 15 % gelagert (Ndiaye et al. 2003).

Abweichend zu den theoretischen Lagerempfehlungen wurde nach anderen mykologischen Studien eine Lagerung bei wärmeren Temperaturen (ca. 20 °C) empfohlen, da für einige Pilze, wie z.B. *Fusarium* spp. beobachtet wurde, dass die Fähigkeit des Pilzes Toxine zu bilden hier mit der Zeit abnimmt (Briggs und McGuinness 1993; Beattie et al. 1998; Noots et al. 1999). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten jedoch eher darauf hin, dass höhere Temperaturen bei *Alternaria* spp. die Toxinbildung anregen, da die Toxingehalte bei 12 °C teilweise höher waren als bei 4 °C. Auch für *Fusarium* spp. konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Toxinbildung in Weizen bei einer Lagertemperatur von 10 - 15 °C stattfand, wohingegen andere Pilze oftmals Temperaturen von 25 - 28 °C zum Wachsen benötigen (Birck et al. 2006). Ebenso wurde bereits die Auswirkung der Belüftung auf die mikrobielle Aktivität untersucht, die zeigte, dass vor allem höhere CO<sub>2</sub> und Stickstoffanteile in der Luft das Pilzwachstum reduzieren können (Noots et al. 1999). Auch Magan und Aldred (2007) untersuchten die Auswirkungen einer modifizierten Lageratmosphäre und fanden, dass ein O<sub>2</sub> – Anteil < 0,14 % nötig ist, bevor das Pilzwachstum deutlich reduziert werden kann. Zusätzlich sei ein CO<sub>2</sub> Anteil > 50 % nötig, um eine Mycelbildung zu vermeiden, was zudem durch einen niedrigen Wasseranteil begünstigt wird. Ob diese Maßnahmen auch zur Reduzierung von *Alternaria* spp. geeignet sind, wurde jedoch noch nicht untersucht und ist somit noch unklar (Magan und Aldred 2007). In der hier durchgeführten Arbeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, welchen Einfluss die Belüftung auf die *Alternaria* Toxinbildung hat, da die detektierten Maximalkonzentrationen teilweise bei guter Belüftung und teilweise bei schlechter Belüftung (= höherer CO<sub>2</sub> Anteil) vorlagen und es somit auch möglich sein könnte, dass manche Lagerbedingungen nur die Bildung von ein paar wenigen Toxinen fördern. Des Weiteren wurde bereits mehrfach beobachtet, dass signifikante Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschiede innerhalb einer gelagerten Batch entstehen können, wodurch auch das Schimmelpilzwachstum und die damit einhergehende Toxinbildung stark inhomogen in der gelagerten Probe vorliegen können (Ndiaye et al. 2003; Birck et al. 2006). Um diesen Faktor in der hier vorliegenden Arbeit zu berücksichtigen, wurden die gelagerten Proben über die acht Monate hinweg regelmäßig gewendet.

In einer Studie von Beattie et al. (1998) wurde die 7 – monatige Lagerung von mit *Fusarium* spp. und *Alternaria* spp. belasteter Gerste unter verschiedenen Bedingungen (- 20 °C, 4 °C, 24 °C + schlechte Belüftung, 24 °C + gesteuerte Belüftung) getestet und neben den

mykologischen Daten auch das *Fusarium* Toxin DON analysiert. Bei allen Lagerbedingungen konnte für *Alternaria* spp. ein leichter Rückgang beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war. Für das *Fusarium* Toxin DON wurden über den Lagerzeitraum konstante Werte erhalten, sodass DON bei allen gewählten Parametern stabil zu sein scheint (Beattie et al. 1998). In dieser Arbeit konnten jedoch bei den *Alternaria* Toxinen keine stabilen Konzentrationen erzielt werden, da teilweise eine Toxinbildung nach drei bzw. acht Monaten beobachtet wurde, aber Toxingehalte auch zum Teil wieder abgenommen haben. Da die detektierten Konzentrationen meist nahe der Bestimmungsgrenze waren, ist es jedoch auch denkbar, dass dies auf die natürliche Inhomogenität der gelagerten Gerstenbatch zurückzuführen ist. Dudoiu et al. (2016) untersuchten die Mikroflora von Mais über einen Lagerzeitraum von 120 Tagen hinweg und identifizierten *Alternaria* spp. zum Erntezeitpunkt als den häufigsten Kontaminanten, jedoch nahm der prozentuale Anteil von *Alternaria* spp. und einigen anderen Pilzen im Verlaufe der Lagerung zu Gunsten anderer Lagerpilze wie *Fusarium* spp., *Penicillium* oder *Aspergillus* spp. ab. Auch Felšöciová et al. (2021) untersuchten die Mikroflora nach Langzeitlagerung von oberflächensterilisierter Gerste in Silos mit drei verschiedenen Gerstensorten und konnten ähnliches beobachten: während der Anteil an *Alternaria* spp. nach 9 Monaten in allen drei Gersten geringer oder ähnlich als zum Erntezeitpunkt war, konnte nach drei Monaten die Bildung weiterer Lagerpilze wie z.B. *Penicillium* beobachtet werden.

Nach Mälzung der gelagerten Gerstenmuster konnten höhere Toxinkonzentrationen als in der Gerste detektiert werden, was höchstwahrscheinlich auf die das Pilzwachstum fördernde Mälzung zurückzuführen ist. Anders als bei den untersuchten Gerstenproben konnten diesmal auch ALTP und ATX I in einigen Proben des Referenzmusters gefunden werden, was auf eine Pilzaktivität während des Mälzens hindeutet. Wie zuvor erwähnt ist bereits nachgewiesen, dass Sporen von *Alternaria* spp. während der Lagerung im Ruhezustand vorliegen können und erst durch die optimalen Wachstumsbedingungen während des Mälzungsprozess wieder aktiv werden und gegebenenfalls Mykotoxine produzieren (Felšöciová et al. 2021; Noots et al. 1999).

Generell sind die höchsten Toxingehalte nach dem Mälzen bei den bei 12 °C gelagerten Proben mit einem Wassergehalt von 13 - 14 % entstanden, wohingegen in der unvermälzten Gerste die Lagerung bei einem Wassergehalt von 17 - 18 % die höhere Toxinbelastung aufzeigte. Somit wäre es denkbar, dass bei der Lagerung mit niedrigem Wassergehalt zunächst mehr Energie in die Ausbreitung des Pilzmycels gesteckt wurde und die Toxinproduktion vorwiegend erst während der Mälzung gestartet ist. Im Gegensatz dazu war die Wasseraktivität bei den mit 17 - 18 % Wassergehalt gelagerten Proben vermutlich schon

ausreichend, um bereits während der Lagerung Toxine zu produzieren, wodurch der Pilz sein Wachstum womöglich eingeschränkt hat und somit bei den idealen Bedingungen während der Mälzung nicht verbreitet genug war, um Toxine zu bilden. Da die Konzentrationen zwischen den verschiedenen Lagerbedingungen jedoch bis auf ein paar wenige Ausnahmen in einem sehr ähnlichen Bereich lagen, könnten diese Unterschiede auch auf die natürlich gegebene Probeninhomogenität zurückzuführen sein.

Beattie et al. (1997) konnten in ihrer Studie zu DON beobachten, dass die DON Konzentration in Gerste auch bei verschiedenen Lagerbedingungen konstant blieb, diese jedoch nach dem Mälzen in den bei 24 °C gelagerten Proben am niedrigsten war. Auch zwischen den anderen Lagerbedingungen waren jetzt Konzentrationsunterschiede zu sehen, allerdings waren diese im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gemessenen *Alternaria* Toxinen nach dem Mälzen niedriger als während der Lagerung. Zu den Einflüssen der Lagerbedingungen auf das Wachstum von *Alternaria* spp. während des Mälzens sowie dessen Toxinbildung sind bisher keine weiteren Studien verfügbar.

Da das Überleben einiger Pilze während der Lagerung nicht nur von den äußeren Lagerparametern beeinflusst wird, sondern auch von der Gerstensorte sowie deren Anteil beschädigter Körner abhängen könnte (Noots et al. 1999), bieten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für die Gerstensorte Avalon lediglich einen ersten Einblick in die Toxinbildung während der Lagerung. Zudem sollte nicht vernachlässigt werden, dass gute Lagerbedingungen zwar gegebenenfalls das Wachstum und die Toxinbildung von *Alternaria* spp. unterdrücken können, der Pilz jedoch mehrere Jahre im Ruhezustand auf dem Korn verbleiben kann. Folglich kann auch nach der Lagerung erst bei der Weiterverarbeitung Toxinbildung und Schimmelpilzwachstum eintreten, sofern bessere Bedingungen für den Pilz vorliegen (Tangni und Larondelle 2002; Noots et al. 1999). Um den Zusammenhang zwischen Pilzwachstum, Toxinproduktion und Lagerbedingungen sowie deren Einfluss auf das Toxinverhalten während des Mälzens besser verstehen zu können, sollten in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, die auch andere Faktoren wie z.B. die Lagerart (Lagerhalle, Silo etc.) sowie Unterschiede zwischen verschiedenen Gerstensorten berücksichtigen sollten.

### 3.7.3 Verfolgung der *Alternaria* Toxine über den Mälzungsverlauf

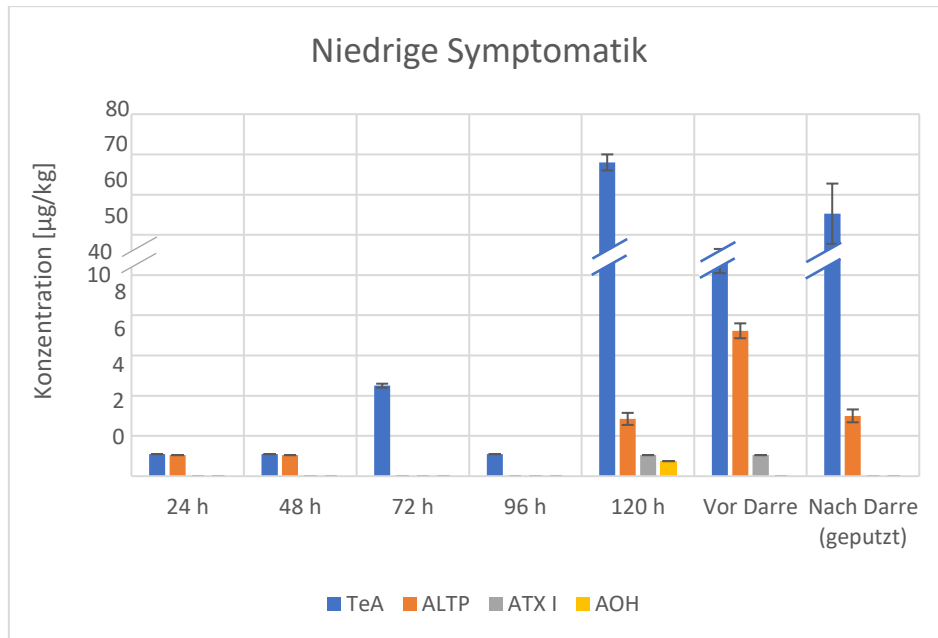
Zur Verfolgung der Toxine während des Mälzungsverlaufes wurden ein Gerstenmuster mit niedriger und eins mit hoher optischer Symptomatik nach MEBAK im Kleinmaßstab vermälzt und regelmäßig Proben genommen (siehe 6.14.1.2). Alle Proben wurden nach Entnahme gefriergetrocknet und im Anschluss nach 6.10.3 auf *Alternaria* Toxine analysiert. Zusätzlich wurden drei Gerstenmuster (niedrige, mittlere und hohe optische Symptomatik) unter variierenden Mälzungsbedingungen vermälzt, um den Einfluss äußerer Parameter (Temperatur, Wassergehalt, Hinzufügen weiterer Schritte) auf die Toxinbildung zu untersuchen (siehe 6.14.3).

#### 3.7.3.1 Mälzungsverlauf

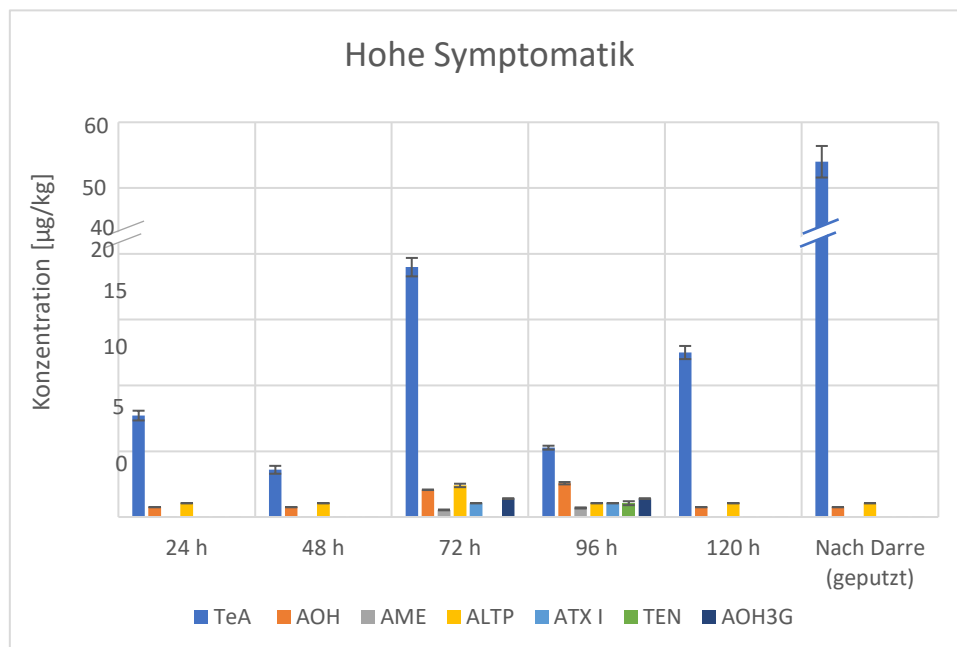
Während des Mälzens des Musters mit niedriger Symptomatik konnten die vier Toxine TeA, ALTP, ATX I und AOH detektiert werden (siehe Abbildung 3.47). An den ersten zwei Tagen wurden hierbei jedoch zunächst lediglich TeA und ALTP in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gefunden. Während TeA an Tag 3 auf  $4,5 \pm 0,1 \mu\text{g/kg}$  anstieg und an Tag 4 erneut eine Konzentration unter der Bestimmungsgrenze aufzeigte, war ALTP an diesen beiden Tagen nicht nachweisbar. An Tag 5 stieg TeA auf eine Konzentration von  $66,5 \pm 1,5 \mu\text{g/kg}$  an und auch ALTP lag mit  $2,85 \pm 0,3 \mu\text{g/kg}$  vor. Zudem konnte zu diesem Zeitpunkt die Bildung von ATX I und AOH beobachtet werden, die Konzentrationen lagen jedoch auch hier unter der Bestimmungsgrenze. Nach sechs Tagen (vor der Darre) konnten  $42,9 \pm 2,3 \mu\text{g/kg}$  TeA und  $7,23 \pm 0,37 \mu\text{g/kg}$  ALTP gefunden werden, wohingegen der Wert von ATX I zu diesem Zeitpunkt unverändert blieb und AOH nicht mehr detektierbar war. Nach dem Darren wurden durch das Putzen u.a. die Wurzelkeimlinge entfernt, um das finale Malz zu erhalten. In diesem konnten nur noch die Toxine TeA mit einer Konzentration von  $56,2 \pm 6,3 \mu\text{g/kg}$  und ALTP mit einer Konzentration von  $3,0 \pm 0,32 \mu\text{g/kg}$  bestimmt werden.

In Abbildung 3.48 sind die Ergebnisse des Mälzungsprozesses mit der Gerste hoher Symptomatik dargestellt. TeA lag hier nach einem Tag bereits mit einer Konzentration von  $7,71 \pm 0,37 \mu\text{g/kg}$  vor, welche nach zwei Tagen leicht abfiel und an Tag drei auf  $19,0 \pm 0,7 \mu\text{g/kg}$  anstieg. Nach Tag vier war erneut ein Konzentrationsrückgang zu beobachten, am Tag darauf stieg der Gehalt an TeA jedoch wieder auf  $12,5 \pm 0,5 \mu\text{g/kg}$  an. Nach der Darre konnten im geputzten Malz noch  $53,5 \pm 1,2 \mu\text{g/kg}$  TeA gefunden werden. Die Toxine AOH und ALTP konnten in allen genommenen Proben detektiert werden und zeigten über den Mälzungsprozess hinweg konstante Werte auf. Lediglich am dritten und vierten Tag stieg die Konzentration dieser beiden Toxine leicht an. An diesen beiden Tagen konnten

zudem die Toxine AME, ATX I und AOH-3-G, sowie an Tag vier zusätzlich TEN in geringen Mengen detektiert werden.



**Abbildung 3.47.** Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess – Muster mit niedriger (optischer) Symptomatik.



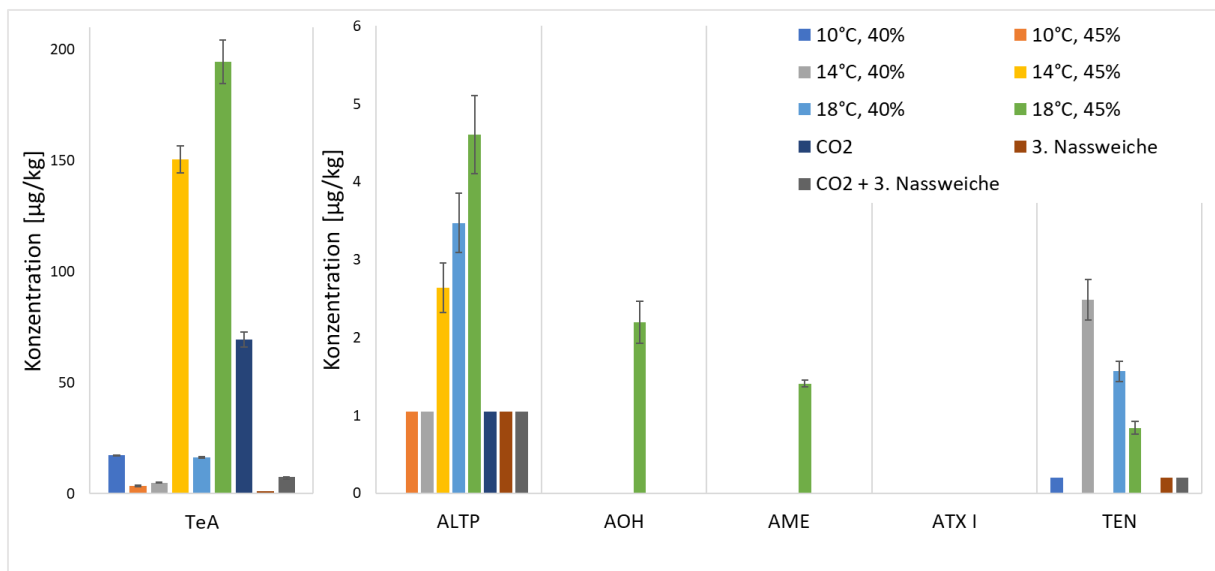
**Abbildung 3.48** Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess – Muster mit hoher (optischer) Symptomatik. Die Probe des Grünmalzes (= vor Darre) lag für dieses Muster nicht vor.



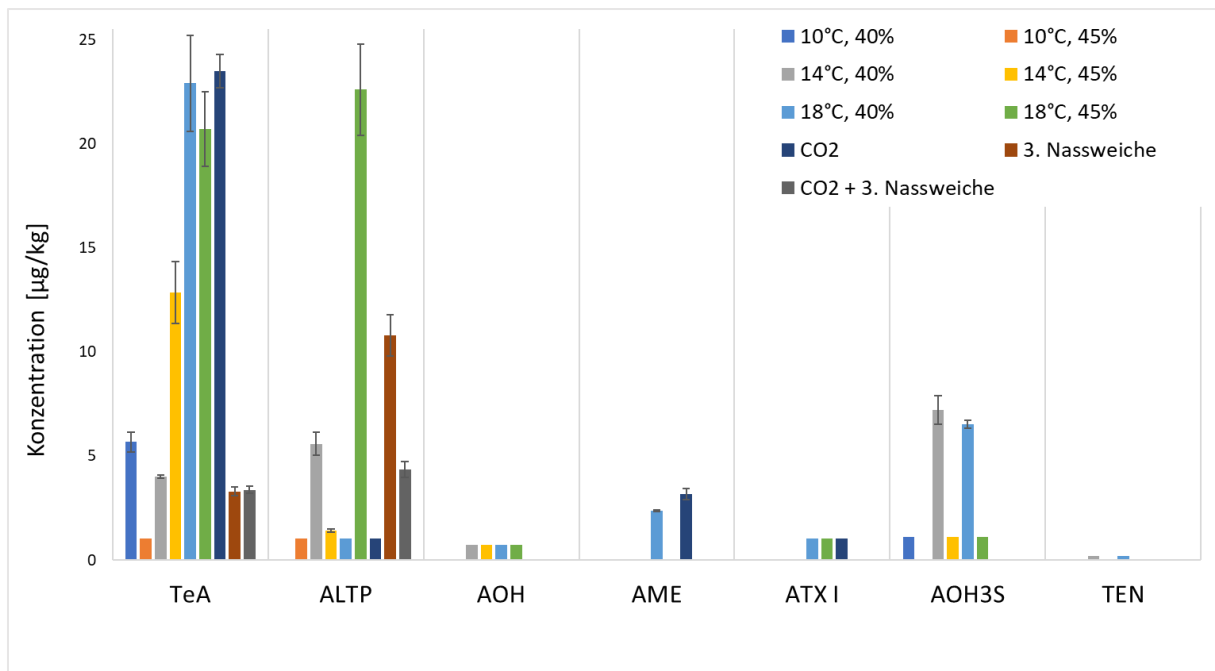
### 3.7.3.2 Variation der Mälzungsparameter

Um zu überprüfen welchen Einfluss verschiedene Mälzungsparameter auf die Toxinbildung haben, wurden drei Gerstenproben (niedrige, mittlere und hohe optische Symptomatik) bei verschiedenen Bedingungen vermälzt (siehe 6.14.3.4). Getestet wurden hierbei der Temperatureinfluss (10 °C, 14 °C und 18 °C) sowie der Wassergehalt des Ausgangsmaterials (40 %, 45 %). Zusätzlich wurden weitere Verfahren auf ihre Fähigkeit der Toxinreduktion getestet: eine CO<sub>2</sub> Rast zur Unterdrückung des Pilzwachstumes, eine dritte Nassweiche vor dem Darren zum Auswaschen der Toxine sowie eine Kombination beider Verfahren. Die somit erhaltenen Malze wurden mit der in 6.10.3 beschriebenen Methode vorbereitet und mit der entwickelten LC-MS/MS Methode gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.49 bis 3.51 grafisch dargestellt.

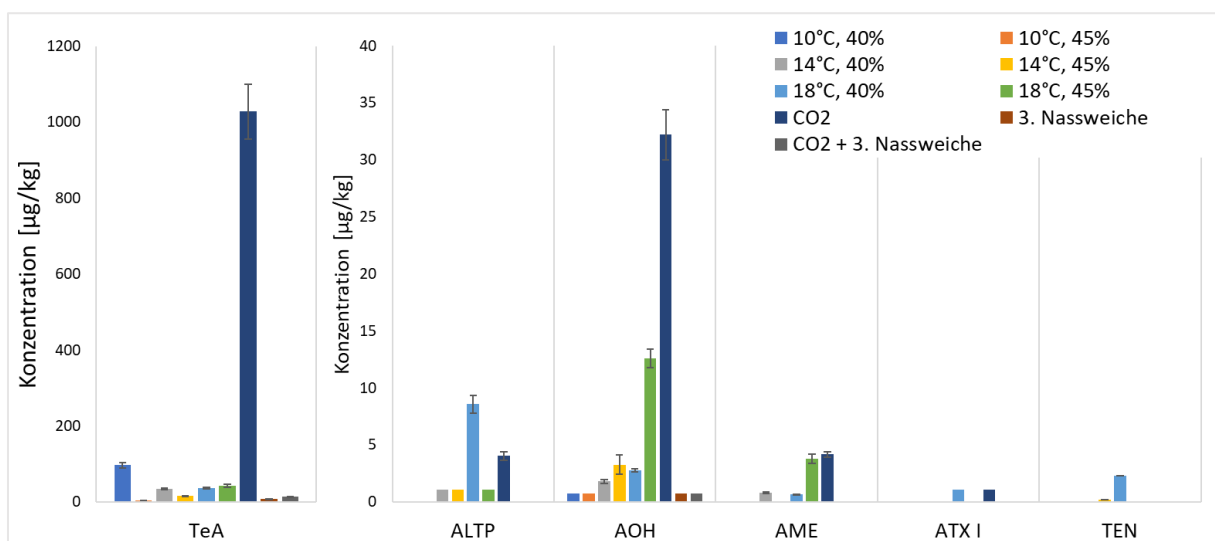
In allen drei Mustern war die Bildung von TeA und ALTP am stärksten von den verwendeten Parametern abhängig, wohingegen AOH, AME, TEN und ATX I sich im Allgemeinen nur geringfügig zwischen den verschiedenen Mälzungen unterschieden haben. Auch die Bildung von AOH-3-S konnte durch Variation der Mälzungsparameter beeinflusst werden, jedoch wurde dieses Toxin nur in einem der drei verwendeten Gerstenmustern detektiert.



**Abbildung 3.49** Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit niedriger Symptomatik.



**Abbildung 3.50** Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit mittlerer Symptomatik.



**Abbildung 3.51** Toxinkonzentrationen nach Mälzungsvariationen – Gerstenmuster mit hoher Symptomatik.

Bei dem verwendeten Muster mit niedriger optischer Symptomatik (Abbildung 3.49) lagen die höchsten Werte für TeA bei den Mälzungen bei 14 °C ( $150,7 \pm 6,1 \mu\text{g/kg}$ ) und 18 °C ( $194,5 \pm 3,3 \mu\text{g/kg}$ ) mit jeweils einem Wassergehalt von 45 % vor. Auch die Probe, bei der eine CO<sub>2</sub>-Rast angewendet wurde, enthielt mit  $69,5 \pm 5,8 \mu\text{g/kg}$  TeA einen auffallend höheren Wert, da die Proben der anderen Variationen nur mit unter 20 µg/kg TeA belastet waren. Der niedrigste TeA-Wert konnte mit einer Konzentration unter der Bestimmungsgrenze in der Probe mit der 3. Nassweiche gefunden werden. Für ALTP konnte ähnliches beobachtet

werden: der maximale Gehalt lag mit  $4,61 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  erneut in der bei  $18^\circ\text{C}$  und  $45\%$  Wassergehalt vermälzten Probe vor, jedoch konnten diesmal auch ähnliche Werte für die bei  $18^\circ\text{C}$  und  $40\%$  Wassergehalt vermälzte Probe gefunden werden. Auch die bei  $14^\circ\text{C}$  und  $45\%$  Wassergehalt gemälzte Probe zeigte analog der Tenuazonsäure wieder höhere Werte ( $2,64 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) im Vergleich zu den anderen Toxinen auf. Die ALTP Konzentrationen aller anderen Variationen lagen unter der Bestimmungsgrenze, sodass hierzu keine weiteren Aussagen getroffen werden konnten. AOH und AME waren mit Konzentrationen von  $2,2 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $1,41 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$  lediglich in der bei  $18^\circ\text{C}$  und  $45\%$  Wassergehalt gemälzten Probe detektierbar. Tentoxin konnte in sechs der neun getesteten Variationen gefunden werden, davon lag die Konzentration in drei Proben unter der Bestimmungsgrenze. Der Maximalwert wurde hier mit  $2,49 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{kg}$  in der bei  $14^\circ\text{C}$  und  $40\%$  Wassergehalt gemälzten Probe gefunden, wobei die Konzentrationen der bei  $18^\circ\text{C}$  gemälzten Proben mit  $1,57 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $40\%$  Wassergehalt) und  $0,84 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $45\%$  Wassergehalt) nur geringfügig unter diesem Wert lagen.

Bei dem gemälzten Gerstenmuster mit mittlerer Symptomatik (Abbildung 3.50) lagen die erhaltenen TeA Werte in einem deutlich niedrigeren Bereich als bei den anderen beiden Mustern. Die höchsten Gehalte konnten hier erneut bei Mälzung bei  $14^\circ\text{C}$  ( $12,85 \pm 1,47 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) bzw.  $18^\circ\text{C}$  ( $20,7 \pm 1,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) und einem Wassergehalt von je  $45\%$  beobachtet werden, wobei diesmal ebenfalls die bei  $18^\circ\text{C}$  und  $40\%$  Wassergehalt gemälzte Probe mit  $22,9 \pm 2,3 \mu\text{g}/\text{kg}$  nahezu identische Werte zu der mit  $45\%$  Wassergehalt gemälzten Probe zeigte. Der Maximalgehalt an TeA von  $23,5 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{kg}$  konnte diesmal jedoch in der Probe mit eingefügter  $\text{CO}_2$  Rast erfasst werden, der niedrigste Wert lag mit einer Konzentration unter der Bestimmungsgrenze bei  $10^\circ\text{C}$  und  $45\%$  Wassergehalt vor. ALTP konnte in acht der neun Variationen detektiert werden, wobei die Konzentrationen in vier Proben entweder knapp über oder unter der Bestimmungsgrenze lagen. Der höchste Wert für TeA war mit  $22,6 \pm 2,2 \mu\text{g}/\text{kg}$  ( $18^\circ\text{C}$ ,  $45\%$  Wassergehalt) in etwa doppelt so hoch wie der zweithöchste Wert, welcher mit  $10,8 \pm 1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$  in der Probe mit dritter Nassweiche gefunden wurde. AOH konnte in den insgesamt vier bei  $14^\circ\text{C}$  und  $18^\circ\text{C}$  gemälzten Proben in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gemessen werden, wohingegen AME nur in der bei  $18^\circ\text{C}$  und  $40\%$  Wassergehalt sowie in der Probe mit  $\text{CO}_2$  Rast vorkam. In letzterer konnte der Maximalwert von  $3,17 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{kg}$  detektiert werden. ATX I konnte in beiden bei  $18^\circ\text{C}$  gemälzten Proben sowie der Mälzung mit  $\text{CO}_2$  Rast in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze gefunden werden, TEN war nur bei einem Wassergehalt von  $40\%$  und Mälzung bei  $14^\circ\text{C}$  bzw.  $18^\circ\text{C}$  nachweisbar. Die Werte lagen hierbei ebenfalls unter der Bestimmungsgrenze. Zusätzlich konnte in diesem Gerstenmuster ebenfalls das Toxin AOH-3-S in fünf der neun durchgeführten Variationen gefunden werden, wobei die Konzentrationen

in drei Proben unter der Bestimmungsgrenze lag. Mit  $7,22 \pm 0,68 \mu\text{g/kg}$  und  $6,52 \pm 0,2 \mu\text{g/kg}$  konnten für AOH-3-S in den bei  $14^\circ\text{C}$  und  $18^\circ\text{C}$  und einem Wassergehalt von 40 % gemälzten Proben nahezu identische Konzentrationen gemessen werden.

Im Gerstenmuster mit hoher Symptomatik (siehe Abbildung 3.51) wurde TeA in acht der neun Proben in Konzentrationen unter  $100 \mu\text{g/kg}$  gemessen, der Maximalwert lag jedoch mit  $1028 \pm 72 \mu\text{g/kg}$  in der Probe mit  $\text{CO}_2$  Rast vor. Ähnliches konnte für AOH beobachtet werden, da auch hier das Maximum bei der Probe mit  $\text{CO}_2$  Rast vorlag ( $32,2 \pm 2,18 \mu\text{g/kg}$ ). Der zweithöchste Wert konnte mit  $12,6 \pm 0,8 \mu\text{g/kg}$  bei der mit  $18^\circ\text{C}$  und 45 % Wassergehalt durchgeführten Probe beobachtet werden, wohingegen die AOH-Gehalte bei  $10^\circ\text{C}$  sowie der Probe mit 3. Nassweiche und dem Kombinationsversuch unter der Bestimmungsgrenze lagen. Für beide bei  $14^\circ\text{C}$  vermälzten Proben, sowie der bei  $18^\circ\text{C}$  und 40 % Wassergehalt gemälzten Probe lag der AOH-Wert bei unter  $4 \mu\text{g/kg}$ . ALTP konnte diesmal in fünf der neun Proben nachgewiesen werden, das Maximum lag hierbei bei  $8,56 \pm 0,8 \mu\text{g/kg}$  ( $18^\circ\text{C}$ , 45 % Wassergehalt). Die Probe mit  $\text{CO}_2$  Rast zeigte für ALTP erneut einen erhöhten Wert ( $4,02 \pm 0,36 \mu\text{g/kg}$ ), und auch für AME lag in dieser Probe mit  $4,16 \pm 0,25 \mu\text{g/kg}$  erneut der höchste für AME erhaltene Wert vor. ATX I wurde in zwei Proben ( $18^\circ\text{C}$ , 40 % Wassergehalt und  $\text{CO}_2$  Rast) in Werten unter der Bestimmungsgrenze gemessen, bei TEN war die bei  $18^\circ\text{C}$  und 40 % Wassergehalt gemälzte Probe mit  $2,32 \pm 0,33 \mu\text{g/kg}$  belastet. Da in diesem Muster die Probe mit  $\text{CO}_2$  Rast deutlich höher mit Toxinen belastet war als die anderen Proben, wurde für diese Variation zusätzlich die Rückstellprobe analysiert, welche die erhaltenen hohen Werte jedoch bestätigen konnte, sodass das Vorliegen eines Toxin Hot-Spots in der Ursprungsprobe ausgeschlossen wurde.

### 3.7.3.3 Diskussion: Verfolgung von *Alternaria* Toxinen über den Mälzungsverlauf

#### Mälzungsverlauf

An Tag 1 und 2 der Mälzung wurden analog den Vorgaben der MEBAK abwechselnd Nass- und Trockenweichen durchgeführt, um eine Kornfeuchte von 40 – 45 % zu erhalten. Bei diesem Schritt konnten jedoch in beiden analysierten Gerstenmustern keine eindeutige Veränderung der Mykotoxingehalte festgestellt werden. Dies könnte an zwei Ursachen liegen: zum einen ist bereits bekannt, dass eingesetzte Pestizide erst nach einer gewissen Zeit durch den Mälzungsprozess inaktiviert bzw. über das Weichwasser entfernt werden (Miyake et al. 2002; Dušek et al. 2021), sodass diese zu diesem frühen Zeitpunkt ein Schimmelpilzwachstum bzw. deren Mykotoxinbildung unterdrücken könnten, zum anderen wurde bereits in anderen Studien ermittelt, dass die Mehrheit an analysierten Pilzisolaten (*Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum* und *Phoma*) im Weichwasser zu finden ist und somit von

der Gerste heruntergewaschen wurde (Kocic-Tanackov et al. 2005, Bretträger et al. 2022). Da es sich bei der in dieser Arbeit analysierte Probe mit hoher Symptomatik um eine biologisch angebaute Gerste und somit um eine pestizidfreie Probe handelte, ist in diesem Fall der Übergang der Pilzisolat ins Weichwasser wahrscheinlicher, wohingegen bei der Probe niedriger Symptomatik auch eine Hemmung der Toxinbildung durch Pestizideinsatz möglich wäre.

In der Studie von Kocic-Tanackov et al. (2005) wurde an Tag 3 ein Anstieg der Gesamtbelastung mit Schimmelpilzen verzeichnet, welches von den Autoren mit der Aktivierung von Pilzsporen unter der Kernoberfläche begründet wurde, für die die Weichung bereits fortgeschritten sein musste. Ähnliches wurde ebenfalls in anderen Studien beschrieben, bei denen beobachtet werden konnte, dass die Aufnahme des Weichwassers im Korn eine Aktivierung schlafender Mikroben zur Folge haben kann (Noots et al. 1999; Tangni und Larondelle 2002; Laitila et al. 2007). Für *Alternaria* konnte jedoch eine geringfügige Abnahme der Belastung zwischen Tag 2 und 3 beobachtet werden (Kocic-Tanackov et al. 2005). In dieser Arbeit wurde ein Anstieg einiger Toxine an Tag 3 beobachtet, was die Hypothese der Sporenaktivierung bestätigen könnte, jedoch ist ebenfalls bei der Probe mit niedriger Symptomatik nicht auszuschließen, dass ab diesem Zeitpunkt keine Pestizide mehr anwesend waren, welche das Schimmelpilzwachstum verhindern könnten.

In den folgenden Tagen des Mälzungsverlaufes wurde für einige Toxine erneut ein Konzentrationsanstieg beobachtet, welches auf die durch die fortschreitende Keimung entstehenden Nährstoffe wie z.B. fermentierbare Zucker zurückzuführen sein könnte, da diese ein Schimmelpilzwachstum fördern und somit die Toxinbildung anregen könnten (Krasauskas 2017). Auch Kocic-Tanackov et al. (2005) beobachteten einen Anstieg aller untersuchten Pilzarten bis Tag 7, welcher nach *Geotrichum* für *Alternaria* am größten war. Im Gegensatz dazu beobachtete Krasauskas (2017) eine Abnahme von *Alternaria* spp. während der Keimung, sodass hier noch weitere Studien zur eindeutigen Klärung nötig sind.

Nach der Darre wurden zum Teil ähnliche oder höhere Toxingehalte beobachtet wie vor der Darre. Während durch die Darre aufgrund der hohen Temperaturen nachweislich die meisten Schimmelpilze, inklusive *Alternaria*, absterben (Kocic-Tanackov et al. 2005; Noots et al. 1999) und somit der Darrprozess als wichtiger Faktor zur Kontrolle des mikrobiellen Befalls gesehen wird (Laitila et al. 2007), war aufgrund der Hitzestabilität der *Alternaria* Toxine keine große Veränderung der Konzentrationen zu erwarten. Ebenso wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Toxingehalte auf das Trockengewicht der Probe bezogen, sodass ein Anstieg der Toxine auf den unterschiedlichen Wassergehalt der Probe vor und nach dem Darren zurückzuführen ist. Wolf-Hall (2007) erwähnte jedoch auch, dass vor allem zu Beginn des

Darrens die ansteigenden Temperaturen noch einmal eine erhöhte Toxinproduktion einiger Pilzarten anregen können, was ebenfalls von Schwarz et al. (1995) vermutet wurde. Ob dies auch auf *Alternaria* spp. zutrifft, ist nach aktuellem Wissensstand jedoch unklar, könnte aber die teilweise höheren Konzentrationen nach der Darre erklären und deckt sich mit den Ergebnissen von Prusova et al. (2022), welche niedrigere AOH, AME und TEN Gehalte im Grünmalz als im Malz fanden. Auch durch das abschließende Putzen des fertigen Malzes wurde in der Vergangenheit bereits eine Reduktion der Pilzbelastung festgestellt, welche durch das Entfernen der Wurzelkeimlinge sowie sonstiger Störsubstanzen erklärt werden kann (Kocic-Tanackov et al. 2005).

### Mälzungsvariationen

Um Einflüsse einer Veränderung der Mälzungsparameter Temperatur und Wassergehalt auf die Toxinbildung zu untersuchen, wurde eine Gerstenprobe bei 10 °C, 14 °C und 18 °C mit Weichgraden von je 40 % und 45 % vermälzt und auf ihren Toxingehalt untersucht.

Ein ähnliches Experiment zu diesem wurde noch nicht durchgeführt, sodass kein direkter Literaturvergleich möglich war, jedoch haben sich einige Wissenschaftler bereits mit den Einflüssen der Mälzungsparameter auf das Wachstum von Mikroorganismen beschäftigt, welche ebenso Aufschlüsse über eine potenzielle Mykotoxinentstehung geben könnten.

So wurde bereits festgestellt, dass während des Mälzens aufgrund der verschiedenen Schritte ein komplexes Ökosystem entsteht, welches abhängig von äußeren Parametern wie der Feuchtigkeit, der Temperatur, Lüftungsbedingungen und Einsatz von Zusatzstoffen (z.B. SO<sub>2</sub>) ist (van Nierop et al. 2006; Noots et al. 1999). Diese Parameter beeinflussen neben dem generellen Schimmelpilzwachstum auch deren Biosynthese diverser Mykotoxine, welche sich negativ auf die menschliche Gesundheit auswirken können (Kocic-Tanackov et al. 2005). Ebenso ist die Ursprungsbelastung der Gerste sowie eventuell die vorliegende Gerstensorte für das potenzielle Wachstum von Mikroorganismen entscheidend (Krasauskas 2017). Je nach gewählten Mälzungsparametern können sich somit verschiedene Mikroorganismen entwickeln und im weiteren Verlauf die Malzqualität negativ beeinflussen (Kumar Dikkala et al. 2018; Laitila et al. 2007). Während die Belüftung und der Einsatz von Zusatzstoffen in dieser Arbeit nicht getestet wurden, konnte doch festgestellt werden, dass bei Mälzungstemperaturen von 10 °C im Durchschnitt die wenigsten Mykotoxine gebildet wurden, wohingegen bei 18 °C oftmals erhöhte Toxingehalte vorlagen. Eine Mälzung bei 10 °C hatte jedoch eine verringerte Keimfähigkeit des Kornes und somit eine voraussichtlich schlechtere Malzqualität zur Folge, sodass die von der MEBAK vorgegebene Mälzungstemperatur von 14 °C als guter Kompromiss zwischen Toxinbildung und

Keimfähigkeit des Kornes betrachtet werden kann. Bezüglich des Weichgrades konnte in dieser Arbeit kein eindeutiger Unterschied zwischen den bei 40 % Kornfeuchte und 45 % Kornfeuchte gemälzten Proben erkannt werden, sodass der Parameter Feuchtigkeit für die Toxinbildung in diesem Rahmen eher zu vernachlässigen ist. Unterschiede zwischen verschiedenen Gerstensorten wurden in dieser Arbeit ebenfalls nicht untersucht, da lediglich die Gerste der Sorte Avalon vermälzt wurde.

Van Nierop et al. (2006) erwähnte zudem, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Belastung abhängig von Stressbedingungen sein könnte. Dies würde die hohen Toxinkonzentration in der Probe mit CO<sub>2</sub> Rast erklären, falls angenommen wird, dass eine CO<sub>2</sub> Atmosphäre *Alternaria* Spezies stresst und diese als Reaktion vermehrt Toxine bilden. Auch für *Fusarium* spp. konnte in Weizen bereits ein erhöhtes Pilzwachstum sowie eine vermehrte Bildung von DON bei ansteigenden CO<sub>2</sub> Konzentrationen beobachtet werden, auch wenn nicht alle *Fusarium* Stämme davon betroffen waren (Cuperlovic-Culf et al. 2019; MELLOY et al. 2010; Bencze et al. 2017).

Laitila et al. (2007) stellte zudem fest, dass Mikroorganismen im Kern innen gut geschützt vorliegen, wohingegen an der Kernoberfläche vorliegende Schimmelpilze während der Weiche abgewaschen werden können. Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit das Einführen einer dritten Wiederweiche ein effektives Vorgehen zur Reduktion des Mykotoxingehaltes darstellte, und zwar sowohl im Einzelversuch als auch in Kombination mit der CO<sub>2</sub> Rast. Hier lagen die Mykotoxine vermutlich auch vermehrt an der Kernoberfläche vor, sodass diese aufgrund ihrer Löslichkeit in Wasser durch erneutes Weichen vom Korn gewaschen wurden. Bei diesem Verfahren ist jedoch zu beachten, dass eine dritte Weiche am Ende der Keimung nicht praxisrelevant ist, da die Körner durch den hohen Feuchtigkeitsgehalt nicht mehr richtig weiterverarbeitet werden können. Somit konnte in dieser Arbeit kein praktikables Verfahren zur Reduktion des Toxingehaltes während der Mälzung festgestellt werden, jedoch könnte in Zukunft die Anwendung einer Waschschnelle weiter untersucht werden.

Laitila et al. (2007) testeten zudem den Einsatz verschiedener antifungaler Behandlungsmitteln (Antibiotika) und beobachteten eine deutliche Reduktion des Pilzwachstumes diverser Schimmelpilzarten, inklusive *Alternaria*. Auch wenn diese Ergebnisse ebenfalls keinen direkten Praxiswert für die Mälzungsindustrie haben, wurde aus dieser Studie dennoch ersichtlich, dass Malzeigenschaften durch die Kontrolle der anwesenden Mikroorganismen verbessert wurden und somit in Zukunft noch weitere Studien zum Mälzungsprozess unternommen werden sollten (Laitila et al. 2007). Briggs und McGuinness (1993) schlugen zudem vor auf die Trockenweichen zwischen den Nassweichen

zu verzichten, da diese wohl einen starken Anstieg an Mikroorganismen während des Mälzens verursachen, jedoch wird die Belüftung benötigt, um das Überleben des Kornes und somit eine gleichmäßige Keimung zu garantieren. Auch eine Sterilisation des Rohmaterials durch gering konzentrierte  $\gamma$  – Bestrahlung könnte die mikrobielle Belastung während des Mälzens reduzieren, sodass auch hierzu noch weitere Studien benötigt werden (Noots et al. 1999).



### 3.7.4 Verhalten der *Alternaria* Toxine während des Brauprozesses

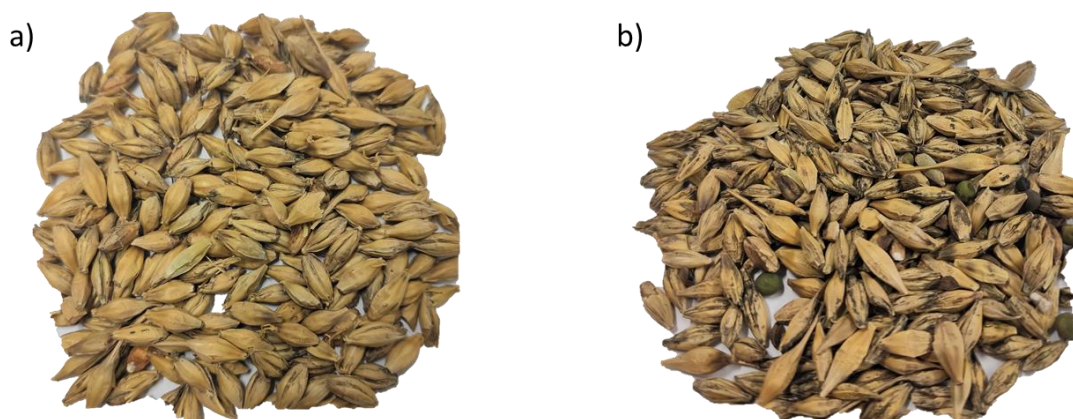
#### 3.7.4.1 Vorversuch zur Beurteilung der Wirksamkeit des Aussortierens schwarzer Körner

Für die Aussortierung schwarzer Körner mittels des SORTEX Gerätes der Firma Bühler wurde ein Gerstenmalz der Sorte Avangard, sowie ein Pilsener Malz verwendet.

Beim optischen Vergleich der Proben (siehe Abbildung 3.52-53) fiel auf, dass vor allem in dem Malz der Sorte Avangard auch in der gesäuberten Probe noch mehrere dunkle Körner sichtbar waren, deren Färbung vermutlich nicht stark genug war, um von der SORTEX Maschine erkannt zu werden. Im Abputz waren die schwarzen Körner deutlich zu erkennen, sodass die Sortierung generell als erfolgreich eingestuft werden kann. Auch im Pilsener Malz konnte eine deutliche Anreicherung der schwarzen Körner im Abputz beobachtet werden, wohingegen hier die saubere Probe kaum noch dunkle Körner enthielt.



**Abbildung 3.52** Malz Avangard vor SORTEX Reinigung (a), als saubere Batch (b) und als aussortierter Abputz (c).



**Abbildung 3.53** Pilsener Malz nach SORTEX Sortierung. A: Saubere Batch, B: aussortierter Abputz.

Um die Effektivität der Aussortierung zur Reduktion der *Alternaria* Toxine zu beurteilen, wurden von beiden Malzen jeweils vor der Sortierung und nach der Sortierung (gereinigte

Probe und Abputz) Proben genommen und mit der in 3.4 entwickelten LC-MS/MS Methode analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.20 dargestellt.

**Tabelle 3.20** Analytik der Malze vor und nach SORTEX Sortierung.

Malz	Probe	TeA [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	AOH [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	AME [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ATX I [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	TEN [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	ALTP [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Avangard	Vorher	45,5 $\pm$ 2,3	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	< BG
	Sauber	7,41 $\pm$ 0,36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Abputz	1041 $\pm$ 55	50,2 $\pm$ 2,8	9,10 $\pm$ 0,43	< BG	3,20 $\pm$ 0,39	20,9 $\pm$ 4,6
Pilsener	vorher	97,1 $\pm$ 4,8	2,71 $\pm$ 0,24	1,14 $\pm$ 0,15	< BG	0,81 $\pm$ 0,06	2,68 $\pm$ 0,21
	Sauber	30,7 $\pm$ 2,8	n.d.	n.d.	n.d.	0,71 $\pm$ 0,04	6,65 $\pm$ 0,46
	Abputz	197 $\pm$ 11	3,63 $\pm$ 0,09	n.d.	n.d.	0,57 $\pm$ 0,05	10,6 $\pm$ 0,6

Im Malz der Sorte TUM Avangard konnte der Toxingehalt der hier detektierten Toxine TeA, ATX I und ALTP durch das Aussortieren der schwarzen Körner deutlich verringert werden, was ebenfalls durch die Analytik der aussortierten schwarzen Körner bestätigt werden konnte. In letzterem wurden zudem hohe Mengen an AOH und ALTP, sowie die Toxine AME und TEN gefunden. Der größte Unterschied zwischen der sauberen und aussortierten Batch lag hierbei für TeA vor, welches in der gereinigten Probe mit 7,41  $\pm$  0,36  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und im Abputz mit 1041  $\pm$  55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vorlag. AOH konnte ebenfalls in erhöhter Konzentration (50,2  $\pm$  2,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) im Abputz detektiert werden, obwohl es sowohl in der ungereinigten sowie sauberen Probe nicht nachweisbar war. Ähnliches konnte bei ALTP beobachtet werden, da hier vor der Aufreinigung eine Konzentration unter der Bestimmungsgrenze vorlag, im Abputz jedoch 20,9  $\pm$  4,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden werden konnten.

Beim Öko Pilsener Malz lagen die Toxine in der gereinigten Probe größtenteils in niedrigeren Konzentrationen als in der ungereinigten Probe vor, für ALTP wurden jedoch 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mehr detektiert. Die im Abputz gemessenen Toxine waren bei TeA, AOH und ALTP höher konzentriert als in den anderen beiden Proben, wohingegen TEN in dieser Probe mit 0,57  $\pm$  0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  die geringste Konzentration zeigte. Die in der ungereinigten Probe detektierten Toxine AME und ATX I waren weder in der sauberen noch in der aussortierten Probe zu finden.

#### 3.7.4.2 Einfluss des Anteils schwarzer Körner auf den Toxingehalt während des Brauens

Die Brauversuche wurden wie in 6.14.5 beschrieben durchgeführt, indem das aufgereinigte Malz der Sorten Pilsener Malz und Malz TUM Avangard jeweils in den Verhältnissen 100/0, 50/50 und 25/75 (saubere Körner/schwarze aussortierte Körner, Pilsener Malz) bzw. 100/0, 75/25 und 50/50 (saubere Körner/schwarze aussortierte Körner, Avangard Malz) gemischt

wurde. Ziel war es herauszufinden, ob durch das Entfernen der schwarzen Körner aus dem Malz der Gehalt an Mykotoxinen reduziert werden kann. Um unterschiedliche Einwaagen und somit Verdünnungseffekte miteinzubeziehen, wurden alle Ergebnisse unter Berücksichtigung der vorliegenden Gesamtmenge auch als Absolutwerte in  $\mu\text{g}$  berechnet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3.21 bis 3.24 dargestellt.

### Pilsener Ökomalz

Im Pilsener Malz wurden die Toxine TeA, AOH, AME, AOH-3-S, ALTP, ATX I und TEN über mehrere Prozessschritte des Brauverlaufes hinweg und in allen drei Mischungen detektiert, wohingegen die Toxine AME-3-S und AOH-3-G nur vereinzelt und in Gehalten unter der Bestimmungsgrenze vorlagen. Somit konnten im Rahmen dieses Versuches keine eindeutigen Aussagen zu diesen modifizierten Toxinen im Zusammenhang mit schwarzen Körnern getroffen werden, sodass im Folgenden lediglich die Ergebnisse der Konzentrationen von TeA, AOH, AME, AOH-3-S, ALTP, ATX I und TEN dargestellt werden.

Für diese Toxine konnten in allen Prozessschritten überwiegend vergleichbare Konzentrationen zwischen den zwei verbrauchten Replikaten jeder Malzmischung erzielt werden, wodurch eine relativ homogene Verteilung der Toxine innerhalb der Probe angenommen und die Bildung von Toxin Hot Spots in diesem Versuch als vernachlässigbar betrachtet werden kann.

Bei Betrachtung der TeA-Gehalte wurde festgestellt, dass die Brauersuche mit 100 % sauberen Körnern über alle Prozessschritte hinweg die niedrigsten Konzentrationen aufzeigten. Im Schrot, sowie zu Beginn der Maische konnten für die 25/75 Mischung höhere Gehalte als bei der 50/50 Mischung detektiert werden, wohingegen am Ende der Maische nahezu identische Konzentrationen in beiden Mischungen ermittelt wurden. Im anschließend anfallenden Treber lagen die Werte der 25/75 Mischung erneut über denen der 50/50 Mischung, was ebenso in der Ausschlagwürze und im finalen Bier beobachtet wurde, während die Konzentrationen der anderen Prozessschritte bei beiden Mischungen erneut sehr ähnlich waren.

**Tabelle 3.21** Konzentrationen von TeA und TEN in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in  $\mu\text{g}$  (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $\mu\text{g}/\text{L}$  mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).

Prozessschritt	Mix	Rep.	TeA		TEN	
			$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)
Schrot	100/0	1	42,1 ± 3,9	63,2	1,29 ± 0,23	1,94
		2	45,2 ± 5,4	67,8	0,99 ± 0,10	1,49
	50/50	1	64,2 ± 6,2	96,3	1,50 ± 0,16	2,25
		2	52,8 ± 3,9	79,2	2,47 ± 0,20	3,71
	25/75	1	115 ± 2	184	0,99 ± 0,10	1,58
		2	122 ± 3	196	2,06 ± 0,24	3,30
Maische Anfang	100/0	1	24,4 ± 0,8	36,6	0,48 ± 0,02	0,72
		2	21,5 ± 0,5	32,2	0,35 ± 0,03	0,53
	50/50	1	28,7 ± 1,1	43,1	0,44 ± 0,03	0,66
		2	23,8 ± 0,7	35,7	0,71 ± 0,05	1,06
	25/75	1	55,2 ± 3,7	88,3	0,61 ± 0,05	0,98
		2	86,0 ± 3,8	138	0,60 ± 0,05	0,96
Maische Ende	100/0	1	63,3 ± 3,1	95,0	0,43 ± 0,04	0,65
		2	63,0 ± 0,6	94,5	0,41 ± 0,04	0,62
	50/50	1	94,4 ± 2,7	142	0,38 ± 0,03	0,57
		2	83,1 ± 2,7	125	0,71 ± 0,07	1,06
	25/75	1	96,3 ± 3,0	154	0,57 ± 0,04	0,91
		2	74,4 ± 2,2	119	0,67 ± 0,06	1,07
Treber	100/0	1	5,29 ± 0,29	10,0	0,20*	0,38
		2	5,58 ± 0,2	10,3	0,20*	0,37
	50/50	1	10,5 ± 0,9	18,8	0,27 ± 0,03	0,48
		2	10,3 ± 0,6	17,8	0,36 ± 0,03	0,62
	25/75	1	16,0 ± 0,6	30,2	0,31 ± 0,03	0,58
		2	15,3 ± 0,8	28,9	0,39 ± 0,02	0,74
Pfannevollwürze	100/0	1	7,75 ± 0,32	56,6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	7,99 ± 0,54	62,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	16,7 ± 1,1	143	0,23 ± 0,03	1,98
		2	23,2 ± 1,3	181	0,28 ± 0,03	2,18
	25/75	1	26,0 ± 0,31	224	0,34 ± 0,02	2,92
		2	20,3 ± 1,4	164	0,36 ± 0,06	2,92
Ausschlagwürze	100/0	1	7,95 ± 0,49	50,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	7,85 ± 0,16	53,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	17,1 ± 1,4	130	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	23,2 ± 1,3	157	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	28,7 ± 2,5	218	0,40 ± 0,10	3,04
		2	20,8 ± 1,4	148	0,17 ± 0,05	1,21
Heißtrub	100/0	1	31,7 ± 2,3	15,9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	35,8 ± 2,9	20,0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	46,3 ± 3,3	11,8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	34,7 ± 1,6	10,7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	50,2 ± 2,7	11,0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	39,6 ± 2,1	11,6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Geläger/ Erntevollhefe	100/0	1	7,87 ± 0,19	4,27	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	7,23 ± 0,25	2,87	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	17,5 ± 0,7	8,74	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	24,2 ± 1,1	13,5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	24,6 ± 2,7	12,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	20,6 ± 2,1	10,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Bier	100/0	1	8,26 ± 0,59	21,5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	6,94 ± 0,41	27,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	15,0 ± 0,5	46,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	15,2 ± 0,4	53,2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	21,4 ± 1,2	70,5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	18,2 ± 0,7	52,8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*n.d.* = nicht detektiert

\* = unter der BG, angegeben als  $\frac{1}{2}$  x BG

Die Konzentrationen für TEN lagen in allen drei Mischungen und in allen Proben außer dem Schrot bei unter 1 µg/kg bzw. unter 1 µg/L und meist nahe an der Bestimmungsgrenze, sodass keine eindeutigen Trends erkennbar waren. In den Proben, die aus 75 % schwarzen Körnern gebraut wurden, war TEN jedoch am längsten nachweisbar und konnte noch in der Ausschlagwürze detektiert werden, wohingegen die Proben der 50/50 Mischung nur noch in der Pfannevollwürze gefunden werden konnten. In der 100/0 Mischung war TEN nur in den Trebern in Gehalten unter der Bestimmungsgrenze nachweisbar und konnte im Anschluss in keinem weiteren Prozessschritt mehr gefunden werden.

Wie erwartet lagen die Konzentrationen von AOH in einem niedrigeren Bereich als TeA und fielen in der 100 % sauberen Mischung teilweise unter die Bestimmungsgrenze. Im Gegensatz zu TeA wurde AOH fast komplett über den Treber aus dem Brauprozess entfernt, sodass in den späteren Prozessschritten nur in einigen Ansätzen AOH in Konzentrationen unter der BG nachweisbar war. In den Proben Schrot, Maische Anfang, Maische Ende und Treber lagen die niedrigsten Konzentrationen erneut in den mit 100 % sauberen Körnern gebrauten Proben vor, wohingegen in den aus 75 % schwarzen Körnern gebrauten Proben mit Ausnahme des Schrotes die höchsten Konzentrationen gemessen wurden. Während in der Pfannevollwürze sowie in der Ausschlagwürze der 100/0 Mischung kein AOH mehr nachgewiesen werden konnte, lagen die Konzentrationen der anderen beiden Mischungen hier unter der Bestimmungsgrenze. Für AME konnte ähnliches beobachtet werden: auch hier lagen die Konzentrationen in der Mischung mit 100 % sauberen Körnern am niedrigsten vor, wobei in einigen Ansätzen bei Berücksichtigung der Standardabweichung ähnliche Werte zu der 50/50 Mischung gefunden wurden. In der Mischung mit 75 % schwarzen Körnern konnten in den Proben Schrot, Maische Anfang, Maische Ende und Treber erneut die höchsten Konzentrationen gemessen werden, wohingegen die Gehalte der Pfannevollwürze und Ausschlagwürze in allen drei Mischungen vergleichbar waren. In den Proben Geläger/Erntehefe, Heißtrub und Bier konnte in keiner Mischung AME nachgewiesen werden. Das modifizierte Toxin AOH-3-S wurde nur in der Mischung mit 75 % schwarzen Körnern detektiert: während hier im Schrot noch Konzentrationen unter der BG vorlagen, konnte während der Maische ein deutlicher Konzentrationsanstieg beobachtet werden. Ein Teil des gebildeten AOH-3-S war im Treber zu finden, allerdings war dieses Toxin in den folgenden Prozessschritten nicht mehr nachweisbar.

**Tabelle 3.22** Konzentrationen von AOH, AME und AOH-3-S in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. In den Proben Heißtrub, Geläger und Bier konnte keines der Toxine nachgewiesen werden. Zur Berechnung des Toxingehaltes in  $\mu\text{g}$  (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $\mu\text{g}/\text{L}$  mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).

Prozessschritt	Mix	Rep.	AOH		AME		AOH-3-S	
			$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)
Schrot	100/0	1	0,75*	1,13	1,25 ± 0,09	1,88	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	1,13	1,35 ± 0,14	2,03	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	5,15 ± 0,29	7,73	4,07 ± 0,13	6,12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	4,56 ± 0,76	6,84	5,57 ± 0,69	8,36	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	4,56 ± 1,76	7,30	37,0 ± 0,09	59,2	1,10*	1,76
		2	5,45 ± 0,06	8,72	16,3 ± 0,54	26,0	1,10*	1,76
Maische Anfang	100/0	1	0,75*	1,13	1,10 ± 0,13	1,65	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	1,13	1,18 ± 0,1	1,77	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	4,4 ± 0,1	6,60	2,38 ± 0,17	3,57	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	2,79 ± 0,13	4,19	3,12 ± 0,20	4,68	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	5,74 ± 0,18	9,18	20,6 ± 1,71	32,9	8,90 ± 1,21	14,2
		2	4,92 ± 0,12	7,87	4,75 ± 0,24	7,6	11,7 ± 3,9	18,7
Maische Ende	100/0	1	1,29 ± 0,07	1,94	2,13 ± 0,08	3,20	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	1,07 ± 0,09	1,61	1,65 ± 0,13	2,48	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	3,3 ± 0,16	4,95	2,16 ± 0,21	3,24	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	3,48 ± 0,23	5,22	4,68 ± 0,23	7,02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	5,39 ± 0,29	8,62	14,5 ± 0,47	23,2	18,6 ± 4,2	29,7
		2	4,00 ± 0,10	6,40	5,16 ± 0,35	8,26	8,60 ± 2,2	13,8
Treber	100/0	1	2,28 ± 0,19	4,32	3,60 ± 0,34	6,81	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	1,67 ± 0,05	3,08	2,39 ± 0,24	4,40	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	7,85 ± 0,70	14,1	7,43 ± 0,31	13,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	7,47 ± 0,39	12,9	10,5 ± 0,98	18,13	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	12,7 ± 1,02	23,98	41,0 ± 2,51	77,4	1,10*	2,07
		2	7,27 ± 0,48	13,74	14,1 ± 1,29	26,7	1,10*	2,08
Pfannevollwürze	100/0	1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,20 ± 0,01	1,46	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,19 ± 0,02	1,48	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	0,75*	6,45	0,21 ± 0,03	1,81	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	5,85	0,23 ± 0,01	1,79	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	0,75*	6,45	0,34 ± 0,01	2,92	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	6,08	0,24 ± 0,01	1,94	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ausschlagwürze	100/0	1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	50/50	1	0,75*	5,70	0,21 ± 0,01	1,60	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	5,10	0,24 ± 0,01	1,63	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	25/75	1	0,75*	5,70	0,32 ± 0,03	2,43	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		2	0,75*	5,33	0,23 ± 0,01	1,63	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*n.d.* = nicht detektiert

\* = unter der BG, angegeben als  $\frac{1}{2} \times \text{BG}$

Die Toxine ALTP und ATX I (siehe Tabelle 3.23) konnten ebenfalls nur in den ersten vier Prozessschritten detektiert werden. Abweichend zu den Toxinen AOH, AME und TeA lag hier für ALTP kein eindeutiger Trend vor, da sich bei diesem Toxin auch teilweise die Toxingehalte im Schrot stärker zwischen beiden biologischen Replikaten unterschieden haben als bei den anderen Toxinen. So konnte in diesem Prozessschritt die niedrigste Konzentration in Replikat 2 der 50/50 Mischung gefunden werden, wohingegen Replikat 1 der gleichen Mischung ähnlich hohe Mengen ALTP wie die 25/75 Mischung enthielt. Bei den Proben Maische Anfang und Treber lagen die niedrigsten Konzentrationen in der 100/0 Mischung vor, wohingegen die

Gehalte der anderen beiden Mischungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung vergleichbar und auch nur geringfügig höher als in der 100/0 Mischung waren. Am Ende der Maische wurden für alle drei Mischungen ähnliche Werte ermittelt und auch im Treber konnte kein Unterschied zwischen der 50/50 und 25/75 Mischung erkannt werden. Auch für ATX I waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Im Schrot lagen hier die niedrigsten Konzentrationen wie erwartet in der Mischung mit 100 % sauberen Körnern vor, wohingegen die höchsten Konzentrationen in der 50/50 Mischung und nicht in der 25/75 Mischung vorlagen. Zu Beginn der Maische konnte dann bereits kein Unterschied mehr zwischen der 100/0 und der 25/75 Mischung beobachtet werden, und am Ende der Maische lagen die Konzentrationsverhältnisse sogar in umgekehrter Reihenfolge vor: die 100/0 Mischung zeigte die höchsten Konzentrationen und in der 25/75 Mischung konnte kein ATX I mehr detektiert werden. Im Gegensatz dazu lagen die im Treber vorliegenden Gehalte für alle drei Mischungsverhältnisse unter der BG und waren somit identisch, und in den folgenden Prozessschritten konnte kein ATX I mehr nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.23** Konzentrationen von ALTP und ATX I in drei verschiedenen Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Pilsener Malzes während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in  $\mu\text{g}$  (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $\mu\text{g}/\text{L}$  mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).

Prozessschritt	Mix	Rep.	ALTP		ATX I		
			$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}$ (absolut)	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}$ (absolut)	
Schrot	100/0	1	$2,58 \pm 0,37$	3,87	1,15*	1,73	
		2	$6,39 \pm 0,33$	9,59	1,15*	1,73	
	50/50	1	$5,15 \pm 0,29$	7,73	$3,24 \pm 0,55$	4,86	
		2	1,05*	1,56	$3,04 \pm 0,36$	4,56	
	25/75	1	$6,03 \pm 0,76$	9,65	1,15*	1,84	
		2	$5,45 \pm 0,06$	8,72	$2,38 \pm 0,21$	3,81	
	Maische Anfang	100/0	1	$2,25 \pm 0,17$	3,38	$3,12 \pm 0,43$	4,68
			2	$2,8 \pm 0,34$	4,20	$3,67 \pm 0,39$	5,51
50/50		1	$5,11 \pm 0,99$	7,67	$6,46 \pm 0,62$	9,69	
		2	$3,97 \pm 0,39$	5,96	$5,80 \pm 0,96$	8,7	
25/75		1	$3,37 \pm 0,27$	5,39	$3,26 \pm 0,35$	5,22	
		2	$3,73 \pm 0,37$	5,97	$3,58 \pm 0,41$	5,73	
Maische Ende		100/0	1	$3,09 \pm 0,36$	4,64	$6,26 \pm 0,29$	9,39
			2	$4,09 \pm 0,36$	6,14	$7,13 \pm 1,22$	10,70
	50/50	1	$3,5 \pm 0,33$	5,25	$2,80 \pm 0,35$	4,2	
		2	$3,59 \pm 0,28$	5,39	1,15*	1,73	
	25/75	1	$4,96 \pm 0,51$	7,94	n.d.	n.d.	
		2	$3,68 \pm 0,36$	5,89	n.d.	n.d.	
	Treber	100/0	1	1,05*	1,99	1,15*	2,18
			2	$1,94 \pm 0,38$	3,57	1,15*	2,12
50/50		1	$4,61 \pm 0,36$	8,26	1,15*	2,06	
		2	$5,91 \pm 1,63$	10,2	n.d.	n.d.	
25/75		1	$5,69 \pm 0,41$	10,7	1,15*	2,17	
		2	$4,43 \pm 0,43$	8,37	1,15*	2,17	

n.d. = nicht detektiert

\* = unter der BG, angegeben als  $\frac{1}{2}$  x BG

### Malz Avangard

Im Avangard Malz konnten weniger Toxine detektiert werden als im zuvor genannten Pilsener Malz, wobei zusätzlich lediglich die Toxine TeA und AOH in quantifizierbaren Mengen vorlagen, sodass der Vergleich der verschiedenen Anteile schwarzer Körner nur mit diesen beiden Toxinen durchgeführt werden konnte.

Im Gegensatz zum Pilsener Malz waren die für TeA erzielten Ergebnisse im Avangard Malz nicht eindeutig. Im Schrot zeigten die Werte der jeweiligen biologischen Replikate große Schwankungen, sodass von einer inhomogenen Toxinverteilung auszugehen ist. Dadurch sind auch hier keine Trends erkennbar, jedoch lag die niedrigste Konzentration in der 100/0 Mischung (Replikat 1) vor, wohingegen der höchste Gehalt in der 75/25 Mischung (Replikat 2) vorlag. Zu Beginn der Maische konnte ein unterschiedlich starker Rückgang von TeA beobachtet werden, sodass in fünf der sechs Ansätzen unabhängig des Anteils schwarzer Körner sehr ähnliche Konzentrationen bestimmt wurden. Lediglich Replikat 2 der 50/50 Mischung zeigte mit 114 µg/kg einen deutlich höheren Wert als im Schrot. Da bei dieser Probe am Ende der Maische jedoch mit 15,1 µg/kg wieder ein den anderen fünf Ansätzen sehr ähnlicher Wert berechnet werden konnte, ist es denkbar, dass die zu Beginn der Maische gezogene Probe nicht repräsentativ für die Gesamtmenge war. Im Treber konnten wie erwartet nur geringe TeA Gehalte gefunden werden, bei denen die Werte der 75/25 Mischung in etwa 1 µg/kg über den Gehalten der anderen beiden Mischungen lag. In den folgenden Prozessschritten lagen für alle sechs Brauansätze meist vergleichbare Konzentrationen vor, lediglich im Heißtrub wurden in der 100/0 Mischung (Replikat 2) die niedrigste und in der 50/50 Mischung (Replikat 1) die höchste Konzentration gemessen. Allgemein betrachtet konnte somit in diesem Malz kein eindeutiger Einfluss der schwarzen Körner auf den Toxingehalt gezeigt werden, allerdings lagen in allen genannten Prozessschritten die niedrigsten Konzentrationen in mindestens einem Replikat der 100/0 Mischung vor, wohingegen die jeweils höchsten Konzentrationen mit Ausnahme der Proben Schrot, Treber und Geläger/Erntevollhefe in mindestens einem Replikat der 50/50 Mischung vorlagen.

Für AOH war eine Auswertung der Ergebnisse nur bedingt möglich, da die Werte aller Mischungen im Schrot, sowie zu Beginn und Ende der Maische in Konzentrationen unter der BG vorlagen. Lediglich im Treber konnte AOH quantifiziert werden, jedoch waren die Konzentrationen in allen drei Mischungen vergleichbar, sodass hier kein Einfluss der schwarzen Körner auf den Toxingehalt beobachtet werden konnte.



**Tabelle 3.24** TeA Konzentrationen dreier verschiedener Mischungen sauberer und schwarzer Körner des Malzes Avangard während des Brauprozesses. Mix = Mischung saubere Körner/schwarze Körner, Rep. = Replikat. Zur Berechnung des Toxingehaltes in  $\mu\text{g}$  (absolut) wurden die Mittelwerte der Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $\mu\text{g}/\text{L}$  mit der entsprechend vorliegenden Gesamtmenge multipliziert (siehe Anhang 7).

Prozessschritt	Mix	Rep.	TeA		AOH	
			$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)	$\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{g}$ (absolut)
Schrot	100/0	1	13,4 ± 1,3	20,1	0,79*	1,19
		2	17,6 ± 0,7	26,4	0,79*	1,19
	75/25	1	18,6 ± 1,5	27,9	0,79*	1,19
		2	56,4 ± 2,7	84,6	0,79*	1,19
	50/50	1	21,1 ± 2,1	31,7	0,79*	1,19
		2	30,1 ± 2,7	45,2	0,79*	1,19
Maische Anfang	100/0	1	11,4 ± 1,1	17,1	0,79*	1,19
		2	7,53 ± 0,78	11,3	0,79*	1,19
	75/25	1	13,1 ± 0,8	19,7	0,79*	1,19
		2	11,9 ± 0,6	17,9	0,79*	1,19
	50/50	1	13,7 ± 0,6	20,6	0,79*	1,19
		2	11,4 ± 1,1	17,1	0,79*	1,19
Maische Ende	100/0	1	13,2 ± 0,25	19,8	0,79*	1,19
		2	9,46 ± 0,61	14,2	0,79*	1,19
	75/25	1	15,1 ± 1,5	22,7	0,79*	1,19
		2	17,1 ± 1,0	25,7	0,79*	1,19
	50/50	1	19,1 ± 1,2	28,7	0,79*	1,19
		2	15,1 ± 1,1	22,6	0,79*	1,19
Treber	100/0	1	2,19 ± 0,21	6,13	1,27 ± 0,07	3,56
		2	1,25*	2,13	0,79*	1,26
	75/25	1	3,01 ± 0,24	4,82	1,84 ± 0,17	2,76
		2	3,32 ± 0,32	5,31	1,49 ± 0,71	2,24
	50/50	1	1,96 ± 0,13	2,94	1,48 ± 0,13	2,37
		2	2,28 ± 0,17	3,65	1,40 ± 0,11	2,24
Pfannevollwürze	100/0	1	4,66 ± 0,36	35,4	1,84 ± 0,17	2,76
		2	2,97 ± 0,08	22,6	1,49 ± 0,71	2,24
	75/25	1	4,91 ± 0,38	37,3	n.d.	n.d.
		2	5,58 ± 0,25	43,0	n.d.	n.d.
	50/50	1	6,22 ± 0,48	46,7	n.d.	n.d.
		2	4,48 ± 0,35	34,6	n.d.	n.d.
Ausschlagwürze	100/0	1	4,44 ± 0,14	33,7	n.d.	n.d.
		2	2,95 ± 0,20	22,4	n.d.	n.d.
	75/25	1	4,77 ± 0,30	36,3	n.d.	n.d.
		2	5,23 ± 0,50	40,3	n.d.	n.d.
	50/50	1	6,09 ± 0,30	45,7	n.d.	n.d.
		2	5,02 ± 0,30	37,1	n.d.	n.d.
Heißtrub	100/0	1	72,7 ± 0,6	14,5	n.d.	n.d.
		2	50,4 ± 4,0	10,1	n.d.	n.d.
	75/25	1	120 ± 2	14,4	n.d.	n.d.
		2	200 ± 1	28,0	n.d.	n.d.
	50/50	1	260 ± 3	36,4	n.d.	n.d.
		2	94 ± 0,9	13,1	n.d.	n.d.
Geläger/ Erntevollhefe	100/0	1	2,71 ± 0,26	2,71	n.d.	n.d.
		2	2,61 ± 0,10	2,61	n.d.	n.d.
	75/25	1	4,13 ± 0,19	4,13	n.d.	n.d.
		2	5,41 ± 0,66	5,41	n.d.	n.d.
	50/50	1	4,02 ± 0,36	4,02	n.d.	n.d.
		2	4,11 ± 0,37	4,11	n.d.	n.d.
Bier	100/0	1	3,07 ± 0,17	14,1	n.d.	n.d.
		2	2,03 ± 0,17	9,14	n.d.	n.d.
	75/25	1	2,84 ± 0,18	10,8	n.d.	n.d.
		2	3,14 ± 0,07	13,2	n.d.	n.d.
	50/50	1	4,10 ± 0,07	17,6	n.d.	n.d.
		2	3,03 ± 0,26	10,9	n.d.	n.d.

n.d. = nicht detektiert

\* = unter der BG, angegeben als  $\frac{1}{2} \times \text{BG}$

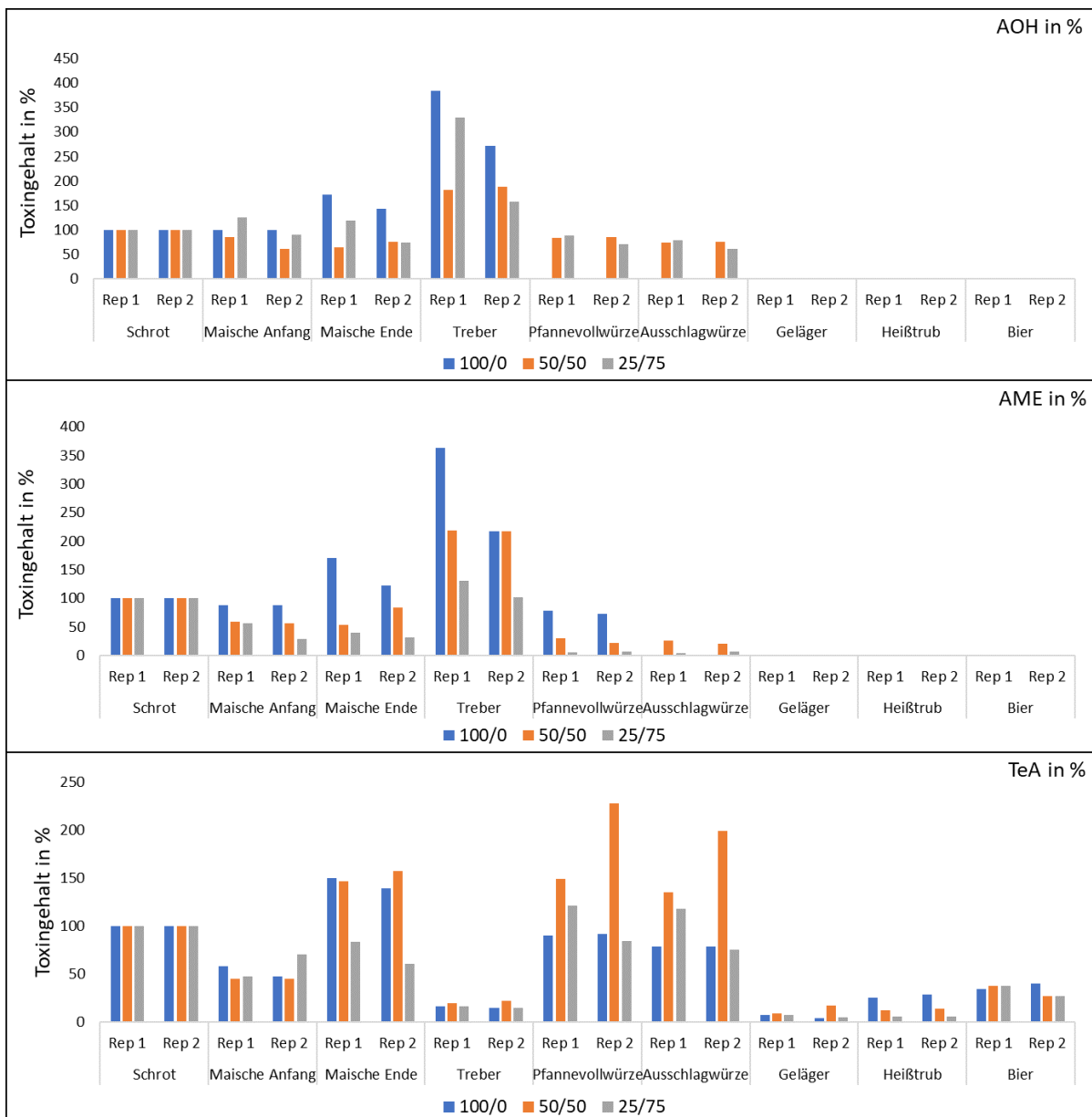
In den Treberproben zeigten sich für AOH dennoch die niedrigsten Konzentrationen in den aus 100 % sauberen Körnern gebrauten Proben, wobei die hier erhaltenen Werte denen der anderen beiden Mischungen sehr ähnlich waren, sodass unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein eindeutiger Unterschied zwischen den drei Mischungen erkennbar war.

#### *3.7.4.3 Bilanzierung der Toxine über den Brauprozess*

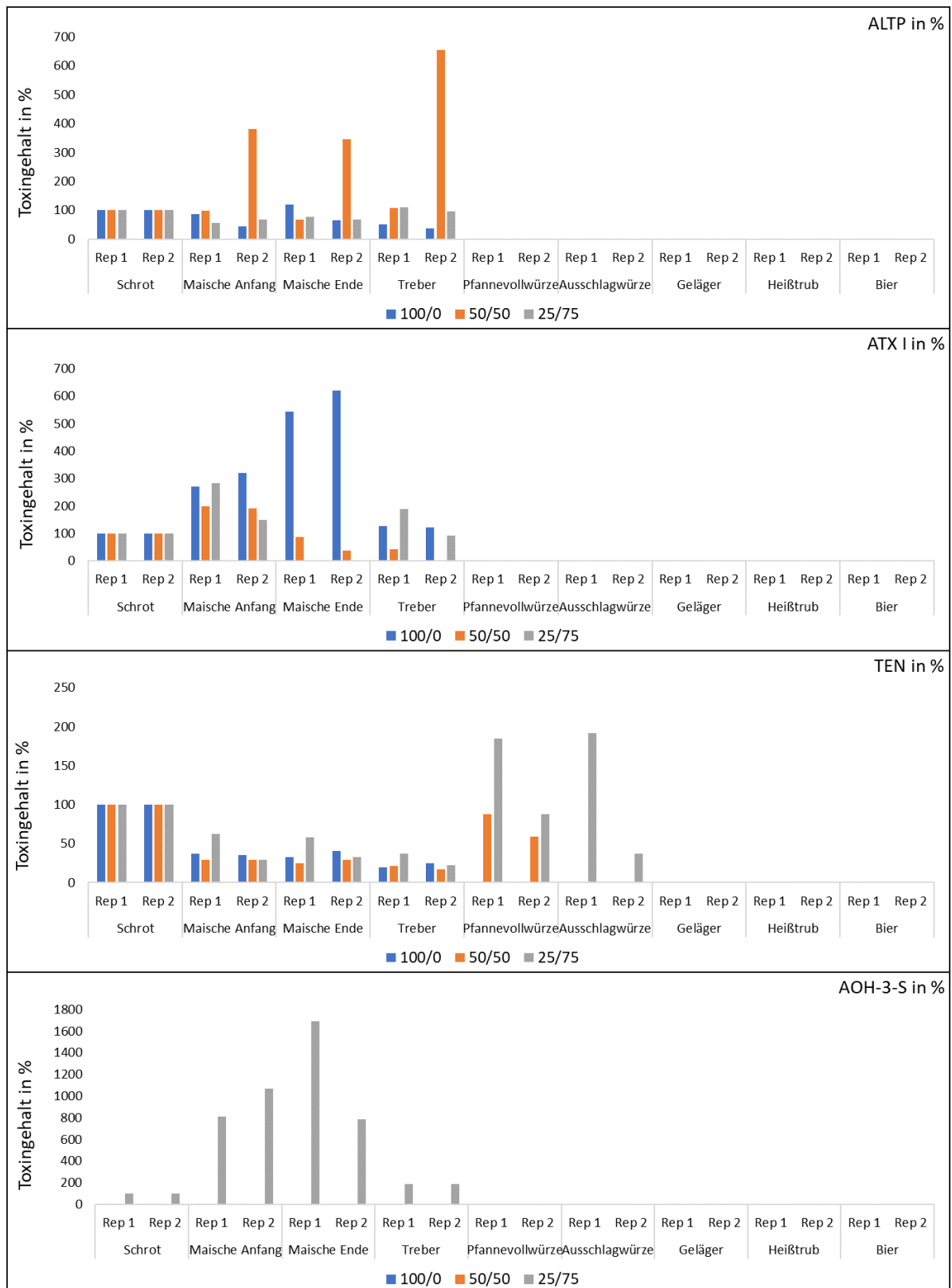
Die Toxingehalte der in 3.7.4.2 beschriebenen Proben wurden als Absolutwerte berechnet, um unterschiedliche Einwaagen sowie Verdünnungseffekte zu berücksichtigen und somit eine prozentuale Bilanzierung der Toxine durchführen zu können. Hierfür wurden alle Startmaterialien, zugegebene Materialien (z.B. Hefe, Wasser) sowie alle entnommenen Proben exakt gewogen. Für die durchzuführende Bilanzierung wurden die Toxingehalte des Schrotes (= Beginn des Brauprozesses) auf 100 % gesetzt und die prozentualen Abweichungen der anderen Prozessschritte bestimmt, um eine Zu- oder Abnahme erkennen zu können. Die errechnete Bilanzierung ist in Abbildung 3.54 und 3.55 (Pilsener Malz) bzw. in Abbildung 3.56 (Malz Avangard) graphisch dargestellt, eine Übersicht über die berechneten Prozentzahlen ist in Anhang 7 zu finden.

Die Gesamtbelastung war in allen gebrauten Bieren eher gering und die Konzentrationen zum Teil unter der Bestimmungsgrenze, sodass minimale Konzentrationsunterschiede oft eine große prozentuale Veränderung bewirkten. Als einzige Ausnahme zeigt sich hier erneut die Tenuazonsäure, welche in allen Proben in gut quantifizierbaren Mengen vorlag. In den Brauversuchen mit dem Avangard Malz konnte neben TeA lediglich AOH quantitativ bestimmt werden, im Pilsener Malz waren zudem AME, ALTP, ATX I, AOH-3-S und TEN über den Brauprozess verfolgbar. Bei beiden Mustern waren die Bilanzierungsergebnisse der Replikate gut vergleichbar: AOH, AME und ALTP blieben in den ersten drei Schritten (Schrot, Maische Anfang und Maische Ende) relativ konstant, und prozentuale Veränderungen sind hier meist mit der Standardabweichung des Gehaltes zu erklären. In den Trebern waren in beiden Mustern für alle drei Toxine prozentual höhere Gehalte zu finden, was auf eine Toxinanreicherung in diesem Schritt hindeuten könnte. In den aus dem Pilsener Ökomalz gebrauten Proben konnten AOH und AME im Folgenden nur noch in der Pfannevollwürze und Ausschlagwürze nachgewiesen werden, alle weiteren Prozessschritte konnten als toxfrei eingestuft werden. ALTP wurde bereits in den Würzen nicht mehr detektiert, sodass dieses Toxin hier komplett über die Treber aus dem Brauprozess entfernt werden konnte. Bei TeA war bereits ein Anstieg während des Maischens zu erkennen, im Vergleich zu den anderen Toxinen war hier der Treber jedoch nur gering belastet. In der Pfannevollwürze konnte ein Anstieg an TeA beobachtet werden, welcher sich ebenfalls in der Ausschlagwürze zeigte. Die

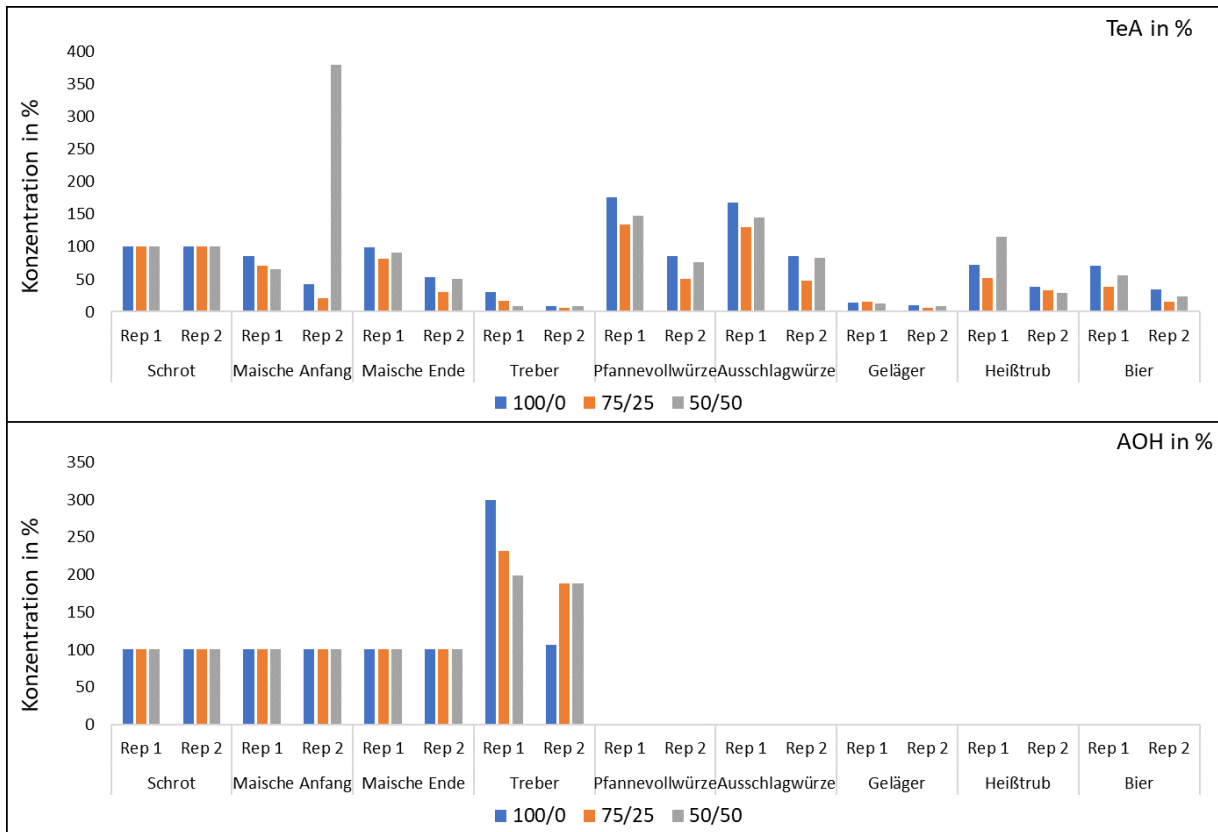
Analyse der Geläger- und Heißtrubproben zeigte nur eine geringe TeA-Belastung, wohingegen ca. 20 % (Muster 1) bzw. 50 % (Muster 2) der TeA-Ausgangskonzentration im Bier gefunden wurde. Durch Addition der prozentualen Anteile der TeA in Treber, Geläger, Heißtrub und Bier konnten im Mittel insgesamt ca. 85 % (Pilsener Malz) bzw. 120 % (Avangard Malz) der ursprünglich im Schrot enthaltenen Menge an TeA im Brauprozess wiedergefunden werden (siehe Tabelle 3.25), was unter der Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen auf keine bzw. lediglich auf eine geringfügige Toxinbildung während des Brauens hindeutet.



**Abbildung 3.54** Bilanzierung der *Alternaria* Toxine AOH, AME und TeA über den Brauprozess (Pilsener Malz, je zwei Replikate).



**Abbildung 3.55** Bilanzierung der *Alternaria* Toxine ALTP, ATX I, TEN und AOH-3-S über den Brauprozess (Pilsener Malz, je zwei Replikate).



**Abbildung 3.56** Bilanzierung der *Alternaria* Toxine AOH und TeA über den Brauprozess (Malz Avangard, je zwei Replikate).

**Tabelle 3.25** Prozentualer Verbleib der Tenuazonssäure während des Brauens.

Prozessschritt	Replikat	Pilsener Ökomalz			Malz Avangard		
		100/0	50/50	25/75	100/0	75/25	50/50
Treber	1	16 %	20 %	16 %	31 %	17 %	9 %
	2	15 %	22 %	15 %	8 %	6 %	8 %
Geläger	1	7 %	9 %	7 %	13 %	15 %	13 %
	2	4 %	17 %	5 %	10 %	6 %	9 %
Heißtrub	1	25 %	12 %	6 %	72 %	52 %	115 %
	2	29 %	14 %	6 %	38 %	33 %	29 %
Bier	1	34 %	48 %	38 %	70 %	39 %	56 %
	2	40 %	67 %	27 %	35 %	16 %	24 %
Summe	1	82 %	89 %	67 %	187 %	122 %	193 %
	2	89 %	120 %	53 %	91 %	61 %	70 %

Neben den bereits dargestellten Toxinen konnten in einigen Prozessschritten noch weitere Toxine in Gehalten unter der Bestimmungsgrenze detektiert werden, sodass hier aufgrund fehlender quantitativer Daten keine Bilanzierung möglich war. Das Auftreten dieser Toxine ist in Tabelle 3.26 (Pilsener Malz) und Tabelle 3.27 (Malz Avangard) dargestellt.

**Tabelle 3.26** Überblick über weitere im Brauprozess vorkommende Toxine (Pilsener Malz).

	Mischung (sauber/schwarz)	Replikat	AOH-3-G	AME-3-S
Schrot	100/0	1 + 2	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	n.d.	n.d.
	75/25	1 + 2	n.d.	n.d.
Maische Anfang	100	1 + 2	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	< BG	< BG
	75/25	1 + 2	< BG	< BG
Maische Ende	100	1 + 2	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	n.d.	< BG
	75/25	1 + 2	< BG	< BG
Treber	100	1 + 2	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	n.d.	< BG
	75/25	1 + 2	n.d.	< BG

n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 3.27** Überblick über weitere im Brauprozess vorkommende Toxine in µg/kg (Malz Avangard).

	Mischung (sauber/schwarz)	Replikat	AME	ATX I	ALTP
Schrot	100/0	1	n.d.	< BG	4,84 ± 0,13
		2	n.d.	< BG	n.d.
	50/50	1	n.d.	< BG	4,19 ± 0,23
		2	n.d.	< BG	7,61 ± 0,26
	75/25	1	1,26 ± 0,19	< BG	10,4 ± 0,39
		2	1,36 ± 0,19	< BG	10,4 ± 0,67
Maische (Anfang)	100	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
	75/25	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
Maische (Ende)	100	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
	50/50	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
	75/25	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
Treber	100	1 + 2	n.d.	n.d.	< BG
	50/50	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.
	75/25	1 + 2	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht detektiert

#### 3.7.4.4 Diskussion: Verhalten der *Alternaria* Toxine während des Brauprozesses

##### Einfluss des Anteils schwarzer Körner auf den Toxingehalt während des Brauens

Die bei den unterschiedlichen Verhältnissen von sauberen und schwarzen Körnern erzielten Ergebnisse waren zum Teil widersprüchlich: Während beim Pilsener Malz eindeutig mit einer ansteigenden Menge schwarzer Körner auch ein Toxinanstieg beobachtet werden konnte, waren die für das Avangard Malz bestimmten Konzentrationen in allen drei Mischungen sehr ähnlich. Auch wenn die Ergebnisse des Avangard Malzes so nicht erwartet wurden, spiegeln die hier erzielten Ergebnisse die widersprüchlichen Resultate vieler bereits publizierter Studien wider, bei denen zum einen der Zusammenhang zwischen der Schwarzfärbung der Körner – auch black point disease bzw. Schwarzfleckenkrankheit genannt - und dem Auftreten von *Alternaria* spp. untersucht, und zum anderen Schwarzfärbungen durch enzymatische Bräunung beschrieben wurden. Zusammen mit der selten auftretenden Verfärbung durch sichtbaren Schimmelbefall scheint es somit drei verschiedene Arten von Kornverfärbungen zu geben (Marasas et al. 1990; Kevin Young und Robert Loughman 2001).

Generell konnte bereits in mehreren Studien *A. alternata* als Hauptverursacher der Schwarzfleckenkrankheit auf Weizen und Gersten identifiziert werden (Williamson 1997; Walker et al. 2008; Amatulli et al. 2013; Rees et al. 1984; Fernandez und Conner 2011), jedoch können auch andere Pilze wie *Cochliobactus sativus*, *Fusarium* spp., *Stemphylium* spp., *Cladosporium* oder *Epicoccum* eine ähnliche Verfärbung des Kornes bewirken (Rees et al. 1984; Walker et al. 2008; Hudec und Muchova 2008; Ramires et al. 2018). Da ein Befall mit diesen Pilzen oft mit der Produktion von Mykotoxinen assoziiert wird (Kang und Buchenauer 2002), wird eine Schwarzfärbung häufig zur Qualitätseinstufung von Gerste und Malz verwendet (Roháčik und Hudec 2008), auch wenn der Zusammenhang zwischen einer Schwarzfärbung und dem Auftreten von *Alternaria* Toxinen bisher nicht weiter untersucht wurde. Stattdessen basieren alle bisherigen Studien hierzu rein auf optischer Beurteilung sowie Pilzisolierungen mittels Ausplattieren, bei welchen *Alternaria* spp. am häufigsten bzw. im Vergleich zu optisch unauffälligen Körnern in größeren Mengen von verfärbten Körnern isoliert werden konnte (Fernandez und Conner 2011; Toklu et al. 2008).

Im Gegensatz zu diesen Studien konnten andere Forscher keinen Zusammenhang zwischen Pilzbefall und Schwarzfärbung erkennen (Ellis et al. 1996; Jacobs und Rabie 1987; Conner und Davidson 1988; Williamson 1997), wodurch gezeigt wurde, dass auch andere Faktoren eine Kornverfärbung bewirken können. So kann bei bestimmten Wetterbedingungen eine dunkle Verfärbung durch biochemische Vorgänge im Korn verursacht werden, die eine enzymatische Bräunung auslösen können (Williamson 1997; Cochrane 1994). Dieser Reaktionsablauf ist bereits für mehrere Pflanzen bekannt und findet meist unter Stresseinfluss

statt. Der Prozess hierbei basiert auf der Oxidation von phenolischen Bestandteilen, welche braune oder schwarze Pigmente (Melanine) bilden (Walker und Ferrar 1998), und wird oftmals auch als „Sonnenbrand“ auf dem Korn beschrieben (Hess et al. 2011). Da diese Verfärbung nicht in Zusammenhang mit einem *Alternaria* spp. Befall steht, und somit auch keine Aussagen zum Mykotoxingehalt möglich sind, ist es denkbar, dass es sich bei dem hier untersuchten Avangard Malz um eine wetterbedingte Schwarzfärbung handeln könnte, bei der durch das Aussortieren der schwarzen Körner keine Mykotoxinreduktion bewirkt werden konnte.

Diese zwei verschiedenen Arten der Kornverfärbungen erklären zudem die widersprüchlichen Aussagen zum Auftreten der Schwarzfleckenkrankheit. So scheint es denkbar, dass das häufig beobachtete Auftreten einer Schwarzfärbung bei nassen und kühleren Temperaturen (Hudec und Muchova 2008; Toklu et al. 2008) durch *Alternaria* spp. ausgelöst werden könnte, wohingegen das vermehrte Auftreten bei trockenen klimatischen Verhältnissen (Logrieco et al. 2009) möglicherweise auf eine wetterbedingte Verfärbung hindeutet.

Die hier durchgeführten Brauversuche zeigten somit, dass eine Reduktion des Toxingehaltes durch Aussortieren schwarzer Körner wahrscheinlich nur dann möglich ist, wenn die Schwarzfärbung durch *Alternaria* spp. verursacht wurde. Anhand des Pilsener Malzes konnte in diesem Fall jedoch durch das Aussortieren der schwarzen Körner eine Reduktion des TeA Gehaltes um bis zu 170 % bewirkt werden, wodurch die optische Aussortierung als eine gute Möglichkeit zur Toxinkontrolle während des Brauens betrachtet werden kann. Auch wenn im Avangard Malz keine eindeutige Toxinreduktion gezeigt werden konnte, könnte die Verwendung eines optischen Sortiergerätes auch hier für die Malz- und Brauindustrie förderlich sein, da eine Kornverfärbung oftmals mit einem mikrobiologischen Befall assoziiert wird und eine Verschlechterung der Malzqualität bewirkt. Um hohe wirtschaftliche Einbußen durch Degradierung der Gerste oder des Malzes zu Tierfutter zu vermeiden (Walker et al. 2008; Li et al. 2003; Fernandez und Conner 2011), könnte der Einsatz solcher Sortiergeräte in der Praxis weiter erprobt werden. Trotzdem wird die *Alternaria* Analytik weiterhin eine große Rolle für die Qualitätssicherung spielen, da bereits mehrfach gezeigt wurde, dass auch optisch unauffällige Proben noch stark belastet sein können (Hanson und Christensen 1953; Conner und Davidson 1988; Williamson 1997; Roháčik und Hudec 2008; Toklu et al. 2008).

#### Bilanzierung der Toxine über den Brauprozess

Um eine möglichst homogene Verteilung der Mykotoxine zu erreichen, wurden die schwarzen und sauberen Körner zunächst unabhängig voneinander geschrotet und erst im Anschluss gemischt. Der Vergleich der verwendeten biologischen Replikate zeigte für die meisten Toxine ähnliche Toxingehalte, jedoch waren zum Teil auch größere Abweichungen zu erkennen. Dies



war insgesamt betrachtet zu erwarten, da eine vollständige Probenhomogenität sowie geringere Messunsicherheiten nur durch feines Mahlen erzielt werden können, sodass durch das vorherige Schrotten nicht alle Toxin Hotspots reduziert werden konnten (Prusova et al. 2021; Grusie et al. 2017; Yli-Mattila et al. 2017).

Für die Bilanzierung wurden folgende Prozessschritte untersucht: Schrot, Maische (Beginn und Ende), Treber, Pfannevollwürze, Ausschlagwürze, Heißtrub, Geläger und das finale Bier. Die während des Brauens eingesetzte Hefe sowie der zugegebene Hopfen wurden nicht separat analysiert, jedoch ist bei diesen beiden Zutaten keine Mykotoxinbelastung zu erwarten (Lancova et al. 2008). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass alle während des Brauprozesses detektierten Toxine aus dem verwendeten Schrot stammen.

Beim Vergleich der beiden eingesetzten Malze fiel als erstes deren unterschiedliche Mykotoxinvielfalt auf. Während im Pilsener Malz die Toxine AOH, AME, TeA, TEN, ALTP, ATX I sowie AOH-3-S, AOH-3-G und AME-3-S detektiert werden konnten, lagen in dem Avangard Malz lediglich TeA, AOH und vereinzelt AME, ATX I und ALTP vor. Die Toxine ATX II, ALT, AOH-9-G und AME-3-G wurden in keiner Probe nachgewiesen, was mit den Resultaten des Malzscreenings (siehe 3.7.1) vereinbar ist. Prusova et al. (2021) konnten in ihrem durchgeführten Brauversuch neben AOH, AME, TeA, TEN und AOH-S ebenfalls AME-S in mehreren Prozessschritten als in dieser Arbeit detektieren, sodass es möglich wäre, dass dieses Toxin aufgrund der im Vergleich zu den anderen modifizierten Toxinen höheren Nachweisgrenzen mit den hier verwendeten Methoden nicht immer nachweisbar war. Da Prusova et al. (2021) jedoch lediglich das Verhältnis von AME-S/AME und keine quantitativen Werte angegeben haben, ist eine Aussage zu erwarteten Mengen nicht direkt möglich.

Die Toxine AOH und TeA, welche in beiden Malzen und somit in allen 12 Brauansätzen nachweisbar waren, wiesen bei der Bilanzierung ähnliche Trends auf: beide Toxine zeigten einen geringen Anstieg während des Maischens, was auf eine Freisetzung dieser Toxine aus modifizierten Formen oder eine vorherige Bindung an z.B. Proteine hindeuten könnte. Im Avangard Malz konnte AOH im Schrot sowie während der Maische nur in Gehalten unter der Bestimmungsgrenze detektiert werden, jedoch ist auch hier aufgrund der höheren Konzentrationen im Treber ebenfalls eine Toxinfreisetzung während des Maischens anzunehmen. Eine Neusynthese dieser Toxine ist nicht realistisch, da *Alternaria* spp. zu diesem Zeitpunkt bereits durch die erhöhten Temperaturen inaktiviert sein sollte (Bottalico und Logrieco 1998). Nach dem Läutern ging in beiden Malzsorten der Hauptteil an TeA in die Würze über, sodass folglich nur geringe Mengen TeA im Treber nachgewiesen wurden. Bei AOH hingegen konnten aufgrund der geringeren Polarität lediglich 61 – 88 % in der Würze einzelner Sude gefunden werden, da der Großteil im Treber zurückblieb (182 – 384 %). Im

Pilsener Malz wurden zudem AME, TEN, ATX I, ALTP und AOH-3-S über den Brauprozess verfolgt. Für ALTP und ATX I zeigte sich hier zunächst eine Toxinreduktion während des Maischens, was auf potenzielle Modifizierungsreaktionen hindeuten könnte. Modifizierte Formen für ALTP und ATX I konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden, sind jedoch aufgrund mehrerer freier Hydroxylgruppen durchaus zu erwarten. Beide Toxine wurden nach der Maische komplett im Treber wiedergefunden, und konnten in keinem weiteren Prozessschritt detektiert werden. Ein hierzu ähnliches Verhalten zeigten TEN und AME, jedoch konnten geringe Anteile beider Toxine noch in der Würze einiger Sude detektiert werden, sodass ein potenzieller Übergang ins Bier bei höheren Konzentrationen denkbar wäre. Für AOH-3-S wurde ein deutlicher Anstieg von bis zu 1687 % während des Maischens beobachtet, jedoch wurden lediglich 189 % im Treber nachgewiesen. Der Verbleib der restlichen Menge ist unklar, da dieses Toxin in keinem weiteren Prozessschritt gefunden werden konnte. Weitere Metabolisierungsreaktion zu z.B. Disulfaten oder Sulfoglucosiden wären denkbar (Soukup et al. 2016), jedoch wäre auch eine erneute Rückbildung zu AOH möglich, was die erhöhten AOH Gehalte im Treber erklären könnte. Für AME konnte ebenfalls ein höherer Gehalt im Treber als in der Maische detektiert werden und auch hier wäre eine Rückbildung aus modifizierten Formen denkbar. Es wurden zwar in keinem Prozessschritt AME-3-G und nur vereinzelt AME-3-S in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze detektiert, jedoch ist deren Anwesenheit aufgrund der höheren Nachweisgrenzen ebenso möglich wie andere, nicht in der Methode enthaltene Modifikationen.

Bisher wurde lediglich eine weitere Studie zum Verhalten der *Alternaria* Toxine AOH, AME, TeA und TEN während des Brauens publiziert, in welcher die modifizierten Formen AOH-3-S und AME-3-S qualitativ als Verhältnis zu ihren jeweiligen Ursprungstoxinen angegeben wurden (Prusova et al. 2021). Somit ergänzt die hier durchgeführte Arbeit das Toxinverhalten während des Brauens um neun weitere *Alternaria* Toxine. In ihrer Studie konnten Prusova et al. (2021) einen partiellen Übergang der Toxine in die Würze beobachten, welche im Zusammenhang mit deren Polarität stand. Folglich konnten sie einen kompletten Übergang des sehr polaren Toxins TeA in die Würze demonstrieren, was mit den in dieser Studie erzielten Ergebnissen vereinbar ist, auch wenn hier 6 – 22 % des Ausgangsgehaltes im Treber zu finden waren. Auch für TEN waren die Ergebnisse vergleichbar: hier konnten Prusova et al. (2021) 87 % der Ausgangskonzentration in der Würze und geringe Konzentrationen im Treber wiederfinden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde TEN ebenfalls trotz der geringen Gesamtkonzentration in ähnlichen Anteilen in der Würze und im Treber detektiert. Für das unpolare AOH konnten 84 % im Treber nachgewiesen werden, und das unpolarste *Alternaria* Toxin AME schien nahezu komplett in den Treber überzugehen (Prusova et al. 2021). Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls in dieser Arbeit erzielt, da AME nur zum Teil in

der Würze noch in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze nachweisbar war. Abweichend zu Prusova et al. (2021) konnte jedoch nur in wenigen Suden ein Anstieg von AOH und AME während der Maische beobachtet werden.

Der in dieser Arbeit gemessene Anstieg von AOH-3-S während des Maischens wurde jedoch ebenfalls von Prusova et al. (2021) beobachtet. Als Erklärung hierfür nannten die Autoren eine Freisetzung von AOH und AOH-S aus anderen modifizierten Formen, wie z.B. AOH-(Sulfo)Glucosiden, deren Existenz bereits von Soukoup et al. (2016) in Pflanzen nachgewiesen wurden. Im weiteren Brauverlauf konnten Prusova et al. (2021) für TEN und TeA keine signifikanten Unterschiede mehr beobachten, wohingegen der AOH und AME Gehalt nach dem Würzekochen abnahm. Auch in dieser Arbeit konnten AOH und AME, jedoch auch TEN nach dem Würzekochen nicht mehr detektiert werden, was durch eine Adsorption dieser Toxine an die zugegebene Hefe oder deren sofortige Metabolisierung erklärt werden könnte (Prusova et al. 2021), wobei die gemessenen Gehalte des Gelägers in dieser Arbeit gering waren. Aufgrund der vermuteten Hitzestabilität von *Alternaria* Toxinen ist ein Toxinabbau während des Würzekochens nicht direkt zu erwarten, jedoch könnten durch Hitzeeinfluss Metabolisierungsreaktionen gefördert werden; beide Möglichkeiten müssten noch weiter untersucht werden. In dieser Arbeit lagen zudem zum Teil sehr geringe Konzentrationen (oft < BG) von AOH, AME und TEN vor, sodass die Abwesenheit dieser Toxine auch durch die bekannten Messunsicherheiten entstanden sein könnten. Die zum ersten Mal über den Brauprozess verfolgten Toxine ALTP und ATX I verhielten sich ähnlich zu AOH, was aufgrund der ähnlichen Polarität zu erwarten war. Beide Toxine konnten jedoch nicht in der Würze nachgewiesen werden, sodass ein nahezu vollständiger Übergang in den Treber anzunehmen ist.

Zusammenfassend zeigte sich eine deutliche Toxinreduktion während des Brauens, da der Großteil der *Alternaria* Toxine im Treber zu verbleiben scheint. Ähnliches wurde bei der Analytik von *Fusarium* Toxinen ebenfalls für Typ A Trichothecene sowie Enniatine beobachtet (Habler et al. 2017; Inoue et al. 2013), sodass die Verwendung des Trebers als Futtermittel kritisch betrachtet und Mykotoxingehalte regelmäßig überprüft werden sollten, da diese eine Gesundheitsrisiko für Tiere darstellen könnten. Das Toxin TeA war in den hier durchgeführten Brauversuchen das einzige Toxin, das in Anteilen von durchschnittlich  $41 \pm 16$  % im finalen Bier zu finden waren. Dies ist mit mehreren Studien, sowie der in dieser Arbeit durchgeführten Bieranalytik (siehe 3.7.5) vereinbar, bei denen TeA bereits vielfach in kommerziellen Bierproben nachgewiesen werden konnte (Prelle et al. 2013; Siegel et al. 2010b). Zusätzlich wurden in mehreren Bieren auch AOH und AME detektiert (Bauer et al. 2016; Prelle et al. 2013; Beccari et al. 2016), sodass davon auszugehen ist, dass diese beiden Toxine bei einer

hohen Belastung im Malz ebenfalls ins Bier übergehen können. Da beide Toxine in den hier verwendeten Malzen eher gering konzentriert vorlagen, konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden, jedoch deutet der Übergang beider Toxine in die Würze den potenziellen Übergang ins Bier an.

### 3.7.5 Analytik diverser nationaler und internationaler Biere

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in Scheibenzuber et al. (2021) publiziert.

#### 3.7.5.1 Screening diverser Biersorten

Um die Exposition von *Alternaria* Toxinen durch den Bierkonsum zu ermitteln, wurden 50 verschiedene Biere aus Supermärkten in und um Freising auf ihren Toxingehalt analysiert. Darunter waren 19 Lagerbiere, 11 Pils, sechs Bockbiere, vier Weißbiere, zwei Exportbiere sowie drei Craft-Biere und fünf internationale Biere. Alle Biere wurden analog 6.11.2 aufgearbeitet und mit der entwickelten LC-MS/MS Methode gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.28 und 3.29 dargestellt.

**Tabelle 3.28** Ergebnisse der analysierten Bierproben in µg/L, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung und Dreifachinjektion.

Biersorte	Alkoholgehalt [%vol]	Stammwürze[°P]	TeA [µg/L]
Pils (n = 11)	4,9	11,2	4,68 ± 0,37
	4,4	11,75	8,63 ± 1,01
	4,9	11,0	8,87 ± 0,43
	4,9	11,3	2,24 ± 0,16
	4,9	11,0	5,54 ± 0,46
	4,7	11,2	7,96 ± 0,62
	4,8	11,2	0,94 ± 0,05
	4,8	11,2	2,09 ± 0,09
	4,8	11,6	2,11 ± 0,23
	4,9	11,2	2,07 ± 0,28
	< 0,5	11,3	1,99 ± 0,08
Helles (n = 19)	5,1	11,7	3,27 ± 0,23
	4,9	11,7	3,09 ± 0,25
	4,9	11,5	2,34 ± 0,22
	5,1	11,8	12,2 ± 0,4
	5,2	11,5	5,34 ± 0,26
	4,9	11,0	6,24 ± 0,29
	5,4	12,0	3,24 ± 0,10
	5,9	13,5	7,74 ± 0,26
	4,7	11,5	4,60 ± 0,27
	5,6	12,0	7,74 ± 0,16
	4,9	11,2	0,93 ± 0,03
	5,6	13,3	8,34 ± 1,01
	4,9	11,0	9,87 ± 0,29
	5,6	12,6	11,6 ± 0,2
5,5	12,5	5,43 ± 0,50	
5,2	11,8	5,08 ± 0,22	
5,0	11,4	2,38 ± 0,17	
5,6	-*	7,07 ± 0,26	
5,1	12,5	2,42 ± 0,16	

(Fortsetzung Tabelle 3.28)

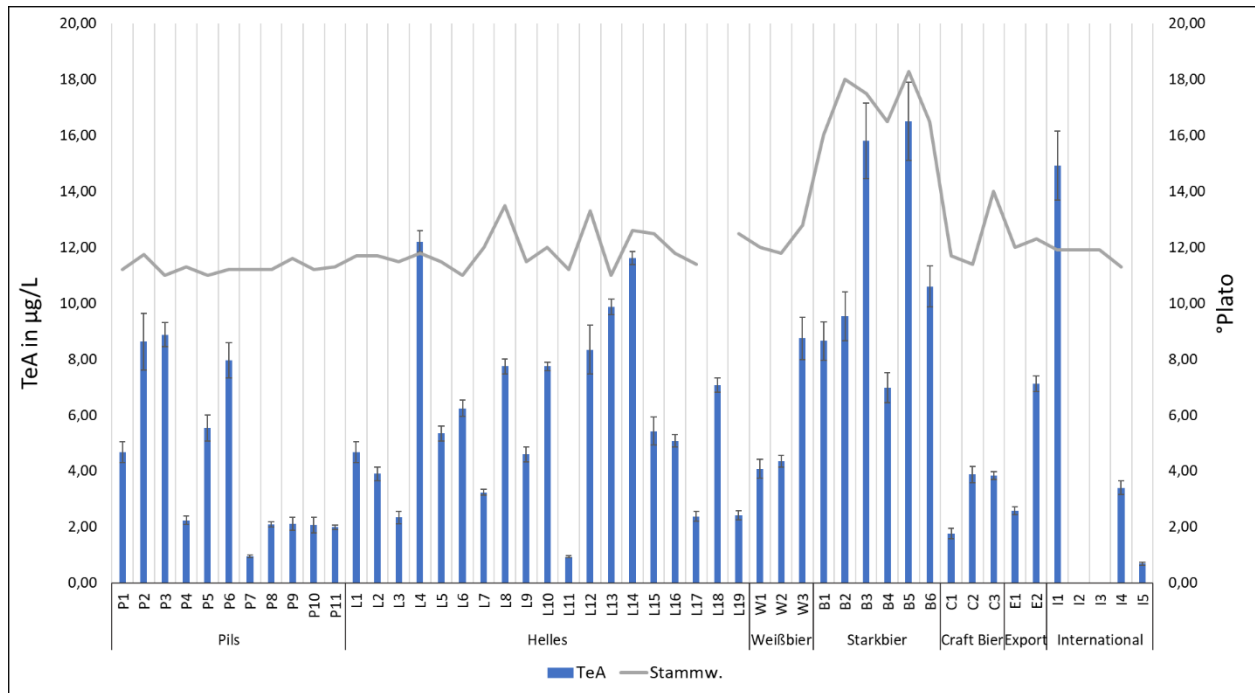
Biersorte	Alkoholgehalt [%vol]	Stammwürze[°P]	TeA [ $\mu\text{g/L}$ ]
Weißbier (n = 4)	5,4	12,0	4,08 $\pm$ 0,33
	5,4	12,8	2,04 $\pm$ 0,14
	5,0	11,8	4,35 $\pm$ 0,22
	5,2	12,8	8,74 $\pm$ 0,75
Starkbier (n = 6)	7,0	16,0	8,65 $\pm$ 0,69
	7,5	18	9,54 $\pm$ 0,87
	8,0	17,5	15,8 $\pm$ 1,4
	6,9	16,5	6,98 $\pm$ 0,53
	7,4	18,3	16,5 $\pm$ 2,2
	7,7	16,5	10,6 $\pm$ 7,7
Craft Bier (n = 3)	5,0	11,7	1,76 $\pm$ 0,18
	4,7	11,4	3,88 $\pm$ 0,29
	6,0	14,0	3,83 $\pm$ 0,14
Export Bier (n = 2)	5,6	12,0	2,58 $\pm$ 0,14
	5,2	12,3	7,12 $\pm$ 0,28
International (n = 5)	5,0	11,9	14,9 $\pm$ 1,2
	4,2	11,9	n.d.
	4,2	11,9	n.d.
	4,5	11,3	3,40 $\pm$ 0,25
	6,6	-*	0,69 $\pm$ 0,06

n.d. = nicht detektiert; \* = nicht verfügbar

**Tabelle 3.29** Ergebniszusammenfassung der Bieranalytik.

Biersorte	Probenanzahl	Proben mit	Durchschnittliche TeA	Maximale TeA
		TeA	Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]
Pils	11	11	4,28 $\pm$ 3,00	8,87 $\pm$ 0,43
Helles	19	19	5,82 $\pm$ 3,18	12,2 $\pm$ 0,4
Weißbier	4	4	5,72 $\pm$ 2,62	8,74 $\pm$ 0,75
Starkbier	6	6	11,4 $\pm$ 3,9	16,5 $\pm$ 2,2
Craft Bier	3	3	3,14 $\pm$ 1,24	3,88 $\pm$ 0,29
Export Bier	2	2	4,85 $\pm$ 3,21	7,12 $\pm$ 0,28
International	5	3	6,34 $\pm$ 7,56	3,40 $\pm$ 0,25

In 48 von 50 Bieren konnte lediglich Tenuazonsäure als einziges Toxin nachgewiesen werden, sodass insgesamt nur zwei der hier analysierten Proben toxfrei vorlagen. Alle erhaltenen Konzentrationen der TeA - Messungen lagen unter 20  $\mu\text{g/L}$  und auch ein Zusammenhang zwischen dem Stammwürzegehalt bzw. Alkoholgehalt und der Tenuazonsäure Konzentration war nicht eindeutig erkennbar (siehe Abbildung 3.57).



**Abbildung 3.57** Darstellung der TeA Konzentrationen und der jeweiligen Stammwürze.

### 3.7.5.2 Diskussion: Analytik diverser nationaler und internationaler Biere

Nur zwei der insgesamt 50 analysierten Bierproben enthielten keine Toxine, in den anderen 48 Bieren war lediglich Tenuazonsäure in Gehalten zwischen  $0,69 \pm 0,06 \mu\text{g/L}$  und  $16,5 \pm 1,4 \mu\text{g/L}$  zu finden.

Überraschend war, dass in keiner einzigen Bierprobe AOH gefunden werden konnte, da dieses Toxin durchaus schon häufiger in Bier nachgewiesen werden konnte (Bauer et al. 2016; Prella et al. 2013). Andere *Alternaria* Toxine wurden auch in vergangenen Studien kaum gefunden bzw. noch nicht in dieser Matrix analysiert (Prella et al. 2013). Die modifizierten *Alternaria* Toxine AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G sowie AOH-3-S und AME-3-S wurden im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in kommerziellen Bierproben analysiert, konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Wie bereits in vorigen Kapiteln untersucht, können diese modifizierten Formen durchaus während des Mälzungs- und Brauprozesses entstehen, werden diesen aber im weiteren Verlauf entzogen oder liegen im Endprodukt in so geringen Konzentrationen vor, dass sie nicht mehr nachweisbar sind. Ebenso wäre es denkbar, dass die Analyten erneut modifiziert werden und somit von der hier verwendeten Methode nicht erfasst werden konnten oder dass das zum Bierbrauen verwendete Malz generell nur geringfügig mit *Alternaria* Toxinen belastet war. Da die Biere alle im Frühjahr und Sommer 2019 erworben wurden, ist es naheliegend, dass viele davon aus 2018 geernteter Gerste gebraut wurden. Wie im Gersten- und Malzscreening (siehe 3.7.1) zu erkennen war, war die

Gesamtbelastung mit *Alternaria* Toxinen in diesem Erntejahr eher gering, was eventuell die Abwesenheit von AOH erklären könnte.

In der Studie von Prella et al. (2013) wurden AOH Konzentrationen zwischen 6,04 bis 23,2 µg/L in italienischen Bieren mittels ELISA ermittelt. Möglich wäre es hier ebenso, dass die AOH Belastung nicht aus der Gerste, sondern aus anderen Quellen stammte, da nur in Deutschland nach dem Reinheitsgebot gebraut wird und somit die italienischen Biere noch weitere Zutaten enthalten könnten. Allerdings wurden auch in der hier durchgeführten Studie ausländische Biere untersucht, in welchen ebenfalls kein AOH gefunden werden konnte, sodass diese Hypothese erneut nicht eindeutig bestätigt werden kann. In einer anderen Studie aus Deutschland wurden zwar nur geringere AOH Konzentrationen in Bier gefunden, dafür war dieses Toxin in jeder Probe nachweisbar (Bauer et al. 2016). Da sich die Nachweisgrenzen der dort verwendeten ELISA Methode kaum von den Validierungsdaten dieser Arbeit unterscheidet, wäre es möglich, dass das entsprechende Erntejahr den größten Einfluss auf die Toxinbelastung in Bier hat. Diese Hypothese wird von einer thailändischen Studie unterstützt, bei der im Jahr 2017 100 Biere analysiert und ähnliche Resultate zu den hier erhaltenen Ergebnissen erzielt wurden (Puangkham et al. 2017).

Die in dieser Studie ermittelten TeA Konzentrationen sind vergleichbar mit einer von Siegel et al. (2010b) durchgeführten Studie, welche sich auf TeA in Bier konzentrierte und bei der sich vor allem Starkbier als Biersorte mit höchstem Toxingehalt herauskristallisiert hatte. Dies wurde von den Autoren anhand des höheren Stammwürzegehaltes erklärt, was in dieser Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden konnte, da kein aussagekräftiger Zusammenhang zwischen dem Stammwürzegehalt und TeA Konzentration beobachtet werden konnte. Vielmehr scheint der Tenuazonsäuregehalt in Bier von dem Belastungsgrad des Ausgangsmaterials abhängig zu sein, sodass ein aus kaum belastetem Malz gebrautes Starkbier weniger TeA enthalten kann als ein Pils, welches mit einem höher belasteten Material gebraut wurde. Auch der Alkoholgehalt scheint keinen Einfluss auf die Toxinkonzentrationen zu haben, was ebenfalls von Siegel et al. (2010b) festgestellt wurde. Ein weiterer Unterschied zu dieser Studie ist, dass dort lediglich 40 % der Proben positiv getestet wurden, wohingegen in dieser Arbeit fast alle Proben TeA enthielten. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zurückzuführen, da diese bei Siegel et al. (2010b) mit einer Nachweisgrenze von 2 µg/L und einer Bestimmungsgrenze von 8 µg/L deutlich über den hier erzielten Werten lagen und somit niedrige TeA Gehalte nicht detektiert werden konnten.



Um das Gefahrenpotenzial bei Konsum dieser Proben abschätzen zu können, wurde der TTC Wert von Tenuazonsäure betrachtet, welcher aufgrund der fehlenden Mutagenität von TeA auf 1500 ng/kg/bw/Tag gesetzt wurde (EFSA 2011). Hieraus kann abhängig vom Körpergewicht ermittelt werden, wie hoch die maximale Tagesaufnahme an TeA sein darf; für einen Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht läge dieser Wert bei 105 µg TeA pro Tag. Konsumiert nun dieser Erwachsene das hier am stärksten belastete Bier (16,5 µg/L), müssten über einen längeren Zeitraum hinweg über 6,5 L Bier pro Tag getrunken werden, um den TTC Wert zu überschreiten. Aus dieser unrealistischen Menge kann geschlossen werden, dass die TeA Aufnahme durch Bierkonsum auch für Vieltrinker (>1 L/Tag) eher gering ist bzw. andere Stoffe, wie z.B. DON oder letztendlich der enthaltene Alkohol schwerwiegendere Schäden anrichten würden als die Tenuazonsäure. Generell ist jedoch zu beachten, dass Bierkonsum zur Gesamtexposition der TeA beitragen kann.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich zwei Methoden zur Analytik von insgesamt 13 *Alternaria* Mykotoxinen in Gerste und Bier mittels LC-MS/MS entwickelt werden. Die in die Methoden integrierten Toxine waren AOH, AME, ALT, ATX I, ATX II, ALTP und TEN, sowie die modifizierten Formen AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G. Das Toxin TeA konnte nicht in die Multimykotoxin Methode integriert werden und wurde in einer separaten Messung bestimmt.

Die fünf modifizierten *Alternaria* Toxine mussten zu Beginn der Arbeit zunächst in Reinform gewonnen werden, um diese in die LC-MS/MS Methode zu integrieren und eine Quantifizierung dieser Metabolite zu ermöglichen. Hierfür wurden für die Gewinnung von AOH-3-S und AME-3-S Sporen von *Alternaria* spp. auf Reismedium kultiviert und diese nach Homogenisierung und Extraktion der Matrix mittels Säulenchromatographie und semipräparativer HPLC-Messungen erfolgreich isoliert. Für die Gewinnung der drei Glucosidverbindungen wurde auf eine enzymatische Synthese zurückgegriffen, welche durch Biotransformation der Ausgangstoxine AOH und AME in *E. coli* Zellen gelang und somit eine gute Alternative zu einer bereits publizierten chemischen Volsynthese darstellte. Neben einer eindeutigen Identifizierung und Quantifizierung mittels <sup>1</sup>H-NMR, LC-MS sowie LC-MS/MS wurden für eine regelmäßige Konzentrationsbestimmung ebenfalls die molaren Extinktionskoeffizienten der neuen Standards ermittelt.

Zur Analytik der Gersten- und Bierproben wurde eine auf die jeweilige Matrix angepasste Probenaufarbeitung entwickelt. Die Messungen am LC-MS/MS wurden im negativen ESI Modus durchgeführt und dauerten inklusive Equilibrierungszeit 32 Minuten für die Multimykotoxinmethode und 24 Minuten für die Bestimmung der Tenuazonsäure. Die Quantifizierung erfolgte hierbei für AOH, AME und TeA anhand einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA), da hier die benötigten isotopenmarkierten Standards bereits aus vorangegangenen Arbeiten vorlagen. Für die Toxine ALTP, ATX I, ATX II, ALT, TEN, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G erfolgte die quantitative Bestimmung über eine externe Kalibriergerade des jeweiligen Toxins, für die eine toxinfreie Gerstenmatrix bzw. ein toxinfreies Bier verwendet wurden.

Die LC-MS/MS Methoden wurden für beide Probenmatrices sorgfältig validiert, indem die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, Wiederfindungen und Präzisionen ermittelt wurden. Da vor allem bei den niedrig konzentrierten *Alternaria* Toxinen die Homogenität der Proben eine wichtige Voraussetzung ist, wurde ebenfalls die für Gerste und Malz angewandte Probennahme auf ihre Eignung getestet. Für die Gerstenmatrix konnten hier

Nachweisgrenzen zwischen 0,05 µg/kg (AME) und 2,45 µg/kg (ALT), und Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0,16 µg/kg (AME) und 8,75 µg/kg (ALT) erzielt werden. Das Toxin ALT war hierbei am wenigstens empfindlich, was auf die Verwendung des negativen statt positiven ESI Modus zurückzuführen ist und zu Gunsten der Multimykotoxinmethode akzeptiert wurde. Für die noch selten berücksichtigten modifizierten Toxine konnten Nachweisgrenzen von unter 1 µg/kg erzielt werden, lediglich das Toxin AME-3-G zeigte eine geringere Sensitivität, wodurch die Nachweisgrenze bei 1,63 µg/kg lag. In der Biermatrix konnten durch Verwendung eines höheren Probenvolumens für alle Toxine außer ALT Nachweisgrenzen von unter 0,8 µg/L und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,09 µg/kg (AME) und 3,42 µg/kg (AME-3-S) erzielt werden; ALT zeigte auch hier aufgrund des verwendeten negativen ESI Modus mit 5,48 µg/L (NWG) und 16,24 µg/L (BG) die höchsten Werte auf. Die Wiederfindungsbestimmung ergab für beide Methoden Wiederfindungsraten im von Hädrich und Vogelgesang geforderten Rahmen von 70 – 120%, und auch die Präzisionen beider Methoden lagen bei maximal 5 % (Gerätepräzision) bzw. 10 % (intra- und inter Day Präzision).

Für die Ermittlung des aktuellen Status Quo der Belastung mit *Alternaria* Toxinen wurden insgesamt 56 Gerstenproben aus den Erntejahren 2016 – 2021 am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie vermälzt und in dieser Arbeit sowohl unvermälzt als auch vermälzt analysiert. In den Gerstenproben konnte in 51 der 56 Proben mindestens ein Toxin nachgewiesen werden, wobei die Konzentrationen meist in sehr geringen Konzentrationen und nahe an der Bestimmungsgrenze vorlagen. Das am häufigsten aufgetretene Toxin war hierbei TeA mit einem Maximalgehalt von 165 µg/kg, gefolgt von AOH (maximal 11,89 µg/kg µg/kg), AME (maximal 6,62 µg/kg µg/kg) und TEN (maximal 3,09 µg/kg). In den vermälzten Proben konnten in 55 der 56 Proben Toxine nachgewiesen werden, sodass von einer Toxinbildung während des Mälzens auszugehen ist. Insbesondere TeA konnte nach dem Mälzen in oft wesentlich höheren Konzentrationen bis zu 247 µg/kg gefunden werden. Auch die Toxine ATX I und ALTP konnten nun in 26 und 36 statt zuvor acht Proben detektiert werden, jedoch lagen hier die meisten Werte unter der Bestimmungsgrenze. Für AOH und AME wurde ebenfalls oft ein geringer Toxinanstieg beobachtet, und AOH-3-S war nun in drei, statt einer Probe zu finden. Der Anstieg von TeA, AOH, AME, ALTP und ATX I während des Mälzens wurde durch einen einseitig durchgeführten Paardifferenzentest ( $\alpha = 0,05$ ) bestätigt. Generell konnte die Belastung in Malz auch trotz des vermehrten Toxinvorkommens als unkritisch eingestuft werden. Die Toxine ALT, ATX II, AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G und AME-3-S konnten in keiner Gersten- oder Malzprobe nachgewiesen werden. Eine Analyse von unter gleichen Bedingungen angebauten Gerstenproben sechs verschiedener Standorte über vier Erntejahre hinweg zeigte zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Standorten

im Vorkommen sowie der Konzentration der *Alternaria* Toxine, welche voraussichtlich auf unterschiedliche klimatische Verhältnisse zurückzuführen sind. Über die vier Erntejahre hinweg waren jedoch noch keine eindeutigen Trends erkennbar.

Zur Untersuchung der Toxinbildung während der Lagerung von Gerste, wurden zwei verschiedene Gerstenmuster sowie eine Referenzprobe unter Variation der Parameter Temperatur (4°C, 12 °C), Wassergehalt (13-14%, 17-18%) sowie Belüftungsart (gut, schlecht) für acht Monate gelagert. Die Mykotoxinanalyse der gelagerten Gerste zeigte einen leichten Anstieg der Toxine nach 3 Monaten, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametern zu erkennen waren. Nach acht Monaten konnten in beiden Gerstenmustern oft weniger Toxine detektiert werden als nach drei Monaten, insbesondere bei AOH, AME und ALTP, sodass die Bildung anderer modifizierter Toxine möglich ist. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden, wodurch der Toxinabfall nach 8 Monaten aktuell noch nicht geklärt werden kann. Der gleiche Trend wurde ebenfalls in den vermälzten Proben des Lagerversuches beobachtet, jedoch lagen hier höhere Konzentrationen als in den unvermälzten Proben vor, was mit den vorherigen Ergebnissen des Gersten- und Malzscreenings übereinstimmte. Auch hier konnte kein großer Unterschied zwischen den verschiedenen Lagerbedingungen festgestellt werden, sodass diese vermutlich keinen größeren Einfluss auf das Mälzungsverhalten haben.

Zur weiteren Klärung der höheren Konzentrationen im Malz wurde ebenfalls der gesamte Mälzungsverlauf untersucht. Hierfür wurden zwei verschieden belastete Gerstenmuster nach MEBAK vermälzt, wobei im 24 Stunden Takt Proben für die Mykotoxinanalytik entnommen wurden. Hier konnte eine Toxinbildung ab Tag 3 beobachtet werden, welche jedoch im finalen Malz zum Teil in geringeren Mengen vorlagen oder nicht mehr detektiert werden konnten. Die gebildeten Toxine lagen hierbei erneut oft unter der Bestimmungsgrenze, sodass weiterhin unklar ist, ob der Toxinrückgang durch auf die Probenheterogenität bedingten Schwankungen oder auf weitere Modifizierungsreaktionen der Toxine zurückzuführen ist. Durch Variation der Mälzungsparameter konnte gezeigt werden, dass höhere Mälzungstemperaturen auch zu höheren Toxingehalten führen können. Ebenso wurde beobachtet, dass die Einführung einer dritten Nassweiche am Ende der Keimung eine zuverlässige Methode zur Reduktion der *Alternaria* Toxine darstellen würde, was jedoch in der Praxis aufgrund des daraus resultierenden zu hohen Feuchtigkeitsgrades der Körner nicht industriell anwendbar ist.

Beim Verfolgen der Toxine über den Brauprozess wurde beobachtet, dass die *Alternaria* Toxine AOH, AME, ALTP und ATX I fast vollständig über den Biertreber aus dem Brauprozess entfernt werden, wodurch TeA als einziges Toxin im finalen Bier zu finden war. Die modifizierten Toxine AOH-3-G und AME-3-S konnten ebenfalls in einigen Prozessschritten in

Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze detektiert werden, aber auch diese wurden nach dem Treber in keinem Prozessschritt mehr nachgewiesen. TeA konnte über den gesamten Brauprozess verfolgt werden, sodass neben einem Anstieg während der Maische auch in geringem Maße eine Reduktion des Toxingehaltes durch die Entfernung des Trebers, des Heißtrubs sowie des Gelägers beobachtet werden konnte. Insgesamt gesehen konnten  $41 \pm 16$  % der ursprünglich im Schrot enthaltenen Menge an TeA im finalen Bier gefunden werden. Die Verwendung unterschiedlicher Mischungen aus schwarzen und optisch unauffälligen Malzkörnern zeigte zudem, dass durch eine Entfernung der schwarzen Körner der Toxingehalt zum Teil reduziert werden kann, jedoch waren auch die Konzentrationen im aus 75% schwarzen Körnern gebrauten Bier sehr gering und somit unbedenklich, sodass in Deutschland aktuell keine Gefährdung durch *Alternaria* Toxine im Bier vorliegen sollte.

Um dies zu überprüfen, wurde die aktuelle Toxinbelastung in 50 kommerziell erhältlichen Bieren untersucht, bei welchen ebenfalls TeA als einziges Toxin detektiert werden konnte. Die Maximalkonzentration lag hierbei bei unter  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , wobei lediglich zwei Biere komplett toxinfrei vorlagen. Einen Zusammenhang zwischen Stammwürzegehalt und Toxinkonzentration konnte nicht beobachtet werden, obwohl zunächst davon ausgegangen wurde, dass Biere mit einem höheren Stammwürzegehalt auch eine höhere Toxinmenge enthalten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Alternaria* Toxine in Braugerste, Malz und im finalen Bier bisher in unkritischen Mengen auftreten und aktuell keine Gesundheitsgefährdung für den Konsumenten zu erwarten ist. Da die Mykotoxinbildung jedoch stark von klimatischen Bedingungen abhängig sein kann, sollte vor allem der Toxingehalt in Gerste regelmäßig überprüft werden, um hoch kontaminierte Ernten rechtzeitig zu erkennen und somit präventiv zu entfernen. Hierzu sollten auch weitere Tests zur Wirksamkeit der Aussortierung schwarzer Körner durchgeführt werden, da dieser Ansatz der Toxinreduktion einfach und ohne größere wirtschaftliche Verluste durchführbar wäre. Da während der Mälzungsvariationen ebenfalls große Erfolge zur Toxinreduktion mit Einführen einer dritten Nassweiche erzielt wurden, könnte zudem der Einsatz einer Waschschncke überprüft werden, welche im Gegensatz zur dritten Nassweiche auch industriell einsetzbar wäre. Allerdings ist es unklar, ob dieser Schritt zur Toxinreduktion beitragen kann, da diese in der Regel zu Beginn der Mälzung eingesetzt wird.

## 5. Abstract

Two LC-MS/MS methods were developed to analyze the *Alternaria* mycotoxins TeA, AOH, AME, ALT, ATX I, ATX II, ALTP und TEN, as well as the modified forms AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G and AME-3-G in barley and beer. The multi-mycotoxin method included all toxins except TeA, which was analyzed in a separate run.

At the beginning of this work, the five modified mycotoxins had to be synthesized or extracted as they were not available for purchase. Here, rice was inoculated with *Alternaria* spp., and after seven days, AOH-3-S and AME-3-S were extracted and isolated using column chromatography and semipreparative HPLC measurements. The three glucosides were enzymatically synthesized by using the toxins AOH and AME for a whole-cell biotransformation system in *E. coli* cells. All isolated toxins were identified and quantified with <sup>1</sup>H-NMR, LC-MS and LC-MS/MS measurements, and molar extinction coefficients were determined as well.

For the analysis of barley, malt and beer, the sample work up procedure was adapted to the respective matrix and to fit the needs for the new modified toxins. For AOH, AME and TeA, a SIDA was used for quantitation, whereas matrix-matched calibrations were used to quantify the other toxins. Methods for both matrices were intensely validated to determine the limits of detection and quantitation, the recovery rates, method precisions, and – for barley - the suitability of the applied sampling method as grain batches are known for their mycotoxin heterogeneity. For barley, LOD and LOQ values ranged between 0.05 µg/kg (AME) and 2.45 µg/kg (ALT), and between 0.16 µg/kg (AME) and 8.75 µg/kg (ALT), respectively. Lower values could be obtained for beer due to a higher sample volume and a lower matrix impact. Here, LODs were below 0.8 µg/kg for all toxins except ALT, and LOQs ranged between 0.09 µg/kg (AME) and 3.42 µg/kg (AME-3-S). With a LOD of 5.48 µg/L and a LOQ of 16.24 µg/L, ALT was the least sensitive toxin in this method, which was also the case in the barley method. Here, the use of the positive instead of the negative ESI mode could have delivered better results, however, for the benefit of the multimethod, the negative ESI mode was chosen. Recoveries of both methods were in the suggested range of 70 – 120 %, and precisions were below or equal 5 % (instrument precision) and 10 % (inter- and intra-day precisions).

In a barley and malt screening, 56 barley samples and their respective malts were analyzed using the developed methods. Here, 51 barley and 55 malt samples were contaminated with at least one *Alternaria* toxin, but concentrations were generally quite low and not critical for human consumption. In malt, TeA showed increased concentrations compared to barley,

which indicates a mycotoxin formation during malting, however, the malting process also seemed to benefit the formation of AOH, AME, ALTP and ATX I as well. The toxins ALT, ATX II, AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G and AME-3-S could not be detected in any sample.

During barley storage at different temperatures, moisture contents and aeration, a slight mycotoxin formation was observed after three months, whereas a decrease in mycotoxin concentration could often be observed after 8 months. Here, the procedures under which conditions the fungus focusses on growth or on mycotoxin production are not understood yet, and it is possible that further metabolization of toxins could be responsible for the lower concentrations after 8 months of storage. Also, the tested storage parameters did only slightly impact the mycotoxin concentrations in this experiment, and the same trends were observed in the malts of the stored barley samples.

A deeper look inside the malting process revealed mycotoxin formations during the germination phase, but also showed a reduction in concentration in the finished malt. As concentrations were often below the LOQ, this phenomenon might also be attributed to inter-sample variations, but further metabolization reactions are also possible. It was also shown that malting at elevated temperatures increases mycotoxin concentrations, and that the use of a third wet stand before kilning is in theory a convenient method to remove mycotoxins from the malt. However, as the green malt absorbs too much water during this step, it is no longer suitable for malt production, and hence cannot be used in industry.

During brewing, the detected *Alternaria* toxins AOH, AME, ALTP, ATX I, AOH-3-S and TEN seem to end up for the most part in the brewer's spent grains and not the beer, which makes TeA the main toxin to migrate through every step of the brewing process. Our experiments have also shown that a removal of black malt kernels might reduce the mycotoxin burden in the final beer, however, concentrations were always low and not critical for human consumption. An analysis of 50 commercial beers confirmed these results as TeA was the only toxin to be found here with maximum concentrations below 20 µg/kg. Therefore, *Alternaria* toxins seem to not be critical for German breweries at the moment, but higher concentrations should be expected due to the climate change, which makes regular barley screenings inevitable for quality control in the malt and brewing industries, especially as TeA concentrations might be regulated soon.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Chemikalien

#### 6.1.1 Referenzsubstanzen und isotoopenmarkierte Standards

In nachstehender Tabelle sind alle verwendeten Referenzsubstanzen mit der jeweiligen Abkürzung, ihrer Summenformel, ihrem Molekulargewicht und ihrer Herkunft aufgeführt. Die Analyten wurden entweder von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen, in vorangegangenen Arbeit aus Pilzextrakten isoliert oder im Rahmen dieser Arbeit selbst synthetisiert bzw. isoliert.

**Tabelle 6.1** Auflistung aller Referenzsubstanzen inklusive Summenformel, Molekulargewicht und Herkunft.

Name	Abkürzung	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Herkunft
Alternariol	AOH	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	258,05	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Alternariol monomethylether	AME	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272,07	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Tenuazonensäure	TeA	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	197,10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tentoxin	TEN	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	414,23	Merck, Darmstadt, Deutschland
Altenuen	ALT	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	292,10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Altertoxin I	ATX I	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	352,10	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Altertoxin II	ATX II	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	350,08	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Stemphytoxin III	STE III	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	348,06	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Alterperyleneol	ALTP	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	350,08	Lehrstuhl für Analytische Lebensmittelchemie, 2019
Alternariol-3-sulfat	AOH-3-S	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> SO <sub>8</sub>	338,01	Scheibenzuber et al. 2021
Alternariol monomethylether-3-sulfat	AME-3-S	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> SO <sub>8</sub>	352,03	Scheibenzuber et al. 2021
Alternariol-3-glucosid	AOH-3-G	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	420,11	Scheibenzuber et al. 2020
Alternariol-9-glucosid	AOH-9-G	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	420,11	Scheibenzuber et al. 2020
Alternariol monomethylether-3-glucosid	AME-3-G	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	434,12	Scheibenzuber et al. 2020



Die verwendeten isotopenmarkierten Standards sind in Tabelle 6.2 zusammen mit ihrem Molekulargewicht und ihrer Herkunft aufgezeigt. Alle Standards wurden im Rahmen vorangegangener Arbeiten synthetisiert (Asam et al. 2009; Asam et al. 2011b).

**Tabelle 6.2** Molekulargewicht und Herkunft der verwendeten stabilisotopenmarkierten Standards.

Isotopenmarkierter Standard	Molekulargewicht [g/mol]	Herkunft
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AOH	262,05	Asam et al. 2009
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AME	276,07	Asam et al. 2009
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N] - TeA	204,10	Asam et al. 2011b

### 6.1.2 Laborchemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6.3 aufgelistet.

**Tabelle 6.3** Verwendete Laborchemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril LC-MS grade	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Acetonitril HPLC grade	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ammoniak 25 % LC-MS grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumformiat, LC-MS grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cyclohexan	LGC Standards, Wesel, Deutschland
Dichlormethan	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Diethylether	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Methanol LC-MS grade	Honeywell, Morristown, USA
Methanol HPLC grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silicagel (Porengröße 60 Å, Mesh 70-230, Partikelgröße 63-200 µm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasser LC-MS grade	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Wasser HPLC grade	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

### 6.1.3 NMR Lösungsmittel

Für die quantitativen NMR-Messungen wurden folgende Lösungsmittel verwendet:

**Tabelle 6.4** NMR-Lösungsmittel.

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton-d <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Acetonitril-d <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol-d <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 6.2 Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborkleingeräte sind in Tabelle 6.5 aufgelistet.

**Tabelle 6.5** Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Advanced Vortex Mixer – ZX3	VELP Scientifica s.r.l., Usmate, Italien
Analysenwaage AX224	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Papierfilter, rund, Grade 1, 500 mm (Whatman Grade 1)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gefriertrocknung Christ-Alpha 1-2 LD Plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Getreidemühle Grindomix GM200	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Gewindeflasche (klar, 1,5 mL, ND8)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Gewindeflasche (klar, 4 mL, ND13)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Kolbenhubpipette 10, 100, 200, 1000 µL und 10 mL	Brand GMBH & Co. KG, Werthheim, Deutschland
Laborautoklav LaS-20	Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen, Deutschland
Magnetrührer IKA-RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Membranpumpe	Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

(Fortsetzung Tabelle 6.5)

Mikroeinsatz (Klarglas, für Gewindeflasche ND8)	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland
Nitril Einmalhandschuhe	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipette 7 mL, graduiert 3 mL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
pH/mV-Tischmessgerät Five Easy	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 10 mL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polycarbonat-Erlenmeyerkolben, 250 mL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Purosorb™ PAD600	Purolite, King of Prussia, Pennsylvania, USA
Reacti-Vap Verdampfer TS-18825	Thermo Fischer Scientifica Srl, Usmate, Italien
Rotationsverdampfer Hei-Vap Value	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schraubdeckel und Septum für Gewindeflaschen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schüttelwasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Soft-Ject® Einmalspritzen, 3 mL	Henke Sass Wolf GmbH, Grünwald, Deutschland
SPE-Kartusche Discovery® DSC-18, 500 mg, 6 mL	Sigma Aldrich, Bellefonte, PA, USA
Spritzenvorsatzfilter Chromafil Xtra PVDF, 13 mm; $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter Chromafil Xtra PVDF, 13 mm; $\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Sterilbank	Envair GmbH, Emmendingen, Deutschland

*(Fortsetzung Tabelle 6.5)*

Ultraschallbad	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Umlaufkühler Microcool MC 600	Lauda Dr. R. Wobser GMBH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Universalschüttler SM-30	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland
Vakuumpumpe CVC3000	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Sigma 2K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 mL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

---

### 6.3 Herstellung der Standardlösungen

Lösen der Analyten in MeOH (AOH, AME, TeA, AOH-3-S, AME-3-S) bzw. in ACN (ATX I, ATX II, ALTP, ALT, TEN, AOH-3-G, AOH-9-G, AME-3-G) und alle Lösungen bis auf AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G bei  $-18\text{ °C}$  lagern. Glucoside im Kühlschrank bei  $+6\text{ °C}$  lagern. Isotopenmarkierte Standards in MeOH lösen und ebenfalls bei  $-18\text{ °C}$  lagern. Herstellen einer Verdünnungsreihe für jedes Toxin zur Verwendung als Arbeitslösung (10  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , 0,001  $\mu\text{g/mL}$ ). Isotopenmarkierte Standards auf 10  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,1  $\mu\text{g/mL}$  und ggf. 0,01  $\mu\text{g/mL}$  ( $[^2\text{H}_4]$  – AME) verdünnen.

### 6.4 Stabilitätstests der Standards

Herstellen von jeweils 12 mL Standard der Konzentration 5  $\mu\text{g/mL}$  für AOH, AME, ALTP, ATX I, ATX II, TEN, APML und AOH-3-G. Abfüllen in vier 4 mL Klarglasvials pro Toxin und Lagerung von jeweils zwei Vials eines jeden Toxins bei  $-18\text{ °C}$  und  $+6\text{ °C}$ . Zum Zeitpunkt der Messung Standards auf Raumtemperatur erwärmen, vortexen und in Doppelbestimmung 150  $\mu\text{L}$  in Quarzglasküvetten überführen. Das UV-/Vis Photometer anschalten, die gewünschte Wellenlänge einstellen und Lampe mindestens 10 Minuten einbrennen lassen. Messung der Toxine in Triplikaten an ihrem Absorptionsmaximum unter Abzug des entsprechenden Lösungsmittel-Blanks, sodass für jedes Toxin sechs Werte erhalten werden. Überführen des Standards aus den Küvetten in ein HPLC-Vial mit Insert und Messung an HPLC (siehe 6.5.2). Mehrfaches Spülen der Küvetten mit Methanol und Trocknen unter Stickstoffstrom. Die Datenauswertung der HPLC-Messung erfolgte mit LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japan), für die Konzentrationsberechnung der Photometermessungen wurden die zuvor bestimmten Extinktionskoeffizienten verwendet (siehe Tabelle 3.6.)

## 6.5 Messgeräte und -methoden

### 6.5.1 Semi-präparative HPLC-UV

**Tabelle 6.6** Bestandteile der semi-präparativen HPLC-UV

Degasser	DG-4400, DEGASSEX, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Pumpe	LaChrom L-7100, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., San Jose, CA, USA
Interface	LaChrom D-7000, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., San Jose, CA, USA
Autosampler	LaChrom L-7200, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., San Jose, CA, USA
UV-Detektor	LaChrom L-7400, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., San Jose, CA, USA

#### 6.5.1.1 Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S

**Tabelle 6.7** Messparameter zur Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S an der semi-präparativen HPLC.

HPLC Säule	Pro-Pack C18, 150x10.0 mm, S-5 µm, 12 nm, YMC, YMC Europe GmbH, Dienslaken, Germany	
	<i>Trennung AOH-3-S und AME-3-S</i>	<i>Aufreinigung AOH-3-S</i>
Mobile Phase A	Ammoniumformiat, 5 mM (in Wasser)	Ammoniumformiat, 5 mM (in Wasser)
Mobile Phase B	Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure	Methanol mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,9 mL/min	0,9 mL/min
Gradient	20 % B für 5 min Auf 65 % B in 20 min 1 min halten Auf 90 % B in 1 min 13 min halten In 3 min auf 20 % B 8 min halten	50 % B für 5 min Auf 90 % B in 10 min 10 min halten Auf 50 % B in 3 min 12 min halten
Ofentemperatur	-	-
Wellenlänge	254 nm	254 nm
Injektionsvolumen	50 µL	100 µL

### 6.5.1.2 Isolierung und Aufreinigung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G

**Tabelle 6.8** Methode 1 zur Trennung der AOH-Gluoside von AME-3-Glucosid.

HPLC Säule	Pro-Pack C18, 150x10.0 mm, S-5 µm, 12 nm, YMC, YMC Europe GmbH, Dienslaken, Germany
Mobile Phase A	Wasser
Mobile Phase B	Acetonitril
Flussrate	1 mL/min
Gradient	10 % B für 3 min Auf 100 % B in 20 min 2 min halten Auf 10 % B in 5 min 5 min halten
Ofentemperatur	-
Injektionsvolumen	50 µL
Software	HPLC System Manager, LaChrom, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., USA, Version 4.1

**Tabelle 6.9** Aufreinigung von AME-3-G und Trennung von AOH-3-G und AOH-9-G (Methode 2).

HPLC Säule	Pro-Pack C18, 150x10.0 mm, S-5 µm, 12 nm, YMC, YMC Europe GmbH, Dienslaken, Germany
Mobile Phase A	Wasser
Mobile Phase B	Methanol
Flussrate	0,8 mL/min
Gradient	50 % B für 5 min Auf 65 % B in 2 min 12 min halten Auf 100 % B in 2 min 3 min halten Auf 50 % B in 3 min 5 min halten
Ofentemperatur	-
Injektionsvolumen	50 µL
Software	HPLC System Manager, LaChrom, Merck, Germany, in cooperation with Hitachi Instruments Inc., USA, Version 4.1

### 6.5.2 Analytische HPLC-UV

**Tabelle 6.10** Bestandteile der analytischen HPLC-UV.

Degasser	DGU-20A3R, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Pumpe	LC-20AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Autosampler	SIL-20A HT, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Communication Bus Module	CBM-20A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Säulenofen	Column-Thermostat Jetstream 2 Plus, DURATECH Analysentechnik GmbH, Hockenheim, Deutschland
Diode Array Detector	SPD-M20A, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan

#### 6.5.2.1 Matrixüberprüfung während der Methodenentwicklung

**Tabelle 6.11** Messparameter zur Matrixüberprüfung der Proben an der analytischen HPLC-UV.

HPLC Säule	Hyperclone 3 µm BDS C18, 150 x 3,20 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
Mobile Phase A	H <sub>2</sub> O
Mobile Phase B	ACN
Flussrate	150 µL/min
Gradient	10 % B für 3 min Auf 100 % B in 19 min 1 min halten Auf 10 % B in 2 min 5 min halten
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL



### 6.5.2.2 Stabilitätstests

**Tabelle 6.12** Messparameter zur Messung der Stabilitätstests an der analytischen HPLC-UV.

HPLC Säule	Hyperclone 5u ODS (C18) 120 A 250 x 3,2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
Mobile Phase A	H <sub>2</sub> O
Mobile Phase B	ACN
Flussrate	400 µL/min
Gradient	10 % B für 5 min Auf 100 % B in 20 min 3 min halten Auf 10 % B in 2 min 10 min halten
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL

### 6.5.2.3 Quantifizierung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G

**Tabelle 6.13** Messparameter zur Quantifizierung von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G an der analytischen HPLC-UV.

HPLC Säule	Hyperclone 3 µm BDS C18, 150 x 3,20 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
Mobile Phase A	H <sub>2</sub> O
Mobile Phase B	MeOH
Flussrate	200 µL/min
Gradient	50 % B für 5 min Auf 65 % B in 8 min Auf 100 % B in 2 min 2 min halten Auf 50 % B in 2 min 6 min halten
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL

### 6.5.3 LC-(ESI)-MS/MS

**Tabelle 6.14** Bestandteile des LC-(ESI)-MS/MS.

Degasser	DGU-20A5R, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Liquid Chromatograph	LC-30AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Autosampler	SIL-30AC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Communication Bus Module	CBM-20A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Säulenofen	CTO-20AC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Detektion	LCMS-8050 Triple Quadrupol MS Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Diode Array Detector	SPD-M30A, Shimadzu Corporation, Kyoto Japan

**Tabelle 6.15** MS Parameter.

Analyten	<i>Alternaria</i> -Toxine, Tenuazonsäure
Ionenquelle	ESI
Modus	negativ
Vernebelungsgasstrom	3 L pro Minute
Heizgasstrom	10 L pro Minute
Interfacetemperatur	300 °C
DL Temperatur	250 °C
Heizblocktemperatur	400 °C
Trockengasstrom	10 L pro Minute

**Tabelle 6.16** Verwendete Massenübergänge und Geräteeinstellungen.

<b>Analyt</b>	<b>Massen- übergang</b>	<b>ESI +/-</b>	<b>m/z [Da] Masse Q1 → Q3</b>	<b>Q1 [V]</b>	<b>CE [V]</b>	<b>Q3 [V]</b>
AOH	1	-	256,90 → 213,15	18	23	20
	2	-	256,90 → 212,10	48	29	38
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AOH	1	-	260,90 → 217,15	18	23	20
	2	-	260,90 → 216,10	48	29	38
AME	1	-	271,10 → 256,10	20	23	24
	2	-	271,10 → 255,10	20	31	24
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] - AME	1	-	275,10 → 260,10	20	23	24
	2	-	275,10 → 259,10	20	31	24
ALT	1	-	291,10 → 203,20	30	35	18
	2	-	291,10 → 248,15	24	27	14
ALTP	1	-	349,10 → 261,20	26	30	26
	2	-	349,10 → 303,20	26	22	18
ATX I	1	-	351,10 → 315,15	26	18	18
	2	-	351,10 → 297,15	26	28	18
ATX II	1	-	349,10 → 313,20	16	18	20
	2	-	349,10 → 330,15	26	26	18
APML	1	-	471,15 → 349,20	22	17	22
	2	-	471,15 → 331,20	22	28	20
STE III	1	-	347,10 → 329,15	12	20	20
	2	-	347,10 → 301,10	16	35	30
TEN	1	-	413,40 → 141,05	14	23	12
	2	-	413,40 → 214,25	14	26	20
TeA	1	-	196,30 → 139,00	14	22	11
	2	-	196,30 → 112,05	22	26	20
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N] - TeA	1	-	203,25 → 142,00	14	22	11
	2	-	203,25 → 113,05	22	26	20
AOH-3-S	1	-	337,00 → 257,15	24	26	26
	2	-	337,10 → 213,15	24	39	20
AOH-3-G	1	-	419,10 → 256,15	30	33	26
	2	-	419,10 → 228,20	30	45	12
AOH-9-G	1	-	419,10 → 283,30	12	30	32
	2	-	419,10 → 256,15	18	35	28
AME-3-S	1	-	351,20 → 271,20	12	23	26
	2	-	351,20 → 256,15	12	35	24
AME-3-G	1	-	433,00 → 270,20	16	33	18
	2	-	433,00 → 227,10	12	54	20

### 6.5.3.1 Multimykotoxinanalytik von *Alternaria* Toxinen

**Tabelle 6.17** Messparameter zur Messung der *Alternaria* Toxine am LC-MS/MS.

Trennsäule	Hyperclone 3 µm BDS C18, 150 x 3,20 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
Mobile Phase A	H <sub>2</sub> O
Mobile Phase B	ACN
Flussrate	300 µL/min
Gradient	10 % B für 2 min Auf 18 % B in 0,5 min 8 min halten Auf 40 % B in 3,5 min 6 min halten Auf 100 % B in 3 min 2 min halten Auf 10 % B in 2 min 5 min halten
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL

### 6.5.3.2 Analytik von Tenuazonsäure

**Tabelle 6.18** Messparameter zur Messung von Tenuazonsäure am LC-MS/MS.

Trennsäule	Gemini-NX 3 µm C18 110 Å, 150 x 4,60 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
Mobile Phase A	5 mM NH <sub>4</sub> COOH (pH 9, mit NH <sub>3</sub> )
Mobile Phase B	MeOH
Flussrate	500 µL/min
Gradient	5 % B für 3 min Auf 100 % B in 5 min 2 min halten Auf 5 % B in 3 min 10 min halten
Ofentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µL

### 6.5.4 LC-MS Q-TOF

**Tabelle 6.19** Gerätebestandteile und Einstellungen LC-MS QTOF.

Degasser	DGU-405, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Pumpe	LC-40D X3, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Liquid Chromatograph	Nexera LC-40, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Autosampler	SIL-40C X3, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
System Controller	SCL-40, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Säulenofen	CTO-40C, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Detektion	LCMS-9030 QTOF
Vernebelungsgasstrom	3 L pro Minute
Heizgasstrom	10 L pro Minute
Trockengasstrom	10 L pro Minute
Interface Temperatur	300 °C
Heizblocktemperatur	400 °C
DL Temperatur	250 °C
Interface Spannung	4 kV

Scans wurden im negativen ESI Modus mit Ionenakkumulation (ID: off) durchgeführt, indem 1 – 4 µL der Standardlösung injiziert wurden. Als Fließmittel wurden ACN und Wasser (70/30, v/v) verwendet, die Scans erfolgten bei einem isokratischen Fluss von 0,3 mL/min. Die externe Massenkalisierung wurde mittels Natriumiodid durchgeführt.

### 6.5.5 NMR-Messungen

Die Messung der NMR-Spektrensätze wurde an einem Bruker AV III System (500 MHz, Bruker, Rheinstetten, Deutschland) am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München durchgeführt. Die Substanzen in ein qNMR Röhrchen überführen, Lösungsmittel abdampfen und erneut in exakt 600 µL deuteriertem Lösungsmittel lösen. Bei NMR-Messung auf das jeweilige Lösungsmittel kalibrieren und über den externen Standard L-Tyrosin quantifizieren. Die Datenauswertung erfolgte mit TopSpin Software 3.2 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) bzw. mit MestReNova Software 10.0 (Mestrelab Research, La Coruña, Spanien).

## 6.6 Isolierung von AOH-3-Sulfat und AME-3-Sulfat aus Kulturen von *A. alternata*

### 6.6.1 Inokulation von Reis mit *A. alternata*

Einwiegen von je 25 g Reis (Parboiled) in 30 Polycarbonat Erlenmeyerkolben. Hinzufügen von 15 mL Wasser und autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten. Beimpfen der Kolben mit 25 µL Sporenlösung. Zur Herstellung der Sporenlösung 3 mL einer Waschlösung (0,5 % Tween 20) auf eine mit dem *A. alternata* Isolat bewachsenen Agarplatte (Lehrstuhl für Phytopathologie, Technische Universität München) geben und Pilzmycel vorsichtig abkratzen. Sporenanzahl unter Verwendung einer Thoma-Kammer auszählen und Lösung auf  $1,25 \cdot 10^6$  Sporen/mL verdünnen (Leslie 2006). Beimpfte Kolben bei 26 °C im Schüttelwasserbad (110 rpm) für sieben Tage im Dunkeln bei einer täglichen Belichtungsdauer von 30 Minuten kultivieren.

### 6.6.2 Extraktion und Isolierung von AOH-3-S und AME-3-S

Homogenisieren des bewachsenen Reises in einem Mixer. Insgesamt dreimal mit einem Liter Ethylacetat/Methanol (1/1; v/v) für eine Stunde bei 250 rpm auf dem Horizontalschüttler extrahieren. Suspension dekantieren, Überstände vereinen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 30 °C entfernen. Glassäule mit Silicagel füllen (125 g, Mesh 70-230, Porengröße 60 Å, Partikelgröße 63 – 200 µm, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und mit Dichlormethan/Methanol (9/1; v/v) equilibrieren. Für die „Dry-load“ Technik den Rückstand in 400 mL Dichlormethan/Methanol (1/1; v/v) aufnehmen, 20 g Silicagel zugeben und Lösungsmittel am Rotationsdampfer bei 30 °C entfernen. Das mit der Probe beladene Silicagel gleichmäßig auf die Säule geben und die Analyten mit einem Lösungsmittelgradienten aus je 200 mL Dichlormethan/Methanol (9/1, 7/1, 3/1, 1/1, 1/3, 0/7, v/v) eluieren. Fraktionen à 50 mL in Zentrifugenröhrchen sammeln und jede Fraktion am LC-MS/MS auf Sulfate testen. Alle Fraktionen mit den Sulfaten vereinen und analog zur ersten Säulen chromatographie über eine zweite, neue Silica Säule (125 g) aufreinigen. Fraktionen am LC-MS/MS messen, sulfathaltige Proben vereinen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (30 °C) entfernen. Rückstand in 10 mL Methanol lösen und in mehrere HPLC Klarglasvials membranfiltrieren (0,22 µm).

Für die Isolierung mittels semi-präparativer HPLC Rückstand aufgrund der hohen Toxinkonzentration erneut 1:4 mit Methanol verdünnen und mit HPLC-UV präparativ messen (siehe 6.5.1.1). Zur Identifizierung einzelne Peaks sammeln und am LC-MS/MS messen (siehe 6.5.3).

Fraktion mit AOH-3-S abrotieren, erneut in 2 mL Methanol lösen und mit HPLC-UV präparativ aufreinigen (siehe 6.5.1.2).

Die Lösungsmittel beider Fraktionen am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen und Rückstand bis zur NMR-Messung bei + 8 °C lagern.

### 6.6.3 qNMR der Sulfate

AOH-3-S und AME-3-S in NMR Röhrchen überführen, unter Stickstoff trocknen und für mindestens eine Stunde an der Schlenkline unter Vakuum trocknen. Aufnahme in 600 µL Methanol-d<sub>6</sub>. Messung der <sup>1</sup>H-NMR Spektren am 400 Hz NMR (siehe 6.5.5).

### 6.6.4 Spektroskopische Charakterisierung von AOH-3-S und AME-3-S

100 µL einer 1 µg/mL Lösung in eine Quarzglasküvette pipettieren und am Photometer im Scan Modus die Absorptionsmaxima bestimmen. Als Blank Methanol verwenden.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten Standard in drei verschiedenen Konzentrationen am Photometer am jeweiligen Absorptionsmaximum vermessen. Von jeder Konzentrationsstufe je 100 µL in drei Quarzglasküvetten pipettieren und dreifach am Photometer vermessen. 100 µL Methanol als Blank verwenden. Konzentrationen so wählen, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 liegt, siehe Tabelle 6.20. Extinktionskoeffizienten über folgende Formel berechnen:

$$E = \varepsilon \times c \times d \quad (1)$$

Mit

E = Extinktion

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration [g/L]

d = Durchmesser [cm]

Umstellen der Formel zu:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \times d} \quad (2)$$

Extinktionskoeffizient durch Mittelwertbildung aller 27 Werte berechnen.

**Tabelle 6.20** Toxinkonzentrationen zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der modifizierten Toxine AOH-3-S und AME-3-S.

	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
AOH-3-S	1 µg/mL	2,5 µg/mL	5 µg/mL
AME-3-S	1 µg/mL	2,5 µg/mL	5 µg/mL

## 6.7 Enzymatische Synthese von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G

### 6.7.1 Herstellung des Pilzextraktes

Inokulation von Reis mit *A. alternata* und Extraktion der Toxine analog Punkt 6.6.1 und 6.6.2. Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (40 °C) und Aufnahme in 10 mL Methanol. Bis zur Verwendung im Kühlschrank lagern.

### 6.7.2 Enzymscreening

Das Enzymscreening wurde von der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe (Technische Universität München) durchgeführt. Durchführung des Screenings wie von Effenberger et al. (2019) beschrieben. AOH und AME in Form des Pilzextraktes in einer geschätzten Konzentration von 1 mg/L AOH und 0,2 mg/L AME einsetzen und die Glucosidbildung mit LC-MS/MS Scans im negativen ESI Modus verfolgen. Für die Bestimmung der relativen Biotransformation in extrahierten Ionenchromatogrammen verwenden von  $m/z$  419 für beide AOH-Glucoside ( $[M-H]^-$ ) sowie  $m/z$  479 für AME-Glucosid (Formataddukt,  $[M-H]^-$ ).

### 6.7.3 Biotransformation

Die Biotransformation wurde von der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe (Technische Universität München) durchgeführt. Starten der Biotransformation in 400 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Kulturmedium (Effenberger et al. 2019). Induzieren der UDP-Expression durch Zugabe von 0,2 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (OD600 1.5) und starten der Biotransformation durch Zugabe der Substrate (je 288 µg AOH und 150 µg AME, sowie Pilzextrakt analog 6.7.2). Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 18 °C Bakterienzellen durch Zentrifugation abtrennen. Überstand sterilfiltrieren (Polyether Sulfon Membranfilter 0,22 µm) und für die weitere Isolierung verwenden.

### 6.7.4 Isolierung der Glucoside nach der Biotransformation

Zugabe von je 70 – 80 g des Festphasensorbens Purosorb™ PAD600 zu den steril gefilterten Überständen. Über Nacht auf dem Horizontalschüttler bei 250 rpm inkubieren und die Suspension mit einem Büchi-Trichter vakuumfiltrieren. Festphase mit fünf Volumina (ca.



150 mL) Wasser waschen, um Zucker zu entfernen, dann die gebildeten Toxine mit Methanol eluieren (ca. 800 mL). Methanol am Rotationsverdampfer bei 30 °C entfernen und für die weitere Aufreinigung in 10 mL ACN/Wasser (1:1; v/v) aufnehmen. Alle Fraktionen (Filtrat, Waschschritte, Eluat) getrennt sammeln und am LC-MS/MS auf Glucoside testen. Falls Glucoside neben dem Eluat auch in anderen Fraktionen gefunden werden, diese vereinen und Prozedur wiederholen.

### 6.7.5 qNMR der Glucoside

AOH-3-G und AOH-9-G in NMR Röhrchen überführen, unter Stickstoff trocknen und für mindestens eine Stunde an der Schlenkline unter Vakuum trocknen. Aufnahme in 600 µL Acetonitril-d<sub>4</sub>. Messung der <sup>1</sup>H-NMR Spektren am nach 6.5.5.

### 6.7.6 Quantifizierung an der HPLC-UV

Für die externe Kalibrierung Referenzstandards von AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G analog 6.5.2.3 an der HPLC-UV bei 254 nm messen (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL). Isolierte Glucoside ebenfalls messen und gegebenenfalls verdünnen, um im Kalibrierbereich zu liegen. Peakflächen mit der LabSolutions Software (Shimadzu, Kyoto, Japan) auswerten und Konzentrationen über 3-Punkt Kalibrierung berechnen.

### 6.7.7 Spektroskopische Charakterisierung der modifizierten Toxine

100 µL einer 1 µg/mL Lösung in eine Quarzglasküvette pipettieren und am Photometer im Scan Modus die Absorptionsmaxima bestimmen. Als Blank Acetonitril verwenden.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten Standard in drei verschiedenen Konzentrationen am Photometer am jeweiligen Absorptionsmaximum vermessen. Von jeder Konzentrationsstufe je 100 µL in drei Quarzglasküvetten pipettieren und dreifach am Photometer vermessen. 100 µL Acetonitril als Blank verwenden. Konzentrationen so wählen, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 liegt, siehe Tabelle 6.21. Extinktionskoeffizienten analog 6.6.4 berechnen (Formel 2) und Mittelwert aller 27 Werte bilden.

**Tabelle 6.21** Toxinkonzentrationen zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der modifizierten Toxine AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G.

	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
AOH-3-G	1 µg/mL	2,5 µg/mL	5 µg/mL
AOH-9-G	1 µg/mL	2,5 µg/mL	5 µg/mL

## 6.8 Methodenentwicklung LC-MS/MS

Scannen der einzelnen Analyten in den Konzentrationen 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL bzw. 1 µg/mL am LC-MS/MS und für das Tuning Konzentration wählen, bei der ein gutes Signal erzeugt wird. Von den vom Gerät ermittelten MS/MS-Fragmentierungen die zwei empfindlichsten und reproduzierbarsten Massenübergänge wählen und den mit der höheren Intensität als „Quantifier“ für die Quantifizierung und den anderen zur eindeutigen Identifizierung des Analyten als „Qualifier“ verwenden. Für die chromatographische Trennung der Analyten (außer TeA) zunächst Testen verschiedener Säulen und Fließmittelkombinationen (siehe Tabelle 6.22). Beste Kombination für die Optimierung der Fließmittelgeschwindigkeit, Ofentemperatur und Gradient

**Tabelle 6.22** Getestete Parameter für die Chromatographische Trennung der Analyten am LC-MS/MS.

Säulen	Hyperclone C18 Gemini NX YMC C18	
Fließmittelkombinationen	A: H <sub>2</sub> O A: H <sub>2</sub> O A: 0,1% Ameisensäure in H <sub>2</sub> O A: 0,1% Ameisensäure in H <sub>2</sub> O A: Ammoniumformiat (5mM) A: Ammoniumformiat (5mM, pH 9) A: H <sub>2</sub> O (pH 5.5 mit Ameisensäure)	B: ACN B: MeOH B: 0,1% Ameisensäure in ACN B: 0,1% Ameisensäure in MeOH B: MeOH B: MeOH B: ACN
Startbedingungen	10 % Fließmittel B 15 % Fließmittel B 20 % Fließmittel B 30 % Fließmittel B	
Fließmittelgeschwindigkeit	0,15 mL/min 0,2 mL/min 0,3 mL/min 0,4 mL/min	
Ofentemperatur	30 °C 40 °C	
Gesamtdauer	25,5 min 27 min 29 min 30 min 32 min	
Gradient	- Lineare Gradienten mit variierender Steigung (je 3 – 5 Minuten Equilibrierungszeit zu Beginn und Ende) - Stufengradient (je 3 – 5 Minuten Equilibrierungszeit zu Beginn und Ende)	

## 6.9 Kalibrierung der LC-MS/MS Methoden

### 6.9.1 Responsegeraden

Zur Herstellung der Responsegeraden von AOH, AME und TeA Analyt und isotopenmarkierten Standard in verschiedenen Konzentrationen analog Tabelle 6.23 – 6.25 mischen, im Stickstoffstrom trocknen und in 100  $\mu\text{L}$  ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (3/7, v/v) aufnehmen. Am LC-MS/MS in Dreifachbestimmung messen, obere Punkte gegebenenfalls 1/10 bzw. 1/20 verdünnen, um Detektorsättigung zu vermeiden.

**Tabelle 6.23** Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von AOH mit [ $^2\text{H}_4$ ] - AOH.

n(A)/n(S)	AOH [ $\mu\text{L}$ ]					[ $^2\text{H}_4$ ] - AOH [ $\mu\text{L}$ ]
	0,001 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,01 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	10 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1:100	33,2					33,72
1:50	66,4					33,72
1:10		33,2				33,72
1:5		66,4				33,72
1:2			16,6			33,72
1:1			33,2			33,72
2:1			66,4			33,72
5:1				16,6		33,72
10:1				33,2		33,72
50:1					16,6	33,72
100:1					33,2	33,72

**Tabelle 6.24** Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von AME mit [ $^2\text{H}_4$ ] - AME.

n(A)/n(S)	AME [ $\mu\text{L}$ ]					[ $^2\text{H}_4$ ] - AME [ $\mu\text{L}$ ]
	0,0001 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,001 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,01 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1:100	16,8					17,1
1:50	33,7					17,1
1:10		16,8				17,1
1:5		33,7				17,1
1:2			8,4			17,1
1:1			16,8			17,1
2:1			33,7			17,1
5:1				8,4		17,1
10:1				16,8		17,1
50:1					8,4	17,1
100:1					16,8	17,1

**Tabelle 6.25** Pipettierschema zur Herstellung der Responsegeraden von TeA mit [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N] - TeA.

n(A)/n(S)	TeA [ $\mu\text{L}$ ]				[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N] - TeA [ $\mu\text{L}$ ]
	0,01 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	1 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	10 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,1 [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1:100	15,8				16,4
1:50	31,6				16,4
1:10		15,8			16,4
1:5		31,6			16,4
1:2			7,9		16,4
1:1			15,8		16,4
2:1			31,6		16,4
5:1				7,9	16,4
10:1				15,8	16,4
50:1				79,0	16,4
100:1				158,0	16,4

### 6.9.2 Matrixkalibrierung für Gersten- und Malzproben

Zur Erstellung einer Matrixkalibrierung 1 g toxische Gerstenmatrix einwiegen und mit sechs bis acht verschiedenen Konzentrationen an Analyt (ALTP, ATX I, ATX II, TEN, ALT, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G) dotieren. Als untersten Punkt die Bestimmungsgrenze des jeweiligen Toxins wählen. Analyten 15 Minuten mit Matrix equilibrieren lassen und analog der Gersten- und Malzaufarbeitung (siehe Punkt 6.10.3) aufarbeiten. Die verwendeten Dotierniveaus und die damit verbundenen Volumina sind in den Tabellen 6.26 – 6.30 dargestellt.

**Tabelle 6.26** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ALTP und ALT in Gerste.

Dotier-niveau	ALTP			ALT		
	Volumen in $\mu\text{L}$		Zielkonzentration	Volumen in $\mu\text{L}$		Zielkonzentration
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	in $\mu\text{g/kg}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	in $\mu\text{g/kg}$
1	22		2,2	100		10
2	30		3	125		12,5
3	45		4,5	150		15
4	80		8		20	20
5	100		10		25	25
6	125		12,5		30	30
7		17	17		50	50
8		20	20		75	75
9		22	22		100	100

**Tabelle 6.27** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ATX I und ATX II in Gerste.

Dotier- niveau	ATX I Volumen in $\mu\text{L}$			ATX II Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$
1	20		2	36		3,6
2	25		2,5	45		4,5
3	30		3	55		5,5
4	50		5	70		7
5	75		7,5	80		8
6	100		10	100		10
7		12,5	12,5		15	15
8		15	15		17,5	17,5

**Tabelle 6.28** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für TEN und AME-3-G in Gerste.

Dotier- niveau	TEN Volumen in $\mu\text{L}$			AME-3-G Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,01 $\mu\text{g/mL}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$
1	40		0,4	49		4,9
2	80		0,8	55		5,5
3	100		1	60		6
4	150		1,5	65		6,5
5		20	2	70		7
6		25	2,5	80		8
7		50	5	100		10
8		90	9		15	15

**Tabelle 6.29** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-G und AOH-9-G in Gerste.

Dotier- niveau	AOH-3-G Volumen in $\mu\text{L}$			AOH-9-G Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/kg}$
1	30		3	30		3
2	40		4	40		4
3	50		5	50		5
4	75		7,5	75		7,5
5	100		10	100		10
6	125		12,5	125		12,5
7		15	15		15	15
8		20	20		20	20

**Tabelle 6.30** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-S und AME-3-S in Gerste.

Dotier- niveau	AOH-3-S			AME-3-S		
	Volumen in $\mu\text{L}$		Zielkonzentration	Volumen in $\mu\text{L}$		Zielkonzentration
	0,1	1	in $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,1	1	in $\mu\text{g}/\text{kg}$
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$		$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	
1	22		2,2	15		1,5
2	30		3	30		3
3	40		4	40		4
4	50		5	55		5,5
5	75		7,5	70		7
6	100		10	80		8
7		15	15	100		10
8		20	20		15	15

Zum Ausgleich tagesaktueller Schwankungen je zwei bzw. bei stark unterschiedlichen Konzentrationen drei Kalibrierpunkte bei jeder Probenaufarbeitung erneut herstellen und vermessen. Hierfür je 1 g Stärke analog nachfolgender Tabelle dotieren und nach 6.10.3 aufarbeiten. Da ATX II, ALT, AOH-9-G sowie AME-3-G in keiner Probe nachweisbar waren, sind diese nicht in der Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 6.31** Herstellung der tagesaktuellen Matrixkalibrierpunkte in Gerste.

	Dotierniveau 1	Dotierniveau 2	Dotierniveau 3
ALTP	2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
ATX I	2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
TEN	0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
AOH-3-S	2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$
AOH-3-G	2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	6 $\mu\text{g}/\text{kg}$
AME-3-S	3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 6.9.3 Matrixkalibrierung für Bierproben

Zur Kalibrierung der Biermethode je 5 mL einer toxischen Bierprobe mit sechs bis acht verschiedenen Konzentrationen an Analyt (ALTP, ATX I, ATX II, TEN, ALT, AOH-3-S, AME-3-S, AOH-3-G, AOH-9-G und AME-3-G) versehen und analog der in 6.11.2 beschriebenen Methodik aufarbeiten. Als unterstes Konzentrationsniveau die Konzentration der Bestimmungsgrenze wählen. Die gewählten Konzentrationslevel und die verschiedenen Volumina sind in den Tabellen 6.32 – 6.36 dargestellt.

**Tabelle 6.32** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ALTP und ALT in Bier.

Dotier- niveau	ALTP Volumen in $\mu\text{L}$			ALT Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$	1,0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$
1	160		3,2	40		8
2	200		4	50		10
3		25	5	75		15
4		30	6	100		20
5		35	7		25	50
6		40	8		37,5	75
7		50	10		50	100
8		100	20			
9		160	32			

**Tabelle 6.33** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für ATX I und ATX II in Bier.

Dotier- niveau	ATX I Volumen in $\mu\text{L}$			ATX II Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$
1			0,2	10		0,2
2			0,4	50		1
3			0,6	125		2,5
4			0,8	150		3
5			1		20	4
6			2		22,5	4,5
7			5		25	5
8			10		50	10

**Tabelle 6.34** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für TEN und AME-3-G in Bier.

Dotier- niveau	TEN Volumen in $\mu\text{L}$			AME-3-G Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1,0 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$
1	20		0,4	75		1,5
2	50		1	175		3,5
3	100		2		20	4
4		25	5		25	5
5		50	10		37,5	7,5
6					45	9
7					55	11
8					65	13

**Tabelle 6.35** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-G und AOH-9-G in Bier.

Dotier- niveau	AOH-3-G			AOH-9-G		
	Volumen in $\mu\text{L}$			Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$
1	67,5		1,35	65		1,3
2	100		2	100		2
3	125		2,5	125		2,5
4	150		3	150		3
5		20	4		20	4
6		25	5		25	5
7		37,5	7,5		37,5	7,5
8		50	10		50	10
9		70	14		70	14

**Tabelle 6.36** Pipettierschema zur Erstellung der Matrixkalibriergeraden für AOH-3-S und AME-3-S in Bier.

Dotier- niveau	AOH-3-S			AME-3-S		
	Volumen in $\mu\text{L}$			Volumen in $\mu\text{L}$		
	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	Zielkonzentration in $\mu\text{g/L}$
1	100		2	150		3
2	125		2,5	200		4
3	150		3	250		5
4		17,5	3,5		37,5	7,5
5		20	4		50	10
6		25	5		60	12
7		37,5	7,5		75	15
8		50	10		100	20
9		100	20			



## 6.10 Analytik von *Alternaria* Toxinen in Gersten- und Malzproben

### 6.10.1 Ausgangsmethode

Ein Gramm homogenisierte Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen einwiegen und mit 15 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure für 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler extrahieren (175 rpm). Bei 3200 x g für 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführen. Extraktionsschritt mit dem Rückstand wiederholen und Überstände vereinen. Für die dritte Extraktion 15 mL ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O (50/25/25, v/v/v) + 300 µL Ameisensäure geben. Erneut bei 175 rpm für 30 Minuten Schütteln, danach Proben filtrieren. Filtrat mit den Überständen der ersten beiden Extraktionen vereinen und Probe am Rotationsverdampfer (40 °C) trocknen. Rückstand in 12 mL Wasser (pH 5,5 mit Ameisensäure) lösen und mittels Festphasenextraktion aufreinigen: Discovery DSC-18 Kartuschen (500 mg, 6 mL) mit einem Säulenvolumen Methanol konditionieren und mit einem Säulenvolumen Wasser (pH 5,5 mit Ameisensäure) equilibrieren. Proben auftragen und mit zwei Säulenvolumen Wasser waschen. Toxine mit 6 mL Methanol und 9 mL Methanol + 2 % NH<sub>4</sub>OH von der Kartusche eluieren. Probe am Rotationsverdampfer (40 °C) trocknen und Rückstand in 1 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) aufnehmen. Proben über Nacht einfrieren, membranfiltrieren (0,22 µm, PVDF) und mittels LC-MS/MS messen (Gotthardt et al. 2019).

### 6.10.2 Methodenoptimierung für Getreidematrix

#### 6.10.2.1 Dilute and Shoot Versuche

Zum Testen einer Dilute and Shoot Methode in Anlehnung an die Aufarbeitung von Walravens et al. (2014) zweimal 2,5 g einer Gerstenprobe in je ein 50 mL Zentrifugenröhrchen einwiegen. Testweise AOH, AME, TEN, ALTP und TeA nach Tabelle 6.37 zugeben und Probe mit 10 mL (Probe 1) bzw. 15 mL (Probe 2) ACN/H<sub>2</sub>O/Ameisensäure (84/16/1, v/v/v) für 60 Minuten auf dem Horizontalschüttler bei 225 rpm extrahieren. Proben für 5 min bei 3200 x g zentrifugieren, Überstand in 15 mL Spitzkolben überführen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen.

**Tabelle 6.37** Dotierniveaus von AOH, AME, TEN, ALTP und TeA beim Testen einer Dilute and Shoot Methode.

Analyt	Dotierniveau
AOH	2,5 µg/kg
AME	1 µg/kg
TEN	0,5 µg/kg
ALTP	2,5 µg/kg
TeA	5 µg/kg

### 6.10.2.2 Proteinfällung

#### Fällung nach Carrez

Herstellen der Carrez-I Lösung durch Einwiegen von 1,5 g Kaliumhexacyanoferrat(II) in einen 10 mL Messkolben und mit destilliertem Wasser auffüllen. Für die Carrez-II Lösung 2 g Zinksulfat analog Carrez-I einwiegen und bis zur Marke mit destilliertem Wasser auffüllen.

In 50 mL Zentrifugenröhrchen zweimal ein Gramm Malz einwiegen und mit 15 mL Extraktionslösung (ACN/H<sub>2</sub>O, 84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure für 30 min auf dem Horizontalschüttler (225 rpm) extrahieren. Überstand in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführen und Rückstand ein zweites und drittes Mal unter identischen Bedingungen extrahieren. Überstände vereinen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen. Aufnahme der Probe in 8 mL Wasser und versetzen mit je 100 µL (Probe 1) bzw. 500 µL (Probe 2) von Carrez-I und Carrez-II. Hinzufügen von 4 mL H<sub>2</sub>O, schütteln und für 10 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren. Discovery DSC-18 (500 mg/6 mL) mit 6 mL MeOH und 6 mL H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure) vorkonditionieren, Probenüberstand auftragen und zweimal mit je 6 mL H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure) waschen. Kartuschen unter hohem Vakuum trocknen und anschließend Proben mit 6 mL MeOH und 6 mL MeOH + 2 % NH<sub>4</sub>OH eluieren. Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen und Rückstand für die LC-MS/MS Messung in 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) lösen und membranfiltrieren (PVDF, 0,22 µm).

Um Toxinverluste durch die Carrez-Fällung zu überprüfen, Versuch mit einer dotierten Malzprobe (siehe Tabelle 6.38) und folgenden Volumina an Carrez-I und Carrez-II Lösung wiederholen: 100 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL und 1000 µL.

**Tabelle 6.38** Dotierniveaus einer Malzprobe zur Überprüfung von Verlusten durch die Carrez-Fällung.

Analyt	Dotierniveau
AOH	10 µg/kg
AME	2 µg/kg
TeA	20 µg/kg
TEN	2 µg/kg
ATX I	2 µg/kg
AME-3-S	2 µg/kg
AOH-3-G	2 µg/kg
AOH-9-G	2 µg/kg

#### Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Herstellung der 30 %-igen TCA 3 g TCA in einen 10 mL Messkolben einwiegen, mit Methanol auf 10 mL auffüllen und schütteln. Zweimal je 1 g Malz in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen einwiegen und 15 mL Extraktionslösung (ACN/H<sub>2</sub>O, 84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure zugeben. Für 30 min auf dem Horizontalschüttler (225 rpm) extrahieren. Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführen und Rückstand ein zweites und drittes Mal unter identischen Bedingungen extrahieren. Überstände vereinen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen. Probe in 12 mL H<sub>2</sub>O aufnehmen und 100 µL (Probe 1) bzw. 250 µL (Probe 2) der methanolischen TCA zugeben. Proben schütteln, für 5 min bei 3200 x g zentrifugieren und pH-Wert mit Ammoniak auf 5,5 einstellen. Die Festphasenextraktion sowie die weitere Vorgehensweise analog der Carrez-Fällung durchführen.

#### 6.10.2.3 Extraktionsoptimierung

##### Untersuchung der Matrixbelastung der Ausgangsmethode

Einwiegen einer Malzprobe (1 g) in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen. Dreifach Extrahieren und mit jedem Extraktionsschritt einzeln analog 6.10.1 weiterarbeiten.

Extraktion 1: 15 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure, 30 Minuten

Extraktion 2: 15 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure, 30 Minuten

Extraktion 3: 15 mL ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O (50/25/25, v/v/v) + 300 µL Ameisensäure, 30 Minuten

##### Untersuchung der Matrixbelastung nach veränderten Extraktionsmittelzusammensetzungen

Eine Malzprobe in Doppelbestimmung dreimal mit ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) + 200 µL Ameisensäure und eine weitere Probe in Doppelbestimmung mit ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v) + 200 µL Ameisensäure extrahieren. Hierbei jeweils eine Probe als Gesamtextraktion verarbeiten und bei der jeweils

anderen Probe die drei Extraktionsschritte einzeln weiterbearbeiten. Eine weitere Gerstenprobe analog 6.10.1 aufarbeiten, jedoch ohne Säurezugabe in den Extraktionsschritten.

#### Untersuchung der Matrixbelastung und des Toxingehaltes nach veränderten Extraktionsbedingungen

Zur Überprüfung der Extraktionsdauer, der Anzahl an Extraktionen und der Säurezugabe viermal 1 g einer belasteten Malzprobe einwiegen und wie folgt zweimal mit ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) extrahieren:

Probe 1: mit 200 µL Säurezusatz, 30 Minuten

Probe 2: ohne Säurezusatz, 30 Minuten

Probe 3: mit 200 µL Säurezusatz, 60 Minuten

Probe 4: ohne Säurezusatz, 60 Minuten

Jede Extraktion als eigene Probe betrachten und nach 6.10.1 weiterarbeiten.

#### Überprüfen der Extraktionsvollständigkeit

Zwei natürlich belastete Malzproben wie in 6.10.1 beschrieben einwiegen. Zu den ersten zwei bereits festgelegten Extraktionsschritten zwei weitere Durchgänge hinzufügen:

Extraktion 1: ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v), 60 min

Extraktion 2: ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure, 30 min

Extraktion 3: ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure, 30 min

Extraktion 4: ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure, 30 min

Zur Überprüfung der Extraktionsvollständigkeit jede Extraktion einzeln nach 6.10.1 weiterbearbeiten und am LC-MS/MS messen.

#### *6.10.2.4 Test diverser SPE Kartuschen*

In ein 50 mL Zentrifugenröhrchen 1 g einer gemahlene Probe einwiegen und mit Analyten nach Tabelle 6.38 dotieren. Probe 15 Minuten equilibrieren lassen, 15 mL Extraktionslösung (ACN/H<sub>2</sub>O, 84/16, v/v) + 200 µL Ameisensäure hinzugeben und für 30 min auf dem Horizontalschüttler (225 rpm) extrahieren. Für 5 min bei 3200 x g zentrifugieren, Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführen und Rückstand ein zweites und drittes Mal unter identischen Bedingungen extrahieren. Nach der dritten Extraktion Entfernen des

Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Aufnahme des Rückstandes in 12 mL H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure). Konditionieren folgender Kartuschen zunächst mit einem Säulenvolumen MeOH gefolgt von einem Säulenvolumen H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure): Discovery DSC-18 (500 mg/6 mL, Merck, Darmstadt, Deutschland), Discovery DSC-8 (500 mg/3 mL, Merck, Darmstadt, Deutschland), Discovery DSC-CN (500 mg/3 mL, Merck, Darmstadt, Deutschland), Supelclean ENVI-Chrom P (500 mg/6 mL, Merck, Darmstadt, Deutschland), Strata-X Reversed Phase (500 mg, 6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und Chromabond HLB (500 mg/3 mL, VWR International, Darmstadt, Deutschland). Probe durch Anlegen eines leichten Vakuums mit einer Geschwindigkeit von 1-2 Tropfen pro Sekunde durch die Kartuschen saugen, diese im Anschluss mit zwei Säulenvolumen H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure) waschen. Kartuschen durch Anlegen eines hohen Vakuums trocken saugen. Zum Eluieren ein Säulenvolumen MeOH und ein Säulenvolumen MeOH + 2 % NH<sub>4</sub>OH aufgeben und Eluat in einem Zentrifugenröhrchen auffangen. Eluat in einen 15 mL Spitzkolben überführen und Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen. Rückstand in 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v) lösen, membranfiltrieren (PVDF, 0,22 µm) und an der HPLC sowie am LC-MS/MS messen.

#### 6.10.2.5 Optimieren des SPE Waschschrilles

Zum Variieren des Waschschrilles der Festphasenextraktion herstellen folgender Lösungen:

5 % MeOH:	1 mL MeOH auf 19 mL Wasser
10 % MeOH:	2 mL MeOH auf 18 mL Wasser
15 % MeOH:	3 mL MeOH auf 17 mL Wasser
20 % MeOH:	4 mL MeOH auf 16 mL Wasser
5 % ACN:	1 mL ACN auf 19 mL Wasser
10 % ACN:	2 mL ACN auf 18 mL Wasser
15 % ACN:	3 mL ACN auf 17 mL Wasser
20 % ACN:	4 mL ACN auf 16 mL Wasser

Eine natürlich belastete Malzprobe zweimal analog 6.10.1 mit den zuvor festgelegten Extraktionsschritten vorbereiten, jedoch die beiden Waschschrilles der Festphasenextraktion mit 5 % MeOH (Probe 1) bzw. 5 % ACN anstatt mit H<sub>2</sub>O (pH 5,5 mit Ameisensäure) durchführen. Waschschrilles einzeln in Zentrifugenröhrchen auffangen und analog dem Eluat weiter vorbereiten. Proben an der HPLC-UV nach 6.5.2.1 messen.

Analog hierzu für weitere Tests sechs dotierte Proben (siehe Tabelle 6.38) herstellen und bei der Festphasenextraktion je eine Probe zweimal mit 10 % MeOH, 15 % MeOH, 20 % MeOH,

10 % ACN, 15 % ACN und 20 % ACN waschen. Waschschritte einzeln auffangen und wie das Eluat weiterbehandeln. Alle Proben an der HPLC und am LC-MS/MS messen.

#### 6.10.2.6 Aufnahmelösungsmittel

Einwiegen von je 1 g natürlich belasteter Gerste in vier 50 mL Zentrifugenröhrchen und mit der optimierten Aufarbeitungsmethode (6.10.3) aufarbeiten. Nach der Festphasenextraktion Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernen und Probe folgendermaßen aufnehmen:

**Tabelle 6.39** Variation des Aufnahmelösungsmittels.

Probe 1	1 mL ACN/H <sub>2</sub> O (3/7, v/v)
Probe 2	1 mL ACN/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v)
Probe 3	1 mL ACN/H <sub>2</sub> O (7/3, v/v)
Probe 4	1 mL ACN

#### 6.10.2.7 Zugabe an internem Standard

Zu 1 g Probe je 50 µL (Probe 1), 100 µL (Probe 2) und 150 µL (Probe 3) von 0,1 µg/mL [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N] - TeA, 0,1 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AOH und 0,01 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AME geben und nach 6.10.3 aufarbeiten.

#### 6.10.2.9 Weitere Optimierungsversuche

Aufarbeiten von Malzproben in Einzelbestimmung wie in 6.10.3 beschrieben mit je einer der folgenden Variationen:

**Tabelle 6.40** Übersicht veränderter Zentrifugationsbedingungen und Membranfilter.

Zentrifugationstemperatur	4 °C, 10 °C, 18 °C
Zentrifugationsdauer	5 min, 10 min, 15 min
Membranfilter	0,1 µm Anotop Filter 0,22 µm PVDF Filter 0,45 µm PVDF Filter 2 x 0,22 µm PVDF Filter

### 6.10.3 Finale Methode zur Aufarbeitung von Gersten- und Malzproben

Gerste bzw. Malz in einer Mühle fein mahlen (Grindomix GM200, Retsch GmbH, Deutschland). In einer Doppelbestimmung je ein Gramm Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen einwiegen und mit isotoopenmarkierten Standards versehen (je 100 µL von 0,1 µg/mL [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N] - TeA und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AOH, sowie 100 µL von 0,01 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AME). Für die Quantifizierung über eine externe Matrixkalibrierung zweimal 1 g Stärke einwiegen und nach Tabelle 6.31 dotieren. Nach 15-minütiger Equilibrierungszeit 15 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16; v/v) hinzugeben und für eine Stunde bei 220 rpm auf dem Horizontalschüttler extrahieren. Danach 10 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren und Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführen. Rückstand zweimal mit 15 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16; v/v) und 200 µL Ameisensäure für 30 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren, zentrifugieren und Überstände vereinen. Lösungsmittel bei 40 °C am Rotationsverdampfer entfernen und in 12 mL H<sub>2</sub>O aufnehmen. Für die Festphasenextraktion Discovery-DSC18 (500 mg/6 mL) mit 6 mL Methanol und 6 mL Wasser konditionieren, Probe auftragen und mit 6 mL Wasser und 6 mL ACN/H<sub>2</sub>O (1,5/8,5; v/v) waschen. Analyten mit 9 mL Methanol und 6 mL ammoniakalischem Methanol (2 % NH<sub>4</sub>OH) von der Kartusche eluieren. Eluat bei 40 °C am Rotationsverdampfer einengen. In 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O (3/7; v/v) aufnehmen und bis zur Messung am LC-MS/MS bei - 18 °C lagern. Für die Quantifizierung über SIVA eine Responselösung durch Pipettieren einer definierten Menge Analyt und markiertem Standard in ein Klarglasvial herstellen. Lösungsmittel abdampfen und in 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O (3/7; v/v) aufnehmen.

## 6.11 Analytik von *Alternaria* Toxinen in Bierproben

Als Basis für die Aufarbeitung wurden verschiedene Methoden aus dem Bereich der *Fusarium* Analytik getestet, da *Alternaria* Toxine bisher nur selten in dieser Matrix bestimmt wurden.

### 6.11.1 Methodenoptimierung von Bierproben

#### 6.11.1.1 Dilute and Shoot

Bier entgasen, 3 mL entnehmen und mit den in Tabelle 6.41 genannten Toxinkonzentrationen dotieren. Probe membranfiltrieren (0,22 µm, PVDF) und 20 µL des Filtrats mit 60 µL ACN/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) in ein Vial mit Insert füllen. Probe am LC-MS/MS messen.

**Tabelle 6.41** Dotierniveaus zum Testen der Dilute and Shoot Aufarbeitung.

Analyt	Dotierniveau
AOH	12 µg/kg
AME	1 µg/kg
TEN	1 µg/kg
TeA	12 µg/kg
AOH-3-G	5 µg/kg
AOH-3-S	5 µg/kg

#### 6.11.1.2 QuEChERS Aufreinigung

Zugeben von 1,8 g MgSO<sub>4</sub>, 20 mL ACN/H<sub>2</sub>O/FA (79/20/1, v/v/v) und 4 mL Bier in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen. Für 60 min auf dem Horizontalschüttler extrahieren. 15 min bei 3200 x g zentrifugieren und Überstand in einen Spitzkolben überführen. Wiederholen der Extraktion mit 5 mL ACN/H<sub>2</sub>O/Ameisensäure (79/20/1, v/v/v), vortexen und 10 min auf dem Universalschüttler schütteln. 15 min bei 3200 x g zentrifugieren und Überstände vereinen. Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (40 °C), in 12 mL H<sub>2</sub>O pH 5,5 aufnehmen und nach 6.10.3 weiterarbeiten.

#### 6.11.1.3 Direkte SPE Aufreinigung

##### Testen verschiedener Probenvolumina

Analog der in 6.10.3 beschriebenen Gerstenmethode vier Discovery DSC-18 (500 mg/6 mL) Kartuschen mit 6 mL Methanol und 6 mL Wasser konditionieren. Je 5, 10, 15 bzw. 20 mL einer entgasten Bierprobe auftragen und mit einer Geschwindigkeit von 1-2 Tropfen unter Anlegen eines leichten Vakuums durch die Kartusche saugen. Proben analog der Gerstenmethode (6.10.3) weiteraufarbeiten.



### Testen der Wiederfindungen

Zwei entgaste Bierproben mit AOH, AME, TEN, TeA, AOH-3-G und AOH-3-S dotieren (siehe Tabelle 6.41) und auf die mit 6 mL MeOH und 6 mL H<sub>2</sub>O vorkonditionierte Kartusche geben. Proben nach 6.10.3 weiterbehandeln.

#### 6.11.1.4 Matrixfällung und Probenvolumen

Um ein geeignetes Probenvolumen zu ermitteln, je zweimal 1 mL, 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL und 10 mL einer entgasten Bierprobe in 15 bzw. 50 mL Zentrifugenröhrchen pipettieren und für die Matrixfällung einmal die jeweils gleiche Menge ACN und einmal das doppelte Probenvolumen ACN zugeben. Proben vortexen und für 5 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren. Überstände an der HPLC nach 6.5.2 messen.

Für weitere Tests 5 mL der entgasten Bierprobe mit je 10 mL anderer Lösungsmittel (Isopropanol, Methanol, Aceton) fällen, schütteln und Überstände nach dem Zentrifugieren (5 min, 3200 x g) an der HPLC messen (6.5.2). Den Versuch ebenso mit 15 mL ACN als Fällungslösungsmittel durchführen.

Um durch die Matrixfällung bedingte Verluste an Toxinen zu überprüfen, zweimal 5 mL einer entgasten Bierprobe mit AOH, AME, TeA und TEN dotieren (siehe Tabelle 6.42). Probe 1 mit 10 mL ACN und Probe 2 mit 15 mL ACN fällen, vortexen und zentrifugieren (5 min, 3200 x g). Nach 6.11.2 weiterarbeiten. Versuch mit einer mit AOH-3-G und AME-3-S dotierten Bierprobe (Tabelle 6.42) wiederholen.

**Tabelle 6.42** Dotierniveaus zum Überprüfen von Toxinverlusten durch Matrixfällung.

Analyt	Dotierniveau
AOH	4 µg/kg
AME	2 µg/kg
TeA	10 µg/kg
TEN	2 µg/kg
AOH-3-G	3,5 µg/kg
AME-3-S	4 µg/kg

#### 6.11.1.5 Matrixreduktion durch Cyclohexan

Zur Entfernung weiterer Matrixbestandteile als Vortest 5 mL einer entgasten Bierprobe mit je 2,5 mL, 5 mL und 7,5 mL Cyclohexan versetzen und vortexen. Proben 15 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren und Cyclohexanphase verwerfen. Probe nach dem in 6.11.2 beschriebenen Vorgehen aufarbeiten und an der HPLC-UV messen (siehe 6.5.2). Versuch mit

einer mit AOH, AME, AOH-3-G und TEN dotierten Bierprobe (Tabelle 6.43) wiederholen und zusammen mit einer nach 6.11.1.4 aufgearbeiteten Probe ohne Cyclohexanextraktion am LC-MS/MS messen (6.5.3).

**Tabelle 6.43** Dotierniveau zur Überprüfung von Toxinverlusten durch Cyclohexanextraktion.

Analyt	Dotierniveau
AOH	4 µg/kg
AME	2,5 µg/kg
TEN	1,5 µg/kg
AOH-3-G	3 µg/kg

#### 6.11.1.6 Rückstandsextraktion

Um Toxinverluste durch die Matrixfällung zu überprüfen, wurde der Rückstand untersucht. Zwei nach Tabelle 6.44 dotierte Bierproben (je 5 mL) mit 15 mL ACN fällen, schütteln und zentrifugieren (5 min, 3200 x g). Überstand abnehmen und Rückstand mit je 10 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16, v/v) versetzen und auf dem Horizontalschüttler extrahieren (225 rpm, 15 Minuten). Bei 3200 x g für 5 min zentrifugieren und mit dem Überstand nach 6.11.2 weiterarbeiten.

**Tabelle 6.44** Dotierniveaus zur Überprüfung der Rückstandsextraktion.

Analyt	Dotierniveau
AOH	4 µg/kg
AME	2 µg/kg
TeA	10 µg/kg
ATX I	4 µg/kg
ALTP	4 µg/kg
AOH-3-G	5 µg/kg
AOH-3-S	5 µg/kg

#### 6.11.1.7 Zugabe der internen Standards

Eine entgaste Bierprobe (5 mL) mit je 50 µL und eine weitere Probe mit 100 µL der isotopenmarkierten Standards in den Konzentration 0,1 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AOH, 0,1 µg/mL [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N] - TeA und 0,01 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] - AME versetzen. Proben schütteln und analog 6.11.2 aufarbeiten.

### 6.11.2 Finale Methode zur Aufarbeitung von Bierproben

Bier für mindestens 15 Minuten im Ultraschallbad entgasen. In einer Dreifachbestimmung je 5 mL Bier in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen und isotopenmarkierte Standards zusetzen (100 µL von 0,1 µg/mL [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N] – TeA, 150 µL von 0,1 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] – AOH, sowie 100 µL von 0,01 µg/mL [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] – AME). Proben durch Schütteln homogenisieren, 2,5 mL Cyclohexan zusetzen, Proben erneut schütteln und für 15 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren. Cyclohexan-Phase verwerfen, 15 mL Acetonitril zur Fällung der Matrix zugeben und Proben schütteln, bis kein neuer Niederschlag gebildet wird. Für 5 Minuten bei 3200 x g zentrifugieren und Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführen. Rückstand in 10 mL ACN/H<sub>2</sub>O (84/16; v/v) lösen, kurz vortexen und für 15 Minuten auf dem Horizontalschüttler extrahieren. Proben 5 Minuten bei 4000 x g zentrifugieren und Überstand in den entsprechenden Spitzkolben pipettieren. Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernen und den öligen Rückstand in 12 mL H<sub>2</sub>O aufnehmen.

Für die Festphasenextraktion analog Punkt 6.10.3 Discovery-DSC18 (500 mg/6 mL) mit 6 mL Methanol und 6 mL Wasser (pH 5,5) konditionieren, Probe auftragen und mit 6 mL Wasser und 6 mL ACN/H<sub>2</sub>O (1,5/8,5; v/v) waschen. Analyten mit 6 mL Methanol und 9 mL ammoniakalischem Methanol (2 % NH<sub>4</sub>OH) von der Kartusche eluieren. Eluat bei 40 °C am Rotationsverdampfer einengen. In 1 mL ACN/H<sub>2</sub>O (3/7; v/v) aufnehmen und bis zur Messung am LC-MS/MS bei – 18 °C lagern.

## 6.12 Methodenvalidierung der Gersten- und Malzmethode

### 6.12.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Gersten- und Malzproben

Für die Bestimmung der NWG und BG nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998) ein Gramm toxischer Gerste mit den Analyten nach Tabelle 6.45 in vier verschiedenen Konzentrationen dotieren, 15 Minuten equilibrieren lassen und nach der in 6.10.3 beschriebenen Vorgehensweise in Dreifachbestimmung aufarbeiten. Am LC-MS/MS in Dreifachinjektion messen. Den Mykotoxingehalt über die zugegebenen stabilisotopenmarkierten Standards oder über externe Matrixkalibrierpunkte ermitteln und die NWG und BG über die in der Literatur gegebenen Formeln berechnen.

**Tabelle 6.45** Dotierniveaus der Getreideproben zur Bestimmung der NWG und BG.

Analyt	Level 1 in µg/kg	Level 2 in µg/kg	Level 3 in µg/kg	Level 4 in µg/kg
AOH	0,5	2,5	4	5,5
AME	0,05	0,3	0,75	1,5
TeA	1,2	4,5	7	10
ALT	3	13	16	20
ALTP	0,25	1	2	5
ATX I	0,3	1,2	2	3,5
ATX II	0,2	1	2,5	5
TEN	0,1	0,7	1	2
AOH-3-G	1	5	7,5	9
AOH-9-G	0,5	3	5	7,5
AME-3-G	0,5	5	6	7,5
AOH-3-S	0,5	2,5	4	5,5
AME-3-S	0,5	2,5	4	5,5

### 6.12.2 Wiederfindung von Gersten- und Malzproben

Zur Bestimmung der Wiederfindung toxische Gerste mit Analyten in drei verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 6.46) versetzen, 15 Minuten equilibrieren lassen und analog 6.10.3 in Dreifachbestimmung aufarbeiten. Berechnung des experimentell ermittelten Gehaltes über die isotopenmarkierten Standards bzw. die externen Matrixkalibrierpunkte und Bestimmung der Wiederfindungsrate durch Bilden des Verhältnisses aus experimentell ermitteltem und dotiertem Analytgehalt:

$$WDF (\%) = \frac{C_{\text{experimentell}}}{C_{\text{dotiert}}} \times 100 \quad (3)$$

**Tabelle 6.46** Dotierniveaus der Gerstenproben zur Bestimmung der Wiederfindungsraten.

Analyt	1. Wiederfindung in $\mu\text{g/kg}$	2. Wiederfindung in $\mu\text{g/kg}$	3. Wiederfindung in $\mu\text{g/kg}$
AOH	2,5	4	5,5
AME	0,3	0,75	1,5
TeA	10	100	500
ALT	13	16	18
ALTP	2,1	3,5	5
ATX I	2,1	3,5	8
ATX II	3,6	5	7
TEN	0,7	1	2
AOH-3-G	5	7,5	9
AOH-9-G	7,5	9	12
AME-3-G	5	6	7,5
AOH-3-S	2,5	4	5,5
AME-3-S	4	5,5	8

### 6.12.3 Präzisionen von Gersten- und Malzproben

Zur Bestimmung der Gerätepräzision eine dotierte Probe aus 6.12.2 achtmal hintereinander am LC-MS/MS messen und den Toxingehalt über den isotoopenmarkierten Standard bzw. die externe Matrixkalibrierung berechnen. Aus den einzelnen Ergebnissen die relative Standardabweichung ermitteln.

Für die Wiederholpräzision eine Probe mit AOH (4  $\mu\text{g/kg}$ ), AME (0,3  $\mu\text{g/kg}$ ), TeA (100  $\mu\text{g/kg}$ ), TEN (1,5  $\mu\text{g/kg}$ ), ATX I (8  $\mu\text{g/kg}$ ), ATX II (5  $\mu\text{g/kg}$ ), ALTP (3,5  $\mu\text{g/kg}$ ), ALT (16  $\mu\text{g/kg}$ ), AOH-3-S (5,5  $\mu\text{g/kg}$ ), AME-3-S (8  $\mu\text{g/kg}$ ), AOH-3-G (4  $\mu\text{g/kg}$ ), AOH-9-G (9  $\mu\text{g/kg}$ ) und AME-3-G (6  $\mu\text{g/kg}$ ) dotieren und dreimal innerhalb von drei Wochen in Dreifachbestimmung aufarbeiten. Am LC-MS/MS dreifach injizieren. Toxingehalt entweder über den jeweiligen isotoopenmarkierten Standard oder die externe Matrixkalibrierung quantifizieren. Mittelwerte jeder Dreifachbestimmung bilden und aus den Mittelwerten die relative Standardabweichung berechnen.

## 6.13 Methodvalidierung der Biermethode

### 6.13.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Biermethode

Bestimmung der NWG und BG analog der Vorgehensweise nach Hädrich und Vogelgesang (Vogelgesang und Hädrich 1998). Hierfür 5 mL toxisches Bier mit den in Tabelle 6.47 beschriebenen Konzentrationen an Analyt versetzen und in Dreifachbestimmung nach 6.11.2 aufarbeiten. Proben in Dreifachinjektion am LC-MS/MS messen und den Mykotoxingehalt über die zugegebenen isotoptenmarkierten Standards bzw. die externe Matrixkalibrierung berechnen. Die Berechnung erfolgte wie in der Literatur beschrieben.

**Tabelle 6.47** Dotierniveaus der Bierproben zur Bestimmung der NWG und BG.

Analyt	Level 1 in µg/L	Level 2 in µg/L	Level 3 in µg/L	Level 4 in µg/L
AOH	0,4	1,2	2,6	4
AME	0,05	0,15	0,33	0,5
TeA	0,5	1,5	3,25	5
ALT	8	24	52	80
ALTP	0,6	1,8	3,9	6
ATX I	0,3	0,9	1,95	3
ATX II	0,2	1	2,5	4
TEN	0,2	0,6	1,3	2
AOH-3-G	0,3	1,5	3	4,5
AOH-9-G	0,3	1,5	3	4,5
AME-3-G	1,5	5	7,5	9
AOH-3-S	0,2	1,5	3	5
AME-3-S	5	7,5	10	15

### 6.13.2 Wiederfindung

5 mL einer toxischen Bierprobe mit drei verschiedenen Mengen an Analyt versetzen (siehe Tabelle 6.48) und in Dreifachbestimmung analog 6.11.2 aufarbeiten, um die Wiederfindungsraten zu ermitteln. Nach dreifacher Messung am LC-MS/MS Toxingehalte über die zugesetzten isotoptenmarkierten Standards oder die externe Matrixkalibrierung berechnen. Ermittlung der Wiederfindungsrate durch Bildung des Quotienten aus dem experimentell ermittelten Wert und dem zugesetzten Analytgehalt (siehe Formel 3, Kapitel 6.12.2).

**Tabelle 6.48** Dotierniveaus der Bierproben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.

Analyt	1. Wiederfindung in $\mu\text{g/L}$	2. Wiederfindung in $\mu\text{g/L}$	3. Wiederfindung in $\mu\text{g/L}$
AOH	1,2	2,6	4
AME	0,15	0,33	0,5
TeA	1,5	3,25	5
ALT	24	52	80
ALTP	3,9	4,5	6
ATX I	0,9	1,95	3
ATX II	2,5	4	5
TEN	1,3	2	2,5
AOH-3-G	1,5	3	4
AOH-9-G	1,5	3	4,5
AME-3-G	5	7,5	9
AOH-3-S	3	5	7
AME-3-S	5	7,5	10

### 6.13.3 Präzision der Biermethode

Für die Bestimmung der Gerätepräzision eine dotierte Probe aus 6.13.2 achtmal hintereinander am LC-MS/MS messen und den Toxingehalt über die isotopenmarkierten Standards bzw. die externe Kalibrierung berechnen. Mit den erhaltenen Werten die relative Standardabweichung bestimmen, um die Gerätepräzision zu berechnen.

Für die Wiederholpräzision eine natürlich mit TeA belastete Bierprobe mit AOH (0,8  $\mu\text{g/L}$ ), AME (0,33  $\mu\text{g/L}$ ), TEN (0,5  $\mu\text{g/L}$ ), ATX I (3  $\mu\text{g/L}$ ), ATX II (4  $\mu\text{g/L}$ ), ALTP (1,8  $\mu\text{g/L}$ ), ALT (24  $\mu\text{g/L}$ ), AOH-3-G (3  $\mu\text{g/L}$ ), AOH-9-G (3  $\mu\text{g/L}$ ), AME-3-G (4  $\mu\text{g/L}$ ), AOH-3-S (5  $\mu\text{g/L}$ ) und AME-3-S (7,5  $\mu\text{g/L}$ ) dotierten und dreimal innerhalb von drei Wochen in Dreifachbestimmung nach 6.11.2 aufarbeiten. In Dreifachinjektion am LC-MS/MS messen. Toxingehalte erneut über die zugegebenen internen Standards bzw. die externe Matrixkalibrierung berechnen und aus den Mittelwerten jeder Dreifachbestimmung die relative Standardabweichung berechnen.

## 6.14 Versuchsaufbau

### 6.14.1 Gersten- und Malzscreening

Für das Gerstenscreening wurden vom Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie der TU München über vier Jahre hinweg insgesamt 56 industrielle Praxismuster bezogen.

#### 6.14.1.1 Probennahme Gerste

Die Probennahme erfolgte von den jeweiligen Unternehmen vor Ort nach den Vorgaben der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (R-110.00.001 [2016], Jacob und Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission, 2011): unter Zuhilfenahme von automatisierten Probensammlern wurden aus mindestens 10 % der Getreidesäcke Einzelproben entnommen, welche zu einer Sammelprobe vereint wurden. Die Gesamtmenge dieser Sammelprobe betrug mindestens 5 kg und wurde gut verschlossen an den Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie geschickt. Nach Ankunft der Proben einen Probenteiler (Pfeuffer GmbH, Kitzingen, Deutschland) nutzen, um repräsentative Laborproben von 0,5 bis 1 kg zu erhalten. Aus dieser Probe ca. 50 g für die Mykotoxinanalytik entnehmen und den Rest als Rückstellprobe verwahren.

Pro Gerstenmuster wurde zudem eine Laborprobe am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie der TU München nach dem Standardmälzungsverfahren der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK) vermälzt (siehe 6.14.1.2).

#### 6.14.1.2 Mälzungsprozess nach MEBAK R-110.00.008 [2016-03]

Nach Probeneingang wurden zeitnah von jeder Gerstenprobe 0,5 bis 1 kg der Laborproben für die Mälzung entnommen. Die Mälzungen wurden am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie als Mikro-Mälzung durchgeführt (MEBAK R-110.00.008 [2016-03], Jacob und Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission, 2011). Diese liefen wie folgt ab: Gersten bei 14 °C zunächst für 5 Stunden in Wasser weichen, danach für 19 Stunden an der Luft ruhen lassen. Erneut für 4 Stunden in Wasser weichen und für 20 Stunden an der Luft ruhen lassen, sodass ein Weichgrad von 45 % erzielt wird. Nach der Weiche für 96 Stunden bei 14 °C keimen lassen, sodass ein Grünmalz mit 45 % Wasseranteil entsteht. Für die Darre folgendes Trockenprogramm verwenden: 16 Stunden bei 50 °C, eine Stunde bei 60 °C, eine Stunde bei 70 °C und 5 Stunden bei 80 °C. Gedarrtes Malz reinigen, um Wurzelkeimlinge zu entfernen.



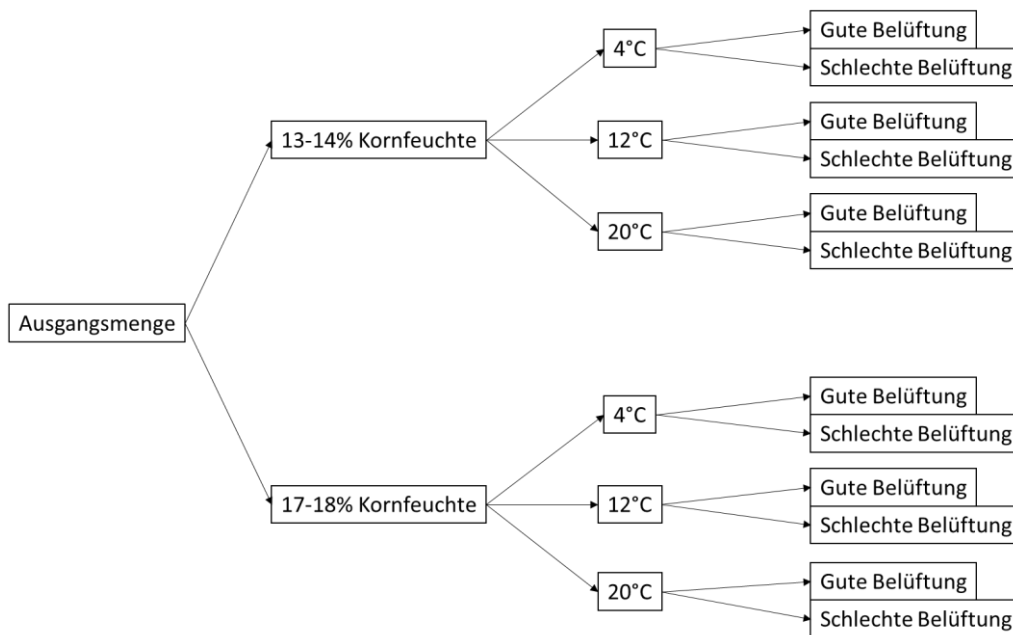
## 6.14.2 Lagerversuch

### 6.14.2.1 Probenmaterial

Für den Lagerversuch wurden drei verschieden belastete Gerstenmuster der Sorte Avalon verwendet. Alle drei Muster wurden vor der Lagerung am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie mittels qPCR auf den DNA-Gehalt von *Alternaria alternata* untersucht (Bretträger et al. 2022). Das Muster mit der mittels qPCR nachgewiesenen niedrigsten Symptomatik wurde in diesem Versuch als Referenzmuster verwendet.

### 6.14.2.2 Lagerbedingungen

Die Lagerung erfolgte über 8 Monate nach dem in Abbildung 6.1 dargestellten Aufbau. Insgesamt konnten somit pro Gerstenmuster 12 verschiedene Kombinationen aus Kornfeuchte, Temperatur und Belüftung getestet werden.



**Abbildung 6.1** Aufbau des Lagerversuches.

Bei den Lagerungsproben mit schlechter Durchlüftung wurden die Probenbehälter lose abgedeckt und regelmäßig durchmischt, um die Lagerungstemperaturen einhalten zu können.

### 6.14.2.3 Probennahme

Die Ausgangsmengen der drei verwendeten Muster waren wie folgt: 8,7 kg (Referenz), 10 kg (Hohe Symptomatik) und 7,7 kg (Niedrige Symptomatik). Diese Menge wurde zum Einstellen der Kornfeuchte gleichmäßig geteilt, um von jedem Muster einen Ansatz mit einer Kornfeuchte von 13-14 % und einen mit 17-18 % Kornfeuchte zu generieren. Diese Ansätze wurden dann

jeweils zu gleichen Teilen bei 4 °C, 12 °C und 20 °C gelagert, sodass bei jeder Probennahme ca. 300 – 350 g entnommen werden konnten.

Die Probennahme erfolgte zunächst vor der Lagerung zum Zeitpunkt 0, um die Ausgangsbelastung zu ermitteln. Danach wurden nach 3 Monaten sowie nach 8 Monaten Proben entnommen und jeweils 200 g davon am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie nach dem MEBAK Verfahren vermälzt. Rohfruchtproben wurden aufgrund des höheren Wassergehaltes bis zur Analytik bei -18 °C gelagert.

### **6.14.3 Verfolgung der Toxine über den Mälzungsprozess**

#### *6.14.3.1 Probenmaterial*

Für die Durchführung wurden drei verschiedene Gerstenproben der Sorte Avalon verwendet, die anhand des optischen Befalls in niedrige, mittlere und hohe Symptomatik eingeteilt wurden. Die Mälzung wurde am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie der TU München nach dem MEBAK Mikromälzungsverfahren durchgeführt.

#### *6.14.3.2 MEBAK Mikromälzungsverfahren*

Zum Mälzen wurde das standardisierte Mälzungsverfahren MEBAK-Rohstoff R-110.00.008 (2016-03) verwendet (siehe 6.14.1.2).

#### *6.14.3.3 Probennahme*

Die Probennahme erfolgte im Abstand von 24 Stunden, sowie direkt vor der Darre (Grünmalz) und nach der Darre (ungeputzt und geputzt). Die Proben wurden direkt nach der Entnahme gefriergetrocknet und dann bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

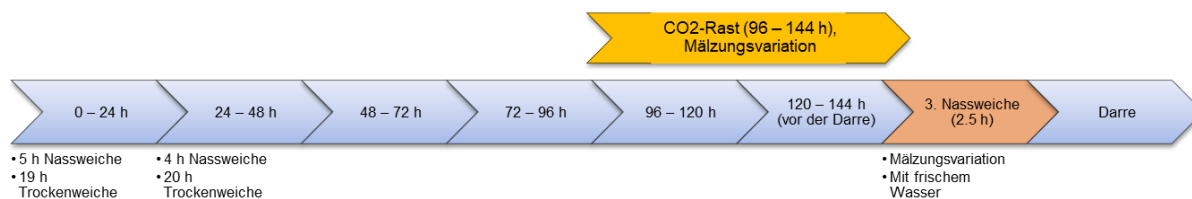
#### *6.14.3.4 Veränderungen der Mälzungsparameter*

Um Einflüsse unterschiedlicher Mälzungsparameter auf die Toxinbildung analysieren zu können, wurden weitere Mälzungen am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie im Labormaßstab durchgeführt. Der Ablauf orientierte sich hierbei am Kleinmälzungsverfahren nach MEBAK-Rohstoff R-110.00.008 (2016-03), jedoch unter Veränderung der in Tabelle 6.49 dargestellten Parameter.

**Tabelle 6.49** Variierte Parameter während der Mälzung.

Parameter	Variation
Temperatur	10 °C, 14 °C, 18 °C
Weichgrad	40 %, 45 %
Maßnahmen zur Reduzierung des Toxingehaltes	Einführung einer dritten Nassweiche Einführen einer CO <sub>2</sub> Rast

Die Variation des Weichgrades erfolgte in Kombination mit der Temperatur, d.h. jeder Weichgrad wurde bei drei verschiedenen Temperaturen gemälzt, sodass hier sechs verschiedene Mälzungen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde eine dritte Nassweiche durchgeführt, um zu versuchen den Pilz sowie die Mykotoxine auszuwaschen. Ebenso sollte eine Rast unter CO<sub>2</sub> Atmosphäre das Schimmelpilzwachstum unterdrücken. Als letzte Variation wurde die dritte Nassweiche in Kombination mit der CO<sub>2</sub> Rast durchgeführt. Bei dieser wurden ebenfalls testweise Proben des Weichwasser genommen und analysiert.

**Abbildung 6.2** Darstellung des Mälzungsverlaufes inklusive der durchgeführten Variationen.

## 6.14.5 Brauprozess im Kleinsudwerk

### 6.14.4.1 Probenmaterial und -vorbereitung

Ein von IREKS zur Verfügung gestelltes Pilsener Biomalz (Sorte Avalon), sowie ein Malz der Sorte Avangard wurden bei der Firma Bühler mit Hilfe eines optischen Sortiergerätes (SORTEX, Bühler AG, Uzwil, Schweiz) in zwei Chargen geteilt: eine mit sauberen, optisch unauffälligen Körnern (im Folgenden als „sauber“ bezeichnet), und eine mit Körnern starker schwarzer Symptomatik (im Folgenden als „farblich aussortiert“ bezeichnet).

### 6.14.4.2 Ablauf

Die Brauersuche wurden am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie in einem halbindustriellen Maßstab (8 Liter) im Glassudwerk durchgeführt.

Zu Beginn das saubere und das farblich aussortierte Malz getrennt voneinander in einer Zwei-Walzen-Trockenschrotmühle zu Schrot (0,8 mm) verarbeiten. Im Anschluss einen Teil des sauberen Schrots für den Brauersuch entnehmen und den Rest im Verhältnis 50/50 und 25/75 (sauberes Malz/farblich aussortiertes Malz, Malz 1) bzw. 75/25 und 50/50 (sauberes Malz/farblich aussortiertes Malz, Malz 2) so mischen, dass pro Brauanatz ca. 1,5 kg Schrot vorliegen. Die vorbereiteten Schrotmischungen zu 5,5 L entmineralisiertes Wasser geben, welches zuvor auf 62 °C temperiert wurde, um die Maische zu starten. Die erste Rast für 30 min bei 62 °C halten, die zweite Rast für 30 min bei 72 °C durchführen, danach Temperatur auf 78 °C erhöhen und zehn Minuten halten. Die Maische in einen vorgeheizten Läutergang überführen. Das Pumpen der Trubwürze durchführen bis EBC < 35 (= Farbstärke) erreicht ist. Nach Erhalt von ca. 3,2 L Vorderwürze mit 2,2 L Wasser nachspülen. Nach dem Läutern die Würze 60 min bei Atmosphärendruck kochen. Sobald der Stammwürzegrad von 11,5 °P erreicht ist, Heißtrub im Whirlpool entfernen und Würze kühlen. Für die Fermentation Trockenhefe (TUM 34/70, Fermentis, Marcq-en-Barœul, Frankreich) in der Vorderwürze rehydrieren und in einer Konzentration von  $15 \times 10^6$  anstellen. Die Hauptfermentation bei 11 °C halten, bis der Extraktgehalt bei unter 3,5 °P liegt. Die Reifung bei 16 °C durchführen, bis der Diacetylgehalt bei unter 0,12 mg/L liegt. Das Grünbier für vier Wochen bei 1 °C lagern. Nach der Lagerung das Bier mit Seitz K150 Filterpapier (Pall-Seitz, Bad Kreuznach, Germany) filtrieren und in Braunglasflaschen (0,33 L) abfüllen.

### 6.14.4.3 Probennahme

Die Probennahme erfolgte bei den Prozessschritten/Nebenprodukten Schrot, Maische Anfang, Maische Ende, Treber, Pfannevollwürze, Ausschlagwürze, Geläger, Heißtrub und

---

Bier. Für die Toxinbilanzierung alle Probenentnahmen und Schritte/Nebenprodukte wiegen, um Verdünnungseffekte zu berücksichtigen.

#### **6.14.5 Analytik diverser nationaler und internationaler Biere**

Zur Analytik verschiedener nationaler und internationaler Biere wurden 50 verschiedene Biere in Supermärkten in und um Freising, sowie in einem lokalen Craft Beer Shop gekauft. Alle Biere wurden entgast und bei -18 °C bis zur Analytik gelagert.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ackermann, Yvonne; Curtui, Valeriu; Dietrich, Richard; Gross, Madeleine; Latif, Hadri; Märtlbauer, Erwin; Usleber, Ewald (2011): Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies. In: *J. Agric. Food Chem.* 59 (12), S. 6360–6368. DOI: 10.1021/jf201516f.
- Agarwal, A.; Garg, G. K.; Devil, S.; Mishra, D. P.; Singh, U. S. (1997): Ultrastructural Changes in Brassica Leaves Caused by *Alternaria brassicae* and Destruxin B. In: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 6 (1), S. 25–28. DOI: 10.1007/BF03263004.
- Agriopoulou, Sofia; Stamatelopoulou, Eygenia; Varzakas, Theodoros (2020): Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (4). DOI: 10.3390/foods9040518.
- Aichinger, Georg; Živná, Natálie; Varga, Elisabeth; Crudo, Francesco; Warth, Benedikt; Marko, Doris (2020): Microfiltration results in the loss of analytes and affects the in vitro genotoxicity of a complex mixture of *Alternaria* toxins. In: *Mycotoxin research* 36 (4), S. 399–408. DOI: 10.1007/s12550-020-00405-9.
- Al-Jaal, Belqes; Salama, Sofia; Al-Qasmi, Noof; Jaganjac, Morana (2019): Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection. In: *Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology* 171, S. 43–50. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.10.003.
- Alshannaq, Ahmad; Yu, Jae-Hyuk (2017): Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. In: *International journal of environmental research and public health* 14 (6). DOI: 10.3390/ijerph14060632.
- Al-Taher, Fadwa; Banaszewski, Katie; Jackson, Lauren; Zweigenbaum, Jerry; Ryu, Dojin; Cappozzo, Jack (2013): Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. In: *J. Agric. Food Chem.* 61 (10), S. 2378–2384. DOI: 10.1021/jf304729f.
- Aly, Amal H.; Edrada-Ebel, RuAngelie; Indriani, Ine Dewi; Wray, Victor; Müller, Werner E. G.; Totzke, Frank et al. (2008): Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. In: *Journal of natural products* 71 (6), S. 972–980. DOI: 10.1021/np070447m.
- Amatulli, Maria T.; Fanelli, Francesca; Moretti, Antonio; Mule, Giuseppina; Logrieco, Antonio F. (2013): *Alternaria* species and mycotoxins associated to black point of cereals. In: *Mycotoxins* 63 (1), S. 39–46. DOI: 10.2520/myco.63.39.
- An, Yuhui; Zhao, Tianzheng; Miao, Jian; Liu, Guiting; Zheng, Yingzhong; Xu, Youmei; van Etten, Robert L. (1989): Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. In: *J. Agric. Food Chem.* 37 (5), S. 1341–1343. DOI: 10.1021/jf00089a029.
- Anastassiades, Michelangelo; Lehotay, Steven J.; Stajnbaher, Darinka; Schenck, Frank J. (2003): Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86 (2), S. 412–431.

- Andersen, Birgitte; Nielsen, Kristian F.; Fernández Pinto, Virginia; Patriarca, Andrea (2015): Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. In: *International journal of food microbiology* 196, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029.
- Arcella, Davide; Eskola, Mari; Gómez Ruiz, Jose Angel (2016): Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. In: *EFSA Journal* 14 (12). DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4654.
- Arnone, Alberto; Nasini, Gianluca; Merlini, Lucio; Assante, Gemma (1986): Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphyliotoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *Lactucum*. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, S. 525. DOI: 10.1039/P19860000525.
- Arntzen, C. J. (1972): Inhibition of photophosphorylation by tentoxin, a cyclic tetrapeptide. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 283 (3), S. 539–542. DOI: 10.1016/0005-2728(72)90273-3.
- Asam, Stefan; Konitzer, Katharina; Rychlik, Michael (2011a): Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. In: *Mycotoxin research* 27 (1), S. 23–28. DOI: 10.1007/s12550-010-0071-6.
- Asam, Stefan; Konitzer, Katharina; Schieberle, Peter; Rychlik, Michael (2009): Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. In: *J. Agric. Food Chem.* 57 (12), S. 5152–5160. DOI: 10.1021/jf900450w.
- Asam, Stefan; Liu, Yang; Konitzer, Katharina; Rychlik, Michael (2011b): Development of a stable isotope dilution assay for tenuazonic acid. In: *J. Agric. Food Chem.* 59 (7), S. 2980–2987. DOI: 10.1021/jf104270e.
- Asam, Stefan; Rychlik, Michael (2015): Recent developments in stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis with special regard to *Alternaria* toxins. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (25), S. 7563–7577. DOI: 10.1007/s00216-015-8904-y.
- Azcarate, M. P.; Patriarca, A.; Terminiello, L.; Fernández Pinto, V. (2008): *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. In: *Journal of food protection* 71 (6), S. 1262–1265. DOI: 10.4315/0362-028x-71.6.1262.
- Babič, Janja; Tavčar-Kalcher, Gabrijela; Celar, Franci Aco; Kos, Katarina; Knific, Tanja; Jakovac-Strajn, Breda (2021): Occurrence of *Alternaria* and Other Toxins in Cereal Grains Intended for Animal Feeding Collected in Slovenia: A Three-Year Study. In: *Toxins* 13 (5). DOI: 10.3390/toxins13050304.
- Baggiani, Claudio; Anfossi, Laura; Giovannoli, Cristina (2008): Molecular imprinted polymers as synthetic receptors for the analysis of myco- and phyco-toxins. In: *The Analyst* 133 (6), S. 719–730. DOI: 10.1039/b711352h.
- Bauer, Julia I.; Gross, Madeleine; Gottschalk, Christoph; Usleber, Ewald (2016): Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. In: *Food Control* 63, S. 135–139. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.11.040.
- Beattie, S.; Schwarz, P. B.; Horsley, R.; Barr, J.; Casper, H. H. (1998): The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. In: *Journal of food protection* 61 (1), S. 103–106. DOI: 10.4315/0362-028x-61.1.103.

- Beccari, Giovanni; Caproni, Leonardo; Tini, Francesco; Uhlig, Silvio; Covarelli, Lorenzo (2016): Presence of *Fusarium* Species and Other Toxigenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. In: *J. Agric. Food Chem.* 64 (21), S. 4390–4399. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00702.
- Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, Peter (2008): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Mit 634 Tabellen. Sechste, vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). S. 921 – 927.
- Bencze, Szilvia; Puskás, Katalin; Vida, Gyula; Karsai, Ildikó; Balla, Krisztina; Komáromi, Judit; Veisz, Ottó (2017): Rising atmospheric CO<sub>2</sub> concentration may imply higher risk of *Fusarium* mycotoxin contamination of wheat grains. In: *Mycotoxin Res* 33 (3), S. 229–236. DOI: 10.1007/s12550-017-0281-2.
- Berthiller, Franz; Crews, Colin; Dall’Asta, Chiara; Saeger, Sarah De; Haesaert, Geert; Karlovsky, Petr et al. (2013): Masked mycotoxins: a review. In: *Molecular nutrition & food research* 57 (1), S. 165–186. DOI: 10.1002/mnfr.201100764.
- Berthiller, Franz; Schuhmacher, Rainer; Adam, Gerhard; Krska, Rudolf (2009): Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 395 (5), S. 1243–1252. DOI: 10.1007/s00216-009-2874-x.
- Bertuzzi, Terenzio; Rastelli, Silvia; Mulazzi, Annalisa; Donadini, Gianluca; Pietri, Amedeo (2011): Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. In: *Food Control* 22 (12), S. 2059–2064. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.06.002.
- Bessaire, Thomas; Mujahid, Claudia; Mottier, Pascal; Desmarchelier, Aurélien (2019): Multiple Mycotoxins Determination in Food by LC-MS/MS: An International Collaborative Study. In: *Toxins* 11 (11). DOI: 10.3390/toxins11110658.
- Birck, N.M.M.; Lorini, I.; Scussel, V.M. (2006): Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection, Brazil, 2005.
- Blanc, Michel (2006): Sampling: the weak link in the sanitary quality control system of agricultural products. In: *Molecular nutrition & food research* 50 (6), S. 473–479. DOI: 10.1002/mnfr.200600009.
- Bottalico, A.; Logrieco, A. (1992): *Alternaria* plant diseases in mediterranean countries and associated mycotoxins. In: J. Chełkowski (Hg.): *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites*. Amsterdam: Elsevier (Topics in secondary metabolism, 3), S. 209–232.
- Bottalico, Antonia; Logrieco, Antonia (1998): Toxigenic *Alternaria* Species of Economic Importance. In: Marcel Dekker Inc. (Hg.): *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Unter Mitarbeit von Kanska K. Sinka und Deepak Bhatuagar. New York, S. 65 – 96.
- Breitenbach, Michael; Simon-Nobbe, Birgit (2002): The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. In: *Chemical immunology* 81, S. 48–72. DOI: 10.1159/000058862.
- Bretrträger, Marina; Becker, Thomas; Gastl, Martina (2022): Screening of Mycotoxigenic Fungi in Barley and Barley Malt (*Hordeum vulgare* L.) Using Real-Time PCR—A Comparison between Molecular Diagnostic and Culture Technique. In: *Foods* (Basel, Switzerland) 11 (8), S. 1149. DOI: 10.3390/foods11081149.
- Briggs, Dennis E.; McGuinness, Geraldine (1993): Microbes on barley grains. In: *Journal of the Institute of Brewing* 99 (3), S. 249–255. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1993.tb01168.x.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (2021): Herstellung von Malz 2015/2016 bis 2020/2021. Online verfügbar unter [www.ble.de](http://www.ble.de), zuletzt geprüft am 14.03.2022.



- Burkhardt, B.; Jung, S. A.; Pfeiffer, E.; Weiss, C.; Metzler, M. (2012): Mouse hepatoma cell lines differing in aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling have different activities for glucuronidation. In: *Archives of toxicology* 86 (4), S. 643–649. DOI: 10.1007/s00204-011-0789-8.
- Burkhardt, Britta; Pfeiffer, Erika; Metzler, Manfred (2009): Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. In: *Mycotoxin research* 25 (3), S. 149–157. DOI: 10.1007/s12550-009-0022-2.
- Burkin, A. A.; Kononenko, G. P. (2011): Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. In: *Appl Biochem Microbiol* 47 (1), S. 72–76. DOI: 10.1134/S0003683811010030.
- Castañares, Eliana; Pavicich, Maria A.; Dinolfo, Maria I.; Moreyra, Federico; Stenglein, Sebastián A.; Patriarca, Andrea (2020): Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in malting barley grains in the main producing region of Argentina. In: *Journal of the science of food and agriculture* 100 (3), S. 1004–1011. DOI: 10.1002/jsfa.10101.
- Castegnaro, Marcel; Tozlovanu, Marianna; Wild, Christopher; Molinié, Anne; Sylla, Abdoulay; Pfohl-Leskowicz, Annie (2006): Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. In: *Molecular nutrition & food research* 50 (6), S. 480–487. DOI: 10.1002/mnfr.200500264.
- Cochrane, M. (1994): Observations on the Germ Aleurone of Barley. Phenol Oxidase and Peroxidase Activity. In: *Annals of Botany* 73 (2), S. 121–128. DOI: 10.1006/anbo.1994.1014.
- Combina, M.; Dalcero, A.; Torres, A. (1998): Spectrometric studies on stability of tenuazonic acid (TeA) solution in organic solvents. In: *Mycotoxin research* 14 (2), S. 54–59. DOI: 10.1007/BF02945094.
- Combina, M.; Dalcero, A.; Varsavsky, E.; Torres, A.; Etcheverry, M.; Rodriguez, M.; Gonzalez, Q. H. (1999): Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour. In: *Mycotoxin research* 15 (1), S. 33–38. DOI: 10.1007/BF02945212.
- Conner, R. L.; Davidson, J. G. N. (1988): Resistance in wheat to black point caused by *Alternaria alternata* and *Cochliobolus sativus*. In: *Can. J. Plant Sci.* 68 (2), S. 351–359. DOI: 10.4141/cjps88-046.
- Cuperlovic-Culf, Miroslava; Vaughan, Martha M.; Vermillion, Karl; Surendra, Anu; Teresi, Jennifer; McCormick, Susan P. (2019): Effects of Atmospheric CO<sub>2</sub> Level on the Metabolic Response of Resistant and Susceptible Wheat to *Fusarium graminearum* Infection. In: *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 32 (4), S. 379–391. DOI: 10.1094/MPMI-06-18-0161-R.
- Davis, V. M.; Stack, M. E. (1991): Mutagenicity of stemphylltoxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. In: *Applied and environmental microbiology* 57 (1), S. 180–182.
- Delaunay-Bertoncini, N.; Hennion, M.-C. (2004): Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis—coupling with HPLC and CE—perspectives. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (4), S. 717–736. DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00559-4.
- Delgado, T.; Gómez-Cordovés, C.; Scott, P. M. (1996): Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 731 (1-2), S. 109–114. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01200-1.

- Dellafiora, Luca; Dall'Asta, Chiara (2016): Masked mycotoxins: An emerging issue that makes renegotiable what is ordinary. In: *Food chemistry* 213, S. 534–535. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.112.
- Delmulle, B.; Saeger, S. de; Adams, A.; Kimpe, N. de; van Peteghem, C. (2006): Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 20 (5), S. 771–776. DOI: 10.1002/rcm.2373.
- Deutscher Wetterdienst (30.12.2020): Deutschlandwetter im Jahr 2020. Uwe Kirschner; Andreas Friedrich. Online verfügbar unter [https://www.dwd.de/DE/presse/pressemittelungen/DE/2020/20201230\\_deutschlandwetter\\_jahr\\_2020.html?nn=714786](https://www.dwd.de/DE/presse/pressemittelungen/DE/2020/20201230_deutschlandwetter_jahr_2020.html?nn=714786), zuletzt geprüft am 16.03.2021.
- Dong, Maofeng; Si, Wenshuai; Jiang, Keqiu; Nie, Dongxia; Wu, Yongjiang; Zhao, Zihui et al. (2015): Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents for simultaneous determination of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Journal of chromatography. A* 1423, S. 177–182. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.10.068.
- Doran, Peter J.; Briggs, Dennis E. (1993): Microbes and grain germination. In: *Journal of the Institute of Brewing* 99 (2), S. 165–170. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1993.tb01160.x.
- Drakopoulos, Dimitrios; Sulyok, Michael; Krska, Rudolf; Logrieco, Antonio F.; Vogelgsang, Susanne (2021): Raised concerns about the safety of barley grains and straw: A Swiss survey reveals a high diversity of mycotoxins and other fungal metabolites. In: *Food Control* 125, S. 107919. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107919.
- Dudoiu, R.; Cristea, S.; Lupu, C.; Popa, D.; Oprea, M. (2016): Microflora associated with maize grains during storage period. In: *AgroLife Scientific Journal* 5 (1), S. 63 – 68.
- Durbin, R. D.; Uchytel, T. F. (1977): A survey of plant insensitivity to tentoxin. In: *Phytopathology* (67), S. 602–603.
- Dušek, Martin; Běláková, Sylvie; Piacentini, Karim Cristina; Jandovská, Vladimíra (2021): Fate and Behavior of Field-Applied Pesticides during Malting and Mashing Processes. In: *J. Agric. Food Chem.* 69 (31), S. 8649–8659. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01120.
- Dzuman, Zbynek; Zachariasova, Milena; Lacina, Ondrej; Veprikova, Zdenka; Slavikova, Petra; Hajslova, Jana (2014): A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. In: *Talanta* 121, S. 263–272. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.12.064.
- Effenberger, Isabelle; Hoffmann, Thomas; Jonczyk, Rafal; Schwab, Wilfried (2019): Novel biotechnological glucosylation of high-impact aroma chemicals, 3(2H)- and 2(5H)-furanones. In: *Sci Rep* 9 (1), S. 10943. DOI: 10.1038/s41598-019-47514-9.
- Ellis, S. A.; Gooding, M. J.; Thompson, A. J. (1996): Factors influencing the relative susceptibility of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to blackpoint. In: *Crop Protection* 15 (1), S. 69–76. DOI: 10.1016/0261-2194(95)00115-8.
- Escobar, Jacqueline; Lorán, Susana; Giménez, Isabel; Ferruz, Elena; Herrera, Marta; Herrera, Antonio; Ariño, Agustín (2013): Occurrence and exposure assessment of *Fusarium* mycotoxins in maize germ, refined corn oil and margarine. In: *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 62, S. 514–520. DOI: 10.1016/j.fct.2013.09.020.

- Escrivá, Laura; Oueslati, Souheib; Font, Guillermina; Manyes, Lara (2017): *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. In: *Journal of Food Quality* 2017 (5), S. 1–20. DOI: 10.1155/2017/1569748.
- European Commission (2002): Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. 2002/657/EG.
- European Commission (2006): Commission Regulation (EC) No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuff.
- EFSA - European Food Safety Authority (2011): Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. In: *EFSA Journal* 9 (10), S. 2407. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2407.
- Fehr, Markus; Pahlke, Gudrun; Fritz, Jessica; Christensen, Morten O.; Boege, Fritz; Altemöller, Martina et al. (2009): Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II $\alpha$  isoform. In: *Molecular nutrition & food research* 53 (4), S. 441–451. DOI: 10.1002/mnfr.200700379.
- Felšöciová, Soňa; Kowalczewski, Przemysław Łukasz; Krajčovič, Tomáš; Dráb, Štefan; Kačániová, Miroslava (2021): Effect of Long-Term Storage on Mycobiota of Barley Grain and Malt. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 10 (8). DOI: 10.3390/plants10081655.
- Fente, C. A.; Jaimez, J.; Vázquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A. (1998): Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. In: *The Analyst* 123 (11), S. 2277–2280. DOI: 10.1039/a804587i.
- Fernandez, M. R.; Conner, R. L. (2011): Black Point and Smudge in Wheat. In: *Prairie Soils & Crops Journal* (4), S. 158–164.
- Flannigan, B. (1969): Microflora of dried barley grain. In: *Transactions of the British Mycological Society* 53 (3), S. 371–379. DOI: 10.1016/S0007-1536(69)80095-1.
- Fleck, Stefanie C.; Pfeiffer, Erika; Podlech, Joachim; Metzler, Manfred (2014): Epoxide reduction to an alcohol: a novel metabolic pathway for perylene quinone-type *alternaria* mycotoxins in mammalian cells. In: *Chemical research in toxicology* 27 (2), S. 247–253. DOI: 10.1021/tx400366w.
- Fleck, Stefanie C.; Sauter, Friederike; Pfeiffer, Erika; Metzler, Manfred; Hartwig, Andrea; Köberle, Beate (2016): DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphyliotoxin III in cultured cells. In: *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 798-799, S. 27–34. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.02.001.
- Fleurat-Lessard, Francis (2017): Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update. In: *Journal of Stored Products Research* 71, S. 22–40. DOI: 10.1016/j.jspr.2016.10.002.
- Fraeyman, Sophie; Croubels, Siska; Devreese, Mathias; Antonissen, Gunther (2017): Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. In: *Toxins* 9 (7). DOI: 10.3390/toxins9070228.
- Frank, Oliver; Kreissl, Johanna Karoline; Daschner, Andreas; Hofmann, Thomas (2014): Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative

- (1)h NMR spectroscopy. In: *J. Agric. Food Chem.* 62 (12), S. 2506–2515. DOI: 10.1021/jf405529b.
- Gergen, Peter J.; Turkeltaub, Paul C.; Kovar, Mary Grace (1987): The prevalence of allergic skin test reactivity to eight common aeroallergens in the U.S. population: Results from the second National Health and Nutrition Examination Survey. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 80 (5), S. 669–679. DOI: 10.1016/0091-6749(87)90286-7.
- Giménez, Isabel; Herrera, Marta; Escobar, Jacqueline; Ferruz, Elena; Lorán, Susana; Herrera, Antonio; Ariño, Agustín (2013): Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled germ during wheat milling and analysis of toxin levels in wheat germ and wheat germ oil. In: *Food Control* 34 (2), S. 268–273. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.04.033.
- Gökmen, Vural; Senyuva, Hamide Z.; Acar, Jale; Sarioğlu, Kemal (2005): Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1088 (1-2), S. 193–199. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.094.
- Gotthardt, Marina; Asam, Stefan; Gunkel, Klara; Moghaddam, Atefeh Fooladi; Baumann, Elisabeth; Kietz, Roland; Rychlik, Michael (2019): Quantitation of Six *Alternaria* Toxins in Infant Foods Applying Stable Isotope Labeled Standards. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 109. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00109.
- Gotthardt, Marina; Kanawati, Basem; Schmidt, Frank; Asam, Stefan; Hammerl, Richard; Frank, Oliver et al. (2020): Comprehensive Analysis of the *Alternaria* Mycobolome Using Mass Spectrometry Based Metabolomics. In: *Molecular nutrition & food research* 64 (3), e1900558. DOI: 10.1002/mnfr.201900558.
- Grabarkiewicz-Szczesna, J.; Chełkowski, J. (1992): Metabolites produced by *Alternaria* species and their natural occurrence in Poland. In: J. Chełkowski (Hg.): *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites*. Amsterdam: Elsevier (Topics in secondary metabolism, 3), S. 363–380.
- Greenberg, N. A.; Shipe, W. F. (1979): Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. In: *J Food Science* 44 (3), S. 735–737. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb08487.x.
- Gruber Schley S.; Thalmann A. (1988): The occurrence of *Alternaria* spp. and their toxins in grain and possible connections to a bad performance of farm animals. In: *Landwirtschaftliche Forschung* (41), S. 11–19.
- Grusie, T.; Cowan, V.; Singh, J.; McKinnon, J.; Blakley, B. (2017): Correlation and variability between weighing, counting and analytical methods to determine ergot (*Claviceps purpurea*) contamination of grain. In: *World Mycotoxin Journal* 10 (3), S. 209–218. DOI: 10.3920/WMJ2016.2174.
- Guo, Wenbo; Fan, Kai; Nie, Dongxia; Meng, Jiajia; Huang, Qingwen; Yang, Junhua et al. (2019): Development of a QuEChERS-Based UHPLC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Six *Alternaria* Toxins in Grapes. In: *Toxins* 11 (2). DOI: 10.3390/toxins11020087.
- Habler, Katharina; Geissinger, Cajetan; Hofer, Katharina; Schüller, Jan; Moghari, Sarah; Hess, Michael et al. (2017): Fate of *Fusarium* Toxins during Brewing. In: *J. Agric. Food Chem.* 65 (1), S. 190–198. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04182.
- Hädrich, J.; Vogelgesang, J. (1999): Konzept 2000 - Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis, Teil 1: Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze - Concept 2000: A Statistical Approach for Analytical Practice, Part 1: Limits of Detection,

- Identification and Determination. In: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht* 95 (10), S. 428–436.
- Hägglom, P.; Stepinska, A.; Solyakov, A. (2007): *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. In: Proceedings of the 29<sup>th</sup> Mycotoxin Research Seminar, Fellbach, Germany, S. 35.
- Halloin, J. M.; Zoeten, G. A. de; Walker, J. C. (1970): The effects of tentoxin on chlorophyll synthesis and plastid structure in cucumber and cabbage. In: *Plant physiology* 45 (3), S. 310–314. DOI: 10.1104/pp.45.3.310.
- Halonen, M.; Stern, D. A.; Wright, A. L.; Taussig, L. M.; Martinez, F. D. (1997): *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 155 (4), S. 1356–1361. DOI: 10.1164/ajrccm.155.4.9105079.
- Hanson, E. W.; Christensen, J. J. (1953): The black point disease of wheat in the United States. In: *Technical Bulletin* (206), S. 3–30.
- Härtl, K.; McGraphery, K.; Rüdiger, J.; Schwab, W. (2017): Tailoring natural products with glycosyltransferases. In: *Biotechnology of Natural Products*, Springer International Publishing AG 2018, S. 219-263. DOI: 10.1007/978-3-319-67903-7
- Hart, L. P.; Schabenberger, O. (1998): Variability of Vomitoxin in Truckloads of Wheat in a Wheat Scab Epidemic Year. In: *Plant disease* 82 (6), S. 625–630. DOI: 10.1094/PDIS.1998.82.6.625.
- Harvan, D. J.; Pero, R. W. (1974): Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid. In: *Journal of Chromatography A* 101 (1), S. 222–224. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94755-7.
- Hess, M.; Nyman, M.; Hausladen, H.; Weigand, S. (2011): Blattfleckenkomplex an der Gerste - Ursachen und Gegenmaßnahmen. In: LfL - Jahrestagung, 9. Kulturlandschaftstag, S. 37–46.
- Hickert, Sebastian; Krug, Isabel; Cramer, Benedikt; Humpf, Hans-Ulrich (2015): Detection and Quantitative Analysis of the Non-cytotoxic allo-Tenuazonic Acid in Tomato Products by Stable Isotope Dilution HPLC-MS/MS. In: *J. Agric. Food Chem.* 63 (50), S. 10879–10884. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04812.
- Hudec, K.; Muchova, D. (2008): Correlation between black point symptoms and fungal infestation and seedling viability of wheat kernels. In: *Plant Protect. Sci.*, 44: 138-146, DOI: 10.17221/14/2008-PPS\_
- Huertas-Pérez, J. Fernando; Arroyo-Manzanares, Natalia; García-Campaña, Ana M.; Gámiz-Gracia, Laura (2017): Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 57 (16), S. 3405–3420. DOI: 10.1080/10408398.2015.1126548.
- Inoue, Tomonori; Nagatomi, Yasushi; Uyama, Atsuo; Mochizuki, Naoki (2013): Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77 (7), S. 1410–1415. DOI: 10.1271/bbb.130027.
- Irakli, Maria N.; Skendi, Adriana; Papageorgiou, Maria D. (2017): HPLC-DAD-FLD Method for Simultaneous Determination of Mycotoxins in Wheat Bran. In: *Journal of chromatographic science* 55 (7), S. 690–696. DOI: 10.1093/chromsci/bmx022.
- Jacob, Fritz; Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission, (2011): Raw materials. barley, adjuncts, malt, hops and hop products: collection of brewing analysis methods of

- the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK). Chairman Dr. Fritz Jacob MEBAK, self-published by MEBAK, Freising-Weihenstephan, 127 – 128.
- Jacobs, Beatrix; Rabie, C. J. (1987): The correlation between mycelial presence and black point in barley. In: *Phytophylactica* (19), S. 77–81.
- Janić Hajnal, Elizabet; Orčić, Dejan; Torbica, Aleksandra; Kos, Jovana; Mastilović, Jasna; Škrinjar, Marija (2015): *Alternaria* toxins in wheat from the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: a preliminary survey. In: *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 32 (3), S. 361–370. DOI: 10.1080/19440049.2015.1007533.
- Jiang, Dongmei; Wei, Dizhe; Wang, Liuqing; Ma, Shuai; Du, Yuanfang; Wang, Meng (2018): Multiwalled Carbon Nanotube for One-Step Cleanup of 21 Mycotoxins in Corn and Wheat Prior to Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis. In: *Toxins* 10 (10). DOI: 10.3390/toxins10100409.
- Jodlbauer, Justus; Maier, Norbert M.; Lindner, Wolfgang (2002): Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. In: *Journal of Chromatography A* 945 (1-2), S. 45–63. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01504-7.
- Juan, C.; Mañes, J.; Font, G.; Juan-García, A. (2017): Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. In: *LWT* 86, S. 344–351. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.020.
- Kalogiouri, Natasa P.; Papadakis, Emmanouil-Nikolaos; Maggalou, Maria G.; Karaoglanidis, George S.; Samanidou, Victoria F.; Menkissoglu-Spiroudi, Urania (2021): Development of a Microwave-Assisted Extraction Protocol for the Simultaneous Determination of Mycotoxins and Pesticide Residues in Apples by LC-MS/MS. In: *Applied Sciences* 11 (22), S. 10931. DOI: 10.3390/app112210931.
- Kang, Z.; Buchenauer, H. (2002): Studies on the Infection Process of *Fusarium Culmorum* in Wheat Spikes: Degradation of Host Cell Wall Components and Localization of Trichothecene Toxins in Infected Tissue. In: *Eur J Plant Pathol* 108 (7), S. 653–660. DOI: 10.1023/A:1020627013154.
- Kelman, Megan J.; Renaud, Justin B.; Seifert, Keith A.; Mack, Jonathan; Sivagnanam, Kumaran; Yeung, Ken K-C; Sumarah, Mark W. (2015): Identification of six new *Alternaria* sulfoconjugated metabolites by high-resolution neutral loss filtering. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 29 (19), S. 1805–1810. DOI: 10.1002/rcm.7286.
- Kocic-Tanackov, Suncica; Skrinjar, Marija; Grujic, Olgica; Pejin, Jelena (2005): Fungal growth during malting of barley. In: *Acta per tech* (36), S. 51–60. DOI: 10.2298/APT0536051K.
- Köppen, Robert; Koch, Matthias; Siegel, David; Merkel, Stefan; Maul, Ronald; Nehls, Irene (2010): Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. In: *Applied microbiology and biotechnology* 86 (6), S. 1595–1612. DOI: 10.1007/s00253-010-2535-1.
- Kosiak, Barbara; Torp, Mona; Skjerve, Eystein; Andersen, Birgitte (2004): *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study. In: *International journal of food microbiology* 93 (1), S. 51–62. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006.
- Krasauskas, Aurimas (2017): Fungi in malting barley grain and malt production. In: *biologija* 63 (3). DOI: 10.6001/biologija.v63i3.3583.

- Kroes, R.; Kleiner, J.; Renwick, A. (2005): The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. In: *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 86 (2), S. 226–230. DOI: 10.1093/toxsci/kfi169.
- Kromidas, Stavros (2011): Validierung in der Analytik. 2., überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, S. 47-198.
- Krska, Rudolf; Welzig, Elvira; Berthiller, F.; Molinelli, A.; Mizaikoff, B. (2005): Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. In: *Food additives and contaminants* 22 (4), S. 345–353. DOI: 10.1080/02652030500070192.
- Kumar Dikkala, P.; Hymavathi, T. V.; Roberts, P.; Sujatha, M. (2018): Effect of Heat Treatment and Gamma Irradiation on the Total Bacterial Count of Selected Millet Grains (Jowar, Bajra and Foxtail). In: *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7 (2), S. 1293–1300. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.702.158.
- Kunze, W.; Dietzsch, M.; Mieth, H. O. (2016): Technologie Brauer und Mälzer. 11., völlig neu bearb. Aufl. Berlin: VLB, S. 119-202.
- Kütt, M-L.; Loiveke, H.; Tanner, R. (2010): Detection of alternariol in Estonian grain samples. In: *Agronomy Research* (8), S. 317–322.
- Laitila, Arja; Kotaviita, Erja; Peltola, Petri; Home, Silja; Wilhelmson, Annika (2007): Indigenous Microbial Community of Barley Greatly Influences Grain Germination and Malt Quality. In: *Journal of the Institute of Brewing* 113 (1), S. 9–20. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2007.tb00250.x.
- Lancova, K.; Hajslova, J.; Poustka, J.; Krplova, A.; Zachariasova, M.; Dostalek, P.; Sachambula, L. (2008): Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. In: *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 25 (6), S. 732–744. DOI: 10.1080/02652030701779625.
- Lattanzio, Veronica Maria Teresa; Solfrizzo, Michele; Powers, Steve; Visconti, Angelo (2007): Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 21 (20), S. 3253–3261. DOI: 10.1002/rcm.3210.
- Lee, Hyang Burm; Patriarca, Andrea; Magan, Naresh (2015): *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. In: *Mycobiology* 43 (2), S. 93–106. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.2.93.
- Leslie, John F.; Summerell, Brett A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. 1<sup>st</sup> ed., Blackwell Publishing, S. 21 – 30.
- Li, C. D.; Lance, R. C. M.; Collins, H. M.; Tarr, A.; Roumeliotis, S.; Harasymow, S. et al. (2003): Quantitative trait loci controlling kernel discoloration in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Aust. J. Agric. Res.* 54 (12), S. 1251. DOI: 10.1071/ar03002.
- Liu, Yang; Rychlik, Michael (2013): Development of a stable isotope dilution LC-MS/MS method for the *Alternaria* toxins tentoxin, dihydrotentoxin, and isotentoxin. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (12), S. 2970–2978. DOI: 10.1021/jf305111w.

- Liu, Yang; Rychlik, Michael (2015): Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (5), S. 1357–1369. DOI: 10.1007/s00216-014-8307-5.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Solfrizzo, M. (2009): *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. In: *World Mycotoxin Journal* 2 (2), S. 129–140. DOI: 10.3920/WMJ2009.1145.
- Magan, N.; Medina, A.; Aldred, D. (2011): Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. In: *Plant Pathol* 60 (1), S. 150–163. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02412.x.
- Magan, Naresh; Aldred, David (2007): Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. In: *International journal of food microbiology* 119 (1-2), S. 131–139. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034.
- Mahony, J. O.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Mizaikoff, B. (2005): Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. In: *Analytica chimica acta* 534 (1), S. 31–39. DOI: 10.1016/j.aca.2004.07.043.
- Maier, Norbert M.; Buttinger, Gerhard; Welhartizki, Silvia; Gavioli, Elena; Lindner, Wolfgang (2004): Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 804 (1), S. 103–111. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.01.014.
- Man, Yan; Liang, Gang; an Li; Pan, Ligang (2017): Analytical Methods for the Determination of *Alternaria* Mycotoxins. In: *Chromatographia* 80 (1), S. 9–22. DOI: 10.1007/s10337-016-3186-x.
- Mandel, John; Mansfield, J. E. (1964): The Statistical Analysis of Experimental Data. In: *Physics Today* 18 (9), S. 66–68. DOI: 10.1063/1.3047724.
- Marasas, W.F.O.; van Wyk, P. S.; Jacobs, G. (1990): Black-point of barley: colonisation of trichomes by *Alternaria alternata*. In: *Phytophylactica* (22), S. 251–253.
- Marvin, Hans J.P.; Kleter, Gijs A.; van der Fels-Klerx, H. J.; Noordam, Maryvon Y.; Franz, Eelco; Willems, Don J.M.; Boxall, Alistair (2013): Proactive systems for early warning of potential impacts of natural disasters on food safety: Climate-change-induced extreme events as case in point. In: *Food Control* 34 (2), S. 444–456. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.04.037.
- Medina, Angel; Valle-Algarra, Francisco M.; Mateo, Rufino; Gimeno-Adelantado, José V.; Mateo, Fernando; Jiménez, Misericordia (2006): Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. In: *International journal of food microbiology* 108 (2), S. 196–203. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.003.
- Melloy, P.; Hollaway, G.; Luck, J. O.; Norton, R. O.B.; Aitken, E.; Chakraborty, S. (2010): Production and fitness of *Fusarium pseudograminearum* inoculum at elevated carbon dioxide in FACE. In: *Global Change Biology* 16 (12), S. 3363–3373. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2010.02178.x.
- Meronuck, R. A.; Steele, J. A.; Mirocha, C. J.; Christensen, C. M. (1972): Tenuazonic acid, a toxic produced by *Alternaria alternata*. In: *Applied microbiology* 23 (3), S. 613–617.



- Mikula, Hannes; Skrinjar, Philipp; Sohr, Barbara; Ellmer, Doris; Hametner, Christian; Fröhlich, Johannes (2013): Total synthesis of masked *Alternaria* mycotoxins—sulfates and glucosides of alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME). In: *Tetrahedron* 69 (48), S. 10322–10330. DOI: 10.1016/j.tet.2013.10.008.
- Miraglia, M.; Marvin, H. J. P.; Kleter, G. A.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E. et al. (2009): Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (5), S. 1009–1021. DOI: 10.1016/j.fct.2009.02.005.
- Miró-Abella, Eugènia; Herrero, Pol; Canela, Núria; Arola, Lluís; Borrull, Francesc; Ras, Rosa; Fontanals, Núria (2017): Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Food chemistry* 229, S. 366–372. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.078.
- Miyake, Y.; Hashimoto, K.; Matsuki, H.; Ono, M.; Tajima, R. (2002): Fate of Insecticide and Fungicide Residues on Barley during Storage and Malting. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60 (3), S. 110–115. DOI: 10.1094/ASBCJ-60-0110.
- Moressi, M. (1999): Amperometric quantification of *Alternaria* mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode. In: *Electrochemistry Communications* 1 (10), S. 472–476. DOI: 10.1016/S1388-2481(99)00096-X.
- Motoyama, Takayuki; Yun, Choong-Soo; Osada, Hiroyuki (2021): Biosynthesis and biological function of secondary metabolites of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 48 (9-10). DOI: 10.1093/jimb/kuab058.
- Müller, M. E. H.; Steier, I.; Köppen, R.; Siegel, D.; Proske, M.; Korn, U.; Koch, M. (2012): Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. In: *Journal of applied microbiology* 113 (4), S. 874–887. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x.
- Nagrале, D.T.; Sharma, L.; Kumar, S.; Gawande, S.P. (2016): Recent diagnostics and detection tools: implications for plant pathogenic *Alternaria* and their disease management. In: *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*, Springer International Publishing, S. 111 – 150. DOI: 10.1007/978-3-319-27312-9
- Narziß, Ludwig; Back, Werner (2019): Die Bierbrauerei. Band 1: Die Technologie der Malzbereitung. Unter Mitarbeit von Werner Back. 8. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=5847747>.
- Narziß, Ludwig; Back, Werner; Gastl, Martina; Zarnkow, Martin (2017): Abriss der Bierbrauerei. 8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 1-100.
- Ndiaye, A.; Ndiaye, S.; Fleurat-Lessard, F. (2003): QualiGrain expert system for stored grain quality maintenance: planning optimal storage technical routes. In: P. F. Credland, D. M. Armitage, C. H. Bell, P. M. Cogan und E. Highley (Hg.): *Advances in stored product protection. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection*, York, UK, 22-26 July 2002. Wallingford: CABI, S. 978–988.
- Noots, I.; Delcour, J. A.; Michiels, C. W. (1999): From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. In: *Critical reviews in microbiology* 25 (2), S. 121–153. DOI: 10.1080/10408419991299257.

- Ostry, V. (2008): *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. In: *World Mycotoxin Journal* 1 (2), S. 175–188. DOI: 10.3920/WMJ2008.x013.
- O’Sullivan, T. F.; Walsh, Y.; O’Mahony, A.; Fitzgerald, G. F.; Sinderen, D. (1999): A Comparative Study of Malthouse and Brewhouse Microflora. In: *Journal of the Institute of Brewing* 105 (1), S. 55–61. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00006.x.
- Otani, H.; Kohmoto, K. (1992): Host-specific toxins of *Alternaria* Species. In: J. Chełkowski (Hg.): *Alternaria. Biology, plant diseases and metabolites*. Amsterdam: Elsevier (Topics in secondary metabolism, 3), S. 123–157.
- Pascale, Michelangelo; Girolamo, Annalisa de; Lippolis, Vincenzo; Stroka, Joerg; Mol, Hans G. J.; Lattanzio, Veronica M. T. (2019): Performance Evaluation of LC-MS Methods for Multimycotoxin Determination. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 102 (6), S. 1708–1720. DOI: 10.5740/jaoacint.19-0068.
- Pascale, Michelangelo; Girolamo, Annalisa de; Visconti, Angelo; Magan, Naresh; Chianella, Iva; Piletska, Elena V.; Piletsky, Sergey A. (2008): Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis. In: *Analytica chimica acta* 609 (2), S. 131–138. DOI: 10.1016/j.aca.2008.01.004.
- Pastor, F. J.; Guarro, J. (2008): *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 (8), S. 734–746. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02024.x.
- Paterson, R. Russell M.; Lima, Nelson (2010): How will climate change affect mycotoxins in food? In: *Food Research International* 43 (7), S. 1902–1914. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.07.010.
- Paterson, R.R.M.; Lima, N. (2011): Further mycotoxin effects from climate change. In: *Food Research International* 44 (9), S. 2555–2566. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.05.038.
- Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C. (2014): Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. In: *Trends in Food Science & Technology* 36 (2), S. 96–136. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.01.005.
- Pero, R. W.; Owens, R. G.; Dale, S. W.; Harvan, D. (1971a): Isolation and identification of a new toxin, altenuene, from the fungus *Alternaria tenuis*. In: *Biochimica et biophysica acta* 230 (1), S. 170–179. DOI: 10.1016/0304-4165(71)90064-x.
- Pero, R. W.; Posner, H.; Blois, M.; Harvan, D.; Spalding, J. W. (1973): Toxicity of metabolites produced by the “*Alternaria*”. In: *Environmental health perspectives* 4, S. 87–94. DOI: 10.1289/ehp.730487.
- Pero, Ronald W.; Owens, Robert G.; Harvan, Donald (1971b): Gas and thin-layer chromatographic methods for analysis of the mycotoxins altenuene, alternariol, and alternariol monomethyl ether. In: *Analytical Biochemistry* 43 (1), S. 80–88. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90110-2.
- Petters, H. I.; Flannigan, B.; Austin, B. (1988): Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production. In: *Journal of Applied Bacteriology* 65 (4), S. 279–297. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb01895.x.

- Pfeiffer, E.; Eschbach, S.; Metzler, M. (2007): *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. In: *Mycotoxin research* 23 (3), S. 152–157. DOI: 10.1007/BF02951512.
- Pfeiffer, E.; Schmit, C.; Burkhardt, B.; Altemöller, M.; Podlech, J.; Metzler, M. (2009a): Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in vitro: chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. In: *Mycotoxin research* 25 (1), S. 3–10. DOI: 10.1007/s12550-008-0001-z.
- Pfeiffer, Erika; Herrmann, Carina; Altemöller, Martina; Podlech, Joachim; Metzler, Manfred (2009b): Oxidative in vitro metabolism of the *Alternaria* toxins altenuene and isoaltenuene. In: *Molecular nutrition & food research* 53 (4), S. 452–459. DOI: 10.1002/mnfr.200700501.
- Pirinçi, Şerife Şeyda; Ertekin, Özlem; Laguna, Duygu Ercan; Özen, Fehime Şeyma; Öztürk, Zafer Ziya; Öztürk, Selma (2018): Label-Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 18 (4). DOI: 10.3390/s18041161.
- Poole, Colin F. (2003): New trends in solid-phase extraction. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (6), S. 362–373. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00605-8.
- Prelle, Ambra; Spadaro, Davide; Garibaldi, Angelo; Gullino, Maria Lodovica (2013): A new method for detection of five *Alternaria* toxins in food matrices based on LC-APCI-MS. In: *Food chemistry* 140 (1-2), S. 161–167. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.065.
- Prusova, Nela; Dzuman, Zbynek; Jelinek, Lukas; Karabin, Marcel; Hajslova, Jana; Rychlik, Michael; Stranska, Milena (2021): Free and conjugated *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins during Pilsner malt production and double-mash brewing. In: *Food chemistry* 369, S. 130926. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130926.
- Puangkham, S.; Poapolathep, A.; Jermnak, U.; Imsilp, K.; Tanhan, P.; Chokejaroenrat, C.; Poapolathep, S. (2017): Monitoring and health risk of mycotoxins in imported wines and beers consumed in Thailand. In: *World Mycotoxin Journal* 10 (4), S. 401–409. DOI: 10.3920/WMJ2017.2216.
- Puntscher, Hannes; Hankele, Svenja; Tillmann, Katharina; Attakpah, Eva; Braun, Dominik; Kütt, Mary-Liis et al. (2019): First insights into *Alternaria* multi-toxin in vivo metabolism. In: *Toxicology letters* 301, S. 168–178. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.10.006.
- Puntscher, Hannes; Kütt, Mary-Liis; Skrinjar, Philipp; Mikula, Hannes; Podlech, Joachim; Fröhlich, Johannes et al. (2018): Tracking emerging mycotoxins in food: development of an LC-MS/MS method for free and modified *Alternaria* toxins. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 410 (18), S. 4481–4494. DOI: 10.1007/s00216-018-1105-8.
- Raistrick, H.; Sticking, C. E.; Thomas, R. (1953): Studies in the biochemistry of microorganisms. 90. Alternariol and alternariol monomethyl ether, metabolic products of *Alternaria tenuis*. In: *The Biochemical journal* 55 (3), S. 421–433. DOI: 10.1042/bj0550421.
- Ramires, Francesca A.; Masiello, Mario; Somma, Stefania; Villani, Alessandra; Susca, Antonia; Logrieco, Antonio F. et al. (2018): Phylogeny and Mycotoxin Characterization of *Alternaria* Species Isolated from Wheat Grown in Tuscany, Italy. In: *Toxins* 10 (11), S. 472. DOI: 10.3390/toxins10110472.
- Ramírez-Jiménez, Antonio; García-Villanova, Belén; Guerra-Hernández, Eduardo (2000): Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. In: *Food Research International* 33 (10), S. 833–838. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00102-2.

- Ran, Congcong; Chen, Dan; Ma, Haiyan; Jiang, Ye (2017): Graphene oxide adsorbent based dispersive solid phase extraction coupled with multi-pretreatment clean-up for analysis of trace aflatoxins in traditional proprietary Chinese medicines. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1044-1045, S. 120–126. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.01.001.
- Rausch, Ann-Kristin; Brockmeyer, Robert; Schwerdtle, Tanja (2020): Development and Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Multi-Method for the Determination of 38 Native and Modified Mycotoxins in Cereals. In: *J. Agric. Food Chem.* 68 (16), S. 4657–4669. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b07491.
- Razzazi-Fazeli, E.; Reiter, E. V. (2011): Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. In: *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed: Elsevier*, S. 37–70.
- Rees, R.; Martin, D.; Law, D. (1984): Black point in bread wheat: effects on quality and germination, and fungal associations. In: *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 24 (127), S. 601 – 605.
- Reiß, Jürgen (1998): Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Aufl. Berlin: Springer, S. 5-18.
- Rico-Yuste, A.; Walravens, J.; Urraca, J. L.; Abou-Hany, R. A. G.; Descalzo, A. B.; Orellana, G. et al. (2018): Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. In: *Food chemistry* 243, S. 357–364. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.125.
- Robeson, D.; Strobel, G; Matusumoto, G. K.; Fisher, E. L.; Chen, M. H.; Clardy, J. (1984): Alteichin: an unusual phytotoxin from *Alternaria eichorniae*, a fungal pathogen of water hyacinth. In: *Experientia* 40 (11), S. 1248–1250. DOI: 10.1007/BF01946657.
- Rodríguez-Carrasco, Yelko; Fattore, Margherita; Albrizio, Stefania; Berrada, Houda; Mañes, Jordi (2015): Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. In: *Food chemistry* 178, S. 149–155. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.092.
- Roháčik, T.; Hudec, K. (2008): Fungal infection of malt barley kernels in Slovak Republic. In: *Plant Protect. Sci.* 43 (No. 3), S. 86–95. DOI: 10.17221/2249-PPS.
- Rosett, T.; Sankhala, R. H.; Stickings, C. E.; Taylor, M. E.; Thomas, R. (1957): Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct; culture filtrate products. In: *The Biochemical journal* 67 (3), S. 390–400. DOI: 10.1042/bj0670390.
- Rotem, Joseph (1998): The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology, and pathogenicity. 2<sup>nd</sup> print. St. Paul, Minn: APS-Press, S. 11-34 und 77-94.
- Rotondo, Francesca; Hong, Soon Gyu; Peever, Tobin; Pryor, Barry M. (2018): Molecular diversity and allergenic profiles of *Alternaria* spp. from desert environments in Arizona. In: *Fungal biology* 122 (1), S. 74–85. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.10.010.
- Rychlik, Michael; Humpf, Hans-Ulrich; Marko, Doris; Dänicke, Sven; Mally, Angela; Berthiller, Franz et al. (2014): Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. In: *Mycotoxin research* 30 (4), S. 197–205. DOI: 10.1007/s12550-014-0203-5.

- Rychlik, Michael; Lepper, Hans; Weidner, Christian; Asam, Stefan (2016): Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. In: *Food Control* 68, S. 181–185. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.03.035.
- Saad, S. M.; Halloin, J. M.; Hagedorn, D. J. (1970): Production, purification, and bioassay of tentoxin. In: *Phytopathology* 60 (3), S. 415–418. DOI: 10.1094/phyto-60-415.
- Salo, Päivi M.; Arbes, Samuel J.; Sever, Michelle; Jaramillo, Renee; Cohn, Richard D.; London, Stephanie J.; Zeldin, Darryl C. (2006): Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118 (4), S. 892–898. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.07.037.
- Sanchis, V.; Sanclemente, A.; Usall, J.; Viñas, I. (1993): Incidence of Mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in Barley. In: *Journal of food protection* 56 (3), S. 246–248. DOI: 10.4315/0362-028X-56.3.246.
- Santana Oliveira, Idjane; da Silva Junior, Alberto Galdino; Andrade, Cesar Augusto Souza de; Lima Oliveira, Maria Danielly (2019): Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. In: *Current Opinion in Food Science* 29, S. 64–79. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.08.004.
- Scheibenzuber, Sophie; Dick, Fabian; Asam, Stefan; Rychlik, Michael (2021): Analysis of 13 *Alternaria* mycotoxins including modified forms in beer. In: *Mycotoxin research* 37 (2), S. 149–159. DOI: 10.1007/s12550-021-00424-0.
- Scheibenzuber, Sophie; Dick, Fabian; Bretträger, Marina; Gastl, Martina; Asam, Stefan; Rychlik, Michael (2022): Development of analytical methods to study the effect of malting on levels of free and modified forms of *Alternaria* mycotoxins in barley. In: *Mycotoxin Res.* DOI: 10.1007/s12550-022-00455-1.
- Scheibenzuber, Sophie; Hoffmann, Thomas; Effenberger, Isabelle; Schwab, Wilfried; Asam, Stefan; Rychlik, Michael (2020): Enzymatic Synthesis of Modified *Alternaria* Mycotoxins Using a Whole-Cell Biotransformation System. In: *Toxins* 12 (4). DOI: 10.3390/toxins12040264.
- Schrader, T. J.; Cherry, W.; Soper, K.; Langlois, I. (2006): Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity in vitro. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 606 (1), S. 61–71. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.02.008.
- Schrader, T. J.; Cherry, W.; Soper, K.; Langlois, I.; Vijay, H. M. (2001): Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. In: *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 21 (4), S. 261–274. DOI: 10.1002/tcm.1014.
- Schulz, Katharina; Pöhlmann, Christopher; Dietrich, Richard; Märtlbauer, Erwin; Eißner, Thomas (2019): Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins. In: *Frontiers in chemistry* 7, S. 31. DOI: 10.3389/fchem.2019.00031.
- Schwarz, Christoph; Tiessen, Christine; Kreutzer, Martin; Stark, Timo; Hofmann, Thomas; Marko, Doris (2012): Characterization of a genotoxic impact compound in *Alternaria alternata* infested rice as Altertoxin II. In: *Archives of toxicology* 86 (12), S. 1911–1925. DOI: 10.1007/s00204-012-0958-4.

- Schwarz, Paul B.; Casper, Howard H.; Beattie, Samuel (1995): Fate and Development of Naturally Occurring Fusarium Mycotoxins During Malting and Brewing 1. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53 (3), S. 121–127. DOI: 10.1094/ASBCJ-53-0121.
- Scott, P. M. (1996): Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 79 (4), S. 875–882.
- Scott, P. M.; Stoltz, D. R. (1980): Mutagens produced by *Alternaria alternata*. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology* 78 (1), S. 33–40. DOI: 10.1016/0165-1218(80)90023-3.
- Scott, P. M.; Weber, D.; Kanhere, S. R. (1997): Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria mycotoxins*. In: *Journal of Chromatography A* 765 (2), S. 255–263. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00917-X.
- Scott, Peter M. (1993): Recent developments in methods of analysis for mycotoxins in foodstuffs. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 12 (9), S. 382–386. DOI: 10.1016/0165-9936(93)87028-V.
- Scott, Peter M. (2001): Analysis of Agricultural Commodities and Foods for *Alternaria* Mycotoxins. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 84 (6), S. 1809–1817. DOI: 10.1093/jaoac/84.6.1809.
- Shigeura, H. T.; Gordon, C. N. (1963): The biological activity of tenuazonic acid. In: *Biochemistry* 2, S. 1132–1137. DOI: 10.1021/bi00905a039.
- Shotwell, O.; Goulden, M. L.; Bothast, R.; Hesseltine, C. W. (1975): Mycotoxins in hot spots in grains. I. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn. In: *Cereal Chemistry* 52 (5), S. 687 – 697.
- Siegel, David; Feist, Michael; Proske, Matthias; Koch, Matthias; Nehls, Irene (2010a): Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. In: *J. Agric. Food Chem.* 58 (17), S. 9622–9630. DOI: 10.1021/jf102156w.
- Siegel, David; Merkel, Stefan; Koch, Matthias; Nehls, Irene (2010b): Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. In: *Food chemistry* 120 (3), S. 902–906. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.070.
- Siegel, David; Rasenko, Tatjana; Koch, Matthias; Nehls, Irene (2009): Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. In: *Journal of chromatography. A* 1216 (21), S. 4582–4588. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.03.063.
- Simmons, E. G. (1992): *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria: biology, plant diseases, and metabolites / editors, J. Chelkowski and A. Visconti*, Elsevier, Amsterdam, S. 1-36.
- Singh, Gurmit; Velasquez, Ligia; Brady, Beth; Koerner, Terry; Huet, Anne-Catherine; Delahaut, Philippe (2018): Development of an Indirect Competitive ELISA for Analysis of Alternariol in Bread and Bran Samples. In: *Food Anal. Methods* 11 (5), S. 1444–1450. DOI: 10.1007/s12161-017-1126-5.
- Slaughter, Gymama (2006): Current Advances in Biosensor Design and Fabrication. In: Robert A. Meyers (Hg.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, S. 1–25.

- Solfrizzo, M.; Girolamo, A. de; Vitti, C.; Visconti, A.; van den Bulk, R. (2004): Liquid Chromatographic Determination of *Alternaria* Toxins in Carrots. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* (87), S. 101–106.
- Somsubsin, Somying; Seebunrueng, Ketsarin; Boonchiangma, Suthasinee; Srijaranai, Supalax (2018): A simple solvent based microextraction for high performance liquid chromatographic analysis of aflatoxins in rice samples. In: *Talanta* 176, S. 172–177. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.028.
- Soukup, Sebastian T.; Kohn, Beate N.; Pfeiffer, Erika; Geisen, Rolf; Metzler, Manfred; Bunzel, Mirko; Kulling, Sabine E. (2016): Sulfoglucosides as Novel Modified Forms of the Mycotoxins Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 64 (46), S. 8892–8901. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b03120.
- Stack, M. E.; Mazzola, E. P. (1989): Stemphyliotoxin III from *Alternaria alternata*. In: *Journal of natural products* 52 (2), S. 426–427. DOI: 10.1021/np50062a042.
- Stack, M. E.; Mazzola, E. P.; Page, S. W.; Pohland, A. E.; Highet, R. J.; Tempesta, M. S.; Corley, D. G. (1986): Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II, and III. In: *Journal of natural products* 49 (5), S. 866–871. DOI: 10.1021/np50047a017.
- Stack, M. E.; Prival, M. J. (1986): Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. In: *Applied and environmental microbiology* 52 (4), S. 718–722.
- Stack, Michael E.; Mislivec, Philip B.; Roach, John A. G.; Pohland, Albert E. (1985): Liquid Chromatographic Determination of Tenuazonic Acid and Alternariol Methyl Ether in Tomatoes and Tomato Products. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 68 (4), S. 640–642. DOI: 10.1093/jaoac/68.4.640.
- Steyn, Pieter S.; Rabie, Christiaan J. (1976): Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. In: *Phytochemistry* 15 (12), S. 1977–1979. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88860-3.
- Stickings, C. E. (1959): Studies in the biochemistry of micro-organisms. 106. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct.: the structure of tenuazonic acid. In: *The Biochemical journal* 72 (2), S. 332–340. DOI: 10.1042/bj0720332.
- Stinson, Edgar E.; Osman, Stanley F.; Pfeffer, Philip E. (1982): Structure of Altertoxin I, a mycotoxin from *Alternaria*. In: *J. Org. Chem.* 47 (21), S. 4110–4113. DOI: 10.1021/jo00142a020.
- Streit, Elisabeth; Schatzmayr, Gerd; Tassis, Panagiotis; Tzika, Eleni; Marin, Daniela; Taranu, Ionelia et al. (2012): Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—focus on Europe. In: *Toxins* 4 (10), S. 788–809. DOI: 10.3390/toxins4100788.
- Stroka, J.; Maragos, C. M. (2016): Challenges in the analysis of multiple mycotoxins. In: *World Mycotoxin Journal* 9 (5), S. 847–861. DOI: 10.3920/WMJ2016.2038.
- Stroka, J.; Petz, M.; Joerissen, U.; Anklam, E. (1999): Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B1 in different food and feed matrices. In: *Food additives and contaminants* 16 (8), S. 331–338. DOI: 10.1080/026520399283902.
- Tangni, E. K.; Larondelle, Y. (2002): Malts, Moulds and mycotoxins. In: *Bacteria, Yeasts and Moulds in Malting and Brewing: Proceedings of the Xth Symposium “Chair J. de Clerck”*. Leuven, Belgien, S. 1–23.

- Templeton, G. E.; Grable, C.I., Fulton, N.D.; Meyer, W. L. (1967): Tentoxin from *Alternaria Tenuis*: its isolation and characterization. In: Proceedings of the 1976 Mycotoxin Research Seminar, held at Washington, D.C., S. 27–29.
- Thomma, Bart P. H. J. (2003): *Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite. In: *Molecular plant pathology* 4 (4), S. 225–236. DOI: 10.1046/J.1364-3703.2003.00173.X.
- Thompson, Michael; Ellison, Stephen L. R.; Wood, Roger (2002): Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). In: *Pure and Applied Chemistry* 74 (5), S. 835–855. DOI: 10.1351/pac200274050835.
- Thompson, Michael; Ellison, Steven L. R.; Fajgelj, Aleš; Willetts, Paul; Wood, Roger (1999): Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. In: *Pure and Applied Chemistry* 71 (2), S. 337–348. DOI: 10.1351/pac199971020337.
- Tittlemier, S. A.; Cramer, B.; Dall’Asta, C.; Iha, M. H.; Lattanzio, V.M.T.; Malone, R. J. et al. (2019): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2017-2018. In: *World Mycotoxin Journal* 12 (1), S. 3–29. DOI: 10.3920/WMJ2018.2398.
- Toklu, Faruk; Akgul, Davut; Bicici, Mehnnet; Karakoy, Tolga (2008): The relationship between black point and fungi species and effects of black point on seed germination properties in bread wheat. In: *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* 32 (4). DOI: 10.3906/tar-0711-32.
- Tothill, I. (2011): Biosensors and nanomaterials and their application for mycotoxin determination. In: *World Mycotoxin Journal* 4 (4), S. 361–374. DOI: 10.3920/WMJ2011.1318.
- Uhlig, Silvio; Eriksen, Gunnar Sundstøl; Hofgaard, Ingerd Skow; Krska, Rudolf; Beltrán, Eduardo; Sulyok, Michael (2013): Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. In: *Toxins* 5 (10), S. 1682–1697. DOI: 10.3390/toxins5101682.
- Unger, A.; Stöger, P.; Simon-Nobbe, B.; Susani, M.; Cramer, R.; Ebner, C. et al. (1999): Clinical testing of recombinant allergens of the mold *Alternaria alternata*. In: *International archives of allergy and immunology* 118 (2-4), S. 220–221. DOI: 10.1159/000024076.
- Urraca, Javier L.; Marazuela, María Dolores; Moreno-Bondi, María C. (2006): Molecularly imprinted polymers applied to the clean-up of zearalenone and alpha-zearalenol from cereal and swine feed sample extracts. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 385 (7), S. 1155–1161. DOI: 10.1007/s00216-006-0343-3.
- van de Perre, Evelien; Jacxsens, Liesbeth; Liu, Cheng; Devlieghere, Frank; Meulenaer, Bruno de (2015): Climate impact on *Alternaria* moulds and their mycotoxins in fresh produce: The case of the tomato chain. In: *Food Research International* 68, S. 41–46. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.10.014.
- van Nierop, S. N. E.; Rautenbach, M.; Axcell, B. C.; Cantrell, I. C. (2006): The Impact of Microorganisms on Barley and Malt Quality—A Review. In: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 64 (2), S. 69–78. DOI: 10.1094/ASBCJ-64-0069.
- Vaquera, Sandra; Patriarca, Andrea; Fernández Pinto, V. (2016): Influence of environmental parameters on mycotoxin production by *Alternaria arborescens*. In: *International journal of food microbiology* 219, S. 44–49. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.003.
- Vishwanath, Vinay; Sulyok, Michael; Labuda, Roman; Bicker, Wolfgang; Krska, Rudolf (2009): Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by

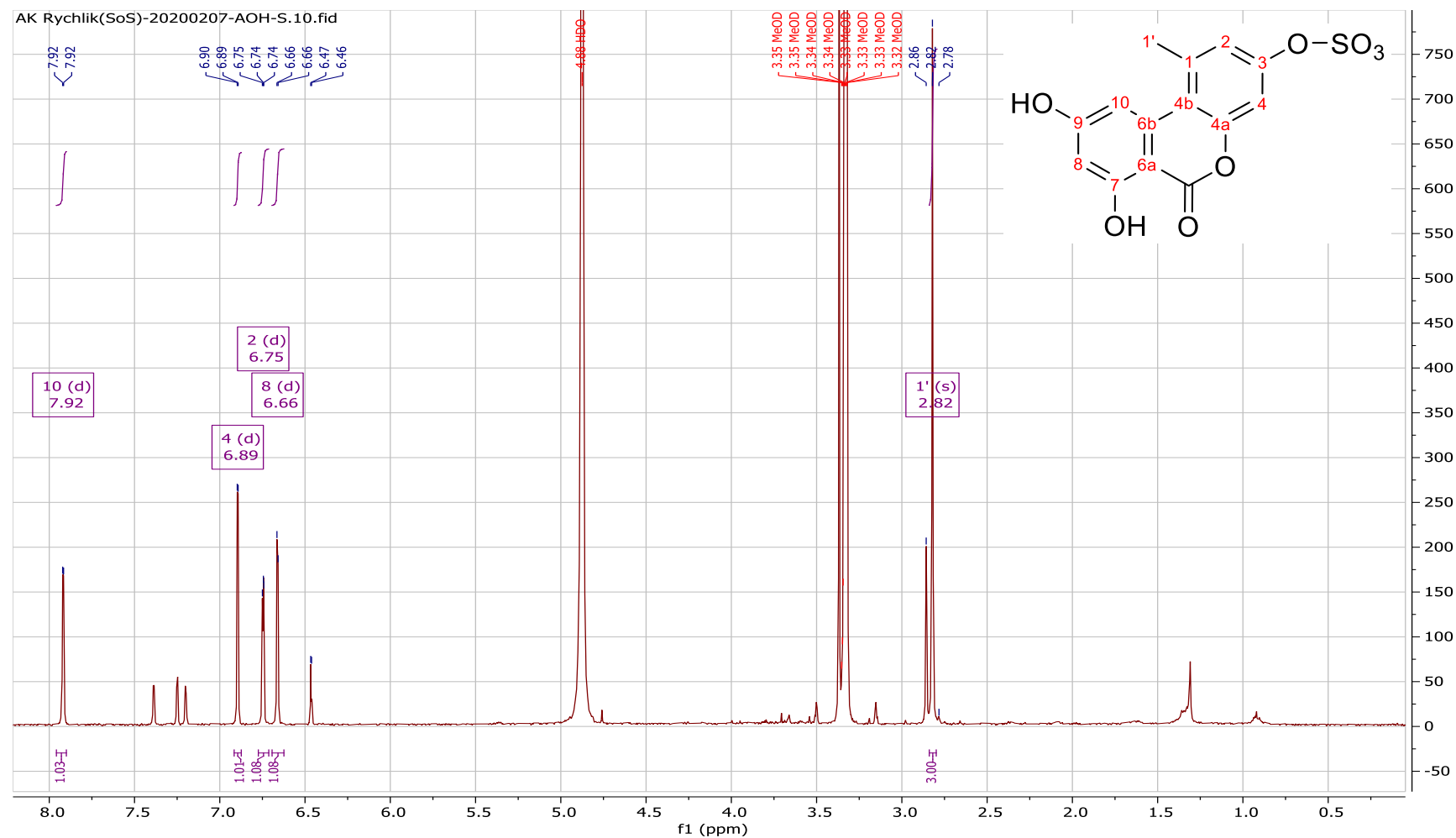


- liquid chromatography/tandem mass spectrometry. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 395 (5), S. 1355–1372. DOI: 10.1007/s00216-009-2995-2.
- Vogelgesang, J.; Hädrich, J. (1998): Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. In: *Accred Qual Assur* 3 (6), S. 242–255. DOI: 10.1007/s007690050234.
- Vučković, Jovana; Bodroža-Solarov, Marija; Vujić, Đura; Bočarov-Stančić, Aleksandra; Bagi, Ferenc (2013): The protective effect of hulls on the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spelt wheat. In: *Journal of the science of food and agriculture* 93 (8), S. 1996–2001. DOI: 10.1002/jsfa.6005.
- Walker, J. R.; Ferrar, P. H. (1998): Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. In: *Biotechnology & genetic engineering reviews* 15, S. 457–498. DOI: 10.1080/02648725.1998.10647966.
- Walker, K. Ryan; Able, Jason A.; Mather, Diane E.; Able, Amanda J. (2008): Black point formation in barley: environmental influences and quantitative trait loci. In: *Aust. J. Agric. Res.* 59 (11), S. 1021. DOI: 10.1071/AR08074.
- Walravens, Jeroen; Mikula, Hannes; Rychlik, Michael; Asam, Stefan; Ediage, Emmanuel Njumbe; Di Mavungu, José Diana et al. (2014): Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. In: *Journal of chromatography. A* 1372C, S. 91–101. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.083.
- Wang, Feng; Cai, Jun; Eremin, Sergei A.; Xiao, Zhi-Li; Shen, Yu-Dong; Tian, Yuan-Xin et al. (2018a): Fluorescence Polarization Immunoassay for *Alternaria* Mycotoxin Tenuazonic Acid Detection and Molecular Modeling Studies of Antibody Recognition. In: *Food Anal. Methods* 11 (9), S. 2455–2462. DOI: 10.1007/s12161-018-1236-8.
- Wang, Jianyi; Peng, Tao; Zhang, Xiya; Yao, Kai; Ke, Yuebin; Shao, Bing et al. (2018b): A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat. In: *Food Control* 94, S. 65–70. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.06.027.
- Whitaker, Thomas B.; Trucksess, Mary W.; Johansson, Anders S.; Geesbrecht, Francis G.; Hagler, Winston M.; Bowman, Daryl T. (1998): Variability Associated with Testing Shelled Corn for Fumonisin. In: *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 81 (6), S. 1162–1168. DOI: 10.1093/jaoac/81.6.1162.
- Williamson, P. M. (1997): Black point of wheat: in vitro production of symptoms, enzymes involved, and association with *Alternaria alternata*. In: *Aust. J. Agric. Res.* 48 (1), S. 13. DOI: 10.1071/A96068.
- Wolf-Hall, Charlene E. (2007): Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. In: *International journal of food microbiology* 119 (1-2), S. 89–94. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.030.
- Woo, So Young; Ryu, So Young; Tian, Fei; Lee, Sang Yoo; Park, Su Been; Chun, Hyang Sook (2019): Simultaneous Determination of Twenty Mycotoxins in the Korean Soybean Paste Doenjang by LC-MS/MS with Immunoaffinity Cleanup. In: *Toxins* 11 (10). DOI: 10.3390/toxins11100594.

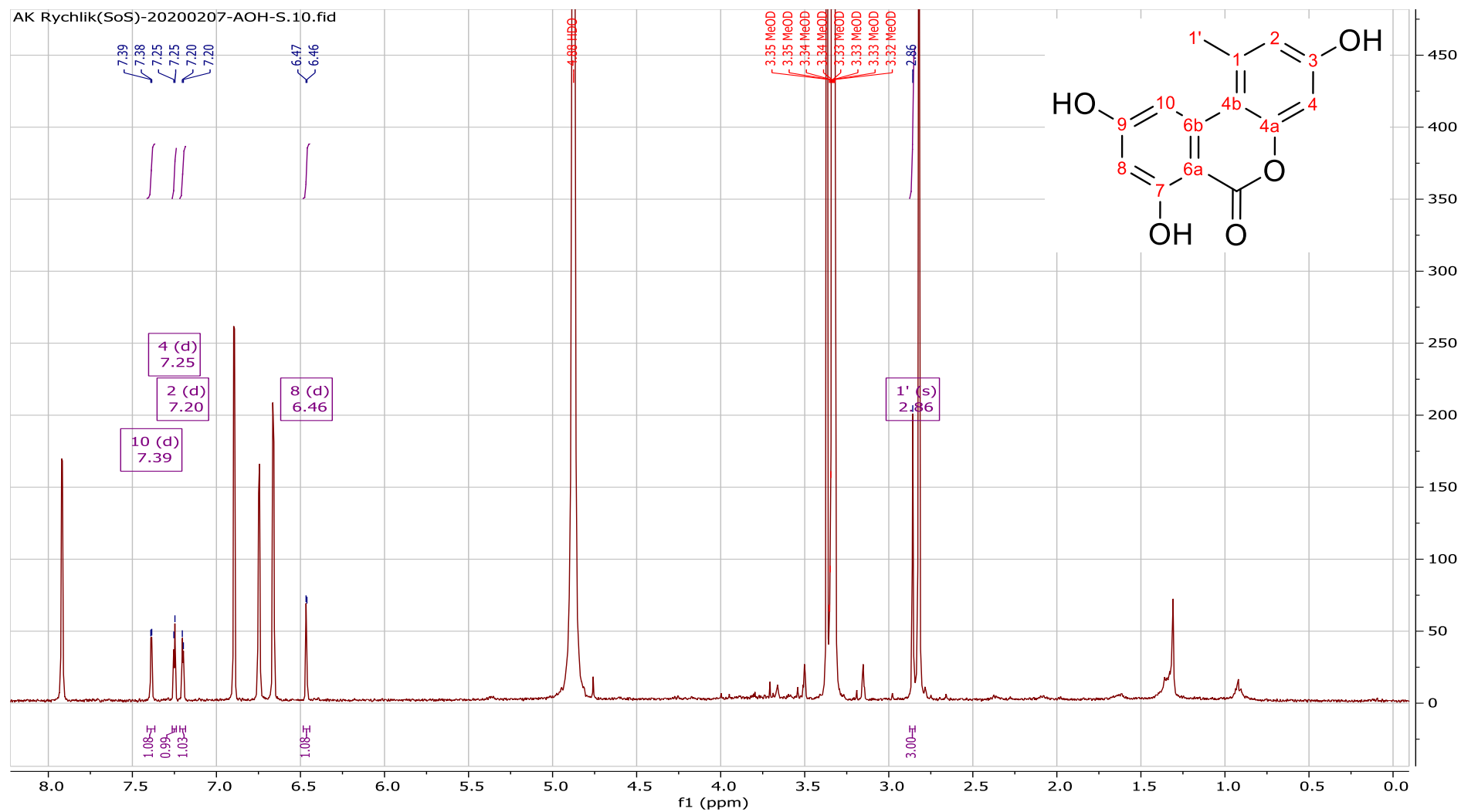
- Yekeler, H.; Bitmiş, K.; Özçelik, N.; Doymaz, M. Z.; Calta, M. (2001): Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. In: *Toxicologic pathology* 29 (4), S. 492–497. DOI: 10.1080/01926230152499980.
- Yli-Mattila, Tapani; Rämö, Sari; Hussien, Taha; Rauvola, Marion; Hietaniemi, Veli; Kaitaranta, Jukka (2017): Different grain grinding methods affect detection of *Fusarium graminearum* DNA and mycotoxins. In: *Phytopathologia Mediterranea* 56 (1). DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-20293.
- Young, Kevin; Loughman, Robert (2001): Fungal associations with weather stained barley in Western Australia. In: 10<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium.
- Yu, Wanjun; Yu, Feng-Yih; Undersander, Daniel J.; Chu, Fun S. (1999): Immunoassays of Selected Mycotoxins in Hay, Silage and Mixed Feed. In: *Food and Agricultural Immunology* 11 (4), S. 307–319. DOI: 10.1080/09540109999690.
- Zachariasova, Milena; Cajka, Tomas; Godula, Michal; Malachova, Alexandra; Veprikova, Zdenka; Hajslova, Jana (2010): Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 24 (22), S. 3357–3367. DOI: 10.1002/rcm.4746.
- Zhang, Lei; Dou, Xiao-Wen; Zhang, Cheng; Logrieco, Antonio F.; Yang, Mei-Hua (2018): A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. In: *Toxins* 10 (2). DOI: 10.3390/toxins10020065.
- Zhou, Simon N.; Lai, Edward P. C.; Miller, J. David (2004): Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid-phase extraction and pulsed elution. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 378 (8), S. 1903–1906. DOI: 10.1007/s00216-003-2409-9.
- Zwickel, Theresa; Kahl, Sandra M.; Rychlik, Michael; Müller, Marina E. H. (2018): Chemotaxonomy of Mycotoxigenic Small-Spored *Alternaria* Fungi - Do Multitoxin Mixtures Act as an Indicator for Species Differentiation? In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 1368. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01368.

## **8. Anhang**

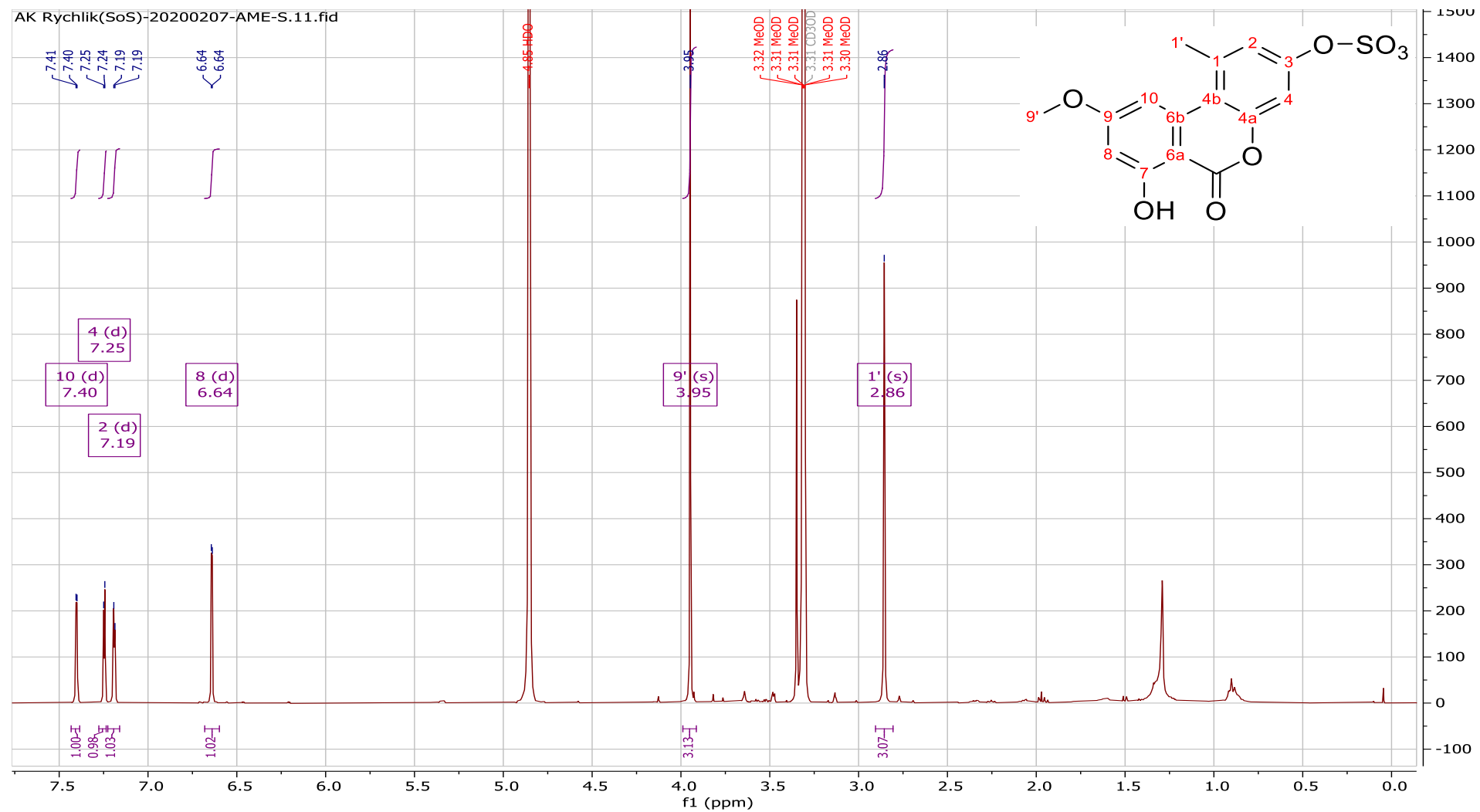
## Anhang 1: NMR-Spektren



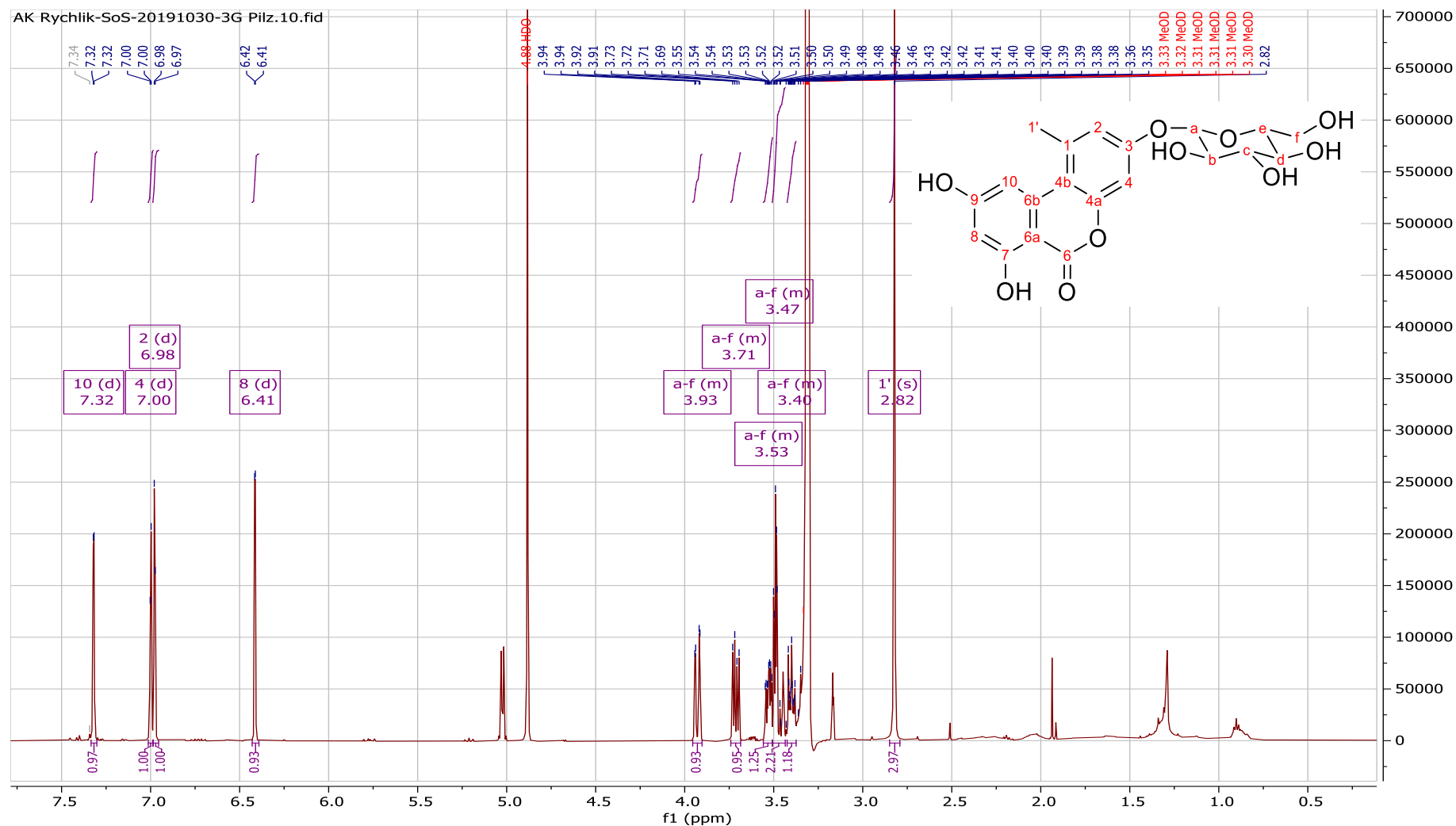
**Abbildung 8.1** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) von AOH-3-S (Verbindung 1, isoliert aus Pilzextrakt). δ 7.92 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 2.82 (s, 3H).



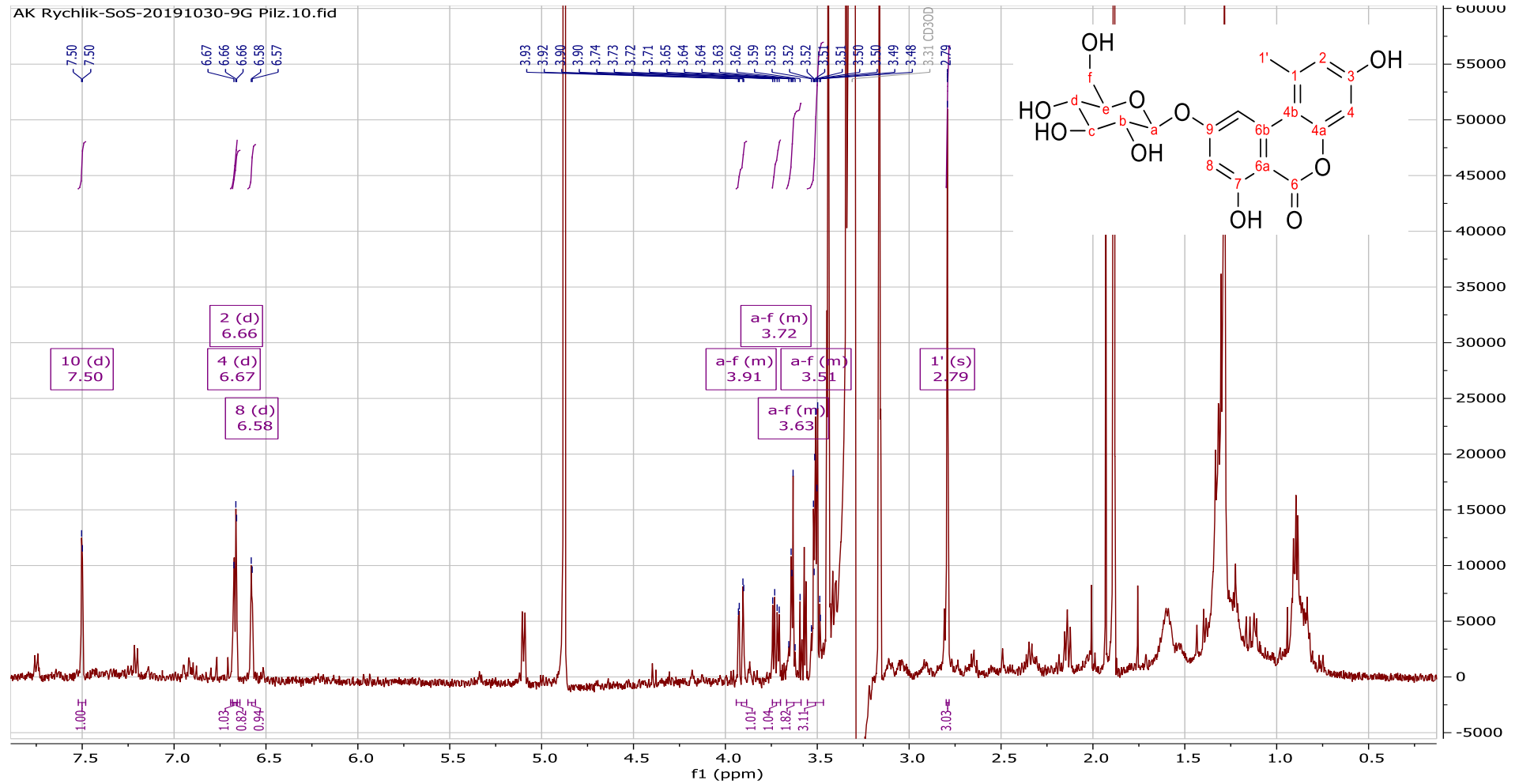
**Abbildung 8.2**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD) von AOH (Verbindung 2, Verunreinigung im isolierten AOH-3-S).  $\delta$  7.39 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.46 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 2.86 (s, 3H).



**Abbildung 8.3**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD) von AME-3-S (isoliert aus Pilzextrakt).  $\delta$  7.40 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.64 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.86 (s, 3H).



**Abbildung 8.4**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD) von AOH-3-G (enzymatisch synthetisiert aus Pilzextrakt).  $\delta$  7.32 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.41 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 3.95 – 3.90 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.55 – 3.51 (m, 1H), 3.50 – 3.47 (m, 2H), 3.42 – 3.37 (m, 1H), 2.82 (s, 3H). Eine exakte Zuordnung der Glucosidsignale war nicht möglich, da die vorliegende Menge nur für ein  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum gereicht hat.



**Abbildung 8.5**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD) von AOH-9-G (enzymatisch synthetisiert aus Pilzextrakt).  $\delta$  7.50 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 3.67 – 3.59 (m, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 3H), 2.79 (s, 3H). Eine exakte Zuordnung der Glucosidsignale war nicht möglich, da die vorliegende Menge nur für ein  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum gereicht hat.



## Anhang 2: Stabilitätstests

**Tabelle 8.1** Detaillierte Ergebnisse der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Toxinstandards (in µg/kg) nach Lagerung im Kühlschrank (+ 6 °C).

Woche	0	1	2	3	4	5	6	8	15	21
AOH	5,40 ± 0,13	5,23 ± 0,05	5,24 ± 0,10	5,32 ± 0,07	5,29 ± 0,01	5,27 ± 0,17	5,33 ± 0,06	5,42 ± 0,03	4,91 ± 0,15	5,25 ± 0,01
AME	4,88 ± 0,09	4,84 ± 0,01	4,74 ± 0,07	4,83 ± 0,07	4,76 ± 0,01	4,82 ± 0,04	4,84 ± 0,06	4,89 ± 0,05	4,28 ± 0,10	4,76 ± 0,01
AOH3G	5,42 ± 0,07	5,90 ± 0,06	5,50 ± 0,02	5,60 ± 0,05	5,56 ± 0,02	5,50 ± 0,08	5,50 ± 0,04	5,58 ± 0,02	5,21 ± 0,07	5,48 ± 0,02
TEN	5,29 ± 0,02	5,34 ± 0,06	5,12 ± 0,10	5,09 ± 0,11	5,08 ± 0,08	5,18 ± 0,08	5,00 ± 0,02	5,08 ± 0,01	5,15 ± 0,02	5,18 ± 0,01
ATX I	4,79 ± 0,02	4,81 ± 0,04	4,85 ± 0,10	4,77 ± 0,03	4,86 ± 0,06	4,89 ± 0,11	4,74 ± 0,03	4,83 ± 0,01	4,55 ± 0,01	4,96 ± 0,06
ATX II	5,61 ± 0,06	5,30 ± 0,07	5,50 ± 0,06	5,54 ± 0,01	5,66 ± 0,01	5,78 ± 0,05	5,65 ± 0,06	5,77 ± 0,05	5,81 ± 0,03	5,76 ± 0,03
ALTP	5,18 ± 0,03	5,02 ± 0,01	5,05 ± 0,07	5,23 ± 0,14	5,19 ± 0,02	5,09 ± 0,02	5,08 ± 0,04	5,14 ± 0,01	5,05 ± 0,13	5,2 ± 0,02
APML	3,20 ± 0,1	3,54 ± 0,03	3,44 ± 0,2	3,43 ± 0,03	3,61 ± 0,10	3,78 ± 0,13	3,31 ± 0,03	3,51 ± 0,04	3,94 ± 0,31	3,72 ± 0,04

**Tabelle 8.2** Detaillierte Ergebnisse der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Toxinstandards (in µg/kg) nach Lagerung im Kühlschrank (- 18 °C).

Woche	0	1	2	3	4	5	6	8	15	21
AOH	5,40 ± 0,13	5,27 ± 0,03	5,29 ± 0,11	5,31 ± 0,04	5,28 ± 0,03	5,34 ± 0,02	5,23 ± 0,11	5,26 ± 0,04	4,79 ± 0,09	5,23 ± 0,01
AME	4,88 ± 0,09	4,76 ± 0,03	4,80 ± 0,06	4,79 ± 0,01	4,79 ± 0,03	4,83 ± 0,06	4,81 ± 0,04	4,87 ± 0,13	4,24 ± 0,07	4,72 ± 0,01
AOH3G	5,42 ± 0,07	5,50 ± 0,02	5,46 ± 0,05	5,41 ± 0,06	5,41 ± 0,01	5,37 ± 0,06	5,26 ± 0,06	5,32 ± 0,06	4,76 ± 0,08	5,02 ± 0,03
TEN	5,29 ± 0,02	5,07 ± 0,02	5,07 ± 0,01	5,02 ± 0,07	5,13 ± 0,01	5,15 ± 0,01	4,92 ± 0,05	5,05 ± 0,08	5,25 ± 0,16	5,17 ± 0,01
ATX I	4,79 ± 0,02	4,80 ± 0,01	4,77 ± 0,04	4,84 ± 0,18	4,83 ± 0,04	4,82 ± 0,01	4,73 ± 0,01	4,78 ± 0,02	4,64 ± 0,13	4,87 ± 0,01
ATX II	5,61 ± 0,06	5,16 ± 0,06	5,21 ± 0,07	5,31 ± 0,07	5,30 ± 0,06	5,34 ± 0,05	5,20 ± 0,03	5,31 ± 0,02	5,01 ± 0,01	5,53 ± 0,02
ALTP	5,18 ± 0,03	5,00 ± 0,04	5,00 ± 0,01	5,07 ± 0,02	5,11 ± 0,02	5,04 ± 0,04	5,02 ± 0,01	5,00 ± 0,1	4,87 ± 0,05	5,05 ± 0,03
APML	3,20 ± 0,1	3,76 ± 0,09	3,53 ± 0,01	3,81 ± 0,19	3,88 ± 0,22	4,04 ± 0,26	3,44 ± 0,07	3,68 ± 0,05	4,06 ± 0,01	3,7 ± 0,02

### Anhang 3: Ergebnisse Malz- und Gerstenscreening

**Tabelle 8.3** Detaillierte Auflistung der Mykotoxinkonzentrationen in µg/kg von 56 analysierten Gersten- und deren Malzproben, sortiert nach Erntejahr. Nicht in der Tabelle aufgelistete Toxine konnten in keiner Probe detektiert werden. G = Gerste, M = Malz, F = Forschungsmuster, BP = Probe aus Berliner Programm, BG = Bestimmungsgrenze. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.

		AOH	AME	TeA	TEN	ALTP	ATX I	AOH-3-S
2016 (F)	G01	3,20 ± 0,15	<i>n.d.</i>	40,5 ± 2,7	0,60 ± 0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M01	1,87 ± 0,15	<i>n.d.</i>	35,6 ± 2,0	< BG	< BG	< BG	<i>n.d.</i>
	G02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8,17 ± 0,39	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	11,7 ± 0,1	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	77,2 ± 3,6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
	G05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G07	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	4,62 ± 0,28	<i>n.d.</i>	4,24 ± 0,38	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M07	4,95 ± 0,27	<i>n.d.</i>	86,3 ± 2,0	<i>n.d.</i>	6,07 ± 0,61	< BG	3,18 ± 0,20
	G08	< BG	<i>n.d.</i>	4,48 ± 0,17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M08	3,64 ± 0,35	<i>n.d.</i>	7,49 ± 0,74	<i>n.d.</i>	4,15 ± 0,41	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G09	< BG	<i>n.d.</i>	3,9 ± 0,18	0,56 ± 0,08	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M09	6,30 ± 0,64	<i>n.d.</i>	31,6 ± 2,3	0,49 ± 0,06	4,78 ± 0,64	< BG	6,72 ± 0,66
	G11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	5,44 ± 0,53	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	26,2 ± 1,2	<i>n.d.</i>	7,28 ± 0,70	2,40 ± 0,19	<i>n.d.</i>
	G12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	23,0 ± 2,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
	G13	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M13	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	86,9 ± 2,8	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	4,27 ± 0,31	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,26 ± 0,45	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
	G16	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2,52 ± 0,14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M16	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,42 ± 0,33	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	12,3 ± 0,7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>

(Fortsetzung Tabelle 8.3)

		AOH	AME	TeA	TEN	ALTP	ATX I	AOH-3-S	
2017 (F)	G51	2,40 ± 0,09	1,19 ± 0,12	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	M51	2,31 ± 0,23	1,39 ± 0,12	187 ± 11	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	G52	3,23 ± 0,28	1,16 ± 0,09	3,05 ± 0,26	< BG	<i>n.d.</i>	3,12 ± 0,49	<i>n.d.</i>	
	M52	2,30 ± 0,20	1,16 ± 0,04	36,9 ± 2,1	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	G53	1,91 ± 0,07	1,2 ± 0,07	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	M53	2,84 ± 0,28	1,06 ± 0,03	30,2 ± 1,8	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	G54	2,36 ± 0,11	1,25 ± 0,1	<LOQ	0,54 ± 0,06	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	M54	6,58 ± 0,65	1,49 ± 0,10	8,55 ± 0,60	0,54 ± 0,22	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	G55	3,00 ± 0,13	1,15 ± 0,08	2,86 ± 0,02	< BG	<i>n.d.</i>	3,12 ± 0,23	<i>n.d.</i>	
	M55	< BG	1,06 ± 0,06	99,8 ± 8,1	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	G57	3,77 ± 0,33	1,5 ± 0,02	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	M57	3,71 ± 0,36	1,35 ± 0,14	25,7 ± 1,5	0,51 ± 0,06	<i>n.d.</i>	3,02 ± 0,36	<i>n.d.</i>	
	G58	3,24 ± 0,29	1,65 ± 0,07	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M58	5,90 ± 0,54	1,43 ± 0,14	111 ± 11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	G88	20,6 ± 1,2	6,62 ± 0,66	3,19 ± 0,1	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
	M88	15,6 ± 1,3	5,56 ± 0,34	134 ± 13	< BG	<i>n.d.</i>	4,19 ± 0,44	<i>n.d.</i>	
	2018 (BP)	G01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,57 ± 0,34	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		M01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	102 ± 7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
G12*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
M12*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	12,7 ± 0,5	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
G23*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
M23*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
G34*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,99 ± 0,35	0,55 ± 0,06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
M34*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	4,28 ± 0,4	0,46 ± 0,04	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
G45*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
M45*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
G56*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8,82 ± 0,21	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
M56*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	21,8 ± 1,0	0,48 ± 0,04	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
2019 (BP)	G01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,98 ± 0,24	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M01*	< BG	<i>n.d.</i>	126 ± 4	2,35 ± 0,06	10,9 ± 1,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	G12*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	5,68 ± 0,24	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M12*	< BG	<i>n.d.</i>	20,8 ± 1,6	< BG	3,42 ± 0,35	< BG	<i>n.d.</i>	
	G23*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M23*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	G34*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	14,8 ± 0,4	1,92 ± 0,18	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M34*	< BG	<i>n.d.</i>	177 ± 5	2,00 ± 0,14	3,68 ± 0,25	< BG	<i>n.d.</i>	
	G45*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M45*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,37 ± 0,37	<i>n.d.</i>	3,45 ± 0,51	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	G56*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,33 ± 0,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	M56*	< BG	<i>n.d.</i>	40,4 ± 2,6	<i>n.d.</i>	3,71 ± 0,3	< BG	<i>n.d.</i>	

(Fortsetzung Tabelle 8.3)

		AOH	AME	TeA	TEN	ALTP	ATX I	AOH-3-S
2019 (F)	G06	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	7,74 ± 0,53	1,34 ± 0,22	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M06	3,69 ± 0,04	1,57 ± 0,11	24,4 ± 1,5	0,95 ± 0,13	4,22 ± 0,63	< BG	<i>n.d.</i>
	G15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	10,3 ± 0,2	0,50 ± 0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M15	< BG	5,41 ± 0,37	12,4 ± 0,6	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M17	12,8 ± 0,4	<i>n.d.</i>	20,0 ± 2,0	< BG	3,77 ± 0,13	< BG	<i>n.d.</i>
	G22	2,69 ± 0,21	<i>n.d.</i>	18,9 ± 1,6	2,28 ± 0,22	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M22	12,2 ± 0,8	<i>n.d.</i>	247 ± 16	< BG	15,6 ± 2,5	< BG	<i>n.d.</i>
	G28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	12,5 ± 0,7	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	48,6 ± 2,0	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G35	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	51,2 ± 1,0	1,21 ± 0,45	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M35	2,16 ± 0,05	<i>n.d.</i>	71,0 ± 10	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G41	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	47,5 ± 3,0	3,09 ± 0,52	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M41	< BG	<i>n.d.</i>	46,0 ± 2,3	0,49 ± 0,02	2,95 ± 0,12	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G50	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M50	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	5,10 ± 0,14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G55	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,24 ± 0,25	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M55	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	5,20 ± 0,15	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	2020 (BP)	G01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	0,61 ± 0,09	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M01*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	7,67 ± 0,36	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
G12*		11,9 ± 0,9	5,39 ± 0,17	165 ± 9	0,77 ± 0,13	4,53 ± 0,47	<i>n.d.</i>	6,23 ± 0,49
M12*		6,94 ± 0,33	6,53 ± 0,4	156 ± 11	1,43 ± 0,27	< BG	<i>n.d.</i>	15,66 ± 0,91
G23*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2,93 ± 0,2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M23		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	14,0 ± 0,9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
G34*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	15,3 ± 0,9	1,65 ± 0,24	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M34*		2,44 ± 0,28	3,18 ± 0,54	45,1 ± 3,5	0,83 ± 0,12	3,35 ± 0,38	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
G45*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	33,7 ± 2,0	1,34 ± 0,19	6,73 ± 0,44	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M45*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	19,5 ± 0,7	0,71 ± 0,08	3,07 ± 0,38	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
G56*		<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,33 ± 0,14	0,57 ± 0,09	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M56*		<i>n.d.</i>	2,15 ± 0,16	41,3 ± 2,0	0,59 ± 0,11	< BG	< BG	<i>n.d.</i>
2021 (BP)		G01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	< BG	< BG	<i>n.d.</i>
	M01*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G07*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	0,63±0,15	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M07*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G13*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M13*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G19*	5,54 + 0,31	3,68+0,16	< BG	< BG	2,78+0,49	2,63+0,41	<i>n.d.</i>
	M19*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G25*	<i>n.d.</i>	0,93+0,01	45,5 + 3,7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	M25*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	G31*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
M31*	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	

\* Proben ebenfalls für den Standortvergleich verwendet, n.d. = nicht detektiert

## Anhang 4. Ergebnisse Lagerversuch

**Tabelle 8.4** Detaillierte Ergebnisse der gelagerten Gerste (unvermälzt) in µg/kg. BP = Muster mit niedriger Symptomatik, RH = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben. n.d. = nicht detektiert

	Muster	Wassergehalt	Temperatur °C	Belüftung	AOH	AME	TeA	ALTP	ATX I	TEN	AOH-3-S	
Zeitpunkt 0	Referenz		-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	BP		-	-	n.d.	n.d.	4,99 ± 0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Rothaus		-	-	n.d.	n.d.	5,92 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Zeitpunkt 1 (3 Monate)	Referenz	13-14%	4°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
				schlecht	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		17-18%	4°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Referenz	13-14%	12°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		17-18%	12°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BP	13-14%	4°C	gut	n.d.	0,55 ± 0,02	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	0,73 ± 0,06	3,23 ± 0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		17-18%	4°C	gut	< BG	0,72 ± 0,06	20,3 ± 0,6	< BG	n.d.	3,31 ± 0,62	n.d.	
				schlecht	n.d.	1,08 ± 0,09	9,08 ± 0,60	n.d.	n.d.	1,32 ± 0,27	n.d.	
BP	13-14%	12°C	gut	n.d.	0,72 ± 0,02	4,16 ± 0,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			schlecht	3,18 ± 0,27	1,16 ± 0,25	5,49 ± 0,44	< BG	< BG	n.d.	n.d.		
	17-18%	12°C	gut	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			schlecht	< BG	0,74 ± 0,11	5,19 ± 0,41	< BG	< BG	n.d.	n.d.		
Rothaus	13-14%	4°C	gut	n.d.	n.d.	6,22 ± 0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			schlecht	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
	17-18%	4°C	gut	n.d.	n.d.	22,1 ± 0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			schlecht	n.d.	n.d.	17,5 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

(Fortsetzung Tabelle 8.4)

	Muster	Wassergehalt	Temperatur °C	Belüftung	AOH	AME	TeA	ALTP	ATX I	TEN	AOH-3-S	
	Rothaus	13-14%	12°C	Gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	19,6 ± 0,6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,37 ± 0,19	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
		17-18%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,98 ± 0,18	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	10,6 ± 0,98	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
Zeitpunkt 2 (8 Monate)	Referenz	13-14%	4°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
			17-18%	4°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
					schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Referenz	13-14%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
			17-18%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
					schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	BP	13-14%	4°C	gut	3,36 ± 0,12	1,05 ± 0,16	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	2,59 ± 0,24	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
			17-18%	4°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2,94 ± 0,12	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
					schlecht	< BG	<i>n.d.</i>	2,66 ± 0,16	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
BP	13-14%	12°C	gut	2,3 ± 0,17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
			schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,15 ± 0,03	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		
		17-18%	12°C	gut	4,95 ± 0,26	2,40 ± 0,49	10,5 ± 1,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
Rothaus	13-14%	4°C	gut	2,54 ± 0,21	<i>n.d.</i>	11,0 ± 0,8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		
			schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	13,5 ± 0,5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		
		17-18%	4°C	gut	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	
				schlecht	2,13 ± 0,13	<i>n.d.</i>	3,77 ± 0,17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
Rothaus	13-14%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,20 ± 0,25	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		
			schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2,68 ± 0,17	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		
		17-18%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	33,7 ± 1,6	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
				schlecht	< BG	<i>n.d.</i>	6,86 ± 0,52	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	

**Tabelle 8.5** Detaillierte Ergebnisse der gelagerten Gerste (vermälzt) in µg/kg. BP = Muster mit niedriger Symptomatik, RH = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben. n.d. = nicht detektiert

	Muster	Wassergehalt	Temperatur	Belüftung	AOH	AME	TeA	ALTP	ATX I	TEN	AOH-3-S
Zeitpunkt 0	Referenz	13-14%	-	-	n.d.	n.d.	< BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		17-18%	-	-	n.d.	n.d.	6,85 ± 0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	BP	13-14%	-	-	1,82 ± 0,12	0,64 ± 0,03	310 ± 5	3,36 ± 0,3	< BG	n.d.	n.d.
		17-18%	-	-	4,62 ± 0,32	1,10 ± 0,11	300 ± 17	4,26 ± 0,42	< BG	n.d.	n.d.
	Rothaus	13-14%	-	-	3,72 ± 0,2	0,55 ± 0,02	61 ± 3	< BG	n.d.	n.d.	n.d.
		17-18%	-	-	15,14 ± 1,17	1,65 ± 0,21	252 ± 7	5,34 ± 0,47	n.d.	n.d.	n.d.
Zeitpunkt 1 (3 Monate)	Referenz	13-14%	4°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		17-18%	4°C	gut	n.d.	n.d.	< BG	< BG	< BG	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	21,6 ± 1,6	3,41 ± 0,5	3,52 ± 0,64	n.d.	n.d.
	Referenz	13-14%	12°C	gut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	4,57 ± 0,51	< BG	2,85 ± 0,5	n.d.	n.d.
		17-18%	12°C	gut	n.d.	n.d.	< BG	< BG	n.d.	n.d.	n.d.
				schlecht	n.d.	n.d.	4,45 ± 0,06	< BG	n.d.	n.d.	n.d.
	BP	13-14%	4°C	gut	1,82 ± 0,11	n.d.	805 ± 66	14,7 ± 1,7	6,57 ± 0,8	< BG	5,88 ± 0,89
				schlecht	14,1 ± 2,2	3,05 ± 0,76	322 ± 19	11,6 ± 1,6	4,9 ± 0,41	n.d.	6,53 ± 0,44
		17-18%	4°C	gut	1,78 ± 0,07	0,74 ± 0,01	118 ± 9	10,6 ± 1,5	3,67 ± 0,21	< BG	n.d.
				schlecht	13,46 ± 0,37	2,48 ± 0,25	81 ± 6	4,60 ± 0,54	2,67 ± 0,21	n.d.	23,32 ± 0,65
13-14%		12°C	gut	45 ± 4	23 ± 3	248 ± 18	17,6 ± 1,2	7,58 ± 0,67	0,67 ± 0,12	n.d.	
			schlecht	1,81 ± 0,18	2,79 ± 0,22	38,3 ± 3,0	11,19 ± 0,94	8,92 ± 0,08	< BG	6,85 ± 0,49	
17-18%	12°C	gut	9,94 ± 1,44	3,21 ± 0,15	290 ± 22	14,92 ± 1,22	4,90 ± 0,53	< BG	8,39 ± 0,77		
		schlecht	8,26 ± 0,25	1,76 ± 0,43	523 ± 30	23,03 ± 1,88	6,32 ± 0,18	< BG	4,13 ± 0,27		

(Fortsetzung Tabelle 8.5)

	Muster	Wassergehalt	Temperatur	Belüftung	AOH	AME	TeA	ALTP	ATX I	TEN	AOH-3-S
	Rothaus	13-14%	4°C	gut	2,79 ± 0,22	<i>n.d.</i>	46,2 ± 2,9	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	2,12 ± 0,18	<i>n.d.</i>	72,2 ± 3,8	2,84 ± 0,23	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		17-18%	4°C	gut	3,21 ± 0,48	0,61 ± 0,01	30,6 ± 1,6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	6,59 ± 0,27	1,22 ± 0,12	23,1 ± 1,9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Rothaus	13-14%	12°C	gut	11,25 ± 0,78	0,80 ± 0,15	66,8 ± 2,4	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	4,93 ± 0,43	0,62 ± 0,01	122 ± 9	< BG	< LOQ	< BG	<i>n.d.</i>
		17-18%	12°C	gut	5,91 ± 0,49	0,94 ± 0,28	22,8 ± 1,3	2,55 ± 0,29	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	7,89 ± 0,45	2,05 ± 0,02	272 ± 13	2,57 ± 0,36	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Zeitpunkt 2 (8 Monate)	Referenz	13-14%	4°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		17-18%	4°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Referenz	13-14%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
		17-18%	12°C	gut	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	BP	13-14%	4°C	gut	2,17 ± 0,18	0,72 ± 0,09	100 ± 8	2,94 ± 0,43	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
				schlecht	2,01 ± 0,20	0,62 ± 0,01	64,2 ± 4,6	4,37 ± 1,39	< LOQ	0,58 ± 0,11	<i>n.d.</i>
		17-18%	4°C	gut	< LOQ	<i>n.d.</i>	10,9 ± 0,7	7,13 ± 1,0	<i>n.d.</i>	< LOQ	<i>n.d.</i>
				schlecht	4,41 ± 0,36	1,87 ± 0,11	66,5 ± 5,4	3,50 ± 1,54	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
BP	13-14%	12°C	gut	7,36 ± 0,33	1,88 ± 0,27	127 ± 8	2,60 ± 0,27	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
			schlecht	1,90 ± 0,16	0,65 ± 0,02	24,7 ± 1,6	5,25 ± 0,63	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	
	17-18%	12°C	gut	3,24 ± 0,24	0,72 ± 0,05	210 ± 18	5,18 ± 0,66	<i>n.d.</i>	< LOQ	<i>n.d.</i>	
			schlecht	24,73 ± 7,5	11,9 ± 0,5	217 ± 24	10,17 ± 1,28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	



(Fortsetzung Tabelle 8.5)

Muster	Wassergehalt	Temperatur	Belüftung	AOH	AME	TeA	ALTP	ATX I	TEN	AOH-3-S
Rothaus	13-14%	4°C	gut	< LOQ	< LOQ	9,18 ± 0,47	3,15 ± 0,29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
			schlecht	< LOQ	< LOQ	8,99 ± 0,51	14,88 ± 0,63	< LOQ	0,53 ± 0,04	<i>n.d.</i>
	17-18%	4°C	gut	1,57 ± 0,06	<i>n.d.</i>	58,2 ± 1,75	10,85 ± 0,93	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
			schlecht	2,09 ± 0,02	0,62 ± 0,04	7,67 ± 0,56	3,62 ± 0,25	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Rothaus	13-14%	12°C	gut	3,03 ± 1,52	<i>n.d.</i>	15,95 ± 0,75	4,82 ± 0,59	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
			schlecht	2,96 ± 0,15	1,87 ± 0,11	21,8 ± 3,1	4,06 ± 0,28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	17-18%	12°C	gut	5,48 ± 0,82	0,65 ± 0,05	57,9 ± 7,8	3,14 ± 0,90	< LOQ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
			schlecht	2,05 ± 0,13	1,31 ± 0,74	21,6 ± 3,5	3,82 ± 1,23	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

**Tabelle 8.6** Aufbau und Probennahmeprotokoll des Lagerversuchs.

Muster	Ausgangsmenge Probe	Menge pro Kornfeuchte	Menge pro Kornfeuchte abzügl. Probennahme "0"	Menge pro Temperatur	Menge pro Durchlüftung	Menge Probennahme	
Referenz	87000 g	4350 g (13-14 %)	4016 g	1338 g (4°C)	669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
					669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
					1338 g (12°C)	669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)
							334 g (6 Monate)
				669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)		
					334 g (6 Monate)		
				1338 g (20°C)	669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
					669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
	4350 g (17-18 %)	4016 g	1338 g (4°C)		669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
				669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)		
					334 g (6 Monate)		
				1338 g (12°C)	669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
				669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)		
					334 g (6 Monate)		
				1338 g (20°C)	669 g (gute Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	
					669 g (schlechte Durchlüftung)	334 g (3 Monate)	
						334 g (6 Monate)	

(Fortsetzung Tabelle 8.6)

Muster	Ausgangsmenge Probe	Menge pro Kornfeuchte	Menge pro Kornfeuchte abzügl. Probennahme "0"	Menge pro Temperatur	Menge pro Durchlüftung	Menge Probennahme	
Mittlere Symptomatik	7700 g	3850 g (13-14 %)	3554 g	1184 g (4°C)	592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
					592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
					1184 g (12°C)	592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)
							296 g (6 Monate)
				592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)		
					296 g (6 Monate)		
				1184 g (20°C)	592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
					592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
	3850 g (17-18 %)	3554 g	1184 g (4°C)		592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
				592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)		
					296 g (6 Monate)		
				1184 g (12°C)	592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
				592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)		
					296 g (6 Monate)		
				1184 g (20°C)	592 g (gute Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	
					592 g (schlechte Durchlüftung)	296 g (3 Monate)	
						296 g (6 Monate)	

(Fortsetzung Tabelle 8.6)

Muster	Ausgangsmenge Probe	Menge pro Kornfeuchte	Menge pro Kornfeuchte abzügl. Probennahme "0"	Menge pro Temperatur	Menge pro Durchlüftung	Menge Probennahme	
Hohe Symptomatik	10000 g	5000 g (13-14 %)	4616 g	1538 g (4°C)	769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
					769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
					1538 g (12°C)	769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)
							384 g (6 Monate)
				769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)		
					384 g (6 Monate)		
				1538 g (20°C)	769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
					769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
	5000 g (17-18 %)	4616 g	1538 g (4°C)		769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
				769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)		
					384 g (6 Monate)		
				1538 g (12°C)	769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
				769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)		
					384 g (6 Monate)		
				1538 g (20°C)	769 g (gute Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	
					769 g (schlechte Durchlüftung)	384 g (3 Monate)	
						384 g (6 Monate)	

## Anhang 5. Ergebnisse Mälzungsverlauf

**Tabelle 8.7** Detaillierte Ergebnisse des Mälzungsverlaufes in µg/kg. Muster 1 = Muster mit niedriger Symptomatik, Muster 2 = Muster mit hoher Symptomatik. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.

	Zeitpunkt	TeA	AOH	AME	ALTP	ATX I	TEN	AOH3G
Muster 1	24 h	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	48 h	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	72 h	4,95 ± 0,58	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	96 h	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	120 h	66,5 ± 1,5	< BG	<i>n.d.</i>	2,85 ± 0,4	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Vor Darre	42,9 ± 2,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8,23 ± 0,37	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Nach Darre (ungeputzt)	24,6 ± 2,5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	6,11 ± 0,64	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Nach Darre (geputzt)	56,2 ± 6,3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,0 ± 0,32	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Muster 2	24 h	7,71 ± 0,37	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	48 h	3,59 ± 0,3	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	72 h	19,0 ± 1,7	2,07 ± 0,02	2,5 ± 0,24	2,4 ± 0,13	< BG	<i>n.d.</i>	< BG
	96 h	5,27 ± 0,15	2,57 ± 0,09	0,69 ± 0,04	< BG	< BG	1,05 ± 0,15	< BG
	120 h	12,5 ± 0,5	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Nach Darre (ungeputzt)	22,8 ± 1,4	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Nach Darre (geputzt)	53,5 ± 6,2	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*n.d.* = nicht detektiert

## Anhang 6. Ergebnisse Mälzungsvariationen

**Tabelle 8.8** Detaillierte Mykotoxinkonzentrationen der Mälzungsvariationen in µg/kg. Muster 1 = Niedrige Symptomatik, Muster 2 = mittlere Symptomatik und Muster 3 = hohe Symptomatik. Kombination = CO<sub>2</sub>-Rast + 3. Nassweiche. Alle Werte sind als Mittelwert einer Doppelbestimmung und Doppelinjektion angegeben.

Gerste	Variation	TeA	ALTP	AOH	AME	ATX I	AOH3S	TEN
Muster 1	10°C, 40%	5,67 ± 0,47	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
	10°C, 45%	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	14°C, 40%	4,02 ± 0,07	5,58 ± 0,55	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	7,22 ± 0,68	< BG
	14°C, 45%	12,9 ± 2,5	1,43 ± 0,07	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>
	18°C, 40%	22,9 ± 2,3	< BG	< BG	2,38 ± 0,04	< BG	6,52 ± 0,2	< BG
	18°C, 45%	20,7 ± 1,8	22,6 ± 2,2	< BG	<i>n.d.</i>	< BG	< BG	<i>n.d.</i>
	CO <sub>2</sub> Rast	23,5 ± 0,8	< BG	<i>n.d.</i>	3,17 ± 0,28	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	3. Nassweiche	3,3 ± 0,22	10,8 ± 1,0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Kombination	3,38 ± 0,16	4,36 ± 0,38	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Muster 2	10°C, 40%	17,3 ± 0,1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG
	10°C, 45%	3,35 ± 0,33	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	14°C, 40%	4,96 ± 0,19	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2,49 ± 0,26
	14°C, 45%	151 ± 6	2,64 ± 0,32	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	18°C, 40%	16,3 ± 0,4	3,47 ± 0,38	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1,57 ± 0,13
	18°C, 45%	195 ± 3	4,61 ± 0,5	2,2 ± 0,27	1,41 ± 0,05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,84 ± 0,08
	CO <sub>2</sub> Rast	69,5 ± 5,8	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	3. Nassweiche	< BG	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG
	Kombination	7,42 ± 0,24	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG
Muster 3	10°C, 40%	96,3 ± 6,5	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	10°C, 45%	4,18 ± 0,22	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	14°C, 40%	34,0 ± 2,4	< BG	1,79 ± 0,15	0,8 ± 0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	14°C, 45%	16,1 ± 0,6	< BG	3,27 ± 0,86	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< BG
	18°C, 40%	36,3 ± 2,6	8,56±0,8	2,77 ± 0,15	0,65 ± 0,02	< BG	<i>n.d.</i>	2,32 ± 0,33
	18°C, 45%	42,8 ± 4,1	< BG	12,6 ± 0,8	3,79 ± 0,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	CO <sub>2</sub> Rast	1028	4,02±0,36	32,2 ± 2,18	4,16 ± 0,25	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	3. Nassweiche	8,13 ± 0,43	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	Kombination	13,5 ± 1,1	<i>n.d.</i>	< BG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

## Anhang 7. Brauersuch

**Tabelle 8.9** Mykotoxinbilanzierung der Brauersuche des Pilsener Malzes in %.

			TeA (%)	AOH (%)	AME (%)	ALTP (%)	ATX I (%)	TEN (%)	AOH3S (%)
Schrot	100/0	Rep 1	100	100	100	100	100	100	100
		Rep 2	100	100	100	100	100	100	100
	50/50	Rep 1	100	100	100	100	100	100	100
		Rep 2	100	100	100	100	100	100	100
	25/75	Rep 1	100	100	100	100	100	100	100
		Rep 2	100	100	100	100	100	100	100
Maische (Anfang)	100/0	Rep 1	58	100	88	87	271	37	0
		Rep 2	47,5	100	87,4	44	319	35	0
	50/50	Rep 1	44,8	85,4	58,5	99	199	29	0
		Rep 2	45	61,2	56	382	190	29	0
	25/75	Rep 1	47,8	125,9	55,7	56	283	62	809
		Rep 2	70,3	90,3	29,2	68	150	29	1065
Maische (Ende)	100/0	Rep 1	150	172	170	120	544	33	0
		Rep 2	139	143	122	64	620	41	0
	50/50	Rep 1	147	64	53,1	68	86	25	0
		Rep 2	157	76,3	84	345	38	29	0
	25/75	Rep 1	83,5	118,2	39,1	78	0	58	1687
		Rep 2	60,8	73,9	31,4	68	0	33	785
Treber	100/0	Rep 1	16	384	363	51	126	20	0
		Rep 2	15	272	217	37	122	25	0
	50/50	Rep 1	20	182	219	107	42	21	0
		Rep 2	22	188	217	654	0	17	0
	25/75	Rep 1	16	329	131	111	189	37	189
		Rep 2	15	158	102	96	91	22	189
Pfannevoll würze	100/0	Rep 1	90	83	78	0	0	0	0
		Rep 2	92	86	73	0	0	0	0
	50/50	Rep 1	149	88	30	0	0	88	0
		Rep 2	228	70	21	0	0	59	0
	25/75	Rep 1	121	78	5	0	0	185	0
		Rep 2	84	61	7	0	0	88	0
Ausschlag würze	100/0	Rep 1	79	74	0	0	0	0	0
		Rep 2	79	75	0	0	0	0	0
	50/50	Rep 1	135	0	26	0	0	0	0
		Rep 2	199	0	20	0	0	0	0
	25/75	Rep 1	118	0	4	0	0	192	0
		Rep 2	75	0	6	0	0	37	0

(Fortsetzung Tabelle 8.9)

			TeA	AOH	AME	ALTP	ATX I	TEN	AOH3S
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Geläger	100/0	Rep 1	7	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	4	0	0	0	0	0	0
	50/50	Rep 1	9	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	17	0	0	0	0	0	0
	25/75	Rep 1	7	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	5	0	0	0	0	0	0
Heißtrub	100/0	Rep 1	25	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	29	0	0	0	0	0	0
	50/50	Rep 1	12	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	14	0	0	0	0	0	0
	25/75	Rep 1	6	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	6	0	0	0	0	0	0
Bier	100/0	Rep 1	34	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	40	0	0	0	0	0	0
	50/50	Rep 1	38	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	27	0	0	0	0	0	0
	25/75	Rep 1	38	0	0	0	0	0	0
		Rep 2	27	0	0	0	0	0	0



**Tabelle 8.10** Mykotoxinbilanzierung der Brauversuche des Avangard Malzes in %.

			TeA (%)	AOH (%)
Schrot	100/0	Rep 1	100	100
		Rep 2	100	100
	75/25	Rep 1	100	100
		Rep 2	100	100
	50/50	Rep 1	100	100
		Rep 2	100	100
Maische (Anfang)	100/0	Rep 1	85,1	100
		Rep 2	42,8	100
	75/25	Rep 1	70,5	100
		Rep 2	21,0	100
	50/50	Rep 1	64,9	100
		Rep 2	378,7	100
Maische (Ende)	100/0	Rep 1	98,5	100
		Rep 2	53,8	100
	75/25	Rep 1	81,2	100
		Rep 2	30,4	100
	50/50	Rep 1	90,5	100
		Rep 2	50,2	100
Treber	100/0	Rep 1	30,5	0
		Rep 2	8,0	0
	75/25	Rep 1	17,2	0
		Rep 2	6,3	0
	50/50	Rep 1	9,3	199
		Rep 2	8,1	188
Pfannevollwürze	100/0	Rep 1	176,2	0
		Rep 2	85,5	0
	75/25	Rep 1	133,4	0
		Rep 2	50,8	0
	50/50	Rep 1	147,4	0
		Rep 2	76,7	0
Ausschlagwürze	100/0	Rep 1	167,9	0
		Rep 2	84,9	0
	75/25	Rep 1	129,8	0
		Rep 2	47,6	0
	50/50	Rep 1	144,3	0
		Rep 2	82,3	0

(Fortsetzung Tabelle 8.10)

			TeA (%)	AOH (%)
Geläger	100/0	Rep 1	13,5	0
		Rep 2	9,9	0
	75/25	Rep 1	14,8	0
		Rep 2	6,4	0
	50/50	Rep 1	12,7	0
		Rep 2	9,1	0
Heißtrub	100/0	Rep 1	72,3	0
		Rep 2	38,0	0
	75/25	Rep 1	51,5	0
		Rep 2	33,1	0
	50/50	Rep 1	115,0	0
		Rep 2	29,1	0
Bier	100/0	Rep 1	70,3	0
		Rep 2	34,6	0
	75/25	Rep 1	38,6	0
		Rep 2	15,6	0
	50/50	Rep 1	55,7	0
		Rep 2	24,2	0

**Tabelle 8.11** Probenmenge und Entnahmepunkte für die Berechnung der Bilanzierung.

	Einheit	Avangard 100/0 Rep 1	Avangard 100/0 Rep 2	Avangard 50/50 Rep 1	Avangard 50/50 Rep 2	Avangard 75/25 Rep 1	Avangard 75/25 Rep 2	Pilsener 100/0 Rep 1	Pilsener 100/0 Rep 2	Pilsener 50/50 Rep 1	Pilsener 50/50 Rep 2	Pilsener 25/75 Rep 1	Pilsener 25/75 Rep 2
<b>Schüttung</b>	kg	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6
<b>Ausschlagwürze</b>	L	8,6	8,6	8,5	8,4	8,6	8,7	7,3	7,8	8,6	7,8	8,6	8,1
<b>Probe Kühlmitte</b>	L	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Anstellwürze</b>	L	7,6	7,6	7,5	7,4	7,6	7,7	6,3	6,8	7,6	6,8	7,6	7,1
<b>Verluste durch:</b> -Gärverfolgung (Spindeln / pH) -Hefeerte -Diacetyl-Probe -Geläger -Filtration													
<b>Bier nach Filtration</b>	L	4,6	4,5	4,3	3,6	3,8	4,2	2,6	3,9	3,1	3,5	3,3	2,9
<b>Heißstrub (Hopfenreste und Spülwasser)</b>	mL	650	1070	900	940	950	700	800	809	850	800	850	650
	g	203,84	183,32	139,72	141,32	123,94	137,47	292,89	279,84	255,13	308,61	219,67	292,77
<b>Geläger</b>	mL	425	430	450	610	930	500	542	397	500	558		
	g	85,01	63,44	56,73	30,11	51,29	55,82	16,6	30,89	53,29	49,82		
<b>Treber</b>	kg	2,86	1,67	1,53	1,56	1,59	1257	1289	1,82	1,79	1,72	1,87	1,89