



ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-, VETERINÄR-
UND AGRARWESEN

MOLD-MEETING 2003

DER

**ALVA-FACHGRUPPE
MIKROBIOLOGIE & MOLEKULARBIOLOGIE**

**„AKTUELLE PROBLEME DER MYKOLOGIE UND
MYKOTOXINFORSCHUNG“**

ALVA-Mitteilungen Heft1/2004

ISSN 1811-7317

© 2004, Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA), Wien

ZUSAMMENGESTELLT: Dr. Andreas Adler

BEZUGSMÖGLICHKEITEN: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)
c/o Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien

HERSTELLUNG: RepaCopy Wien DC
Triesterstraße 122
1230 Wien

Vorwort

Am 13. und 14. November 2003 fand in Gars am Kamp das 7. Mold-Meeting der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie & Molekularbiologie mit Präsentationen und Diskussionen zum Thema „Aktuelle Probleme der Mykologie und der Mykotoxinforschung“ statt.

Dem mikrobiellen Status von landwirtschaftlichen Produkten und von Lebensmitteln wird in einer in zunehmendem Maß an Qualität orientierten Gesellschaft hoher Stellenwert eingeräumt - nicht zuletzt auf Grund der steigenden Bedeutung der Mykotoxinproblematik. Schadstoffe in Futter- und Lebensmitteln führen immer wieder zu Diskussionen über die Sicherheit von Lebensmitteln. Die Konsumenten müssen aber davon ausgehen können, dass mit dem Genuss von Lebensmitteln das geringst mögliche Risiko verbunden ist.

Mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte einer hochwertigen landwirtschaftlichen Qualitätsproduktion sowie einer maximalen Lebensmittel- und Ernährungssicherheit stellen daher zentrale Themen für das „Mold-Meeting“ der Fachgruppe Mikrobiologie dar, in zunehmendem Maße treten dabei auch Fragen und Anwendungen der Molekularbiologie in den Mittelpunkt des Interesses.

Wissenschaftlich fundierte Untersuchungen und Forschungsarbeiten sowie ein umfassendes Risikomanagement erfordern neben dem Einsatz modernster Analysetechniken vor allem auch eine enge und interdisziplinäre Zusammenarbeit der verschiedenen Fachbereiche und -gruppen. Multidisziplinarität im Zuge der gesamten Nahrungskette prädestiniert aber gerade die Fachgruppe Mikrobiologie als einen Ort, an dem verschiedene Fachbereiche miteinander ins Gespräch kommen können. Das Tagungsprogramm des „Mold-Meetings“ folgte daher dem Ziel, aktuelle Probleme der Mykologie und der Mykotoxinforschung in Vorträgen und Diskussionen umfassend aufzuarbeiten.

Die nachfolgend publizierten Arbeiten stellen einen Auszug aus dem Fachprogramm des „Mold-Meetings“ der ALVA-Fachgruppe Mikrobiologie und Molekularbiologie bei der Vortragstagung 2003 in Gars am Kamp dar.

Großer Dank gebührt den Autoren der Fachbeiträge und all denen, die zum Gelingen der Tagung beigetragen haben, insbesondere Frau Mag. Sandra Brunner und Herrn Peter Hanslmayr. Dem ALVA-Vorsitzenden, Herrn Hofrat Univ. Doz. Dr. Gerhard Bedlan sei für die Publikation dieses Bandes sehr herzlich gedankt.

Dr. Andreas Adler

Vorsitzender der ALVA-Fachgruppe
Mikrobiologie und Molekularbiologie

Inhaltsverzeichnis: Vorträge und Poster

A. Adler, R. Öhlinger, Sandra Brunner, P. Hanslmayr und J. Söllinger

Anbau von Winterhafer – mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte 6

G. Reischer, A. Farnleitner und R. L. Mach

Quantitative Bestimmung von *Fusarium graminearum* in infiziertem Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls 10

G. Adam

***Fusarium graminearum* Genomsequenz: was nun ?** 14

Brigitte Poppenberger, Doris Lucyshyn und G. Adam

Detoxifikation des *Fusarium* Mykotoxins Deoxynivalenol durch eine UDP-Glucosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* 17

F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Adam und R. Krska

LC-MS/MS von konjugierten Toxinen 21

W. Brodacz

Optimierung und Verifizierung von GC-Trennungen in der Trichothecenanalytik 25

W. Brodacz und A. Della Rosa

Vergleich von Trichothecen-Kalibrierstandards 29

M. Freudenschuss, G. Häubl und G. Jaunecker

Deepoxy-desoxynivalenol (DOM-1) als interner Standard für die Typ B-Trichothecene 33

Sabine Baumgartner, Elvira Welzig und R. Krska

Entwicklung und Anwendung eines IgY-ELISA zur Bestimmung von ZON in Weizen 37

H. Würzner

Aktuelle Regulierungen für Mykotoxine in Futtermitteln im internationalen Vergleich

41

R. Grossgut

Aktuelle und geplante gemeinschaftliche Regelungen bezüglich Mykotoxinen in Lebensmitteln

43

R. Öhlinger, E. Kiendler, W. Brodacz und W. Edinger

Überblick über Mykotoxingehalte in Getreide, Mais und Futtermitteln – 2002 und 2003

47

R. Krska und Elvira WELZIG

Das neue Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung

50

G. Buttinger, H. Knapp, Elisabeth Fuchs, Eva-Maria Binder und R. Krska

Entwicklung einer neuen Aufreinigungssäule zur Ochratoxin A - Bestimmung

53

G. Häubl, M. Freudenschuss, G. Jaunecker und R. Krska

Ochratoxin A – Isolierung und analytische Charakterisierung für den Einsatz als Referenzmaterial

57

Anbau von Winterhafer – mikrobiologische und mykotoxikologische Aspekte

A. ADLER, R. ÖHLINGER, Sandra BRUNNER, P. HANSLMAYR und J. SÖLLINGER

Einleitung

Hafer wird in Österreich praktisch ausschließlich als Sommerung angebaut. Trotz ausgezeichneter pflanzenbaulicher und ernährungsphysiologischer Eigenschaften weisen die Anbauflächen stark rückläufige Tendenz auf. Dafür verantwortlich ist einerseits die mangelnde Eignung als Marktfrucht und andererseits die allgemein rückläufige Tendenz des Anbaus von Sommergetreide vor allem in ackerbaulichen Gunstlagen. Über den Anbau von Winterhafer gibt es in unseren Breiten nur wenige Erfahrungen. Lediglich im Rahmen einiger Sortenversuche wurden erste Ergebnisse gesammelt, die vielversprechend erscheinen [1, 2].

Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Haferproduktion generell zu berücksichtigen ist, sind Probleme durch Verpilzung und Mykotoxinbelastung [3, 4]. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass *F. graminearum*-Populationen von Mais nicht in dem Maße auf Hafer übergreifen, wie es bei Weizen [5] der Fall ist. Da Hafer in der Fruchtfolge normalerweise nicht unmittelbar nach Mais steht, wurden bis jetzt nur wenige Haferproben aus einer direkten Mais-Hafer-Fruchtfolge untersucht. Es sollte daher erforscht werden, in welchem Maße Mais als Vorfrucht in Relation zu anderen Vorfrüchten die Fusarieninfektion von Hafer beeinflusst und ob es Unterschiede in der Anfälligkeit von Sommer- und Winterhafer hinsichtlich Verpilzung, Fusarienbefall und Toxinbildung gibt.

Material und Methoden

In den Vegetationsperioden 2001/02/03 wurden zwei Winterhafersorten (Wisent, Winnipeg) und zwei Sommerhafersorten (Expander, Expo) von verschiedenen Standorten in OÖ (Freistadt, Lambach, Ritzlhof), NÖ (Grabenegg, Schönfeld) und der Stmk (Gleisdorf) geprüft.

Fusarienkeimzahlen wurden auf Pepton-PCNB-Agar erfasst, die Identifizierung der Isolate [6] erfolgte auf PDA- bzw. SNA-Agar. Ausgesuchte Fusarienisolate wurden mittels RAPD analysiert und auf ihre Toxinproduktion in vitro auf sterilisierten Maiskörnern geprüft. Trichothecene der A- und B-Gruppe wurden mittels Kapillargaschromatographie mit ECD nach Mycosep-Säulen-Clean-up und Halogenierung bzw. Silylierung bestimmt. Die Analytik von Zearalenon erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Immunaффinitätssäulen-Clean-up.

Die Anbauversuche waren in beiden bisherigen Erntejahren von Problemen begleitet, wobei im Jahre 2002 mangelnde Verträglichkeit der eingesetzten Herbizide, das Auftreten von Gelbverzweigung bei Winterhafer sowie von Mehltau bei Sommerhafer Ertragsreduktionen bewirkten. Später Frost im Winter 2002/03 führte zu so massiven Auswinterungsschäden, dass Winterhafer im Jahr 2003 nur an einem einzigen Standort (Lambach) geerntet werden konnte.

Ergebnisse und deren Interpretation

Die Höhe der Pilzkeimzahlen zeigte einen deutlichen Einfluss von Standort und Erntetermin. Zwischen früh und spät gesättem Winterhafer konnten hinsichtlich der Verpilzung allerdings kaum

relevante Unterschiede festgestellt werden. Als Vorfrucht förderte Körnermais den Fusarienbefall sowohl bei Winter- als auch bei Sommerhafer stärker als Raps. Bei Silomais als Vorfrucht war am Standort Freistadt (2003) dieser nachteilige Einfluss auf den Fusarienbefall der Haferkörner dagegen nicht zu erkennen. Zudem zeigen die ermittelten Daten, dass Sommerhafer, der an allen Standorten durchschnittlich erst etwa zwei Wochen nach Winterhafer geerntet wurde, bisher meist deutlich stärker zu Fusarienbefall neigte, woraus in späterer Folge auch durchwegs höhere Toxingehalte der Körner resultierten (vergl. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Fusarientoxine in österreichischem Winter- und Sommerhafer
Ernte 2002 und 2003, Mittelwerte unterschiedlicher Versuchsvarianten**

Ernte	Proben (n)	DON		NIV		T-2		HT-2	
		positiv %	max. mg/kg	positiv %	max. mg/kg	positiv %	max. mg/kg	positiv %	max. mg/kg
2002									
Winterhafer	28	0		43	0,65	11	0,13	7	0,32
Sommerhafer	28	21	0,21	75	1,10	14	0,25	14	0,36
2003									
Winterhafer	4	25	0,11	25	0,26	0		25	0,15
Sommerhafer	28	71	0,64	50	1,30	0		25	0,30

Das Spektrum der von den Körnern isolierten Pilze wurde während beider Erntejahre und auf allen Haferproben meist von saprophytischen Schwärzepilzen sowie von *Cephalosporium*-artigen Schimmelpilzen dominiert. Die Artenzusammensetzung der *Fusarium*-Flora wies dagegen zwischen den Standorten, nicht jedoch zwischen den Winter- und Sommerhafersorten innerhalb eines Standorts, zum Teil sehr charakteristische Unterschiede auf, die sich jeweils auch im Spektrum der nachgewiesenen Toxine niederschlugen (vergl. Tabelle 1).

Vor allem in Zusammenhang mit ausdauernd warmen und trockenen Witterungsperioden im Laufe der Abreife konnten sich in beiden Erntejahren Infektionen der Haferährchen mit *F.poae*, einer vergleichsweise schwach pathogenen *Fusarium*-Art bei Hafer, die jedoch für ihre Nivalenolbildung bekannt ist [7], vor allem bei Sommerhafer nachhaltig etablieren. So konnten in Proben in denen *F. poae* als dominierende Fusarienart nachgewiesen wurde, auch vergleichsweise hohe Nivalenolgehalte von bis zu 1,30 mg/kg (Ritzlhof, Ernte 2003) festgestellt werden. Tendenziell führte ein später Saattermin bei Winterhafer zu etwas höheren Toxingehalten.

Von den Haferproben aus Freistadt wurden im Jahr 2002 vorwiegend *F. sporotrichioides* und in geringerem Umfang auch *F. langsethiae* [8] isoliert. In der Folge konnten in den geernteten Körnern Trichothecene der A-Gruppe, die als wesentlich stärker toxisch als etwa Nivalenol einzustufen sind, nachgewiesen werden. So waren alle Winter- und Sommerhafersorten in Freistadt sowie auch einige Proben aus Gleisdorf mit bis zu 0,25 mg/kg T-2 Toxin und einzelne Proben zusätzlich mit HT-2 Toxin (bis zu 0,36 mg/kg) kontaminiert (vergl. Tabelle 1), was angesichts der relativen hohen Toxizität der beiden Substanzen alarmierend erscheint.

Zearalenon (Nachweisgrenze unter 0,02 mg/kg) und Desoxynivalenol (Nachweisgrenze unter 0,1 mg/kg) konnten in keiner (ZON) bzw. nur in wenigen Proben (DON) der Ernte 2002 nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit dem nur sporadischen Nachweis der für die Produktion dieser Toxine hauptsächlich in Frage kommenden Spezies *F. graminearum*. Obwohl 2003 in den wichtigsten österreichischen Produktionsgebieten ein besonders trockenes und warmes Klima vorherrschte, war bei Hafer eine deutliche Mehrbelastung mit Desoxynivalenol gegenüber dem deutlich regenreicheren Jahr 2002 zu beobachten. Dabei ist noch unklar, ob eventuell besonders günstige Witterungsbedingungen zur Blütezeit des Hafers oder ob Hitze- und Trockenheitsstress im Verlauf der Abreife im Versuchsjahr 2003 Hauptgrund für eine spätere massive Fusarien-Infektion der Ährchen gewesen sein könnte, die etwa in den Körnern aus Ritzlhof zu einer Belastung mit bis zu 0,64 mg Desoxynivalenol je kg Sommerhafer führte (vergl. Tabelle 1). Winterhafer, der 2003 nur am Standort Lambach geprüft werden konnte, erwies sich als deutlich geringer belastet.

Von *F. graminearum* sind zwei Chemotypen bekannt, die sich im Biosyntheseweg des wichtigen Toxins Desoxynivalenol (DON) unterscheiden, je nachdem ob sie 3-Acetyl-desoxynivalenol (3-ADON) oder 15-Acetyldesoxynivalenol (15-ADON) als Vorstufe des DON bilden. Auf Mais finden wir in Österreich dabei ausschließlich Populationen, die 15-ADON produzieren, während auf Hafer nur 3-ADON-Typen vorkommen. Während in den 80er Jahren bei *F. graminearum*-Isolaten von Weizen sowohl 15-ADON- als auch 3-ADON-Typen gefunden wurden, wurden in den letzten Jahren nur mehr 15-ADON-Populationen nachgewiesen [9].

Tabelle 2: *F. graminearum*-Chemotypen, Toxinbildung der Isolate

Wirt	Erntejahr	Isolate (n)	3-ADON-Typen	15-ADON-Typen
			produzieren DON und 3-ADON	produzieren DON und 15-ADON
Hafer	1981-2001	24	24	0
	2002	7	3	4
	2003	8	8	0
Mais	1981-2002	32	0	32
Weizen	1981-1990	13	6	7
	1991-2002	15	0	15

Von Hafer unterschiedlicher Standorte, Sorten- und Anbauvarianten wurden *F. graminearum*-Stämme isoliert, mittels RAPD analysiert und auf ihr Toxinbildungspotential untersucht. Nach den Ergebnissen der RAPD-Analyse erscheinen die untersuchten *F. graminearum*-Stämme als Teil eines Populations-Pools [10]. Die Isolate zeigen dabei allerdings ein hohes Maß an genetischer Diversität, jedoch ohne Bezug auf ihren Chemotyp (3-ADON- oder 15-ADON-Typen) und vorläufig auch unabhängig von ihrer Wirtspflanze (Hafer, Weizen bzw. Mais). Sehr wohl zeigte sich jedoch, dass sowohl in den Winter- als auch in den Sommerhaferproben nach wie vor fast ausschließlich originäre Hafer-Stämme (3-ADON-*F. graminearum*-Typen) vorkommen (vergl. Tabelle 2).

Dieses Ergebnis ist zunächst ein Indiz dafür, dass Mais-*F.graminearum*-Populationen (15-ADON-Typen) Hafer bisher nicht im selben Maß wie Weizen befallen. Dies könnte auf ein höheres Resistenzniveau von Hafer gegenüber Mais-Fusarienstämmen hinweisen, das Hafer als Alternative zu Winterweizen und als sinnvolle Nachfrucht nach Mais mit positiver Fruchtfolgewirkung prädestinieren würde. Allerdings wurden im Untersuchungsjahr 2002 erstmals auch von Hafer (Sommer- und Winterhafer, jeweils nach Vorfrucht Mais) zumindest vier Stämme einer Population von 15-ADON-Chemotypen von *F. graminearum* isoliert (vergl. Tabelle 2).

Inwieweit der Nachweis dieser Stämme nur mit eventuellen außerordentlichen Standort- oder Klimabedingungen eines einzelnen Jahres zusammenhängt, oder ob sich daraus bereits der Beginn einer Verschiebung von Biotypen ablesen lässt, muss jedenfalls noch weiter untersucht werden. So ließ sich etwa dieser erstmalige Nachweis einzelner von Haferkörnern isolierter 15-ADON-Chemotypen in den Ernteproben des Jahres 2003 nicht wiederholen und sowohl in Winter- als auch in den Sommerhaferproben wurden wieder ausschließlich originäre Hafer-Stämme (3-ADON-*F.graminearum*-Population) festgestellt.

Literatur

- 1 EBMEYER, E. (2001): Winterhafer – Züchterische Fortschritte und Anbaumanagement; in Getreide-Magazin 4/2001, 194-195, Gelsenkirchen.
- 2 TAFERNER, J. und C. LANGER (2001): Alternative Winterhafer? Pflanzenschutz 3/2001, p. 2.
- 3 LEW, H. (1986): Zur mikrobiellen Qualität von Hafer. Inform - Zeitschrift für Pflanzenzüchtung und Saatgutproduktion 2, 21-22.
- 4 LEW, H. (1991): Qualitätshaferproduktion aus mikrobiologischer Sicht. Inform - Zeitschrift für Pflanzenzüchtung und Saatgutproduktion 1; 29-30.
- 5 BECK, R. und LEPSCHY J. (2000): Ergebnisse aus dem Fusarium-Monitoring 1989-1999 – Einfluss der produktionstechnischen Faktoren Fruchtfolge und Bodenbearbeitung. Bodenkultur und Pflanzenbau. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau 3: 39-47.
- 6 BURGESS, L.W., C.M. LIDDEL and B. SUMMERELL (1988): Laboratory manual for Fusarium research. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sidney.
- 7 PETTERSSON, H. (1991): Nivalenol production by *Fusarium poae*. Mycotoxin Research 7A, 26-30.
- 8 ADLER, A., H. LEW, J. MOUDRY, Z. STERBA, K. VRATILOVA, W. EDINGER, W. BRODACZ and E. KIENDLER (2003): Microbiological and mycotoxicological quality parameters of naked and covered oats with regard to the production of bran and flakes. Die Bodenkultur 54, 41-48.
- 9 ADLER, A., H. LEW, S. BRUNNER, M. OBERFORSTER, J. HINTERHOLZER, C.M. KULLNIG-GRADINGER, R.L. MACH and C.P. KUBICEK (2002): Fusaria in Austrian cereals - change in species and toxins spectrum. J. Appl. Genetics 43A, 11-16.
- 10 O'DONNELL, K., H.C. KISTLER, B.K. TACKE and H.H. CASPER (2000): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 7905-7910.

Autoren: Dr. Andreas ADLER, Mag. Sandra BRUNNER, Peter HANSLMAYR, Institut für Landwirtschaftliche Analytik; Dr. Richard ÖHLINGER, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“; Dipl. Ing. Josef SÖLLINGER, Zentrum für Versuchswesen, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieningerstraße 8, A-4020 Linz

Quantitative Bestimmung von *Fusarium graminearum* in infiziertem Pflanzenmaterial während aller Stadien des Befalls

G. Reischer, A. Farnleitner und R. L. Mach

Einleitung

Pilze der Gattung *Fusarium* sind weltweit in praktisch allen Natur- und Kulturböden verbreitet; sie wachsen saprophytisch oder dringen parasitisch in lebende Pflanzen ein und zerstören deren Gewebe. Zusätzlich scheiden etliche Spezies von *Fusarium* Mykotoxine in das Substrat aus. Strategien zur Schadensvermeidung beruhen ggw. vor allem auf der (morphologisch und ggf. molekularbiologischen) Identifikation der Fusarien, und dem Nachweis der gebildeten Toxine. Die Problematik dieser Vorgangsweise liegt in der mangelnden Korrelation zwischen Spezies-Identifizierung und Toxinbildung, da die in der Pflanze gebildete Menge an Toxin stark Isolat-abhängig ist. Ursache dafür ist die hohe genetische Variabilität imperfekter Pilzspezies. Eine besonders bedeutende Rolle kommt in Österreich, aber auch weltweit der Spezies *Fusarium graminearum* (teleomorph: *Gibberella zeae*) zu. Dieser pflanzenpathogene Pilz ist ubiquitär verbreitet und Produzent verschiedener Toxine, unter denen die Trichothecene Nivalenol und Deoxynivalenol, und Zeralenon die relevantesten sind.

Ziel unserer Arbeit war es, ein molekularbiologisches Nachweisverfahren für *F. graminearum* zu entwickeln. Wichtige Anforderungen an dieses Verfahren waren hohe Spezifität, möglichst hohe Sensitivität und ein geringer Zeit- und Materialaufwand. Des Weiteren sollte es möglich sein *F. graminearum* direkt in infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen und zu quantifizieren. Dadurch erübrigen sich bisher nötige Kultivierungsschritte, die zu einer morphologischen Identifizierung des Pilzes notwendig wären, und mit denen eine quantitative Abschätzung der Pilzbiomasse nicht möglich ist.

Parallel dazu war es unsere Absicht eine Methode zum quantitativen Nachweis der Toxinbildungsaktivität (Trichothecene) zu etablieren. In Verbindung mit dem Biomasse-Nachweis erlaubt dies eine Abschätzung der Toxinbildungsrate bzw. der biologischen Aktivität des jeweiligen Stammes direkt in der Pflanze.

Methodische Entwicklung

Extraktion von RNA bzw. DNA aus infizierten Weizenähren:

In einem Freilandversuch durchgeführt von unserem Kooperationspartner Dr Lemmens (IFA, Tulln) wurde Weizen mit *Fusarium graminearum* infiziert. Ähren aus verschiedenen Krankheitsstadien (uninfiziert bis 16 Tage nach Infektion, siehe Abb.1) wurden eingefroren (-80°C). Aus diesen wurde

in unserem Labor sowohl RNA wie auch DNA isoliert und in Folge als Templat für spezifische quantitative PCR Nachweise verwendet.



Abb.1: Mit *F. graminearum* inokulierte Weizenähren in verschiedenen Stadien der Infektion. Neg: uninferierte Ähre; 0d, 1d, 2d, 4d, 6d, 8d, 16d: Ähren 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 16 Tage nach Inoculation

Spezifischer quantitativer Nachweis von *Fusarium graminearum*:

Durch die hohe Konserviertheit der Sequenz des β -Tubulin Gens und die große Menge an verfügbarer Sequenzinformation, bietet sich dieses Gen als Ziel eines quantitativen PCR Nachweises an. Zu diesem Zweck wurden alle bereits veröffentlichten β -Tubulin Sequenzen von *F. graminearum* Stämmen und verwandten Arten (z.B.: *F. sporotrichoides*, *F. lunulosporum*, *F. culmorum* oder *F. cerealis*; insgesamt 193 Sequenzen; NCBI Genbank Sequenzdatenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesammelt und gemeinsam mit selbst ermittelten Sequenzen von 10 österreichischen *Fusarium* Stämmen analysiert. Der Vergleich der Sequenzen und die Suche nach geeigneten Sequenzbereichen führte zum Design von PCR Primern und einer TaqMan Sonde mit hoher Spezifität für *F. graminearum*.

Durchgeführt wurden die „real-time“PCR Reaktionen in einem iQ Thermocycler System der Firma Biorad. Dieses erlaubt eine direkte, quantitative Verfolgung der PCR-Produktbildung anhand der Freisetzung des Fluorophors FAM aus der TaqMan Sonde bei jeder einzelnen Vervielfältigung der Zielsequenz. Dadurch wird es möglich die ursprünglich in der Probe vorhandenen Anzahl an Kopien des β -Tubulin Gens zu errechnen, die ein direktes Maß für die vorhandenen Pilz-Genome von *F. graminearum* ist.

Dieser „real-time“ PCR Ansatz wurde unter Verwendung von *F. graminearum* Reinstämmen ausführlichen getestet. Als Bezugsgröße diente ein selbstentwickelter β -Tubulin Plasmid-Standard. Unter anderem umfassten diese Untersuchungen die Ermittlung der Bestimmungsgrenze der Methode. Wir konnten zeigen, dass es möglich ist das β -Tubulin Gen in Pflanzenmaterial ab einer Anzahl von nur 5-10 Kopien positiv nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Ergebnisse waren in hohem Maß reproduzierbar und über einen Bereich von 10 bis 10^5 Templaten linear ($R^2 > 0,97$) (siehe Abb.2). In Ansätzen konnte die hohe Spezifität für *F. graminearum* gegenüber anderen wichtigen Ähren-Fusariose Erregern (z.B.: *F. culmorum*, *F. poae*) (Edwards, Pirgozliev et al. 2001), dem T-2 Toxin Bildner *F. sporotrichoides* sowie gegenüber Stämmen, die eine hohe

Sequenzähnlichkeit mit *F. graminearum* aufweisen (z.B.: *F. cerealis*), bestätigt werden. Keine der getesteten verwandten *Fusarium* Arten ergab im hier entwickelten Nachweis ein positives Ergebnis, wohingegen alle 9 von uns getesteten österreichischen *F. graminearum* Stämme detektier- und quantifizierbar waren.

Die Untersuchung der Proben aus oben erwähntem Freilandversuch ergab einen stetigen Anstieg der Pilzbiomasse im Verlauf des gesamten Infektionsverlaufes.

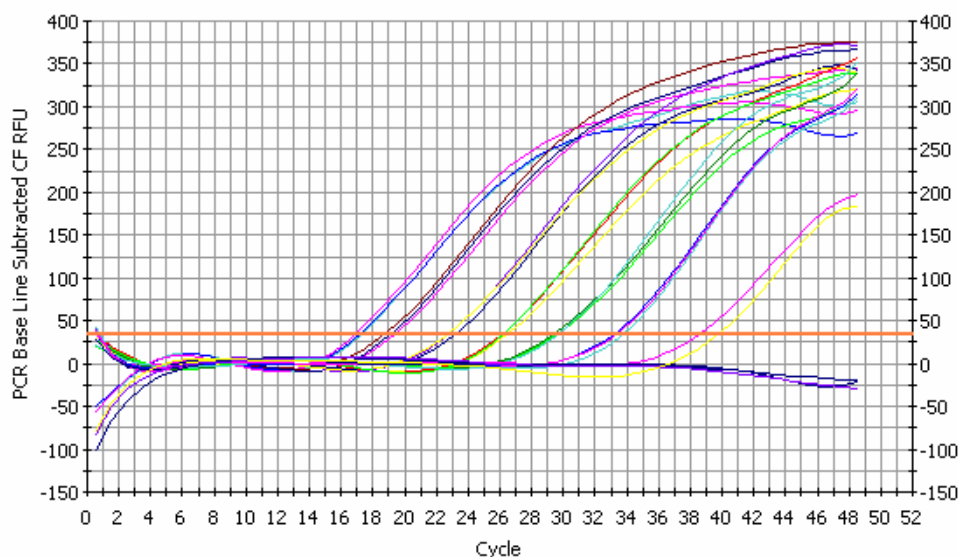


Abb.2: „Real-Time“ PCR Amplifikationskurven des Plasmid Standards mit den Kopienzahlen 1 bis 10^7 als Triplikate

Reverse Transkription der mRNA des *tri5* Gens und anschließende „real-time“ PCR:

Das *tri5* Gen in Trichothecen produzierenden Pilzen codiert für das Enzym Trichodiensynthase. Dieses katalysiert den ersten Schritt in der Trichodien-Biosynthese und ist damit das Schlüsselenzym in der Entstehung aller Trichothecene (Sweeney and Dobson 1999). Da seine Expression direkte Rückschlüsse auf die Trichothecen-Bildung zulässt, wurde es als zweites Ziel unserer Studie gewählt.

Die aus den infizierten Ähren extrahierte RNA wurde nach DNase Verdau einer Reversen Transcriptase (RT) Reaktion unterzogen. Dabei fand der für das *tri5* Gen von *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* und *F. sambucinum* spezifische Primer Tri5_RT_r Verwendung (5'-AAACCATCCAGTTCTCCATCTG-3') (Doohan, Weston et al. 1999). Die so gewonnene cDNA wurde in einer anschließenden „real-time“ PCR quantifiziert. Dabei fand neben dem oben angeführten Primer Tri5_RT_r der Primer Tri5_RT_f (5'-AGCGACTACAGGCTTCCCTC-3') Verwendung. Die direkte online Verfolgung der PCR Produktbildung, die eine Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen mRNA erlaubt, geschah unter anhand des fluoreszierenden und an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes SYBRGreen I. Das verwendete PCR Protokoll lautet wie folgt: 5 min 95°C, 45 mal 95°C 30 sec, 69°C 20 sec, 72°C 45 sec.

Parallel wurde auch die extrahierte genomische DNA aus den Ähren dieser PCR Analyse unterzogen. Da in jedem *F. graminearum* Genom sowohl das β -Tubulin Gen als auch das *tri5* Gen

in nur einer einzigen Kopie vorliegen, kann man über diese Analyse direkt die Expressionrate des für die Toxinbildung verantwortlichen Gens *tri5* mit der Pilzbiomasse in Beziehung setzen. Es war möglich im untersuchten Pflanzenmaterial die Expression von *tri5* schon am vierten Tag nach Inokulation nachzuweisen.

Zukünftige Arbeiten und Anwendungsperspektiven

Als nächste Schritte in der Ausweitung der hier beschriebenen Untersuchungsmethoden bieten sich die Erweiterung des „real-time“ Detektionssystems auf weitere relevante Fusarien Arten (z.B.: *F. culmorum* oder *F. sporotrichoides*) und die Einbeziehung weiterer für die Toxin-Biosynthese wichtiger Gene (z.B.: *tri7* Gen zur Differenzierung zwischen DON bzw. NIV produzierenden Stämmen, Polyketidsynthasen in der ZON Bildung sowie neue Virulenzfaktoren) an.

Die entwickelten Verfahren könnten zur Etablierung eines Frühwarnsystems zur frühzeitigen Erkennung, Identifikation und Quantifizierung des Befalls durch Fusarien dienen. Auch Bekämpfungsmaßnahmen könnten so präzise bewertet werden. Durch den geringen Zeit- und Materialaufwand bietet sich die Methode auch als Routineanalyseverfahren an.

Danksagung

Unser Dank gilt dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft für die Finanzierung dieses Forschungsprojekts 1264, Dr. Marc Lemmens für die zur Verfügung gestellten Stämme und Ähren und Dr. Andreas Adler für zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und die konstruktive Diskussion der Problematik.

Doohan, F. M., G. Weston, et al. (1999). "Development and Use of a Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of Tri5 by Fusarium Species In Vitro and In Planta." Appl. Environ. Microbiol. **65**(9): 3850-3854.

Edwards, S. G., S. R. Pirgozliev, et al. (2001). "Quantification of Trichothecene-Producing Fusarium Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against Fusarium Head Blight of Winter Wheat." Appl. Environ. Microbiol. **67**(4): 1575-1580.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." FEMS Microbiology Letters **175**: 149-163.

Autoren: Dipl. Ing. Georg REISCHER, A. FARNLEITNER und Univ. Prof. Dr. Robert L. MACH, Division Applied Biochemistry and Gene Technology, Institute of Chemical Engineering, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/172, A-1060 Wien

***Fusarium graminearum* Genomsequenz: was nun?**

G. ADAM

Einleitung

Aufgrund der großen Bedeutung des Pilzes *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) als Pathogen von wichtigen Nutzpflanzen wie Weizen, Gerste und Mais wurden von amerikanischen Forschungsförderungsstellen die Mittel bereitgestellt, das gesamte Genom dieses Organismus zu sequenzieren. Diese nun öffentlich zugängliche Genomsequenz ermöglicht völlig neue Möglichkeiten, die noch weitgehend unbekannten Virulenzmechanismen des Pilzes zu erforschen. Ziel solcher Arbeiten ist es, für die Virulenz des Pathogens essentielle Vorgänge zu identifizieren, und die dafür erforderlichen Zielgene („targets“) zu neutralisieren. Einerseits könnte dies durch die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel geschehen, die nicht unspezifisch für Pilze toxisch sind, sondern nur solche Prozesse blockieren, die für die Pathogenizität des Pilzes notwendig sind. Andererseits ist daran gedacht, vorhandenen Resistenzmechanismen der Pflanze durch züchterische oder gentechnische Maßnahmen zu stärken. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über den Stand und die Entwicklung im Bereich „Fusarium Genomforschung“ gegeben werden.

Sequenzierung von *Fusarium graminearum*

Aufgrund des Projektantrages von Bruce Birren (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Boston), Corby H. Kistler (USDA-ARS und Univ. Minnesota), Jin-Rong Xu (Purdue University) und Frances Trail (Michigan State University) wurden etwa 1,8 Millionen Euro für die Sequenzierung bereitgestellt. Die Sequenzierstrategie bestand darin, das Genom des Pilzes in kleine Stücke zu zerteilen und diese Plasmide nach dem Zufallsprinzip anzusequenzieren. Aufgrund der für die Sequenzierung des menschlichen Genoms aufgebauten Sequenzierkapazität (Das Whitehead Institut alleine kann automatisiert pro Monat etwa 3 Millionen Sequenzreaktionen mit durchschnittlich 580 Basen pro Sequenzlauf durchführen) war es innerhalb weniger Wochen möglich, die Genomequenz des Pilzes zu ermitteln. Dabei wurde im statistischen Durchschnitt jeder Bereich des auf 40.000.000 Basenpaare geschätzten Genoms etwa 10x ermittelt, wodurch die Fehlerrate und Zahl der Lücken klein ist. Aufgrund der Überlappungen der Sequenzen konnte aus den zufälligen Bruchstücken die Genomsequenz assembliert werden (wozu Hochleistungscomputer in weniger als einem Tag imstande sind). Weiters wurde von Whitehead eine automatisierte Annotation (Vorhersage, für welche Proteine die DNA-Sequenz kodiert) erstellt. Diese Datenbank ist unter folgender Internet-Adresse zu finden: <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/>

Laut den zur Vorhersage verwendeten Computerprogrammen besitzt der Pilz etwa 11.600 Gene. Die meisten dieser postulierten Gene weisen mehrere Introns auf (unterbrechende Abschnitte in der DNA die aus der Messenger-RNA entfernt werden müssen, bevor die Information in Proteine umgesetzt wird). Solche Introns weisen konservierte Strukturmerkmale auf, die jedoch auch zufällig im Genom vorkommen. Die Vorhersage von Introns ist daher nicht ganz einfach. Es ist auch nicht leicht die Anfangs- und Endpunkte der für Proteine kodierenden Bereiche in der genomischen DNA vorherzusagen. Die alleine auf Computer-Algorithmen basierenden Vorhersagen liefern in etwa 30% der Fälle teilweise fehlerhafte Genmodelle. Häufig werden zwei nahe beieinander liegende offene Leserahmen zu einem fusioniert, oder es werden durch falsche Intronvorhersagen Proteine am C-terminus fälschlich verlängert.

Fusarium „genomics“ und GEN-AU:

Im Rahmen des österreichischen Genomforschungsprogrammes GEN-AU (<http://www.gen-au.at>) wurde ein Pilotprojekt FUSARIUM gefördert, das sich die Erforschung von Virulenzmechanismen von *Fusarium graminearum* und von Resistenzmechanismen von Pflanzen zum Ziel gesetzt hat. Da Sekundärmetaboliten des Pilzes eine wesentliche Rolle als Virulenzfaktoren spielen dürften, ist auch die Chemie im interdisziplinären Forscherteam stark vertreten. Zusammen sollen beispielsweise Fragen geklärt werden wie: Wofür kodieren die 16 vorhergesagten Polyketidsynthase-Gene? Welche (mit Ausnahme von Zearalenon und dem Pigment Rubrofusarin) unbekannten Metaboliten werden von diesen Enzymen gebildet? Sind die gebildeten Metaboliten für die Virulenz auf Weizen relevant? Der experimentelle Ansatz ist in vielen Fällen, Gene gezielt zu zerstören, bzw. diese heterolog zu exprimieren (beispielsweise in Hefe oder *Escherichia coli*) um ihre Funktion studieren zu können. Korrekte Genmodelle sind eine Voraussetzung für derartige Forschungsansätze. Daher ist ein Partner (Subcontract) im GEN-AU Konsortium eine Gruppe von Bioinformatik-Spezialisten aus München (Prof. HW Mewes, Dr. Ulrich Guedener vom „Munich Information Center for Protein Sequences“ (MIPS)), die bereits große Erfahrung mit der Annotation von Pilzgenomen hat. So wurde am MIPS beispielsweise im Rahmen eines deutschen Genomprojektes das Erbgut des saprophytischen Pilzes *Neurospora crassa* annotiert:

(http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwfly.pl?&Set=Ncrassa_annotations&Page=index).

Vorerst nur für das GEN-AU Konsortium, jedoch ab Mitte 2004 dann öffentlich zugänglich, soll eine benutzerfreundliche *Fusarium*-Genomdatenbank erstellt werden, die für alle *Fusarium*-Interessierten von großem Wert sein sollte. Die Datenbank ermöglicht beispielsweise die Suche nach bestimmten Begriffen (zB: Enzymatische Reaktion, EC Nummer etc.). Vor der systematischen Sequenzierung waren nur 39 Gene bekannt (vor allem Trichothecene-Biosynthese). Von den fast 12.000 vorhergesagten Genen findet man für etwa 55% mehr oder weniger stark sequenzähnliche und vermutlich funktionell äquivalente Gene („housekeeping genes“). Für etwa 15% der Proteine kann eine biochemische Funktion vorhergesagt und eine systematische Enzymnummer zugeordnet werden. Ein großer Teil der *Fusarium*-Gene hat jedoch

keine Ähnlichkeit mit aus anderen Organismen bekannten bzw. vorhergesagten Genen. Die MIPS Datenbank erlaubt den raschen Vergleich mit anderen Pilzgenomen, die ebenfalls schon vollständig sequenziert sind (Hefen: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, filamentöse Ascomyceten: *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*). Diese Verknüpfungsmöglichkeit ist an einem Beispiel (Abbildung 1) dargestellt:

Fusarium_graminearum: genome comparison table			
sure high medium low			
Fusarium_graminearum	Aspergillus nidulans	Magnaporthe grisea	Neurospora crassa annotations
10_120 23390.. 24277 predicted protein	-	mg03110.1 predicted..protein	3nc400_120 putative..protein
10_130 26332.. 24326 predicted protein	-	-	-
10_140 31024.. 30610 predicted protein	-	-	-
10_150 31520.. 35534 conserved hypothetical protein	an7748.1 hypothetical..protein	mg00073.1 hypothetical..protein	6nc360_500 related..to DNA-directed DNA polymerase
		mg09124.1 hypothetical..protein	1nc594_120 conserved..hypothetical protein
			29e8_520 related..to caffeine-induced death protein 1 Cid1
10_160 36696.. 37655 predicted protein	an8518.1 hypothetical..protein	mg06586.1 hypothetical..protein	-
	an7527.1 hypothetical..protein	mg09297.1 predicted..protein	

Abbildung 1: Die in einer Zeile gelisteten Gen-Nummern haben die durch den Farbcode ersichtlichen Ähnlichkeitsgrad. Zu dem in der ersten Zeile aufgelisteten *F. graminearum* Gen 10_120 gibt es in *Aspergillus* keine Entsprechung, während sehr ähnliche Gene in *Magnaporthe* und *Neurospora* vorkommen. Die am Chromosom unmittelbar benachbarten Gene 10_130 und 10_140 sind spezifisch für *Fusarium graminearum*. Durch Mausklick kann die vollständige Information zu den jeweiligen homologen Genen eingesehen werden.

Die Datenbank soll in Zukunft eine international anerkannte Anlaufstelle werden, bei der neue Informationen über *F. graminearum* Gene hinterlegt werden („community annotation“). Vorbilder sind beispielsweise die Hefedatenbanken (<http://www.yeastgenome.org/>; *Saccharomyces* Genome Database SGD; und <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp>, MIPS YCGD Comprehensive Yeast Genome Database). Diese Datenbanken erlauben auch unmittelbar den Zugriff auf die verfügbaren Literatur- und Genexpressionsdaten („gen chip“). Auch für *Fusarium graminearum* wurden inzwischen in den USA die Mittel bewilligt, um einen Affymetrix Chip zu entwickeln, der ab 2005 kommerziell erhältlich sein wird (Prof. Frances Trail, persönliche Mitteilung).

Es gibt also noch viel zu tun – mit den technologischen Entwicklungen im Bereich der „Genomik“ ist es hoffentlich bald möglich, dem Pilz umweltverträgliche und nachhaltige, auf tieferen Einsichten in Virulenzmechanismen beruhende Bekämpfungsstrategien entgegenzusetzen. GEN-AU!

Autor: Univ. Ass. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Detoxifikation des *Fusarium* Mykotoxins Deoxynivalenol durch eine UDP-Glucosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

BRIGITTE POPPENBERGER, DORIS LUCYSHYN und G. ADAM

Einleitung

Infektionen von Getreide durch verschiedene pflanzenpathogene Pilze der Gattung *Fusarium* stellen ein großes Problem in der Landwirtschaft dar. Besondere Bedeutung hat dabei die Kontamination des Erntegutes mit Mykotoxinen der Klasse der Trichothecene. Diese sesquiterpenoiden Epoxide werden häufig von *Fusarium* Arten gebildet und inhibieren sehr wirksam die eukaryotische Proteinbiosynthese. *F. graminearum* bildet hauptsächlich die Trichothecene Deoxynivalenol (DON), 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-ADON), und Nivalenol (NIV). Der Verdacht, dass bei der Infektion der Pflanzen durch den Pilz DON-Bildung eine Rolle als Virulenzfaktor spielt und deshalb die Resistenz gegen das Mykotoxin einen wichtigen Faktor der *Fusarium* Resistenz von Weizen und anderen Pflanzen darstellen dürfte, wurde durch folgende Befunde erhärtet: Eine Deletion in einem Toxin-Biosynthesegen, der Trichodien Synthase (Tri5), von *Fusarium graminearum* führt zu stark verminderter Virulenz (Desjardins et al., 1996), und *in vitro*-Toxinresistenz verschiedener Weizensorten korreliert mit Feldresistenz gegen die Ährenfusariose (Mesterhazy, 2003; M. Lemmens persönliche Mitteilung). Toxinresistenz von Pflanzen kann durch verschiedene Mechanismen entstehen: reduzierte Aufnahme oder aktives Ausschleusen der Toxine, Detoxifikation durch Modifizierung oder eine Veränderung am Angriffsort sind Möglichkeiten, die von Pflanzen genutzt werden. Eine wichtige Art der Detoxifikation ist die Konjugation von Substanzen an Zuckergruppen durch Glykosyltransferasen, wodurch die Toxine wesentlich weniger schädlich gemacht werden und leichter ausgeschleust oder in der Zelle kompartimentiert werden können. Wir berichten hier von der Isolierung und Charakterisierung einer UDP-Glykosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*, die DON glucosylieren und damit detoxifizieren kann (Poppenberger et al., 2003)

Methoden und Ergebnisse

Isolierung von DOGT1

Ein Hefestamm, der durch Inaktivierung mehrerer ABC Transporter hypersensitiv gegen DON ist (YZGA452), wurde mit einer *Arabidopsis* cDNA-Genbank transformiert (Minet et al. 1992). 10⁷ Transformanten wurden auf Resistenz gegen 180 ppm DON getestet und eine der selektierten resistenten Kolonien erwies sich als plasmidabhängig. Das cDNA-Insert dieses Plasmides wurde sequenziert, es codiert für eine UDP-Glucosyltransferase (DOGT1: DON-glucosyltransferase 1).

Expression von *DOGT1* in Hefe

Das *DOGT1* Gen wurde im Hefestamm YZGA515 exprimiert (bei dem neben ABC Transportern auch eine DON-Acetyltransferase inaktiviert wurde), und Transformanten wurden auf Medium mit steigender Toxinkonzentration verschiedener Trichothecene aufgetragen. Transformanten mit dem leeren Expressionsvektor wurden als Kontrolle verwendet. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, verleiht *DOGT1* der Hefe Resistenz gegen mehr als 200 ppm DON und 30 ppm 15-ADON. Resistenz gegen andere getestete Trichothecene konnte nicht festgestellt werden.

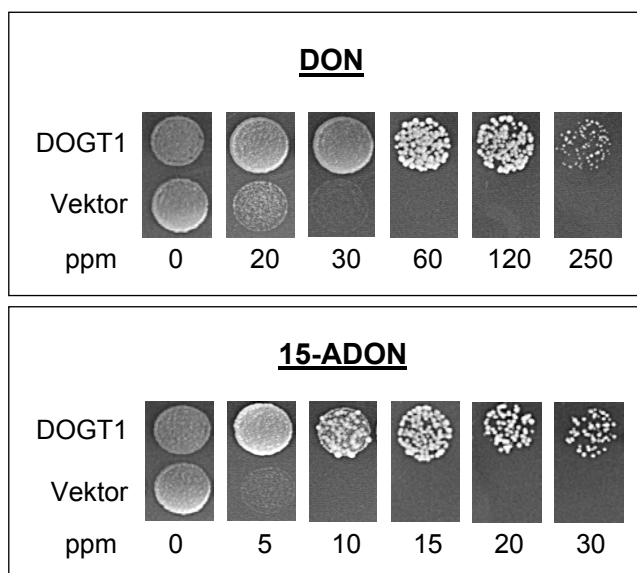


Abbildung 1: Überexpression von *DOGT1* in Hefe schützt vor den Trichothecenen DON und 15-ADON. Kulturen gleicher optischer Dichte von YZGA515 transformiert mit *DOGT1* (jeweils oben) beziehungsweise dem leeren Expressionsvektor (unten) wurden auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Toxin aufgetropft und bebrütet.

Überexpression von *DOGT1* in *Arabidopsis thaliana*

Um zu testen, ob *DOGT1* auch Pflanzen vor DON schützt, wurden Überexpressionskonstrukte hergestellt, bei denen das *DOGT1*-Gen unter der Kontrolle eines duplizierten 35S Promotors steht. Ausserdem wurde das Gen mit einem N-terminalen c-Myc-Tag versehen, um die Expression in den Pflanzen mittels Western Blotting überprüfen zu können. *Arabidopsis thaliana* Columbia Wildtyp (Col-0) wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* Stamm UA143 mit dem Konstrukt transformiert. Samen von transformierten Pflanzen, die *DOGT1* stark überexprimierten, wurden auf Murashige und Skoog- Medium mit 5-30 ppm DON gekeimt. Die Wildtyp Pflanzen (Col-0) keimten nur langsam, bildeten keine Wurzel und ihre Keimblätter bleichten aus bevor weitere Blätter sich entwickeln konnten. Nach fünf Wochen auf DON hörten die Pflanzen auf zu wachsen. Auch *DOGT1*-Überexpressionpflanzen zeigten verzögertes Wachstum, aber sie keimten schneller als Wildtyp Pflanzen und entwickelten sich ohne auszubleichen weiter.

Induktion der Expression von *DOGT1* in *Arabidopsis thaliana*

Zur Beobachtung der Expression von *DOGT1* in *Arabidopsis* wurde das Reportergen β -Glucuronidase unter die Kontrolle des *DOGT1*-Promotors gestellt. Nach der Transformation

dieses Konstruktes kann man gewebespezifische Aktivierung des Promoters über die Aktivität des Reportergens beobachten und so Rückschlüsse auf die Expression des *DOGT1*-Gens ziehen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass *DOGT1* entwicklungsspezifisch reguliert ist. In Keimlingen ist die Expression auf Wurzeln und Hypocotyl beschränkt, wobei sie im Meristem der Wurzelspitzen und im Gefäßsystem am stärksten war. Später in der Entwicklung nimmt die Expression im Gefäßsystem ab, in adulten Pflanzen wurde Expression in der späten Blütenentwicklung und in Zellen der Wurzelepidermis beobachtet. Allgemein war die Expression eher schwach. Über reverse Transkription-PCR wurde festgestellt, dass die Expression von *DOGT1* durch das Substrat DON, und die Pathogenstress-Signalmoleküle Salicylsäure, Ethylen und Jasmonsäure induzierbar ist.

Reduktion der Toxizität von DON durch Glucosylierung

Von F. Berthiller (siehe nachfolgenden Artikel) konnte nachweisen werden, dass DOGT1 Glucose von UDP-Glucose auf die C3-Hydroxylgruppe von DON überträgt (siehe Abbildung 2A). Mit Hilfe eines gekoppelten Transkriptions/Translations System aus Weizenkeimextrakt (Promega) konnten wir demonstrieren, dass DON-3-Glucosid weniger toxisch ist als DON. Dabei werden *in vitro* Transkription und Translation des Reportergens Luciferase über dessen Aktivität gemessen. Während die Zugabe von 5 μ M DON die Luciferase-Aktivität auf 3.1% gegenüber der Kontrolle ohne Toxin senkte, betrug die Aktivität bei Zugabe von 20 μ M DON-3-Glucosid immer noch 92% (siehe Abbildung 2B).

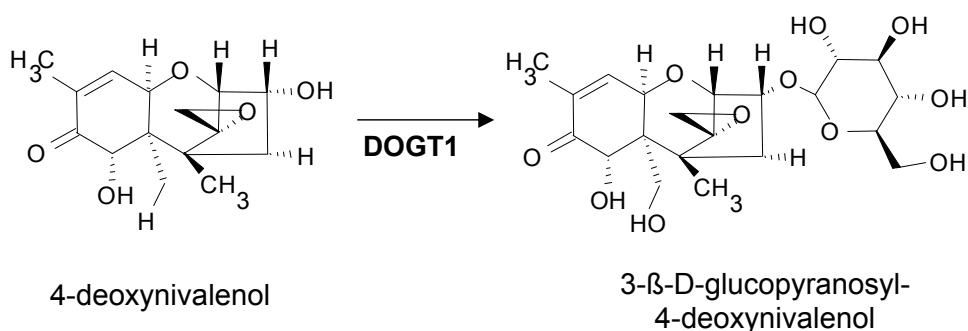


Abbildung 2A: Umwandlung von DON zu DON-3-Glucosid durch DOGT1.

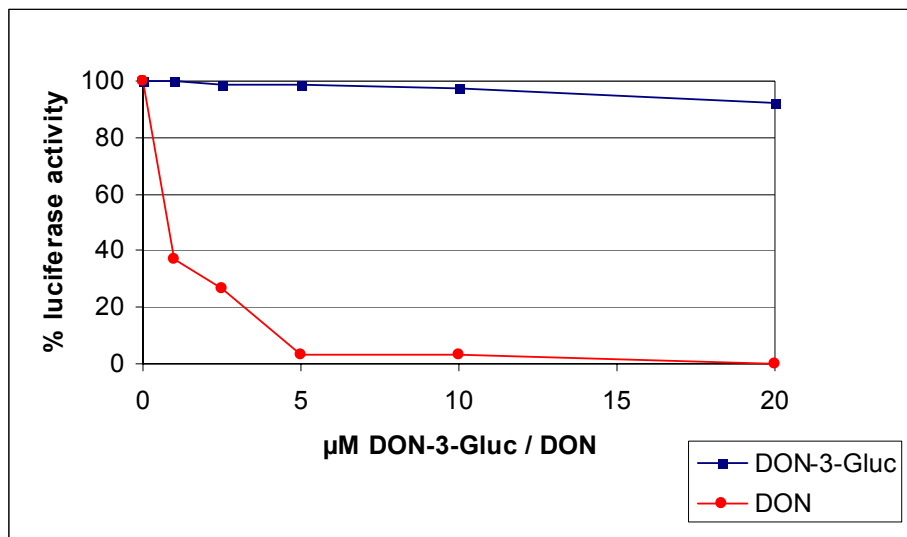


Abbildung 2B:

Zugabe von DON-3-Glucosid beeinflusst die *in vitro* Translation der Luciferase mRNA kaum im Vergleich zur Zugabe von DON.

Zusammenfassung

Die UDP-Glucosyltransferase DOGT1 glucosyliert das Trichothecen-Mykotoxin Deoxynivalenol an der C3-Hydroxylgruppe. Da durch diese enzymatische Modifikation in einem *in-vitro* Test die Toxizität sehr stark reduziert wurde, kann man von einem Detoxifikationsprozess sprechen. Die Expression von *DOGT1* in *Arabidopsis thaliana* ist entwicklungspezifisch reguliert und wird sowohl durch DON als auch durch Substanzen, die die Stressantwort regulieren induziert. Erhöhte Resistenz gegen DON von *Arabidopsis* kann durch Überexpression von *DOGT1* erreicht werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (DOC-Stipendium) und dem Österreichische Genomforschungsprogramm (GEN-AU) für die Finanzierung dieser Arbeit.

Literatur

- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C. and Adam, G. (2003) Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* **278**: 47905-47914
- Desjardin, A.E., Procter, R.H., Bai, G., McCormic, S.P., Shaner, G., Buechley, G. and Hohn, T. (1996) *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 775-781
- Mesterhazy, A. (2003) Fusarium head blight of wheat. In: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (Hrsg. Leonard, K. & Bushnell, W) . pp.211-295 (ISBN:0-89054-302-X), APS Press.
- Minet, M., Dufour, M.-E. and Lacroute, F. (1992) *Plant J.* **2**: 417-422

Autoren: Dr. Brigitte POPPENBERGER, Mag. Doris LUCYSHYN und Univ. Ass. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien

LC-MS/MS von konjugierten Toxinen

F. BERTHILLER, R. SCHUHMACHER, G. ADAM und R. KRSKA

Einleitung:

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und insbesondere die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) erlauben die Bestimmung einer großen Anzahl nicht flüchtiger Analyten unterschiedlichster Polarität. Ein Vorteil gegenüber der Gaschromatographie (GC) liegt darin, das Schimmelpilz-Gifte (Mykotoxine) nicht vorher derivatisiert werden müssen, sondern nach der Probenvorbereitung meist direkt gemessen werden können. Zur Detektion der Analysen-substanzen eignen sich Massenspektrometer (MS) besonders gut, sie gestatten die direkte Bestimmung der molekularen Masse der gemessenen Substanzen. Darüber hinaus bieten Tandemmassenspektrometer (MS/MS), wie Dreifach-Quadrupol-Geräte, weitere Möglichkeiten, sowohl zur Identifikation des Analyten und dessen Strukturcharakterisierung, sowie zu dessen Quantifizierung. Bei der quantitativen Bestimmung kommt vor allem der „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus zum Einsatz. Bei dieser Messtechnik gelangen nur Ionen eines bestimmten Masse/Ladung-Verhältnis in die Kollisionszelle des Massenspektrometers. Diese werden dort unter der Bildung charakteristischer Bruchstücke fragmentiert. Die Intensität eines einzigen charakteristischen Bruchstücks wird in der Regel zur Auswertung herangezogen. Neben der hohen Selektivität kann hierbei auch hohe Sensitivität erreicht werden. Zur qualitativen Analyse dienen unter anderem der Produktionen-, der Vorläuferionen- und der Neutralteilchenverlust-Scan. Während man im Produktionenscan das Fragmentierungsverhalten eines ausgewählten Ions beobachtet, erhält man im Vorläuferionenscan ausgehend von einem charakteristischen Bruchstück alle Analyten in der Probe, welche dieses Bruchstück bilden, d.h. strukturell verwandt sind. Der Neutralteilchenverlust-Scan ermöglicht die Detektion eines gemeinsamen Struktur-elements, z.B. Glucose, in unterschiedlichen Analyten, welches als ungeladenes Bruchstück von den Analysesubstanzen abgespalten wird.

Pflanzen können die Toxizität schädlicher Substanzen, wie Mykotoxine, vermindern. Dieser Entgiftungsprozess beinhaltet auch die Konjugation der Mykotoxine an polare Substanzen wie Glukose, Sulfat, Acetat oder Glutathion. Obwohl diese „maskierten Mykotoxine“ zum Teil wesentlich niedrigere Toxizität aufweisen, können sie im Verdauungstrakt von Säugetieren wieder zurück zum freien Mykotoxin hydrolysiert werden. Zur Zeit existiert, unseres Wissens nach, lediglich eine validierte analytische Methode zur Bestimmung eines dieser konjugierten Mykotoxine, nämlich für Zearalenon-4-Glukosid. Schneweis et al. zeigten mittels HPLC-MS, dass Zearalenon-4-Glukosid in 42% aller Zearalenon (ZON) positiven Weizenproben nachweisbar ist (Schneweis et al., 2002). Diese Substanz wurde darüber hinaus bereits am IFA-Tulln chemisch synthetisiert und mittels chromatographischer und spektroskopischer Techniken analysiert.

Aufgabenstellung:

Zwei der in Österreich am häufigst vorkommenden und deshalb wichtigsten *Fusarium* Mykotoxine sind Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON). In einem ersten Schritt wurden deshalb konjugierte Verbindungen dieser Vorstufen mittels LC-MS/MS analysiert. Wir wollen an dieser Stelle beispielhaft auf drei konjugierte Toxine eingehen und anhand von Zearalenon-4-Sulfat die quantitativen und anhand von zwei Deoxynivalenol-Glukosiden die qualitativen Möglichkeiten von LC-MS/MS Bestimmungen demonstrieren.

Zearalenon-4-Sulfat:

25g Reis wurden mit Saccharose- und Caseinhydrolysatmedium versetzt, autoklaviert und mit einer *Fusarium graminearum* Flüssigkultur angeimpft. Nach 3 Wochen Wachstum bei niedriger Raumtemperatur, wurde der verschimmelte Reis mit Methanol/Wasser (75/25) extrahiert und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Die Lösung wurde filtriert, und ein Aliquot mit Methanol/Wasser (5/95) 1:20 verdünnt. LC-MS/MS Analysen wurden auf einem QTrap-LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, USA), ausgestattet mit einer Turbo Ion Spray (ESI) Quelle und einem 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany) samt Diodenarraydetektor (DAD) durchgeführt. Die chromatographische Trennung wurde bei 25°C mittels eines Methanol/Wasser Gradienten über eine 150 mm x 4.6 mm i.d., 3 µm RP-18 Aquasil-Säule (Keystone, Waltham, USA) erzielt. Die Flußrate wurde auf 0.35 ml/min gesetzt. UV-Detektion wurde bei 270 nm durchgeführt, bevor die Proben im negativen MRM Modus bei 400°C analysiert wurden. Weitere Parameter waren CUR 20 psi, GS1 30 psi, GS2 75 psi, IS -4200 V, CAD 6. Für ZON wurde der Massenübergang von m/z 317.2 auf m/z 131.2 mit einem Declusteringpotential (DP) von -51 V und einer Kollisionsenergie (CE) von -38 eV gewählt. Für ZON-4-Sulfat beobachteten wir den Übergang von m/z 397.1 auf m/z 317.2 mit -51 V DP und -18e V CE. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm des Laufs, oben werden MRM-Übergänge, darunter das UV-Signal dargestellt.

ZON und ZON-4-Sulfat sind deutlich chromatographisch getrennt. Anhand der UV-Signale lässt sich abschätzen, dass ZON-4-Sulfat und ZON ca. im Verhältnis 1 zu 6 vorliegen. Das hohe MRM-Signal bei der Retentionszeit von 20.56 min erklärt sich durch die leichte Fragmentierung von ZON-4-Sulfat und erlaubt keine Konzentrationsabschätzung ohne Kalibration. Hierzu ist eine gereinigte Standardsubstanz erforderlich, an deren Präparation wir gerade arbeiten. Weiters soll danach festgestellt werden, ob und wie viel ZON-4-Sulfat auch in natürlich kontaminiertem Getreide nachgewiesen werden kann.

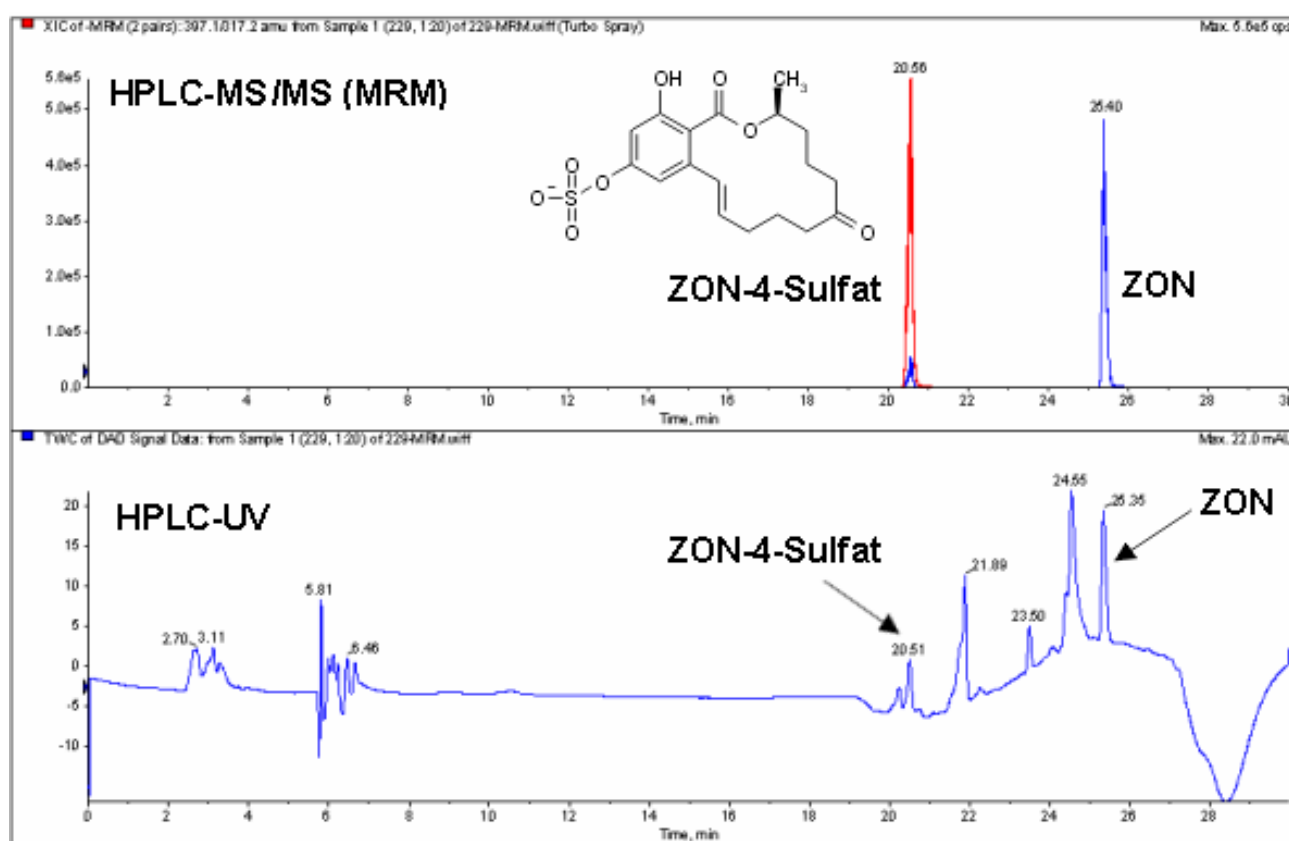


Abbildung 1

HPLC-MS/MS und HPLC-UV Chromatogramme eines Extrakts von inokuliertem Reis

Deoxynivalenol-Glukoside:

Sowohl DON-3-Glukosid als auch DON-15-Glukosid wurden durch eine zweistufige Synthese aus 15-Acetyl-DON bzw. 3-Acetyl-DON mit Acetobromglukose und anschließender Hydrolyse der Acetat-Schutzgruppen über einen basischen Ionenaustauscher hergestellt (Berthiller et al., 2004). Die beiden Glukoside konnten sowohl chromatographisch getrennt, als auch aufgrund ihres unterschiedlichen MS/MS Fragmentierungsmusters von einander unterschieden werden. Darüber hinaus konnten wir nachweisen (Abbildung 2), dass die UDP-Glukosyltransferase DOGT1 aus *Arabidopsis thaliana* in der Lage ist DON-3-Glukosid aus DON zu bilden (Poppenberger et al., 2003). Auch bei den DON-Glukosiden wollen wir feststellen, ob diese konjugierten Mykotoxine in natürlich kontaminiertem Getreide nachgewiesen werden können. Eine Voraussetzung ist auch hier die Verfügbarkeit gereinigter Standardsubstanzen. Darüber hinaus sind verbesserte Probenaufarbeitungsschritte erforderlich, die garantieren, dass neben dem freien auch konjugierte Formen des Toxins analytisch erfasst werden.

Danksagung:

Die Autoren bedanken sich beim Österreichischen Genomforschungsprogramm (GEN-AU) sowie bei der Christian Doppler Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

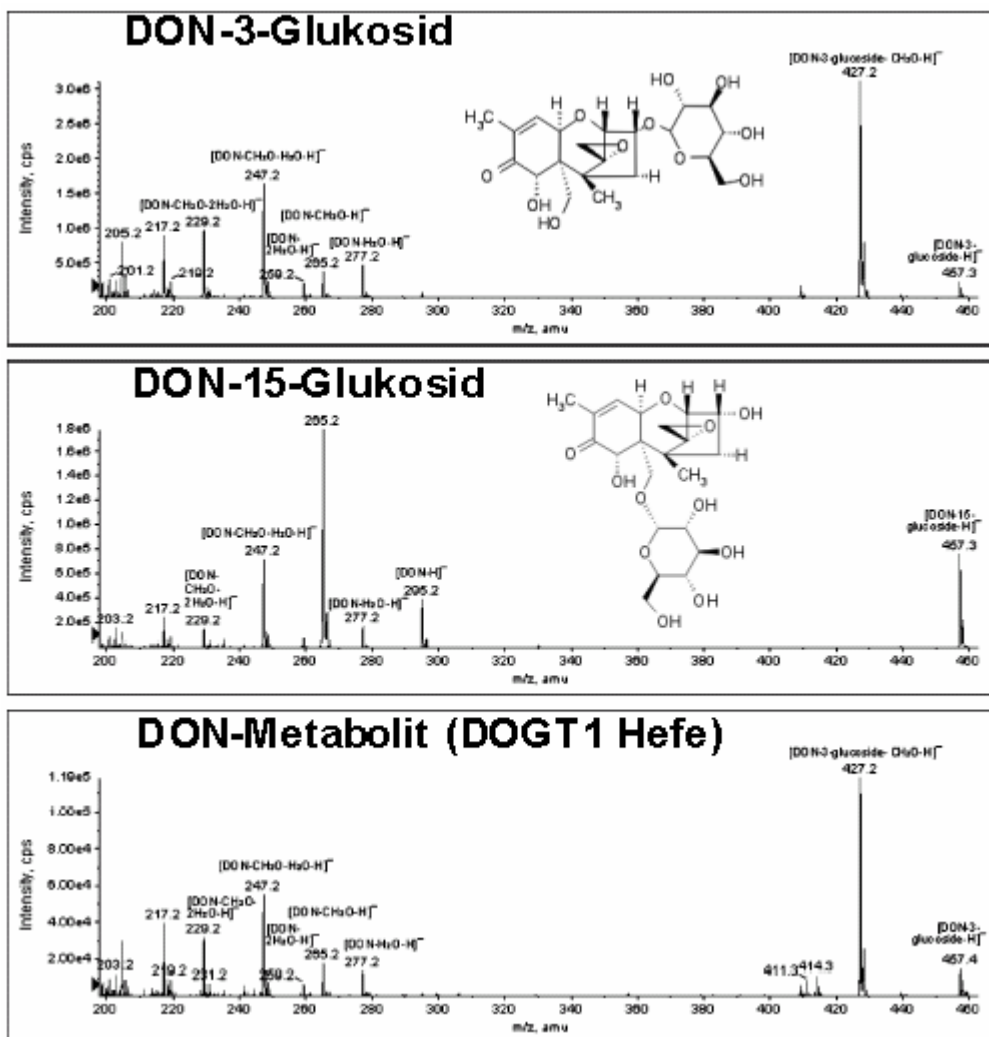


Abbildung 2
HPLC-MS/MS Spektren von DON-Glukosiden (nachgebildet aus Poppenberger et al., 2003)

Literatur:

Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G. und Bauer, J., 2002: Occurrence of Zearalenone-4-β-D-glucopyranoside in Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1736-1738

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Freudenschuss, M., Adam, G. und Krska, R., 2004: Synthesis of Deoxynivalenol-Glucosides and their Characterization using a QTrap LC-MS/MS. *Mycotoxin research* (in press)

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C. and Adam, G., 2003: Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry* 278(48), 47905-47914

Autoren: Mag. Franz BERTHILLER, Univ. Ass. Dr. Rainer SCHUHMACHER und Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln;
Univ. Ass. Dr. Gerhard ADAM, Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie, Department für Angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien

Optimierung und Verifizierung von GC-Trennungen in der Trichothecenanalytik

W. Brodacz

AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH

Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“

Zielvorgaben

Bei der Entwicklung einer abgesicherten GC/ECD-Methode für Trichothecen-Mykotoxine sind folgende Anforderungen maßgeblich. An erster Stelle steht die optimale Auftrennung aller Zielanalyten, sowohl bei den silylierten B-Trichothecenen [Desoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), Fusareneon X (Fus X), 3-Acetyldesoxynivalenol (3-AcDON) und 15-Acetyldesoxynivalenol (15-AcDON)], als auch bei den halogenierten A-Trichothecenen [T-2 Toxin, HT-2 Toxin, 15-Monoacetoxyscirpenol (MAS) und Diacetoxyscirpenol (DAS)]. Die Forderung einer Absicherung auf einer zweiten Säule möglichst unterschiedlicher Polarität ist die andere wichtige Zielvorgabe. Darüber hinaus ist die Einbindung einer Referenzsubstanz vorzusehen, die zur Feinjustierung der Peak-Erkennungsfenster erlaubt und eine Kontrolle des ECD-Response bei jedem GC-Lauf gewährleistet. Mit der Verwendung des hoch chlorierten Insektizides Mirex ist diese Qualitätssicherungsmaßnahme bereits seit geraumer Zeit in die Praxis umgesetzt.

Computersimulation

Zur Entwicklung der GC-Methoden wurde die computergestützte Trennungsoptimierung auf Basis der so genannten „thermodynamischen Retentionsindizes“ („TRI“) eingesetzt. Sie beschreiben das chromatographische Verhalten jedes Analyten auf einer bestimmten stationären Phase und sind unabhängig von der Säulengeometrie und den pneumatischen Parametern¹. Für ihre Berechnung sind zwei Kalibrierexperimente mit linearen Temperaturprogrammen notwendig, deren Steigungen sich um den Faktor 2 – 4 unterscheiden. Die daraus resultierenden Retentionszeiten und Halbwertsbreiten fließen ebenso in den Berechnungsalgorithmus ein, wie die Säulenparameter (Länge, Innendurchmesser und Filmdicke) und alle pneumatischen Einflussgrößen (Trärgas, Vordruck etc.). Diese werden zusätzlich noch durch präzise Totzeitmessungen kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Mittels spezieller mathematischer Modelle werden die thermodynamischen Retentionsindizes und die sog. „Coating Efficiency“ (Maßzahl für die Qualität der Phasenbelegung) iterativ berechnet².

Mit Hilfe dieser Kennzahlen, einer bestimmten Säulendimension und der Pneumatik-Vorgaben können für jedes beliebige Temperaturprogramm auf Knopfdruck Retentionszeiten und Halbwertsbreiten jedes gewünschten Analyten simuliert werden. Die daraus berechneten Auflösungsinformationen bzw. die optische Beurteilung der simulierten Chromatogramme

¹ W. Brodacz, „Computersimulation in der Gaschromatographie - Praktische Erfahrungen mit GC-Simulationsprogrammen“; LABO, Leitartikel, S4-13, Heft 8, Juli/August 1995

² W. Brodacz, „Trennungsoptimierung in der Kapillar-GC 1. Teil: Temperaturprogramm und GC-Simulation“; LaborPraxis, S48-52, Februar 1996

ermöglichen eine rasche Erfolgskontrolle der jeweiligen (mehrstufigen) Temperaturprofile. Durch wiederholte Variation der Temperaturprogramme, welche automatisch generiert werden können (mehrere Millionen Varianten pro Tag), wird der optimale Temperaturverlauf für eine maximale Auflösung bei kürzester Analysenzeit ermittelt ³. Darüber hinaus ist es auch möglich, Länge, Innendurchmesser und Filmdicke der Säulen zu verändern bzw. diverse Gasfluss-Änderungen vorzunehmen und damit wiederum mit Millionen von Temperaturprogrammen zu kombinieren. Am Ende einer kompletten Trennungsoptimierung steht für eine bestimmte stationäre Phase die ideale Geometrie der Kapillare und das jeweils optimale Temperaturprogramm sowohl für die A- als auch für die B-Trichothecene fest ⁴.

Nach Optimierung aller Trennparameter mit dem gängigsten unpolaren Phasentyp Methyl-Polysiloxan (MPS) mit 5% Phenylanteil folgt die Auswahl polarerer Typen zu Absicherungszwecken. Grundsätzlich kommen MPS-Phasen, die mit Phenyl-Gruppen bzw. mit Cyanopropyl-Gruppen modifiziert sind, für die Trichothecen-Analytik in Frage. Neben der Erhöhung des Phenylanteils auf 35% stehen noch die Phasentypen 1301 und 1701 zur Verfügung, die Anteile von 6 bzw. 14% an Cyanopropyl/Phenyl-Substituenten enthalten.

Mit diesen polareren Phasen werden - in Analogie zur unpolaren Variante - für alle Zielanalyten die jeweiligen TRIs berechnet und nach Trichothecen-Typ (A bzw. B) getrennt jeweils umfangreiche Trennungsoptimierungen (mehrere Millionen Varianten) durchgeführt. Letztlich stehen sowohl für die A- als auch für die B-Trichothecene die jeweils optimierten Trennbedingungen (Temperaturprogramm, Pneumatikparameter und Säulendimensionen) auf allen 4 Phasentypen zur Verfügung.

Aus diesen Daten erfolgt abschließend die Auswahl der zwei am besten geeigneten und sich komplementär ergänzenden Trennphasen. Die Hauptkriterien für die Auswahl als Absicherungskombination sind vollständige Auftrennung aller Zielanalyten und möglichst unterschiedliche Elutionsmuster der beiden Phasen, denn je unterschiedlicher das Elutionsverhalten, desto größer ist die Identifizierungssicherheit. Schließlich nimmt die Wahrscheinlichkeit, dass es auf beiden Säulen zu einer Koelution eines Zielanalyten mit derselben Verunreinigung kommt, deutlich ab, je stärker sich die chromatographischen Eigenschaften der zwei Phasen unterscheiden ⁵.

Optimierte Trennungen

Hinsichtlich Auftrennung und Verifizierung wurden die besten Ergebnisse bei der Kombination von Phasentyp 5 und 35 (Methyl-Polysiloxan-Säulen mit 5 % bzw. 35 % Phenylanteil) erzielt.

³ W. Brodacz, „Trennungsoptimierung in der Kapillar-GC 2. Teil: GC-Simulation und Optimierungsstrategien in der Praxis“, LaborPraxis, S46-54, März 1996.

⁴ W. Brodacz, „Effiziente GC-Methodenentwicklung mit Computersimulation und TRI-Bibliotheken“, LABO, S32 - 37, Februar 2000

⁵ W. Brodacz, „Verifizierungsstrategien in der GC-Rückstandsanalytik“, LaborPraxis LP3, S 36 - 39; März 2003

Die optimierten Auftrennungen der 5 B-Trichothecene in Form ihrer TMS-Derivate auf beiden Phasen sind in Abb. 1 gegenübergestellt (trotz vollständiger Auftrennung konnte mit der polaren Phase die Analysenzeit fast halbiert werden). Während jeweils DON am Anfang und die Referenzsubstanz Mirex am Ende eluieren, sind die relativen Positionen der übrigen 4 B-Trichothecene völlig unterschiedlich (Nivalenol z.B. eluiert auf der polaren Säule an 2.Stelle und auf der unpolaren als vorletzter Peak). Ebenso große (angestrebte) Unterschiede gibt es bei der vergleichenden Auftrennung der 4 A-Trichothecene als HFB-Derivate in Abb. 2. Dabei ist auch sichergestellt, dass die Bestimmung der A-Trichothecene nicht durch die Anwesenheit von B-Trichothecene gestört wird, obwohl diese auch mit HFBI derivatisiert werden.

Mit der Computersimulation ist es auch möglich die Trennbedingungen so zu optimieren, dass sowohl die 4 A-Trichothecene als auch die 5 B-Trichothecene (gemeinsam silyliert) in einem GC-Lauf aufgelöst werden (Abb. 3). Aufgrund des um rund eine Zehnerpotenz geringeren ECD-Response der A-Typen ist eine gemeinsame Bestimmung aller Trichothecene als TMS-Derivate allerdings nur für Screening-Zwecke einsetzbar.

Zwei parallele Gaschromatographen

Obwohl es technisch möglich ist, beide Säulen an einem Injektor angeschlossen in einem GC mit zwei ECDs zu betreiben, muss doch die Variante mit zwei unabhängigen GCs aus folgenden Gründen dringend empfohlen werden (Abb. 4).

Nur so kann kompromisslos das jeweils optimale Temperaturprogramm eingesetzt und voneinander unabhängige Säulendimensionen verwendet werden. Es sind zwei unabhängige Injektionen gewährleistet, wodurch eventuell auftretende Probleme bei der Probenaufgabe sofort erkannt werden können. Beim Vergleich der beiden Kalibrierungen würde auch eine eventuell auftretende so genannte Matrixerhöhung rasch entdeckt werden.

Fazit

Im Vergleich zur HPLC erlaubt die hohe Trennleistung von GC-Kapillaren in Kombination mit sehr empfindlichen Detektoren (ECD, MSD) die simultane und nachweisstarke Bestimmung vieler Trichothecene in einem Chromatographieschritt. Durch die Verwendung der Referenzsubstanz Mirex wird mittels Retentionszeit-Feinanpassung die Peakerkennung wesentlich verbessert und das gesamte chromatographische System inklusive Detektor bei jedem Lauf auf Reproduzierbarkeit überprüft. Darüber hinaus gewährleistet insbesondere der parallele Einsatz von zwei Kapillaren unterschiedlicher Säulenpolarität und computergestützt optimierter Trennparameter höchste Identifizierungssicherheit. Stehen zwei eigene GCs für diese Absicherung zur Verfügung, wird darüber hinaus auch eine wesentlich verbesserte Quantifizierung erzielt, während für Screening-Aufgaben doppelte Kapazität bzw. mehr Flexibilität bei Ausfall eines GCs als Vorteile zu erwähnen sind. Zur Verifizierung bei besonders wichtigen Proben bzw. bei Richtwertüberschreitungen wird auch die GC/MS eingesetzt.

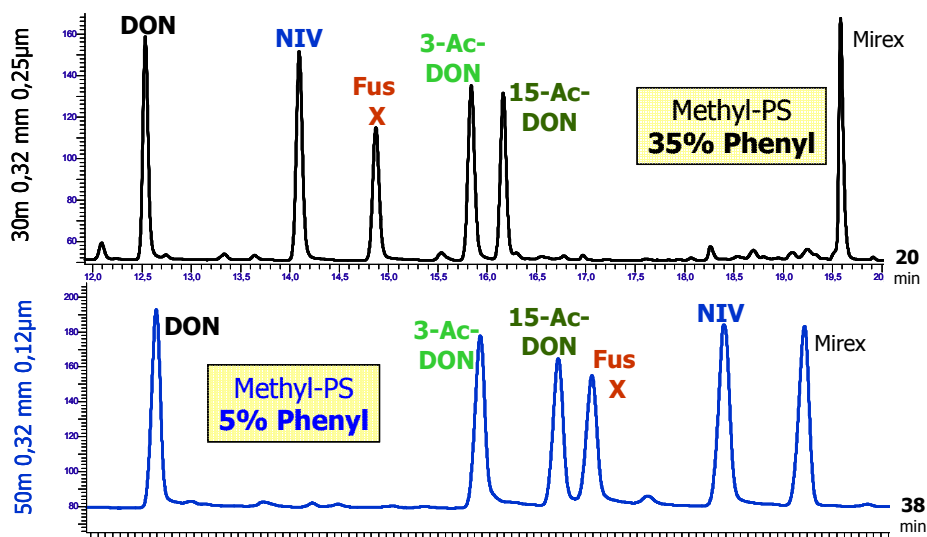


Abb. 1: Absicherung von 5 B-Trichothecenen (TMS) durch optimierte Auftrennungen mit 2 Phasen

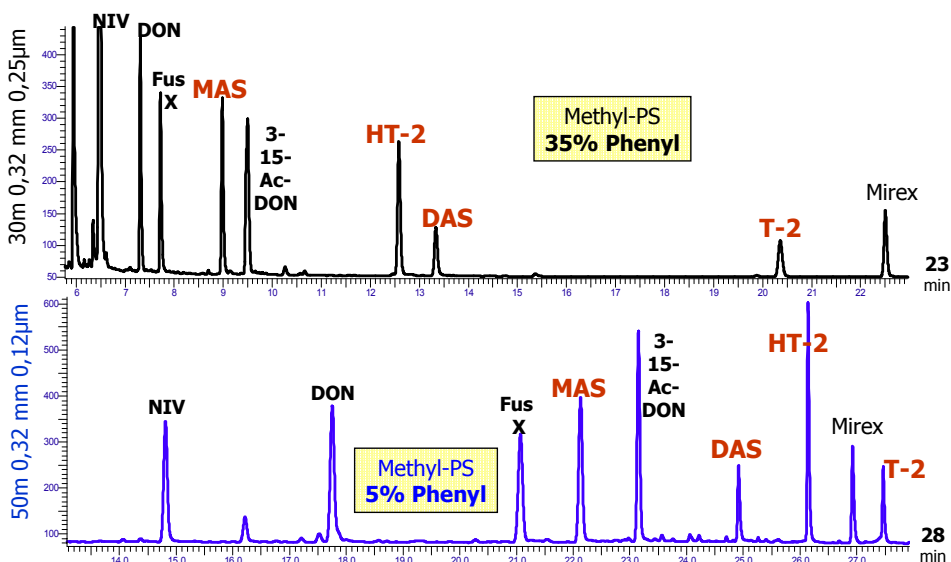


Abb. 2: Absicherung von 4 A-Trichothecenen (HFBI) durch optimierte Auftrennungen mit 2 Phasen (Interferenzen mit den 5 B- Trichothecenen als HFB-Derivate sind dabei ausgeschlossen)

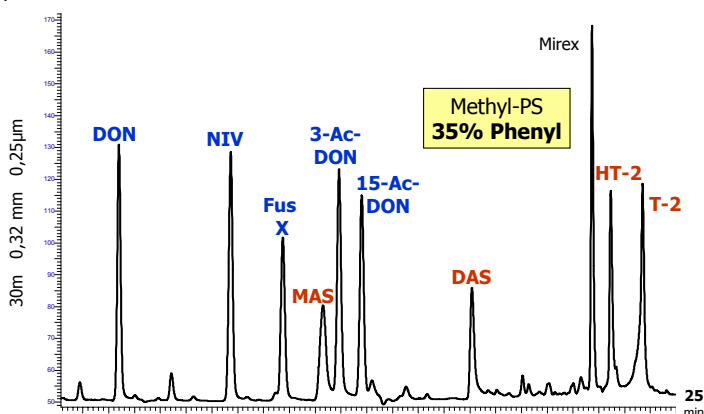


Abb. 3: Optimierte Auftrennung von 4 A- und 5 B-Trichothecenen (als TMS-Derivate)

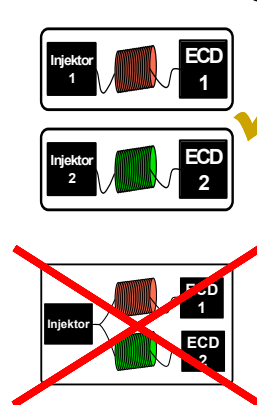


Abb. 4:
Bevorzugte
GC-Konfiguration
zur Absicherung
mittels zweier
Kapillarsäulen
unterschiedlicher
Polarität

Autor: Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wieneringstraße 8, A-4020 Linz

Vergleich von Trichothecen-Kalibrierstandards

W. Brodacz, A. Della Rosa

AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH

Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“

Einleitung

Kalibrierstandards sind das Fundament jeder quantitativen Analytik. Ihre Herstellung verdient besonderen Aufwand, damit die Identität der Analyten zweifelsfrei feststeht und eine exakte Gehaltsbestimmung gewährleistet ist. Insbesondere bei sehr toxischen und teuren Reinsubstanzen, wie z. B. den Mykotoxinen, ist deren Beschaffung schwierig und die Manipulationen damit gefährlich. Die Fa. Sigma bietet derzeit alle relevanten Trichothecene als Festsubstanzen an. Finanziell vertretbar stehen meist jedoch nur Mengen von ca. 1 – 5 mg zur Verfügung. Diese sind oft auf der Glasoberfläche des Kaufgebundes gleichmäßig verteilt und nur ein Teil davon kann effektiv eingewogen werden. Eine exakte Einwaage von 1 - 5mg der toxischen Reinsubstanzen ohne Mikrowaage und Glovebox ist auch bezüglich Sicherheit und Genauigkeit sehr problematisch. Noch können nicht alle Trichothecene als gebrauchsfertige Kalibrierlösungen erstanden werden. Zweckmäßig sind daher exakt vorgewogene Festsubstanzen bzw. zur Trockene eingedampfte Lösungen definierter Masse, die lediglich in einem bestimmten Lösungsmittelvolumen aufgenommen werden (Fa. Romer Labs). Es handelt sich dabei um so genannte „dried down-Lösungen“. Das heißt, eine definierte Menge Analyt wird als Lösung in das Gebinde eingebracht und das Lösungsmittel vollständig evaporiert. Zur Rekonstitution der Kalibrierungslösung wird der Rückstand, entsprechend einer beigelegten Prozedur, in einem definierten Volumen gelöst.

Mit der Fa. Biopure steht jetzt eine Quelle mit großer Auswahl an Mykotoxinen zur Verfügung, die ihre Produkte (mit Zertifikaten und Prüfprotokollen) als Festsubstanz, sowie auch als genau spezifizierte Lösungen anbieten kann (Supelco bietet nur DON in einer 1ml-Ampulle an). Bei Bezug der kristallinen Reinsubstanzen kann eine dokumentierte Einwaage mittels Mikrowaage vereinbart werden, diese exakte Menge braucht nur noch quantitativ aus dem Gefäß herausgelöst und verdünnt werden.

Vergleich

Im Zuge der Neuorganisation der Trichothecenanalytik im Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“ der AGES wurde besonderer Wert auf möglichst zuverlässige Kalibrierstandards gelegt. Zur Absicherung der quantitativen Zusammensetzung war es daher notwendig Standards unterschiedlicher Provenienz gegeneinander zu vermessen. Lösungen mit guter Übereinstimmung sollten dann als Mischung die abgesicherten neuen Kalibrierstandards darstellen.

Daher wurden für die A-Trichothecene T-2 Toxin, HT-2 Toxin, 15-Monoacetoxyscirpenol (MAS) und Diacetoxyscirpenol (DAS), sowie für die B-Trichothecene Desoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), Fusarenon X (Fus X), 3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) und 15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) Reinsubstanzen bzw. Fertiglösungen aus allen bekannten kommerziellen Quellen angekauft (Tab. 1). Nach Herstellung der Stammlösungen bzw. Verdünnung der Kauflösungen wurden alle Produkte auf einem Konzentrationsniveau von ca. 10 µg/ml silyliert und die TMS-Derivate mittels GC/MS im Scan-Modus auf Identität (Abb. 1) und Verunreinigungen (Abb. 2) im Gaschromatogramm überprüft. Provenienz und Herstellungsprozedur der verglichenen Standards sind in Tab. 2 dargestellt. (Zur Verbreitung der Datenbasis wurden die als „alt“ bezeichneten Probanden mit einbezogen. Dabei handelt es sich zum Teil um bis zu vier Jahre alte Standardlösungen unterschiedlicher Provenienz.

Für den quantitativen Vergleich wurden die A-Trichothecene mit HFBI derivatisiert, während der B-Typ einer Silylierung unterzogen wurde, sodass alle Lösungen mittels GC/ECD vermessen werden konnten (Konzentrationsniveau: 20ng/ml). Um die nicht unerheblichen Schwankungen durch die Derivatisierungen so gut als möglich auszugleichen, wurden alle Lösungen von zwei Personen an unterschiedlichen Tagen in 4 unabhängigen Sequenzen derivatisiert. Die Messlösungen jeder Sequenz wurden sofort auf zwei GCs mit unterschiedlichen Kapillarsäulen analysiert und die Mittelwerte zwischen polarer und unpolarer Phase gebildet. (Der durchschnittliche Variationskoeffizient von jeweils 10 Derivatisierungen an unterschiedlichen Tagen und wechselnden Laboranten liegt bei den A- bzw. B-Trichothecenen bei ca. 5 %.) Für die vergleichende Darstellung in Abb. 3 wurden die Gehalte der Vergleichslösungen auf den jeweiligen Mittelwert (=100%) jeder Analytengruppe bezogen.

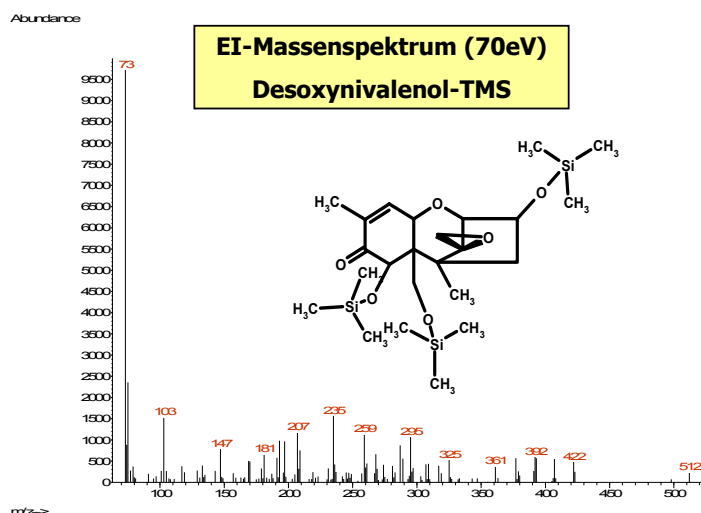
Mischstandards

Wie in der Pestizidanalytik wurde auch hier folgende Maxime verfolgt: Zwei (oder mehr) möglichst unabhängige Kalibrierstandards diene als gegenseitige Absicherung. Dazu werden von zwei Personen Reinsubstanzen aus unterschiedlichen Quellen eingewogen (bzw. Lösungen zugekauft) und die Kalibrierstandards daraus verdünnt. Abschließend werden die neuen Kalibrierungslösungen miteinander und auch mit den bisher gültigen Standardlösungen verglichen. Bei weitgehender Übereinstimmung aller Lösungen erfolgt die Vereinigung der neu bereiteten Standards. Die Mischung stellt nun die gültige Kalibrierlösung dar. Nach präziser Verdünnung der einzelnen Levels (mit Vollpipetten) werden zur abschließenden Dokumentation noch einmal die neuen Mischstandards mit den alten verglichen.

Im Falle der hier verglichenen Trichothecene wurden abschließend - nach A- und B-Trichothecenen getrennt - jene Einzelstandards vereinigt, welche nicht mehr als 10% differieren. Diese Mischungen stellen letztlich den Durchschnitt der am besten geeigneten Lösungen dar und gelten dann als die aktuellen abgesicherten Kalibrierstandards.

Quelle:	Romer Labs <i>dried down</i>			Biopure <i>mit Zertifikat</i>			Supelco <i>mit Zertifikat</i>			Biopure <i>exakte Ew.</i>	Sigma <i>ca. Ew.</i>
Substanz	Konz. mg/ml	Lösungs= mittel	Vol. ml	Konz. mg/ml	Lösungs= mittel	Vol. ml	Konz. mg/ml	Lösungs= mittel	Vol. ml	kristallin	kristallin
HT-2	100	CH ₂ Cl ₂	10								5 mg
T-2	100	CH ₂ Cl ₂	10								25 mg
DAS	100	CH ₂ Cl ₂	10								100 mg
MAS											5 mg
NIV	100	Methanol	10	100	Acetonitril	5				5 mg	5 mg
DON	100	Methanol	10	100	Acetonitril	5	200	Ethylacetat/ Methanol 95 / 5	1	5 mg	5 mg
Fus X	100	Methanol	10								5 mg
3-AcDON				100	Acetonitril	5				5 mg	5 mg
15-AcDON				100	Acetonitril	5				5 mg	5 mg

Bezeichnung	Bezugsquelle	Herstellung
Biopure-L	Fa. Biopure	kommerzielles Produkt - als Fertiglösung erhältlich (siehe Tab. 1)
Biopure-F	Fa. Biopure	kommerzielles Produkt - als exakt eingewogene Festsubstanz erhältlich
RomerLabs-F/L	Fa. Romer Labs	kom. Produkt - zur Trockene eingedampfte Festsubstanz zum Wiederauflösen
Sigma-F D	Fa. Sigma	ca. 5mg Festsubstanz ausgespült; Gewichts Differenz=Einwaage (auf 0,01 mg)
Fermentek-F µW	Fa. Fermentek	3-4mg Festsubstanz auf Mikrowaage (Fa. Biopure) exakt eingewogen
Sigma-F µW	Fa. Sigma	3-4mg Festsubstanz auf Mikrowaage (Fa. Biopure) exakt eingewogen
Supelco-L	Fa. Supelco	kom. Produkt - als 1ml-Fertiglösung 200µg/ml EthOH/MeOH erhältlich
alt	Fa. Sigma	Altlösungen verschiedener Provenienz (ab 1999; ca. 1mq EW auf 0,01 mg)



DON-TMS-Derivate
GC/MS scan

Abundance

Time-->

Biopure-F

RomerLabs-F/L

Supelco-L

Biopure-L

31

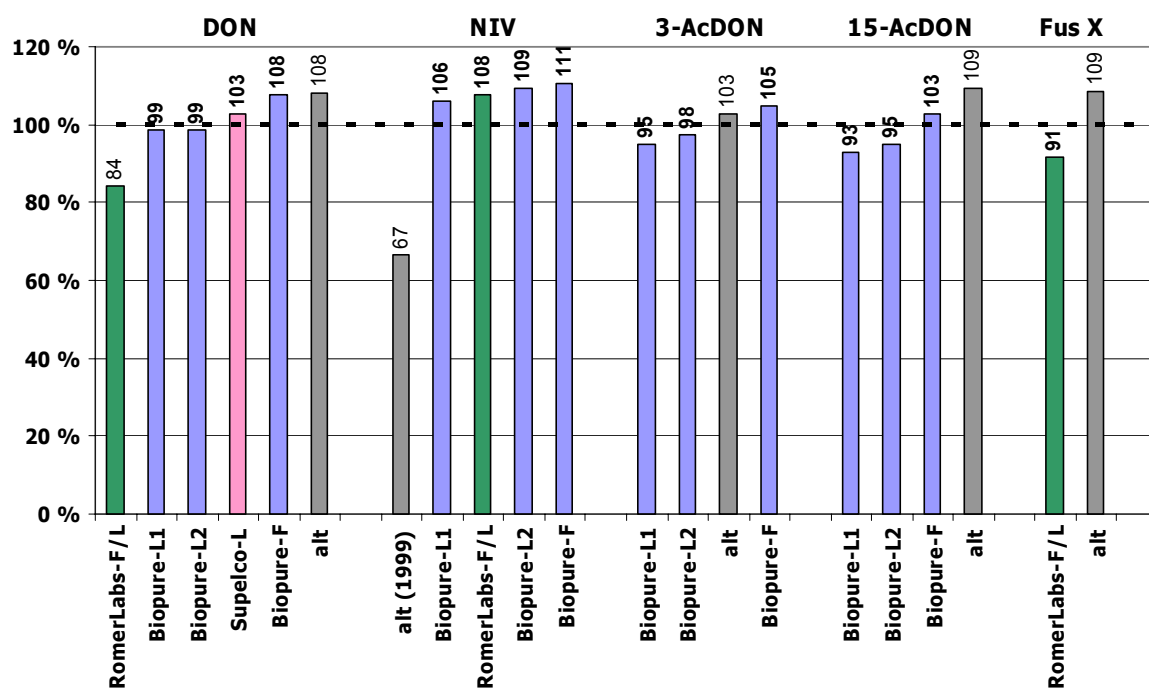
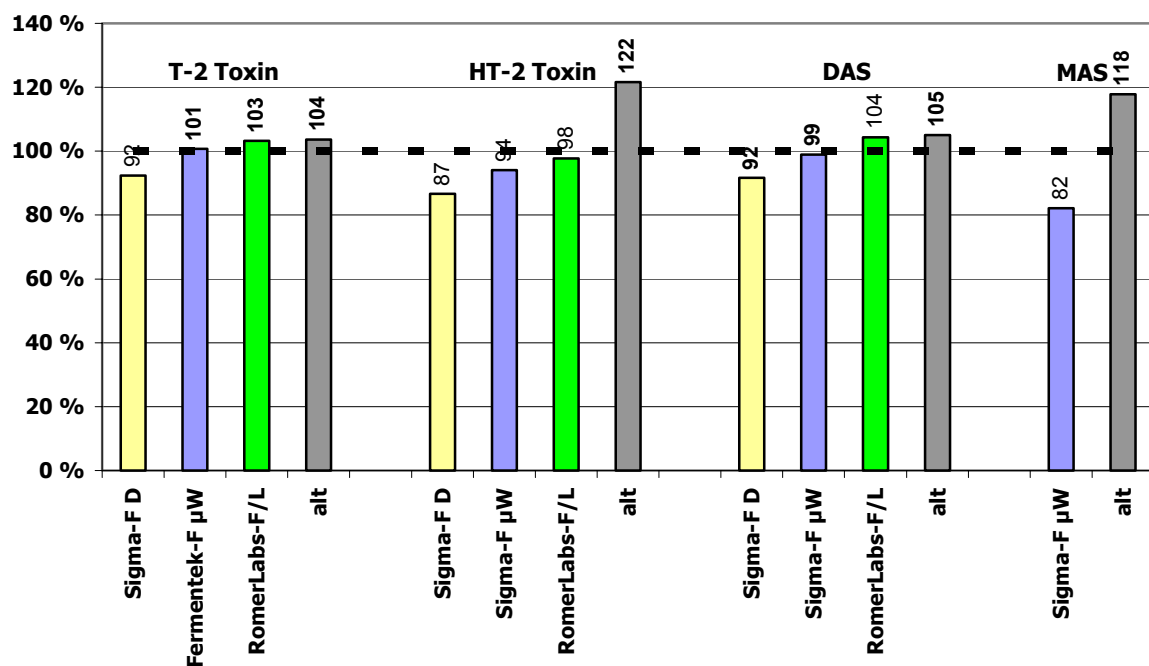


Abb. 3: Vergleich der Trichothecen-Standards (Typ A: oben; Typ B: unten) mit Normierung auf den jeweiligen Mittelwert

Autoren: Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ und Andreas DELLA ROSA, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieneringstraße 8, A-4020 Linz

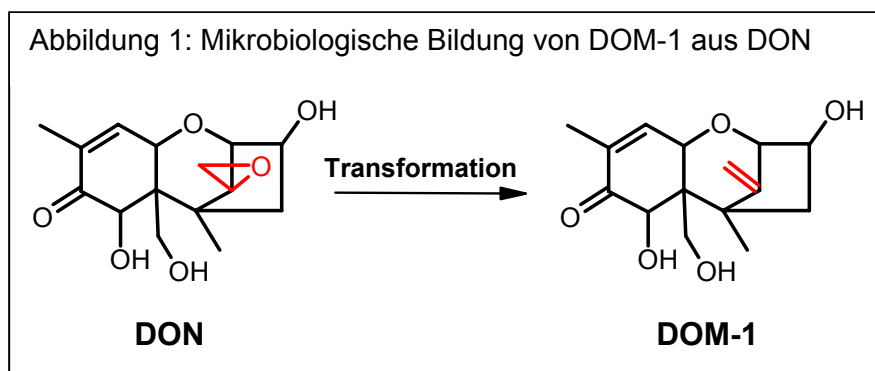
Deepoxy-desoxynivalenol (DOM-1) als interner Standard für die Typ B-Trichothecene

M. Freudenschuss, G. Häubl, G. Jaunecker

Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenzstrasse 20, 3430 Tulln, Österreich

Einleitung:

Deepoxy-desoxynivalenol (DOM-1) wird im tierischen Organismus im Magen-Darmtrakt durch Mikroorganismen aus dem Mykotoxin Desoxynivalenol (DON) gebildet (Abbildung 1) [1]. Dieser Metabolit wird einerseits als Referenzstandard benötigt, andererseits könnte dieses Molekül den Schlüssel für ein bisher ungelöstes Problem in der Mykotoxinanalytik darstellen.



DOM-1 ist aufgrund seiner fast identischen Molekülstruktur und Polarität ein vielversprechender Kandidat für den Verwendungszweck als interner Standard (IS) für die Typ B-Trichothecene (prominente Vertreter: DON, NIV, 3- und 15-ADON). Bis heute gibt es für diese wichtige Substanzgruppe noch keinen geeigneten IS.

Begriffsdefinition und prinzipielle Anforderungen an einen IS

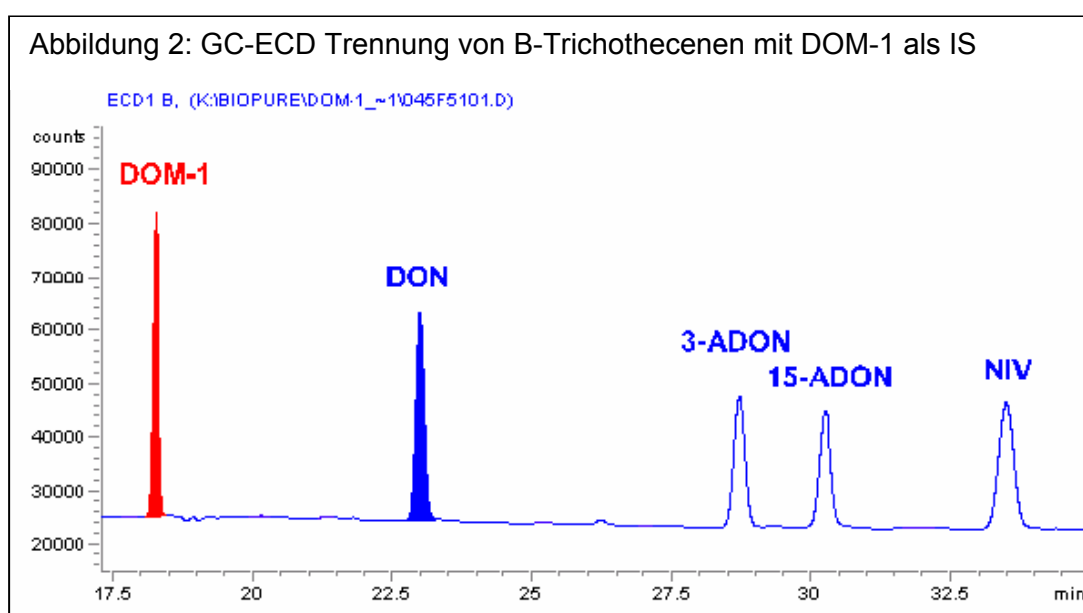
In der analytischen Chemie wird mit der Verwendung eines IS ein genau bekannter Bezugspunkt in einem Analyseverfahren geschaffen. Bei der internen Standardisierung durchläuft der IS gemeinsam mit der Analysesubstanz die gesamte Probenvorbereitung (Extraktion, Aufreinigung, Derivatisierung) und den anschließenden Analyseprozess (Injektion, chromatographische Trennung, Detektion) und soll dabei das Verhalten des Analyten nachahmen. Der Vorteil dieses Kalibrationskonzeptes beruht auf der Auswertung von relativen Werten, die innerhalb ein und derselben Analyse ermittelt werden. In der Praxis wird der IS als feste Bezugsgröße allen Standardlösungen und Analyseproben immer in der gleichen Konzentration zugegeben. Zur Auswertung gelangen dann die Flächenwerte (Höhenwerte) der Analysesubstanz bezogen auf die Fläche (Höhe) des IS in selben Analyselauf. Mit der Verwendung eines IS ist eine automatische Korrektur von Konzentrationsänderungen des Zielanalyten (ZA) im gesamten analytischen Prozess möglich, damit kann die Präzision einer chemischen Analyse entscheidend verbessert werden.

Die ausschlaggebenden Kriterien für den Einsatz einer Substanz als IS werden in der analytischen Fachliteratur wie folgt definiert [2-4]:

1. Kein natürliches Vorkommen in der Probe
2. Physikochemische Verwandtschaft (Molekülstruktur, Polarität) mit dem ZA
3. Identisches oder sehr ähnliches Verhalten während der gesamten Probenvorbereitung
4. Gute chromatographische Auflösung vom ZA und Störpeaks
5. Ähnliche Retentionszeit – Elution im Zeitfenster des ZA
6. Vergleichbarer Response-Faktor am Detektor
7. Stabil und unreaktiv in der Probe und der mobilen Phase
8. Geringe Toxizität
9. Kommerziell und in hoher Reinheit erhältlich

Diskussion der Eignung von DOM-1 als IS für Deoxynivalenol nach obigen Kriterien 1-9

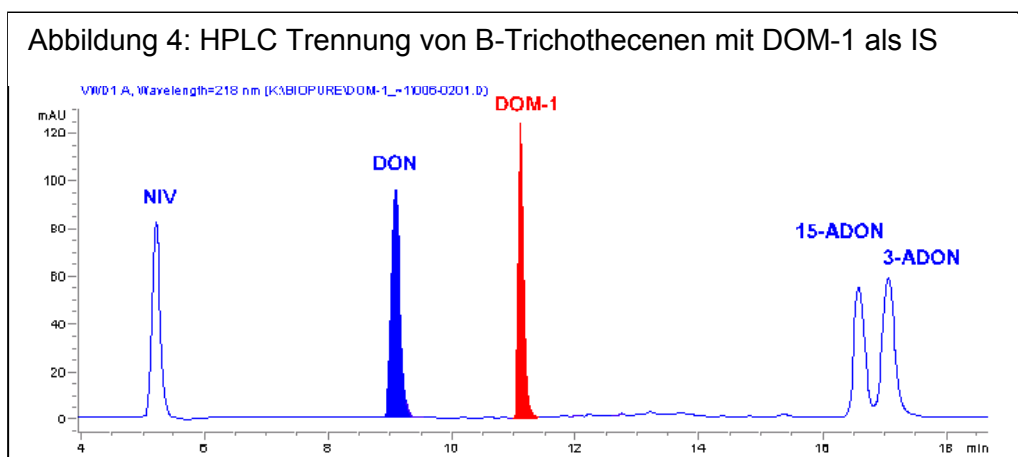
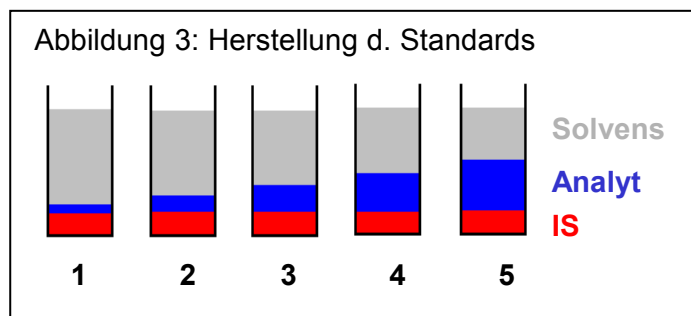
- ♦ Ad 1: Die Bildung von DOM-1 als Detoxifikationsreaktion von DON wurde bisher nur im tierischen Organismus beobachtet. In Proben pflanzlichen Ursprungs wurde diese Substanz noch nicht nachgewiesen.
- ♦ Ad 2: In der Molekülstruktur und der Stereochemie unterscheidet sich DOM-1 nur unwesentlich von DON; im Zuge der mikrobiologischen Transformation wird der Epoxidring am Kohlenstoffatom C12 im Ausgangsmolekül DON zu einer exozyklischen Kohlenstoff-Kohlenstoff Doppelbindung im DOM-1 reduziert. DOM-1 ist durch das Fehlen des Epoxid-Sauerstoffs etwas geringer polar als DON.
- ♦ Ad 3: DOM-1 sollte sich aufgrund der sehr ähnlichen Molekülstruktur und Polarität fast identisch wie DON während der gesamten Vorbereitung der Analyseprobe verhalten.



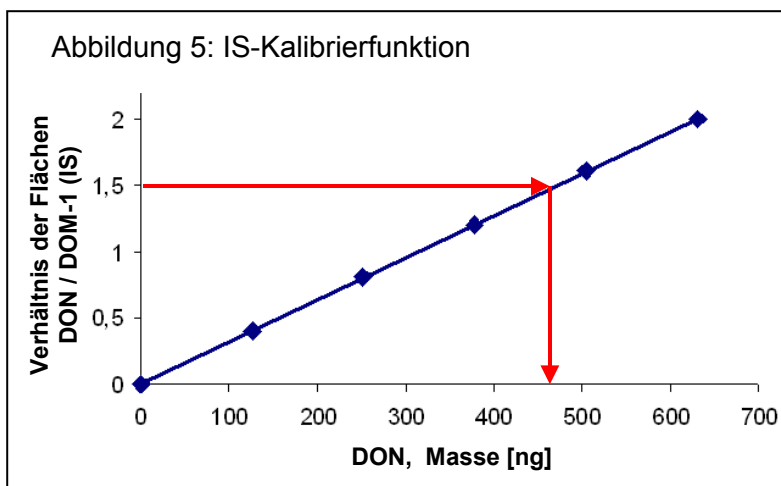
- ◆ Ad 4: DOM-1 kann chromatographisch auf GC- und HPLC-Säulen sauber von den Typ B-Trichothecen DON, NIV, 3- und 15-ADON abgetrennt werden (Abbildung 2 und 4)
- ◆ Ad 5: DOM-1 eluiert nach der chromatographischen Trennung innerhalb des Zeitfenster des Zielanalyten DON mit einem geringen Retentionszeitunterschied von 5 Minuten (GC-ECD, Abbildung 2) bzw. 2 Minuten (HPLC-UV, Abbildung 4).
- ◆ Ad 6: Die Response-Faktoren von DON und DOM-1 sind beim ECD, UV- oder MS-Detektor jeweils in derselben Größenordnung und damit vergleichbar.
- ◆ Ad 7: DOM-1 ist stabil im Lösungsmittel Acetonitril und in Mischungen aus Acetonitril mit Wasser, welche als Laufmittel in der HPLC-Analyse der B-Trichothecene eingesetzt werden.
- ◆ Ad 8: Die Toxizität von DOM-1 ist im Vergleich zu DON um den Faktor 50 reduziert [5].
- ◆ Ad 9: DOM-1 Referenzstandard in Acetonitril (5 mL) mit einer zertifizierten Konzentration von 25 µg/mL ist kommerziell erhältlich bei biopure Referenzsubstanzen GmbH (Tulln, Österreich), Bestellnummer 002033

Fallbeispiel einer realen IS Kalibrierung mit DON als Analysesubstanz und DOM-1 als IS:

Bei diesem Kalibrierverfahren werden Standardlösungen von DON in abgestuften Konzentrationen hergestellt, welche dabei aber alle die gleiche Menge an DOM-1 als IS enthalten. Eine mögliche Vorgangsweise bei der Herstellung solcher Kalibrierlösungen wird in der Abbildung 3 veranschaulicht. In alle 5 Messkolben werden zuerst gleiche Volumina an IS pipettiert, dann 5 unterschiedliche Konzentrationsniveaus in aufsteigender Reihenfolge an Analyt zugegeben und mit dem Solvens auf eine definierte Marke aufgefüllt. Die Abbildung 4 zeigt die chromatographische Trennung einer solchen Kalibriermischung mit DOM-1 als IS in einer Mischung aus B-Trichothecen; am Beispiel von DON und DOM-1 soll die Erstellung der zugehörigen Kalibrierfunktion erläutert werden.



Nach der Bestimmung der Peakflächen für die Analysesubstanz DON und dem IS DOM-1 aus den Chromatogrammen der 5 verschiedenen Kalibriermischungen wird für jede Konzentrationsstufe das Verhältnis der Peakflächen aus ZA bezogen auf den IS gebildet. Diese 5 Werte werden graphisch auf der Ordinate gegen die Konzentration des ZA auf der Abszisse aufgetragen (Abbildung 5). Mit diesem Kalibrierkonzept kann nun direkt die Konzentration von DON in Realproben bestimmt werden. Dazu wird der IS DOM-1 in einer fixen Konzentration zur Probe zugegeben und durchläuft parallel mit dem Analyten sämtliche Schritte der Probenvorbereitung bis zur gemeinsamen Detektion.



Zusammenfassung

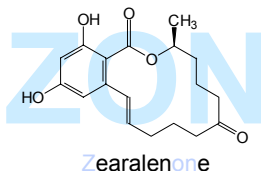
Durch die Verwendung eines IS als genau bekannter Bezugspunkt im gesamten Analyseverfahren können Konzentrationsänderungen des Analyten während der Probenvorbereitung durch Adsorption, Verdampfung, Pipettierfehler oder unvollständiger Derivatisierung automatisch korrigiert werden, da im Idealfall das Verhältnis der Konzentrationen von Analyt und IS unverändert und damit konstant bleiben sollte. Durch diese interne Standardisierung sind prozentuelle Standardabweichungen von unter 5 % erreichbar [2]. DOM-1 erfüllt aus heutiger Sicht theoretisch alle wichtigen Kriterien für den Einsatz als IS für die Analyse der Typ B-Trichothecene in Proben pflanzlicher Herkunft, die Praxistauglichkeit dieser Idee wird zur Zeit am Analytikzentrum des IFA-Tulln im Labor für Mykotoxin-Routineanalyse ausgetestet.

Literatur:

- [1] P. He, L.G. Young, C. Forsberg, Appl. Environ. Microbiology, **58**, 3857-3863, (1992), "Microbial Transformation of Deoxynivalenol (Vomitoxin)"
- [2] H.J. Hübschmann, Verlag VCH Weinheim, "Handbuch der GC/MS: Grundlagen und Anwendungen", (1996)
- [3] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Verlag John Wiley & sons, "Practical HPLC Method Development", (1997)
- [4] K.D. Altria, LC•GC Europe, 1-5, (2002) "Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards"
- [5] J. Binder, Nat. Toxins, **7**, 401-406, (1999), "A Yeast Bioassay for Trichothecenes"

Autoren: Dipl. Ing. Dr. Martin FREUDENSCHUSS, Georg HÄUBL und G. JAUNECKER, Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenzstrasse 20, A-3430 Tulln

Entwicklung und Anwendung eines IgY-ELISA zur Bestimmung von ZON in Weizen



Sabine Baumgartner, Elvira Welzig, R. Krska

Einleitung

Enzymimmunoassays (ELISA) finden als rasche, empfindliche und preisgünstige Nachweismethode wachsende Anwendung in der Mykotoxinanalytik. Die dafür erforderlichen polyklonalen Antikörper werden meist aus dem Serum immunisierter Säugetiere, z. B. Kaninchen oder Ziegen, gewonnen. Diese Technik ist oftmals mit schmerzhaften Entzündungen an den Einstichstellen verbunden sowie mit regelmäßigen Blutabnahmen zur Serumgewinnung. Neben dieser Methode und der zeit- und kostenintensiven Gewinnung monoklonaler Antikörper, kann die Isolierung von spezifischen Antikörpern aus dem Eidotter immunisierter Hühner als einfache und zugleich interessante Alternative angesehen werden. Bisher konnte sich diese, in der Humanmedizin durchaus akzeptierte und verbreitete Methode, in der Spurenanalytik nur wenig durchsetzen.

Die bisher am Analytikzentrum des IFA-Tulln erzielten Ergebnisse zeigen, dass in der Anwendung von Eidotter-Antikörpern durchaus einiges an Potential für die Entwicklung von Immunoassays für die Spurenanalytik steckt (Schneider et al., 2000; Welzig et al., 2000). Aufgrund der beachtlichen Menge an Antikörpern in einem einzelnen Eidotter stellt diese Methode auch eine wirtschaftlich interessante Alternative zu den in der Herstellung aufwändigeren und teuren monoklonalen Antikörpern dar. Dotterantikörper haben nicht nur in der medizinischen Forschung ihren berechtigten Stellenwert, sondern sind auch für einen praktischen Einsatz in der Mykotoxinanalytik geeignet. Die vergleichsweise hohe Antikörperausbeute der Hühnereier in Kombination mit der einfachen und tierfreundlichen Gewinnungsmethode, sollte zu einem verstärkten Interesse an Hühnern als Antikörperlieferanten führen.

Immunisierung und Antikörpergewinnung

Derco Brown Legehennen zwischen 30-40 Wochen alt wurden mit einem ZON-BSA-Konjugat immunisiert (Biozentrum der Universität Wien, Institut für Molekulare Genetik). Präimmuneier vor der ersten Immunisierung wurden gesammelt. Für die erste Immunisierung wurden 250 µL Immunogen mit 250µL komplettem Freundschem Adjuvans vermischt und in den Brustmuskel des Huhnes injiziert. Boosterinjektionen mit inkomplettem Freundschem Adjuvans wurde 2-mal im Abstand von 6 Wochen durchgeführt. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurde mit der Sammlung der Eier begonnen. Die Antikörpergewinnung erfolgt dann aus den Eidottern, wobei

eine modifizierte Reinigungsprozedur nach Polson angewendet wurde (Polson et al., 1980). Nach einer Trennung des Dotters vom Eiweiß wird der Dottersackinhalt gesammelt von fünf Eiern und eine 3.5%ige Polyethylenglykolfällung durchgeführt, um das Fett abzutrennen. Nach Zentrifugation kann der Überstand direkt verwendet werden bzw. bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Indirekt kompetitiver ELISA

Das indirekt kompetitive Format ist in diesem Fall das Format der Wahl für den ELISA. Folgende Konditionen treffen auf die unten abgebildete Standardkurve (Abb. 1) und die weiteren Kurven (Abb. 2) zu: Coating Antigen: ZON-ConA (1:1000); Blocking: 0.2% Fischgelatine; ZON Standard in Weizenmatrix 5% MeOH-PBS; Anti ZON-BSA IgY (1:1500); Kaninchen anti-IgY-HRP (1:5000); Inkubationszeiten: 45, 45, 30 min; LOD: $0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ entspricht $2.5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ ZON in Weizen; LOQ: 3 bis $99\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ entspricht 12 bis $495\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ ZON in Weizen; Guideline level: $60\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ Weizen.

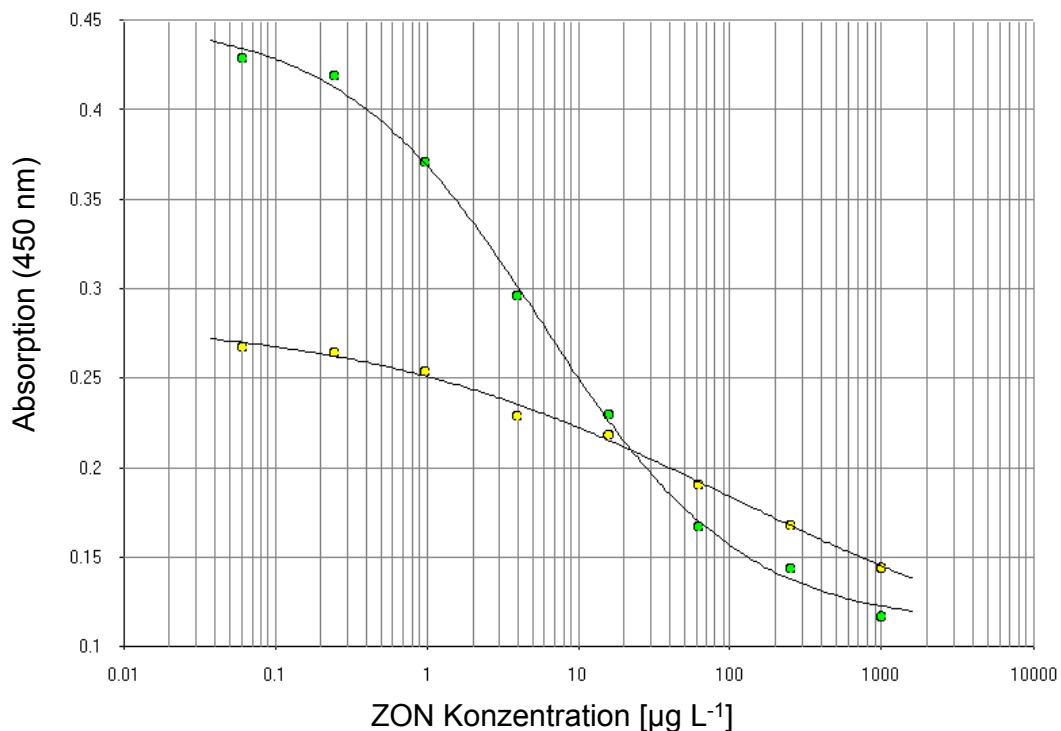


Abbildung 1: Typisches Beispiel einer Standard Kurve (1000, 250, 62.5, 15.6, 4, 1, 0.24, und $0.06\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, grüne Punkte) und einer Weizenprobe (gelbe Punkte) dotiert mit den entsprechenden Standardkonzentrationen ZON.

Aus dem Verlauf der beiden Kurven ist sehr gut zu erkennen, dass die IgY-Antikörper matrixabhängig reagieren. Dieses Verhalten der Antikörper im ELISA führt dazu, dass eine Matrixkalibrierung unausweichlich wird.

Blank Weizen (HPLC-geprüft) wurden mit ZON dotiert und die entsprechenden Standardkurven wurden aufgenommen (Abb. 2).

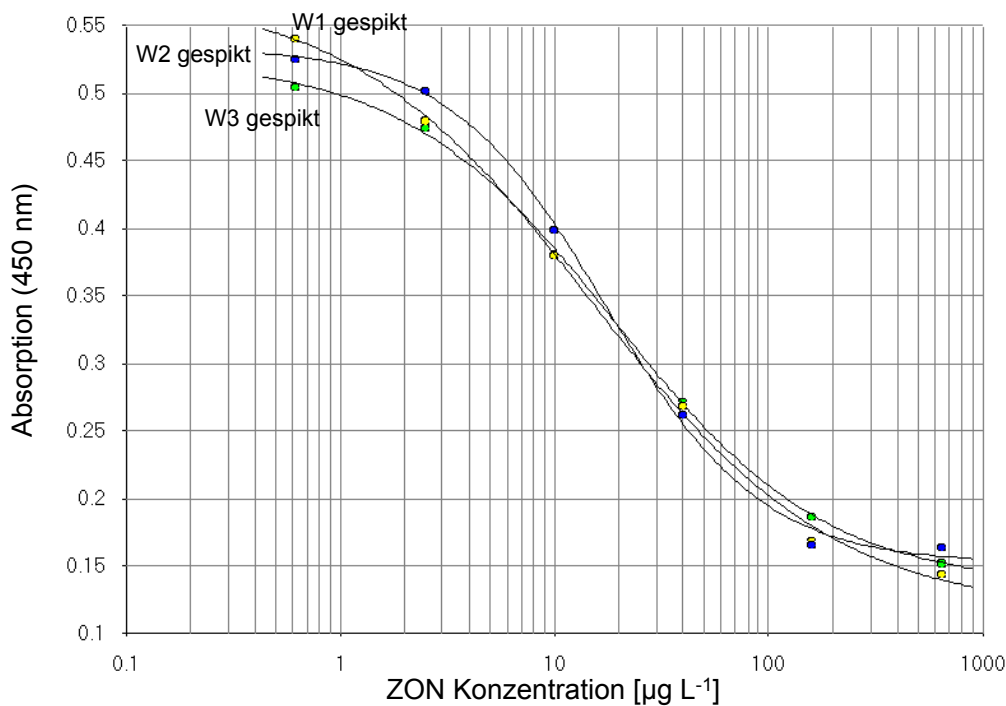


Abbildung 2: Drei verschiedene Blankweizen dotiert mit 650, 162, 40.5, 10, 2.5 und 0.6 $\mu\text{g ZON L}^{-1}$ im Vergleich.

Dieses Experiment zeigte deutlich, dass Weizenproben generell gleiche Effekte hervorrufen und dass die Standardkurven sehr gut vergleichbar sind. Eben diese Kongruenz der drei dotierten Weizenproben ist eine Bestätigung für die oben angeführte Vermutung, dass eine Matrixkalibrierung von Vorteil für den Test ist, um die extremen Matrixeinflüsse auszugleichen. Man muss aber bedenken, dass eine Matrixkalibrierung immer einen größeren Aufwand bedeutet als eine Kalibrierung, die in einem Puffer durchgeführt wird. Daher ist wohl kaum an eine Kommerzialisierung eines IgY-ELISAs in diesem Bereich zu denken. Obwohl trotz des erhöhten Zeitaufwandes die Anwendung dieses tierfreundlichen Immunassays als in-house Test immer noch denkbar ist.

Unter Einsatz der Matrixkalibrierung wurden auch Realproben vermessen. Diese Proben wurden zusätzlich mit HPLC analysiert und parallel im ELISA in dreifacher Wiederholung gemessen. In Abbildung 3 sind die Vergleiche der Proben aufgeführt. Fünf natürlich kontaminierte Weizenproben wurden extrahiert mit 70% Methanol und anschließend mit PBS Puffer auf 5% MeOH verdünnt. Es wurde eine mittlere Wiederfindung von $93 \pm 20\%$ mit der Matrixkalibrierung erreicht.

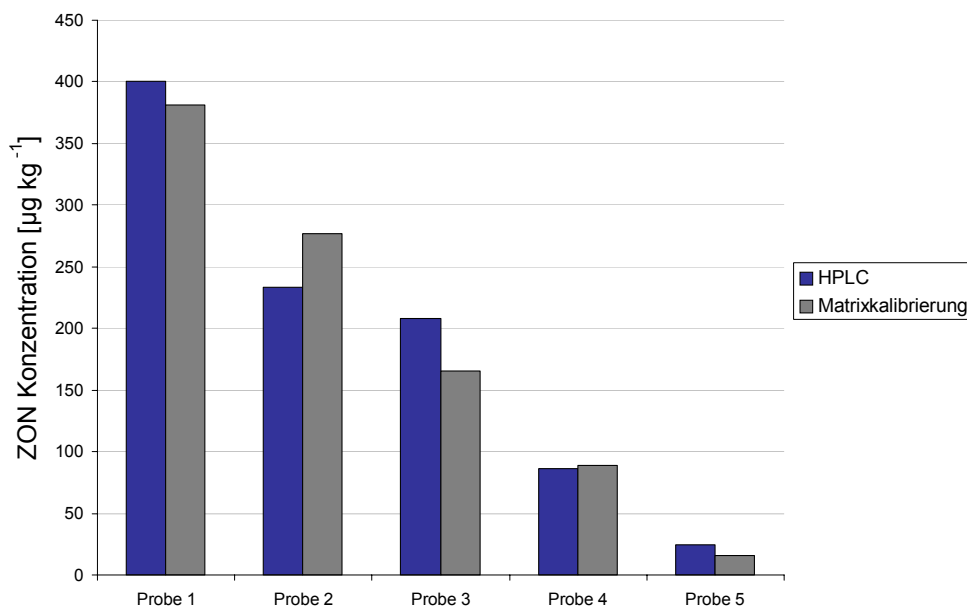


Abbildung 3: Realproben wurden mittels HPLC analysiert (RSD = 8%) und parallel mit dem ELISA vermessen (n = 3).

Danksagung

Fa. Biopure Referenzsubstanzen GmbH, IFA-Tulln, Österreich, für die Herstellung der ZON Konjugate.

Dr. Marcela Herman, Inst. f. Med. Biochemie, Abteilung f. Molekulare Genetik, Universität Wien, Österreich, für die Betreuung und Immunisierungen der Hühner.

Literatur

Polson, A.; von Wechmar, M. B.; van Regenmortel, M. H. V. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens: Immunol. Comm. 1980, 9, 475-493.

Schneider Liane, Pichler Harald, and Krska Rudolf. An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies. Fresenius J.Anal.Chem. 367:98-100, 2000.

Welzig Elvira, Pichler Harald, Krska Rudolf, Knopp Dietmar, and Niessner Reinhard. Development of an Enzyme Immunoassay for the Determination of the Herbicide Metsulfuron-Methyl based on Chicken Egg Yolk Antibodies. Intern.J.Enviroanal.Chem. 78 (3-4):279-288, 2000.

Autoren: Univ. Ass. Dr. Sabine BAUMGARTNER, Dr. Elvira WELZIG und Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRKA, Analytikzentrum, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Straße 20, A-3430 Tulln

Aktuelle Regulierungen für Mykotoxine in Futtermitteln im internationalen Vergleich

H. Würzner

Die Richtlinie der Europäischen Kommission über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung 1999/29/EG wurde im Jahr 2002 durch die RL 2002/32/EG ersetzt. Diese wurde durch die RL 2003/100/EG vom 31.10.2003 geändert, welche mit November 2003 in Kraft tritt.

In der geänderten RL 2003/100/EG wurden auch die Aflatoxin-Grenzwerte geändert. So wird bei den Alleinfuttermitteln nicht mehr nach Ausgangsprodukten (alle 0,05mg/kg außer Erdnüsse, Kokoskerne, Palmkerne, Baumwollsaat, Maiskörner usw. 0,02mg/kg) unterschieden, sondern es gibt nur mehr einen einzigen, für alle Ausgangserzeugnisse gültigen Grenzwert von 0,02mg/kg. Auch für Ergänzungsfuttermittel wurden die Grenzwerte auf 0,02mg/kg geändert.

Für andere Mykotoxine gibt es weiterhin keine Grenzwerte. Im koordinierten Kontrollprogramm für Tierernährung 2004 wird jedoch gefordert, die Schwerpunkte der Kontrollen neben anderen kritischen Parametern auch auf Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenon, Deoxynivalenol und die Fumonisine B₁, B₂ und B₃ als Gruppe zusammengefasst zu legen. Kontrollen sollen sowohl in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen als auch in Mischfuttermitteln durchgeführt werden und die verwendete Analysenmethode und ihre Nachweisgrenzen sind anzugeben.

Für DON, ZON, OTA und Fumonisine gibt es weiterhin nur Richtwerte in einzelnen EU-Ländern:

Tierkategorie	DON						Zearalenon					
	Ö	D	N	NL	CH	USA	Ö	D	N	CH	NL	
				AW	GW						AW	GW
Schweine				0,80	1,00	1,00	5,00					
Ferkel und junge Zuchtschweine											0,08	0,10
Junge, weibliche Zuchtschweine	0,50	1,00	0,50				0,05	0,05		0,05	0,08	0,10
Mastschweine und Zuchtsauen	0,50	1,00	0,50				0,15	0,25	0,10	0,25	0,20	0,25
Rinder				4,00	5,00	10,00						
Kälber und Jungrinder	--	2,00		1,60	2,00		0,25				0,40	0,50
Kalbin und Milchvieh	--	5,00	1,50	2,40	3,00		0,50				0,40	0,50
Mastrinder	1,00	5,00	1,50				*					
Geflügel		5,00		3,20	4,00	5,00						
Legehennen, Puten	1,00		0,50				*					
Masthühner	2,00		1,50				*					
Pferde			0,50			5,00						

	Ochratoxin A		Fumonisin
	NL		CH
Tierkategorie	AW	GW	
Schweine			
Junge, weibliche Zuchtschweine			1,00
Ferkel, Mastschweine und Zuchtsauen	0,04	0,05	
Geflügel	0,16	0,2	

Autor: Univ. Doz. Dr. Herbert WÜRZNER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Futtermittel, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Aktuelle und geplante gemeinschaftliche Regelungen bezüglich Mykotoxinen in Lebensmitteln

DI Dr. Roland Grossgut - AGES-Risikobewertung

Im Zuge der nachfolgenden Darstellung sollen die aktuellen und vorgesehenen gemeinschaftlichen gesetzlichen Regelungen von den verschiedensten Mykotoxinen, wie Aflatoxine, Patulin, Ochratoxin A, Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon, T2- und HT2-Toxin sowie Fumonisin B₁/B₂) zusammenfassend dargestellt werden. Da es sich um eine Bestandaufnahme zum Zeitpunkt des Mold-Meetings 2003 handelt, ist speziell bei den diskutierten Höchstgehalten und Lebensmitteln festzuhalten, dass im Jahr 2004 noch intensiv über die Höhe diese Werte und Art der zu regelnden Lebensmittel diskutiert werden wird. Die angeführten, bereits erlassenen Verordnungen, Richtlinien sowie Empfehlungen können im Internet über die Seite <http://www.europa.eu.int/eur-lex/de/index.html> heruntergeladen werden.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln bis Moldmeeting 7. - 8. November 2002

RICHTLINIE 98/53/EG DER KOMMISSION vom 16. Juli 1998 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten

In dieser Richtlinie werden im wesentlichen Probenahmeverfahren sowie Kriterien für Analysenmethoden bezüglich Aflatoxinen in Lebensmitteln geregelt.

VERORDNUNG (EG) Nr. 466/2001 DER KOMMISSION vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Erdnüssen, Schalenfrüchten, getrockneten Früchten, Getreide und Milch.

VERORDNUNG (EG) Nr. 257/2002 DER KOMMISSION vom 12. Februar 2002 zur Änderung der Verordnung (EG)Nr. 194/97 zur Festsetzung der zulässigen Höchstgehalte an Kontaminanten in Lebensmitteln sowie der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Erdnüssen, Schalenfrüchten, getrockneten Früchten und Getreide.

VERORDNUNG (EG) Nr. 472/2002 DER KOMMISSION vom 12. März 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Die Verordnung regelt Höchstgehalte von Aflatoxinen in Gewürzen sowie Ochratoxin A in Getreide, Getreideerzeugnissen sowie getrockneten Weintrauben.

RICHTLINIE 2002/26/EG DER KOMMISSION vom 13. März 2002 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Ochratoxin A-Gehalte in Lebensmitteln

RICHTLINIE 2002/27/EG DER KOMMISSION vom 13. März 2002 zur Änderung der Richtlinie 98/53/EG zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle bestimmter Lebensmittel auf Einhaltung der Höchstgehalte für Kontaminanten

Mit dieser Richtlinie werden die Probenahmenvorschriften wegen der Regelung von Aflatoxinen in Gewürzen angepasst.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln seit Moldmeeting 7. – 8. 11. 2002 – Patulin

VERORDNUNG (EG) Nr. 1425/2003 DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin

Mit dieser Regelung werden nun Höchstgehalte für das Mykotoxin Patulin geregelt.

Fruchtsäfte, insbesondere Apfelsaft, und Fruchtsaftzusätze in anderen Getränken einschließlich Fruchtnektar	50 µg/kg
Fruchtsaftkonzentrate nach Rekonstitution entsprechend den Herstellerangaben	50 µg/kg
Spirituosen, Apfelwein und andere aus Äpfeln gewonnene oder Apfelsaft enthaltende fermentierte Getränke	50 µg/kg
Feste, für den direkten Verzehr bestimmte Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott, Apfelpüree	25 µg/kg
Apfelsaft sowie feste Apfelerzeugnisse, einschließlich Apfelkompott und Apfelpüree, für Säuglinge und Kleinkinder, die mit diesem Verwendungszweck gekennzeichnet und verkauft werden; andere Beikost	10 µg/kg *

* Bis zum 1. November 2003 wird durch einen internationalen Ringversuch ein Analyseverfahren validiert, das zeigen soll, dass der Wert von 10 µg/kg Patulin zuverlässig bestimmt werden kann. Liegt bis zum 1. November 2003 kein Nachweis vor, dass ein Wert von 10 µg/kg Patulin zuverlässig bestimmt werden kann, gilt der Wert von 25 µg/kg.

Bezüglich dieser Anmerkung ist festzuhalten, dass ein vergleichender Test im Wesentlichen die Analysierbarkeit dieses Höchstgehaltes belegt hat.

RICHTLINIE 2003/78/EG DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Patulingehalts von Lebensmitteln

Diese Richtlinien legt Vorgaben für die Probenahme sowie Leistungskriterien für die analytische Untersuchung fest

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION vom 11. August 2003 zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination von Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken

Diese Empfehlung wurde auf Ersuchen der in der Arbeitsgruppe „Agrarkontaminanten“ vertretenen Mitgliedstaaten erarbeitet und enthält den „Verhaltenskodex zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination in Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken“ sowie das Ziel, letztlich einen Höchstgehalt von 25 µg Patulin/kg anzustreben.

Mykotoxinregelungen in Lebensmitteln in Vorbereitung ⁶

Aflatoxine, Ochratoxin A

COMMISSION REGULATION (EC) No .../.. of [...] amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children

Für Aflatoxin B₁ ist 0,05 µg/kg, für Aflatoxin M₁ 0,025 µg/kg sowie für Ochratoxin A 0,3 µg/kg vorgesehen.

Fusarientoxine

Anlässlich der SCOOP-Arbeitsgruppe 3.2.10 “Collection of Occurrence data of Fusarium-toxin in Food and Assessment of the Dietary Intake by the Population of EU Member States” wurden europaweit Daten gesammelt und in einem Bericht zusammengefasst, der auch im Internet veröffentlicht ist: http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html. Die Daten sind auch Basis für Höchstgehaltsüberlegungen der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON), T-2 und HT-2-Toxin, Zearalenon sowie Fumonisin B₁ und B₂

⁶ Da diese Zusammenfassung einige Zeit nach dem Mold-Meeting erstellt wurde, muss angeführt werden, dass Regelungen zu T2- und HT2-Toxin derzeit wegen mangelnder Datenlage nicht realisiert werden und für andere Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon, Fumonisin B₁, B₂) sowie Aflatoxin und Ochratoxin A die während des Treffens in Mold angegebenen Werte und Lebensmittel bereits abgeändert sind! Auskünfte über den aktuellen Stand der Diskussion können beim Autor eingeholt werden.

Deoxynivalenol (DON): Die täglich duldbare Aufnahmemenge für dieses Mykotoxin beträgt 1 µg/kg KG und Tag (SCF 2. Dezember 1999)

Rohgetreide außer Durum-Weizen und Mais	1000 µg/kg
Rohgetreide Durum-Weizen und Mais	1500 µg/kg
Getreide für den direkten menschlichen Verbrauch und als Lebensmittelzutat (ausg. s.u.)	500 µg/kg
Frühstücksgetreide und Snacks auf Getreidebasis	200 µg/kg
Nudeln (trocken)	750 µg/kg
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis und Zutaten zu solchen	100 µg/kg

T-2 und HT-2-Toxin: Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt für die Summe dieser beiden Substanzen 0,06 µg/kg KG und Tag (SCF 30. Mai 2001)

Rohgetreide außer Hafer	100 µg/kg
Rohgetreide Hafer	500 µg/kg
Getreideprodukte mit mehr als 20% Hafer	200 µg/kg
Getreideprodukte und Säuglings- bzw. Kleinkindernahrung auf Getreidebasis und Zutaten zu solchen	50 µg/kg

Zearalenon: Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt 0,2 µg/kg KG und Tag (SCF 22. Juni 2000)

Rohgetreide außer Mais	100 µg/kg
Rohgetreide Mais	200 µg/kg
Getreide für den direkten menschlichen Verbrauch und als Lebensmittelzutat (ausg. Mais)	50 µg/kg
Frühstücksgetreide und Snacks auf Maisbasis und glutenfreie Getreideprodukte	75 µg/kg
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis und Zutaten zu solchen	20 µg/kg

Fumonisin B₁, B₂: Die temporäre duldbare Aufnahmemenge beträgt 2 µg/kg KG und Tag (Substanz allein oder in Kombination (Fumonisin B₁, B₂, B₃); SCF 17. Oktober 2000 bzw. 4. April 2003)

Rohgetreide Mais	1500 µg/kg
Mais für den direkten menschlichen Verbrauch, als Lebensmittelzutat sowie Lebensmittel auf Maisbasis	500 µg/kg
Frühstücksgetreide und Snacks auf Maisbasis sowie glutenfreie Getreideprodukte	200 µg/kg
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis und Zutaten zu solchen	100 µg/kg

Autor: Dipl. Ing. Dr. Roland GROSSGUT, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Risikobewertung, Spargelfeldstraße 191, A-1226 Wien

Überblick über Mykotoxingehalte in Getreide, Mais und Futtermitteln – 2002 und 2003

Öhlinger R., Kiendler E., Brodacz W., Edinger W., AGES GmbH, CC Cluster Chemie Linz

Bei Betrachtung der österreichischen Mykotoxinsituation sind aus dem heutigen Kenntnisstand vor allem die Fusariantoxine ein „hausgemachtes“ Problem. Dieses beruht auf dem Befall von Getreide mit Feldpilzen der Gattung *Fusarium*. Den Befall fördernde Bedingungen sind z.B. feuchtwarmes Klima zur Zeit der Blüte und, aus agrotechnischer Sicht, eine minimale Bodenbearbeitung. Von den gebildeten Mykotoxinen (Fusariantoxine) sind im heimischen Getreidebau und in weiterer Folge für die Futter- und Nahrungsmittelproduktion folgende von aktueller Bedeutung:

Weizen: Deoxynivalenol (Vomitoxin), Zearalenon

Hafer: Deoxynivalenol (Vomitoxin), Nivalenol, Zearalenon, T-2 und HT-2 Toxin

Mais: Deoxynivalenol (Vomitoxin), Zearalenon, Fumonisine, (Moniliformin)

Die jeweilige Befallssituation, das Mykotoxinspektrum bzw. die jeweiligen Mykotoxinbelastungen in Getreide variieren z.T. sehr deutlich von Jahr zu Jahr und von Gebiet zu Gebiet. In Tab. 1 sind zum Vergleich die Mediane der Deoxynivalenol (DON)-Konzentrationen, dem mengenmäßig bedeutendsten Mykotoxin in der heimischen Landwirtschaft, angeführt.

	2002	2003	2002-2003	n
Weizen	0,14	1,25	0,73	186
Hafer	0,06	0,12	0,08	92
Maiskörner	0,68	0,17	0,53	268

Tab. 1: DON-Mediane in mg/kg

Obwohl im Jahr 2003 ein besonders trockenes und warmes Klima vorherrschte, war bei Weizen eine deutliche Mehrbelastung mit DON gegenüber dem regenreichen Jahr 2002 zu beobachten. Besonders günstige klimatische Bedingungen zur Blütezeit dürften der Hauptgrund für ein abundantes Fusarienauftreten gewesen sein. Relativierend muss dazu bemerkt werden, dass die meisten 2003-Proben aus Oberösterreich (hauptsächlich Futterweizen) stammten und somit diese Mittelwertschätzung nicht das gesamte Bundesgebiet beschreibt. Einige Beobachtungen aus Niederösterreich zeigten keine so dramatischen DON-Kontaminationen in Weizen, jedoch sind diese in ähnlicher Größenordnung in Südösterreich zu vermuten. In Hafer und besonders in Maiskörnern waren die DON-Gehalte unauffällig.

In vielen Fällen ist bei Weizen auch die DON-Vorstufe 15-Acetyldeoxynivalenol nachweisbar. Im Gegensatz dazu wird diese bei Hafer kaum gefunden. Hier wird dafür die Vorstufe 3-Acetyldeoxynivalenol gebildet.

Sowohl in Weizen als auch in Hafer wurde das Toxin Nivalenol nachgewiesen. Während in Weizen die Nivalenolgehalte jedoch meistens sehr gering waren (Median < 0,05 mg/kg) und nicht sehr häufig auftraten, war fast jede zweite Haferprobe mit Nivalenol kontaminiert (2002-Median = 0,1 mg/kg und 2003-Median = 0,18 mg/kg). In Hafer war zudem HT-2 Toxin in ca. 30 % der Analysen nachweisbar (2003-Median = 0,07 mg/kg).

Das Fusariumtoxin Zearalenon (ZON), welches unter natürlichen Bedingungen zeitlich meistens später als DON gebildet wird, konnte im Jahre 2003 kaum nachgewiesen werden. Die Mediane der Jahre 2002 und 2003 lagen unter 0,02 mg/kg (Bestimmungsgrenze).

Eine Besonderheit im Mykotoxinaufkommen bei Mais in Österreich der letzten Jahre war das Auftreten von *F. proliferatum* und damit verbunden die Kontamination mit Fumonisinen. Wahrscheinlich durch die allmähliche Klimaänderung - mildere und feuchtere Wintermonate und wärmere und heißere Sommer – verursacht, konnte *F. proliferatum* auch in Österreich zu größerer Verbreitung gelangen. Während für das Jahr 2002 der Median noch unter 0,1 mg/kg lag, erreichte dieser 2003 bereits 0,15 mg/kg.

In Futtermitteln ist z.Z. von den Mykotoxinen nur der Aflatoxin B1-Gehalt mit einem Höchstgehalt geregelt (Richtlinie 1999/29/EG). Deoxynivalenol und Zearalenon werden national tierspezifisch mit einem Richtwert behandelt (Tab. 2).

Kategorie	Deoxynivalenol (mg/kg Futter)	Zearalenon (mg/kg Futter)
Schweine		
Präpubertäre weibliche Zuchtschweine	0,5	0,05
Mastschweine und Zuchtsauen	0,5	0,15
Geflügel		
Zuchtgeflügel, Legehennen, Mastputen	1	-
Masthühner	2	-

Tab. 2: Österreichische Richtwerte für Futtermittel (ALVA-Arbeitskreis für „Mykotoxine im Futter“, 2003)

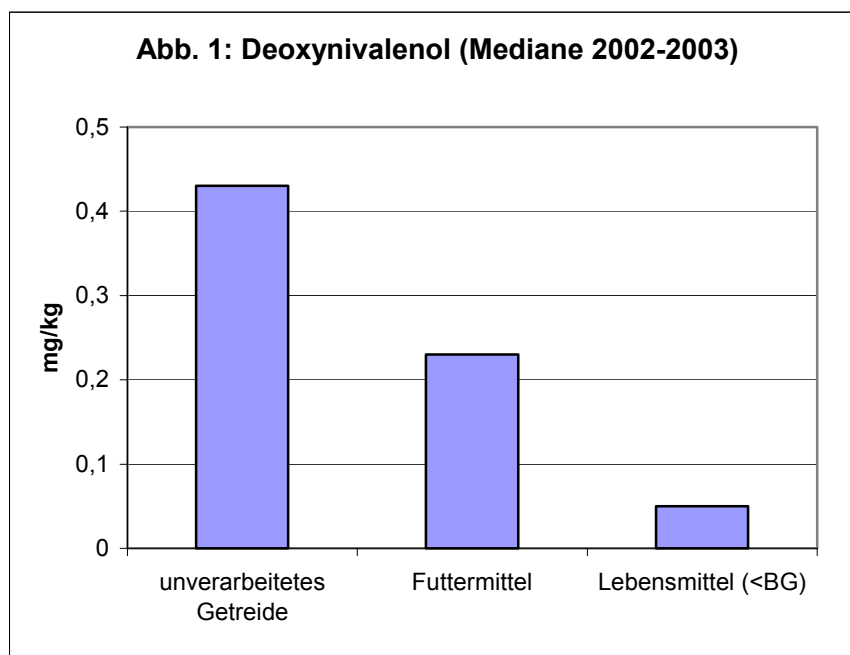
Aflatoxine werden von Lagerpilzen der Gattung *Aspergillus* gebildet. Österreichisches Getreide mit Ausnahme von Mais wird normalerweise erst geerntet, wenn der Feuchtigkeitsgehalt der Körner unter 16 % gesunken ist. Unter diesen Bedingungen kann sich zwar noch eine Lagerpilzflora bilden, jedoch werden keine Toxine (z.B. Aflatoxine oder Ochratoxin A) mehr produziert. Daher stellen österreichische Futtermittel auf Getreidebasis keine Probleme hinsichtlich des Aflatoxin B1-Gehaltes dar (Median <0,0005 mg/kg). Im Gegensatz dazu sind jedoch erhöhte DON- oder ZON-Gehalte manchmal Auslöser diverser Beanstandungen. Tab. 3 gibt einen Überblick über DON- und ZON-Konzentrationen in Futtermittelproben der amtlichen Kontrolle. Wenn auch die Gehalte sehr

schwanken können (DON: <0,05-4,5 mg/kg; ZON: <0,02-1,1 mg/kg), so liegen doch die Mediane deutlich unter den z.Z. gültigen Richtwerten (siehe Tab. 2).

	Median	Bereich	n
Deoxynivalenol	0,23	<0,05 – 4,5	240
Zearalenon	<0,02	<0,02 – 1,1	142

Tab. 3: DON- und ZON-Gehalte in Futtermittel in mg/kg (2002-2003)

Bei einem Vergleich der DON-Mediane von unverarbeitetem Getreide, Futtermitteln und Lebensmitteln auf Getreidebasis ist deutlich eine Verminderung dieser Mykotoxinkontamination entlang der Produktionskette zu beobachten (Abb. 1, BG=Bestimmungsgrenze). Gründe für diese Verminderung dürften nicht nur in gut funktionierenden Reinigungs- oder Sortierungsmaßnahmen bei der Futter- und Lebensmittelherstellung liegen, sondern können auch durch Verdünnungseffekte mitverursacht sein.



Autoren: Dr. Richard ÖHLINGER, Ing. Elisabeth KIENDLER, Dipl.-HTL-Ing. Wolfgang BRODACZ und Ing. Walter EDINGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Kompetenzzentrum „Cluster Chemie Linz“, Wieneringstraße 8, A-4020 Linz

Das neue Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung

R. KRSKA und E. WELZIG

Zur Beurteilung der Mykotoxinbelastung von Getreide braucht es eine leistungsfähige qualitative Analytik, die auch eine exakte Quantifizierung der Metaboliten ermöglicht. Gleichzeitig trachtet man nach Methoden zur effizienten Entgiftung von Futtermitteln. Zunehmendes Interesse gilt der biologischen Entgiftung der kontaminierten Güter. Spezielle Bakterien, Hefen, Pilze oder Enzyme sind dafür geeignet. Einige Mykotoxine können durch mikrobiellen Abbau inaktiviert werden. Die Identifizierung von Konjugations- oder Transformationsprodukten, die bei einem solchen Abbau entstehen, ist einer der Schlüsselpunkte bei der Entwicklung von Futtermittelzusätzen auf Basis von Mikroorganismen. Die mikrobielle Inaktivierung von Trichothecenen (v.a. Desoxynivalenol, DON) durch Umsatz zum ungiftigen DOM-1 ist ein erfolgreiches Beispiel dieses Mykotoxinabbaus (1,2), das in früherer Zusammenarbeit der Firma Biomin und dem IFA-Tulln entstand. Ausgehend von grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen der Stoffwechselvorgänge in Pilz und Getreide sollen nun im im Dezember 2002 gegründeten Christian Doppler-Labor (CD-Labor) für Mykotoxinforschung neue Analysenmethoden, die eine effiziente Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln ermöglichen, sowie weitere mikrobielle Zusatzstoffe zur Entgiftung bereits kontaminierter Futtermittel, entwickelt werden. Die Aufklärung von Metabolismen während des mikrobiellen Abbaus von Zearalenon (ZON) und der Fumonisine FB1 und FB2 sind dabei wichtige Forschungsziele des CD-Labors für Mykotoxinforschung. Das CD-Labor wurde von der Christian Doppler-Gesellschaft (CDG) genehmigt, die in Österreich die anwendungsorientierte Grundlagenforschung an der Schnittstelle zwischen Wissenschaft und Wirtschaft fördert. Dazu werden in Zusammenarbeit mit der Industrie CD-Labors an Universitäten und außeruniversitären Forschungsinstituten eingerichtet. Industriepartner des CD-Labors für Mykotoxinforschung sind die beiden Herzogenburger (NÖ) Firmen Biomin als Erzeuger von Mykotoxin-dekontaminierenden Futterzusätzen und Romer Labs, ein auf die Analytik von Pilzgiften spezialisiertes Unternehmen. Das Jahresbudget des Labors in Höhe von rund 300.000 Euro wird rund zur Hälfte von der CDG und den beteiligten Firmen aufgebracht.

Mykotoxine liegen jedoch nicht immer ausschließlich in ihrer bekannten Form vor. Es gibt auch Konjugate, die in der Pflanze gebildet werden („maskierte Mykotoxine“ (3) und entweder ebenfalls toxische Aktivität aufweisen oder im Verdauungstrakt von landwirtschaftlichen Nutztieren aufgespalten werden. Damit wird die Verbindung freigesetzt und bioverfügbar gemacht. Konjugationen von Mykotoxinen an Glykoside oder Fettsäureester (3,4) können in der Literatur gefunden werden. Das Studium der oben erwähnten Konjugation von Mykotoxinen in Pflanzen ist in pflanzlichen Zellkulturen mit ¹³C-markiertem DON, FB1 und FB2 geplant.

Die Metabolisierung im Magen-Darm-Trakt von Tieren kann auch zu einer Transformation des Mykotoxins führen. Die Mykotoxinmetaboliten, die aus Konjugation oder Transformation entstehen, werden jedoch häufig mit Routineanalysemethoden nicht detektiert. Da es auch beim mikrobiellen Abbau zur Entgiftung von Futtermitteln zur Bildung von Mykotoxinmetaboliten kommt, werden die Abbauprodukte mittels LC-API-MS/MS (Flüssig Chromatographie mit Massenspektrometrischer Bestimmung mittels Q-Trap LC-MS/MS) aufgeklärt und quantifiziert. Praktisch werden zur Aufklärung des mikrobiellen Abbauweges von ZON, FB1 und FB2 Mikroorganismen mit den Mykotoxinen in Puffer, in Nährmedien und in Darmmodellen inkubiert. Dabei werden die Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit, nicht-toxische Abbauprodukte zu bilden, überprüft. Im Laufe dieser Versuche wird eine große Anzahl von Mikroorganismen untersucht. Die Identifizierung der entstandenen Metaboliten erfolgt mittels LC-API-MS/MS und ^1H -NMR. Das beschriebene Screening von Mikroorganismen ist eine Grundlage für die weitere Entwicklung von Futtermitteladditiven. Von analytischer Seite ist es daher ausschlaggebend, qualitative und in manchen Fällen auch quantitative Methoden der LC-API-MS/MS zu entwickeln und zu optimieren.

In diesem Zusammenhang ist es auch naheliegend, mehrere Mykotoxine gleichzeitig zu bestimmen. Die konventionelle Analytik erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung, die aus Extraktion und einem mehrstufigen Clean-up besteht. GC-ECD/FID, HPLC-FLD/UV Methoden bieten nur geringe Identifikationsmöglichkeiten, immunoanalytische Methoden (ELISA) weisen eine stärkeren Matrixabhängigkeit auf. Daraus ergibt sich der Bedarf nach schnellen Methoden mit hoher Genauigkeit zur simultanen Bestimmung von Mykotoxinen und deren Metaboliten. Die LC-MS besitzt dabei das größte Potential für die simultane Bestimmung und Identifizierung von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln (1). Im CD-Labor für Mykotoxinanalytik werden Multianalyt-Methoden für die vorherrschenden *Fusarium*-Mykotoxine ZON, Fumonisine und die Trichothecene und deren Metaboliten entwickelt. Eine LC-MS/MS-Methode zur simultanen Bestimmung von A- und B-Trichothecenen und Zearalenon in Mais mit DOM-1 und Zearalanon als internen Standards nach erfolgtem Mycosep®-Clean-up konnte bereits Ende 2003 realisiert werden.

Mit der Entwicklung neuer Probenaufreinigungsmethoden wird ein weiterer wichtiger Beitrag zur verbesserten Mykotoxinanalytik geleistet. Schnelle Clean-up Methoden auf Basis von molekular geprägten Polymeren (molecularly imprinted polymers, MIPs) und Mycosep-Säulen-Formaten sind dabei das Kernstück der Forschung. Auf dem Gebiet der MIPs wurden schon Vorarbeiten mit DON und ZON geleistet (1). Molekular geprägte Polymere ergaben sich aus der Suche nach künstlichen Antikörper-ähnlichen Strukturen. Makromolekulare Rezeptoren werden durch das Prägen von synthetischen Polymeren gewonnen. Das Polymer wird anschließend in analytische Säulen gepackt. Vorteile gegenüber traditionellen Antikörpern sind die thermische Stabilität, chemische

Robustheit, und die lange Lagerfähigkeit ohne den Verlust der Erkennungsfähigkeit. Auf Basis des von RomerLabs patentierten Mycosep-Formates werden spezielle Polymermischungen zur Aufreinigung von Mykotoxinen entwickelt. So konnte im ersten Projektjahr bereits eine neuartige Clean-up-Säule zur raschen Bestimmung von Ochratoxin A in Lebensmitteln entwickelt werden, die auch bereits von RomerLabs® vertrieben wird (Mycosep® 229 Ochra Aufreinigungssäule).

Über einer Laufzeit von 7 Jahren wird das Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung eine neue Basis für die Entwicklung von effizienten mikrobiologischen Futtermittelzusätzen schaffen. Zusätzlich sollen die analytischen Methoden zur Überwachung von Mykotoxinen und deren Metaboliten verbessert und optimiert werden.

Danksagung

Wir danken der Christian Doppler Gesellschaft (Wien) und den Firmen RomerLabs und Biomin für die finanzielle Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Literatur

- 1 Binder, E.-M.; Binder, H. Microorganisms, method for obtaining same and feed additive; WO 99/35 240, **1999**.
- 2 J. Binder, E.M. Horvath, G. Schatzmyr, N. Ellend, H. Danner, R.Krska, R. Braun Cereal Research Communications 25 (3/1). **1997**, 343-346.
- 3 Engelhardt, F.; Ruhland, M.; Wallnöfer, P. R. Metabolism of mycotoxins in plants. *Adv. Food Sci.* **1999**, 21(3/4), 71-78.
- 4 Gareis, M. Maskierte Mykotoxine, *Uebers. Tierernaehrer* 22 (1), **1994**, 104-113.
- 5 Wallnöfer, P. R.; Preiß, U.; Ziegler, W.; Engelhardt, G. Konjugatbildung organischer Stoffe in Pflanzen; *UWSF – Z. Umweltchem Ökotox.* 8(1) **1996**, 43-46.
- 6 E. Rosenberg, R. Krska, R. Wissiack, V. Kmetov, R. Josephs, E. Razzazi, M. Grasserbauer Atmospheric-pressure chemical ionization-HPLC-MS as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *J. Chromatogr. A* 819, **1998** 277-288.
- 7 R. Weiss, M. Freudenschuss, R. Krska, B. Mizaikoff Improving the analysis of mycotoxins in beverages. Molecularly Imprinted Polymers for Deoxynivalenol and Zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 20(4), **2003**, 386-395.

Autoren: Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA und Dr. Elvira WELZIG, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln

Entwicklung einer neuen Aufreinigungssäule zur Ochratoxin A - Bestimmung

G. BUTTINGER, H. KNAPP, ELISABETH FUCHS, EVA-MARIA BINDER, R. KRSKA

Einleitung:

Ochratoxin A (OTA) wurde das erste mal 1965 in Kulturen von *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe et. al., 1965) entdeckt und isoliert. Es wird aber auch von *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* und *Penicillium verrucosum*, *Penicillium viridictatum*, *Penicillium cyclopium* etc. produziert.

All diese Pilze haben unterschiedlich klimatische Präferenzen z. B. ist *Penicillium viridictatum* hauptsächlich für die Kontamination in gemäßigten Regionen wie Skandinavien und Kanada, hingegen ist *Aspergillus ochraceus* mehr in wärmeren Regionen, wie Australien und das ehemalige Jugoslawien anzutreffen (Environmental Health Criteria, 1990).

OTA wird von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als Stoff mit möglicher krebserzeugender Wirkung beim Menschen (Gruppe 2B) gelistet. In mehreren Tierspezies verursacht OTA renale Toxizität, Nephropathie und Immunsuppression. In Nagetieren induziert es DNA - Schädigungen.

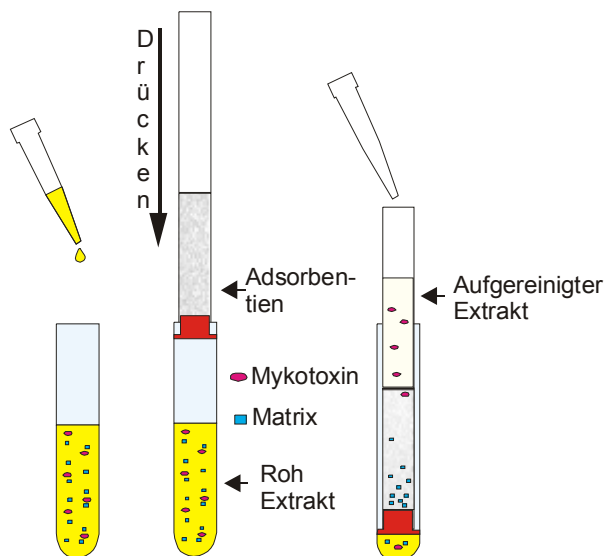
Zwei weit verbreitete analytische Methoden zum Nachweis von OTA sind Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (FLD) sowie Dünnschichtchromatographie. Normalerweise kann der Rohextrakt nicht direkt für diese Analysen eingesetzt werden. Deshalb ist ein Aufreinigungsschritt nötig. Die häufigsten Aufreinigungsmethoden beinhalten Immunoaffinitäts Säulen (IAC), flüssig-flüssig Extraktion (LLE) und Festphasen Extraktion (SPE) (Scott, 2002).

Die neu entwickelte Aufreinigungssäule besteht aus einer Mischung von Polymeren und apolaren Absorbentien und ist von Romerlabs® in zwei Ausführungen erhältlich; im Mycosep® und im Multisep® (Spritzen) Format. Im Gegensatz zu herkömmlichen SPE Säulen müssen diese Säulen nicht konditioniert werden und die Aufreinigung wird in einem Schritt durchgeführt. Der Extrakt wird durch die Säule gesaugt (Multisep® Format) oder gepresst (Mycosep® Format) und das gesammelte Eluat wird für die weitere Analyse verwendet. Die Leistungsfähigkeit dieser Säulen wurde untersucht.

Materialien und Methoden:

25 g gemahlene Probe wurden für 90 min mit 100 mL Acetonitril/Wasser (84+16) in einem Erlenmeyer Kolben auf einem Orbitalschüttler extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert und zu einem Gehalt von 1% Essigsäure angesäuert. Ca. 6 mL dieser Lösung wurden in die Epruvette der Mycosep® Ochra Säule (Romer Labs Diagnostic, Herzogenburg) gefüllt. Die Säule wurde in die

Epruvette gedrückt bis 4 mL gereinigter Extrakt entnommen werden konnten (Abb. 1). Der gereinigte Extrakt wird unter einem Luftstrom zu Trockene gebracht und in 0.5 mL mobiler Phase aufgenommen.



Alto, USA) erreicht.

HPLC Analysen wurden mit einem HP1100 series System (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) bestehend aus einer quaternären Pumpe, Säulenofen und Autosampler durchgeführt. Der verwendete Fluoreszenzdetektor war ein HP1046A (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland). Chromatographische Trennung wurde bei 20°C mit Acetonitril/Wasser/Essigsäure (40+60+1) auf einer Hypersil ODS 2.0*100mm 3µ Säule (Agilent, Palo

Abbildung 1: Mycosep® Prinzip

Die Leistungsfähigkeit der Mycosep® 229 Ochra Säule wurde mit Mais, Weizen, grünen Kaffeebohnen, Rosinen und dem zertifizierten Referenzmaterial (CRM) BCR472 von IRMM (Geel, Belgien) getestet. BCR472 ist eine natürlich kontaminierte Weizenprobe mit einem zertifizierten Wert von $8.2 \pm 1.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Eine Stammlösung ($26.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aus kristallinem OTA (Biopure, Tulln, Österreich) in Acetonitril wurde hergestellt und sowohl zum Spiken als auch für die externe Kalibration verwendet. Mais, grüne Kaffeebohnen und Rosinen wurden in 8 äquidistanten Levels von $2.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ bis $91 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dotiert. Weizen wurde mit zwei Level $2.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ und $26.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ dotiert. Zusätzlich wurde mit dem CRM noch eine Standardaddition mit zwei Level durchgeführt; + $2.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ und + $13.1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, entsprechend 10.8 und $21.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Ergebnisse und Diskussion:

Die HPLC-FLD Methode erreichte eine Nachweisgrenze von 4.1 ng.mL^{-1} entsprechend $2.1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (berechnet entsprechend DIN 32645, 1994). Die Leistungsfähigkeit der Methode war hauptsächlich durch den verwendeten FLD begrenzt. In einzelnen Versuchen, in einem anderen Labor, konnte mit einem Agilent 1100 series FLD (Waldbronn, Deutschland) das Signal/Rausch Verhältnis um einen Faktor von 10 verbessert werden.

Es konnte ein gut abgetrennter OTA Peak erreicht werden. (Abb. 2). Die Wiederfindungsraten von Mais, grünen Kaffeebohnen und Rosinen wurde berechnet, indem die errechnete Konzentration gegen die gemessene Konzentration aufgetragen wurde. Die Steigung der resultierenden Korrelationsgerade entspricht der Wiederfindungsrate (Tabelle 1).

Table 1: Wiederfindungsraten für Mais, Rosinen und grüne Kaffeebohnen

Matrix	Bereich [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	Wiederfindung [%]	RSD [%]	n
Mais	2.6-91	95.2	2.5	24
Rosinen	2.6-91	99.4	2.7	24
Grüne Kaffeebohnen	2.6-91	97.6	1.5	24

Die gute Wiederholbarkeit der Ergebnisse des Weizen und des CRM demonstrieren die gute Präzision und die Verwendbarkeit für natürlich kontaminierte Proben. Die Auswertung der Standardaddition für das CRM ergab eine gefunden Konzentration von $8.4 \pm 0.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=9) verglichen mit den zertifizierten Wert von $8.2 \pm 1.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Die Auswertung einer siebenfachen Bestimmung nach ISO Guide 33 (2000) bestätigte das kein signifikanter systematischer Fehler vorliegt.

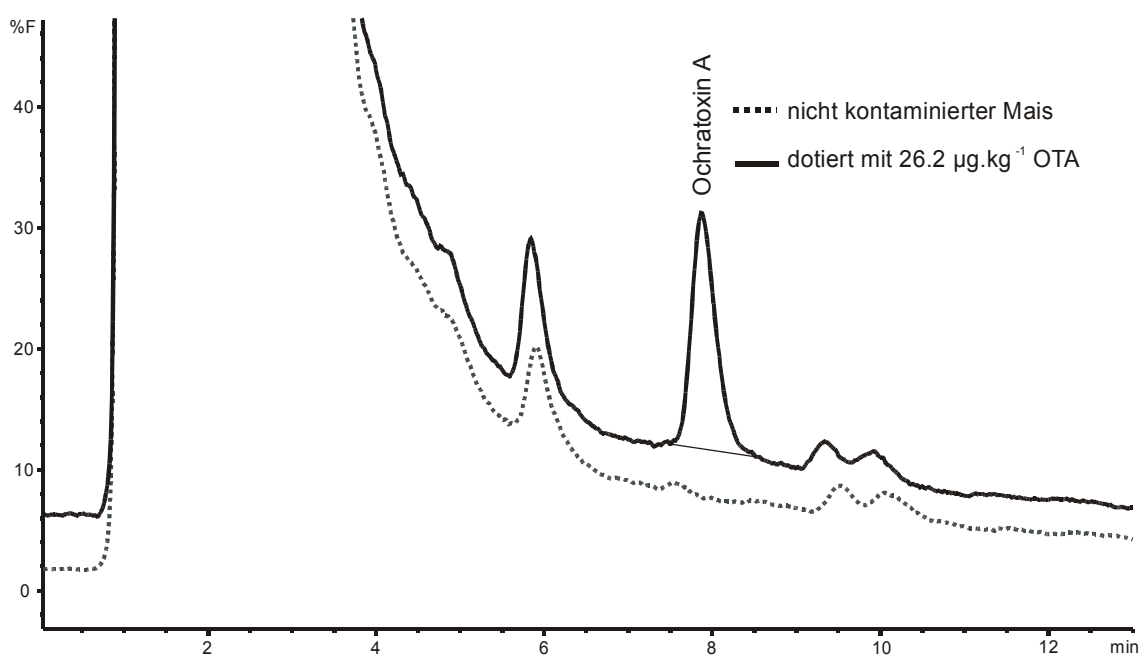


Abbildung 2: Chromatogramm eine Maisprobe nach Aufreinigung mit Mycosep® 229 Ochra

Schlussfolgerungen:

Diese erste Validierungstudie zeigt das große Potential dieser Mycosep® 229 Ochra Aufreinigungssäule von RomerLabs® als Alternative zu den häufig verwendeten IACs. Zwar wurden im Vergleich zu Immunoaffinitätssäulen mehr Interferenzen in den Chromatogrammen beobachtet, aber diese Methode erlaubt die präzise OTA Quantifizierung im unteren $\mu\text{g.kg}^{-1}$ Bereich. Es konnten mit dieser einstufigen Aufreinigung Wiederfindungsraten von mehr als 95% erzielt werden. Die gute Präzision und Verwendbarkeit für natürlich kontaminierte Proben wurden mit der Verwendung eines CRM klar bestätigt.

Danksagung:

Diese Studie wurde finanziell unterstützt von der Christian Doppler Gesellschaft (Wien).

Literatur:

- van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1965: Mycotoxins. Part II. The Constitution of Ochratoxin A, B, and C, Metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. Journal of the Chemical Society, 7083-7088.
- Environmental Health Criteria 105, 1990: Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. World Health Organization, Genf, Schweiz.
- Scott, P. M., 2002: Methods of Analysis for Ochratoxin A. In: De Vries, J. W., Trucksess, M. W., Jackson, L. S. (Eds.), Mycotoxins and Food Safety, pp. 117-134, Kluwer Academic / Plenum Publisher, Ames, USA.
- DIN 32645, May 1994: Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung.
- ISO Guide 33, 2000: Uses of Certified Reference Materials.

Autoren: Mag. Gerhard BUTTINGER, Hermann KNAPP und Ao. Univ.-Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln; Dr. Elisabeth FUCHS und Dr. Eva-Maria BINDER, Romer® Labs Diagnostic GmbH, Industriestr. 21, A-3130 Herzogenburg

Ochratoxin A – Isolierung und analytische Charakterisierung für den Einsatz als Referenzmaterial

G. HÄUBL, M. FREUDENSCHUSS, G. JAUNECKER und R. KRSKA

Einleitung:

Ochratoxin A (OTA), ein Mykotoxin mit nephrotoxischen, kanzerogenen, teratogenen und immunsuppressiven Eigenschaften, wurde erstmals aus einer Kultur von *Aspergillus ochraceus* auf Sorghum-Hirse isoliert [1]. Chemisch gesehen besteht OTA aus L-(β)-Phenylalanin, welches über eine Amidbindung mit einem Dihydroisocumarin (Ochratoxin α) verknüpft ist (Abb.1). Der systematische Name ist (R)-N-[(5-Chlor-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-L-phenylalanin.

OTA wird bei feuchtwarmen Bedingungen hauptsächlich von einigen *Aspergillus*-Arten produziert. In klimatisch kühleren Regionen sind *Penicillium*-Pilze wie *P. viridicatum* für OTA-Kontaminationen verantwortlich.

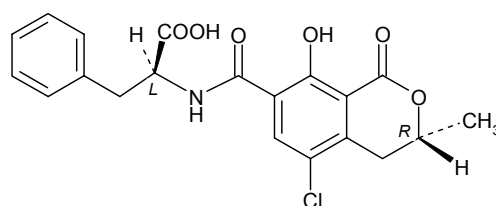


Abbildung 1 – Ochratoxin A

OTA steht im Verdacht, der Urheber für BEN (Balkan Endemic Nephropathy) in Kroatien und andere regionale Erkrankungen der Nieren zu sein [2, 3]. Rinder besitzen im Pansen OTA-abbauende Bakterien, aber andere Nutztiere (Schweine, Geflügel) reagieren ebenso empfindlich auf OTA wie der Mensch. In Skandinavien traten Fälle von Nierenversagen bei Schweinen auf, die auf verschimmeltertes Futter rückgeführt werden konnten [4]. Daher wurden Grenzwerte für OTA in Nahrungs- und Futtermittel festgelegt und analytische Methoden zur Detektion von OTA entwickelt [5]. Um den Gehalt an Mykotoxinen bestimmen zu können, benötigt man Referenzsubstanzen mit einer hohen Reinheit. Leider zeigten Studien, dass sich die Reinheit von Mykotoxinstandards nicht nur nach der Herkunft unterscheidet, sondern auch von Charge zu Charge variieren kann [6]. Bei kommerziell erhältlichen OTA wurde von den Herstellern eine Reinheit >98% angegeben. Die Übereinstimmung mit der tatsächlichen Reinheit ist nicht immer gegeben. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurde ein Verfahren zur Gewinnung und genauer Charakterisierung von kristallinem OTA entwickelt.

Produktion, Isolation und Reinigung :

OTA wurde entsprechend der Methode von Hesseltine [7] auf Weizenschrot produziert. Nach 4 Wochen Inkubationszeit wurde das fermentierte Kulturmaterial ausgiebig mit Lösungsmittel extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde mit 0.5 M Natriumbikarbonatlösung ausgeschüttelt. Die erhaltene wässrige Phase wurde angesäuert und mit einem organischen Lösungsmittel rückextrahiert. Nach einigen Waschschritten mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung wurde die

organische Phase getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde schonend bis zur Trockene eingedampft. Durch eine präparative Chromatographie über Silikagel, wurden Verunreinigungen abgetrennt. Die OTA-hältige Fraktion wurde schonend vom Laufmittel befreit und das OTA aus Xylol mehrfach umkristallisiert. Die erhaltenen reinweißen Kristalle wurden bei 60°C im Hochvakuum getrocknet.

Charakterisierung der Struktur:

Mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie, LC-MS/MS und verschiedenen NMR-Techniken wurde die Struktur des hergestellten OTA charakterisiert (Abb. 2a,b) und mit kommerziell erhältlichen OTA verglichen. Alle NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AC 400 Fouriertransform-NMR-Spektrometer aufgenommen. Für eine eindeutige Zuweisung der Wasserstoffe zu den Kohlenstoffatomen im Molekülgerüst wurde zusätzlich ein $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -COSY durchgeführt. Das Massenspektrum wurde auf einer Q-TRAP-LC-MS/MS (Applied Biosystems) aufgenommen. Diese Ergebnisse wurden mit Literaturdaten verglichen [8, 9]. In den NMR-Spektren eines kommerziell erhältlichen OTA wurden deutlich Benzol und andere Verunreinigungen entdeckt.

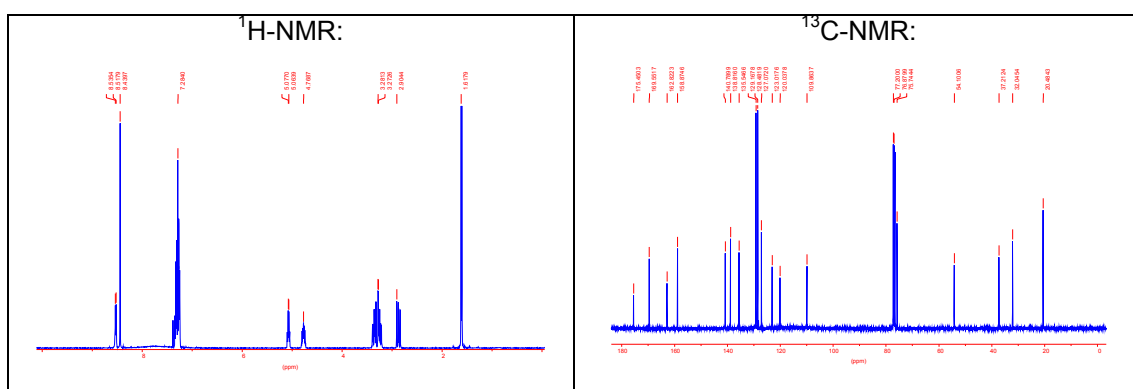


Abbildung 2a – Charakterisierung von OTA durch NMR

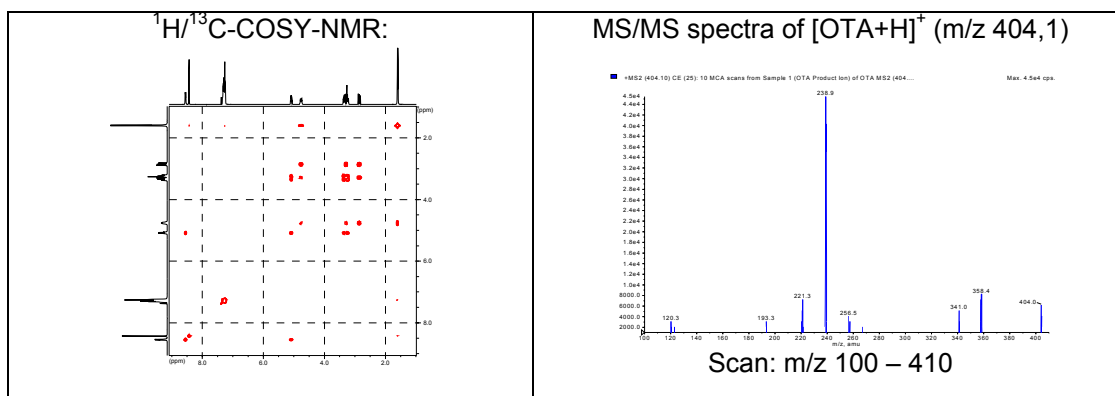


Abbildung 2b – Charakterisierung mittels COSY-NMR und LS-MS/MS

Bestimmung der Reinheit:

Der Reinheitsgrad des erhaltenen OTA wurde mittels UV-Spektrometrie, LC-Techniken und einer Elementaranalyse untersucht und mit mehreren kommerziell erhältlichen OTA-Standards

verglichen (Abb. 3). Die HPLC-Analyse wurde auf einem HP 1050 (Hewlett Packard) mit Fluoreszenzdetektor (FLD) HP1046A und UV-Detektor (VWD) HP1050 (beide Hewlett Packard) durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Zorbax Eclipse XDB C18-Säule (Agilent Technologies) (5µm, 150 x 2.1 mm). Als Laufmittelgemisch wurde Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure (60:40:1) verwendet. Die Trennung erfolgte unter isokratischen Bedingungen bei Raumtemperatur und einem Fluss von 0.4mL/min. Die Ergebnisse der Analysen bestätigen, dass das hergestellte OTA (OTA biopure) wesentlich weniger Verunreinigungen enthält als alle anderen kommerziell erhältlichen OTA-Standards.

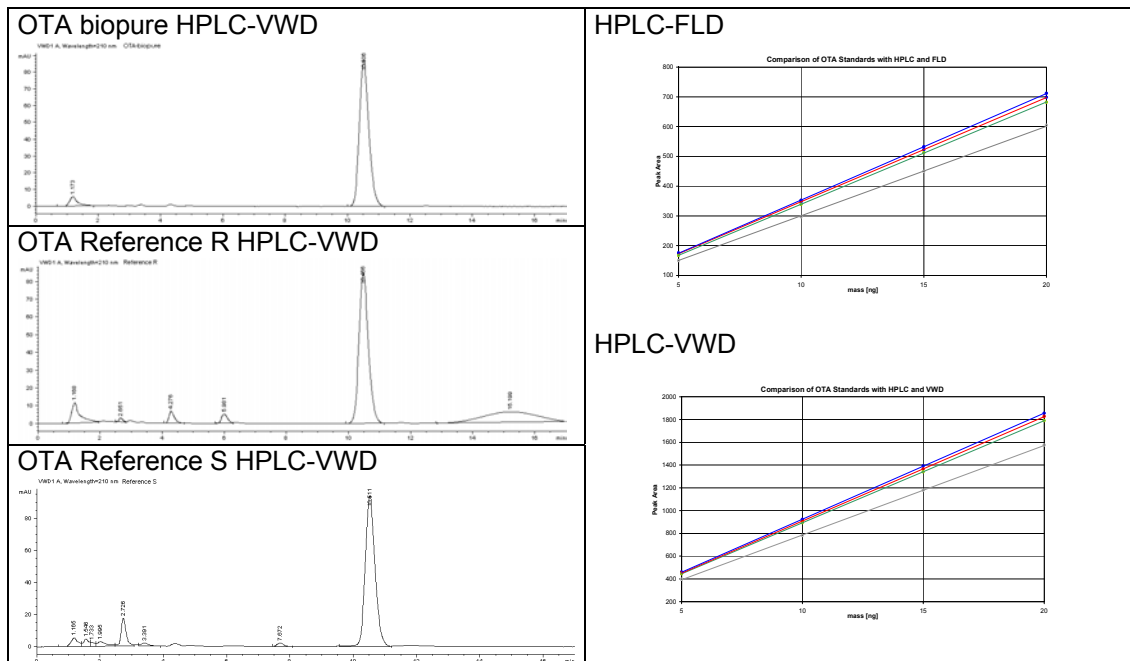


Abbildung 3 – Vergleich einiger OTA-Standards mittels HPLC

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde in einem Konzentrationsbereich von 30 – 40mg/L OTA in reinem Acetonitril auf einem Perkin Elmer Lambda 16 UV/Vis-Spektrometer durchgeführt. Auch hier wurde ein Vergleichsspektrum von kommerziell erhältlichen OTA angefertigt. Der Extinktionskoeffizient des isolierten und gereinigten OTA (OTA biopure) beträgt $5753 \pm 90 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Abb. 4).

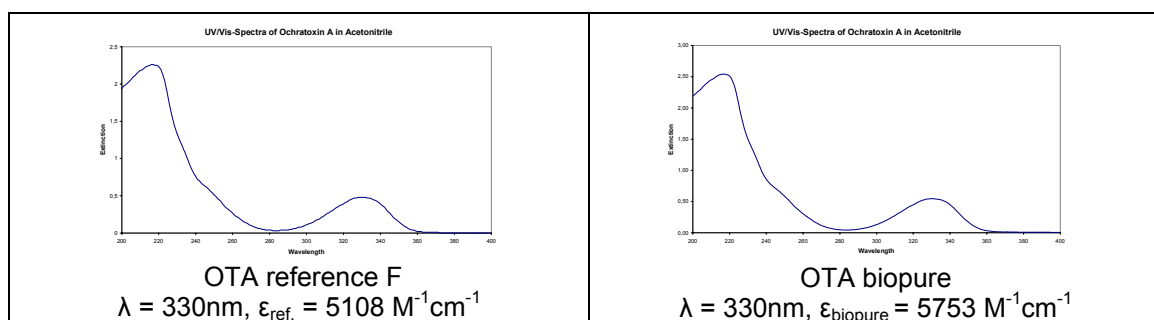


Abbildung 4 – Vergleich von UV-Spektren von OTA-Standards

Die Elementaranalyse wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien durchgeführt und bestätigt die hohe Reinheit des hergestellten OTA (Abb. 5).

Element	Soll (%)	Gefunden (%)	Abweichung vom Sollwert (%)
C	59.49	59.23	0.26
H	4.49	4.46	0.03
N	3.47	3.48	0.01

Abbildung 5 – Elementaranalyse OTA biopure

Zusammenfassung:

Es wurde erfolgreich ein effizientes und einfaches Verfahren zur Isolation und Aufreinigung von OTA entwickelt. Das erhaltene hochkristalline OTA besitzt eine sehr hohe Reinheit von >98% und genügt damit den Ansprüchen, die an einen Standard gestellt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde festgestellt, dass nicht alle kommerziell erhältlichen OTA-Standards diesem Kriterium entsprechen.

Literatur:

- 1 Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1956: Mycotoxins Part II. The Constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh., J. Chem. Soc. 1956, 7083
- 2 Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucic, A., 1997: Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia, Tox. Lett. 91, 105-109
- 3 Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., Märtlbauer, E., 2000: Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages, J. Agric. Food Chem. 48, 2483-2488
- 4 Krogh, P., 1976: Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy, Nord. Vet. Med. 28, 452-458
- 5 Valenta, H., 1998: Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids, J. Chromatography A, 815, 75-92
- 6 Widestrand, J., Langseth, W., Pettersson, H., 2003: Chemical characterisation and preparation of trichothecene standards, Food Add. Cont., *in press*
- 7 Hesseltine, C. W., 1972: Solid State Fermentations, Biotechnology and bioengineering, XIV, 4, 517-532, John Wiley & Sons
- 8 De Jesus, A.E., Steyn, P.S., Vleggaar, R., Wessels, P.L., 1980: Carbon-13 nuclear magnetic resonance assignments and biosynthesis of the mycotoxin ochratoxin A, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1980, 52-54
- 9 Lau, B.P.-Y., Scott, P.M., Lewis, D.A., Kanhere, S.R., 2000: Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 35, 23-32

Autoren: Georg HÄUBL, Dipl. Ing. Dr. Martin FREUDENSCHUSS und Günther JAUNECKER, biopure Referenzsubstanzen GmbH, Konrad Lorenzstrasse 20, A-3430 Tulln; Ao. Univ. Prof. Dr. Rudolf KRSKA, Christian Doppler Labor für Mykotoxinforschung, Analytikzentrum, Department IFA-Tulln, Universität für Bodenkultur, Konrad Lorenzstrasse 20, A-3430 Tulln
