



UNIVERSITÄT
HOHENHEIM

Abschlussbericht:

Mykotoxindetektion in Futtermitteln und Getreiden: Erprobung einer nicht destruktiven-Schnelltestmethode für die zukünftige Praxis

Institut für Agrartechnik,

FG Agrartechnik in den Tropen und Subtropen (440e)

Catalina Acuna-Gutierrez, Steffen Schock, Iris Ramaj, Prof. Joachim Müller

gefördert durch den QS-Wissenschaftsfonds



Inhalt

1	Einführung & Zielsetzung	3
2	Stand der Technik.....	4
3	Methode zur Entwicklung des optischen Mykotoxin-Nachweisverfahrens.....	5
4	Wissenschaftliche Ergebnisse	8
4.1	Kinetik des Kontaminationsprozesses	10
4.2	UPLC/MS-Mykotoxin-Nachweisverfahren.....	10
4.3	Analyse der verschiedenen Infektionsmethoden	11
4.4	Ergebnisse der optischen Analyse für FB ₁ kontaminierten Mais	16
4.5	Ergebnisse der optischen Analyse für FB ₁ kontaminierte Bohnen.....	23
4.6	Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse	33
5	Nutzung Hyperspektraler Verfahren	34
6	Entwicklung eines portablen, kostengünstigen Detektors.....	37
7	Diskussion und Einordnung der Projektergebnisse.....	39
8	Zusammenfassung und Ausblick	40
9	Kooperationen innerhalb des Projektes & Veröffentlichungen	41
	Literaturhinweise.....	42

1 Einführung & Zielsetzung

Die Sicherheit von Futtermitteln wird sowohl für Produzenten als auch die Gesetzgeber zu einem immer größeren Anliegen, da durch die Verfütterung potenziell gefährliche Stoffe in die tierische und menschliche Nahrungskette gelangen können. Mykotoxine spielen hierbei eine wichtige Rolle. Diese sind eine relativ große und chemisch vielfältige Gruppe von toxischen Sekundärmetaboliten mit geringem Molekulargewicht. Sie werden typischerweise von Pilzen produziert, insbesondere von solchen, die zu den Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* und *Fusarium* gehören, aber auch *Claviceps* und *Stachybotrys* sind wichtige Mykotoxinproduzenten. Bisher wurden ca. 300 bis 400 Mykotoxine identifiziert. Im Hinblick auf ihre Prävalenz in Futtermitteln und ihre bekannten Auswirkungen auf die Gesundheit von Nutztieren werden jedoch nur einige wenige Gruppen von Mykotoxinen als gefährdend und wirtschaftlich bedenklich eingestuft. Diese sind: Aflatoxine, *Fumonisine*, *Ochratoxine*, *Trichothecene* und *Zearalenon*. Die schädlichen Wirkungen von Mykotoxinen sind lange bekannt. Eine Großzahl der Mykotoxine hemmt die Proteinsynthese. Diese Hemmung ist jedoch oft nicht der primäre Mechanismus, der für die immuntoxischen Effekte verantwortlich ist. Sie können selektive Wirkungen auf verschiedene Zielorgane haben, Membranen beeinflussen oder die makromolekulare Synthese und Funktion stören. Aufgrund der Vielfalt ihrer toxischen Wirkungen und ihren synergetischen Eigenschaften gelten Mykotoxine als risikoreich für die Verbraucher von kontaminierten Lebens- und Futtermitteln (Santos Pereira, C Cunha, & Fernandes, 2019). Die Tierproduktion kann durch Mykotoxine in Leistung und Produktivität stark beeinträchtigt werden. Die Verfütterung kontaminierter Futtermittel an anfällige Tiere kann zu reduzierten Wachstumsraten, Krankheit oder sogar dem Verenden führen. Darüber hinaus können mit kontaminierten Futtermitteln belastete Tiere, Fleisch und Milch produzieren, die toxische Rückstände und Biotransformationsprodukte enthalten, welche schlussendlich dann in den menschlichen Verzehr gelangen (Streit et al., 2012).

Grundsätzlich können Mykotoxine in den verschiedenen Produktionsschritten in die Nahrungskette gelangen, so z.B. auf dem Feld, bei der Lagerung und weiteren Verarbeitung (Yang, Song, & Lim, 2020). Rechtlich wurden aufgrund der aufgezeigten Problematik auch in der Vergangenheit schon verschiedene Richtlinien und Gesetze erlassen. So muss beispielsweise gemäß der Richtlinie 2002/32/EG über „unerwünschte Stoffe in der Tierernährung“, die Qualität und Sicherheit von Produkten vor ihrer Verwendung in Futtermitteln bewertet werden, um sicherzustellen, dass sie keine Gefahr für Gesundheit oder Umwelt darstellen. Neben der Richtlinie 2002/32/EG werden

Grenzwerte für signifikante Mengen an Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln von verschiedenen Behörden weltweit festgelegt, z. B. von der United States (US) Food and Drug Administration (FDA), der World Health Organization (WHO), der Food Agriculture Organization (FAO) und der European Food Safety Authority (EFSA).

Mykotoxine stellen eine substantielle Gefahrenquelle für die Futtermittelherstellung und Lebensmittelproduktion dar. Die Prävention ist eine der wichtigsten Strategien zur Vermeidung, schließlich kann eine kontinuierliche Überwachung von Mykotoxingehalten in Futtermitteln erhebliche Probleme bei der Vermarktung, dem Vertrieb und dem Verzehr von Lebensmitteln verhindern. Sie sollte daher bei der Futtermittelherstellung und der Herstellung von Lebensmitteln angewendet werden.

Aus diesem Grund hat dieses Projekt zum Ziel, die optische Detektion von Mykotoxinen in Futtermitteln an einen möglichen, potentiellen Praxiseinsatz heranzuführen und somit zukünftig ein schnelles, zerstörungsfreies, kostengünstiges Mykotoxin-Monitoring zu ermöglichen, um so einen Beitrag zur Lebensmittelsicherheit und Tiergesundheit zu leisten.

2 Stand der Technik

Der herkömmliche Mykotoxin-Nachweis kann durch verschiedene Laboranalysen erfolgen. Die Standard-Detektionsmethode wird mit chromatographischen Techniken durchgeführt, wobei die Flüssigchromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie die empfindlichste und selektivste Methode zum Nachweis von Mykotoxinen ist (z.B. HPLC-MS/MS) (Aiko & Mehta, 2015). Einer der wesentlichen Nachteile dieser Methode sind die hohen Kosten für die Ausrüstung, der hohe Verbrauch an Lösungsmitteln zur Durchführung der Analyse und der Bedarf an hochqualifiziertem Personal. Andere, in der Anwendung etwas einfachere Techniken umfassen Testkits wie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), bei denen Antikörper zum Nachweis von Mykotoxinen verwendet werden. Dieser Test hat den Vorteil, dass er zeiteffizienter als die chromatographischen Methoden ist. Allerdings kann pro Testkit nur eine begrenzte Anzahl von Proben analysiert werden (ca. 400€ für 30 Proben bei n=2) und die Ergebnisse können matrixabhängig sein. Am anwendungsfreundlichsten und schnellsten sind Detektionsstreifen, die als Schnelldiagnostest und nach einem ähnlichen Prinzip wie die ELISA-Tests, arbeiten. Daher sind die Kosten vergleichsweise hoch. Die zusätzlichen Einschränkungen bezüglich

Matrixabhängigkeit und potentiell geringer Sensitivität und Selektivität bestehen ebenfalls (Krska & Molinelli, 2009). Letztlich sind Labortests teuer, erzeugen chemische Rückstände und sind zeitaufwendig. Aus den oben genannten Gründen werden für die Mykotoxinkontrolle in Produkten schnellere, aber dennoch empfindliche Methoden für den in situ-Nachweis gesucht. Optische Verfahren bieten die Vorteile eines schnellen Nachweises einer großen Anzahl von Proben sowie die Möglichkeit der Quantifizierung des in Lebens- und Futtermitteln vorhandenen Mykotoxins. Da diese Techniken verschiedene Bereiche des elektromagnetischen Spektrums analysieren, erlaubt sie zudem gleichzeitig die Bestimmung anderer Komponenten wie Proteine oder Kohlenhydrate mit dem Nachweis des Mykotoxins. Optische Methoden zum Mykotoxin-Nachweis sind die Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS) und die Hyperspektrale Bildgebung (HSI). Die Probenvorbereitung ist gering, z.B. mittels mahlen oder einer völlig zerstörungsfreien Probenvorbereitung. Daher ist kein Einsatz von Lösungsmitteln erforderlich. Die Fortschritte in diesem Bereich sind verschiedentlich in der Literatur dokumentiert (Sendin, Williams, & Manley, 2018; Siche et al., 2015; Teye, Huang, & Afoakwa, 2013).

3 Methode zur Entwicklung des optischen Mykotoxin-Nachweisverfahrens

Es gibt mehrere optische, zerstörungsfreie Nachweisverfahren, die zur Detektion von Mykotoxinen verwendet werden können. Zur Auswahl der optimalen Methode ist es entscheidend, die Struktur des nachzuweisenden Toxins zu berücksichtigen. Für diese Arbeit wurde Fumonisin B1 (FB₁) aufgrund der großen Relevanz, des weithin dokumentierten Vorkommens in Lebens- und Futtermitteln, und der Molekülstruktur, ausgewählt. Die chemischen Bindungen in der FB₁-Molekularstruktur, erlauben es, dieses im Nah-Infrarotbereich des elektromagnetischen Spektrums zu untersuchen. Daher bestand unser Ansatz darin, mit einem Nah-Infrarot-Spektrometer (NIRS) zu arbeiten, um die wichtigen Wellenlängen im Zusammenhang mit dem Toxin nachzuweisen und zu identifizieren. Anschließend können die Ergebnisse auf andere optische Methoden übertragen und getestet werden. Im Falle dieses Projektes ist dies eine Kamera mit hyperspektraler Bildgebung, welche die spektrale Komponente des NIRS für jedes Pixel darstellen kann. Die ausführliche Erklärung erfolgt in einem späteren Kapitel. Als Studienobjekte wurden Mais- und Bohnenkerne ausgewählt. Mais wird sehr häufig in Futtermitteln verwendet und hat daher eine große Relevanz. Bohnen wurden ausgewählt, da sie bei der Erprobung der Methode eine

interessante Ergänzung darstellen, da sie in Anbetracht der Farbe und des hohen Gehalts an Protein und Polyphenolen eine schwierig zu bearbeitende Matrix darstellen. Außerdem deuten die unterschiedliche Form der Kerne und Körner darauf hin, dass verschiedene Anordnungen, entstehen, z.B. mit mehr oder weniger Leerräumen, was sich auf die Analyse auswirken kann.

Nachdem die Versuchsobjekte definiert waren, galt es die Empfindlichkeit des NIRS beim Nachweis unterschiedlicher Konzentrationen des Mykotoxins zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde ein systematischer Ansatz zur künstlichen Infizierung der Kerne mit dem kommerziell erhältlichen FB₁-Standard gewählt. Hierfür wurden zwei Infektionsmethoden getestet (getaucht und benetzt). Die Methode „getaucht“ bestand darin, die Kerne auf eine Zellkulturplatte zu legen (ein Kern pro Vertiefung, Abb. 1) und dann mit der FB₁-Lösung (entweder 0, 1, 5 oder 10 mg kg⁻¹) vollständig zu bedecken (ca. 500 µl). Danach wurden die Proben vollständig getrocknet, bevor sie mit dem Spektrometer gemessen wurden.



Abbildung 1. Mais und Bohnen in den 24-Kavitäten Zellkulturplatten, die als Probenhalter für die Mykotoxin-Infektion verwendet wurde.

Die Infektionsmethode benetzt bestand darin, die Kerne in die Zellkulturplatten zu legen, aber anstatt sie mit der Lösung zu bedecken, wurden 10 µl auf jeder Seite des Kerns aufgetragen (20 µl Gesamtvolumen hinzugefügt). Mit dieser Methode sollte getestet werden, ob eine bessere Inokulation erreicht werden kann. Die Messungen wurden mit einem Labor-Nahinfrarotspektrometer (NIRS) mit Wellenlängen von 680-2500 nm und einem semiportablen NIRS mit einem Bereich von 899-2500 nm durchgeführt. Dieser Wellenlängenbereich ist wichtig,

weil dort die chemischen Veränderungen in Nahinfrarotspektren zu finden sind. Darüber hinaus wurden alle Proben aus beiden Infektionsmethoden gemahlen und mit den Spektrometern erneut gemessen. Die Partikelgröße hat einen großen Einfluss auf die Spektralmessungen; daher kann mit gemahlene Proben geprüft werden, ob eine homogenere Matrix aufgrund der Partikelgrößenreduzierung bessere Ergebnisse liefert. Abbildung 2 zeigt die Proben von Mais und Bohnen vor und nach dem Mahlen.

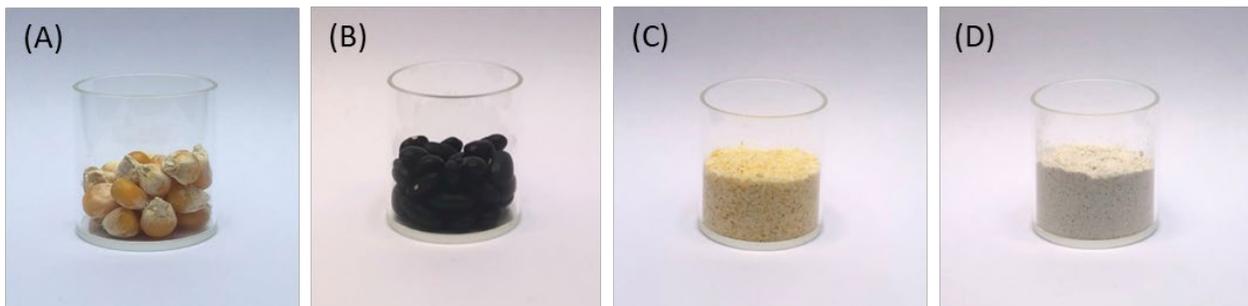


Abbildung 2. Mit NIRS analysierte Mais- und Bohnenproben. (A) ganze Maiskörner, (B) ganze Bohnen, (C) gemahlener Mais und (D) gemahlene Bohnen.

Nachdem die optische Analyse durchgeführt wurde, müssen die Proben mit herkömmlichen Nachweisverfahren analysiert werden, um den genauen Konzentrationswert für die Entwicklung des Kalibrierungsmodells zu erhalten. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit der Core Facility der Universität Hohenheim deren Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatograph gekoppelt mit einem Massenspektrometer (UPLC/MS) zum Nachweis von Mykotoxinen eingesetzt. Dann wurde aufgrund der einfachen Methode ein Ansatz mit einem Detektionskit für Gesamtfumonisine gewählt. Dieser Kit basiert auf dem ELISA-Prinzip. Es wurde der AgraQuant® Fumonisin 0,25 / 5,0 ELISA-Kit von Romer Labs (Getzersdorf, Österreich) verwendet. Die Extraktion erfolgte immer unter Einhaltung des Verhältnisses 1:5 von Probe zu Extraktionslösung.

Nachdem die Daten der spektralen und nasschemischen Analyse erhoben waren, wurde als nächster Schritt die statistische Analyse durchgeführt. Es ist wichtig zu beachten, dass sich Spektraldaten im NIR-Bereich aus Rauschen und anderen nicht wertvollen Informationen zusammensetzen, die vor der Analyse entfernt werden müssen. Um eine umfassendere Analyse zu erreichen, müssen die

Daten daher verschiedenen Transformationen unterzogen werden, um die relevanten Informationen zu extrahieren. Hierfür wurde eine Software zur Spektralanalyse verwendet (Unscrambler, Camo Analytics). Die Daten wurden zunächst mit einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) analysiert, um nach Ausreißern zu suchen. Dann wurde eine partielle Regression der kleinsten Quadrate (PLSR) für die Analyse und Erstellung eines Vorhersagemodells verwendet. Eine schematische Beschreibung des zuvor beschriebenen Prozesses ist in Abbildung 3 zu sehen.

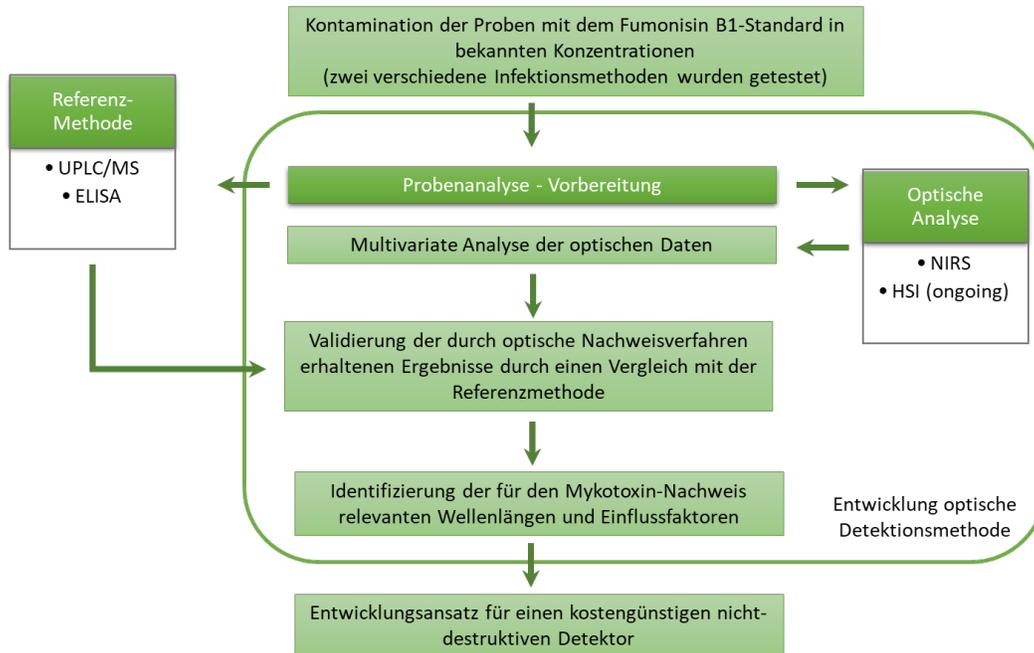


Abbildung 3. Schematischer Arbeitsablauf für die optische Erkennung von Mykotoxinen in Körnern und Hülsenfrüchten.

4 Wissenschaftliche Ergebnisse

Ziel dieses Projektes war es auch, zwei verschiedene Typen von NIRS-Detektoren im Hinblick auf den möglichen Praxiseinsatz zu evaluieren, da diese sich hinsichtlich Kosten und Einfachheit des Einsatzes zur Erstellung von Referenzspektren deutlich unterscheiden. So hat beispielsweise das semiportable Spektrometer den Vorteil, dass es kleiner ist, technisch angepasst werden kann, und vor Ort transportabel ist. Einer der Hauptunterschiede zwischen beiden Spektrometern ist der Wellenlängenbereich, den sie analysieren können. Das stationäre, Labor-NIRS analysiert den Bereich von 680-2500 nm mit einer optischen Auflösung von 1 nm, während das semiportable

Spektrometer den Bereich von 899-2500 nm mit einer Auflösung von 3 nm analysiert. Darüber hinaus unterscheiden sich die Probenhalter der Geräte voneinander. Das erstere besitzt einen Ringbecher, der mit einer goldenen Platte bedeckt ist (reduziert die Menge an externem Licht in den Messungen) (Abb. 4C). Das zweite hat eine Ulbricht Kugel, auf der ein Quarzbecher angebracht ist (daher mehr externe Lichtinterferenz) (Abb. 4D). Schließlich erfolgt die Ausgabe der Ergebnisse des stationären NIRS als Absorption, wohingegen das semi-portable den Reflexionsgrad anzeigt, welcher vor der Datenanalyse noch als Absorptionswert interpretiert werden muss. Abbildung 4 zeigt sowohl die beiden in dieser Untersuchung verwendeten Geräte als auch die verschiedenen Arten von Probenhaltern.

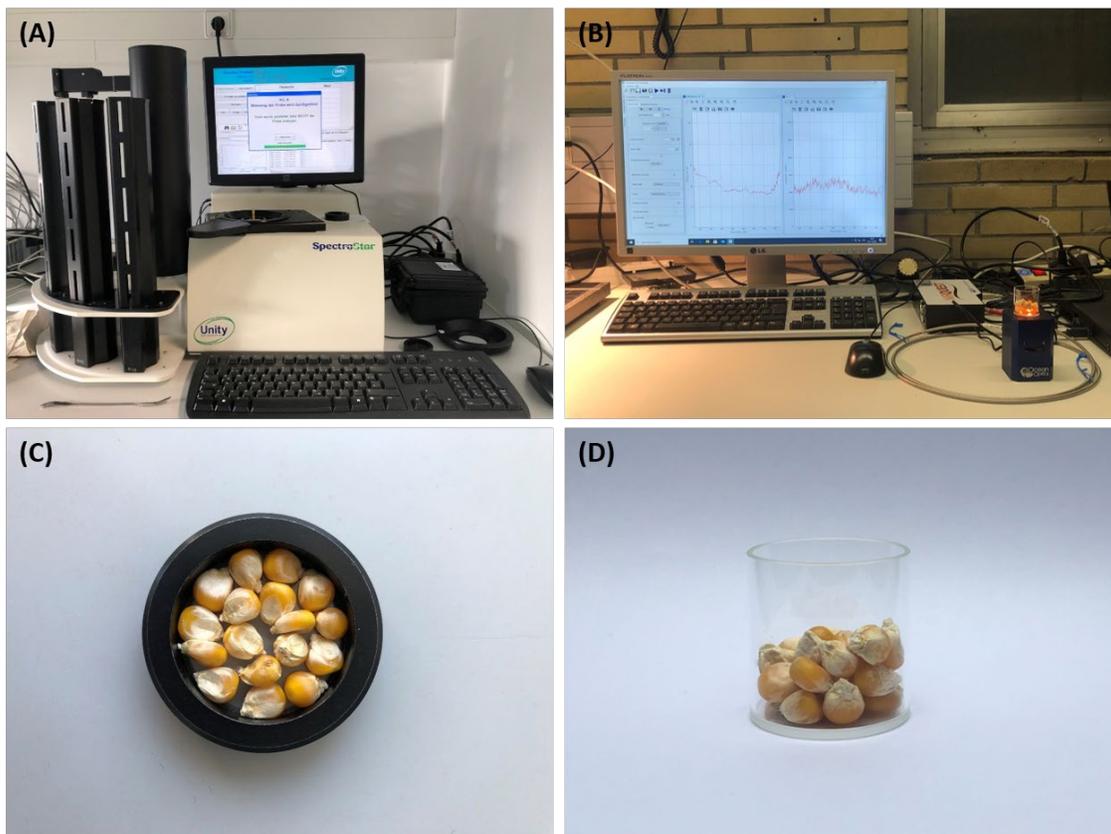


Abbildung 4. Nahinfrarotspektrometer (NIRS), die für Bestimmung der relevanten Wellenlängen verwendet wurden: (A) Laborspektrometer, (B) semi-portables Spektrometer, (C) Probenhalter für das Laborspektrometer und (D) Probenhalter für das semi-portable Spektrometer.

4.1 Kinetik des Kontaminationsprozesses

Um systematische Experimente zu ermöglichen, wurde eine Methode zur Kontamination des Korns mit FB_1 entwickelt, welche Methanol als Lösungsmittel verwendet. Um jedes einzelne Korn mit der Toxinlösung zu beschichten, wurde eine Zellkulturplatte als Probenhalter verwendet. Um zu bestimmen, wieviel Zeit für die Verdunstung des Lösungsmittels benötigt wurde, wurde die Platte gewogen, bis sie ihr Ausgangsgewicht erreicht hatte. Es dauert etwa 20 h, bis das Lösungsmittel vollständig aus den Körnern verdunstete (Abb. 5).

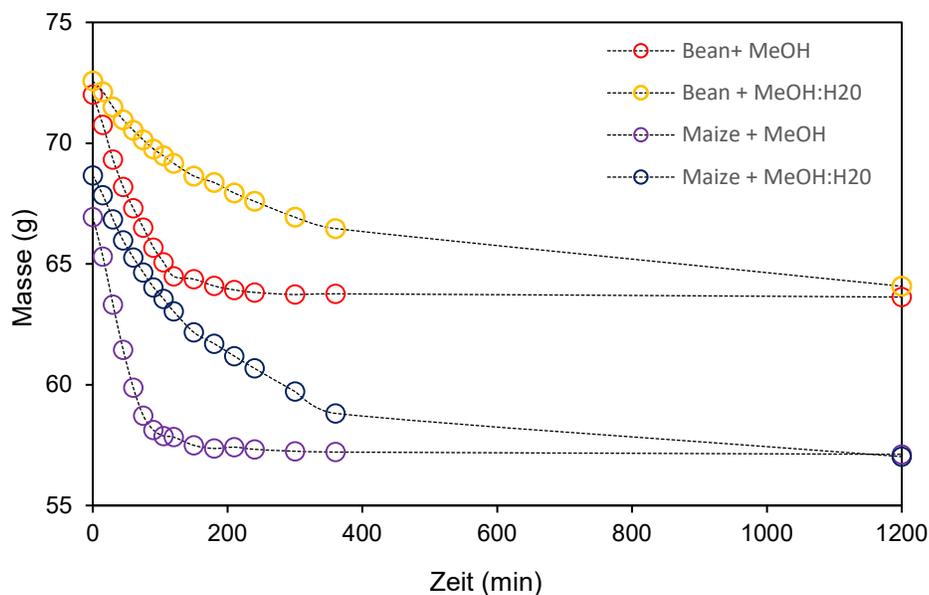


Abbildung 5. Masseabnahme durch Verdunstung des Solvents bis zur Erreichung des Ursprungsgewichts.

4.2 UPLC/MS-Mykotoxin-Nachweisverfahren

Zunächst wurde eine Nachweismethode für Aflatoxin B1 (AFB_1), Fumonisin B1 (FB_1) und Deoxynivalenol (DON) unter Verwendung des gereinigten Mykotoxin-Standards entwickelt (Abb. 6). Nur für das FB_1 ist die erreichte Nachweisgrenze (50 mg kg^{-1}) höher als der Grenzwert, den die EU-Politik für den menschlichen Verzehr festgelegt hat (1 mg kg^{-1}).

Um das Mykotoxin aus den Proben zu extrahieren, wurde die QuEChERS-Methode (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) für die Mykotoxinextraktion aus Proben angepasst. Zunächst wurde die Extraktionsmethode mit den Bohnen getestet, da sie aufgrund ihres hohen Phenol- und Proteingehalts als ein schwieriger zu bearbeitende Matrix als Mais gelten. Es war möglich, 71% zurückzugewinnen, was als gute Rate angesehen wird. Zur DON-Analyse war es nicht möglich, die QuEChERS-Methode anzuwenden, da die Probe Verunreinigungen enthielt (Abb. 6D).

Es wurde beschlossen, die Referenznachweismethode durch einen ELISA-Kit zu ersetzen, da sie mit einer einfacheren Methodik ausreichend genaue Ergebnisse liefert. Dies wird später erläutert.

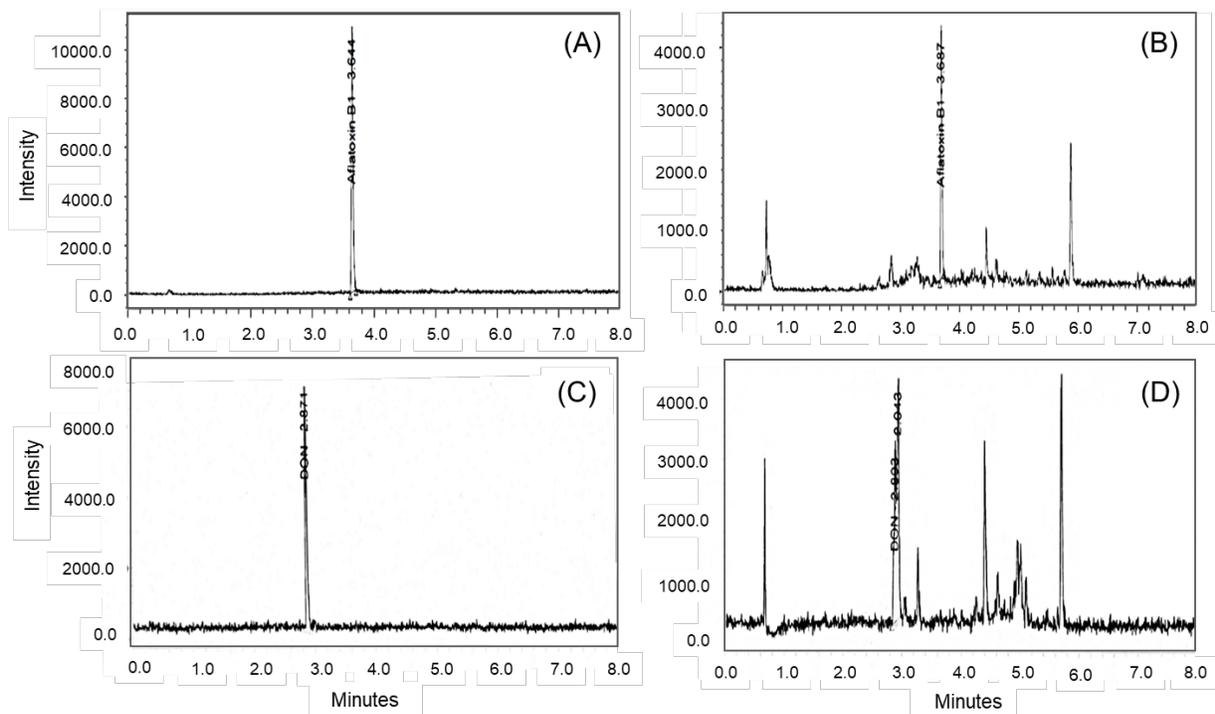


Abbildung 6. Für die UHPLC/MS-Analyse verwendetes Chromatogramm. A) Standard AFB₁, B) Bohnenprobe angereichert mit AFB₁-Standard, (C) Standard DON, (D) Bohnenprobe angereichert mit DON-Standard.

4.3 Analyse der verschiedenen Infektionsmethoden

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Applikation des FB₁ bei Mais und Bohnen mit einer bekannten Konzentrationslösung. Dabei sind jedoch Verluste zu erwarten, da die Lösung an den Wänden der

Zellkulturplatte haften bleiben kann. Aus diesem Grund wurden zwei Applikationsmethoden getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Ergebnisse der Mykotoxin-Kit-Analyse der verschiedenen Anwendungsmethoden der FB₁-Lösung bei Maiskörnern und Bohnen

Theoretical concentration (mg kg⁻¹)	Solution concentration submersion inoculation^a (µg µL⁻¹)	Solution concentration spread inoculation^b (µg µL⁻¹)
Maize		
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.53 ± 0.09	0.80 ± 0.07
5	2.76 ± 0.81	2.49 ± 0.30
10	5.64 ± 1.67	4.39 ± 0.42
Bean		
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	0.69 ± 0.16	0.84 ± 0.19
5	2.86 ± 0.51	3.68 ± 0.42
10	7.66 ± 0.40	7.54 ± 0.11

^a 500 µL solution per bean

^b 20 µL solution per bean

Bei Mais führt die erste Applikationsmethode (vollständige Bedeckung des Korns mit der Lösung) zu besseren Ergebnissen, insbesondere in der höheren Konzentration. Im Fall von Bohnenkernen ergab die Infektionsmethode „benetzt“ genauere Ergebnisse, da sie den theoretischen Konzentrationen näherkommt.

Es ist notwendig, den tatsächlichen FB₁-Gehalt der Körner nach der Inokulation zu kennen, da das Kalibrierungsmodell die tatsächliche Konzentration benötigt um eine verlässliche Vorhersage treffen zu können. Aus diesem Grund wurden die gemessenen Konzentrationen in der Analyse verwendet. Um die Klassifizierungsgruppen den theoretischen Konzentrationen in der Nomenklatur vergleichbar zu machen, wurde die Codierung verwendet, wie in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Bezeichnung der verschiedenen Konzentrationen für das zur Kontamination verwendete FB_1

Classification groups	Approximate concentration of FB_1 ($mg\ kg^{-1}$)
Level 1	0
Level 2	1
Level 3	5
Level 4	10

Beim Vergleich der beiden verschiedenen Typen von Spektrometern ist die Form der Spektren, die von jedem einzelnen Spektrometer abgegeben werden, unterschiedlich. Im Fall des Labor-NIRS sehen die Spektren aufgrund der höheren Auflösung (1 nm) glatter aus. Zusätzlich hat dieses Spektrometer eine Peakänderung in der Nähe von 1280 nm, wo der Detektor vom Sichtbaren ins Nah-Infrarot wechselt (Abb. 7). Dies ist auf die verwendete Detektor Hardware zurückzuführen. Im Falle des semiportablen Typs haben die Spektren aufgrund der Auflösung eine rauere Form. Dies wirkt sich auf die Vorbehandlung der Daten aus, da das Rauschen reduzieren werden muss, was später noch erläutert wird.

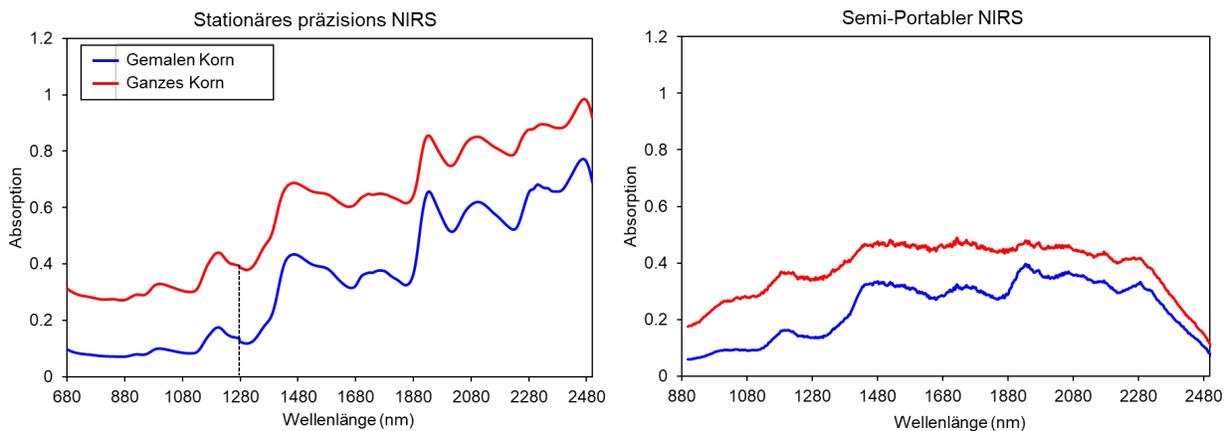


Abbildung 7. Beispiel Spektrum von der Analyse von Maiskörnern. Der Pfeil zeigt den Wechsel des Detektors im Fall des Labor-NIRS an.

Wie bereits erwähnt, setzen sich Spektraldaten aus Rauschen und relevanten Informationen zusammen. Daher müssen die Daten mit mathematischen Transformationen vorbehandelt werden,

um die wichtigen Informationen zu extrahieren. Während der Analyse zeigen die durch die Transformationen erzeugten Spektren meist am Anfang oder am Ende Bereiche, die nicht relevant sind. Diese werden zur Analyse entfernt. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Datenvorbehandlung und der Region, die für die besten Ergebnisse analysiert wurde.

Tabelle 3. Datenvorbehandlung und analysierter Wellenlängenbereich für die kontaminierten Mais- und Bohnenproben.

Grain type	Spectrometer used	Application method of FB ₁	Analyzed wavelength (nm)	Data pre-treatment
Maize				
Whole	Laboratory	Submersion	850-2500	Savitzky-Golay 2 nd derivative 15 smoothing points
		Spread	850-2500	
	Semi-portable	Submersion	899-2202	Savitzky-Golay smoothing 5 points + Savitzky-Golay 2 nd derivative with 11 smoothing points
		Spread	899-2300	
Milled	Laboratory	Submersion	850-2500	Savitzky-Golay 2 nd derivative 15 smoothing points
		Spread	850-2500	
	Semi-portable	Submersion	680-2500	Savitzky-Golay smoothing 5 points + Savitzky-Golay 2 nd derivative with 11 smoothing points
		Spread	899-2300	
Bean				
Whole	Laboratory	Submersion	680-2500	Savitzky-Golay 2 nd derivative 15 smoothing points
		Spread	680-2500	
	Semi-portable	Submersion	1002-2300	Savitzky-Golay smoothing 5 points + Savitzky-Golay 2 nd derivative with 15 smoothing points
		Spread	1002-2300	
Milled	Laboratory	Submersion	925-2500	Savitzky-Golay 2 nd derivative 15 smoothing points
		Spread	900-2500	
	Semi-portable	Submersion	1002-2350	Savitzky-Golay smoothing 5 points + Savitzky-Golay 2 nd derivative with 15 smoothing points
		Spread	1002-2300	

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wurden die Daten aus dem semiportablen NIRS mit zwei verschiedenen Methoden vorbereitet (Glättung und eine zweite Ableitung). Dies kann auf die geringere Auflösung dieses Spektrometers (3 nm) und auf die Interferenz des externen Lichts zurückzuführen sein, welches zu einer Erhöhung des Rauschens führen kann.

4.4 Ergebnisse der optischen Analyse für FB₁ kontaminierten Mais

Nach der Vorbehandlung der Daten wurde für jedes Experiment eine PCA durchgeführt. Im Fall von Mais wurde das beste Ergebnis mit dem Labor-NIRS bei gemahlten und mit der Infektionsmethode „getaucht“ infizierte Korn erzielt (Abb. 8A). Es besteht eine klare Trennung zwischen Konzentrationsstufe 1 (die 0 mg kg⁻¹ beträgt) und den übrigen Konzentrationen. Unter den höchsten Stufen (die nahe bei 5 und 10 mg kg⁻¹ liegen) gibt es keine Trennung. Mit diesem Spektrometer war es nicht möglich, bei ganzen Maiskörnern die verschiedenen Konzentrationsniveaus zu trennen (Abb. 8B und 8D).

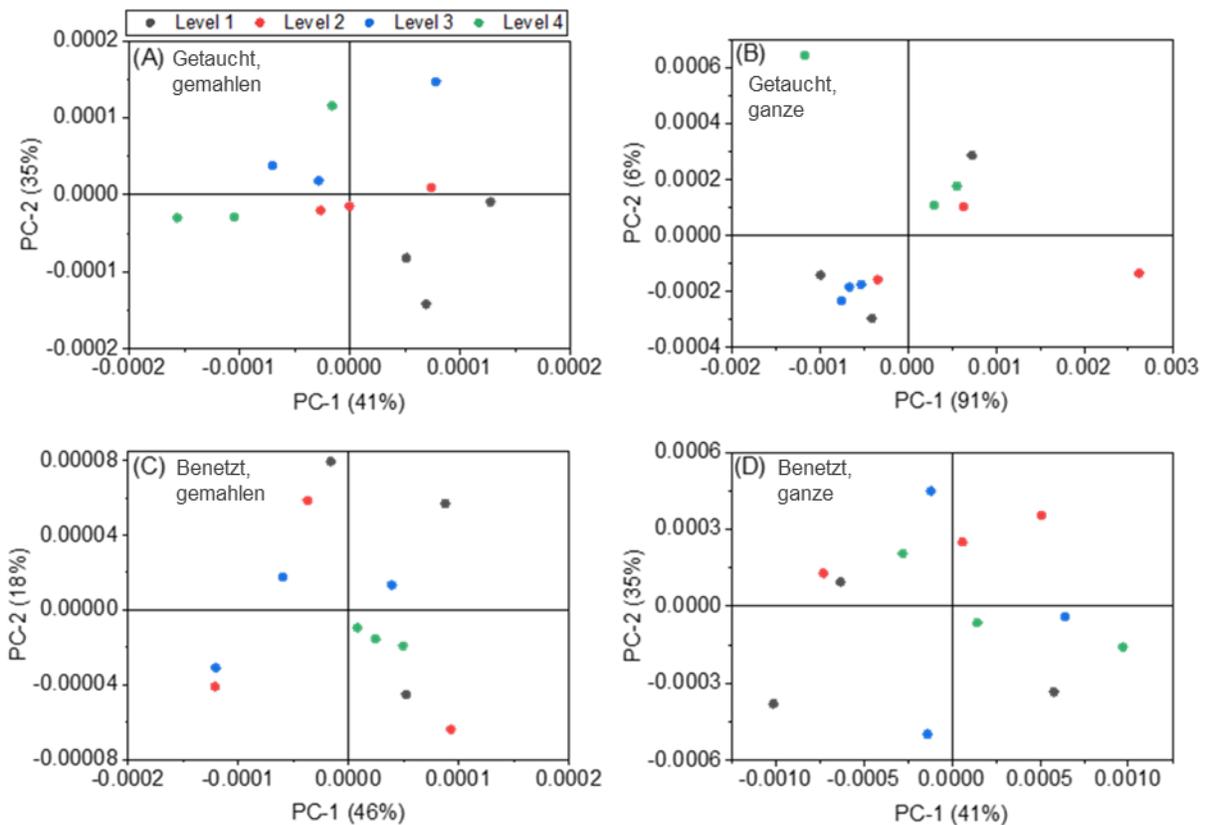


Abbildung 8. Hauptkomponentenanalyse von infiziertem Mais mit vier verschiedenen Konzentrationen von FB_1 , analysiert auf einem Labor-NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Körner.

Bei der Analyse der Proben mit dem semiportablen NIRS, lieferte die Infektionsmethode „getaucht“ die besseren Ergebnisse (Abb. 9). Gemahlene und ganze Körner (Abb. 9A bzw. 9B), zeigen die vier Klassifikationsgruppen getrennt voneinander. Bei Infektionsmethode benetzt war es bei gemahlene Körnern möglich, 0 mg kg^{-1} von den übrigen Konzentrationen zu unterscheiden, jedoch nicht innerhalb der verschiedenen Konzentrationsniveaus (Abb. 9C). Bei der Analyse der Infektionsmethode „benetzt“ mit ungemahlene Proben war es nicht möglich, die Kontaminationsniveaus zu unterscheiden (Abb. 9D).

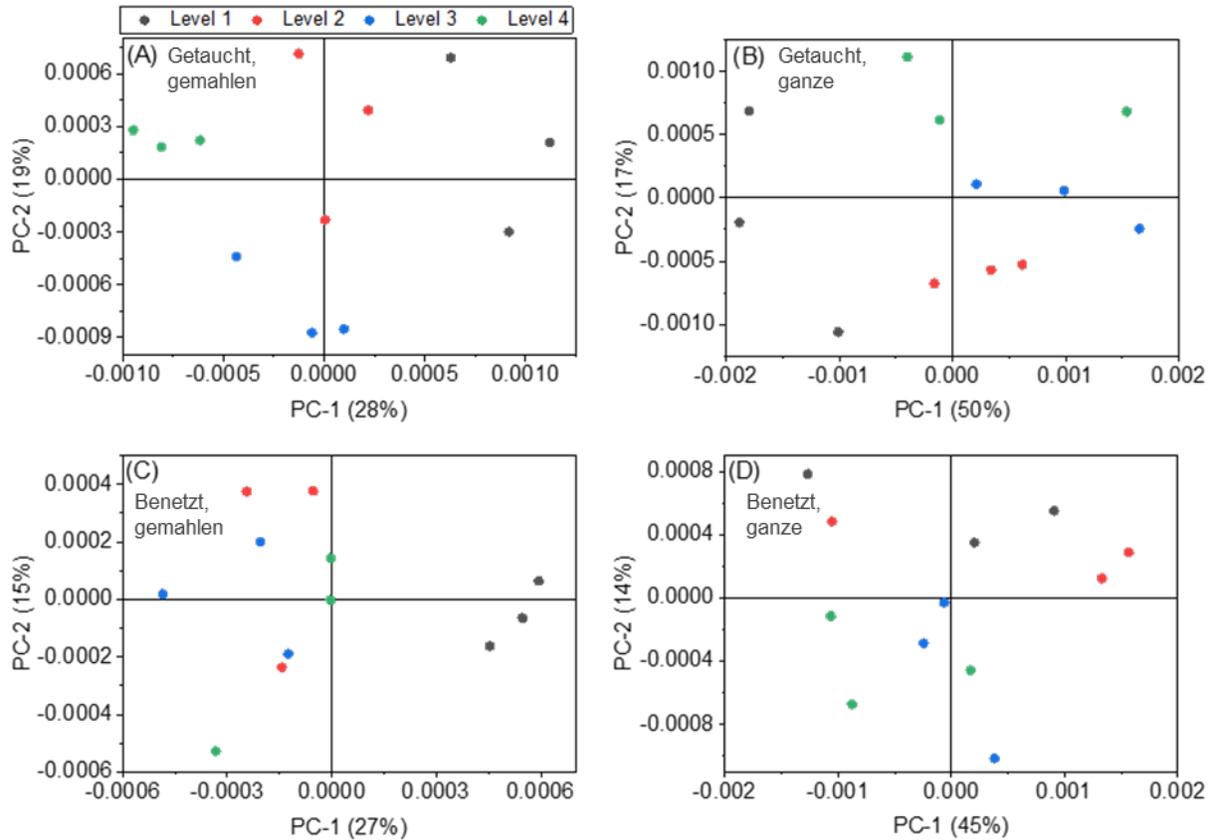


Abbildung 9. Hauptkomponentenanalyse (PCR) von infiziertem Mais mit vier verschiedenen FB_1 Konzentrationsniveaus, analysiert auf einem semiportablen NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Körner.

Bei der Entwicklung des Kalibrierungsmodells unter Verwendung des Labor NIRS wurde das beste Ergebnis mit gemahlene Maiskörnern und der Infektionsmethode „benetzt“ erzielt (Abbildung 10C). Dies wird durch das beste R^2 der Validierung (0,79), den niedrigsten mittleren Standardfehler der Kreuzvalidierung (RMSECV) von 0,84 und den niedrigsten Standardfehler der Kreuzvalidierung (SEC) von 0,88 bestimmt. Es war nicht möglich, eine zuverlässige Kalibrierungsmethode bei ganzen Körnern und Infektionsmethode „benetzt“ zu erhalten (Abb. 10D). Tabelle 4 zeigt die Regressionsfunktionen, die zur Qualitätsbestimmung des Vorhersagemodells abgeleitet wurden.

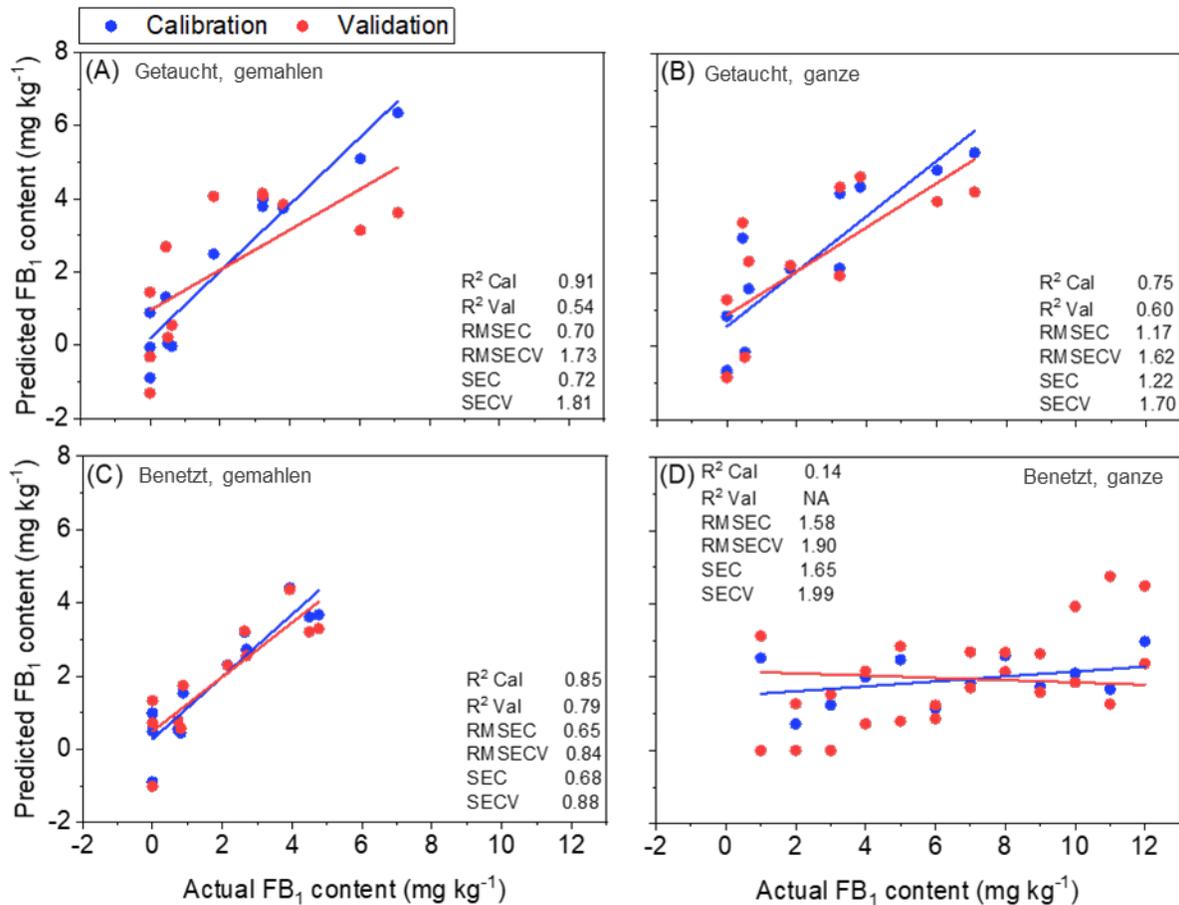


Abbildung 10. Regression (PLS) von kontaminiertem Mais mit vier verschiedenen FB₁ Konzentrationsniveaus, analysiert auf einem Labor-NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Körner.

Tabelle 4. Regressionsfunktionen und Fit von FB₁-infiziertem Mais, analysiert mit einem Labor-NIRS.

Infektionsmethode & Probentyp	Regressionsgleichung Kalibrierung	R²	Regressionsgleichung Validierung	R²
Getaucht				
Gemahlen	$y=0.9131x + 0.1938$	0.9131	$0.5495x + 0.9578$	0.5438
Ganzes Korn	$y=0.7527x + 0.5517$	0.7527	$y=0.6008x + 0.8543$	0.6013
Benetzt				
Gemahlen	$y=0.8526x + 0.2833$	0.8526	$y=0.7420x + 0.4994$	0.7942
Ganzes Korn	$y=0.1387x + 1.6558$	0.1387	$y=-0.0592x + 2.0860$	NA

Die beste Kalibrierung, die bei Mais mit dem semiportablen NIRS ermittelt wurde, erfolgte bei gemahlene Körnern unter Verwendung der Infektionsmethode „getaucht“, mit einem R² von 0,74, einem RMSECV von 1,30 und einem SECV von 1,33 (Abb. 11A). In diesem Fall war die Infektionsmethode „benetzt“ zur Erstellung eines guten Modells nicht geeignet (Abb. 11C und 11D). In Tabelle 5 finden sich die Regressionsfunktionen, die zur Bestimmung der Qualität des Vorhersagemodells verwendet wurden.

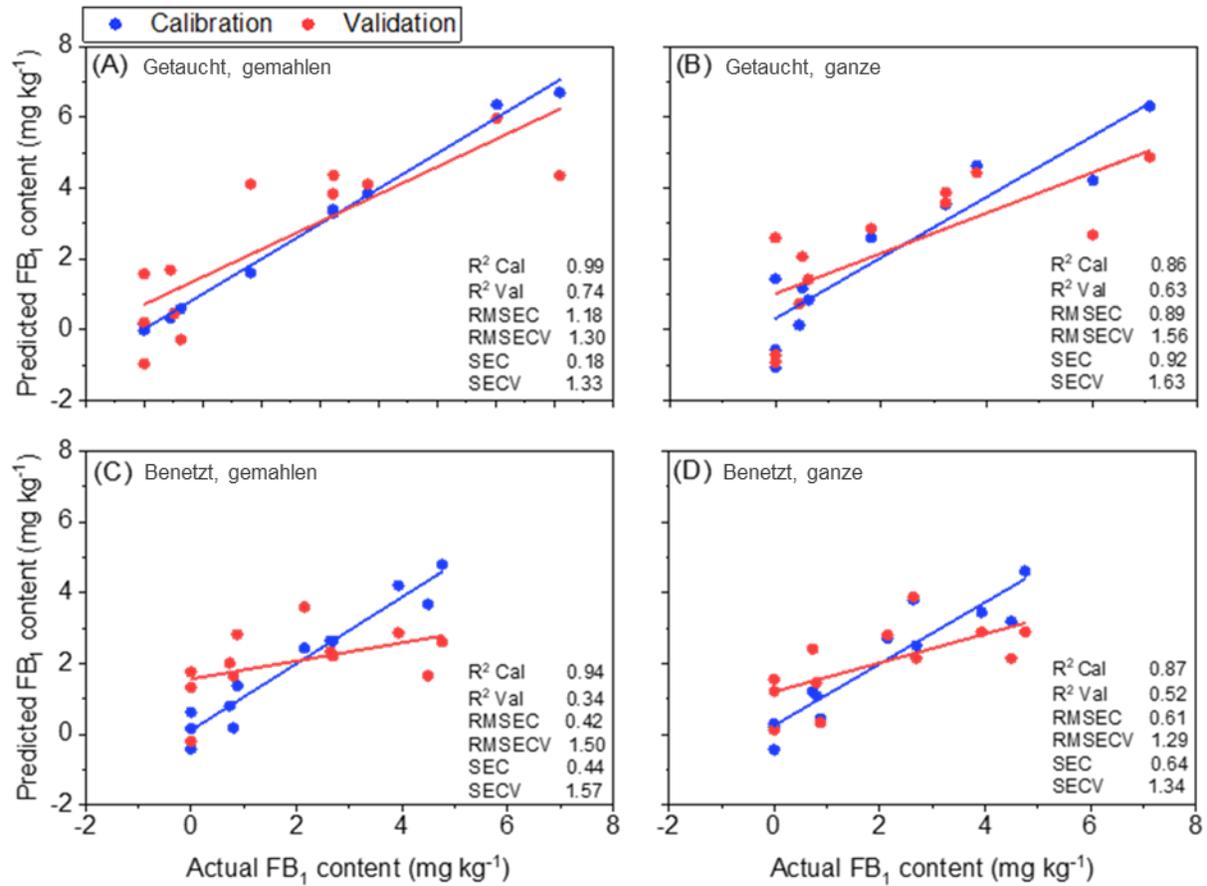


Abbildung 11. Regressionsmodell (PLS) von kontaminiertem Mais mit vier verschiedenen FB_1 Konzentrationsniveaus, analysiert mit dem semi-portablem NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Körner.

Tabelle 5. Regressionsfunktion und Fit von FB₁-infiziertem Mais, analysiert mit dem semi-portablen NIRS

Infektionsmethode & Probenotyp	Regressionsgleichung Kalibrierung	R²	Regressionsgleichung Validierung	R²
Getaucht				
Gemahlen	$y=0.9940x + 0.0133$	0.9940	$y=0.7782x + 0.7127$	0.7425
Ganzes Korn	$y=0.8576x + 0.3177$	0.8576	$y=0.5705x + 1.0167$	0.6286
Benetzt				
Gemahlen	$y=0.9399x + 0.1154$	0.9399	$y=0.2560x + 1.5609$	0.3409
Ganzes Korn	$y=0.8706x + 0.2485$	0.8706	$y=0.4081x + 1.2020$	0.5201

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse, die für die PCA von Bohnen mit dem Laborspektrometer erzielt wurden. Die Infektionsmethode „benetzt“ und das Mahlen der Körner lieferten die besten Ergebnisse, wobei eine klare Trennung zwischen den Konzentrationsniveaus besteht (Abb. 12C). Die Untersuchung der vollständigen Körner ermöglicht keine Unterscheidung innerhalb der Konzentrationsstufen (Abb. 12B und 12D).

4.5 Ergebnisse der optischen Analyse für FB₁ kontaminierte Bohnen

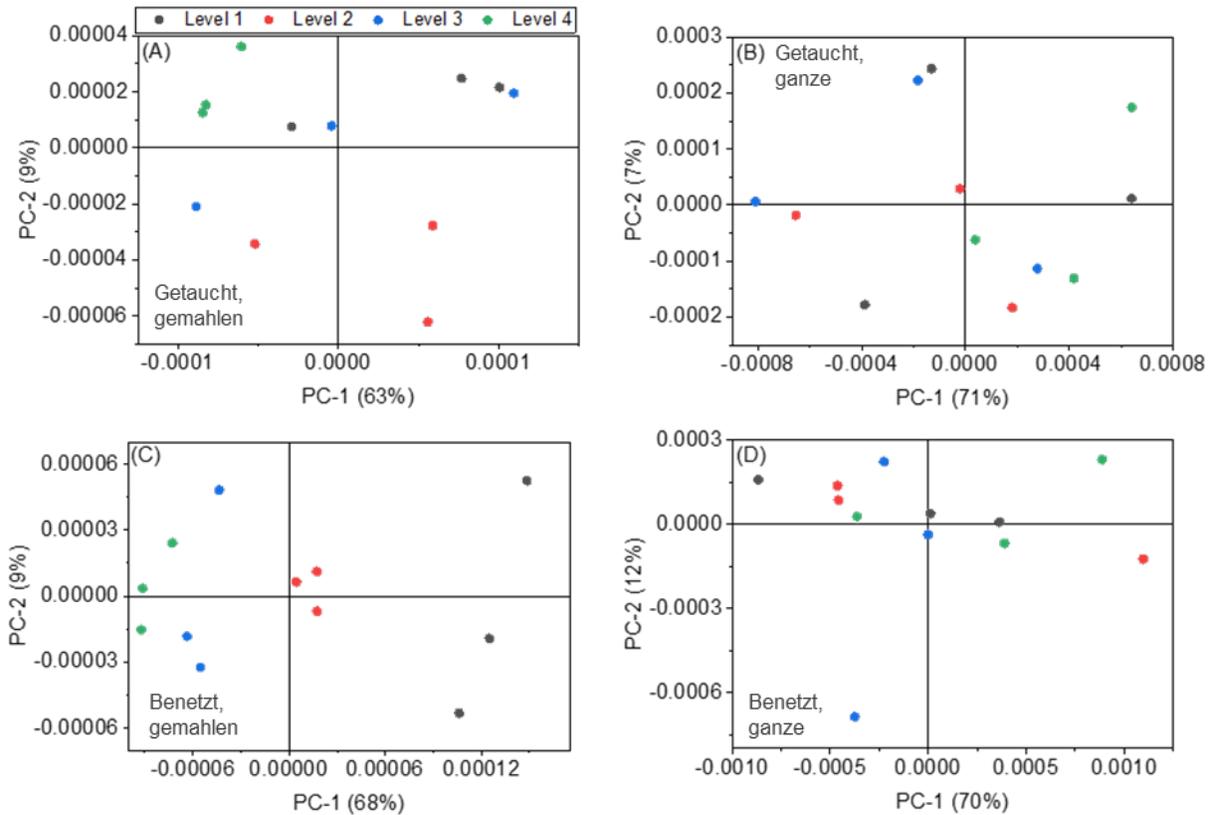


Abbildung 12. Hauptkomponentenanalyse von infizierten Bohnen mit vier verschiedenen FB₁ Konzentrationsniveaus, die auf einem Labor-NIRS analysiert wurden. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Kerne.

Das beste Ergebnis wurde bei gemahlene Bohnen mit dem semi-portablen NIRS in Kombination mit der Infektionsmethode „benetzt“ erzielt. Stufe 1 (0 mg kg^{-1}) lässt sich von den übrigen Kontaminationsniveaus unterscheiden, die verschiedenen kontaminierten Proben zeigen jedoch keinen Unterschied (Abb. 13C). Dasselbe gilt für ganze Körner, die mit Infektionsmethode „benetzt“ infiziert wurden (Abb. 13D).

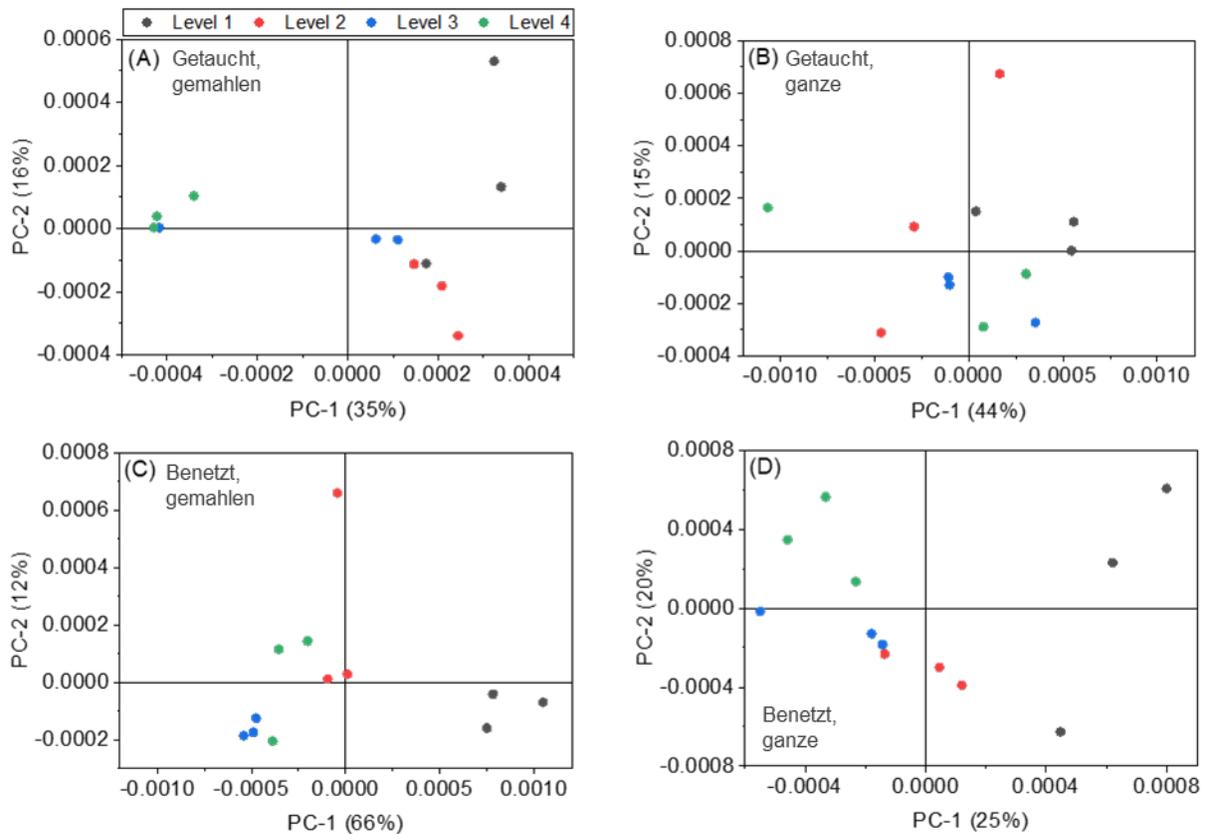


Abbildung 13. Hauptkomponentenanalyse von infizierten Bohnen mit vier verschiedenen FB_i Konzentrationsniveaus analysiert mit dem semi-portablen NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Kerne.

Bei der Kalibrierungsmethode wurde das beste Ergebnis für Bohnen unter Verwendung des Labor NIRS erzielt, wenn diese gemahlen und die Infektionsmethode „benetzt“ (R^2 0,95, RMSECV 0,75 und SECV 0,78) angewandt wurde (Abb. 14C). Die Verwendung der ganzen Körner führte zu keinem guten Kalibrierungsmodell (Abb. 14B und 14D). Die Regressionsfunktionen sind in Tabelle 6 dargestellt.

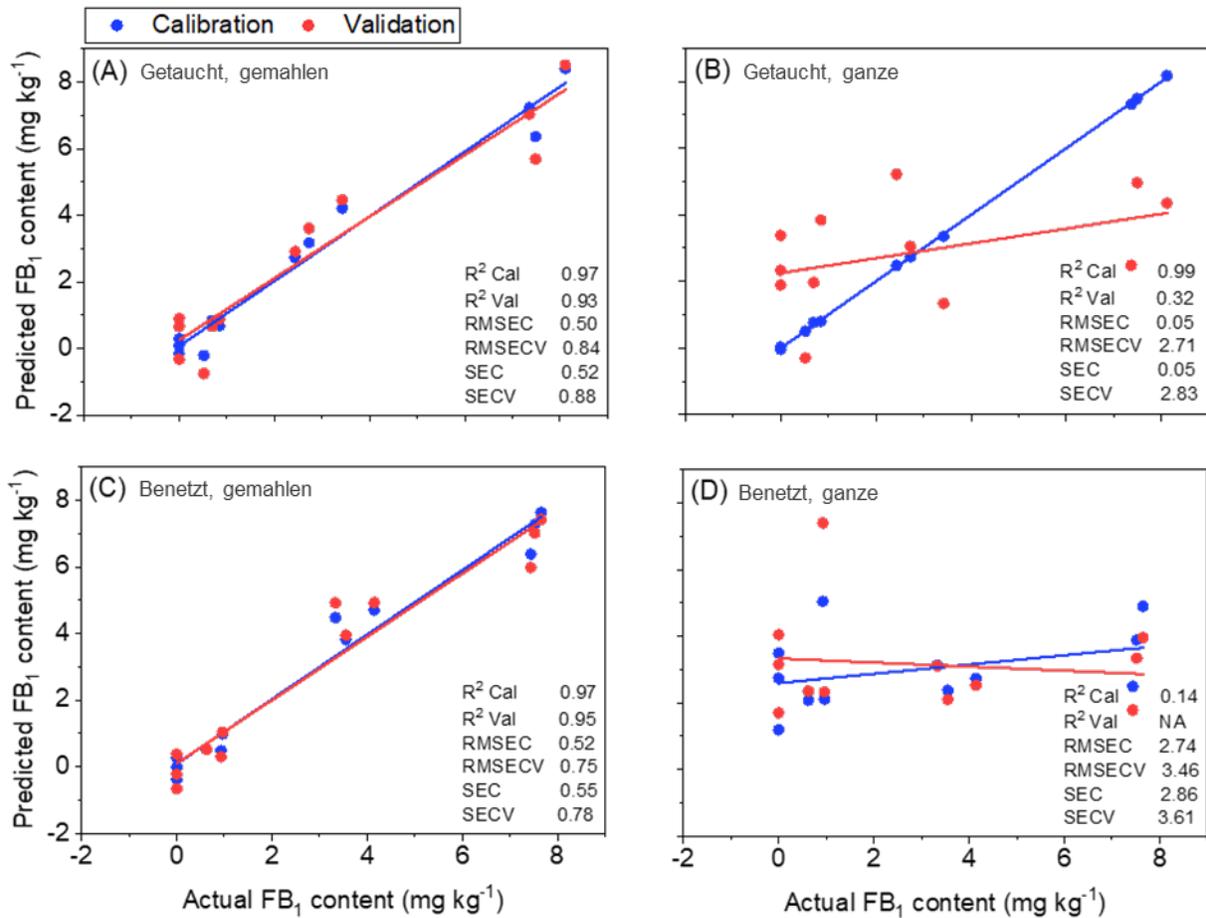


Abbildung 14. Regression (PLSR) von kontaminierten Bohnen mit vier verschiedenen FB_1 Konzentrationsniveaus, welche auf einem Labor-NIRS analysiert wurden. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Kerne.

Tabelle 6. Regressionsfunktionen und Fit von FB₁-infizierten Bohnen, die mit einem Labor-NIRS analysiert wurden

Infektionsmethode & Probentyp	Regressionsgleichung Kalibrierung	R²	Regressionsgleichung Validierung	R²
Getaucht				
Gemahlen	$y=0.9725x + 0.0767$	0.9725	$y=0.9257223x + 0.2552$	0.9337
Ganzes Korn	$y=0.9997x + 0.0006$	0.9997	$y=0.2220x + 2.2515$	0.3163
Benetzt				
Gemahlen	$y=0.9686x + 0.0946$	0.9686	$y=0.9498x + 0.1047$	0.9459
Ganzes Korn	$y=0.1388x + 2.5963$	0.1388	$y=-0.0604x + 3.3326$	NA

Die Kalibrierungsergebnisse für Bohnen mit dem semi-portablen NIRS sind in Abbildung 15 dargestellt. Das beste Ergebnis wurde mit der Infektionsmethode „getaucht“ und gemahlene Körnern (R² 0,78, RMSECV 1,54 und SECV 1,60) erzielt (Abb. 15A). Tabelle 7 zeigt die Regressionsfunktionen.

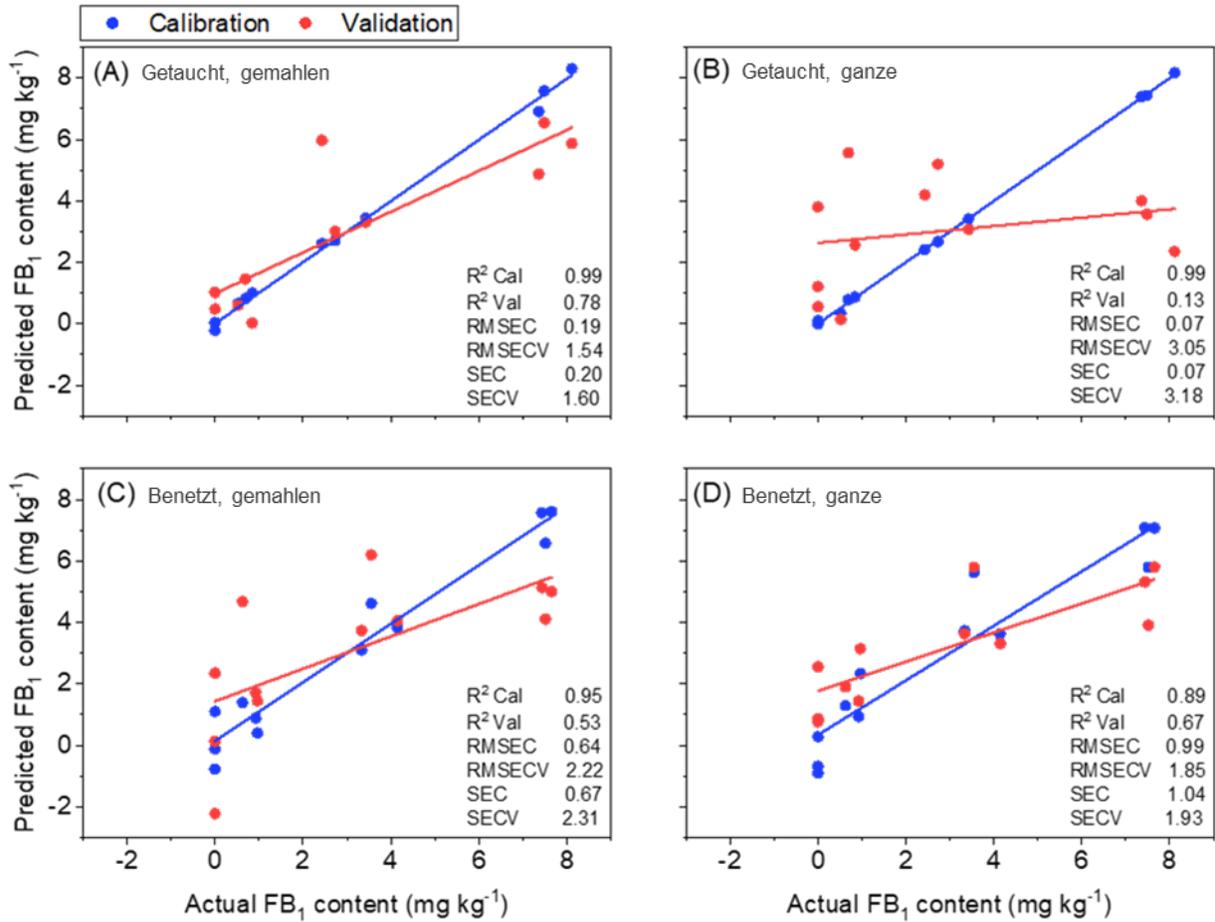


Abbildung 15. Partielle Regression der kleinsten Quadrate von infizierten Bohnen mit vier verschiedenen FB_1 Konzentrationsniveaus, analysiert mit dem semi-portablen NIRS. (A) und (B) entsprechen der Infektionsmethode „getaucht“, (C) und (D) „benetzt“. (A) und (C) zeigen die gemahlene Proben, (B) und (D) ganze Kerne.

Tabelle 7. Regressionsfunktionen und Fit von FB₁-infizierten Bohnen, analysiert mit einem semiportablen NIRS

Infektionsmethode & Probentyp	Regressions- gleichung Kalibrierung	R²	Regressionsgleichung Validierung	R²
Getaucht				
Gemahlen	$y=0.9960x + 0.0110$	0.9960	$0.6647x + 0.9865$	0.7806
Ganzes Korn	$y=0.9993x + 0.0017$	0.9993	$0.1370x + 2.6332$	0.1321
Benetzt				
Gemahlen	$y=0.9526x + 0.1428$	0.9526	$y=0.5265x + 1.4389$	0.5267
Ganzes Korn	$y= 0.8867x + 0.3414$	0.8867	$y=0.4734 + 1.7756$	0.6684

Nachdem die Kalibrierungsmodelle berechnet wurden, können mehrere Parameter herangezogen werden, um die relevanten Wellenlängen zu identifizieren, die das Modell beeinflussen. Wie vorhergegangen in Abbildung 9C gezeigt, wurde dabei das beste Ergebnis für das Kalibrierungsmodell bei Mais erreicht. Das Modell besteht aus einem Faktor und zeigt die besten Parameter; daher wurde es für die wichtige Wellenlängenidentifizierung ausgewählt. Die Analyse wurde mit der „X-Belastungsgewichtskurve“ durchgeführt. Dieses Ergebnis beschreibt, welche Bereiche in "x" (in unserem Fall die Wellenlängen) am meisten mit der Vorhersage von "y" (FB₁-Konzentration) zusammenhängen (Abb. 16).

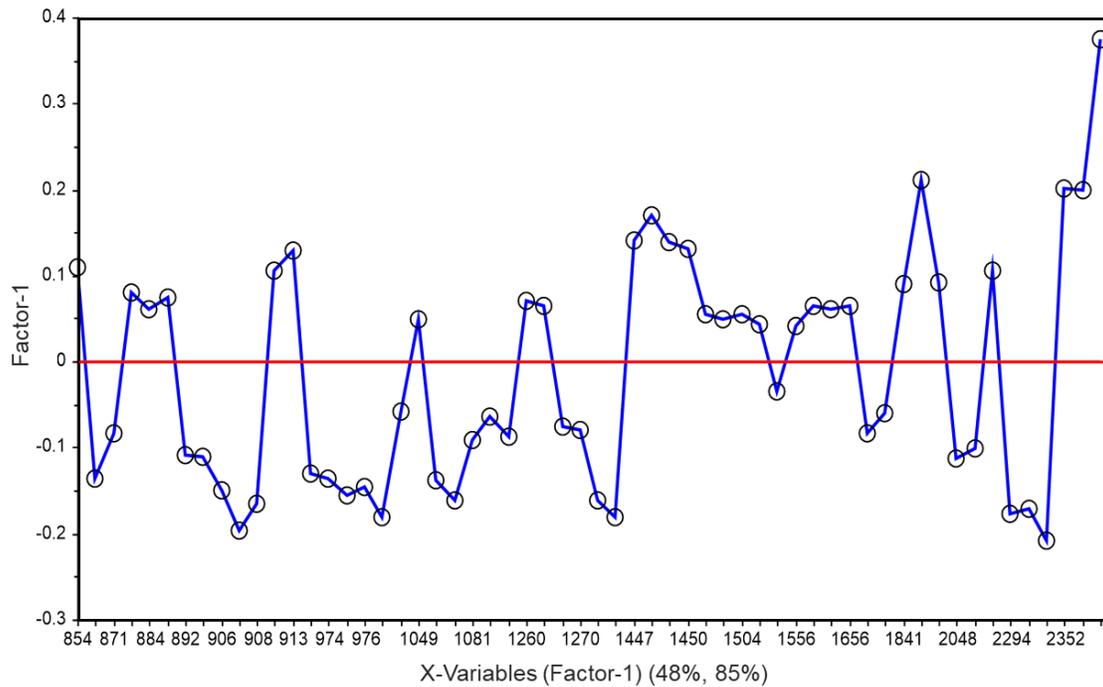


Abbildung 16. Relevante Wellenlängen für die Vorhersage des FB₁-Gehalts in gemahlenem Mais.

Aus dem Diagramm der X-Belastungsgewichte wurden die weiter von der Basislinie entfernten Peaks ausgewählt. Diese Wellenlängen haben den größten Einfluss auf die Varianz des Modells. Tabelle 8 zeigt die ausgewählten Wellenlängen sowie die Bindungsvibration und die mögliche Strukturbeschreibung nach Osborne, Fearn, and Hindle (1993). Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass den Wellenlängen 1260, 1262, 1298 und 1875 keiner Struktur zugeordnet werden konnten. Es ist möglich, dass diese Wellenlängen mit der Fumonisinstruktur in Zusammenhang stehen.

Tabelle 8. Relevante Wellenlängen in Verbindung mit der möglichen Struktur von FB₁-infiziertem Mais im Vorhersagemodell

Relevant wavelength in our study	Zugehörige Wellenlänge aus der Literatur	Chemical bond vibration	Associated structure
854	844	RCH=CH ₂ , C=CH ₂	-
870	879	CH ₃ asym	-
884	880	C-H str. third overtone	Benzene and CHCl ₃
907	910	C-H str. third overtone	Protein
913	913	C-H third overtone	CH ₂
977	980	O-H str. second overtone	ROH, H ₂ O
1049	1053	2 × C-H str. + 2 × C-H def. + (CH ₂) _n	CH ₂
1057	1060	N-H str. second overtone	RNH ₂
1448	1450	O-H str. First overtone	Starch, H ₂ O
2048	2050	N-H sym. str.+ amide II, N-H sym. str.+ amide III	Protein, CONH ₂
2123	2132	N-H str. + C=O str.	Amino acid
2294	2294	N-H str. + C=O str.	Amino acid
2317	2310	C-H str. + C-H def.	CH ₂
2352	2352	C-H def. second overtone	Cellulose
2490	2488	C-H str. + C-C str.	Starch

Asym.: asymmetric

Sym.: symmetric

Str.: stretch

Def.: deformation

Die gleiche Analyse zur Ermittlung der relevanten Wellenlängen wurde für die Bohnen-Daten durchgeführt. In diesem Fall ist das gewählte Modell in Abbildung 13C dargestellt und zeigt die Messung der gemahlten Bohnenproben mit dem Labor NIRS und der Infektionsmethode „benetzt“. Das Modell zur Vorhersage des FB₁-Gehalts setzt sich in diesem Fall aus drei Faktoren zusammen. Abbildung 17 zeigt das X-Belastungsdiagramm der ersten beiden Faktoren.

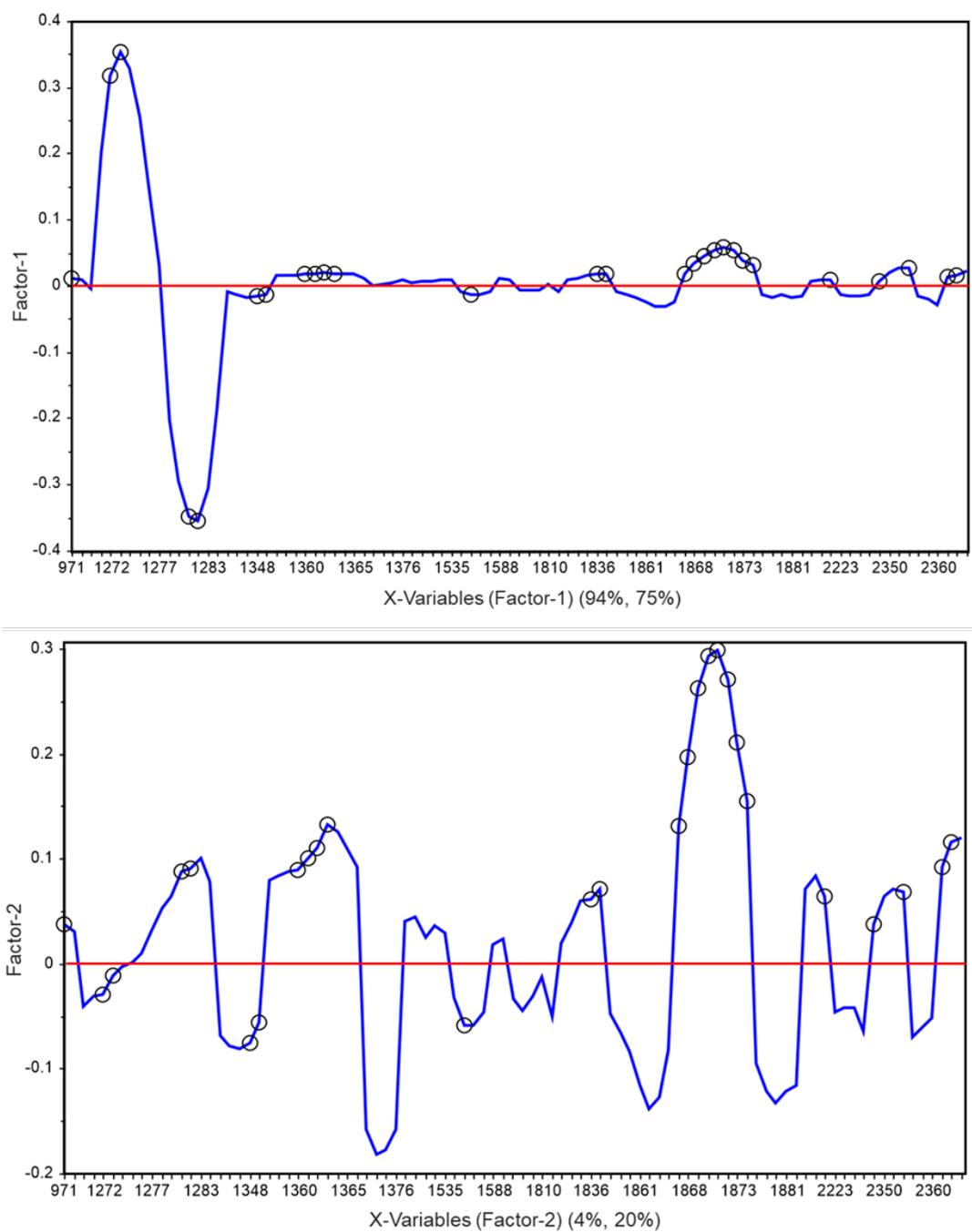


Abbildung 17. Relevante Wellenlängen zur Vorhersage des FB_1 -Gehalts in gemahlene Bohnen.

Die relevanten Wellenlängen, die aus dem X-Belastungsdiagramm ausgewählt wurden, sind in Tabelle 9 dargestellt. Folgende Wellenlängen konnten keiner Struktur zugeordnet werden: 1266,

1273, 1279, 1282, 1283, 1347, 1374, 1376, 1834, 1837, 1862, 1867, 1871, 1880, 1881, 2214, 2223, 2228.

Tabelle 9. Relevante Wellenlängen im Zusammenhang mit der möglichen Struktur im Vorhersagemodell für FB₁-infizierte Bohnen

Relevante Wellenlänge gemessen	Zugehörige Wellenlänge aus der Literatur	Chemische Bindungsschwingung	Zugehörige Struktur
1363	1360	2 × C-H str. + C-H def.	CH ₃
1519	1520	O-H str. first overtone	CONH ₂
1564	1570	N-H str. first overtone	-CONH-
1775	1780	C-H str. first overtone	Cellulose
1904	1900	O-H str. + 2 × C-O str., C=O str. second overtone	Starch, -CO ₂ H
2351	2352	C-H def. second overtone	Cellulose
2460	2461	C-H str. + C-C str.	Starch

Str.: stretch

Def.: deformation

Die Ergebnisse der Analyse von Mais und Bohnen zeigten ein konsistentes Verhalten in den wichtigen Wellenlängen. In beiden Fällen zeigten die Wellenlängen in den Bereichen von 1260-1300 nm und von 1834-1875 nm Ergebnisse, bei denen keine Struktur assoziiert werden konnte (Abb. 18). Diese Bereiche müssen weiter untersucht werden, um eine Assoziation mit dem FB₁-Molekül zu bestätigen.

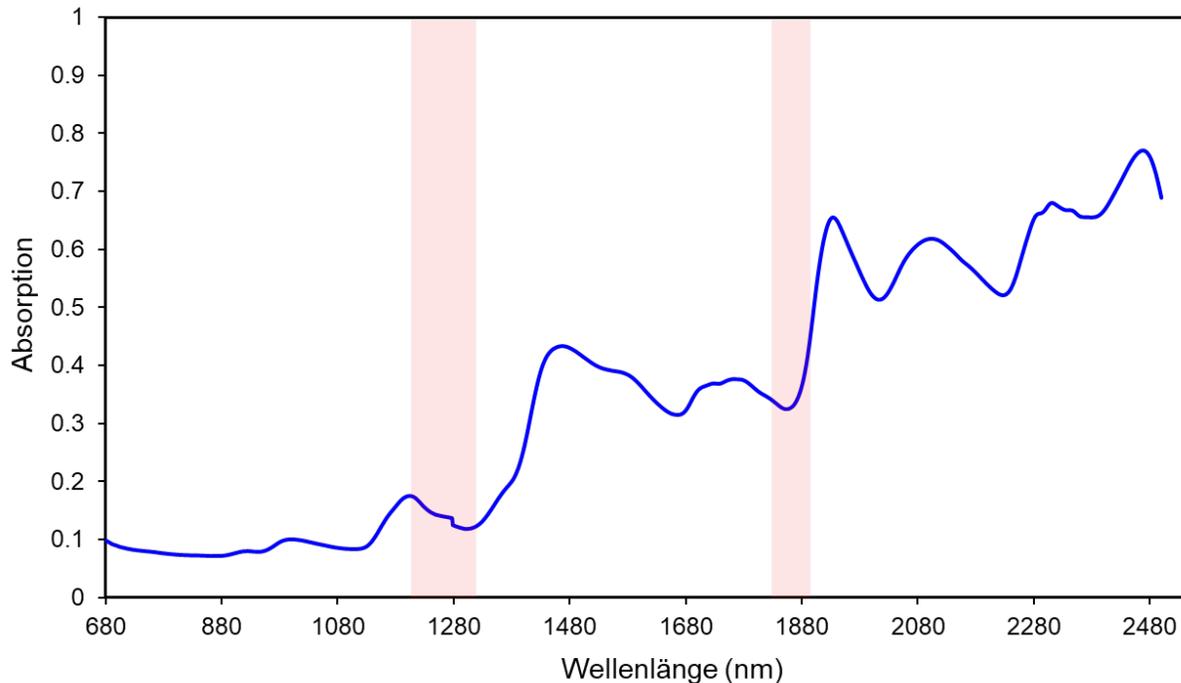


Abbildung 18. Spektren von gemahlenem Mais mit wichtigem Wellenlängenbereich. Die Schattierungen in der Darstellung stellen die wichtigen Wellenlängen in Bezug auf Fumonisin B1 dar.

4.6 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Die beste Infektionsmethode von FB₁ in Maiskörnern wurde mit dem ersten Kontaminations-Verfahren (Infektionsmethode getaucht) erreicht, bei dem die Körner vollständig von der Lösung bedeckt waren. Im Gegensatz dazu war die beste Methode für Bohnen die zweite, bei der 10 µl auf jeder Seite des Kornes aufgetragen wurden.

Die Verwendung eines Labor-NIRS ergab, wie zu erwarten, bessere Kalibriermodelle als die des semi-portablen. Es ist jedoch wichtig zu bedenken, dass auch die semi-portable Variante bei der PCA vielversprechende Ergebnisse lieferte. Diese Ergebnisse könnten unter Verwendung von weiteren Untersuchungen weiter verbessert werden. Des Weiteren kann ein modifizierter Probenbehälter helfen, von außen einfallendes Licht zu blockieren, was zu robusteren Ergebnissen führen kann.

In beiden Fällen führte die Verwendung von gemahlenem Material zu besseren Ergebnissen. Dies kann auf die Homogenität des Materials zurückzuführen sein, die dazu beiträgt, die Streueffekte zu reduzieren. Insgesamt lieferten Bohnen ein robusteres Modell als Mais.

Die in dieser Forschung erzielten Ergebnisse zeigen einen vielversprechenden Ansatz zum Nachweis von Fumonisin B1 in Mais- und Bohnenkörnern. Es wurde festgestellt, dass gemahlene Proben bessere Ergebnisse liefern als ganze Kerne. Auch wenn dies die Zerstörung der Probe bedeutet, ist die Analyse einfacher und schneller durchzuführen als eine herkömmliche Laboranalyse, bei der Chemikalien und andere Verbrauchsmaterialien zur Durchführung benötigt werden. Um das Kalibrierungsmodell zu verbessern, sollte eine höhere Anzahl von Proben und unterschiedliche Konzentrationen getestet werden.

Andererseits ist es nach wie vor notwendig, das Kalibrierungsmodell mit natürlich kontaminierten Proben zu testen. Hierzu können die Körner mit *Fusarium verticillioides* infiziert und anschließend der Mykotoxingehalt analysiert werden. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass auf diese Weise eine neue Variable in das System eingeführt wird (die Pilzanwesenheit), die die Spektren verändern kann. Infolgedessen muss das Modell möglicherweise verfeinert werden, um das Mykotoxin und den Pilz nachzuweisen.

Obwohl die Mais- und Bohnenproben mit dem selben Verfahren infiziert wurden, zeigte sich, dass die Ergebnisse je nach Kultur variieren. Daher sollte bei der Anwendung dieser Technik auf neue Kulturen oder Matrizen ein neues Validierungs- und Nachweismodell entwickelt werden.

5 Nutzung Hyperspektraler Verfahren

Die hyperspektrale Bildgebung kombiniert Bildaufnahmen mit Spektroskopie, d.h. es ist möglich, eine Probe gleichzeitig räumlich und chemisch zu analysieren. Bei einem hyperspektralen Bild enthält jeder Pixel spektrale Informationen. So entsteht ein Hypercube oder Datenwürfel, der aus zwei räumlichen Dimensionen und einer dritten, den Spektren, besteht (Abb. 19).

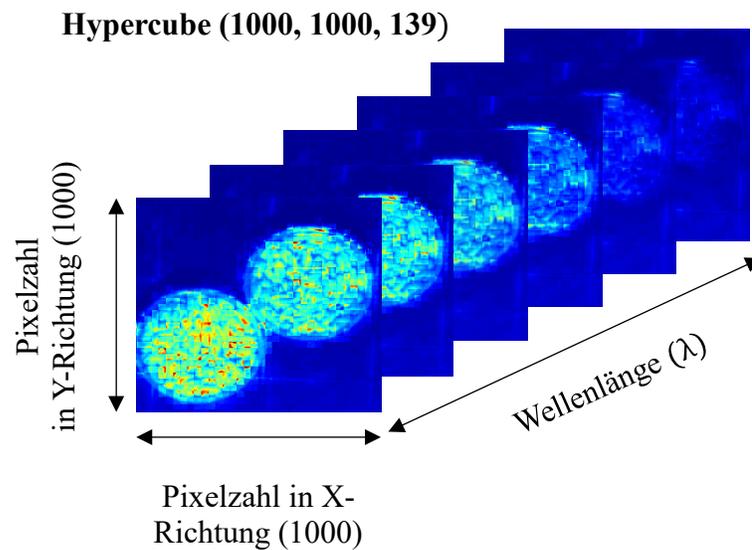


Abbildung 19. Hyperspektraler Würfel einer Weizenprobe, bestehend aus zwei räumlichen Dimensionen (y und x) sowie der dritten Dimension mit der Spektralinformation.

Der räumliche Vorteil kann mit der traditionellen Spektralanalyse nicht erreicht werden, da eine Probe, in unserem Fall eine Probe von ganzen oder gemahlten Körnern, als Mittelwert analysiert wird. Daher könnte die hyperspektrale Bildgebung den Vorteil bieten, einzelne kontaminierte Körner zu erkennen um diese zu entfernen. Abbildung 20 zeigt, wie die Markierung der Pixel auf einer Maisprobe zu unterschiedlichen Reflexionsprozentsätzen führt.

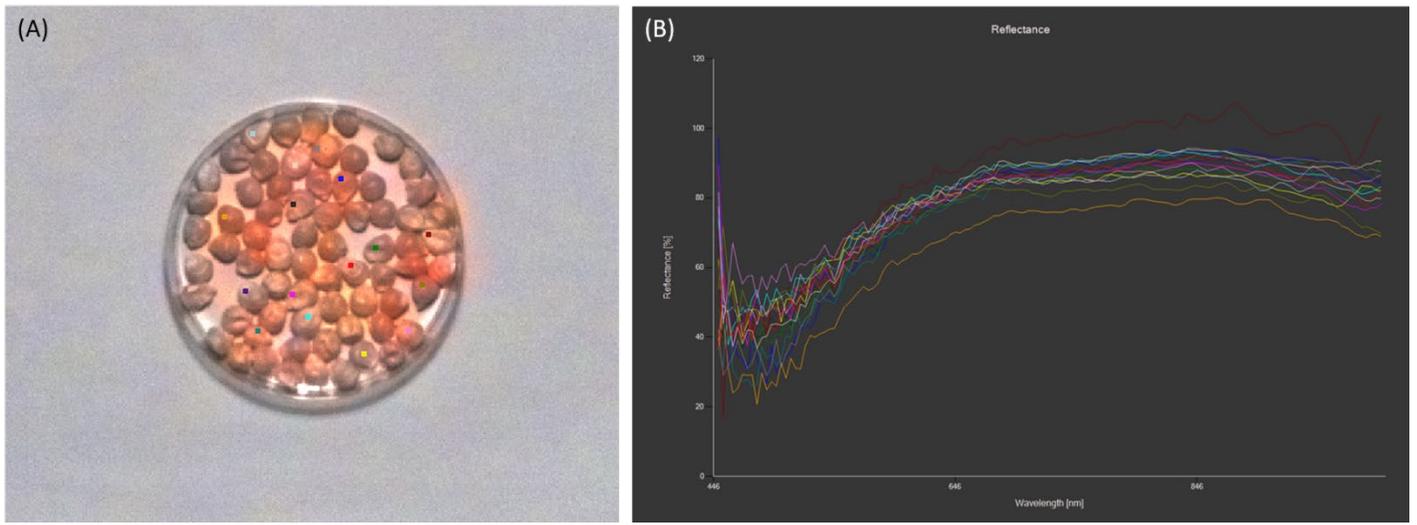


Abbildung 20. Maiskörner, die mit einer Hyperspektralkamera aufgenommen & analysiert wurden. (A) Von der Kamera aufgenommenes Bild (verschiedenfarbigen Punkte repräsentieren die Pixelauswahl); (B) durch die Pixelauswahl festgelegte Spektren

Von besonderem Interesse ist es, Pilzinfektionen in Körnern nachzuweisen, die durch den Erreger *Fusarium spp.* verursacht werden. In diesem Fall liegt die Wellenlänge der im Labor verfügbaren Kamera bei 450-950 nm, also einem Teil des sichtbaren Spektrums. Daher kann die Farbe des Materials einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, die wir analysieren. Abbildung 21 stellt den Standardaufbau für die hyperspektrale Erfassung im optischen Labor dar.

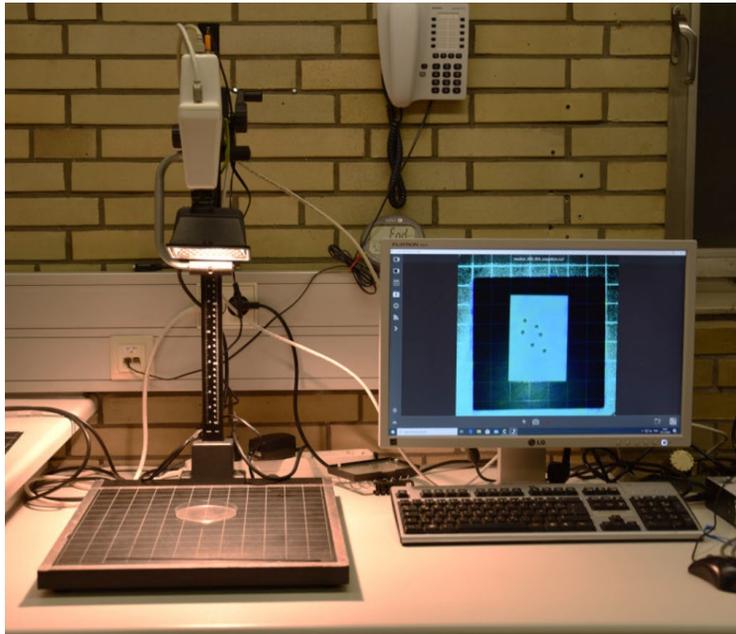


Abbildung 21. Aufbau der stationären, experimentellen hyperspektralen Bilderfassung im optischen Labor des Institutes. Es können verschiedene Kameras mit unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt werden.

6 Entwicklung eines portablen, kostengünstigen Detektors

Die Entwicklung eines kostengünstigen Detektors, der den schnellen Nachweis von Mykotoxinen ermöglicht, ist ein übergeordnetes Ziel. Der „ToxiAnalyzer“ ist ein Entwurf in kleinem Maßstab (600 x 535 x 535 mm), der ein Echtzeit- und Hochgeschwindigkeitsscreening von Mykotoxinen in Produkten ermöglichen soll. Er wird am Institut für Agrartechnik der Universität Hohenheim entwickelt. Der Aufbau ist wie folgt: Eine Bildkamera mit verschiedenen optischen Filtern, die den in den Versuchen identifizierten Wellenlängen angepasst sind, einem Beleuchtungssystem mit zwei 150-W-Wolfram-Halogenlampen, die in einem Winkel von 45° angeordnet sind, einem Bildschirm (300 x 510 mm), der per Touch die Bildaufnahme steuert, wie z.B. Belichtungszeit, den Wellenlängenbereich und die Auswertefunktionen. Für den Datenabruf ist ein SD-Cardreader oder ein USB-Flash-Laufwerk-Port in das Displaygehäuse integriert. Das Gehäuse des ToxiAnalyzer besteht aus einem Aluminiumrahmen, der für die Stabilität und Haltbarkeit des

Systems garantiert. Die Probe wird unter Abschluss des Umgebungslichtes in einer Dunkelkammer platziert, um jegliches Streulicht zu vermeiden, das die Ergebnisse beeinträchtigen könnte. Die zu testende Probe wird in einem Quarzbehälter ($\varnothing=100$ mm) in den Analyzer eingebracht. Im unteren Teil des Analyzers befinden sich das Controller-Board, ein Microcomputer, sowie Axiallüfter um die Temperatur in den vorgegebenen Limits zu halten (Abb. 22).

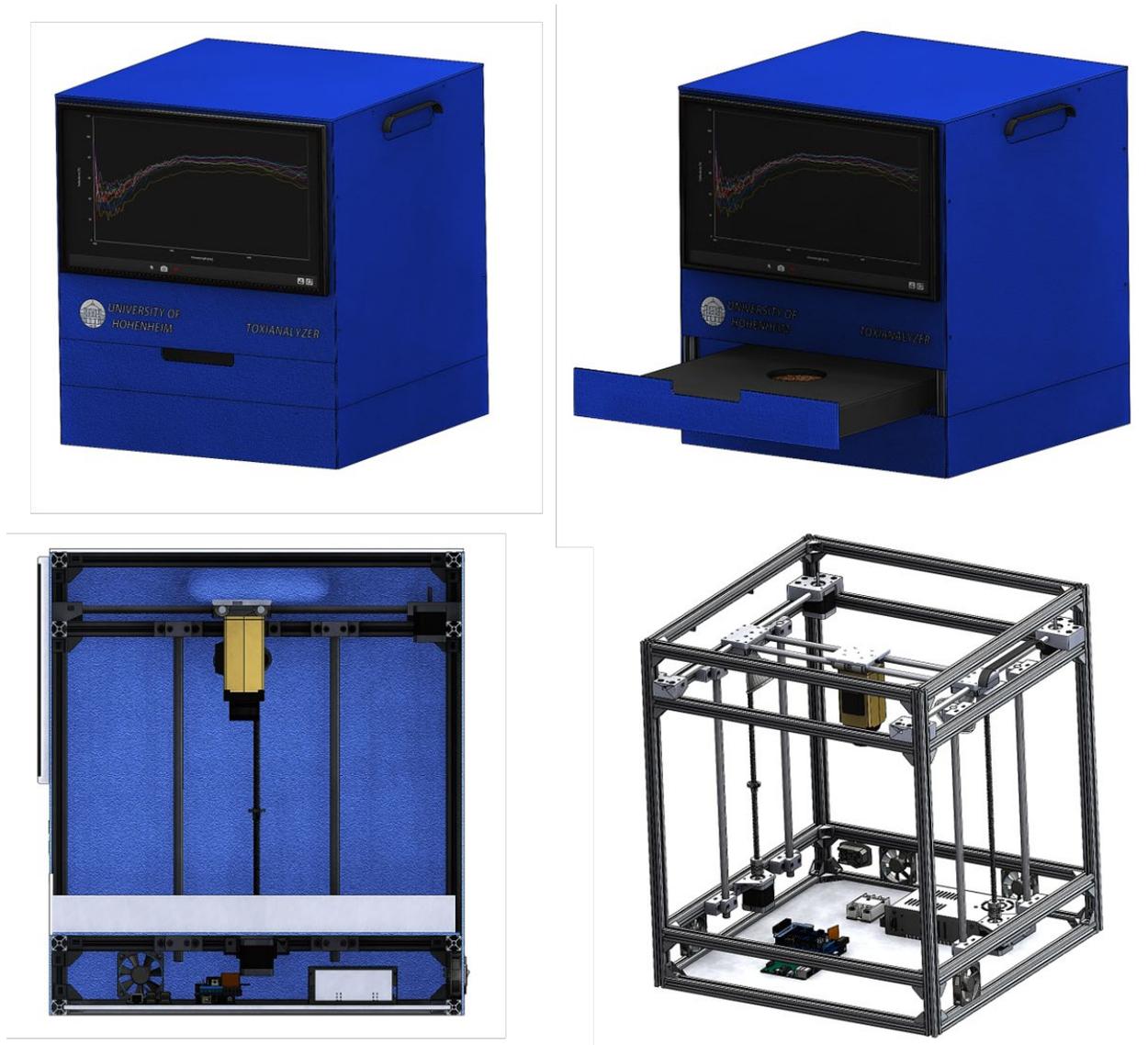
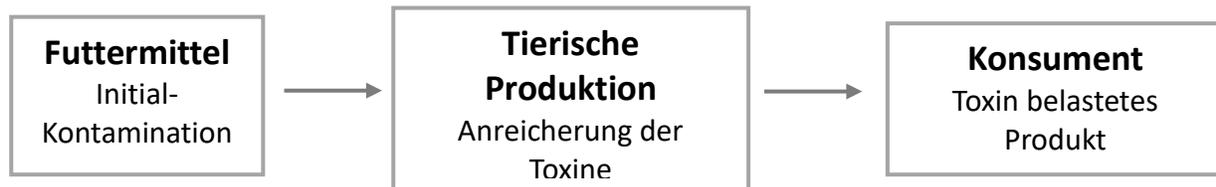


Abbildung 22. CAD Konstruktionszeichnungen des portablen ToxiAnalyzer (1.1).

7 Diskussion und Einordnung der Projektergebnisse

Tierische Erzeugnisse, wie Fleisch oder Milchprodukte, sind anfällig für die Anreicherung von Mykotoxinen. Diese Kontamination kann durch das an die Tiere verfütterte Futter in Nahrungsmittel gelangen, wie die folgende Prozesskette beispielhaft zeigt.



Die in dem Projekt gewonnenen Ergebnisse leisten einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung und Etablierung einer zerstörungsfreien Schnelltestmethode für Mykotoxine. Die Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, dass es möglich ist, Mykotoxine in den Konzentrationsbereichen nachzuweisen, in denen nasschemische Standardanalysen in der Praxis angewendet werden. Die entwickelte Methodik nutzt repräsentative Futtermittel- oder Getreideproben, die unter kontrollierten Bedingungen analysiert werden, um ein robustes Kalibrierungsmodell zu erstellen. Darüber hinaus ermöglicht diese Methodik die Identifizierung relevanter Wellenlängen, die mit dem untersuchten Mykotoxin assoziiert sein können.

Im Rahmen des Projekts wurde diese Methode mit zwei grundlegend unterschiedlichen Matrizen validiert um ein breites potentiell Einsatzspektrum zu evaluieren. Es bleibt anzumerken, dass unter bestimmten Bedingungen noch eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Produkt- und Umweltparametern besteht. Daher besteht die Notwendigkeit, die Technik weiter zu verfeinern um sie weniger sensibel gegenüber äußeren Einflüssen und Produkteigenschaften zu machen. Dazu sind weitere Versuche mit auf natürliche Weise kontaminierten Proben notwendig, d.h. Proben, die mit Mykotoxin produzierenden Pilzen befallen wurden und so Mykotoxine in höheren Dosen entwickelt haben.

Darüber hinaus wurde ein erster Entwurf für einen tragbaren, kostengünstigen Detektor entwickelt. Diese Technik bietet zukünftig den möglichen Vorteil, dass verschiedene Analysen gleichzeitig durchgeführt werden können. So könnte beispielsweise der Nachweis von Mykotoxinen mit der Bestimmung der Produkteigenschaften (z. B. Proteingehalt) oder von Spurenelementen gekoppelt werden und so eine umfassende Analyse des Probenzustands ermöglicht werden. Diese

verschiedenen, vorhergehend genannten weiterführenden Versuche sind Bestandteil laufender Forschung am Institut.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Der Klimawandel birgt ein großes Risiko für das verstärkte Auftreten von Mykotoxinen in der Agrarischen Wertschöpfungskette. Wie in Abbildung 23 gezeigt, kann bereits ein Anstieg der Temperatur um 2 °C das Risiko von Aflatoxin-Kontamination in Mais in Europa erheblich erhöhen.

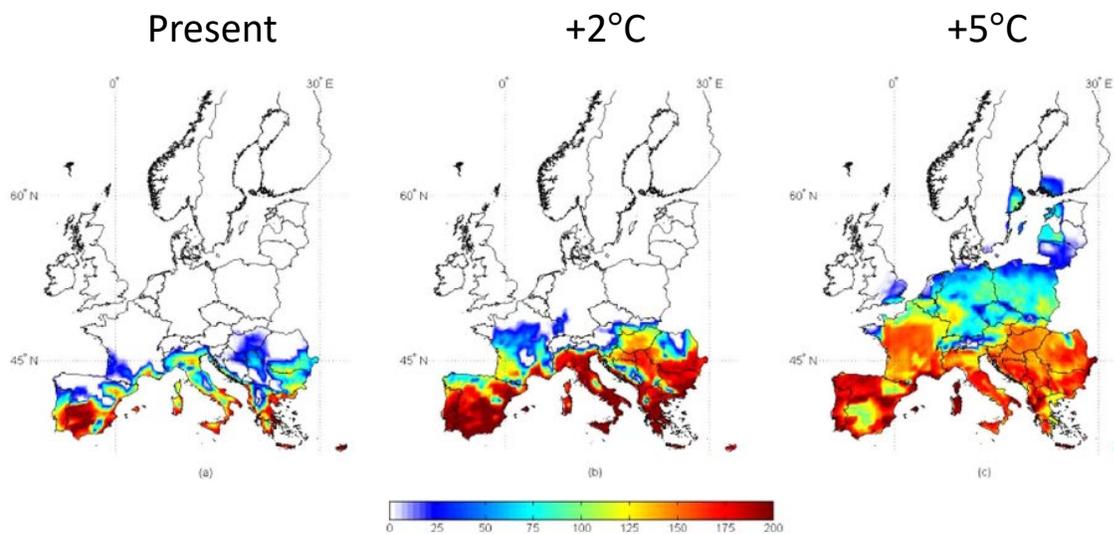


Abbildung 23. Risikokarte für das vermehrte Vorkommen von Aflatoxin bei Mais zum Erntezeitpunkt unter drei verschiedenen Klimawandelszenarien. (Battilani et al. 2016.)

Die Prognose zeigt die Ausbreitung im Fall von Aflatoxinen, das Szenario ist jedoch für viele Mykotoxine wahrscheinlich. Daher ist es notwendig Vorkehrungen zu treffen, die erhöhte Belastungen vermeiden und den immer strenger werdenden Grenzwerten, wie sie beispielsweise in der EU definiert werden, gerecht werden. Ein Ausbau von Mykotoxin Monitoringprogrammen ist hierbei ein wichtiger Baustein, um Kontaminationswerte zuverlässig innerhalb der gesundheitlich unbedenklichen und gesetzlichen Grenzen zu halten. Den Landwirten und der Industrie müssen dafür Analytische Instrumente an die Hand gegeben werden, die einfach zu handhaben sind und eine kontinuierliche, unkomplizierte Identifikation der Belastungshotspots

erlauben. Bei den untersuchten und entwickelten optischen Methoden ist dies gegeben. Die Umweltbelastung kann durch diese Art von Analytik ebenfalls reduziert werden, da der chemische Abfall zu reduziert wird, der normalerweise bei herkömmlichen Nachweismethoden (wie z. B. HPLC oder ELISA) anfällt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die optischen Nachweismethoden nur eine geringe oder gar keine Probenvorbereitung für die Analyse erfordern.

Vor dem Hintergrund der zukünftigen Herausforderungen wird die Bedeutung von innovativen Techniken zur Qualitätssicherung im Kontext der Nahrungsmittelproduktion deutlich, was sich auch in der zunehmenden Forschungs- und Entwicklungsarbeit in diesem Bereich widerspiegelt.

9 Kooperationen innerhalb des Projektes & Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene Kooperationen etabliert. So wurden die Versuche in Zusammenarbeit mit der „Core Facility“ der Universität Hohenheim, CIGRAS, Universidad de Costa Rica, IIA, Universidad de Costa Rica sowie dem Instiut für Kulturpflanzenwissenschaften, FG Ernährungsphysiologie (340h) der Universität Hohenheim, durchgeführt. Die Ergebnisse werden in die Dissertation von C. Acuna-Gutierrez einfließen. Des weiteren werden aus den Ergebnissen wissenschaftliche Publikationen angefertigt. Der Artikel “Detecting fumonisin B1 in black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by near-infrared spectroscopy (NIRS)” ist bereits im Journal „Food Control“ erschienen (<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108335>), der Konferenzbeitrag „Rapid detection of fumonisin B1 in maize kernels (*Zea mays*) using a semi-portable near-infrared spectrometer“ wurde beim Tropentag 2021 präsentiert, eine weitere Journal Publikation entsteht zu den Ergebnissen der Untersuchungen von Mais.

Literaturhinweise

- Aiko, V., & Mehta, A. (2015). Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *Journal of Biosciences*, 40(5), 943-954. doi:10.1007/s12038-015-9569-6
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H., Moretti, A., Leggieri, M. C., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.
- Krska, R., & Molinelli, A. (2009). Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 67-71. doi:10.1007/s00216-008-2424-y
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Harlow: Longman Scientific and Technical.
- Santos Pereira, C., C Cunha, S., & Fernandes, J. O. (2019). Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11(5), 290. doi:10.3390/toxins11050290
- Sendin, K., Williams, P. J., & Manley, M. (2018). Near infrared hyperspectral imaging in quality and safety evaluation of cereals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 575-590. doi:10.1080/10408398.2016.1205548
- Siche, R., Vejarano, R., Aredo, V., Velasquez, L., Saldaña, E., & Quevedo, R. (2015). Evaluation of food quality and safety with hyperspectral imaging (HSI). *Food Engineering Reviews*, 8(3), 306-322. doi:10.1007/s12393-015-9137-8
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., . . . Oswald, I. P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed--focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788-809. doi:10.3390/toxins4100788
- Teye, E., Huang, X. Y., & Afoakwa, N. (2013). Review on the potential use of near infrared spectroscopy (NIRS) for the measurement of chemical residues in food. *American Journal of Food Science and Technology*, 1, 1-8. doi:10.12691/ajfst-1-1-1
- Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020). Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *J Hazard Mater*, 389, 122087. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122087