

Sensortechnologie für die Identifizierung von Mykotoxinen in Getreide



Claudia Rasch, Dörte Steinbrück, Michael U. Kumke, Hans-Gerd Löhmannsröben

Universität Potsdam, Institut für Chemie (Physikalische Chemie)
Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam-Golm

1. Einleitung

Mykotoxine sind giftige Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze, die primäre Lebensmittel infizieren können, z.B. Getreide, Nüsse und Früchte. In Europa häufig anzutreffende Mykotoxine sind z.B. die *Aflatoxine* und *Ochratoxine*, gebildet von Lagerpilzen (*Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten), und die von Feldpilzen (*Fusarium*- und *Alternaria*-Spezies), gebildeten *Deoxynivalenol* und *Zearalenon*.

Aufgrund der möglichen Gesundheitsgefahren für Mensch und Tier ist die Untersuchung auf Anwesenheit von Mykotoxinen in Getreide und Getreideprodukten von großer Bedeutung. Dafür werden zuverlässige, preiswerte und einfache Methoden für den Nachweis des Pilzbefalles und der Mykotoxinkonzentration benötigt, insbesondere für die vor-Ort-Messungen des Rohmaterials am Anfang der Produktionskette.

Der Einsatz von faseroptischen, chemischen Sensoren (FOCS) und spektroskopischen Methoden in der Futter- und Lebensmittelkontrolle nimmt zu, besonders in Verbindung mit chemometrischen Auswerteverfahren. Zerstörungsfreie Methoden wie Absorption-, Fluoreszenz- und Reflektionsspektroskopie sind leistungsfähige Verfahren zur Detektion der Mykotoxine in Lösung und auf Feststoffoberflächen.

2. Experimenteller Aufbau

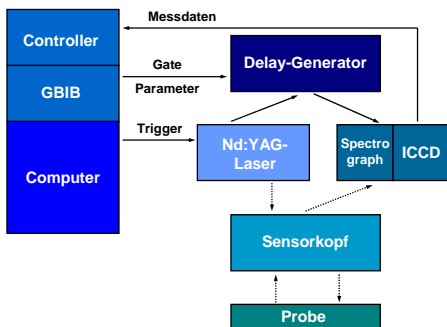


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des OPTIMOS LIF-Spektrometers (Fa. Optimare, Wilhelmshaven)

(durchgehende Linie: elektrisches Signal, gestrichelte Linie: optisches Signal)

Das LIF (laser-induzierte Fluoreszenz) - Spektrometersystem (Abbildung 1) besteht im Wesentlichen aus einem Laser (Nd:YAG, $\lambda_{ex} = 266, 355$ oder 532 nm bzw. N_2 , $\lambda_{ex} = 337$ nm), einem Sensorkopf und Detektionssystem. Licht aus dem Laser wird in einen Lichtleiter eingekoppelt und zum Sensorkopf geführt. Die Probe wird zur Fluoreszenz angeregt, die durch einen zweiten Lichtleiter zum Detektionssystem (CCD-Kamera mit integriertem Bildverstärker und Spectrograph) geleitet wird. In Erweiterung zum Standardmessmodus wird zur Optimierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses die zeitliche Korrelation von Anregung und Detektion optimiert („gated detection“).

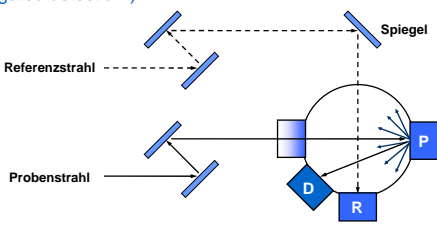


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Integrationskugel (P – Probe, R – Referenz, D – Detektor)

Während man bei der Transmissionsspektroskopie die Absorption einer Probe misst, indem man die Intensität eines kollimierten Lichtstrahls vor und hinter der zu durchstrahlenden Probe misst, richtet man bei der Reflektionsspektroskopie den Strahl auf die Probenoberfläche und analysiert das diffus gestreute Licht (Abbildung 2).

3. Ergebnisse

Aufgrund fehlerhafter und teilweise unvollständiger Literaturangaben [1] wurden die optischen Eigenschaften von *Aflatoxin B₁* (*AFB₁*), *Ochratoxin A* (*OTA*), *Ochratoxin B* (*OTB*), *Zearalenon* (*ZEA*) und *Deoxynivalenol* (*DON*) in Ethanol bestimmt (Abbildung 3).

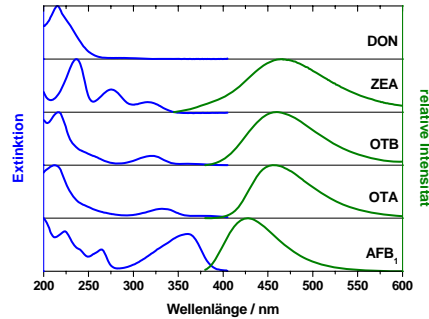


Abbildung 3: Absorptions- (blau) und Fluoreszenz- (grün) Spektren ausgewählter Mykotoxine in Ethanol

Die untersuchten Mykotoxine absorbieren im Wellenlängenbereich von $200 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$. Die Emissionsmaxima von *AFB₁*, *OTA*, *OTB* und *ZEA* liegen in ethanolischer Lösung zwischen 420 und 470 nm . Die Maxima in einer Ethanol-Wasser-Mischung (1:6) sind gleich bleibend (*OTA*, *OTB*, *ZEA*) oder wenig bathochrom verschoben (*AFB₁*). Erst in stark saurer Lösung oder aprotischen Lösungsmitteln sind bathochrome Verschiebungen bis zu 20 nm zu erkennen. *DON* hingegen fluoresziert unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht.

In Tabelle 1 sind die Absorptions- und Fluoreszenzdaten der o.g. Mykotoxine zusammengefasst. Die Quantenausbeuten wurde gegen Chininsulfat in $0.1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ ($\Phi=0.58$) bei $\lambda_{ex} = 324 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 400 - 600 \text{ nm}$ ermittelt [2]. Diese verringern sich durch Zugabe von Wasser sowie in aprotischen Lösungsmitteln bis zu 80% .

	<i>AFB₁</i>	<i>OTA</i>	<i>OTB</i>	<i>ZEA</i>
Absorption	224	212	216	236
$\lambda_{max} \text{ [nm]}$	264	333	320	275
	360	380	367	318
Fluoreszenz		333 / 455	320 / 460	
$\lambda_{ex} / \lambda_{em} \text{ [nm]}$	360 / 427	380 / 427	367 / 422	318 / 466
Quantenausbeute Φ_{Fl}	0.05	0.29	0.36	0.03

Tabelle 1: Zusammenfassung der Absorptions- und Fluoreszenzdaten in Ethanol

In Abbildung 4 sind die Fluoreszenzspektren der drei Hauptbestandteile eines Getreidekorns – Frucht- und Samenschale, Keimling und Mehlkörper – nach Anregung bei $\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$ dargestellt. Mit der Zuordnung der einzelnen Banden haben sich bereits *Nakai et al.* [3] beschäftigt. Die Emissionsbanden bei $\lambda_{em,max} = 320 \text{ nm}$ werden Tryptophan und bei $\lambda_{em,max} = 430 \text{ nm}$ Riboflavin zugeordnet. Die Fluoreszenzspektren der Bestandteile eines Getreidekorns verdeutlichen die unterschiedlichen Beiträge zum Gesamtemissionspektrum.

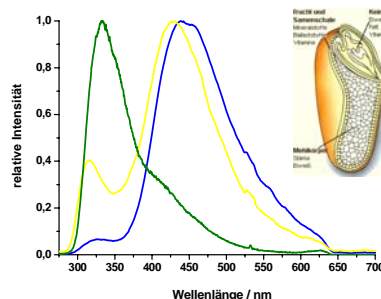


Abbildung 4: Normierte Fluoreszenzspektren der Hauptbestandteile eines Roggenkorns ($\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$) (blau: Frucht- und Samenschale, gelb: Keimling, grün: Mehlkörper)

Anhand der vorangegangenen Darstellungen wird deutlich, dass die laser-induzierte Fluoreszenz der Matrix (des Getreidekorns) im Wellenlängenbereich der Emission der Mykotoxine liegt und damit die Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$ für diese Problemstellung ungeeignet ist. Geeigneter scheinen $\lambda_{ex} = 337$ und 355 nm zu sein.

Mittels Reflektionsspektren können qualitative und quantitative Aussagen über die Anteile der Inhaltsstoffe gemacht werden [4], aber auch der Befall des Getreides mit Schimmelpilzen untersucht werden. In Abbildung 5 sind drei Reflektionsspektren von Roggenkörnern ohne und mit Schimmelpilzbefall (*Fusarium poae*) dargestellt sowie einer inokulierten Kultur der *Fusarium*-Art. Bei der befallenen Probe zeigt sich deutlich eine Veränderung der Bandenform im Bereich kleiner 1000 nm und Verringerung des Reflektionsgrades oberhalb 1000 nm . Das Spektrum der Reinkultur unterscheidet sich deutlich unterhalb 900 nm und zusätzlich oberhalb 1400 nm .

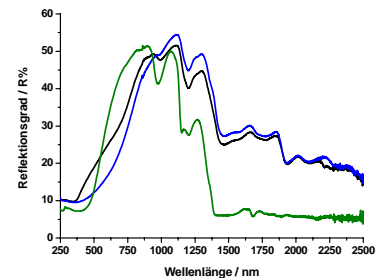


Abbildung 5: Reflektionsspektren von Roggenkörnern ohne (schwarz) und mit (blau) Schimmelpilzbefall sowie der Reinkultur *Fusarium poae* (grün), gegen 99% Spectralon

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Form, Farbe und Größe eines Korns sowie der Feuchtigkeitsgehalt und die Zusammensetzung (Stärke, Fett, Protein) großen Einfluss auf das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten hat. Auch das Fluoreszenzverhalten des jeweiligen Mykotoxins kann von den Absorptionseigenschaften der Matrix abhängen. Dieser Einfluss muss auf Basis der Kubelka-Munk-Theorie [5] korrigiert werden.

4. Zusammenfassung

Wegen seiner herausragenden Empfindlichkeit sind die auf Fluoreszenzspektroskopie basierenden Techniken potentiell für schnelle vor-Ort-Bestimmungen von Mykotoxinen wie *Ochratoxin*, *Aflatoxin* sowie *Zearalenon* geeignet. Die genannten Toxine können mit einer Anregung im Spektralbereich $200 \text{ nm} < \lambda_{ex} < 400 \text{ nm}$ und der Emissionswellenlänge $\lambda_{em} > 420 \text{ nm}$ untersucht werden. In Kombination mit Absorption- und Reflektionsmessungen lassen sich qualitative und quantitative Aussagen treffen. Ferner erhält man anhand von NIR-Reflektionsspektren Angaben zu den Bestandteilen, dem Wassergehalt und die An- (oder Abwesenheit) von Schimmelpilzen auf der Probe.

5. Literatur

- (a) Sydenham, E.W.; Thiel, P.G.; *Journal of AOAC International* **1996**, *79*(6), 1365-1379
(b) Pohland, A.E.; Schuler, P.L.; Steyn, P.S.; *Pure and Applied Chemistry* **1982**, *54*(11), 2219-2284
- Lakowicz, J.R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science, New York, **2006**, 54-56
- Nakai, S.; Horimoto, Y.; *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (edited by R.A. Meyer), Wiley, Weinheim **2000**
- Williams, P.; *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (edited by P. Griffiths, J.M. Chalmers), Wiley & Sons, New York **2006**
- Kortüm, G.; *Reflexionsspektroskopie – Grundlagen, Methodik, Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin **1969**

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, das das Verbundprojekt „ProSenso.net“ (PSn2): „Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien und ganzheitlicher Bewertungsmodelle in der Produktionskette von pflanzlichen Lebensmitteln“ (www.prosenso.net) fördert.

