

# Über die Bedeutung der Schimmelpilzgattung *Alternaria* im Lebensmittelsektor: Pflanzenpathogene und Mykotoxine

About the significance of the fungal genus *Alternaria* for the food sector: plant pathogens and mycotoxins

Sul significato del genere fungino *Alternaria* per il settore alimentare: fitopatogeni e micotossine

Hannes Puntischer<sup>1,2</sup>, Doris Marko<sup>2</sup>, Peter Robatscher<sup>1</sup>, Benedikt Warth<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Versuchszentrum Laimburg, Pfatten, Italien

<sup>2</sup> Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Fakultät für Chemie, Universität Wien, Wien, Österreich

## ABSTRACT

The fungal infestation of agricultural crops worldwide leads to considerable economic losses every year. Moreover, certain major plant pathogens like *Alternaria* species produce harmful secondary metabolites, so-called mycotoxins, which may result in food contamination and therefore a potential health risk for consumers. Data on the occurrence and the toxicological potential of the “emerging” *Alternaria* toxins are still scarce, which limits comprehensive risk assessments. Here, we present a summary of current *Alternaria* research focusing on the development of innovative analytical tools to determine contamination patterns in various food products and the investigations of metabolic defense strategies in plants and mammals (biotransformation). By the application of sophisticated LC-MS-based multi-toxin quantitation methods, barely studied toxins and even biologically modified toxins were revealed to contribute considerable concentrations to the overall exposure. Furthermore, in vivo studies gave intriguing first insights in bioavailability, metabolism, and excretion rates of *Alternaria* toxins in rats. These valuable data set demonstrates the necessity for further studies to approach the question, whether legal regulations of *Alternaria* toxins would be appropriate to continuously ensure and increase food safety.

## KEYWORDS

Emerging mycotoxins, food contamination, food safety, liquid chromatography tandem mass spectrometry, bioavailability, in vivo metabolism

## CITE ARTICLE AS

Puntischer Hannes, Marko Doris, Robatscher Peter et.al. (2020). About the significance of the fungal genus *Alternaria* for the food sector: plant pathogens and mycotoxins. Laimburg Journal 02/2020  
[DOI: 10.23796/LJ/2020.011](https://doi.org/10.23796/LJ/2020.011)

## CORRESPONDING AUTHOR

Hannes Puntischer  
Versuchszentrum Laimburg,  
Laimburg 6, Pfatten, 39040 Auer  
(BZ), Italy  
hannes.puntischer@laimburg.it /  
hannes.puntischer@univie.ac.at  
+390471414845

## EINLEITUNG

Die Schimmelpilzgattung *Alternaria* umfasst knapp 300 Arten. Einige dieser weltweit verbreiteten Saprophyten sind auch bedeutende Pflanzenpathogene und bekannt in verschiedensten landwirtschaftlichen Kulturen. Sie verursachen jährlich beträchtliche ökonomische Schäden, nicht zuletzt, weil ihr vielfältiges Wirtspflanzenspektrum von Getreide wie Weizen, Hafer und Gerste, über Sonnenblumen, Raps und Gemüsearten wie Kohlgewächse, Kartoffeln, Tomaten und Karotten, bis hin zu Fruchtbäumen wie Apfel, Birne und Zitruspflanzen reicht. Eine *Alternaria*-Infektion wird häufig mit Blattfleckenkrankheiten assoziiert, sowie mit dunklen Flecken an Früchten und Knollen. Die Folgen sind Qualitätsminderung der landwirtschaftlichen Produkte durch optische Veränderungen oder Ernteeinbußen durch Fäulnis der Pflanzen und Früchte. Zu den bedeutendsten Vertretern dieser Schimmelpilzgattung zählen *Alternaria alternata* (syn. *A. tenuis*), *A. solani*, *A. infectoria*, *A. helianthi*, *A. brassicae*, *A. brassicola*, *A. citri* und *A. tenuissima*. [1] [2] [3] [4] [5] [6].

Diese ubiquitären Schimmelpilzspezies besitzen die Fähigkeit, sich auch bei Temperaturen unter 5 °C zu vermehren und zu verbreiten. Dadurch ist eine Infektion von landwirtschaftlichen Produkten nicht nur am Feld möglich, sondern auch nach der Ernte, z.B. während einer gekühlten Lagerung [8] [9].

Besondere Relevanz hat eine *Alternaria*-Kontamination von Lebensmitteln nicht nur aufgrund der verursachten Pflanzenkrankheiten und der daraus resultierenden wirtschaftlichen Verluste. *Alternaria*-Spezies produzieren sekundäre Stoffwechselprodukte, sogenannte Mykotoxine, die schädliche Wirkungen auf Mensch und Tier haben können. Um ein eventuelles Gesundheitsrisiko für Konsumenten ermitteln zu können, bedarf es detaillierter toxikologischer Untersuchungen und Daten zum tatsächlichen Vorkommen dieser Substanzen bzw. zur Exposition des Konsumenten. Falls nötig, können entsprechende gesetzliche Bestimmungen (z.B. durch die Europäische Union) festgelegt werden, um die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten. Letzteres kann beispielsweise durch Vorgaben zu entsprechendem Qualitäts-Monitoring oder durch das Definieren von maximal zulässigen Kontaminationswerten (ML, maximum levels) in

bestimmten Lebensmittelprodukten erfolgen [10] [11].

Anders als weit bekanntere und gesetzlich regulierte Mykotoxine, wie etwa Aflatoxine oder Deoxynivalenol (DON), gelten *Alternaria*-Mykotoxine nach wie vor als sogenannte „emerging mycotoxins“, also „aufkommende Mykotoxine“ [12]. Es liegen nämlich nicht hinreichend viele Studien zum Vorkommen dieser Substanzen vor und zudem sind auch nur wenige der bis heute bekannten 70 Sekundärmetaboliten toxikologisch charakterisiert. Bisherige in-vitro-Studien haben jedenfalls biologisch relevante Effekte einiger dieser Stoffwechselprodukte aufgezeigt: Darunter Zytotoxizität, Genotoxizität, Mutagenität, Induktion von oxidativem Stress und östrogene Effekte, also ein Einwirken auf das Hormonsystem [4] [13]. Die bekanntesten Vertreter der *Alternaria*-Mykotoxine sind Dibenzopyron-Derivate wie Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Altenuen (ALT) und Isoaltenuen (isoALT), Perylenchinone wie Altertoxin I, II, III (ATX-I, -II, -III), Alterperyleneol (ALP) und Stemphylytoxin III (STTX-III), die Tenuazonensäure (TeA) sowie das Tetrapeptid Tenuotoxin (TEN) (Abb. 1).

Ein weiterer relevanter Aspekt, der für *Alternaria*-Toxine bislang kaum erforscht ist, betrifft die biologische Modifikation dieser Substanzen durch den pflanzlichen oder tierischen Fremdstoffmetabolismus, also eine mögliche Biotransformation [14]. Wird eine Pflanze von einem Schimmelpilz befallen und kommt dadurch in Kontakt mit dessen Toxinen, hat der pflanzliche Stoffwechsel enzymatische Werkzeuge zur Verfügung, diese Moleküle biochemisch zu verändern und dadurch schädliche Wirkungen abzuwehren. Genauso verfügen Säugetiere über derartige „Entgiftungsstrategien“. Glukosylierung, die enzymatische Konjugation der Fremdstoffe mit Glukose-Einheiten, ist ein typisches Beispiel für den pflanzlichen Fremdstoffmetabolismus, während für Säugetiere Glukuronidierung und Sulfatierung, also die Konjugation mit Glukuronsäure- und Sulfat-Einheiten, sowie Hydroxylierungen, sprich das Einbringen von Hydroxyl-Gruppen, bekannt sind. Diese sogenannten modifizierten Toxine sind für den Menschen jedoch weiterhin relevant, da viele biologische Modifikationen im menschlichen und auch tierischen Verdauungstrakt rückgängig gemacht werden können.

Aufgrund der aktuell limitierten Datenlage konnten lediglich vier *Alternaria*-Toxine im aktuellsten wissenschaftlichen Bericht der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, European Food Safety Authority) begutachtet werden, nämlich AOH, AME, TeA und TEN [11]. Das Vorantreiben der *Alternaria*-Mykotoxin-Forschung ist eine Angelegenheit von öffentlichem Belang, um die Bedeutung von *Alternaria*-Kontaminationen in landwirtschaftlichen Produkten für die lokale, aber auch die weltweite Lebensmittelsicherheit besser verstehen und die eventuelle Notwendigkeit von gesetzlichen Regulierungen einschätzen zu können.

## ENTWICKLUNG, OPTIMIERUNG UND VALIDIERUNG VON GEEIGNETEN ANALYSEVERFAHREN [15]

Für die effiziente Erhebung verlässlicher Daten zum Vorkommen dieser Substanzen werden leistungsstarke analytische Methoden benötigt. Eine besonders geeignete, innovative Technologie stellt die Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) dar [16] [17]. Diese Kombination aus stoffspezifischer, chemischer Probenauftrennung und hochselektiver, molekulmassen-spezifischer Detektion ermöglicht die Erfassung und Quantifizierung von äußerst niedrigen Mykotoxin-Konzentrationen im Bereich weniger Nanogramm pro Gramm Probe (und darunter) selbst in komplexen Matrices wie Lebensmitteln. Allerdings sind nach wie vor nur wenige Analysemethoden für den Nachweis von *Alternaria*-Toxinen verfügbar [18] [19] [20] [21]. In der Routineanalytik werden diese gesetzlich nicht regulierten Substanzen zu meist gar nicht oder bestenfalls nur einzelne von ihnen berücksichtigt (z.B. AOH, AME, TEN und TeA).

Aus diesen Gründen wurde in diesem Forschungsprojekt zunächst eine möglichst umfassende Methode für die akkurate Quantifizierung von 12 freien und 5 modifizierten *Alternaria*-Toxinen in unterschiedlichen Lebensmitteltypen etabliert. Als chemisch unterschiedliche Probenmatrices wurden die häufig konsumierten Lebensmittel Tomatensauce (hoher Wasseranteil), Sonnenblumenöl (hoher Fettanteil) und Weizenmehl (hoher Kohlenhydratanteil) gewählt (Abb. 2). Durch die systematische Optimierung des chromatographischen Trennver-

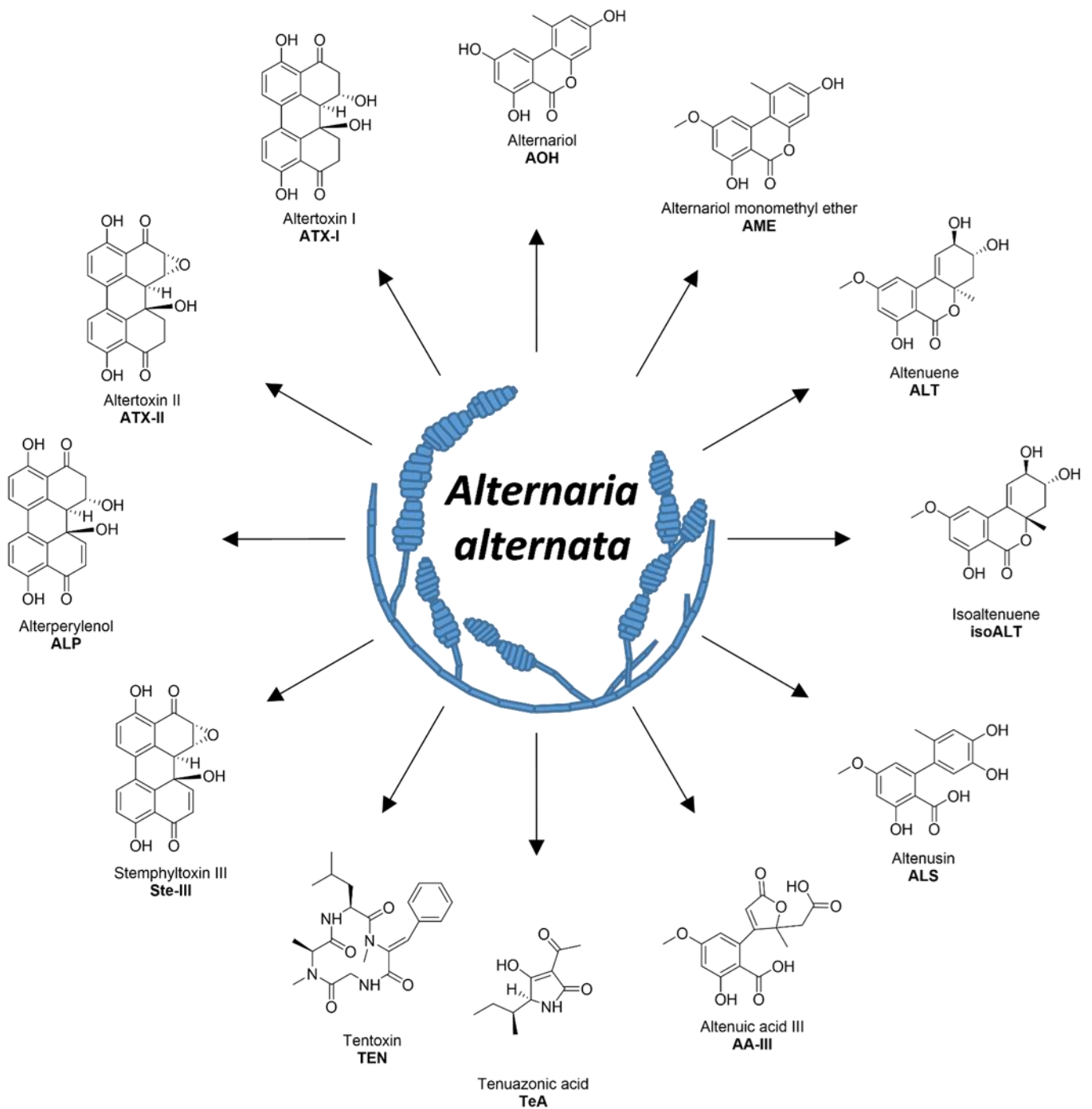
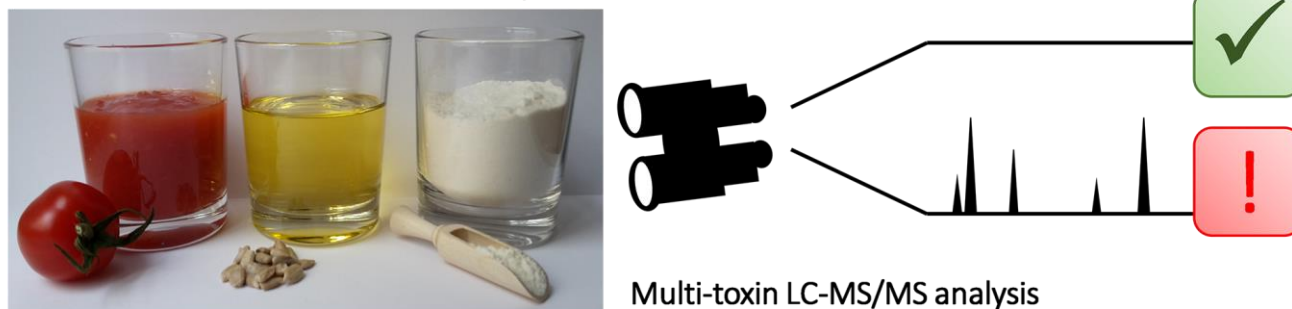


Abb. 1: Chemische Strukturen bekannter *Alternaria*-Toxine //Chemical structures of known *Alternaria* toxins. Bearbeitet nach / adapted from: Puntscher, et al. (2019) [7].

## Food contaminated with *Alternaria* mycotoxins?



Multi-toxin LC-MS/MS analysis

Abb. 2: Untersuchte Lebensmittelmatrices: Tomatensauce, Sonnenblumenöl und Weizenmehl // Analyzed food matrices: tomato sauce, sunflower seed oil, wheat flour.

Bearbeitet nach / adapted from: Puntscher, et al. (2018) [15].

fahrens sowie das individuelle Tuning (Feineinstellung) der massenspektrometrischen Parameter der Analyten in den jeweiligen Matrices konnte eine robuste und zuverlässige Methode mit entsprechend niederen Nachweisgrenzen von 0,03-9 ng/g entwickelt und nach offiziellen Richtlinien validiert werden [22] [23].

## ANALYSE VON EUROPÄISCHEN LEBENSMITTELN [24]

Für einen ersten Einblick bezüglich aktueller Vorkommen von *Alternaria*-Toxinen wurden über 200 kommerziell erhältliche, europäische Lebensmittelproben von unterschiedlichen Quellen (Geschäfte und Supermärkte in Österreich und anderen europäischen Ländern, sowie online-Plattformen) eingekauft und analysiert. Dabei konnten neun der 17 Toxine festgestellt werden (Abb. 3). Neben den bereits etwas bekannteren Vertretern wie Alternariol (AOH, Median-Gehalte der verschiedenen Matrices: 1,2-6,6 ng/g), dessen Monomethylether (AME, 0,5-1,3 ng/g), Tentoxin (TEN, 0,1-0,5 ng/g), Altenuen (ALT, unter der Quantifizierungsgrenze von 10 ng/g) und der Tenuazonsäure (TeA, 66-161 ng/g) wurden auch die Perylenchinone Altartoxin I (ATX-I, 2,3-4,1 ng/g) und Alterperyleneol (ALP, 4-9,1 ng/g), sowie Glukoside von AOH und AME nachgewiesen (bis zu 12,7 ng/g in der Pilotstudie [15]) und Sulfate (bis zu 17,5 ng/g). Diese kaum erforschten Substanzen scheinen folglich einen bisher kaum bekannten und unterschätzten Beitrag zur Gesamtexposition an *Alternaria*-Mykotoxinen für europäische Konsumenten zu leisten. Bemerkenswert waren zudem die signifikanten Unterschiede der festgestellten Kontaminationsmuster in Lebensmitteln

unterschiedlicher Art, geographischer Herkunft, Verarbeitung, landwirtschaftlicher Erzeugung (biologisch/konventionell) und Vermarktung (Geschäfte/online-Verkauf).

Tomatensaucen zeigten im Vergleich zu Sonnenblumenöl und Weizenmehl die meisten positiven Proben, die größte Anzahl an gefundenen *Alternaria*-Toxinen, sowie auch die vergleichsweise höchsten Konzentrationen. Eine kritische Evaluierung der erhobenen Daten zeigte, dass der direkte und alleinige Vergleich zwischen Lebensmitteln aus biologischer und konventioneller Produktion nicht hinreichend und gar irreführend ist. Das Verbot von synthetischen Fungiziden und damit die limitierte Auswahl entsprechender Pflanzenschutzmittel im biologischen Anbau kann sehr wohl ein höheres Potential für Schimmelpilzkontaminationen bedeuten, doch die Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere die unterschiedlichen Qualitätsanforderungen, die von Herkunftsländern, Vermarktern und Supermarktketten eingefordert werden, einen wesentlichen Einfluss auf mögliche Kontaminationsmuster in landwirtschaftlichen Produkten haben. Auffällig höhere Kontaminationsmuster zeigten Produkte aller drei Matrices, die von einer Online-Plattform für Bio-Produkte erworben wurden. In Anbetracht der unterschiedlich strengen Kategorien der biologischen Landwirtschaft und insbesondere der stetig wachsenden Entwicklung dieser durchaus profitablen Branche, könnten strengere Qualitätskontrollen in Betracht gezogen werden.

Ob Lebensmittelverarbeitungsprozesse etwaige Mykotoxin-Konzentrationen verringern können, hängt u.a. von der chemischen Stabilität der jeweiligen Substanzen ab [25]. Viele *Alternaria*-Toxine wie AOH und AME

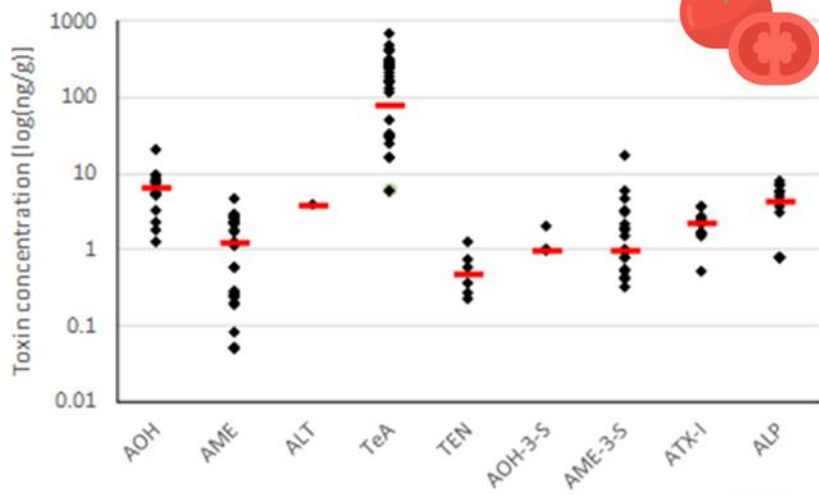
sind thermisch stabil und überdauern selbst Brotbackvorgänge [26]. Raffiniertes Sonnenblumenöl zeigte in unserer Studie signifikant geringere Kontaminationsmuster, was auf effektive Extraktionsschritte während der Raffination zurückgeführt werden kann. Dies kann allerdings nicht als Konsumempfehlung interpretiert werden, da kalt gepresste und unraffinierte Öle meist mehr wertvolle Nährstoffe beinhalten, während Raffinationsprozesse mitunter auch unerwünschte Nebenprodukte verursachen.

Weitere Studien sind jedenfalls notwendig, um einen tieferen Einblick zu aktuellen *Alternaria*-Toxin-Kontaminationen zu gewinnen und potenzielle Risiken für Konsumenten abschätzen zu können. Insbesondere auch in Ländern mit wärmerem und feuchterem Klima wären detailliertere Untersuchungen von besonderem Interesse.

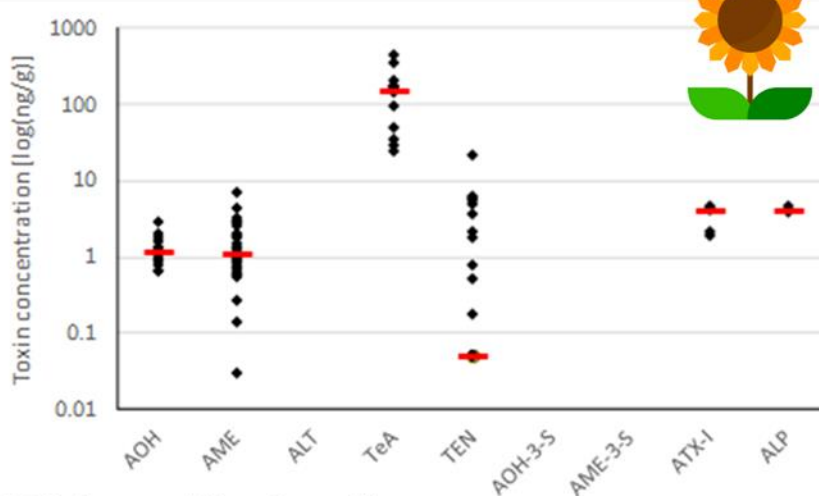
## UNTERSUCHUNGEN ZUM THEORETISCHEN AUFTRETEN DES GENOTOXISCHEN PERYLENCHINONS ATX-II IN TOMATEN-MATRIX [27]

Der unerwartet häufige Nachweis von nicht unerheblichen Konzentrationen der Perylenchinone ATX-I und ALP, warf Fragen zum Vorkommen des strukturell verwandten Toxins ATX-II auf. Dieses erlangte in den letzten Jahren mehr und mehr Aufmerksamkeit aufgrund seiner beträchtlich hohen Genotoxizität [28] [29] [30]. Während ATX-II in *Alternaria*-Pilzkulturen unter Laborbedingungen in hohen Konzentrationen nachgewiesen wurde, war es bislang noch nie in einer Lebensmittelprobe gefunden worden.

**A Tomatensauce - Tomato sauce**



**B Sonnenblumenöl - Sunflower seed oil**



**C Weizenmehl - wheat flour**

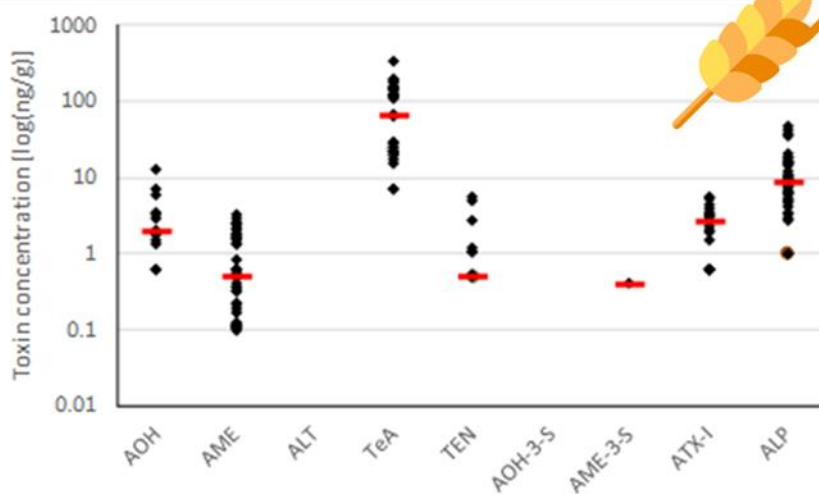
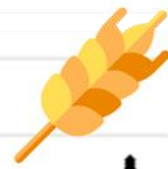
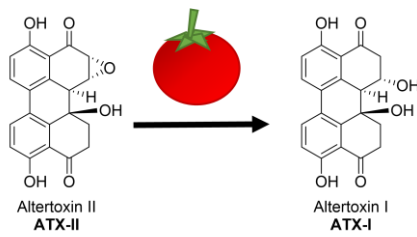


Abb. 3: Erfasste Alternaria-Toxin-Konzentrationen in Tomatensauce, Sonnenblumenöl und Weizenmehl // Alternaria toxin concentrations determined in tomato sauce, sunflower seed oil and wheat flour. Bearbeitet nach / adapted from: Puntscher, et al. (2019) [24].



### Enzymatic biotransformation

Abb. 4: Das *Alternaria*-Toxin Altartoxin II wird in Tomatenfrüchten teilweise de-epoxidiert zu Altartoxin I. // *The Alternaria toxin altartoxin II is partially de-epoxidated in intact tomato fruits forming altartoxin I.*

Bearbeitet nach / *adapted from*: Puntischer, et al. (2019) [27].

Aus diesem Grund wurden Tomatenfrüchte und Tomatensaucen künstlich mit ATX-II ( $1 \mu\text{g/g}$  Probe) versetzt und mittels der entwickelten LC-MS/MS Methode die Konzentrationsverläufe unter verschiedenen Bedingungen verfolgt. Als Referenz dienten Wasserproben, die mit denselben ATX-II-Konzentrationen versetzt und nach dem gleichen Protokoll verarbeitet wurden. So wurde ein signifikanter Rückgang der Toxin-Konzentration in rohem Tomatenpüree bei Lagerung bei Raumtemperatur (87-80% des Anfangsgehalts nach 1,5 h, 47-49% nach 24 h) und insbesondere nach thermischer Behandlung festgestellt (4% nach 1,5 h, 2,5% nach 24 h), was auf Matrix-bedingte Reaktionen und Abbauprozesse zurückzuführen sein könnte. Ein deutlich stärkerer Rückgang bei Raumtemperatur wurde für die intakten Tomatenfrüchte gemessen (23% nach 1 h und <1% nach 24 h), wobei zudem das Auftreten von ATX-I entdeckt (7% der ATX-II-Äquivalente nach 1,5 h, 12% nach 24 h) wurde (Abb. 4). Dies lässt auf eine effektive enzymatische Biotransformation des pflanzlichen Metabolismus schließen (De-Epoxidierung).

Insgesamt zeigte diese Studie die hohe Reaktivität bzw. geringe Lebensdauer von ATX-II, wobei nicht auszuschließen ist, dass daraus resultierende Abbauprodukte nicht ebenso von toxikologischer Relevanz sind.

## ALTERNARIA AM APFEL [31]

### ANALYSE VON APFELPROBEN AUS NORDITALIEN MIT OPTISCH SICHTBARER ALTERNARIA-INFESTION

Sechs Apfelproben (je 1,4-1,8 kg) mit den für *Alternaria*-Infektionen typischen Flecken

bzw. Punkten auf der Schale wurden im August 2015 von sechs verschiedenen Apfeln in den norditalienischen Regionen Trentino-Südtirol und Veneto gesammelt (Abb. 5). Die Hälfte des jeweiligen Probenumfangs wurde 24 Stunden nach der Ernte für die Analyse aufbereitet und zwischenzeitlich bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die jeweilige zweite Probenhälfte wurde erst nach sechs Monaten Lagerung unter kontrollierter Atmosphäre aufbereitet, um etwaige Entwicklungen während dieser Zeit zu untersuchen. Wiederum wurden die Proben mittels der etablierten LC-MS/MS Methode analysiert und auf *Alternaria*-Toxin-Kontaminationen untersucht.

Die Resultate zeigten lediglich vernachlässigbare Konzentrationen von TEN für das direkt befallene Gewebe der Apfelproben, die 24 Stunden nach der Ernte analysiert wurden und zusätzlich geringe Konzentrationen von AOH, AME und einem Sulfat von AME nach sechs Monaten Lagerung. Somit wurde eine Kontamination gefunden, aber die nachgewiesenen Konzentrationen stellen mit großer Wahrscheinlichkeit kein Gesundheitsrisiko für den Konsumenten dar. Damit bliebe eine derartige *Alternaria*-Infektion hauptsächlich ein optisches Problem für die Vermarktung.

### ERSTE DETEKTION VON ALTERTOXIN II IN EINER NATÜRLICH INFIZIERTEN APFELPROBE

Zusätzlich zu den oben beschriebenen *Alternaria*-Flecken auf der Schale wurde sepa-

rat auch eine kleine Faulstelle ( $0,5 \times 1 \text{ cm}$ ,  $0,9 \text{ g}$ ) eines Apfels nach der Lagerung entnommen und analysiert (Abb. 6). Unerwarteterweise wurden dabei hohe Konzentrationen von 14 der 17 untersuchten Toxine festgestellt: AOH ( $33 \mu\text{g/g}$ ), AME ( $9,2 \mu\text{g/g}$ ) und vier ihrer modifizierten Formen: AOH-3-Glukosid ( $0,1 \mu\text{g/g}$ ), AOH-9-Glukosid ( $118 \mu\text{g/g}$ ), AOH-3-Sulfat ( $0,04 \mu\text{g/g}$ ) und AME-3-Sulfat ( $0,37 \mu\text{g/g}$ ), aber auch ALT ( $2 \mu\text{g/g}$ ) und dessen Isoform isoALT ( $0,92 \mu\text{g/g}$ ). Darüber hinaus, wurden auch Perylenchinone detektiert: ATX-I ( $0,08 \mu\text{g/g}$ ), ATX-II ( $0,06 \mu\text{g/g}$ ) und ALP ( $0,42 \mu\text{g/g}$ ). Da die Messsignale außerhalb des linearen Bereichs der angewandten Methode lagen, werden die Werte als semiquantitativ angenommen und können zum Vergleich des relativen Auftretens herangezogen werden. Klar bestätigt ist jedenfalls der erste Nachweis des genotoxischen *Alternaria*-Toxins ATX-II in einer natürlich kontaminierten Lebensmittelprobe.

Zur Relevanz dieses erstmaligen Nachweises ist Folgendes zu bemerken: In mehreren Studien wurde eine limitierte Stabilität von ATX-II aufgezeigt, jedoch gilt dies nicht für eventuell bedenklliche Reaktionsprodukte. Außerdem kann ein Gesundheitsrisiko auch für ATX-II selbst nicht ausgeschlossen werden, speziell im Falle der aktuell so populären frisch zubereiteten Smoothies und Fruchtsäfte. Eine derart kleine infizierte Stelle kann versehentlich in ein derartiges Produkt und damit binnen kurzer Zeit direkt zum Konsumenten gelangen.



Abb. 5: Apfel mit für *Alternaria*-Infektionen typischen Punkten auf der Schale // *Apple with peel spots typically assigned to symptoms of Alternaria infection.*



Abb. 6: Separat analysierte, kleine Faulstelle (0.5 x 1 cm, 0.9 g) eines Apfels mit unerwartet hohen Konzentrationen von 14 der 17 untersuchten *Alternaria*-Toxine // Separately analyzed peel lesion (0.5 x 1 cm, 0.9 g), which exhibited unexpectedly high concentrations of 14 of the 17 *Alternaria* toxins included in our method.

Bearbeitet nach / adapted from: Puntscher, et al. (2020) [31].

### BIOVERFÜGBARKEIT UND SÄUGETIER-METABOLISMUS VON ALTERNARIA-TOXINEN IN VIVO [7] [32]

Um die toxikologische Relevanz von *Alternaria*-Toxinen zu erforschen, werden verschiedenste in-vitro-Studien durchgeführt.

So wurden biologische Effekte wie die Genotoxizität und Mutagenität von AOH [33] und ATX-II [34] näher untersucht, die östrogene Wirkung von AOH [35] und die Beeinträchtigung der ribosomalen Aktivität durch TeA [36]. Um das tatsächliche Gesundheitsrisiko dieser Substanzen abschätzen zu können, bedarf es allerdings noch weiterer Informationen und Untersuchungen. Wichtige Parameter für das toxikologische Potential

eines Toxins sind auch dessen Bioverfügbarkeit, also inwiefern die Substanz tatsächlich von einem Organismus aufgenommen wird, dessen Metabolisierung, also inwiefern die Substanz von einem Organismus unschädlich gemacht werden kann, und dessen Ausscheidungsrate und Ausscheidungseffizienz, also wieviel und wie rasch die Substanz von einem Organismus auch wieder ausgeschieden werden kann.

Zu diesen zentralen Fragen gibt es bislang nur einzelne Studien, weswegen die EFSA dazu aufgerufen hat, diese Wissenslücken zu schließen [11]. Im Zuge unseres Projekts konnten wir in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Universität Wien zwei Studien an Ratten durchführen. Dabei wurden kontrollierte Mengen eines Pilzkulturextraktes mit 11 bestimmten *Alternaria*-Toxinen an Ratten verabreicht (50 mg/kg Körpergewicht), um nach 3 und 24 Stunden gesammeltes Blutplasma, Urin und Faeces zu untersuchen (Abb. 7). Nach aufwändiger Methodenentwicklung für diese komplexen biologischen Matrices, konnte eine LC-MS/MS basierende Analysenmethode für die simultane Detektion von 20 *Alternaria* Toxinen etabliert werden.

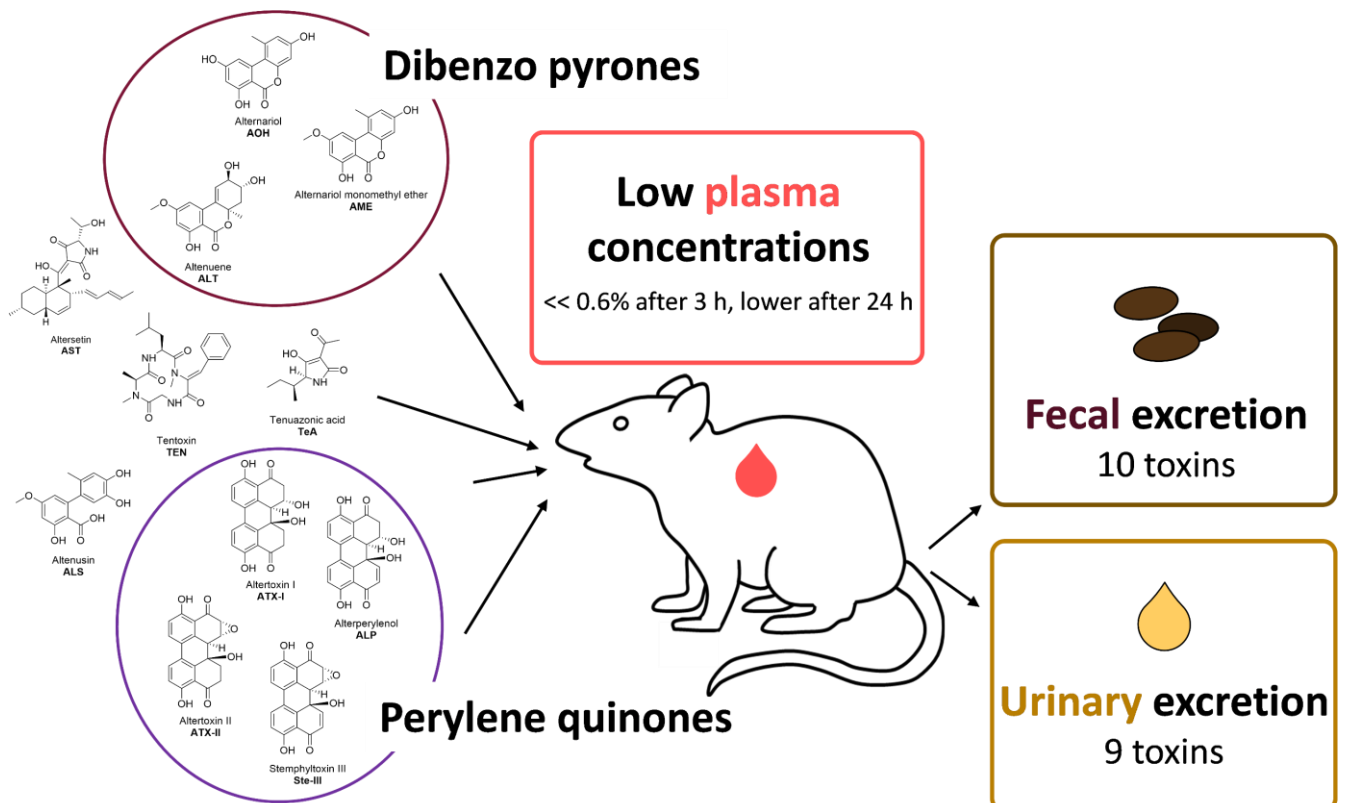


Abb. 7: Überblick zur durchgeführten Studie an Ratten: Administration, Absorption und Ausscheidung von *Alternaria*-Toxinen // Overview on the conducted in vivo study: Administration, absorption, and excretion of *Alternaria* toxins in rats.

Bearbeitet nach / adapted from: Puntscher, et al. (2019) [32].

Die Analyse der Proben zeigte nur geringe Konzentrationen (<0,6% der verabreichten Dosis) der Toxine im Blutplasma, während zehn Toxine in Faecesproben und neun Toxine in Urinproben festgestellt wurden. Insbesondere AOH und AME wurden nach 24 Stunden zum Großteil über den Faeces (>89 %) und Urin (>2,6%) ausgeschieden und zeigten nur geringe Bioverfügbarkeit. Zudem wurden modifizierte Formen in beiden Matrices festgestellt, nämlich 4-hydroxy-AOH und Sulfate von AOH und AME, was aktiven Fremdstoffmetabolismus der Ratte beweist. TeA wurde bereits nach 3 Stunden zu 20% und nach 24 Stunden zu fast 90% via Urin ausgeschieden. Obwohl die Perylenchinone ATX-I, ALP, ATX-II und STTX III in vergleichsweise hohen Dosen verabreicht wurden, konnten nur ATX-I und ALP in geringen Konzentrationen (<0,06% in Plasma und Urin, <5% in Faeces) und die genotoxischen Epoxid-Verbindungen ATX-II und STTX-III gar nicht wiedergefunden werden.

Diese Studien geben wertvolle Einblicke zur Bioverfügbarkeit, dem Säugetiermetabolismus, der Ausscheidung und somit der biologischen Relevanz von *Alternaria*-Toxinen. Insbesondere die Erkenntnisse zum säugetierspezifischen Stoffwechsel und die gefundenen Ausscheidungsprodukte sind wichtig für zukünftige Risikobewertungen und die mögliche Entwicklung von Biomarker-basierenden Analysenverfahren (HBM, human biomonitoring) für umfangreiche Expositionserhebungen. Die Leber und der gastrointestinale Trakt wurden als relevante Zielgewebe und Organe erkannt, was richtunggebend für die Planung zukünftiger toxikologischer Untersuchungen ist.

## FAZIT

*Alternaria*-Infektionen führen jährlich zu beträchtlichen wirtschaftlichen Einbußen in ganz unterschiedlichen landwirtschaftlichen Kulturen weltweit. Außerdem können daraus auch Lebensmittelkontaminationen mit entsprechenden *Alternaria*-Mykotoxinen resultieren. In den präsentierten Studien wurden bis zu neun der weltweit unregulierten *Alternaria*-Toxine in verschiedenen kommerziell erhältlichen Lebensmitteln Europas nachgewiesen. Da die aktuell verfügbaren Daten zum tatsächlichen Vorkommen und zum toxikologischen Potential dieser Schimmelpilzmetaboliten nicht für eine umfassende Risikobewertung ausreichen, sind weitere Studien erforderlich. Nicht nur die etwas bekannteren *Alternaria*-Toxine wie

## ZUSAMMENFASSUNG

Pilzkrankheiten verursachen alljährlich bedeutende ökonomische Einbußen in verschiedensten landwirtschaftlichen Kulturen weltweit. Darüber hinaus produzieren bestimmte Pflanzenpathogene wie *Alternaria*-Spezies schädliche Sekundärmetaboliten, sogenannte Mykotoxine, die Lebensmittel kontaminieren und damit ein mögliches Gesundheitsrisiko für Konsumenten bedeuten können. Bisher sind nur wenige Studien zum Vorkommen und dem toxikologischen Potential von *Alternaria*-Toxinen verfügbar, was umfassende Risikobewertungen deutlich einschränkt. In dieser Arbeit präsentieren wir eine Zusammenfassung aktueller *Alternaria*-Forschung mit dem Fokus auf die Entwicklung von innovativen analytischen Methoden, um Kontaminationsmuster in verschiedenen Lebensmittelprodukten effizient zu erfassen und biologische Abwehrstrategien im pflanzlichen und tierischen Fremdstoffmetabolismus (Biotransformation) zu untersuchen. Durch die Anwendung leistungsstarker LC-MS-basierender Multi-Toxin-Methoden konnte gezeigt werden, dass auch bisher kaum untersuchte Toxine sowie biologisch modifizierte Toxine einen nicht unwesentlichen Beitrag zur Gesamtexposition leisten. Außerdem lieferten in-vivo-Studien hochinteressante erste Einblicke zur Bioverfügbarkeit, dem Metabolismus und den Ausscheidungsraten von *Alternaria*-Toxinen in Ratten. Die aussagekräftigen Ergebnisse zeigen, dass weitere Studien ratsam und notwendig sind, um der Frage nachzugehen, ob eine gesetzliche Regulierung von *Alternaria*-Toxinen zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit angemessen wäre.

## RIASSUNTO

L'infestazione fungina delle colture agricole provoca notevoli perdite economiche ogni anno. Inoltre, certi agenti fitopatogeni come le specie di *Alternaria* producono metaboliti secondari dannosi, le cosiddette micotossine, che in caso di contaminazione di prodotti alimentari possono risultare in un potenziale rischio per la salute dei consumatori. I dati sulla presenza e sul potenziale tossicologico delle tossine di *Alternaria* sono ancora scarsi e quindi le valutazioni del rischio rimangono limitati. In questo rapporto presentiamo un riassunto di ricerca attuale focalizzata sullo sviluppo di metodi analitici innovativi per determinare contaminazioni in vari prodotti alimentari e per studiare le strategie di difesa metabolica nelle piante e nei mammiferi (biotrasformazione). Con l'applicazione di sofisticati metodi di quantificazione basati su LC-MS, è stato dimostrato che tossine poco conosciute e perfino tossine biologicamente modificate contribuiscono concentrazioni considerevoli all'esposizione complessiva. Inoltre, studi in vivo hanno fornito interessanti nuove conoscenze sulla biodisponibilità, sul metabolismo e sulle escrezioni delle tossine di *Alternaria* in ratti. I risultati significativi dimostrano la necessità di ulteriori studi per affrontare la questione se eventuali normative legali per queste tossine sarebbero appropriate per garantire e aumentare continuamente la sicurezza alimentare.



Alternariol und Tenuazonssäure, sondern auch kaum untersuchte modifizierte Formen, wie Sulfate und Glukoside von Alternariol und Alternariolmonomethylether, wie auch die Perylenchinone scheinen einen bislang unbekanntem und nicht zu unterschätzenden Beitrag zur Gesamtexposition der Konsumenten zu leisten.

Die Erkenntnisse der beschriebenen wissenschaftlichen Arbeiten, insbesondere die neu entwickelten und validierten leistungsstarken Analysemethoden für Lebensmittel, aber auch für andere biologische Matrices, leisten wertvolle Beiträge für die zukünftige Datenerfassung und das Voranschreiten dieser Mykotoxin-Forschung. Die gewonnenen Einblicke in aktuelle Kontaminationsmuster europäischer Lebensmittel, sowie erste Erkenntnisse zum tierischen Metabolismus dieser Substanzen bestätigen die von der EFSA betonte Wichtigkeit der Thematik. In Zukunft können auch mit Hilfe dieser Ergebnisse die noch ausstehenden, notwendigen Risikobewertungen erarbeitet werden, um zu verstehen, ob etwaige gesetzlichen Regulierungen dieser Toxine notwendig und sinnvoll für eine Verbesserung der Lebensmittelsicherheit sind.

## ABKÜRZUNGEN

- EFSA, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
- LC, Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
- MS, Massenspektrometrie

### *Alternaria*-Toxine:

- ALT, Altenuene
- ALP, Alterperyleneol
- AME, Alternariolmonomethylether
- ATX-I, Alvertoxin I
- ATX-II, Alvertoxin II
- isoALT, Isoaltenuene
- STTX-III, Stemphylotoxin III
- TeA, Tenuazonssäure
- TEN, Tentoxin

## DANKSAGUNG – ACKNOWLEDGEMENTS

Dieser Artikel befasst sich mit den Ergebnissen der wissenschaftlichen Publikationen bzw. der kumulativen Dissertation von Hannes Puntschner, die am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien erarbeitet wurden. Besonderer Dank gilt: Den Forschungsgruppen, die großzügigerweise wertvolles Referenzmaterial zur Verfügung gestellt haben: Hannes Mikula, Philipp Skrinjar und Johannes Fröhlich (Technische Universität Wien, Österreich), Joachim Podlech (Karlsruher Institut für Technologie, Deutschland), Michael Rychlik (Technische Universität München, Deutschland), Sarah DeSaeger und Jeoren Walravens (Ghent University, Belgium). Unseren Kooperationspartnern an der Medizinischen Universität Wien mit Katharina Tillmann, Roberto Plasenzotti und Harald Höger. Dem Joint Research Center (Europäische Kommission) mit Ádám Tölgyesi für den wertvollen fachlichen Austausch. Allen Mitgliedern des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien, sowie den involvierten Bachelor- und Masterstudierenden. Des Weiteren danken wir dem Team des Massenspektrometrie-Zentrums der Fakultät für Chemie an der Universität Wien für die hervorragende Unterstützung in technischen Fragen.

## LITERATUR

- [1] Lee H.B., Patriarca A., Magan N. (2015). *Alternaria* in food. Ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology* 43 (2), 93-106, DOI: [10.5941/MYCO.2015.43.2.93](https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93).
- [2] Ostry V. (2008). *Alternaria* mycotoxins. An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1 (2), 175-188, DOI: [10.3920/WMJ2008.x013](https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x013).
- [3] Scott P.M. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International* 84 (6) 1809-1817, DOI: [10.1093/jaoac/84.6.1809](https://doi.org/10.1093/jaoac/84.6.1809).
- [4] Solfrizzo, M. (2017). Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 17, 57-61, DOI: [10.1016/j.cofs.2017.09.012](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.012).
- [5] Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* 2 (2), 129-140, DOI: [10.3920/WMJ2009.1145](https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1145).
- [6] Chełkowski J., Visconti A. (1992). *Alternaria*. Biology, plant diseases, and metabolites, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- [7] Puntischer H., Hankele S., Tillmann K. et al. (2019). First insights into *Alternaria* multi-toxin in vivo metabolism. *Toxicology Letters* 301, 168-178, DOI: [10.1016/j.toxlet.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.006).
- [8] Juan C., Oueslati S., Mañes J. (2016). Evaluation of *Alternaria* mycotoxins in strawberries. Quantification and storage condition. *Food Additives & Contaminants: Part A* 33 (5), 861-868, DOI: [10.1080/19440049.2016.1177375](https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1177375).
- [9] Patriarca, A., Medina A., Pinto V. et al. (2014). Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal* 7 (3), 329-334, DOI: [10.3920/WMJ2013.1711](https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1711).
- [10] EFSA - European Food Safety Authority (ed.). (2011). Panel on contaminants in the food chain. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9 (10), 2407, DOI: [10.2903/j.efsa.2011.2407](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407).
- [11] EFSA - European Food Safety Authority (ed.). (2016). Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal* 14 (12), e04654, DOI: [10.2903/j.efsa.2016.4654](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4654).
- [12] Gruber-Dorninger C., Novak B., Nagl V. et al. (2017). Emerging mycotoxins. Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of agricultural and food chemistry* 65 (33), 7052-7070, DOI: [10.1021/acs.jafc.6b03413](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413).
- [13] Escrivá L., Oueslati S., Font G. et al. (2017). *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed. An Overview. *Journal of Food Quality* 2017:1569748, DOI: [10.1155/2017/1569748](https://doi.org/10.1155/2017/1569748).
- [14] Rychlik M., Humpf H.U., Marko D. et al. (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin research* 30 (4), 197-205, DOI: [10.1007/s12550-014-0203-5](https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5).
- [15] Puntischer H., Kütt M.-L., Skrinjar P. et al. (2018). Tracking emerging mycotoxins in food. Development of an LC-MS/MS method for free and modified *Alternaria* toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (18), 4481-4494, DOI: [10.1007/s00216-018-1105-8](https://doi.org/10.1007/s00216-018-1105-8).
- [16] Berthiller F., Brera C., Crews C. et al. (2016). Developments in mycotoxin analysis. An update for 2014-2015. *World Mycotoxin Journal* 9 (1), 5-29, DOI: [10.3920/WMJ2015.1998](https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1998).
- [17] Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta* 632 (2), 168-180, DOI: [10.1016/j.aca.2008.11.010](https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010).
- [18] López P., Venema D., Mol H. et al. (2016). *Alternaria* toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands. *Food Control* 69, 153-159. DOI: [10.1016/j.foodcont.2016.04.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.001).
- [19] Tölgyesi Á., Stroka J., Tamosiunas V. et al. (2015). Simultaneous analysis of *Alternaria* toxins and citrinin in tomato. An optimised method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 2015. 32 (9), 1512-1522, DOI: [10.1080/19440049.2015.1072644](https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1072644).
- [20] Walravens J., Mikula H., Rychlik M. et al. (2016). Validated UPLC-MS/MS methods to quantitate free and conjugated *Alternaria* toxins in commercially available tomato products and fruit and vegetable juices in Belgium. *Journal of agricultural and food chemistry* 64 (24), 5101-5109, DOI: [10.1021/acs.jafc.6b01029](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01029).
- [21] Zwickel T., Klaffke H., Richards K. et al. (2016). Development of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based analysis for the simultaneous quantification of various *Alternaria* toxins in wine, vegetable juices and fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 1455, 74-85, DOI: [10.1016/j.chroma.2016.04.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.066).
- [22] Magnusson B., Örnemark U. (eds.) (2014<sup>2</sup>). The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. (Eurachem Guide). Eurachem, Teddington, UK.
- [23] European Commission (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044). Official Journal of the European Union, L221, pp. 8-36. Retrieved May 17 2019, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32002D0657&qid=>.
- [24] Puntischer H., Cobankovic I., Marko D. et al. (2019). Quantitation of free and modified *Alternaria* mycotoxins in European food products by LC-MS/MS. *Food Control* 102, 157-165, DOI: [10.1016/j.foodcont.2019.03.019](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.019).
- [25] Bullerman L.B., A. Bianchini (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology* 119 (1-2), 140-146, DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035).
- [26] Siegel D., Feist M., Proske M. et al. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of agricultural and food chemistry* 58 (17), 9622-9630, DOI: [10.1021/jf102156w](https://doi.org/10.1021/jf102156w).
- [27] Puntischer H., Marko D., Warth B. (2019). The fate of altertoxin II during tomato processing steps at a laboratory scale. *Frontiers in Nutrition* 6:92, DOI: [10.3389/fnut.2019.00092](https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00092).
- [28] Fleck S.C., Burkhardt B., Pfeiffer E. et al. (2012). *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicology letters* 214 (1), 27-32, DOI: [10.1016/j.toxlet.2012.08.003](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.003).
- [29] Liu Y., Rychlik M. (2015). Biosynthesis of seven carbon-13 labeled *Alternaria* toxins including altertoxins, alternariol, and alternariol methyl ether, and their application to a multiple stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (5), 1357-1369, DOI: [10.1007/s00216-014-8307-5](https://doi.org/10.1007/s00216-014-8307-5).

- [30] Schwarz C., Tiessen C., Kreutzer M. et al. (2012). Characterization of a genotoxic impact compound in *alternaria alternata* infested rice as altertoxin II. Archives of Toxicology 86 (12), 1911-1925, DOI: [10.1007/s00204-012-0958-4](https://doi.org/10.1007/s00204-012-0958-4).
- [31] Puntischer H., Marko D., Warth B. (2020). First determination of the highly genotoxic fungal contaminant altertoxin II in a naturally infested apple sample. Emerging Contaminants 6, 82-86, DOI: [10.1016/j.emcon.2020.01.002](https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.01.002).
- [32] Puntischer H., Aichinger G., Grabher S. et al. (2019). Bioavailability, metabolism, and excretion of a complex *Alternaria* culture extract versus altertoxin II. A comparative study in rats. Archives of toxicology 93 (11), 3153-3167, DOI: [10.1007/s00204-019-02575-7](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02575-7).
- [33] Brugger E.-M., Wagner J., Schumacher D.M. et al. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. Toxicology letters 164 (3), 221-230, DOI: [10.1016/j.toxlet.2006.01.001](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.01.001).
- [34] Fleck S.C., Sauter F., Pfeiffer E. et al. (2016). DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 798-799, 27-34, DOI: [10.1016/j.mrgentox.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.02.001).
- [35] Lehmann L., Wagner J., Metzler M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. Food and Chemical Toxicology 44 (3), 398-408, DOI: [10.1016/j.fct.2005.08.013](https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.013).
- [36] Shigeura H.T., Gordon C.N. (1963). The biological activity of tenuazonic acid. Biochemistry 2 (5), 1132-1137, DOI: [10.1021/bi00905a039](https://doi.org/10.1021/bi00905a039).



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).  
Quest'opera è distribuita con [Licenza Creative Commons Attribuzione - Non commerciale 4.0 Internazionale](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).  
This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Für alle Abbildungen und Tabellen ohne Nennung des Urhebers gilt: © Versuchszentrum Laimburg.  
Per tutte le immagini e tabelle senza menzione dell'artefice vale: © Centro di Sperimentazione Laimburg.  
For all figures and tables without mention of the originator applies: © Laimburg Research Centre.